



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Priscila Gonçalves Moura

Metagenômica de Água de Reúso, Esgoto e Água Potável

Rio de Janeiro

2019

Priscila Gonçalves Moura

Metagenômica de Água de reúso, Esgoto e Água potável

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Adriana Sotero Martins

Coorientador: Dr. Rodrigo Jardim

Rio de Janeiro

2019

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – 310110016015PO.

Título do trabalho em inglês: Metagenomics of reuse water, sewage and drinking water.

Catálogo na fonte

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde

Biblioteca de Saúde Pública

M929m Moura, Priscila Gonçalves.
Metagenômica de água de reúso, esgoto e água potável / Priscila
Gonçalves Moura. — 2019.
171 f. : il. color. ; graf. ; tab

Orientadora: Adriana Sotero Martins
Coorientador: Rodrigo Jardim Monteiro da Fonseca.
Tese (Doutorado) -Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de
Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2019.

1. Água de Reuso. 2. Esgotos. 3. Metagenômica. 4. Biomarcadores
Ambientais. 5. Saúde Pública. 6. Água Potável. 7. Micropoluentes
I. Título

CDD – 23.ed. – 628.3

Priscila Gonçalves Moura

Metagenômica de água de reúso, Esgoto e Água potável

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em 06 de dezembro de 2019.

Banca Examinadora

Prof^ª Dr.^a, Anna Beatriz Robottom Ferreira
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Prof^ª Dr.^a, Elvira Carvajal
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof Dr., Antônio Nascimento Duarte
Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof^ª Dr.^a, Maria José Salles
Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof^ª Dr.^a, Adriana Sotero Martins (Orientadora)
Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof Dr., Rodrigo Jardim (Coorientador)
Instituto Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2019

"Dedico esse trabalho aos meus pais pelo apoio incondicional em todos os momentos difíceis da minha trajetória acadêmica. Sem eles nada seria possível."

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me fortalecido até aqui e sustentado os meus sonhos.

A minha família em especial minha mãe Edilma Moura e meu filho Bernardo Moura, por compartilharem das minhas angústias e compreenderem as renúncias necessárias para a conclusão deste curso, sempre acreditando na minha capacidade e apostando no meu sucesso.

Agradeço a minha querida orientadora Dra. Adriana Sotero Martins, por todos os ensinamentos, cuidado e carinho nas horas mais difíceis, por apostar nos meus sonhos e por me ensinar além da ciência, as lições da vida.

Ao meu querido orientador Dr. Rodrigo Jardim que me auxiliou na germinação das ideias e durante todo o processo de desenvolvimento desta presente tese, com quem compartilhei as minhas dúvidas e angústias a respeito do tema.

A Coordenação do Programa de Saúde Pública e Meio ambiente, gestão 2015 à 2019, Dra. Liliane Reis Teixeira e Dra. Ariane Leites Larentis por me proporcionarem o conhecimento não apenas acadêmico, mas também político, e por mostrarem a importância da afetividade na educação e no processo de formação profissional.

As minhas queridas amigas Dr^a. Rachel Lins, Dr^a. Raquel Hora, M^a Natasha Handam e M^a Elisa Cavalcanti, pelas valorosas contribuições físicas e intelectuais na elaboração desta pesquisa, amizade, companheirismo e otimismo.

Agradeço as minhas amigas e colegas de turma, em especial Danielle Carvalho, Giselle Goulart, Denise Lima, Bruna Pagliari, Adriana Pereira, Carla Patricia, Natália Lanzarini e ao querido Norberto Santos pelo companheirismo durante o curso de pós-graduação, tornando esta experiência muito mais prazerosa, com a certeza de que grandes foram os obstáculos, mas a vitória é nossa.

A agência financiadora CAPES e FAPERJ por financiarem os meus estudos e a Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, que forneceu todo o necessário para a minha formação acadêmica.

"Desistir, nunca foi uma opção"

MOURA, 2016.

RESUMO

O tema desse estudo é a qualidade e a utilização segura da água de reúso, tendo em vista que a água é um recurso natural limitado e sujeito a contaminação ambiental. Tecnologias alternativas visando o tratamento e refinamento do esgoto vem sendo desenvolvidas para ambas propostas para uso de fins potáveis e não potáveis. Porém, esta estratégia é questionável, pois micropoluentes de difícil detecção por metodologias tradicionais persistem na água de reúso, o que oferece risco à saúde pública. O objetivo deste trabalho foi avaliar a água de reúso, esgotos e água potável por meio de análise metagenômica do material genético. Foram realizadas análises por metagenômica do DNA total da microbiota presente em amostras de águas de reúso submetidas a diferentes tratamentos (cloro, membrana filtrante e filtro biológico), de esgoto tratado e água potável. As amostras também foram submetidas a análises colimétricas, físico-químicas e ensaios de PCR para a buscar de marcadores moleculares de poluição. Concluímos que as tecnologias utilizadas no Brasil não estão sendo capazes de retirar poluentes a nível de coliformes uma vez que contaminantes foram detectados em todas as amostras de água de reúso. Proteobactérias e Bacteriófagos foram os microrganismos mais abundantes nas matrizes ambientais estudadas. Recomendamos que a água de reúso tratada com cloro pode ser destinada para atividade de contato direto a humanos mas não indicado para atividades agrícolas ou paisagísticas, por causa da presença de fitopatógenos. Águas de reúso submetidas a tratamentos por membranas filtrantes e filtro biológico não são indicados em atividades de contato direto, sendo recomendado para fins agrícola em irrigação por gotejamento. A biodiversidade das espécies encontradas reforçam a necessidade das pesquisas envolvendo água de reúso, de modo a garantir a segurança sanitária para uso em diferentes fins. É urgente adequar a legislação nacional para que a água de reúso atenda a parâmetros de qualidade existentes em outros países, e que assegure o padrão sanitário de importância para a saúde pública.

Palavras-chave: água de reúso, esgoto, água potável, metagenômica, micropoluentes.

ABSTRACT

The Theme of this study is the quality and safe use of reused water, considering that water is a limited natural resource and subject to environmental contamination. Alternative technologies for sewage treatment and refinement have been developed for both potable and non-potable purposes. However, this strategy is questionable because micro pollutants that are difficult to detect by traditional methodologies persist in reused water, which poses a risk to public health. The objective of this work was to evaluate reuse water, sewage and drinking water through metagenomic analysis of the genetic material. Metagenomics analyzes were performed on the total DNA of the microbiota present in wastewater samples submitted to different treatments (chlorine, filter membrane and biological filter), treated sewage and drinking water. The samples were also subjected to collimetric analysis, physicochemical and PCR assays to search for molecular markers of pollution. We conclude that the technologies used in Brazil are not capable of removing pollutants at the coliform level, since contaminants were detected in all reused water samples. Proteobacteria and Bacteriophages were the most abundant microorganisms in the environmental matrices studied. We recommend that chlorine-treated wastewater may be intended for direct contact with humans but not suitable for agricultural or landscape activities because of the presence of phytopathogens. Reuse waters submitted to membrane and biological filter treatments are not indicated for direct contact activities, being recommended for agricultural purposes in drip irrigation. The biodiversity of the specimens found reinforces the need for research involving reused water to ensure health safety for use in different purposes. There is an urgent need to adapt national legislation so that reused water meets quality standards in other countries and to ensure the sanitary standard of importance to public health.

Keywords: reuse water, sewage, drinking water, metagenomics, micro-pollutants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1. Dados das coletas.....	60
Quadro 2. Presença dos marcadores moleculares nas amostras de reúso e água potável.....	71
Quadro 3. Diversidade Alfa.....	75
Quadro 4. Diversidade Beta.....	76
Quadro 5. Pesquisa no Krona Chart dos microrganismos pesquisados por ensaio de PCR....	99
Figura 2. Ilustração de estratégias usadas em metagenômica .	55
Figura 3. Eletroforese em géis de agarose.....	72
Figura 4: Curva de rarefação das amostras de esgoto.	74
Figura 5. Curva de rarefação das amostras de água de reúso..	75

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Representação da diversidade de vírus em reuso clorado	78
Gráfico 2: Procariotos de importância sanitária em reuso clorado.....	79
Gráfico 3: Representação da diversidade de vírus em reuso polido.....	81
Gráfico 4: Procariotos de importância sanitária em reuso polido	82
Gráfico 5. Representação da diversidade de vírus em reuso biológico	83
Gráfico 6: Procariotos de importância sanitária em reuso biológico.....	84
Gráfico 7: Representação da diversidade de vírus em água potável	86
Gráfico 8: Procariotos de importância sanitária em água potável	87
Gráfico 9: Representação da diversidade de vírus em esgoto polido	89
Gráfico 10: Procariotos de importância sanitária em esgoto polido.....	90
Gráfico 11: Representação da diversidade de vírus em esgoto biológico	91
Gráfico 12: Procariotos de importância sanitária em esgoto biológico.....	92
Gráfico 13: Comparação entre esgoto polido e reuso polido (gênero).....	93
Gráfico 14: Comparação esgoto biológico e reuso biológico (gênero).....	94
Gráfico 15: Comparação entre os reusos polido, clorado e biológico (gênero)	95
Gráfico 16: Comparação entre reuso polido e reuso clorado (gênero).....	96
Gráfico 17: Comparação dos procariotos de importancia sanitária entre esgoto polido e reuso polido.....	97
Gráfico 18: Comparação dos procariotos de importância sanitária entre esgoto biológico e reuso biológico	97
Gráfico 19: Comparação dos procariotos de importância sanitária entre os reusos clorado, biológico e polido	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação dos tipos de uso de água de reúso no Brasil	35
Tabela 2. Relação dos tipos de uso de água de reúso por países pesquisados.....	38
Tabela 3. Tabela comparativa dos parâmetros Brasil x Diversos Países.....	40
Tabela 4. Riscos relacionados ao uso de água de reúso e doenças associadas.....	47
Tabela 5. Riscos relacionados ao esgoto e doenças associadas.....	48
Tabela 6. Resultados dos parâmetros colimétricos em água de reúso.....	66
Tabela 7. Resultado dos parâmetros físico-químicos em águas de reúso e potável	68
Tabela 8. Resultados dos parâmetros colimétricos em esgotos.....	69
Tabela 9. Resultado dos parâmetros físico - químicos avaliados para esgoto polido	70
Tabela 10. Resultado da quantificação de DNA.....	73
Tabela 11. Representação cinco gêneros mais abundantes em reúso clorado.....	76
Tabela 12. Vírus mais abundantes em reúso clorado	77
Tabela 13. Representação dos cinco gêneros mais abundantes em reúso polido	79
Tabela 14: Vírus mais abundantes em reúso polido.....	80
Tabela 15: Representação dos cinco gêneros mais abundantes em reúso biológico	82
Tabela 16. Vírus e bacteriófagos mais abundantes em reúso biológico.....	83
Tabela 17: Representação dos cinco gêneros mais abundantes em água potável	85
Tabela 18: Vírus mais abundantes em água potável.....	85
Tabela 19: Representação dos cinco gêneros mais abundantes em esgoto polido	87
Tabela 20. Vírus e mais abundantes em esgoto polido.....	88
Tabela 21: Representação dos cinco gêneros mais abundantes em esgoto biológico	90
Tabela 22: Vírus mais abundantes em esgoto biológico	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABES	Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
APHA	American Public Health Association, Associação Americana de Saúde Pública
CESAN	Companhia Espírito Santense De Saneamento
CNRH	Conselho Nacional de Recursos Hídricos
CONERH	Conselho Estadual de Recursos Hídricos
CT	Coliformes Totais
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DSSA	Departamento de Saúde e Saneamento Ambiental
EC	<i>Escherichia coli</i>
ENSP	Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca
EPA	Environmental Protection Agency
ETAR	Estação de Tratamento de Águas E Resíduos
ETE	Estação de Tratamento de Esgotos
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
GOS	Global Ocean Sampling Expedition
HPYV	Polyomavírus Humano
PPM	Partes Por Milhão
UV	Ultra Violeta
IEMA	Instituto Estadual De Meio Ambiente E Recursos Hídricos
mDNA	DNA Metagenômico
MS	Ministério da Saúde
NCBI	National Center For Biotechnology Information
NGS	Sequenciamento De Nova Geração
NMP	Números Mais Prováveis
OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde / World Health Organization
ONU	Organização das Nações Unidas
Plansab	Plano Nacional de Saneamento Básico
PROLAGOS	Concessionária de serviço público de água e esgoto

Prosab	Programa de Pesquisas em Saneamento Básico
rDNA	DNA Ribossomal
RSU	Resíduos Sólidos Urbanos
SAAE	Serviço Autônomo de Água e Esgoto
SHU	Síndrome Hemolítico-Urêmica
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2. ÁGUA DE REÚSO	18
2.1 CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO	18
2.2 TIPOS DE TRATAMENTO DE ÁGUA DE REÚSO	24
2.3 ÁGUAS DE REÚSO NO BRASIL.....	26
2.4 ÁGUAS DE REÚSO NO MUNDO.....	36
3. SANEAMENTO E SAÚDE	41
3.1. RISCOS RELACIONADOS COM SAÚDE PÚBLICA E MEIO AMBIENTE	44
3.2 RISCO BIOLÓGICO E BIOINDICADORES	45
4. ESTUDO DA DIVERSIDADE MICROBIANA.....	49
4.1 ANÁLISE DA DIVERSIDADE MICROBIANA.....	49
4.2 PADRÕES E MÉTODOS TRADICIONAIS PARA ANÁLISE DA QUALIDADE DAS ÁGUAS	50
4.3 EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS AMBIENTAIS	51
4.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA A BUSCA DE MARCADORES MOLECULARES DE POLUIÇÃO	52
4.5 METAGENÔMICA.....	53
4.6 BIOINFORMÁTICA	56
5. OBJETIVOS	58
5.1 OBJETIVO GERAL	58
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	58
6. METODOLOGIA.....	59
6.1 COLETAS DAS AMOSTRAS	59
6.1.1 Tipos de amostras	59
6.2 ANÁLISES COLIMÉTRICAS	61
6.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	61
6.4 FILTRAGEM E EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL	62
6.5 QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO DNA METAGENÔMICO	62
6.6 ENSAIOS MOLECULARES POR PCR	63
6.7. PREPARO DE BIBLIOTECAS E SEQUENCIAMENTO DE ALTO DESEMPENHO.....	64
6.8 ANÁLISES DE METAGENOMAS	64

7. RESULTADOS	66
7.1- ANÁLISES TRADICIONAL DA ÁGUA DE REÚSO.....	66
7.1.1 Análises colimétricas da água de reúso e água potável.....	66
7.1.2 Análises físico-químicas da água de reúso e água potável.....	68
7.2- ANÁLISES TRADICIONAIS DO ESGOTO	69
7.2.1 Análises colimétricas dos esgotos	69
7.2.2 Análise físico-química dos esgotos	70
7.3 DETECÇÃO POR PCR DOS MARCADORES MOLECULARES DE POLUIÇÃO ASSOCIADOS À HUMANOS	71
7.4 QUANTIFICAÇÃO DE DNA METAGENÔMICO NO QUIBIT E QUALIDADE DO SEQUENCIAMENTO	72
7.5 AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE ECOLÓGICA ALFA, BETA E CURVA DE RAREFAÇÃO.....	73
7.6 ANÁLISE DESCRITIVA DOS METAGENOMAS	76
7.6.1 Análises do metagenoma do reúso clorado	76
7.6.2 Análises do metagenoma reúso polido	79
7.6.3 Análises do metagenoma reúso biológico	82
7.6.4 Análises do metagenoma água potável.....	84
7.6.5 Análises do metagenoma para esgoto polido	87
7.6.6. Análises do metagenoma esgoto biológico	90
7.7 ANÁLISES COMPARATIVAS DOS METAGENOMAS	92
7.7.1 Análise comparativa entre a diversidade encontrada no esgoto polido e reúso polido ...	92
7.7.2 Análise comparativa entre a diversidade encontrada no esgoto biológico e reúso biológico.....	93
7.7.3 Análise comparativa entre a diversidade encontrada em amostras de água de reúso....	94
7.8 ANÁLISE COMPARATIVA DE IMPORTÂNCIA SANITÁRIA.....	96
7.8.1 Análise comparativa entre esgoto polido e reúso polido com ênfase em procariotos de importância sanitária.....	96
7.8.2 Comparação entre esgoto biológico e reúso biológico com ênfase em procariotos de importância sanitária.....	97
7.8.3 Comparação entre reúsos com ênfase em procariotos de importância sanitária	98
7.9 MICRORGANISMOS ANALISADOS POR PCR E ENCONTRADOS NOS METAGENOMAS.....	99
8. DISCUSSÃO	100
8.1 ANÁLISE TRADICIONAL DE MATRIZES DE ÁGUAS E ESGOTO	100

8.2 ANÁLISE MOLECULARES EM REÚSOS.....	107
8.3 ANÁLISES DESCRITIVA DOS METAGENOMAS	108
8.4 ANÁLISES COMPARATIVAS DOS METAGENOMAS	115
9. CONCLUSÃO.....	118
10. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	121
REFERÊNCIAS	122
APÊNDICE	136
1 INICIADORES UTILIZADOS NA PCR	136
2 PROTOCOLOS DAS REAÇÕES DE PCR.....	137
3 CICLOS DE AMPLIFICAÇÃO	138
ARTIGO 1: CONCEPTS AND CLASSIFICATION FOR WATER REUSE.....	139
ARTIGO 2: ÁGUA DE REÚSO: UMA ALTERNATIVA SUSTENTÁVEL PARA O BRASIL.	144

1 INTRODUÇÃO

A água é um direito essencial à vida (ONU, 2010), portanto é uma questão prioritária em saúde pública. Preservar e conservar a água em qualidade e quantidade é proteger o direito à saúde, estabelecendo o direito de todos a um ambiente equilibrado e a qualidade de vida sadia (BRASIL, 1988). No entanto, a garantia à água é ameaçada por questões como crescimento populacional e aumento da demanda de consumo tanto para usos urbanos, como rural, acesso e distribuição desigual das fontes hídricas, mudanças climáticas, poluição química e contaminação biológica. Esse panorama limita a disponibilidade hídrica para o consumo humano, o que torna a água, que é um produto natural renovável, um recurso natural finito (ROLIM *et al.*, 2016).

Em muitas regiões do mundo, a população ultrapassou o ponto que podia ser abastecida pelos recursos hídricos disponíveis (MANCUSO; SANTOS, 2003). Atualmente, 4 bilhões de pessoas sofrem com escassez hídrica grave pelo menos 1 mês no ano. O stress hídrico continua aumentando já que a demanda/uso cresce 1% ao ano desde 1980 (UNESCO, 2019).

No Brasil, é histórico a seca na região nordeste, fazendo milhares de famílias migrarem para outras regiões e grandes centros urbanos. Em 2014, a região sudeste sofreu uma crise hídrica provocada pela intermitência das chuvas, onde o sistema Cantareira em São Paulo teve em seus reservatórios os níveis de água mais baixos da sua história.

Esse cenário aqueceu as discussões sobre água de reúso e a possibilidade de se disponibilizar esse tipo de água para a população. Reusar água ou a denominação "água de reúso", há alguns anos considerada como uma opção exótica, hoje é uma das principais estratégias de gestão das águas e uma alternativa que não pode ser descartada (MANCUSO; SANTOS, 2003; MOURA *et al.*, 2019).

Rio de Janeiro, São Paulo, Bahia e Ceará são alguns dos estados brasileiros que se anteciparam em fazer as suas legislações estaduais e/ou municipais, afim de regular e incentivar a utilização de água de reúso (MOURA *et al.*, 2020). Essas medidas ajudam na conservação dos recursos hídricos e minimizam o uso de águas nobres (potável) em

outros fins que não o do consumo humano, frente a possibilidade de uma crise hídrica. Alguns exemplos de uso são: na agricultura, indústria, descarga de sanitários, limpeza de pisos e logradouros, combate a incêndio entre outros. No entanto, não há uma legislação nacional que regule sobre a água de reúso e que defina critérios de padrões de qualidade (MOURA *et al.*, 2019).

Embora existam diversas aplicações para a água de reúso, ainda há questionamentos científicos relacionados à segurança do uso desse tipo de água, em função da sua composição. Apesar do avanço das tecnologias de obtenção da água de reúso, micropoluentes podem persistir às etapas de tratamento devido ao grande volume de água tratada diariamente (SCARPA *et al.*, 2011) e a própria resistência dos microrganismos a essas metodologias. Dentre eles, microrganismos não cultiváveis como vírus, bacteroides, metanobactérias e outros indicadores de poluição por fontes humanas (MOURA, 2015).

O avanço da ciência tem fornecido tecnologias que nos permite responder perguntas biológicas cada vez mais complexas. A metagenômica é um campo da ciência que possibilita estudar ácidos nucleicos de qualquer microrganismo, cultivável ou não cultivável, para o estudo da biodiversidade de qualquer tipo de amostra.

O diferencial desse trabalho em relação aos estudos de metagenômica, que visam à avaliação da biodiversidade ambiental, foi a utilização da metagenômica para avaliar a diversidade de contaminantes em diferentes matrizes de água de reúso, desde a sua origem enquanto esgoto sanitário, até o produto final como reúso. Além de conhecer os microrganismos que estão persistindo as etapas de tratamento, comparados com a água potável. Desta forma os resultados desse estudo poderão contribuir com a formulação de indicadores para fomento de legislação específica para este resíduo. Este estudo foi pioneiro no país, e poderá oferecer perspectivas para uma mudança nas políticas públicas voltadas para águas e efluentes. A ciência tem o compromisso de fornecer dados para amparar as leis que regulam a utilização de água de reúso no Brasil, em especial ao tocante a qualidade sanitária e assegurando que não haja danos à saúde pública e ao ambiente.

2. ÁGUA DE REÚSO

2.1 CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO

A escassez hídrica é um problema de regiões áridas, semi-áridas e de outras regiões com recursos hídricos abundantes, mas insuficientes para satisfazer demandas elevadas de consumo (HESPANHOL, 2002a). Com o consenso mundial sobre a problemática da escassez de água potável no mundo, o tema reúso de água tem sido discutido desde a década de 60 do século passado (BUCHMANN; PROCHNOW, 2016).

A Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e o Desenvolvimento (Eco 92), através da Agenda 21 dedicou importância especial ao reúso, recomendando aos países participantes a implementação de políticas de gestão dirigidas para o uso e reciclagem de efluentes, integrando proteção da saúde pública de grupos de risco com práticas ambientais adequadas (HESPANHOL, 2002).

A utilização de água de reúso, importante estratégia de gestão das águas, possibilita que a oferta de água potável seja destinada para fins essenciais enquanto que a de reúso seja direcionada para outros fins, tais como atividades agrícolas, irrigação paisagística e limpeza urbana (PINTO *et al.*, 2014).

O conceito de água de reúso assim como sua classificação é discutida por diversos autores, mas é consenso que sua origem é o esgoto, seja sanitário ou efluente industrial. Lavrador Filho (1987) descreve que a água de reúso é o aproveitamento de águas previamente utilizadas, uma ou mais vezes, em alguma atividade humana, para suprir as necessidades em outros usos benéficos, inclusive o original. A resolução nº 54 do Conselho Nacional de Recursos Hídricos (2005), define água de reúso como água residuária, que se encontra dentro dos padrões exigidos para sua utilização nas modalidades pretendidas. A Companhia PROLAGOS S.A., concessionária de serviço público de água e esgoto (PROLAGOS, 2015) cita que a água de reúso é a proveniente de uma técnica de refinamento do esgoto tratado e polido. Barros *et al.* (2015), define que água de reúso é a reutilização de águas, estas provenientes de efluentes tratados.

Contudo a denominação do termo "água de reúso" confunde-se, no popular, com o aproveitamento de águas pluviais. É essencial frisar que a água de chuva não é considerada água de reúso. O aproveitamento da água pluvial pode ser um instrumento muito importante para gestão dos recursos hídricos. Apesar disso, não deve ser confundida como água de reúso, pois, após passar pelo ciclo hidrológico natural, esta água captada em reservatório terá sua primeira utilização (FIORI; FERNANDES; PIZZO, 2005).

A classificação da água de reúso é discutida por diferentes autores desde 1973, sendo considerada quanto ao uso final, quanto ao método de tratamento (RODRIGUES, 2005) e mais recentemente quanto a origem do reúso (MOURA *et al.*, 2019).

A Organização Mundial de Saúde – OMS (WHO, 1973) define que a água de reúso pode ser classificada como reúso direto, reúso indireto e reciclagem interna:

Reúso direto: é o uso planejado e deliberado de esgotos tratados para certas finalidades como irrigação, uso industrial, recarga de aquífero e água potável;

Reúso indireto: ocorre quando a água que foi usada, uma ou mais vezes para o uso doméstico ou industrial, é descarregada nas águas superficiais ou subterrâneas e utilizada novamente a jusante de forma diluída;

Reciclagem interna: é o reúso da água internamente a instalações industriais, tendo como objetivo a economia de água e o controle da poluição;

Reúso indireto intencional: é devido ao descarte planejado de efluente a montante ou ao descarte planejado de reservas de água subterrânea;

Reúso indireto não intencional: ocorre amplamente quando como um resultado de uso da água de rio na agricultura, para recreação e para fontes de águas industriais.

Westerhoff (1984), classifica água de reúso em categorias quanto a sua potabilidade:

Reúso potável direto: quando o esgoto recuperado, por meio de tratamento avançado, é diretamente reutilizado no sistema de água potável;

Reúso potável indireto: quando o esgoto, após o tratamento, é disposto na coleção de águas superficiais ou subterrâneas para diluição, purificação natural e subsequente captação, tratamento e finalmente utilizado como água potável;

Reúso não potável para fins agrícolas: quando se tem o objetivo de uso na irrigação de plantas alimentícias e não alimentícias, além de ser aplicada na dessedentação de animais.

Reúso não potável para fins industriais: abrange os usos industriais de refrigeração, águas do processo, para a utilização em caldeiras e etc;

Reúso não potável para fins recreacionais: Classificação reservada à irrigação de plantas ornamentais, campos de esporte, parques e para enchimento de lagoas ornamentais e recreacionais;

Reúso não potável para fins domésticos: são considerados os casos de reúso de água para rega de jardins residenciais, para descargas sanitárias e a utilização desse tipo de água em grandes edifícios;

Reúso não potável para manutenção de vazões: A manutenção de vazões de cursos de água promove utilização planejada de efluentes tratados, visando uma adequada diluição de cargas poluidoras a eles carreadas;

Reúso não potável para aquicultura: consiste na produção de peixes e plantas aquáticas visando à obtenção de alimentos e/ou energia, utilizando-se nutrientes presentes nos efluentes tratados;

Recarga de aquíferos subterrâneos: É a recarga de aquíferos subterrâneos com efluentes tratados, podendo ser da forma direta ou indireta.

As definições de Westerhoff foram adotadas pela Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental (ABES) pela praticidade e facilidade dessa classificação (MANCUSO; SANTOS, 2003).

Em 1987 para efeito de informação de linguagem, Lavrador Filho sugere as terminologias:

Reúso indireto planejado de água: ocorre quando os efluentes, depois de convencionalmente tratados, são descarregados de forma planejada nos corpos d'água superficiais ou subterrâneos, para serem utilizados a jusante em sua forma diluída e de maneira controlada, no intuito de algum uso benéfico;

Reúso indireto não planejado de água: ocorre quando a água, que foi utilizada uma ou mais vezes em alguma atividade humana, é descarregada no meio ambiente e novamente utilizada a jusante de forma diluída, de maneira não intencional e não controlada. Nesse caso, o reúso da água é um subproduto não intencional da descarga de montante. Após sua descarga no meio ambiente, o efluente será diluído e sujeito a processos como autodepuração, sedimentação, entre outros além de eventuais misturas de outros despejos advindos de diferentes atividades humanas;

Reúso planejado de água: ocorre quando o reúso é resultado de uma ação humana consciente, adiante do ponto de descarga do efluente a ser usado de uma forma direta ou indireta. O reúso planejado das águas pressupõe a existência de um sistema de tratamento de efluentes que atenda a padrões de qualidade requeridos pelo novo uso a que se deseja fazer da água. Podendo ser também denominado como "reúso intencional da água";

Reúso direto planejado de água: ocorre quando os efluentes, após devidamente tratados, são encaminhados diretamente de seu ponto de descarga até o local de reúso. Assim, sofrem em seu percurso os tratamentos adicionais e armazenamentos necessários, mas não são descarregados no meio ambiente.

Reciclagem de água: é o reúso interno da água, antes de sua descarga em um sistema geral de tratamento ou outro local de disposição, para servir como fonte suplementar de abastecimento do uso original. É um campo particular do reúso direto.

A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) nº 13.969/97 (ABNT, 1997), apresenta a classificação desenvolvida por Lavrador filho (1987) e traz ainda a definição reúso local:

Reúso local: esgoto de origem doméstica ou com características similares tratado, deve ser reutilizado para fins que exigem qualidade de água não potável, mas sanitariamente segura, tais como, irrigação, lavagem de pisos e dos veículos automotivos, descargas de vasos sanitários, manutenção paisagística dos lagos e canais, pastagens, entre outros. O tipo de reúso pode abranger desde a simples recirculação de água de enxágue da máquina de lavagem, com ou sem tratamento aos vasos sanitários, até uma remoção em alto nível de poluentes para lavagens de carros.

O Conselho Nacional de Recursos Hídricos (CNRH, 2006) considera ainda que:

Reúso direto de água: é o uso planejado de água de reúso, conduzida ao local de utilização, sem lançamento ou diluição prévia em corpos hídricos superficiais ou subterrâneo;

Reúso direto não potável: nas modalidades de reúso para fins urbanos, reúso para fins agrícolas e florestais, reúso para fins ambientais, reúso para fins industriais e reúso na aquicultura.

O CNRH (2006) cita que as modalidades de reúso não são mutuamente excludentes, podendo mais de uma delas ser empregada simultaneamente em uma

mesma área. Determina, ainda, que as diretrizes, critérios e parâmetros específicos para as modalidades de reúso não potável definidas nos incisos de seu artigo serão estabelecidos pelos órgãos competentes. No entanto, isso ainda não foi deliberado. Apenas uma modalidade teve avanços, descrita na Resolução CNRH nº 121 (2010), que estabeleceu as diretrizes e critérios para a prática de reúso direto não potável de água nas modalidades agrícola e florestal. Portanto, há necessidade de agilizar as resoluções das demais modalidades.

A legislação estadual do Ceará nº 16.033 de 2016 (GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ, 2016), trouxe ainda a seguinte classificação:

Reúso de água não potável – utilização de água residuária;

Reúso interno: como o uso interno de água de reúso proveniente de atividades realizadas no próprio empreendimento;

Reúso externo: como o uso de efluentes tratados provenientes das estações administradas por prestadores de serviços de saneamento básico ou terceiros, cujas características permitam sua utilização.

Com isso, Moura *et al.* (2019) propuseram uma classificação mais atualizada, de acordo com a origem da água de reúso:

Reúso local ou interno: o proveniente de águas cinzas a partir de reúso residencial (casa ou prédio) e reúso de novos empreendimentos comerciais ou não. As águas cinzas consistem nas águas de pias, chuveiros e máquinas de lavar, excluindo águas de vaso sanitário (águas negras) (FIORI; FERNANDES; PIZZO, 2005);

Reúso externo: o proveniente de águas negras (esgoto bruto) a partir de estações tratamento de esgoto (ETE) e que passam na sequência por estações de tratamento de água de reúso (ETE+ETAR). Considerando que de acordo com (GONÇALVES, 2009), as águas negras são efluentes provenientes dos vasos sanitários, contendo basicamente fezes, urina e papel higiênico ou proveniente de dispositivos separadores de fezes e urina, tendo em sua composição

grandes quantidades de matéria fecal e papel higiênico, por isto apresentam elevada carga orgânica e a presença de sólidos em suspensão, em grande parte sedimentáveis;

Reúso industrial: o proveniente de águas a partir de atividades industriais do próprio empreendimento (reúso direto interno) ou a partir de reúso externo.

Essa classificação apoia a tese de que de acordo com a origem da água de reúso, ela deverá ter parâmetros de qualidade adequados a suas características e assim garantir um destino seguro, sem colocar em risco quem a utiliza (MOURA *et al.*, 2019).

2.2 TIPOS DE TRATAMENTO DE ÁGUA DE REÚSO

A tecnologia de água de reúso é subentendida como um tratamento de maior ou menor grau, dependendo dos fins a que se destina a água e de como ela tenha sido usada anteriormente (MANCUSO; SANTOS, 2003). Para se chegar ao produto final, água de reúso, o esgoto sanitário é submetido a Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) e a Estações de Tratamento de Água de Reúso (ETAR). Nas companhias de saneamento de grande porte, geralmente o esgoto passa pelas etapas de tratamento em ETE que consistem em: tratamento preliminar (remoção de sólidos grosseiros, areia e gordura); tratamento primário (sedimentação, flotação, digestão do lodo, secagem do lodo); tratamento secundário (filtração biológica, lodos ativados, decantação intermediária ou final, lagoa estabilização aeróbia); tratamento terciário (lagoas de maturação, remoção de nutrientes, filtração final, desinfecção) (JORDÃO; PESSÔA, 2011). É comum em regiões com menos recursos esse tratamento ir apenas até a etapa secundária (MANCUSO; SANTOS, 2003). Após avaliação microbiológica e físico-química, o esgoto tratado está pronto para retornar ao ambiente para fins balneáveis.

Para se tornar água de reúso, o esgoto tratado é submetido às etapas da ETAR. Existem diferentes tecnologias para o tratamento de água de reúso. O tratamento pode ser por membranas semi-permeáveis com estruturas de macroporos, mesoporos e microporos, que visam a remoção de materiais indesejáveis. As membranas utilizadas dependem das características do produto de entrada (esgoto tratado), do tipo de

impureza a ser removida e da eficiência de remoção desejada (MANCUSO; SANTOS, 2003). Essa técnica pode ser incorporada em três etapas de purificação: filtração, ultrafiltração e osmose reversa (PROLAGOS, 2015). As membranas de diferentes porosidades garantem reter qualquer microrganismo maior que 0,22 μm (sólidos suspensos, bactérias, protozoários), as etapas de osmose reversa removem os vírus, produtos farmacêuticos e minerais dissolvidos. Em alguns processos são incorporadas etapas de limpeza com peróxido e luz ultravioleta, a fim de dissolver quaisquer resíduos de produtos farmacêuticos e cancerígenos. Para uso potável, além das etapas citadas, o produto final é disposto nos corpos hídricos de forma planejada e após um tempo determinado, passando pelos ciclos hidrológicos naturais, a água de reúso pode ser novamente captada e tratada como água potável (SCHWARTZ, 2015).

Outra possibilidade é a adição de cloro ao produto final do esgoto tratado (OKUN, 1990) ou tecnologias alternativas como o tratamento biológico (MANCUSO; SANTOS, 2003). O tratamento por filtro biológico, processo de tratamento secundário, consiste na filtração do esgoto por pedras, cascalhos e areias de diferentes porosidades. Consideramos aqui, o modelo desenvolvido por Santiago *et al.* (2012) onde utiliza-se o reaproveitamento de águas cinzas na transformação em água de reúso, empregado em modelos de agricultura familiar. A água cinza coletada, é direcionada por tubulações até uma caixa de gordura com gradeamento. Nessa etapa os sólidos maiores são retidos, separa-se o sólido-líquido e gordura, funcionando como um tratamento preliminar. A segunda etapa é o tratamento biológico em si, que por gravidade a água cinza é filtrada por um sistema de filtro biológico que contém camadas de material orgânico (húmus com minhocas e serragem de madeira) e camadas de material inorgânico (areia, brita e seixo rolado). Em seguida a água é encaminhada para um tanque de reúso, onde é armazenada e pode ser bombeada para o sistema de irrigação por gotejamento (SANTIAGO *et al.*, 2012, 2015).

As técnicas apresentadas, são as comumente empregadas no Brasil, sendo essas que deram origem as amostras analisadas por esse estudo. Porém, existem outras técnicas como lagoas de estabilização (aeradas, aeróbias, aeradas facultativas, anaeróbicas, facultativas, maturação), lodos ativados, processo de nitrificação biológica, de desnitrificação biológica, processo de coagulação, floculação e sedimentação, processo de recarbonatação, filtros entre outros (MANCUSO; SANTOS, 2003).

2.3 ÁGUAS DE REÚSO NO BRASIL

Atualmente no Brasil, quase toda água retirada no processo de tratamento do esgoto é jogada fora. As grandes capitais brasileiras como Rio de Janeiro e São Paulo, utilizam água de reúso para a limpeza de logradouros, sanitários em shopping center, irrigação paisagística e de áreas esportivas, atividades agrícolas, em lava jatos e em atividades industriais. A utilização de água de reúso diminui o consumo de águas nobres (água potável), economiza cerca de 30% de água potável nas edificações residenciais e reduz até 30% da produção de esgoto, podendo ser utilizada em descargas, na limpeza urbana, em lavagem de veículos, em regas agrícolas ou em jardins urbanos (ABNT n° 13.969/97). Além disto, a água de reúso pode ser utilizada para fins industriais o que reduz a utilização de água potável nos processos industriais que não requerem este tipo de recurso como resfriamento de máquinas e altos-fornos, corte de rochas ornamentais, limpeza de plantas industriais, dentre outros e atividades agrícolas de grande porte.

Hespanhol (2002) demonstra que com o uso de água de reúso na rega agrícola, a produção de insumos alimentares aumenta expressivamente e reduz os gastos com adubos e fertilizantes por causa dos nutrientes disponíveis nesta água (modelo de agricultura sustentável, agricultura familiar). Isto representa um forte impacto na economia e no consumo de água disponível no planeta pois segundo dados do Fundo das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2019), 69% do consumo de água é destinado para agricultura, 19% consumido pela indústria e apenas 12 % utilizado para o consumo humano.

No Brasil, não há uma legislação específica para água de reúso que garanta a qualidade desta, a nível colimétrico e físico-químico para as diferentes possibilidades de destinação.

A Associação brasileira de normas técnicas, na norma ABNT n° 13.969/97, fornece instruções para “reúso de água servida” ou de esgotos tratados. Essa normativa define parâmetros de avaliação da qualidade da água de reúso de acordo com a classe de uso, seja para lavagem de carros, lavagem de pisos, uso em vaso sanitário e rega de

hortaliças. Define também como acondicionar e distribuir de forma segura, assim como alerta para o risco à saúde pública pelo contato direto do usuário com a água de reúso. Os parâmetros englobados por esta normativa, não encontram em concordância plena com as legislações vigentes para balneabilidade disposta na resolução CONAMA n° 274 (BRASIL, 2001) e potabilidade conforme a Portaria de consolidação n° 5 do Ministério da Saúde (MS) (BRASIL, 2017), além disto, não há uma relação de parâmetros que seja aplicado para a todas as classes:

Classe 1 – Lavagem de carros e outros usos que requerem contato direto do usuário com a água.

- Turbidez – inferior a 5 unidades (U);
- Coliforme fecal – inferior a 200 números mais prováveis (NMP) / 100 mL;
- Sólidos dissolvidos totais inferior a 200 mg/L;
- pH entre 6,0 e 8,0;
- Cloro residual entre 0,5 mg/L e 1,5 mg / L.

Os valores físico-químicos em conformidade com os parâmetros da portaria de consolidação n°5 do MS (BRASIL, 2017) para a potabilidade e os colimétricos em conformidade como níveis excelentes de acordo com a resolução CONAMA n° 274 para a balneabilidade (BRASIL, 2001).

Classe 2 - Lavagens de pisos, calçadas e fins paisagísticos.

- Turbidez – inferior a 5 U;
- Coliforme fecal – inferior a 500 NMP/100 mL;
- Cloro residual superior a 0,5 mg/L.

O valor máximo permitido de cloro residual permitido para potabilidade é 2 mg/L (BRASIL, 2017). Os níveis de coliformes estão em conformidade para a balneabilidade (BRASIL, 2001).

Classe 3 – Reúso nas descargas dos vasos sanitários.

- Turbidez inferior a 10 U;
- Coliforme fecal – inferior a 500 NMP/100 mL.

O valor máximo permitido de turbidez é de 5 U para potabilidade (BRASIL, 2017). Os níveis de coliformes estão em conformidade para a balneabilidade (BRASIL, 2001).

Classe 4 – Reúso nos pomares, cereais, forragens, pastagens para gados e outros cultivos através de escoamento superficial ou sistema de irrigação pontual.

- Coliforme fecal – inferior a 5000 NMP/100 mL;
- Oxigênio dissolvido acima de 2 mg/L.

Os valores descritos para classe 4 não se enquadram em nenhuma das legislações citadas. A falta de legislação específica dificulta a aplicação da água de reúso no país, devido a falta de orientações técnicas para a implantação dos sistemas de reúso e a respectiva fiscalização de tais sistemas.

Entre os objetivos da Política Nacional de Recursos Hídricos (1997) onde diz que "devemos assegurar à atual e às futuras gerações, a necessária disponibilidade de água, em padrões de qualidade adequados aos respectivos usos", a realidade demonstra que não tem sido possível identificar todas as atividades de reúso de água no Brasil, sendo utilizada para fins agrícolas em algumas regiões de maneira informal sem garantir a segurança ambiental e a saúde pública. Torna-se cada vez mais necessário institucionalizar, regulamentar e promover este setor através da criação de estruturas de gestão, preparação de legislação, disseminação de informação, e do desenvolvimento de tecnologias compatíveis com as condições técnicas, culturais e socioeconômicas brasileiras (ANA, 2017).

O Projeto de lei nº 58 de 2015 (SENADO FEDERAL), dispõe sobre abastecimento de água por fontes alternativas abrangendo as modalidades:

Reúso doméstico potável: utilização de água de reúso para ingestão, preparação de alimentos e higiene pessoal, em área urbana ou rural;

Reúso doméstico não potável: utilização de água de reúso para fins domésticos, exceto o potável, em área urbana ou rural;

Reúso urbano: utilização de água de reúso para fins não potáveis, tais como irrigação paisagística, lavagem de logradouros públicos e veículos, desobstrução de tubulações, construção civil, edificações e combate a incêndio, em área urbana;

Reúso agrícola: aplicação de água de reúso para produção agropecuária;

Reúso florestal: aplicação de água de reúso para o cultivo de espécies florestais;

Reúso industrial: utilização de água de reúso em processos, atividades e operações industriais;

Reúso aquicultura: utilização de água de reúso para criação de animais ou cultivo de vegetais aquáticos.

Este projeto de lei obriga o abastecimento por fontes alternativas para as novas edificações residenciais, comerciais, industriais e as edificações, públicas ou privadas, construídas com recursos da União ou das agências federais de crédito. O artigo 13º diz que os serviços públicos de irrigação paisagística e lavagem de vias e logradouros em áreas de domínio público deverão utilizar, parcial ou totalmente, água de reúso ou de chuva como fonte de abastecimento.

No sudeste, o estado do Rio de Janeiro, com a lei nº 7424 de 24 de agosto de 2016 (GOVERNO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, 2016) obriga à utilização de água de reúso não potável pelos órgãos integrantes da administração pública estadual direta, das autarquias, das fundações instituídas ou mantidas pelo poder público, das empresas em cujo capital do estado do Rio de Janeiro tenha participação, bem como pelas demais entidades por ele controladas direta ou indiretamente. Sinaliza, ainda, que outros critérios podem ser estabelecidos em regulamentação posterior. Também, que a água de reúso pode ser utilizada para as seguintes finalidades:

- I –Agricultura em geral;
- II - irrigação de áreas verdes, parques, jardins, áreas turísticas, campos de esporte;
- III -lavagem de veículos públicos de qualquer tipo;
- IV -lavagem de pisos, pátios e logradouros públicos;
- V - outros usos similares.

Além desta, o estado do Rio de Janeiro tem a lei n° 7599 de 2017, que dispõe sobre a obrigatoriedade das indústrias instaladas no estado possuírem equipamentos de tratamento e reutilização de água. As indústrias que tiverem em seus quadros 100 (cem) ou mais empregados, ficam obrigadas a instalar equipamentos de tratamento e reutilização de água. As indústrias que não cumprirem a determinação contida no art. 1º desta Lei não poderão:

- I – Receber nenhum benefício e/ou incentivo do Estado do Rio de Janeiro;
- II – Ser contratadas pelo Estado do Rio de Janeiro;
- III – firmar convênios ou instrumentos similares com o Estado do Rio de Janeiro".

A obtenção de qualquer benefício e/ou incentivo estadual, bem como a contratação ou fimação de convênio com o Estado do Rio de Janeiro dependerá da apresentação de certidão expedida pelo órgão fiscalizador competente, comprovando o fiel cumprimento desta Lei.

No Espírito Santo, a Lei n° 10.487/2016 (GOVERNO DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, 2016) dispõe sobre o Programa de Reúso de Efluentes das Estações de Tratamento de Esgoto, que prevê minimizar a utilização de água potável nos processos industriais que não requerem potabilidade. A lei cria incentivos que permite que o Executivo estadual estabeleça mecanismos de estímulo para que as empresas públicas e privadas de grande porte possam investir na implementação do programa. Além disso, estimula as empresas potencialmente poluidoras a utilizarem água de reúso, proveniente de ETEs, reduzindo a utilização de água potável nos processos industriais, como resfriamento de máquinas e altos-fornos, corte de rochas ornamentais, limpeza de plantas industriais, dentre outros. Ainda, a lei determina que

nos processos de licenciamento ambiental das empresas potencialmente poluidoras sejam definidas condicionantes que obriguem a utilização de água de reúso das ETEs, tanto da Companhia Espírito Santense de Saneamento (Cesan) como do Serviço Autônomo de Água e Esgoto (SAAE) nos municípios. O projeto aprovado na Assembleia exige que a qualidade do efluente seja monitorada pelas próprias ETEs e fiscalizado pelo Instituto Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos (IEMA).

Em São Paulo, a Lei nº 16.174 DE 22 de abril de 2015 (PREFEITURA DA CIDADE DE SÃO PAULO, 2015a) estabelece regras e medidas para fomento ao reúso de água para aplicações não potáveis, oriundas do polimento do efluente final do tratamento de esgoto, de recuperação de água de chuva, da drenagem de recintos subterrâneos e de rebaixamento de lençol freático. Determina que a água de reúso pode ser destinada para:

- I. Lavagem de pisos, pátios e logradouros públicos;
- II. Lavagem de lagos e fontes ornamentais;
- III. Lavagem de caminhões e carretas de lixo e pátios de transbordo de resíduos sólidos urbanos (RSU);
- IV. Lavagem de fachadas e jateamento para sua recuperação e envidraçamento,
- V. Operações de rescaldo após incêndios, realizadas por bombeiros.
- VI. Construção civil: perfurações unidirecionais, em serviços de pavimentação asfáltica;
- VII. Lavagem de veículos.

Determina que a qualidade da água de reúso deve seguir os parâmetros de qualidade físico-químicas e microbiológicas compatíveis com as “aplicações previstas e normas aplicáveis”, porém não indica nenhuma das legislações ou normas vigentes para serem seguidas como referencial, seja resolução CONAMA 274/2000, resolução CONAMA 430/ 2011 ou ABNT 13.969/97.

Diferentemente de outras legislações estaduais pesquisadas, a Lei nº 16174 do estado São Paulo faz uma recomendação específica para o uso na irrigação:

A irrigação de jardins, mudas, canteiros, campos esportivos e outras áreas verdes poderá ser feita com água de reúso, desde que:

I- Assegurado por avaliação agrônômica que a qualidade não causará prejuízos à vegetação, nem desagregação de solo por acúmulo de sódio;

II- Haja intervalo de tempo pós-aplicação, exposição ao sol, que limitem o risco de contaminação de pessoas, animais domésticos e silvestres em contato direto com a vegetação.

Além disto, São Paulo tem uma legislação específica para o uso em lava-jatos, a Lei nº 16.160 de 13 de abril de 2015 (PREFEITURA DA CIDADE DE SÃO PAULO, 2015b). Esta lei estabelece que os postos de gasolina e lava rápidos, no município de São Paulo, deverão fazer o reúso da água utilizada na lavagem de veículos, após passar pelo processo de tratamento adequado. No entanto, não recomenda um processo de tratamento.

No Nordeste, a Bahia, a partir Conselho Estadual de Recursos Hídricos (CONERH), estipulou uma resolução estadual nº 75 de 2010 (BAHIA, 2010) estabelece procedimentos para disciplinar a prática de reúso direto não potável de água, na modalidade reúso para fins agrícolas e/ou florestais: aplicação de água de reúso para produção agrícola e cultivo de florestas plantadas. A lei utiliza as características microbiológicas recomendadas pela OMS para água em todos os tipos de reúso para fins agrícolas e/ou florestais. Divide-se em duas categorias “A” e “B”. Para a categoria “A” a quantidade de coliforme termotolerantes por 100 mL deve ser 1×10^3 e 1 ovo de helmintos por litro, em média durante o período de irrigação, nesta categoria é para irrigação, inclusive hidroponica, de qualquer cultura incluindo produtos alimentícios consumidos crus. Para a categoria “B” a quantidade de coliforme termotolerantes por 100 mL deve ser 1×10^4 e 1 ovo de helmintos por litro, em média durante o período de irrigação, nesta categoria é para Irrigação, hidroponia, em produtos alimentícios não consumidos crus, produtos não alimentícios, forrageiras, pastagens, árvores, cultivos usados em revegetação e recuperação de áreas degradadas.

Nas características físicas e químicas é definido salinidade através da condutividade elétrica e concentração de substâncias. A lei define ainda que para utilização do reúso de esgotos sanitários para fins agrícolas e/ou florestais não há restrição de DBO, DQO e SST, sendo as concentrações microbiológicas devendo ser compatíveis com as definidas nesta resolução. Ademais a resolução define que o monitoramento deve ser periódico, com definição do período pelo órgão competente, a aplicação de água de reúso em solos agrícolas e/ou florestais deve ser obrigatoriamente condicionada à elaboração de projetos que atendam aos critérios estabelecidos pela resolução, entre outros.

No Ceará, a Lei n.º 16.033 de 20 de junho de 2016 (GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ, 2016) dispõe sobre a política de reúso de água não potável no âmbito do estado do Ceará, estabelece critérios para o reúso de água não potável, com o objetivo de viabilizar e estimular a sua ação no Estado do Ceará. Esta lei proíbe o uso de água de reúso para o abastecimento humano e define as modalidades de reúso de água: para fins urbanos, agrícolas, florestais, ambientais, industriais e na aquicultura. Responsabiliza a Secretaria de Recursos Hídricos a fiscalizar a gestão e infraestrutura relativas a água de reúso. A fiscalização da qualidade da água de reúso é de competência da Secretaria do Meio Ambiente e da Superintendência Estadual de Meio Ambiente. Cita que todos os equipamentos, tubulações e instrumentos utilizados com água de reúso, devem ser identificados e diferenciados daqueles que utilizam água potável. Cria um selo de reúso para usuários de água de reúso interno e externos devidamente licenciados. E compete à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP, a responsabilidade por criar um programa de apoio ao desenvolvimento científico e tecnológico das práticas de reúso de água.

No sul, o Paraná, a Lei nº 11.552 de 24 de abril de 2012 (GOVERNO DO ESTADO DO PARANÁ, 2012) dispõe sobre a obrigatoriedade do reúso de água no município de Londrina em edificações residenciais e comerciais a partir das águas cinzas das próprias edificações (reúso local ou interno). As disposições desta lei se aplicam às obras novas e às obras de ampliação e/ou reformas que tenham consumo de volume igual ou superior a 20 (vinte) metros cúbicos de água por dia. Esta lei, apresenta os parâmetros de qualidade definidos pela norma ABNT 13.969/97.

No Rio Grande do Sul, a Lei Nº 6616, de 5 de dezembro de 2006 (PREFEITURA MUNICIPAL DE CAXIAS DO SUL, 2006), institui no município de Caxias do Sul, o programa municipal de conservação, reúso e uso racional da água. Este programa tem a previsão para ser aplicado dentro de 5 anos de forma a adequar as habitações visando o uso racional da água e a utilização de fontes alternativas.

Apenas a normativa ABNT 13.969/97 e as legislações do estado da Bahia e do Paraná, apresentam algum parâmetro de qualidade para a água de reúso. O Projeto de Lei nº 58 de 2016 e as legislações estaduais pesquisadas, não apresentam parâmetros de avaliação da qualidade da água de reúso (seja para fins potáveis ou não) ficando algumas vezes a cargo das Secretarias do Meio Ambiente e das Superintendências Estaduais de Meio Ambiente a competência de fiscalizar a qualidade deste resíduo. A resolução do CNRH nº 121 (2010), indica que características físicas, químicas e biológicas para a água em todos os tipos de reúso para fins agrícolas e florestais deverão atender os limites definidos na legislação pertinente.

A tabela 1 traz a relação dos tipos de uso de água de reúso no Brasil de acordo com as legislações apresentadas:

Tabela 1: Relação dos tipos de uso de água de reúso no Brasil

Legislação / Normas	Observação	Tipo de Uso para Água de Reúso					
		Agricultura, Aquicultura Silvicultura e afins	Águas cinzas	Urbano	Construção Civil	Industrial	Utilizações ambientais
Nacional							
<i>ABNT 13.969/97</i>	Norma técnica de Tanques Sépticos	X	X	X			
<i>Resolução 54 de 2005</i>	Conselho Nacional de Recursos Hídricos	X		X	X	X	X
<i>PL 58 de 2016</i>	Alteração das Leis 11.445 de 2007, fontes alternativas de água	X	X	X		X	X
Nordeste							
Bahia <i>Resolução 75 de 2010</i>	Norma Estadual	X					
Ceará <i>Lei 16.033 de 2016</i>	Lei Estadual	X	X	X	X	X	X
Sudeste							
Espírito Santo <i>Lei 10.487 de 2016</i>	Lei Estadual					X	
Rio de Janeiro <i>Lei 7.424 de 2016</i> <i>Lei 7.599 de 2017</i>	Lei do Município do Rio de Janeiro Lei do Município do Rio de Janeiro	X		X			X
São Paulo <i>Lei 16.174 de 2015</i> <i>Lei 16.160 de 2015</i>	Lei do Município de São Paulo Criação de Programa para Reúso em Lava-rápidos, Município de São Paulo			X	X		
Sul							
Paraná <i>Lei 11.522 de 2012</i>	Lei do Município de Londrina, parâmetros de qualidades definido pela NBR/ABNT 13.969/97		X				
Rio Grande do Sul <i>Lei 6.616 de 2006</i>	Legislação do Município Caxias do Sul. Define o Programa para ser aplicado dentro de 5 anos						

2.4 ÁGUAS DE REÚSO NO MUNDO

Considerando a relevância dos Estados Unidos, Continente Africano e Comissão Europeia, pode-se considerar como regiões representativas para abordar sobre o uso de água de reúso no mundo. Um levantamento ampliado foi desenvolvido e está descrito no artigo "Água de Reúso: uma Alternativa Sustentável para o Brasil", disponível no apêndice deste trabalho (MOURA *et al.*, 2020).

O reúso da água é praticado desde tempos antigos na agricultura, em países como China, Índia e Egito. Entre os séculos 18 e 19 utilizava-se reúso direto, de efluente não tratado, para agricultura tanto na América do Norte quanto na Europa. No começo do século 20, os países desenvolvidos diminuíram a prática devido às tecnologias de tratamento. Enquanto países em desenvolvimento, como China, México, Peru, Egito, Líbano, Marrocos, Índia e Vietnã continuaram utilizando o reúso na agricultura devido a quantidade de nutrientes contido na água (JIMÉNEZ-CISNEROS, 2014).

As primeiras diretrizes e padrões sobre reúso da água apareceram por volta do século 20, nos Estados Unidos, representado pelo Estado da Califórnia, em 1918 onde se padronizou a utilização do reúso na irrigação agrícola (ANGELAKIS; GIKAS, 2014; RODRIGUES, 2005). Atualmente, a Califórnia utiliza o sistema de reúso indireto planejado para recarga de aquíferos e renovação dos ecossistemas aquáticos. O tratamento é realizado por metodologias de membranas e osmose reversa para se transformar esgoto em água de reúso. Posteriormente, etapas de limpeza com peróxido e luz ultravioleta. O produto final deste tratamento, a água de reúso, é encaminhado ao subsolo e aquíferos da região para ser diluída pelo abastecimento natural de águas (SCHWARTZ, 2015). Especialistas estimam que após um período de dois anos a água é novamente captada para o abastecimento humano.

Além do reúso indireto planejado, nos EUA, o reúso direto tem sido desenvolvido de forma experimental por Bill Gates que criou um ônibus que percorre as cidades tratando o esgoto e transformando em água potável (MANCUSO; SANTOS, 2003). Os EUA seguem os padrões de qualidade estabelecidos pela *United States Environmental Protection Agency* (EPA), agência ambiental americana, e entre alguns desses parâmetros encontram-se *Escherichia coli*, coliformes fecais e totais, sólidos

suspensos, DBO, turbidez, cloro, nitrogênio entre outros que são mais restritos que no Brasil.

Na África, a Namíbia submete quase na totalidade seu esgoto ao tratamento para originar água de reúso reduzindo expressivamente o impacto ambiental, com técnicas de purificação pioneiras aceitas pela OMS e pela Comunidade Europeia. Esse foi o primeiro país no mundo a utilizar água de reúso para fins potáveis de forma indireta, fazendo recarga de aquíferos (HESPANHOL, 2002a). A água de reúso é regulada pela legislação “Water Resources Management Act, 2013 (Act No. 11 of 2013)” do país. Os parâmetros de qualidade englobam a detecção microbiológica de *E. coli* e análises físico-químico como DBO, DQO e pH.

Israel tem o mais avançado sistema de manejo de água do mundo. Utilizam a técnica de gotejamento para irrigação agrícola com água de reúso. Esta técnica é mais econômica e a irrigação com água de reúso garante uma maior produção de alimentos. Cerca de 80% a 90% dos esgotos de Israel são tratados e reutilizados reduzindo o impacto ambiental (ANGELAKIS; GIKAS, 2014). Em Israel é permitido a utilização de água de reúso para agricultura e os parâmetros de qualidade apresentados são DBO, sólidos suspensos, presença de cloro e salinidade, mas não há nenhuma referência a pesquisa de microrganismos patogênicos.

A União Europeia tem desenvolvido estudos para possibilitar criação de uma norma para diferentes usos e parâmetros para os países associados (SANZ; GAWLIK, 2014). Em 2018 foram propostas novas regras para estimular o reúso na irrigação agrícola. Um desses estudos, é o Projeto Poseidon, que consiste em um programa para avaliação de tecnologias de remoção de produtos farmacêuticos e de higiene pessoal de esgotos e das instalações de tratamento de água (MANCUSO; SANTOS, 2003). Esse tem como objetivo aumentar o reúso indireto da água potável, tendo como garantia a remoção desses produtos, que passam através dos processos tradicionais de tratamento de esgoto e contaminam a água de abastecimento de aquíferos. De modo geral, na Europa a água de reúso é utilizada em fins industriais, urbanos, domésticos (a partir de águas cinzas) e na agricultura. Atualmente os países da comunidade europeia que contém padronização para o reúso são Chipre, França, Grécia, Itália, Portugal e Espanha e com regulamentos incluídos na legislação nacional. Em Portugal, as normas relativas

à reutilização das águas são diretrizes, ficando a cargo do governo nacional, emitir todas as licenças da reutilização das águas no campo (SANZ; GAWLIK, 2014). Na tabela 2 relacionamos os tipos de uso de água de reúso por países pesquisados.

Tabela 2: Relação dos tipos de uso de água de reúso por países pesquisados

Tipo de Uso para Água de Reúso	África		Américas	Europa					
	Israel	Namíbia	EUA	Chipre	Espanha	França	Grécia	Itália	Portugal
Agricultura, aquicultura silvicultura e afins	X		X	X	X	X	X	X	X
Água potável		X	X						
Doméstico (águas cinzas e irrigação de gramado e afins)			X		X			X	
Urbano (Limpeza de ruas, irrigação de parques, campos, sistemas de proteção de incêndio e afins)			X	X	X	X	X	X	X
Construção Civil			X		X				
Industrial (Aquecimento, Torres de Resfriamento e afins)			X		X		X	X	
Recarga de Aquífero		X	X	X	X		X		
Utilizações ambientais (manutenção de zonas úmidas, fluxo mínimos e similares)			X		X				

Fonte: Sanz; Gawalik (2014), adaptado.

Na tabela 3 apresentamos a relação das legislações nacionais e internacionais que incluem em seus regulamentos parâmetros de qualidade. No Brasil, como foi citado, apenas a normativa ABNT nº 13.969/97 e as legislações do estado da Bahia e do Paraná, apresentam algum parâmetro de qualidade para a água de reúso.

No continente africano, apesar de ser umas das regiões que mais sofrem com escassez hídrica, poucos países possuem regulação. África do Sul, que utiliza água de reúso em fins industriais, na Agricultura, aquicultura em fins domésticos, não possui qualquer consideração em relação a parâmetros de qualidade. Israel recomenda a

avaliação de sólidos suspensos, DBO, salinidade e cloro. Namíbia e Tunísia, consideram a pesquisa de *E. coli*, coliformes totais e de parâmetros físicos - químicos.

Nas Américas, Canadá e EUA consideram *E. coli*, coliformes fecais e totais e parâmetros físicos - químicos. México que utiliza água de reúso em atividades agrícolas, na aquicultura e silvicultura não possui nenhuma indicação de parâmetros de qualidade estabelecido.

Na Europa, os países citados (Chipre, França, Grécia, Itália e Espanha), regulamentam a pesquisa de *E. coli*, com exceção de Portugal que indica a pesquisa de coliformes fecais. Há um destaque para a recomendação de pesquisa de outros microrganismos patogênicos como *Enterococos fecais*, *Legionella* sp., *Salmonella* sp. e bactérias redutoras de sulfato, frutos do avanço das pesquisas nesse tema no continente europeu.

Tabela 2. Tabela comparativa dos parâmetros Brasil x Diversos Países

Parâmetros	Brasil		África			Américas			Europa							
	ABNT 13.969/97	Resolução 75/2010 (Bahia)	Lei 11.522/2012 (Londrina)	África do Sul	Israel	Namíbia	Tunísia	Canadá	EUA	México	Chipre	Espanha	França	Grécia	Itália	Portugal
Microbiológicos																
<i>Escherichia coli</i>		X			X	X		X	X		X	X	X	X	X	
Coliformes fecais	X		X			X		X	X							X
Coliformes totais		X						X	X				X			
<i>Enterococos fecais</i>												X				
<i>Legionella</i> sp.											X					
<i>Salmonella</i> sp.											X			X		
Bactéria Redutora de Sulfato												X				
Parasitológicos																
<i>Giardia</i> sp.					X											
Ovos de Helminetos		X									X	X				X
Físico-químicos																
Total de Sólidos Suspensos	X		X		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X
Turbidez					X	X		X	X		X		X			
Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)	X		X		X	X	X	X	X		X	X		X	X	
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	X		X			X					X	X	X		X	
pH					X	X		X	X		X		X	X	X	X
Metais pesados		X			X	X		X	X		X	X	X	X	X	X
Salinidade		X			X			X	X		X	X	X	X	X	X
Total de Sólidos Dissolvidos									X				X		X	
Adsorção de Sódio									X			X		X	X	X
Cloro					X			X	X		X	X	X	X	X	X
Nitrogênio	X		X			X		X	X		X	X	X	X	X	X
Sulfeto						X		X	X							
Fósforo	X		X			X		X	X		X	X	X	X	X	X
Biocarbonetos (HCO ₃)													X			

Fonte: Sanz; Gawalik (2014), adaptado.

3. SANEAMENTO E SAÚDE

Atualmente a definição de saúde é entendida como um estado de completo bem-estar físico, mental e social, e não simplesmente a ausência de doença (OMS, 2006). Os fatores fundamentais para a promoção da saúde são: a paz, habitação, educação, alimentação, renda, ecossistema estável, recursos sustentáveis, justiça social e equidade. Dentre estes fatores alguns podem tanto favorecer como prejudicar a saúde (CARTA DE OTTAWA, 1986). Entende-se assim, que as condições ambientais são um dos fatores mais importantes como determinantes da saúde, sendo o saneamento básico um dos instrumentos de promoção da saúde (FUNASA, 2004).

No Brasil, o saneamento básico é conceituado pela Lei nº 11.445/2007 como:

“Conjunto de serviços, infraestruturas e instalações operacionais de: abastecimento de água potável; esgotamento sanitário; limpeza urbana e manejo de resíduos sólidos; drenagem e manejo das águas pluviais urbanas”.

Para a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2014):

Entende-se por saneamento o controle de todos os fatores do meio físico do homem, que exercem ou podem exercer efeitos nocivos sobre o bem-estar físico, mental e social. De outra forma, pode-se dizer que saneamento caracteriza o conjunto de ações sócio-econômicas que tem por objetivo alcançar a salubridade ambiental. A oferta de saneamento associa sistemas constituídos por uma infraestrutura física e uma estrutura educacional, legal e institucional, que abrange os seguintes serviços: abastecimento de água às populações; com a qualidade compatível com a proteção de sua saúde e em quantidade suficiente para a garantia de condições básicas e conforto; coleta, sanitariamente segura de águas residuárias (esgoto sanitário, resíduos líquidos industriais e agrícola); acondicionamento, coleta, transporte e/ou destino final dos resíduos sólidos; coleta de águas pluviais e controle de empoçamentos e inundações; controle de vetores de doenças transmissíveis (insetos, roedores moluscos, etc.); saneamento dos alimentos; saneamento dos meios de transportes;

saneamento e planejamento territorial; saneamento da habitação, dos locais de trabalho, de educação e de recreação e dos hospitais; e controle da poluição ambiental – água, ar e solo, acústica e visual.

Por sua vez, a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA, 2004) conceitua saneamento ambiental como:

O conjunto de ações socioeconômicas que tem por objetivo alcançar salubridade ambiental, por meio de abastecimento de água potável, coleta e disposição sanitária de resíduos sólidos, líquidos e gasosos, promoção da disciplina sanitária de uso do solo, drenagem urbana, controle de doenças transmissíveis e demais serviços especializados, com a finalidade de proteger e melhorar as condições de vida urbana e rural.

A relação existente entre saneamento e saúde foi muito caracterizada pela ciência médica, responsável pelo diagnóstico e tratamento das enfermidades humanas. A água, essencial a vida é uma das principais vias de disseminação de doenças. Dados divulgados pelo Ministério da Saúde afirmam que o investimento gasto no setor de saneamento permite economizar na área de medicina curativa (BARROS, 2014).

O sistema de saneamento básico está fundamentado em proporcionar melhor qualidade de vida à população, pois reduz à incidência de doenças e a degradação do meio ambiente (WHO, 2014; BRASIL, 2007). Países desenvolvidos apresentam melhores condições de saneamento ambiental, portanto a população tem melhor qualidade de vida. Regiões com países não desenvolvidos, tais como a África, América do Sul e partes da Ásia, enfrentam problemas de saúde quase inexistentes entre os países desenvolvidos. A população desses, enfrentam problemas associados à falta de infraestrutura urbana, como os serviços de saneamento básico, que ainda matam centenas de pessoas todos os anos, principalmente aquelas que vivem em áreas abandonadas pelo poder público, em contato com valas-negras, esgoto a céu aberto, água sem tratamento, ruas sem pavimentação (VAZ, 1994).

As doenças diarreicas, representam a maioria dos agravos que afetam a população mundial, possuem uma estreita relação com o meio ambiente e afetam milhões de pessoas em todo o mundo. Para isto, o saneamento constitui-se como uma ferramenta fundamental para minimizar estes impactos e promover a saúde pública (FUNASA, 2007).

No Brasil, a lei do saneamento, Lei Nº 11.445 de 05 de Janeiro de 2007, (Brasil, 2007) estabelece as diretrizes nacionais para o saneamento e determina o conjunto de procedimentos adotados pelo governo com o objetivo de proporcionar uma situação higiênica e saudável para sua população urbana e rural, das quais inclui: disposição de resíduo, drenagem urbana, abastecimento de água e sistema de captação de efluente (BRASIL, 2005). Essa lei tem dentre os princípios fundamentais a universalização do acesso, a integralidade, compreendida como o conjunto de todas as atividades e componentes de cada um dos diversos serviços de saneamento básico, propiciando à população o acesso na conformidade de suas necessidades e maximizando a eficácia das ações e resultados.

Cerca de 83,62% da população urbana brasileira é atendida com água potável porém destas, 53% possuem redes coletoras de esgoto. Esse déficit, está localizado justamente nas regiões mais vulneráveis, como favelas e zonas periféricas tanto na zona urbana, rural e no interior (BRASIL, 2019).

Segundo o Plano Nacional de Saneamento (Plansab), no Brasil o abastecimento de água é considerado inadequado quando há ausência de canalização interna e sem garantias de qualidade para consumo humano, ou seja, fora dos padrões de potabilidade, ou mesmo sem segurança, como no caso de fornecimento por duas fontes, ou sem pontos internos de água canalizada, e sem atendimento quando não há fornecimento pela rede oficial (Brasil, 2013). Guimarães *et al.* (2007) e Follador *et al.* (2015) explicam que investir em saneamento é uma das formas de se reverter esse quadro.

A constituição brasileira de 1988 (BRASIL, 1988), no artigo 225, defende que preservar e conservar água em qualidade e quantidade é proteger o direito à saúde, além disso, estabelece o direito de todos a um meio ambiente equilibrado e qualidade de vida sadia, bem como o dever público em atuar nessa matéria. A ONU (2010) reforça que a

água, é um direito essencial a vida, sendo assim, uma questão prioritária em saúde pública. Preservar e conservar água em qualidade e quantidade é proteger o direito à saúde, estabelecendo o direito de todos a um meio ambiente equilibrado e a qualidade de vida sadia.

3.1. RISCOS RELACIONADOS COM SAÚDE PÚBLICA E MEIO AMBIENTE

A saúde pública tem dedicado crescente atenção aos problemas da interface saúde e ambiente. Esta preocupação não é nova, mas se intensifica devido à crise ambiental contemporânea (SIMONI, 2016). Os riscos ambientais modernos modificam as escalas temporais e espaciais, trazendo a necessidade de abordagens que dêem conta da complexidade, amplitude e questões éticas a eles relacionados (PORTO et al., 2004). Estudar a biodiversidade de contaminantes que podem ser disseminados por veiculação hídrica, se enquadra no conjunto de medidas para garantir o bem-estar e a saúde da população. Segundo o último relatório da ONU intitulado "Água doente", no mundo se morre mais pelo consumo e uso de água contaminada do que por violência. Além disso, a diarreia, principalmente causada por água contaminada, mata cerca de 2,2 milhões de pessoas ao ano e mais de metade dos leitos de hospital no mundo é ocupado por pessoas com doenças ligadas à água contaminada. Esse mesmo relatório recomenda sistemas de reciclagem de águas e projetos para o tratamento de esgoto (ONU, 2019).

Os riscos associados a água de reúso ainda é objeto de vários estudos devido aos questionamentos que persistem a respeito da saúde pública. Mancuso e Santos (2013) descrevem que são adotados dois princípios gerais para avaliação de risco sanitário:

- I- O reúso não potável é mais seguro do que o reúso potável;
- II- O reúso indireto, em que o processo de recuperação da qualidade inclui depuração na natureza, é mais seguro do que o reúso direto.

Os mesmos autores estabelecem como regra geral para uma primeira discussão sobre os riscos sanitários associado ao reúso de águas, cinco critérios por ordem crescente de riscos:

(1º) Para uso não potável indireto, deve - se levar em conta a saúde pública. Quanto maior a exposição ou o nível de contato humano com a água de reúso, maior deve ser a segurança sanitária;

(2º) Para o uso não potável direto, a aceitação da água pelo usuário, deve ser considerada. Dependendo do nível de contato, a água deve apresentar qualidade estética que não cause nenhum tipo de objeção. Dentre elas cor, turbidez que levam ao usuário a uma percepção como água suja;

(3º) Para uso potável indireto, deve -se levar em conta a preservação do meio ambiente. A implantação do sistema não pode comprometer a qualidade ambiental como por exemplo, um lago que recebesse água de reúso com excesso de nutrientes, causando proliferação de algas, geração de odores e possível morte de peixes;

(4º) Para o uso potável direto, deve- se considerar a qualidade da fonte da água para o reúso. O mais comum é o sistema de reúso direto para fins não potáveis, a partir de ETEs, com o tratamento apenas de nível secundário. Se o esgoto tratado não atender as qualidades mínimas exigidas, poderá comprometer a qualidade da água de reúso produzida (produto final). Essa também deverá atender as especificações mínimas de qualidade;

(5º) Como critério principal, a adequação da qualidade da água de reúso para o uso pretendido. Um nível mínimo de qualidade deve ser estabelecido considerando tanto os aspectos sanitários de aceitação pelo usuário como também as necessidades específicas ao uso pretendido.

3.2 RISCO BIOLÓGICO E BIOINDICADORES

Os problemas relacionados a saúde em decorrência da água de reúso é preocupante principalmente com a proteção a saúde pública, sendo geralmente baseada ao controle de microrganismos patogênicos (MANCUSO; SANTOS, 2003).

Autores como Lee *et al.* (2008) e Harwood *et al.* (2005), descrevem sobre as incertezas da qualidade sanitária da água de reúso, que se relacionam à riscos associados à saúde mesmo por contato primário a coliformes, parasitas e vírus, os quais são encontrados em abundância nas águas residuais, e parte destes perpetuam nas diferentes etapas de tratamento dos efluentes.

MOURA *et al.* (2019b, no prelo) indicam que os riscos associados a contaminantes biológicos, diante as modalidades de água de reúso devem levar em conta a sua origem:

(i) Reúso local - água de reúso de origem local, a partir de águas cinzas espera-se uma carga orgânica menor. Esta usada de forma direta, no domicílio, oferecerá menor risco à saúde. Podemos citar como exemplo o uso de água proveniente da lavagem de roupas para a limpeza de quintais. Outro exemplo seria a utilização de águas cinzas para a rega de plantas. Neste caso necessita-se de um tratamento prévio visando à retirada de detergentes;

(ii) Reúso externo - considerando água de reúso a partir de estações de tratamento de esgoto, a carga orgânica é altíssima, sendo recomendados parâmetros de qualidade mais restritivos. Apesar do avanço das tecnologias de obtenção da água de reúso, micropoluentes podem persistir às etapas de tratamento devido ao grande volume de água tratada diariamente (SCARPA *et al.*, 2011) e a própria resistência dos microrganismos a essas metodologias, dentre eles, microrganismos não cultiváveis como vírus, bacteroides, metanobactérias e outros indicadores de poluição por fontes humanas (MOURA, 2015). Destaca-se a preocupação com viroses que são humano específicas como Adenovírus (HARWOOD *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2008), pois estes patógenos têm sido detectados mesmo quando os indicadores de bactérias cultiváveis (*E. coli*) não excedem os padrões recomendados ou até mesmo na ausência destes por metodologias tradicionais de cultivo (JIANG; NOBLE; CHU, 2001; LIPP; FARRAH; ROSE, 2001). Com isto, este tipo de água de reúso oferece risco pelo contato primário e ao ambiente caso não seja avaliada rigorosamente a qualidade e segurança em seu uso.

(iii) Reúso industrial - que deve considerar o tipo de resíduo original que levou ao processo final de reúso industrial tratado. Necessita assegurar que não haverá risco de contaminação ao trabalhador que o manipula ou ser utilizado em áreas restritas onde não há contato humano. Os padrões de qualidade devem atender as necessidades da produção industrial e o risco de contato à saúde humana e ambiental.

Nas modalidades de reúso direto e indireto é preciso levar em consideração a destinação do resíduo sempre com padrões que não ofereçam riscos. Doenças associadas aos microrganismos que podem ser encontrados em diferentes modalidades de água de reúso podem ser observadas na tabela 4.

Tabela 3. Riscos relacionados ao uso de água de reúso e doenças associadas

Riscos Patogênicos	Doenças associadas
Bactéria	
<i>Escherichia coli</i>	Gastroenterite
<i>Campylobacter jejuni/ coli</i>	Gastroenterite
<i>Legionella spp.</i>	Respiratória
<i>Salmonella typhi/ paratyphi</i>	Febre Tifoide
<i>Salmonella spp.</i>	Gastroenterite
<i>Shigella spp.</i>	Desinteira
<i>Vibrio cholera</i>	Cólera
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Gastroenterite
Vírus	
<i>Adenovirus (40 y 41)</i>	Gastroenterite
<i>Agente Norwalk</i>	Gastroenterite
<i>Astrovirus</i>	Gastroenterite
<i>Calicivirus</i>	Gastroenterite

Fonte: SANZ; GAWLIK (2014), adaptado.

É importante destacar os microrganismos presentes no esgoto sanitário, uma vez que são a fonte do reúso. A tabela 5 apresenta os microrganismos patogênicos presentes no esgoto e as doenças associadas segundo dados da EPA (2004):

Tabela 4. Riscos relacionados ao esgoto e doenças associadas

Riscos patogênicos	Doenças associadas
Bactéria	
<i>Shigella</i>	Shigelose (disenteria bacilar)
<i>Salmonella</i>	Salmonelose, Gastroenterite (diarreia, vômito, febre), febre tifoide
<i>Vibrio cholera</i>	Cólera
<i>Escherichia coli</i>	Gastroenterite e septicemia, síndrome hemolítico-urêmica (SHU)
<i>Yersinia</i>	Yersinose, Gastroenterite e septicemia
<i>Leptospira</i>	Leptospirose
<i>Campylobacter</i>	Gastroenterite, artrite reativa, síndrome de Guillain-Barré
<i>Atypical mycobacteria</i>	Doença respiratória (pneumonia por hipersensibilidade)
<i>Legionella</i>	Doença respiratória (pneumonia, febre de Pontiac)
<i>Staphylococcus</i>	Infecções de Pele, olhos, ouvido e septicemia
<i>Pseudomonas</i>	Infecções da pele, olhos e ouvidos
<i>Helicobacter</i>	Gastrite crônica, úlceras, câncer gástrico
Protozoários	
<i>Entamoeba</i>	Amebíase (desinteira amebiana)
<i>Giardia</i>	Giardíase (gastroenterite)
<i>Cryptosporidium</i>	Cryptosporidíase, diarreia, febre
<i>Microsporidia</i>	Diarreia
<i>Cyclospora</i>	Ciclosporíase (diarreia, febre, cólicas estomacais e dores musculares)
<i>Toxoplasma</i>	Toxoplasmose
Helmintos	
<i>Ascaris</i>	Ascariíase
<i>Ancylostoma</i>	Ancilostomíase
<i>Necator</i>	Necatoríase
<i>Ancylostoma</i>	Larva migrans cutâneos
<i>Strongyloides</i>	Estrongiloidíase
<i>Trichuris</i>	Tricuríase
<i>Taenia</i>	Teníase, neurocisticercose
<i>Enterobius</i>	Enterobíase
<i>Echinococcus</i>	Hidatidose
Vírus	
Enterovirose (poliomelite, eco, coxsackie, nova enterovirose, sorotipo 68 a 71)	Gastroenterite, anomalias cardíacas, meningite, doenças respiratórias, distúrbios nervosos, outros
Hepatite A e vírus E	Hepatite infecciosa
Adenovírus	Doença respiratória, infecções oculares, gastroenterite (tipo 40 e 41)
Rotavírus	Gastroenterite
Parvovírus	Gastroenterite
Astrovírus	Gastroenterite
Calicivírus (incluindo Norovírus e Sapovírus)	Gastroenterite
Coronavírus	Gastroenterite

Fonte: (EPA, 2012)

O monitoramento é feito pelo uso de microrganismos adotados como indicadores entre os quais o grupo coliformes e a *E. coli*, são os indicadores de qualidade sanitária mais utilizados, embora se reconheça que eles não cobrem suficientemente toda a gama de microrganismos eventualmente presentes em esgoto e águas de reúso (MANCUSO; SANTOS, 2003).

4. ESTUDO DA DIVERSIDADE MICROBIANA

4.1 ANÁLISE DA DIVERSIDADE MICROBIANA

A diversidade microbiana pode ser avaliada a partir do número de espécies encontradas em uma amostra. Com isso, podem-se construir curvas de rarefação, que permitem avaliar o tamanho da riqueza de espécies amostradas. Amostras de tamanhos diferentes podem ser comparadas através do uso de índices de diversidade e o tamanho total pode ser estimado a partir das relações de contribuição das espécies, sem a necessidade de acessar todos os indivíduos de uma amostra (RODRIGUES, 2011).

A curva de rarefação é uma medida de riqueza de espécie onde permite avaliar o quanto um estudo se aproxima de capturar todas as espécies do local. Quando a curva se estabiliza, significa que nenhuma espécie nova está sendo adicionada e que a riqueza total da amostra foi obtida (RODRIGUES, 2011).

Entre os estimadores de diversidade utilizados em pesquisa de microbiomas destacamos riqueza e abundância. A riqueza fornece o número de espécies que se pode encontrar em uma amostra. A abundância é a quantidade de indivíduos por espécie. A diversidade é a razão entre a riqueza e a abundância (DIAS, 2004).

Os índices de diversidade sempre foram usados em estudos ecológicos. Esses índices são diversidade alfa, diversidade beta e diversidade gama (MAGURRAN, 2004).

- i. A diversidade alfa (α) ou local, correlaciona-se ao número de espécies em um habitat, dentro de uma amostra;
- ii. A diversidade beta (β), correlaciona-se a mudança de espécies ao longo de um gradiente ambiental. Este índice é indicado para comparar a diversidade entre amostras diferentes;
- iii. A diversidade gama (δ) ou regional, correlaciona-se ao número total de espécies observadas em todos os habitats.

4.2 PADRÕES E MÉTODOS TRADICIONAIS PARA ANÁLISE DA QUALIDADE DAS ÁGUAS

A avaliação da qualidade da água, associada aos riscos à saúde pública é necessária para propor efetivas estratégias de remediação e descontaminação microbiana.

Os indicadores de bactérias fecais, tais como coliformes totais, *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. estão presentes em grande abundância no trato gastrointestinal dos animais de sangue quente. A detecção destes organismos na água indica a presença de poluição (EPA, 2000) e assim, rotineiramente utilizados para avaliar a qualidade sanitária de águas sendo sugeridos pela resolução CONAMA n°. 274 (BRASIL, 2001) e Portaria de Consolidação n°. 5 do MS (BRASIL, 2017).

Os coliformes totais são bactérias do grupo coliforme, pertencentes à família Enterobacteriaceae, tendo como principais gêneros: *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, *Proteus*, *Serratia*, embora vários outros gêneros pertençam ao grupo. Estão presentes nas fezes de animais homeotermos, indicando indiretamente a presença de fezes humanas (PELCZAR; REID; CHAN, 1981; RODRIGUES *et al.*, 2015).

Escherichia coli pertencente à família Enterobacteriaceae, pode ser identificada e enumerada rapidamente em placas de isolamento ou em caldo, por diversas técnicas baseadas em substratos enzimáticos cromogênicos e fluorogênicos ou ambos, que envolvem a capacidade de detecção da presença das enzimas específicas (SOTERO-MARTINS, 2014). São abundantes em fezes humanas e de animais (por fazer parte da flora intestinal), sendo somente encontradas em esgotos, efluentes, águas naturais e solos que tenham recebido contaminação fecal recente (BRASIL, 2001).

Enterococcus são bactérias do grupo dos *Streptococcus faecalis*, se caracterizam pela alta tolerância às condições adversas de crescimento, tais como: capacidade de crescer na presença de 6,5 % de cloreto de sódio, a pH 9,6 e nas temperaturas de 10°C a 45°C. Sendo a maioria das espécies desse grupo de origem fecal humana, embora possam ser isolados de fezes de animais (SOTERO-MARTINS, 2014). Os tradicionais

métodos de cultura baseiam-se na detecção destas bactérias para avaliar a qualidade da água, por ser mais fácil de realizar e menos oneroso.

Por essas razões, nas análises de diferentes matrizes ambientais (água, areia e sedimentos), eles constituem um dos parâmetros mais usados no mundo pelos órgãos ambientais (SOTERO-MARTINS, 2014). As principais metodologias empregadas para detecção de coliformes em água são as técnicas:

- I. Tubos múltiplos, expressando os resultados em número mais provável (NMP), calculados conforme *American Public Health Association* (APHA);
3. Método colilert, ensaio enzimático também expresso em NMP;
4. Método da membrana filtrante associada ao ensaio cromogênico Chromocult, sendo os resultados descritos em unidade formadora de colônia (UFC).

Além dos parâmetros colimétricos, para se analisar a qualidade da água, incluem-se os métodos físicos e químicos que dão suporte ao diagnóstico. Entre os parâmetros físicos - químicos: Turbidez, cor aparente, condutividade elétrica, pH, dureza total, cloro, cloretos, fluoreto, nitrato, nitrito, cloretos e sulfatos. São parâmetros recomendados por legislações (BRASIL, 2001, 2017) e especialistas para uma avaliação mais conclusiva das condições de qualidade da água (COELHO *et al.*, 2017)

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS AMBIENTAIS

A possibilidade de se explorar vários ecossistemas considerados inexploráveis tornou-se possível com o avanço das ferramentas de biologia molecular e do sequenciamento de nova geração (NGS). No entanto, um pré-requisito importante para o sucesso das análises é o uso de um protocolo eficiente para extrair o DNA completo das comunidades microbianas a partir de amostras ambientais. Anteriormente os estudos com água utilizavam os kits comerciais de extração de solo, pois eram kits mais próximos as condições de amostras ambientais. O protocolo do Kit comercial "*Metagenomic DNA Isolation Kit for Water*" (Epicentre) foi considerado o marco e o principal caminho para esse tipo de análise de forma precisa, confiável e bem-sucedida (HASSAN; ESSAM; MEGAHED, 2018). Consequentemente, o isolamento de DNA metagenômico de alta qualidade que cobria todo o ambiente microbiano. Muitos

estudos relataram o desenvolvimento de métodos e kits comerciais para extração de DNA metagenômico (BAG *et al.*, 2016). No entanto, ainda existe um aumento no desenvolvimento, aprimoramento e otimização de protocolos novos ou atuais para a extração de DNA a partir de diferentes tipos de amostras (HASSAN; ESSAM; MEGAHED, 2018).

4.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA A BUSCA DE MARCADORES MOLECULARES DE POLUIÇÃO

A técnica PCR consiste na amplificação “*in vitro*” de uma região específica de DNA com intuito de aumentar o número de cópias deste, produzindo material suficiente para as diversas análises. Nos últimos anos, a PCR é amplamente aplicada em centenas de procedimentos laboratoriais e considerada como o método de escolha no diagnóstico e caracterização molecular de diversos agentes bacterianos. A principal vantagem desta técnica em relação aos métodos de cultura é a redução do tempo de obtenção de resultados e a detecção do microrganismo sem necessidade de um cultivo prévio. Além disso, a PCR apresenta maior sensibilidade e especificidade que a cultura, representando um método laboratorial rápido e seguro (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2007).

Na pesquisa ambiental, a PCR tem sido utilizada para detectar a presença de microrganismos associados a poluição antrópica para uma avaliação mais abrangente do que a fornecida pelos métodos tradicionais que avaliam coliformes e *E. coli* (MOURA, 201). Além disso, a pesquisa de marcadores moleculares por PCR nos permite saber a fonte de contaminação, seja de origem humana ou não (MCQUAIG; GRIFFITH; HARWOOD, 2012).

A análise da presença de uma série de marcadores moleculares associados à poluição antrópica (por serem comensais ou patógenos humanos), vem sendo descritos e sugeridos para a avaliação de poluição fecal humana em recursos hídricos (HARWOOD *et al.*, 2009). Com isso um amplo conjunto de potenciais novos marcadores, bem como um levantamento sanitário abrangente, deve ser feito para ajudar e contribuir na identificação de fontes de contaminação fecal (GRIFFITH *et al.*, 2009).

De acordo com FATEMEH *et al.*, (2014), técnicas moleculares são metodologias precisas, rápidas e sensíveis para o estudo de patógenos específicos de bactérias e estas técnicas podem ser utilizadas precisamente para analisar água.

Moura (2015), avaliou por PCR a presença de marcadores moleculares de poluição em rios do Complexo de Manguinhos como HAdV tipos 40,41 e T-antigen para vírus, 16S rRNA, nifH e uidA para bactérias e beta-giardin para protozoários reunidos no estudo.

4.5 METAGENÔMICA

A metagenômica é a abordagem que permite acessar de forma direta os genomas dos organismos que não podem ser cultivados, isolando seu DNA, e ainda analisar genomas coletivos presentes num ambiente (HANDELSMAN *et al.*, 1998). A possibilidade de estudar o genoma de organismos não cultiváveis, representou uma transformação na microbiologia clássica, que constatou que a maioria dos microrganismos não podem ser cultivados em cultura (HANDELSMAN, 2004).

Essa aplicação surgiu em 1998 através da pesquisa de busca de novos produtos naturais a partir do solo, usando clonagem do metagenoma (o DNA total de microrganismos presentes) para acessar o genoma coletivo da microbiota do solo (HANDELSMAN *et al.*, 1998)

Chen e Pachter (2005) citam que a metagenômica utiliza tecnologias modernas em genômica, para estudar comunidades microbianas diretamente de seus ambientes naturais, sem a necessidade de isolamento e cultivo em laboratório de espécies individuais. Acessando diretamente os genomas dos organismos cultiváveis e não cultiváveis presentes em uma amostra ambiental seja solo, água, ar, esgoto, possibilitou estudar microbiomas por diferentes estratégias: descoberta de novos genes e posterior inferência de suas funções, avaliar a diversidade e a evolução dos genomas no contexto ambiental.

Handelsman *et al.* (1998) citam que a capacidade de acessar sequências de DNA dos genomas microbianos oferece também uma alternativa interessante para explorar e

melhorar a caracterização e detecção de diversos grupos de patógenos na água e de microrganismos com potenciais aplicações na biotecnologia.

Bower *et al.* (2005) destacam que a metagenômica possibilita analisar um conjunto de genes metabólicos a partir de comunidades microbianas, que podem ser usadas para determinar condições ambientais tais como: poluição, definir a composição de uma comunidade e a diversidade de genes (SINGH *et al.*, 2009).

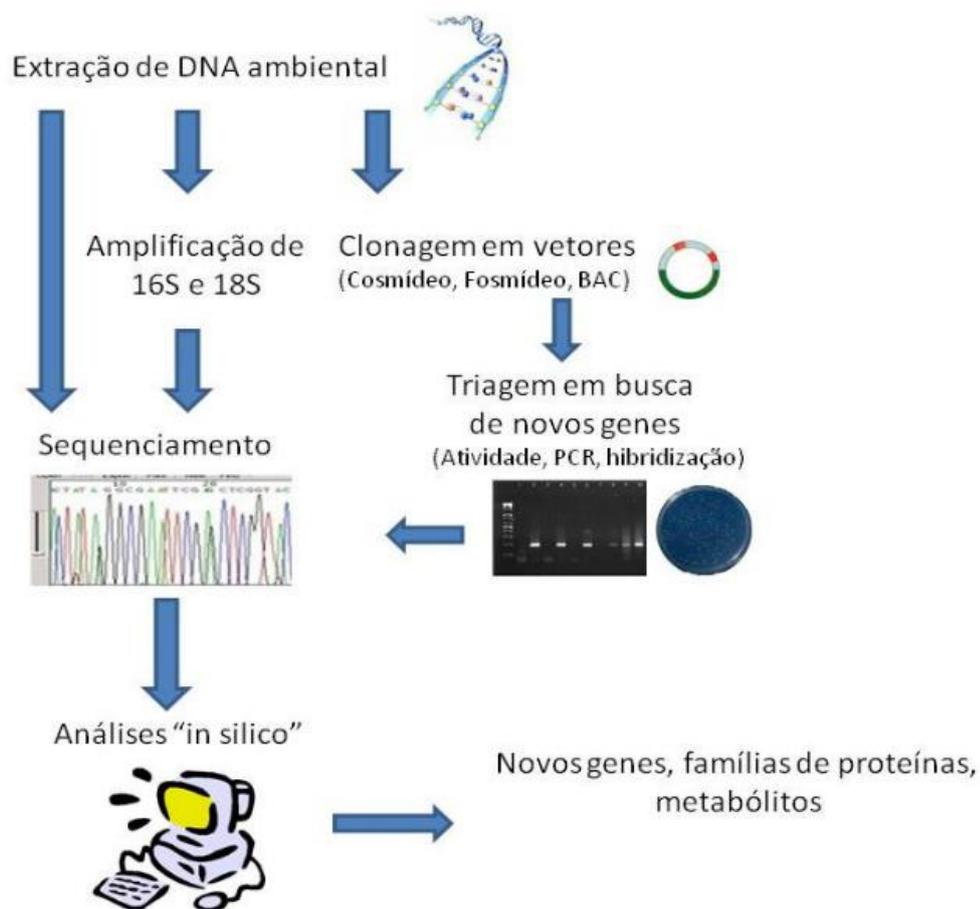
As análises metagenômicas têm sido utilizada nas seguintes abordagens em (CARDOSO *et al.*, 2012; CUADRAT, 2010):

Metagenômica funcional - extração de DNA total, clonagem em vetores como: plastídios, fasmídios ou cosmídeos (de acordo com o tamanho do fragmento de DNA) e sequenciamento a fim de realizar metagenômica funcional, caracterizando enzimas de amostras ambientais a partir da inferência de função;

Análises baseadas na sequência ou shotgun - extração e sequenciamento direto do DNA ambiental, utilizando técnicas para avaliar a biodiversidade de um determinado ambiente e também com grande potencial na identificação de novos genes;

Análise baseada na busca de marcadores moleculares - Extração do DNA total, amplificação de genes marcadores (16S e 18S rDNA) por PCR, afim de encontrar genes alvos em amostras ambientais.

Figura 1. Ilustração de estratégias usadas em metagenômica (CUADRAT, 2010).



Essas metodologias têm tido sucesso aplicado à estudos de composição, dinâmica e função de comunidades microbianas, na variação de ecossistemas, incluindo aqueles sujeitos a modificações antropogênicas (GILBERT; DUPONT, 2011).

Projetos como o do metagenoma do Mar de Sargaço (VENTER *et al.*, 2004) e *Global Ocean Sampling Expedition* (GOS) (RUSCH *et al.*, 2007), contou com a extração do DNA total presente na água do mar podendo acessar as comunidades microbianas, gerando mais de 1Gpb de DNA, fornecendo uma nova perspectiva para a identificação de novos genes.

No entanto, estes estudos resultam na produção de uma grande quantidade de dados, usando mais recentemente os equipamentos de sequenciamento de nova geração

que exige um poder computacional cada vez mais eficiente (CASTRAVECHI; SHINODA, 2004).

O sequenciamento de nova geração (NGS) transformou o campo da genômica. A tecnologia de sequenciamento de alto rendimento é uma técnica poderosa para determinar toda uma sequência do genoma (NAKAZATO; OHTA; BONO, 2013). O NGS tem a capacidade de gerar entre 10 gigabases a 1 terabase de dados por corrida de forma rápida e acurada, com tamanho de sequências consideráveis (100 a 250 bases) e de forma mais profunda (ILLUMINA INC., 2014).

A bioinformática fornece ferramentas como algoritmos, programas, bases de dados, para análise destes dados.

4.6 BIOINFORMÁTICA

A bioinformática é um campo da ciência que emprega ferramentas computacionais no estudo de problemas e questões biológicas, abrangendo também as aplicações relacionadas à saúde humana (VERLI, 2014).

Estudos de DNA ambiental geralmente resultam na produção de um grande volume de dados, gerados pelo sequenciamento requerendo uma alta capacidade das ferramentas de bioinformática para tratá-los. O tratamento de dados metagenômicos para posterior análise genética necessita de uma série de ferramentas da bioinformática dado que a abundância das sequências obtidas, especialmente com equipamentos de NGS, logo não podem ser processadas manualmente (CARDOSO *et al.*, 2012).

Entre as ferramentas de bioinformática utilizadas, os softwares FastQC e Sickle são ferramentas de análise da qualidade e limpeza de sequências de baixa qualidade. O FastQC avalia a qualidade das sequências e o Sickle remove sequências de baixa qualidade de acordo com um valor de corte determinado pelo Phred (CHEN *et al.*, 2014). O Phred é um programa que executa uma probabilidade de erro a cada base (EWING *et al.*, 1998). Assim, a pontuação de qualidade Phred 20 corresponde a uma taxa de erro de 1 em 100, com uma precisão correspondente a 99%. Já o Phred 30 representa uma taxa de erro de 1 em 1000, com uma precisão correspondente a 99,9%.

As bases com qualidade ≥ 20 são consideradas de alta qualidade enquanto as bases inferiores, devem ser retiradas pois podem levar a resultados enviesados (PENG *et al.*, 2015).

Os projetos de metagenoma geram bilhões de sequências (*reads*) para análises (HUSON *et al.*, 2016). Para analisar esses dados e posteriormente inferir taxonomia, busca-se a similaridade entre os *reads* sequenciados e as sequências disponíveis em base de dados, como *RefSeq* (base de dados de sequências genéticas de referência) (O'LEARY *et al.*, 2016) e *GenBank* (base de dados de sequências genéticas) do *NCBI - National Center for Biotechnology Information* (SAYERS *et al.*, 2019).

A ferramenta utilizada para buscar similaridade em *reads* de metagenômica é o *software* DIAMOND, uma ferramenta que possibilita alinhar os *reads* metagenômicos da base de dados do NCBI, a uma velocidade de 20.000 vezes maior do que a ferramenta usual de busca de similaridade BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), sem perda de sensibilidade (BUCHFINK; XIE; HUSON, 2015). O DIAMOND realiza o alinhamento de DNA para proteína integrado ao *software* MEGAN.

O MEGAN é um *software* que permite a análise de grandes conjuntos de dados metagenômicos. É usado para calcular e explorar o conteúdo taxonômico do conjunto de dados, empregando a taxonomia do NCBI para resumir e ordenar os resultados (HUSON *et al.*, 2007). Também é uma ferramenta de visualização gráfica e estatística para comparar diferentes conjuntos de dados e de análise dos resultados (HUSON *et al.*, 2007).

Ainda, para a visualização de dados metagenômicos o pacote KronaTools é uma ferramenta de visualização de dados com gráficos interativos compartilhados via web. A tela do Krona se assemelha a um gráfico de pizza, na medida em que subdivide classes separadas em setores, com uma hierarquia incorporada. Possui um algoritmo que permite dar um zoom com coordenadas polares e recursos interativos avançados permitindo visualizar a taxonomia desde domínio até níveis mais interessantes de gêneros e espécies (ONDOV; BERGMAN; PHILLIPPY, 2011).

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar comunidades microbianas e virais de água de reúso, e de matrizes de comparação como esgoto e água potável através da abordagem metagenômica.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar por colimetria e fisico-química as águas de reúso, esgotos e água potável e relacionar com as legislações nacionais e internacionais;
- Avaliar a presença de contaminantes através da técnica de PCR com marcadores moleculares para vírus, bactérias e protozoários, normalmente encontrados em águas contaminadas;
- Caracterizar a microbiota presente na água de reúso, esgoto e água potável;
- Caracterizar a microbiota de importância sanitária na água de reúso, esgoto e água potável;
- Analisar comparativamente amostras de esgoto e água de reúso a partir de diferentes tipos de tratamento: membranas filtrantes, filtro biológico e cloração.

6. METODOLOGIA

Foi realizado um estudo descritivo, com análise exploratória de dados obtidos em laboratório e de análise por bioinformática.

6.1 COLETAS DAS AMOSTRAS

As coletas de amostras ocorreram entre março a novembro de 2017, a partir de diferentes sistemas de tratamento de esgoto e de água. As amostras foram nomeadas a partir do tipo de tratamento para manter o sigilo das empresas de saneamento, condição imposta pelos fornecedores.

6.1.1 Tipos de amostras

Foram analisados três tipos de água de reúso, uma água potável e dois tipos de esgoto:

- (i) Água de reúso a partir de estação de tratamento de esgoto (ETE), em que o produto final foi clorado, denominado de **Reúso Clorado**;
- (ii) Água de reúso a partir de ETE, onde o produto final passou por mais três etapas de refinamento em Estação de Tratamento de Água de Reúso (ETAR): filtração, ultrafiltração e osmose reversa, denominado de **Reúso Polido**;
- (iii) Água de reúso a partir de águas cinzas com tratamento a partir de filtro biológico em zona rural, denominado de **Reúso Biológico** ;
- (iv) Água potável da torneira, usada como controle negativo.
- (v) Esgoto sanitário proveniente de ETAR, que deu origem ao reúso polido, foi denominado de **Esgoto Polido**.
- (vi) Esgoto sanitário proveniente de águas cinzas, que deu origem ao reúso biológico, foi denominado de **Esgoto Biológico**.

Não foi obtido o esgoto que deu origem a amostra de reúso clorado. A companhia de saneamento não disponibilizou o material a tempo da realização do estudo, embora o esgoto polido possa ser usado para fins de comparação.

Todas as amostras tiveram como origem o esgoto doméstico. As amostras denominadas como reúso biológico e esgoto biológico, tiveram como origem amostras compostas a partir de cinco casas que utilizam o sistema de reúso, para irrigação por gotejamento, na agricultura familiar.

As datas das coletas e as respectivas fontes são descritas no quadro 1.

Quadro 1. Dados das coletas

Tipo de amostra	Data da coleta	Fontes de coleta
Potável	15 de março de 2017	Torneira de pia
Reúso clorado	15 de março de 2017	Caminhão de água de reúso
Reúso biológico	09 de novembro de 2017	Tanque de armazenamento
Reúso polido	23 de novembro de 2017	Direto da ETAR
Esgoto biológico	09 de novembro de 2017	Tanque de armazenamento
Esgoto polido	23 de novembro de 2017	Tanque de armazenamento

O volume de 20 litros de água de reúso foi coletado em galões devidamente esterilizados e tratados para extração de DNA. Além disto, foram coletadas em torno de 500 mL de água de reúso para análises físico-químicas e 100 mL para análises colimétricas. As amostras foram coletas em duplicata para todos os ensaios e transportadas em gelo para o laboratório.

Para as amostras de esgoto, foram coletados 5 litros para a extração de DNA, 500 mL para análises físico-químicas e de 100 mL para análises colimétricas. As amostras foram coletas em duplicatas e transportadas em gelo para o laboratório.

6.2 ANÁLISES COLIMÉTRICAS

Os níveis de coliformes totais (CT) e de *Escherichia coli* (EC) foram analisados em 100 mL de amostras, pelo método da membrana filtrante como descrito em Sotermartins *et al.* (2017), após diferentes diluições e contagem das colônias em Unidade Formadora de Colônias (UFC) por mililitro. Para o isolamento dos microrganismos foi utilizada a metodologia descrita no Manual da Merck (2000), em meio de cultura cromogênico indicador Chromocult® Coliform Agar (Cat. No. 1.10426.0100/500). As colônias foram diferenciadas por processo colorimétrico, em que coliformes totais apresentam-se como colônias na cor salmon/vermelhas e *Escherichia coli* como colônias na cor azul escuro para violeta. Cada diluição foi feita em triplicata. Os dados da contagem das colônias presumíveis de serem coliformes totais (CT) ou *E. coli* (EC) foram utilizados na avaliação das condições sanitárias das águas baseado nos parâmetros da Legislação, Portaria Consolidada no. 5/2017 do MS (BRASIL, 2017).

6.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As análises físico-químicas foram realizadas, por meio dos métodos descritos no Manual Prático de Análise de Água da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA, 1999, 2006), baseado no em Eaton *et al.* (2005). Para os diferentes tipos de amostras de água de reúso e água potável foram utilizadas 500 mL, e feitos 8 parâmetros físico-químicos: dureza total (método titulométrico com sal dissódico de etilenodiamina tetracético - EDTA); pH (método potenciométrico da marca Quimis®); cloro residual livre (comparação visual – DPD); nitrogênio amônia (método de Nessler); nitrogênio nitrito (método de diazotização); cloretos (método titulométrico de Mohr); sulfato (método de espectrofotometria, equipamento Hach®); e turbidez (método nefelométrico por meio do turbidímetro 2100P da Hach®).

Para amostras de esgoto polido, foram utilizados 500 mL e foram feitos 7 parâmetros: Cloro livre, dureza total, alcalinidade, condutividade, pH, turbidez e cor aparente. Sendo utilizado o parâmetro pH, para análise segundo parâmetro descrito na Resolução n°. 430/2011 do CONAMA (BRASIL, 2011a), tendo o limite permitido na faixa de 5,0 a 9,0. Para esgoto biológico foi feito apenas o parâmetro de Demanda

Bioquímica de Oxigênio (DQO), que permite avaliar o grau de eutrofização do esgoto. O esgoto clorado não foi coletado, portanto não foi feito.

As análises colimétricas e físico-químicas, foram realizadas pelo Laboratório de Microbiologia do Departamento de Saúde e Saneamento Ambiental (DSSA) da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (ENSP)/ FIOCRUZ.

Foram utilizadas para interpretação dos resultados as seguintes normativas: (i) Portaria Consolidada nº 5/2017 do MS – para água potável; (ii) Resolução nº. 430/2011 do CONAMA – para disposição do efluente em corpos hídricos; (iii) Resolução nº. 274/2000 do CONAMA – para balneabilidade.

6.4 FILTRAGEM E EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL

Para a extração de DNA total, 20 litros de cada amostra foram submetidos ao processo de filtração por bomba à vácuo, utilizando membranas Millipore de diferentes porosidades: 0,8 µm a fim de reter o material particulado em suspensão, 0,45 µm a fim de reter eucariotos, 0,22 µm a fim de reter procariotos. As membranas contendo o material filtrado foram submetidas à extração de DNA através do kit "*PowerWater® Sterivex™ DNA Isolation Kit Sample*" (MO bio laboratories, Inc). O DNA total de cada membrana foi extraído separadamente e o protocolo foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

6.5 QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO DNA METAGENÔMICO

Para quantificação e avaliação da integridade e qualidade do DNA metagenômico que foi utilizado no preparo das bibliotecas, foi usado o sistema do Qubit™ 2.0 fluorometer (Thermofisher scientific) seguindo as instruções do fabricante. Foi realizado pela Plataforma de Sequenciamento de Alto Desempenho da FIOCRUZ - RJ.

6.6 ENSAIOS MOLECULARES POR PCR

Foram selecionados para os ensaios moleculares o conjunto de dez pares de iniciadores específicos previamente publicados e propostos por Moura (2015), para detecção de bactérias, vírus e protozoários associados à contaminação hídrica por esgoto doméstico, microrganismos patogênicos ou não, associados à humanos.

Utilizou-se nas reações de PCR marcadores moleculares de contaminação bacteriana baseados no gene 16S rRNA: para *Bacteroides* associados à humanos os iniciadores HF183F e Bac708R com amplicon 525pb (MCQUAIG *et al.*, 2012), *Enterococcus faecalis* os iniciadores M66–M107 e M66–M107EF com amplicon 401 pb (ROSLEV; BUKH, 2011), *Faecalibacterium* spp. os iniciadores HFB e HFBR com amplicon 399 pb (ROSLEV; BUKH, 2011), *Bifidobacterium dentium* os iniciadores Bi-DEN 1 e Bi-DEN com amplicon 387pb -400 pb, *Bifidobacterium adolescentis* os iniciadores Bi-ADO 1 e Bi-ADO 2 com amplicon 279 pb (ROSLEV; BUKH, 2011).

Para reações de PCR com marcadores moleculares de outros procaríotos de importância sanitária, baseou-se no gene uidA, *Escherichia coli* os iniciadores uidA298F e uidA884R com amplicon 600 pb (SAUER *et al.*, 2011); e baseado no gene nifH para *Methanobrevibacter smithii* os iniciadores Mnif-342f e Mnif-363r com amplicon 221pb (ROSLEV; BUKH, 2011).

A detecção de contaminação por vírus foi baseada no gene HadV para Adenovirus tipos 40 e 41, os iniciadores HAdVF e HAdV R com amplicon 137pb (WOLF; HEWITT; GREENING, 2010); e no gene T-antigen para Polyomavirus humano (HPyV) os iniciadores SM2-F e P6-R com amplicon 173pb (MCQUAIG *et al.*, 2009). Para o protozoário *Giardia* spp, foi baseado no gene beta-giardin utilizando os iniciadores G7F e G759R com amplicon 753pb (ZHENG *et al.*, 2009). Descrição do protocolo no anexo I. Esses ensaios foram realizados apenas nas amostras de água de reúso e água potável.

6.7. PREPARO DE BIBLIOTECAS E SEQUENCIAMENTO DE ALTO DESEMPENHO

As bibliotecas metagenômicas foram preparadas com os Kits Nextera XT DNA e Nextera XT index da Illumina pela Plataforma de Sequenciamento de Alto Desempenho da FIOCRUZ- RJ, localizado no Instituto Oswaldo Cruz, com reagentes adquiridos pelo grupo de pesquisa da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca.

As amostras foram sequenciadas pelo método *shotgun* no sequenciador HiSeq 2500 da Illumina realizado na plataforma. A partir de quanto 1 ng DNA por amostra, paired end e tamanho dos reads 150 pb.

6.8 ANÁLISES DE METAGENOMAS

Para análise de qualidade dos dados gerados pelo sequenciamento, utilizou-se a ferramenta FastQC versão 0.67 (BLANKENBERG *et al.*, 2010), com os parâmetros padrão. Em seguida, utilizou-se a ferramenta Sickle versão 1.3 (JOSHI; FASS, 2011) para a limpeza das sequências de baixa qualidade utilizando o parâmetro de corte Phred de 28.

Para a busca de similaridade utilizou-se o Diamod versão 0.9.21 (BUCHFINK; XIE; HUSON, 2015b) com os parâmetros padrões, exceto para e-value 1e-05, identidade e cobertura de 75% contra a base de dados curados de referência RefSeq Genomic Release 2018 do NCBI versão 206.0 (Centro Nacional para Informação Biotecnológica).

As ferramentas utilizadas nesse trabalho foram realizadas na plataforma de bioinformática Stingray@Galaxy (WAGNER *et al.*, 2014) do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ .

Os resultados das análises foram visualizadas no programa *Megan* versão 6 (HUSON *et al.*, 2016) e KronaTools versão 1.1.0 (ONDOV; BERGMAN; PHILLIPPY, 2011).

As estatísticas dos resultados foram realizadas no programa R versão 3.62 (R CORE TEAM, 2013), utilizando o pacote *Vegan* para os parâmetros de curva de rarefação e diversidade β . A diversidade β foi gerada utilizando o índice de Whittaker. A diversidade α foi realizada *Megan* versão 6 (HUSON *et al.*, 2016), utilizando o índice de Shannon-Wiener. A proporção de abundância foi feita por estatística descritiva (porcentagem).

7. RESULTADOS

7.1- ANÁLISES TRADICIONAL DA ÁGUA DE REÚSO

7.1.1 Análises colimétricas da água de reúso e água potável

A tabela 6 apresenta os resultados obtidos nas análises colimétricas e os valores recomendados pelas legislações nacionais e internacionais vigentes, descritas na tabela 3.

Tabela 5. Resultados dos parâmetros colimétricos em água de reúso.

	CT (UFC/mL)	EC(UFC/mL)
Reúso clorado	40	20
Reúso polido	6	ND*
Reúso biológico	26.600	25.800
Potável	ND*	ND*
Portaria n°5/2018	Ausente	Ausente
CONAMA n°274 ^a	4,61	3,9
ABNT n°13969/97 Classe 1	9,23	-
ABNT n°13969/97 Classe 2	23,07	-
ABNT n°13969/97 Classe 3	23,07	-
ABNT n°13969/97 Classe 4	230	-
Bahia n°75/2010 Categoria A ^b	4,75	-
Bahia n°75/2010 Categoria B ^c	4,8	-
EPA (2012)	(TI) ^d 3,46 e (TII) ^e 36,9	(T1)3,46 e (T2)36,9
OMS (2006)	<2,2	-

^a Consideramos os valores correspondentes como satisfatórios

^b Irrigação por gotejamento, cultivos distantes do nível do solo, inclusive hidroponia (contato da parte da planta minimizado), de qualquer cultura incluindo produtos alimentícios consumidos crus.

^c Irrigação, inclusive hidroponia, de produtos alimentícios não consumidos crus, produtos não alimentícios, forrageiras, pastagens, árvores, cultivos usados em revegetação e recuperação de áreas degradadas.

^d Tipo I - tipo de água de reúso onde há provável o contato com seres humanos, como em irrigação, água recreativa, represas, combate a incêndios e descarte de sanitários

^e Tipo II- Tipo de água de reúso onde é improvável o contato com seres humanos, como em áreas restritas ou remotas.

*Não detectável

No reúso clorado a média dos níveis de coliformes totais observada foi de 40 UFC/100 mL e o de *Escherichia coli* foi de 20 UFC/100 mL. No reúso polido esses níveis para coliformes totais foram de 6 UFC/100mL e para *Salmonella* spp. foi de 3 UFC/100 mL. Nessa amostra observou-se a ausência de *E. coli*. No reúso biológico a média de coliformes totais foi de 26.600 UFC/100 mL e o de *E. coli* de 25.800 UFC/100 mL. E como esperado, na água potável não ocorreu crescimento de bactérias.

A fim de comparação, os dados das legislações estabelecidas foram convertidos em UFC por mL (GRONEWOLD; WOLPERT., 2008). Os dados obtidos em reúso clorado apresentam-se em conformidade apenas na classe 3 da ABNT n°13969/97 e impróprios nas demais legislações. Os dados de reúso polido estiveram em conformidade em todas as classes da ABNT n°13969/97, porém impróprios nas demais legislações. Os dados de reúso biológico estiveram impróprios em todas as legislações citadas.

7.1.2 Análises físico-químicas da água de reúso e água potável

A tabela 7 apresenta os resultados obtidos, considerando os 12 parâmetros físico-químicos analisados em laboratório e comparando com os limites descritos na Portaria de Consolidação nº5/2017 (Tabela 3):

Tabela 6. Resultado dos parâmetros físico-químicos em águas de reúso e potável

Parâmetros	Reúso Clorado	Reúso Polido	Reúso Biológico	Água Potável	VMP* (Portaria nº5/2018)	VMP (EPA, 2012)	ABNT Classe1	ABNT Classe2	ABNT Classe3	ABNT Classe4
Cloro livre mg/L	0,15	0,05	0	0,19	2	1	0,5 - 1,5	Superior a 0,5	-	-
Dureza total mg/L	68,5	14	645	25,8	500	40	-	-	-	-
Alcalinidade CaCO ₃ mg/L	31,8	715	698	8,10	**	50-150	-	-	-	-
Condutividade µS/cm	554	284	1017	114	**	360-1250	-	-	-	-
pH	7,0	7,0	7,0	6,99	6,0 a 9,5	6.0-9.0	6,0 - 8,0	-	-	-
Turbidez uT	2,55	0,3	44	0,30	5,0	5,0	5,0	5,0	10.0	-
Cor aparente	44,2	19	340	21	15	15	-	-	-	-
Fluoreto mg/L	0,61	0,42	0,77	0,57	1,5	1,0	-	-	-	-
Cloreto mg/L	97,68	16,6	146,24	12,84	250	65-170	-	-	-	-
Nitrato mg/L	60,20	1,35	14,34	4,60	10	5-20	-	-	-	-
Nitrito mg/L	0,71	0,06	0	0,00	1	0.01-0.05	-	-	-	-
Sulfato mg/L	38,93	22,37	15,56	16,00	250	80-250	-	-	-	-

* VMP-Valores máximos permitidos.

** Faixa de concentração máxima permitida segundo (COELHO et al., 2017) 30 a 500 mg/L de CaCO₃ e faixa de condutividade de 10 a 1000µS/cm.

O reuso clorado apresentou níveis em não conformidade para os parâmetros cor aparente e nitrato. O reuso polido apresentou níveis em não conformidade para os parâmetros alcalinidade e cor aparente. O reuso biológico apresentou níveis em não conformidade nos parâmetros dureza, alcalinidade, condutividade, turbidez, cor aparente e nitrato. Apesar do reuso biológico ser a amostra mais fora dos padrões para potabilidade e balneabilidade, essa não é usada em atividades de contato direto, sendo utilizada apenas para rega agrícola por gotejamento. A água potável apresentou todos os níveis em conformidade com a legislação vigente.

Comparando com os limites descritos na EPA, 2012 que define os parâmetros permitidos para água de reuso em fins não potáveis, o reuso clorado apresentou níveis em não conformidade para os parâmetros dureza total, cor aparente, nitrato e nitrito. O reuso polido apresentou níveis em não conformidade para os parâmetros alcalinidade, cor aparente e nitrito. O reuso biológico apresentou níveis em não conformidade para os parâmetros dureza total, alcalinidade, turbidez, e cor aparente.

7.2- ANÁLISES TRADICIONAIS DO ESGOTO

7.2.1 Análises colimétricas dos esgotos

A tabela 8 apresenta os resultados obtidos nas análises colimétricas e os valores recomendados pelo CONAMA n° 274 (BRASIL, 2001).

Tabela 7. Resultados dos parâmetros colimétricos em esgotos

	CT (UFC/mL)	EC (UFC/mL)
Esgoto polido	6.850	55
Esgoto biológico	820.000	2.060.000
CONAMA n°274	4,61	3,9

No esgoto polido a média dos níveis de coliformes totais observado foi de 6.850 UFC/100 mL e o de *E. coli* foi de 55 UFC/100 mL. No esgoto biológico esses níveis para coliformes totais foram de 820.000 UFC/100mL e para *E. coli* foi de 2.060.000 UFC/100 mL. Como a resolução CONAMA n°. 430/2011 que dispõe sobre as

condições e padrões de lançamento de efluentes não traz indicação de parâmetros colimétricos, baseou-se na resolução CONAMA n° 274/2000.

Os dados obtidos indicam que as duas amostras de esgotos não estiveram em conformidade com as recomendações para a balneabilidade, portanto impróprias para o despejo em corpos hídrico.

7.2.2 Análise físico-química dos esgotos

Para esgoto polido, foram feitos 7 parâmetros físico-químicos (tabela 9), dentre eles, apenas o pH (5,0 a 9,0) é descrito na resolução CONAMA nr. 430/2011 que dispõe sobre lançamento de efluentes. O esgoto polido esteve em não conformidade para o pH.

Tabela 8. Resultado dos parâmetros físico - químicos avaliados para esgoto polido

	Cloro livre mg/L	Dureza total mg/L	Alcalinidade CaCO ₃ mg/L	Condutividade µS/cm	pH	Turbidez uT	Cor aparente
Esgoto Polido	0,03	303	1933	2932	4,2	12,3	215

Para esgoto biológico (a partir de água cinza), foi feito apenas 1 parâmetro, Demanda Bioquímica de Oxigênio (DQO), para avaliar o grau de eutrofização ainda presente. O valor encontrado foi de 11,817 mg/L, conforme esperado pela natureza da amostra.

Para o esgoto que dá origem a água de reúso clorado não foram feitas análises físico-química.

O nível de cloro livre na concentração obtida, indica que caso o esgoto tenha recebido cloração após tratamento, a matéria orgânica presente consumiu o cloro adicionado. A dureza relativamente alta indica que ainda tem cálcio e magnésio presentes no esgoto. A alcalinidade confirma a presença de carbonato de potássio. A condutividade indica que existem muitos sais dissolvidos na amostras. O pH encontrou-se ácido e a turbidez e cor aparente fora dos valores recomendado. Resultado que o tratamento dado ao esgoto polido não foi eficaz.

7.3 DETECÇÃO POR PCR DOS MARCADORES MOLECULARES DE POLUIÇÃO ASSOCIADOS À HUMANOS

Nas análises realizadas com os marcadores moleculares, 50% dos marcadores investigados (5/10) foram detectados em todas as amostras de água de reúso, descritos no quadro 2. São eles: *Bacteroides* associados a humanos, *B. dentium* (16S rRNA), *M. smithii* (nifH), Adenovírus tipo 40 e 41 (HADv). O marcador para *Escherichia coli* gene uidA foi detectado no reúso clorado e polido, porém ausente no reúso biológico. Isso confirmou que não houve mistura de águas cinzas com esgoto bruto (águas negras). Como esperado, não se detectou a presença dos marcadores na amostra de água potável.

Quadro 2. Presença dos marcadores moleculares nas amostras de reúso e água potável.

	Amostras			
	Reúso clorado	Reúso polido	Reúso biológico	Água potável
<i>Bacteroides humanos</i>	■	■	■	□
<i>M. smithii</i>	■	■	■	□
<i>E. coli</i>	■	■	□	□
<i>E. faecalis</i>	□	□	□	□
<i>Faecalibacterium spp.</i>	□	□	□	□
<i>B. adolescentis</i>	□	□	□	□
<i>B. dentium</i>	■	■	■	□
Adenovírus	■	■	■	□
HPyV	□	□	□	□
<i>Giardia spp.</i>	□	□	□	□

Legenda: Onde lê-se ■, representa positividade e onde lê-se □, representa negatividade.

A figura 3 , mostra a justaposição de fotos, um exemplo dos amplicons esperados nas análises da eletroforese dos produtos de PCR com as amostras com resultados positivos em géis de agarose.

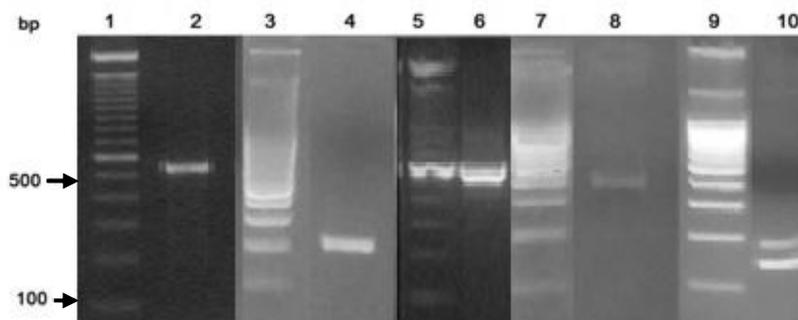


Figura 2. Eletroforese em géis de agarose.(1-2: 2%, 3-4: 2%, 5-6: 2%, 7-8: 3%, 9-10: 2%). A seta indica a posição da banda de 500 pb do padrão. Os produtos de PCR obtidos com os iniciadores correspondentes aos marcadores referentes a: *Bacteroides* de humanos (pista 2, com 525 pb), *M. smithii* (pista 4, com 221 pb), *E. coli* (linha 6, com 600 pb), *B. dentium* (linha 8, com ~400 pb) e Adenovirus (linha 10, com 137 pb). O padrão de peso molecular de 100 kb (1, 3, 5, 7 e 9) nas respectivas corridas dos géis, corados com brometo de etídeo (1 µg.mL⁻¹).

Nos ensaios de PCR em todas as amostras de água de reúso detectou-se a banda de 525 pb, marcadora da presença de *Bacteroides* associados a humanos. Nas amostras de água reúso também foram detectados *B. dentium* com a banda marcadora 387 pb.

A contaminação por *E. coli* pelo de gene uidA foi detectada nas amostras de água de reúso pois as análises de PCR mostraram a presença do respectivo amplicon de 600 pb.

7.4 QUANTIFICAÇÃO DE DNA METAGENÔMICO NO QUIBIT E QUALIDADE DO SEQUENCIAMENTO

Na tabela 10 estão apresentados os resultados da extração de DNA. Para a amostra de reúso polido e para a amostra de água potável foram obtidos menos de 1 nanograma de DNA por microlitro. Para avaliação da pureza de uma amostra é indicado o método de absorvância de UV onde requer valores na razão de 260nm/280nm (1,8 – 2,0).

Tabela 9. Resultado da quantificação de DNA.

Amostras	Concentração (ng/μL)	Volume (μL)
Reúso clorado	18,5	50
Reúso polido	0,07	50
Reúso biológico	33	50
Potável	0,09	50
Esgoto polido	8,5	50
Esgoto biológico	7,7	50

A qualidade do sequenciamento avaliados pelo *software* FastQC demonstrou que não houveram sequências sinalizadas como de baixa qualidade. O comprimento das sequências foram de 35-101 pb e percentual do conteúdo GC foi de 57% em reúso clorado, 55% em reúso polido, 59% em reúso biológico, 62% em água potável, 55% em esgoto polido e 52% em esgoto biológico.

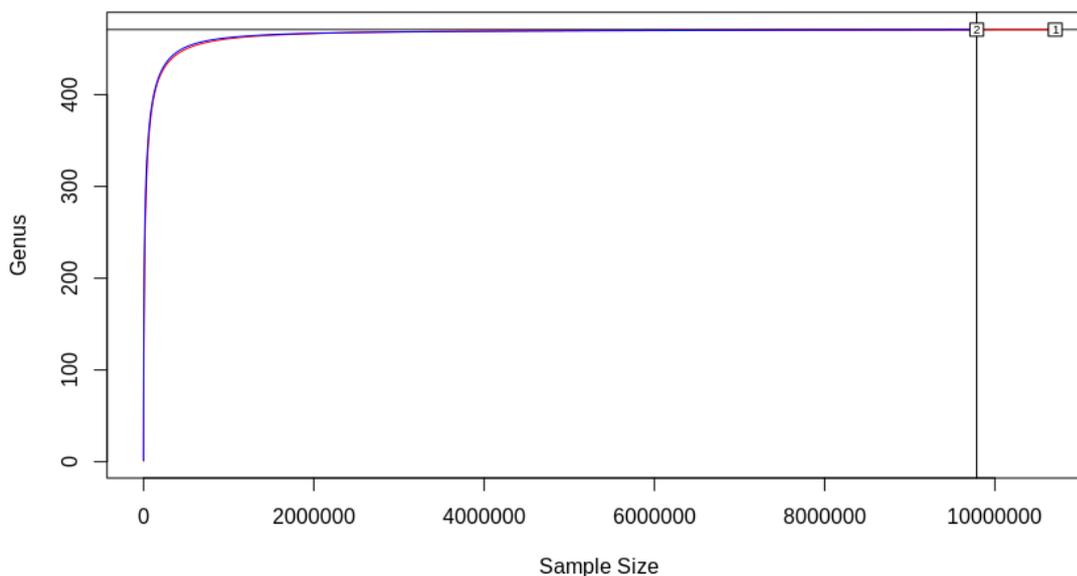
7.5 AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE ECOLÓGICA ALFA, BETA E CURVA DE RAREFAÇÃO

As curvas de rarefação demonstram graficamente a cobertura da diversidade das amostras para o nível taxonômico de gênero (Figuras 4 e 5). Além disso, os índices de diversidade ecológica alfa (α) e beta (β) foram utilizados para estimar a diversidade local e a mudança de espécies ao longo de um gradiente ambiental (quadros 3 e 4).

As curvas de rarefação demonstraram que a riqueza total das amostras de esgoto e de água de reúso foram obtidas.

O esgoto polido e esgoto biológico, apresentaram um platô de diversidade semelhantes como observa-se na figura 4. A partir de 8 milhões de sequências não se observa crescimento significativo na curva, que chega no platô acima de 450 gêneros.

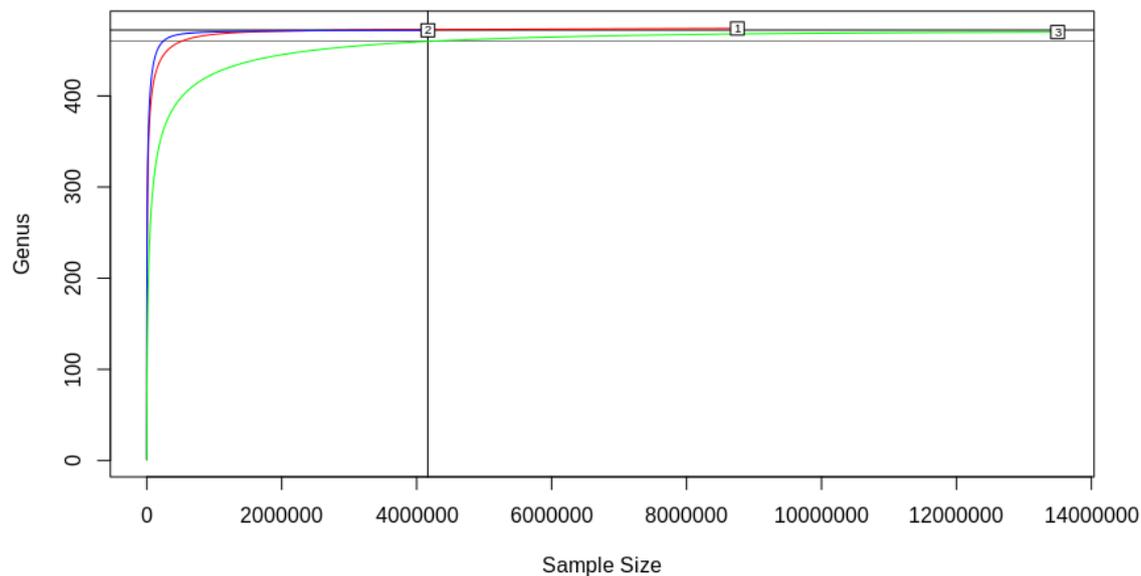
Figura 3: Curva de rarefação das amostras de esgoto. Em linha vermelha: esgoto biológico (1), linha azul: esgoto polido (2). Gráfico gerado pelo Megan6.



Legenda ■ Esgoto biológico (1) ■ Esgoto polido (2)

Na figura 5 foi possível observar que as comunidades presentes no reuso polido cresce de forma mais lenta em relação as demais. A presença do platô nas amostras analisadas, em aproximadamente 10 milhões de sequências, demonstra que estas tiveram a diversidade explorada ao máximo. No reuso polido (verde – 3), quando a amostra atingiu em torno de 13 milhões e 500 mil sequências, a curva atingiu o platô e não houve mais a inserção de gêneros diferentes. Aproximadamente 450 gêneros detectados. No reuso clorado (azul- 2), quando a amostra atingiu cerca de 4 milhões de sequências em 450 gêneros, alcançou o platô e não houve a inserção de novos gêneros. No reuso biológico (vermelho – 1), quando a amostra atingiu cerca de 9 milhões de sequências em 450 gêneros, alcançou o platô e não houve a inserção de novos gêneros.

Figura 4. Curva de rarefação das amostras de água de reúso. Em linha vermelha (1): reúso biológico; linha azul (2): reúso clorado e linha verde (3): reúso polido. Gráfico gerado pelo Megan6.



Legenda ■ Reúso biológico (1) ■ Reúso clorado (2) ■ Reúso polido (3)

A diversidade alfa foi avaliada pelo Índice de Shannon-Wiener. A diversidade alfa variou entre 3,0 e 5,0 em todas as amostras. Isso demonstra que nas amostras a diversidade de espécies foi pequena. A diversidade beta, calculada por Whittaker também demonstrou que a mudança da diversidade de espécies entre as amostras esgoto e reúso foi pequena.

Quadro 3. Diversidade Alfa

Amostras	Alfa (α)
Reúso clorado	5.358
Reúso polido	3.537
Reúso biológico	5.335
Potável	4.664
Esgoto polido	3.793
Esgoto biológico	3.409

Quadro 4. Diversidade Beta

Amostras	Beta (β)
Reúso	0,00635
Esgoto	0,002123

7.6 ANÁLISE DESCRITIVA DOS METAGENOMAS

Os resultados das análises metagenômicas foram dispostos da seguinte forma: (a) diversidade de procariotos, (b) diversidade de vírus, (c) procariotos de importância sanitária.

7.6.1 Análises do metagenoma do reúso clorado

(a). Diversidade de procariotos em reúso clorado (gênero).

A amostra reúso clorado apresentou o total de 13.013.943 de sequências, sendo destas 7.872.313 sequências similares às disponíveis nas base de dados. As análises mostraram que as bactérias dos gêneros *Acidovorax* teve maior abundância em reúso clorado com 18% das sequências similares com as dispostas na base de dados. Posteriormente *Sphingomonas* (7%), *Caulobacter* (4%), *Limnohabitans* (3%) e *Tabrizicola* (2%). Os números de sequências dos cinco procariotos mais abundantes estão descritos na tabela 11.

Tabela 10. Representação cinco gêneros mais abundantes em reúso clorado.

Gêneros	número de sequências
<i>Acidovorax</i>	1.488.617
<i>Sphingomonas</i>	553.340
<i>Caulobacter</i>	363.107
<i>Limnohabitans</i>	268.000
<i>Tabrizicola</i>	214.640

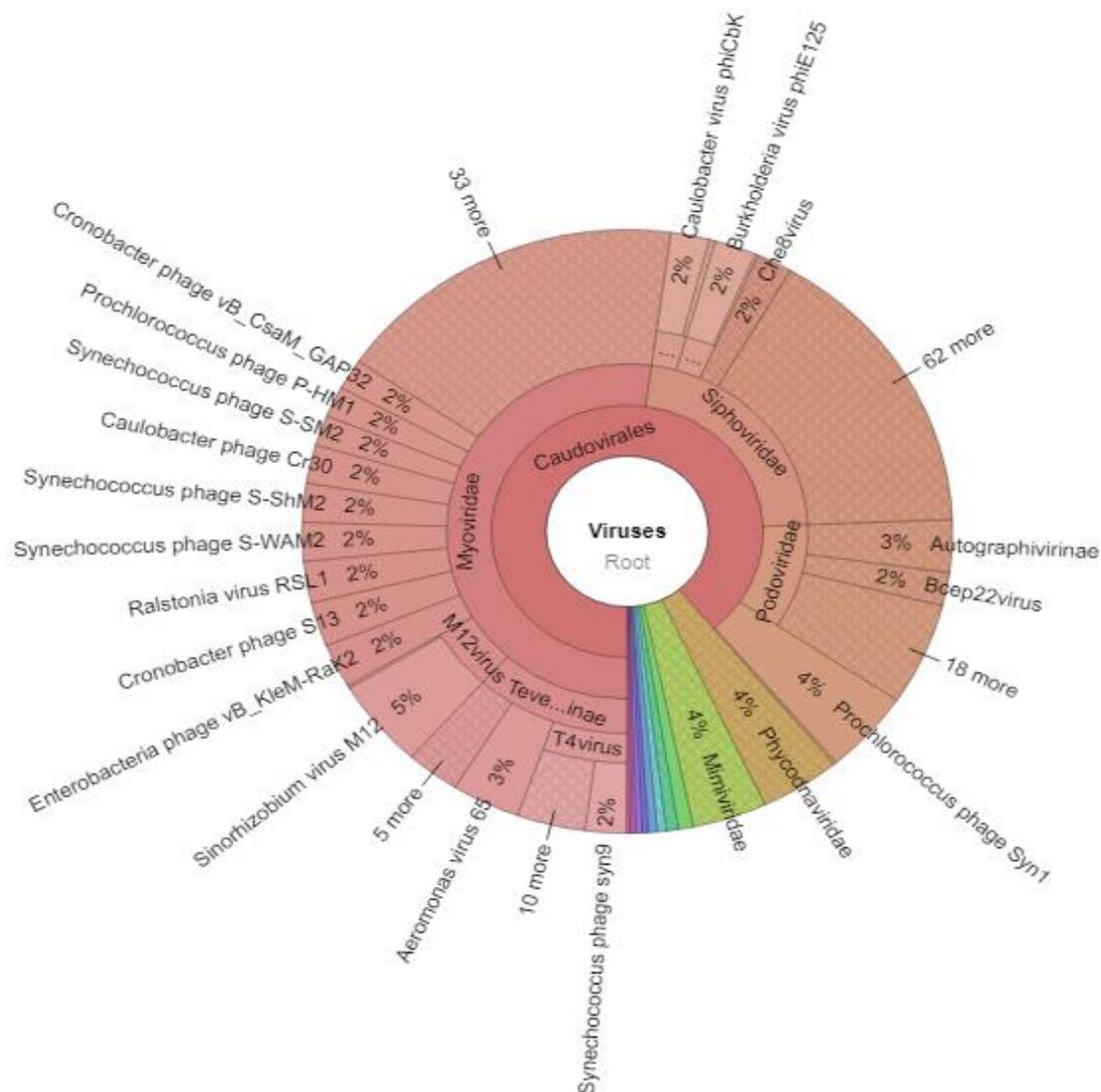
(b). Diversidade de vírus em reúso clorado

Os vírus representaram 0,5% das sequências no reúso clorado. O vírus mais abundante foi *Sinorhizobium virus M12*, que representou 5% dos vírus em reúso clorado. Posteriormente, *Prochlorococcus phage Syn1*, *Phycodnaviridae* e *Mimiviridae*, todos com 4%, *Aeromonas virus 65* e *Autographivirinae* com 3% de representação no reúso clorado. Os números de sequências dos cinco vírus mais abundantes estão descritos na tabela 12 e representados no gráfico 1.

Tabela 11. Vírus mais abundantes em reúso clorado

Vírus	número de sequências
<i>Sinorhizobium virus M12</i>	1.968.078
<i>Prochlorococcus phage Syn1</i>	1.574.463
<i>Phycodnaviridae</i>	1.574.463
<i>Mimiviridae</i>	1.574.463
<i>Aeromonas virus 65</i>	1.180.847
<i>Autographivirinae</i>	1.180.847

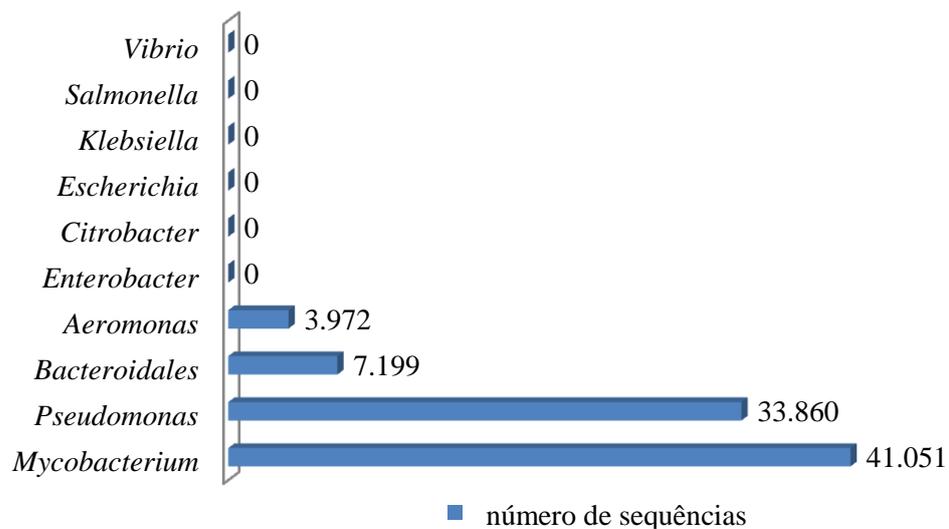
Gráfico 1: Representação da diversidade de vírus em reuso clorado



(c). Procariotos de importância sanitária em reuso clorado (gênero).

Dentre os procariotos de importância sanitária pesquisados, apenas quatro dos dez avaliados, foram encontrados no reuso clorado. *Mycobacterium* apresentou o maior número de sequências com 41.051, seguido dos *Pseudomonas* (33.860), *Bacteroidales* (7.199) e *Aeromonas* (3.972). Não foram detectados nas análises: *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella* e *Vibrio*. Os quatro procariotos de importância sanitária detectados estão apresentados no gráfico 2.

Gráfico 2: Procariotos de importância sanitária em reúso clorado



7.6.2 Análises do metagenoma reúso polido

(a). Diversidade de procariotos em reúso polido (gênero)

A amostra reúso polido apresentou um total de 12.030.565 sequências, dessas, 9.910.813 foram similares com as dispostas nas bases de dados. Através das análises foi identificado o gênero *Aeromonas* com maior abundância no grupo, representando 30% e em seguida: *Pseudomonas* (14%), *Shewanella* (11%), *Methylobacterium* (9%) e *Enterobacter* (3%). O número de sequências dos cinco procariotos mais abundantes estão descritos no tabela 13.

Tabela 12. Representação dos cinco gêneros mais abundantes em reúso polido

Gêneros	número de sequências
<i>Aeromonas</i>	2.999.188
<i>Pseudomonas</i>	1.483.285
<i>Shewanella</i>	1.160.904
<i>Methylobacterium</i>	906.983
<i>Enterobacter</i>	352.255

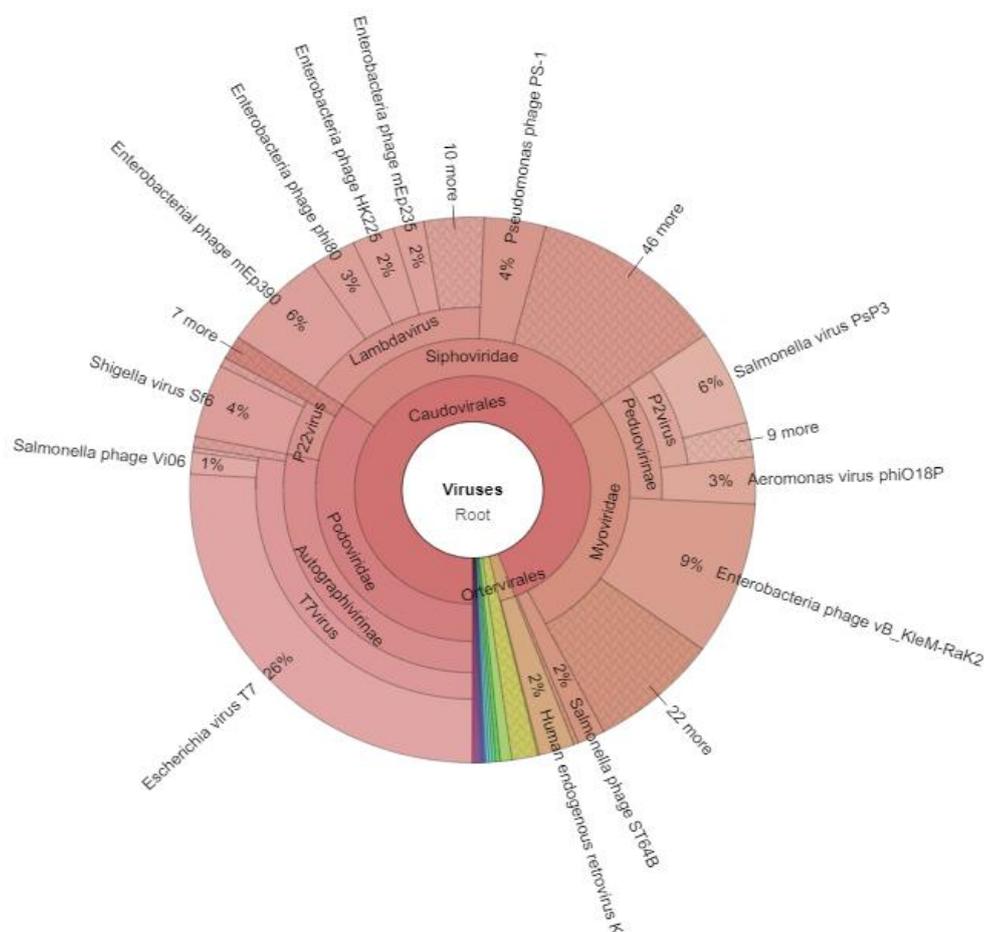
(b). Diversidade de vírus em reúso polido

Os vírus representaram 0,02% do número de sequências na amostra de reúso polido. A abundância foi representada pelo vírus *Escherichia virus T7* com 26% de sequências. Em seguida, *Enterobacteria phage vB_KleM-RaK2* (9%), *Enterobacterial phage mEp390* (6%), *Salmonella virus PsP3* (6%), *Pseudomonas phage PS-1* e *Shigella virus Sf6*, ambos com 4% de sequências em reúso polido. Os números de sequências dos cinco vírus mais abundantes estão descritos na tabela 14 e representados no gráfico 3.

Tabela 13: Vírus mais abundantes em reúso polido

Vírus	número de sequências
<i>Escherichia virus T7</i>	5.153.624
<i>Enterobacteria phage vB_KleM-RaK2</i>	1.783.947
<i>Enterobacterial phage mEp390</i>	1.189.298
<i>Salmonella virus PsP3</i>	1.189.298
<i>Pseudomonas phage PS-1</i>	7.928.652

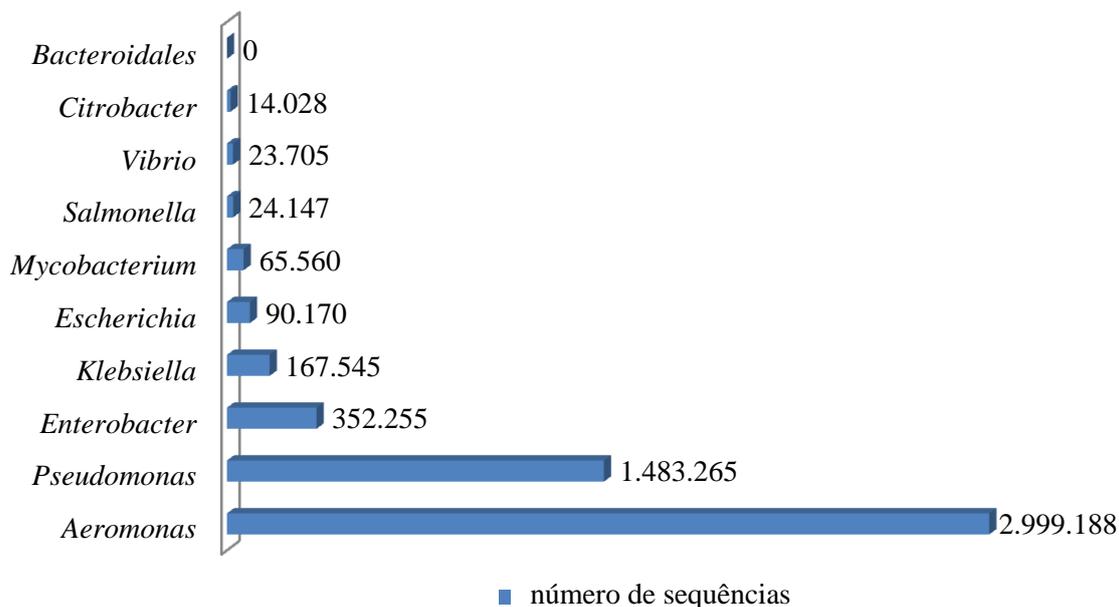
Gráfico 3: Representação da diversidade de vírus em reuso polido



(c). Procariotos de importância sanitária reuso polido (gênero).

Dentre os procariotos de importância sanitária presentes no reuso polido, o gênero *Aeromonas* foi o que representou o maior número de sequências, com 2.999.188. Posteriormente foram: *Pseudomonas* (1.483.265), *Enterobacter* (352.255), *Klebsiella* (167.545), *Escherichia* (90.170), *Mycobacterium* (65.560), *Salmonella* (24.147), *Vibrio* (23.705) e *Citrobacter* (14.028). Apenas o gênero *Bacteroidales* não foi detectado. Os nove procariotos de importância sanitária detectados estão apresentados no gráfico 4.

Gráfico 4: Procariotos de importância sanitária em reúso polido



7.6.3 Análises do metagenoma reúso biológico

(a). Diversidade de procariotos a nível de gênero para reúso biológico

A amostra reúso biológico apresentou um total de 15.394.021 sequências, sendo dessas, 13.328.093 similares às dispostas na base de dados. Na análise da diversidade de procariotos em reúso biológico, o gênero *Pseudomonas* apresentou mais abundante, sendo 10% do total. Posteriormente, *Rhodobacter* (7%), *Shewanella* (6%), *Aeromonas* e *Acidovorax* (4%). Os números de sequências dos cinco procariotos mais abundantes estão descritos na tabela 15.

Tabela 14: Representação dos cinco gêneros mais abundantes em reúso biológico

Gêneros	número de sequências
<i>Pseudomonas</i>	1.334.321
<i>Rhodobacter</i>	941.878
<i>Shewanella</i>	904.311
<i>Aeromonas</i>	606.800
<i>Acidovorax</i>	587.887

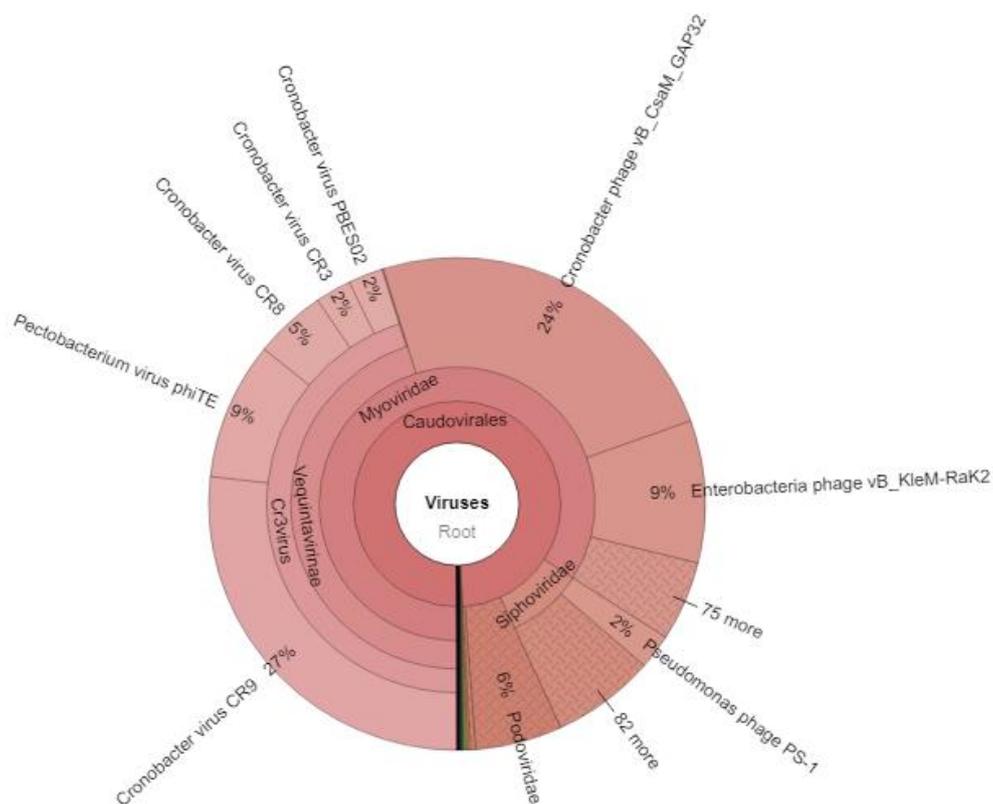
(b). Diversidade de vírus em reuso biológico

Os vírus representaram 0,09% das sequências em reuso biológico. O vírus mais abundante foi *Cronobacter virus CR9*, com 27%, seguido de *Cronobacter phage vB_CsaM_GAP32* com 24%, *Enterobacteria phage vB_KleM-RaK2*, *Pectobacterium virus phiTE* ambos com 9% e *Podoviridae* com 6%. Os números das sequências dos cinco vírus mais abundantes estão descritos na tabela 16 e representados no gráfico 5.

Tabela 15. Vírus e bacteriófagos mais abundantes em reuso biológico

Vírus	número de sequências
<i>Cronobacter virus CR9</i>	32.387.256
<i>Cronobacter phage vB_CsaM_GAP32</i>	28.788.672
<i>Enterobacteria phage vB_KleM-RaK2</i>	10.795.752
<i>Pectobacterium virus phiTE</i>	10.795.752
<i>Podoviridae</i>	7.197.168

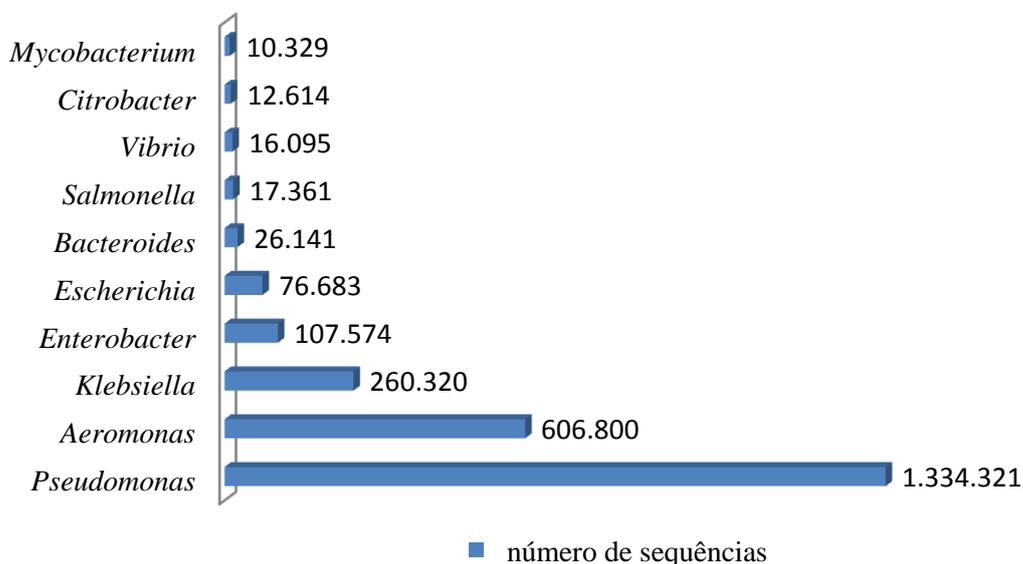
Gráfico 5. Representação da diversidade de vírus em reuso biológico



(c). Procariotos de importância sanitária reuso biológico.

Na análise de procariotos de importância sanitária, no reuso biológico foram detectados todos os procariotos selecionados, sendo *Pseudomonas* como a bactéria mais abundante, com 1.334.321 sequências neste nível de avaliação. Em seguida, *Aeromonas* (606.800), *Klebsiella* (260.320), *Enterobacter* (107.574), *Escherichia* (76.683), *Bacteroides* (26.141), *Salmonella* (17.361), *vibrio* (16.095), *Citrobacter* (12.614) e *Mycobacterium* (10.329). Os procariotos de importância sanitária detectados estão apresentados no gráfico 6.

Gráfico 6: Procariotos de importância sanitária em reuso biológico



7.6.4 Análises do metagenoma água potável

(a). Diversidade de procariotos a nível de gênero para água potável.

Em água potável o número total de sequências foi de 9.559.916, sendo dessas, 6.195.143 similares com as disponíveis na base de dados. *Bradyrhizobium* foi o procarioto mais abundante com 17% das sequências, seguido de *Sphingomonas* (11%), *Mycobacterium* (6%), *Aquabacterium* e *Novosphingobium* (5%). Os número de sequências dos cinco procariotos mais abundantes estão descritos na tabela 17.

Tabela 16: Representação dos cinco gêneros mais abundantes em água potável

Gênero	número de sequências
<i>Bradyrhizobium</i>	1.113.028
<i>Sphingomonas</i>	712.470
<i>Mycobacterium</i>	406.242
<i>Aquabacterium</i>	371.352
<i>Novosphingobium</i>	340.855

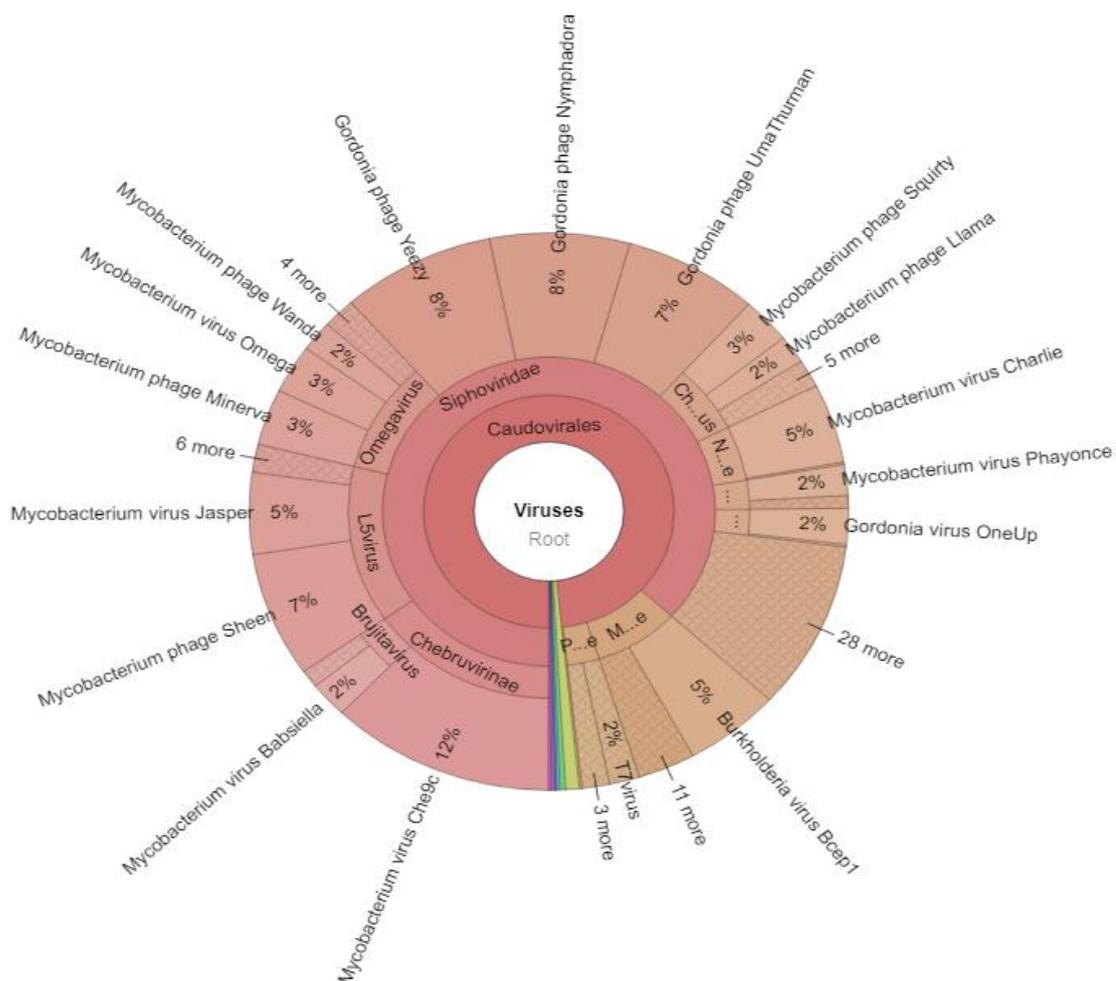
(b). Diversidade de vírus em água potável

Os vírus representaram 0,02% das sequências em água potável. O vírus mais abundante foi *Mycobacterium virus Che9c*, com 12%, seguidos de *Gordonia phage Yeezy* e *Gordonia phage Nymphadora*, ambos com 8%, *Gordonia phage UmaThurman* e *Mycobacterium phage Sheen* ambos com 7%. Os números de sequências dos cinco vírus mais abundantes estão descritos na tabela 18 e representados no gráfico 7.

Tabela 17: Vírus mais abundantes em água potável

Vírus	número de sequências
<i>Mycobacterium virus Che9c</i>	14.868.348
<i>Gordonia phage Yeezy</i>	9.912.232
<i>Gordonia phage Nymphadora</i>	9.912.232
<i>Gordonia phage UmaThurman</i>	8.673.203
<i>Mycobacterium phage</i>	8.673.203

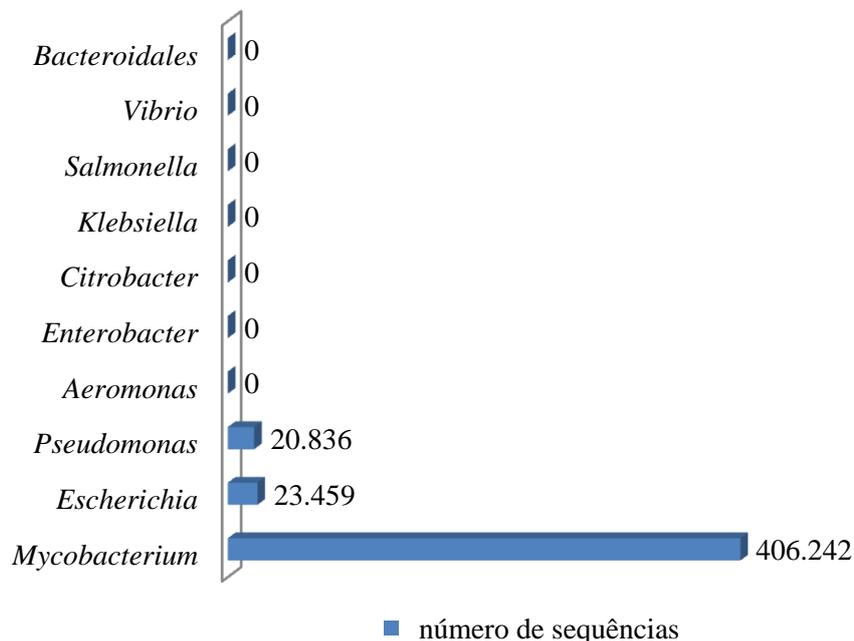
Gráfico 7: Representação da diversidade de vírus em água potável



(c). Procariotos de importância sanitária em água potável.

Em água potável, os procariotos de importância sanitária foram: *Mycobacterium* com o maior número de sequências (406.242); em seguida *Escherichia* (23.459) e *Pseudomonas* (20.836). Não foram detectados hits para *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Vibrio* e *Bacteroidales*. Os procariotos de importância sanitária detectados estão apresentados no gráfico 8.

Gráfico 8: Procariotos de importância sanitária em água potável



7.6.5 Análises do metagenoma para esgoto polido

(a). Diversidade de procariotos a nível de gênero para esgoto polido

Em esgoto polido foram detectados um total de 9.492.982 sequências. O procarioto com maior abundância foi *Pseudomonas*, com 40% das sequências, seguidos de *Acinetobacter* (9%), *Acidovorax* (6%), *Shewanella* (5%) e *Aeromonas* (4%). Os números de sequências dos cinco procariotos mais abundantes estão descritos na tabela 19.

Tabela 18: Representação dos cinco gêneros mais abundantes em esgoto polido

Gêneros	número de sequências
<i>Pseudomonas</i>	3.766.518
<i>Acinetobacter</i>	858.489
<i>Acidovorax</i>	640.669
<i>Shewanella</i>	476.036
<i>Aeromonas</i>	469.286

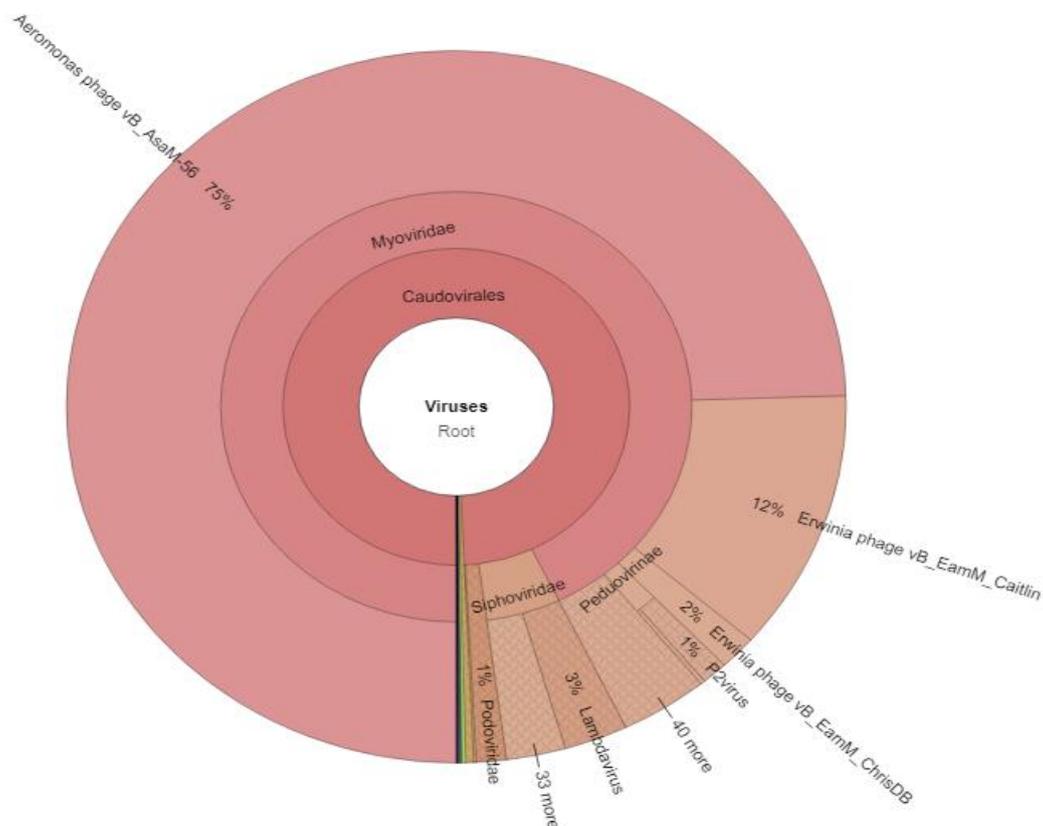
(b). Diversidade de vírus em esgoto polido

A diversidade de vírus em esgoto polido representou 0,1% das sequências. Os vírus encontrados foram *Aeromonas phage vB_AsaM-56* com 75%, seguidos de *Erwinia phage vB_EamM_Caitlin* (12%), *Lambdavirus* (3%), *Erwinia phage vB_EamM_ChrisDB* (2%) e *P2virus* (1%). Os números de sequências dos cinco vírus mais abundantes estão descritos na tabela 20 e representados no gráfico 9.

Tabela 19. Vírus e mais abundantes em esgoto polido

Vírus	número de sequências
<i>Aeromonas phage vB_AsaM-56</i>	7.119.736
<i>Erwinia phage vB_EamM_Caitlin</i>	1.139.157
<i>Lambdavirus</i>	284.789
<i>Erwinia phage vB_EamM_ChrisDB</i>	189.859
<i>P2virus</i>	94.929

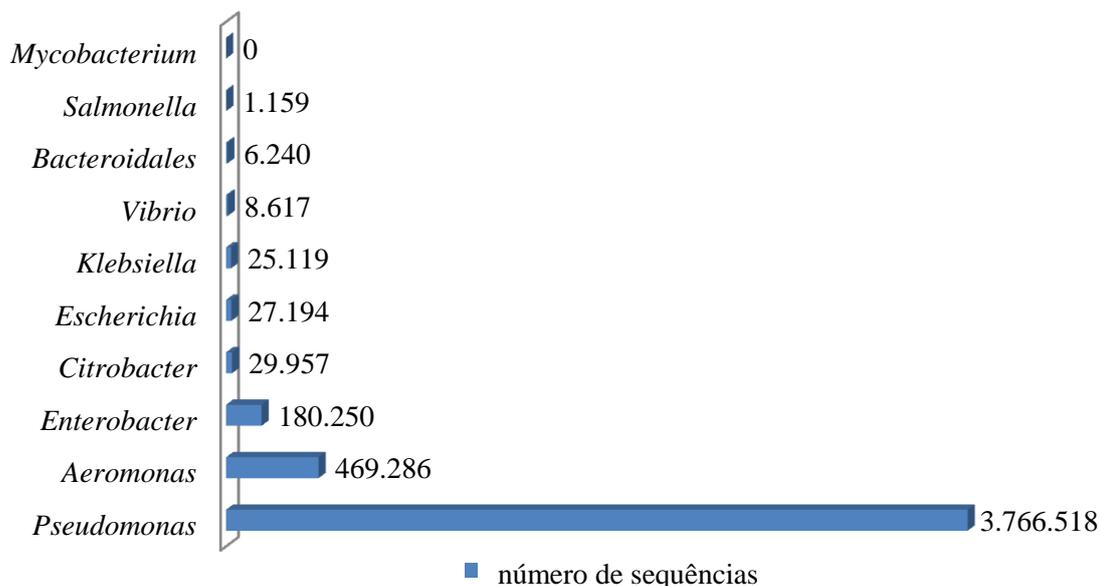
Gráfico 9: Representação da diversidade de vírus em esgoto polido



(c). Procariotos de importância sanitária em esgoto polido.

Na análise dos procariotos de importância sanitária, o *Pseudomonas* foi mais abundante com 3.766.518 sequências. Em seguida, *Aeromonas* (469.286), *Enterobacter* (180.250), *Citrobacter* (29.957), *Escherichia* (27.194), *Klebsiella* (25.119), *Vibrio* (8.617), *Bacteroidales* (6.240) e *Salmonella* (1.159). O gênero *Mycobacterium* não foi detectado. Os procariotos de importância sanitária detectados no esgoto polido estão apresentados no gráfico 10.

Gráfico 10: Procariotos de importância sanitária em esgoto polido



7.6.6. Análises do metagenoma esgoto biológico

(a). Diversidade de procariotos a nível de gênero para esgoto biológico

O esgoto biológico apresentou um total de 13.020.426 sequências sendo dessas, 12.687.705 similares com a base de dados. O procarioto com maior abundância foi *Aeromonas* com 30% das sequências, seguidos de *Acinetobacter* (10%), *Tolumonas* (6%), *Shewanella* (5%) e *Klebsiella* (4%). Os números de sequências dos cinco procariotos mais abundantes em esgoto biológico estão descritos na tabela 21.

Tabela 20: Representação dos cinco gêneros mais abundantes em esgoto biológico

Gêneros	número de sequências
<i>Aeromonas</i>	3.837.256
<i>Acinetobacter</i>	1.335.696
<i>Tolumonas</i>	842.656
<i>Shewanella</i>	747.864
<i>Klebsiella</i>	628.525

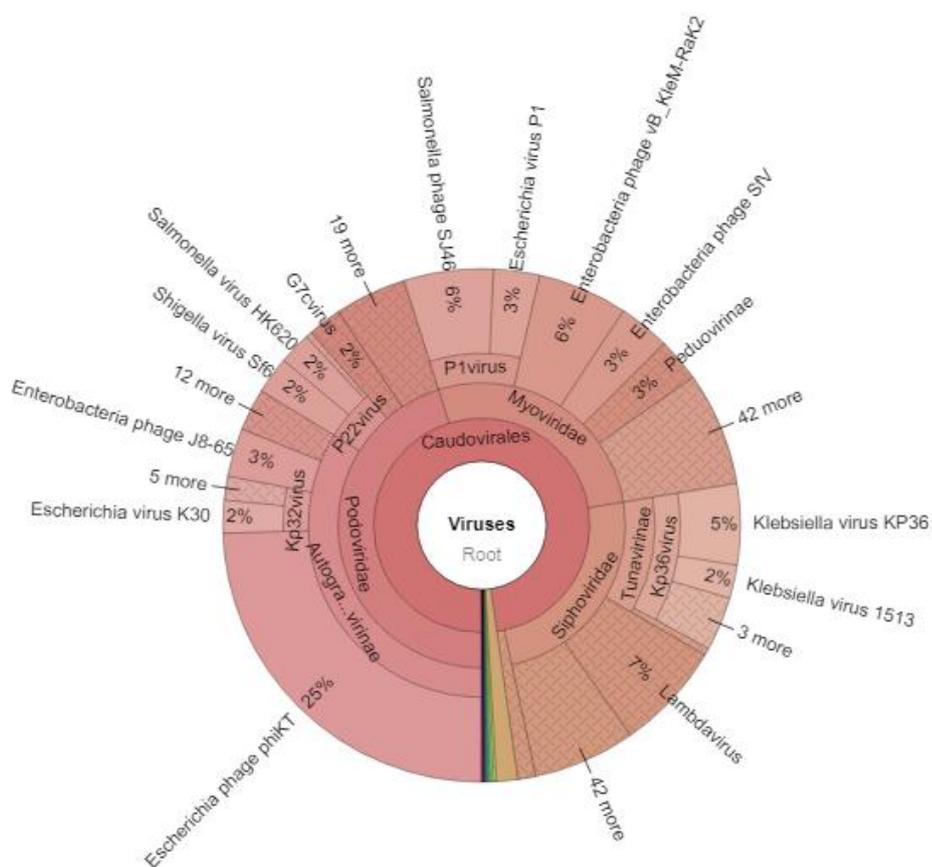
(b). Diversidade de vírus em esgoto biológico

A diversidade de vírus em esgoto biológico representou 0,04% das sequências. Os cinco vírus mais abundantes foram *Escherichia phage phiKT* com 25% *Lambdavirus* com 7%, *Salmonella phage*, *Enterobacteria phage vB_KleM-RaK2* ambos com 6%, *Klebsiella virus kp36* com 5% das sequências. Os números das sequências dos cinco vírus mais abundantes estão descritos na tabela 22 e representados no gráfico 11.

Tabela 21: Vírus mais abundantes em esgoto biológico

Vírus	número de sequências
<i>Escherichia phage phiKT</i>	1.268.770
<i>Lambdavirus</i>	355.255
<i>Salmonella phage</i>	304.504
<i>Enterobacteria phage vB_KleM-RaK2</i>	304.504
<i>Klebsiella virus KP36</i>	253.754

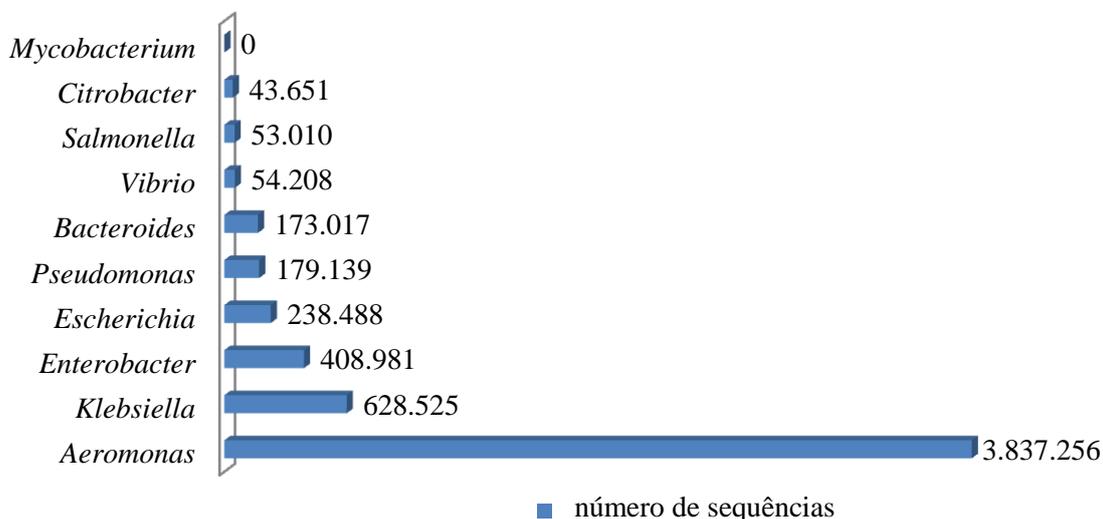
Gráfico 11: Representação da diversidade de vírus em esgoto biológico



(c). Procariotos de importância sanitária.

Na análise dos procariotos de importância sanitária, *Aeromonas* foi mais abundante com 3.837.256 sequências. Em seguida, *Klebsiella* (628.525), *Enterobacter* (408.981), *Escherichia* (238.488), *Pseudomonas* (179.139), *Bacteroidales* (173.017), *Vibrio* (54.208), *Salmonella* (53.010), *Citrobacter* (43.651). Não houveram sequências de *Mycobacterium*. Os procariotos de importância sanitária detectados estão apresentados no gráfico 12.

Gráfico 12: Procariotos de importância sanitária em esgoto biológico



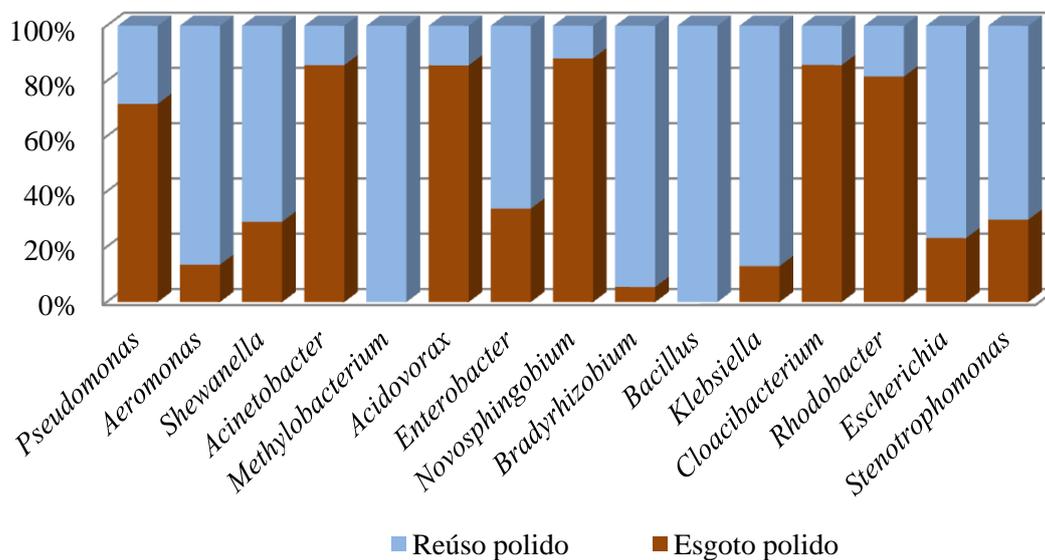
7.7 ANÁLISES COMPARATIVAS DOS METAGENOMAS

7.7.1 Análise comparativa entre a diversidade encontrada no esgoto polido e reuso polido

No gráfico 13 estão apresentados os resultados da comparação entre esgoto polido e reuso polido, levando em consideração os quinze procariotos mais abundantes nessas amostras. As bactérias *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Acidovorax*, *Novosphingobium*, *Cloacibacterium* e *Rhodobacter* apresentaram percentuais mais altos no esgoto polido (acima de 40%) em relação ao reuso, como esperado. Ao passar pelas etapas de tratamento, essas bactérias tiveram redução nas suas proporções no reuso. No entanto, *Aeromonas*, *Shewanella*, *Methylobacterium*, *Enterobacter*, *Bradyrhizobium*, *Bacillus*,

Klebsiella, *Escherichia*, e *Stenotrophomonas*, contaminantes de origem fecal, mostraram percentuais maiores no reuso polido.

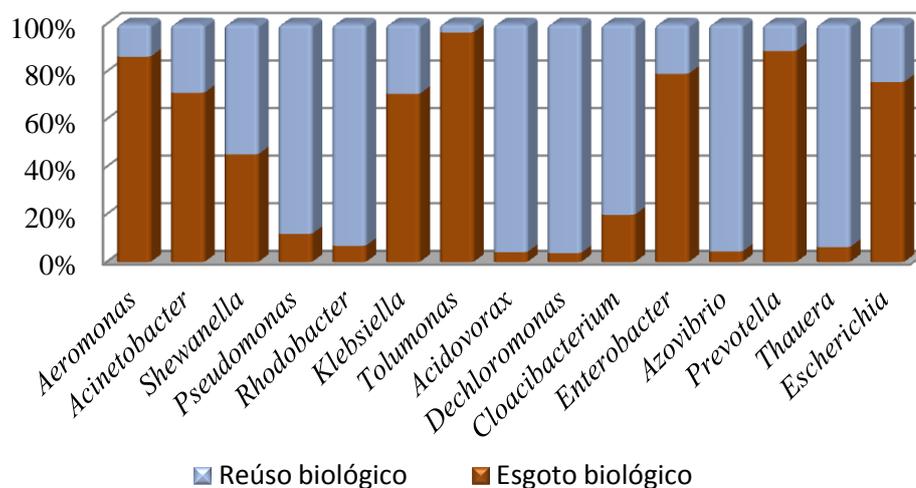
Gráfico 13: Comparação entre esgoto polido e reuso polido (gênero)



7.7.2 Análise comparativa entre a diversidade encontrada no esgoto biológico e reuso biológico

O gráfico 14 mostra a comparação entre esgoto e reuso biológico. Pode-se observar que *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Tolumonas*, *Enterobacter*, *Prevotella* e *Escherichia*, parte deles contaminantes, apresentaram percentuais mais altos no esgoto (acima de 40%) e diminuíram a proporção depois do tratamento, como água de reuso, conforme esperado. Por outro lado, algumas bactérias como *Shewanella*, *pseudomonas*, *Rhodobacter*, *Acidovorax*, *Dechloromonas*, *Gloacibacterium*, *Azovibrio* e *Thauera* foram favorecidas com o tratamento, tendo proporções maiores (acima de 40%) observadas no reuso biológico.

Gráfico 14: Comparação esgoto biológico e reúso biológico (gênero)



7.7.3 Análise comparativa entre a diversidade encontrada em amostras de água de reúso

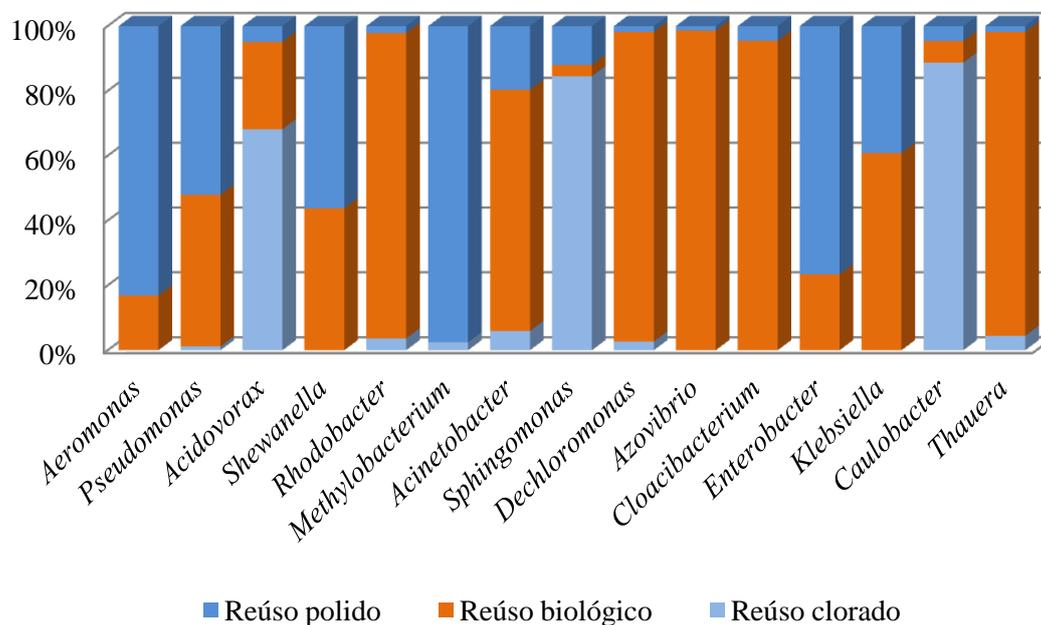
(a) Entre todos os reúsos

O gráfico 15 representa a análise comparativa de todas as amostras de água de reúso. No reúso clorado, observou-se apenas três bactérias com proporções acima de 40%, amplamente distribuídas na natureza, são elas: *Acidovorax*, *Sphingomonas*, *Caulobacter*.

No reúso biológico, por sua vez, nove bactérias obtiveram maiores proporções com percentuais no corte de 40%. São elas: *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Rhodobacter*, *Acinetobacter*, *Dechloromonas*, *Azovibrio*, *Cloacibacterium*, *Klebsiella*, *Thauera*.

No reúso polido, todas as bactérias selecionadas foram detectadas e seis delas em percentuais no corte de 40%. São elas: *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Methylobacter* e *Klebsiella*.

Gráfico 15: Comparação entre os reúsos polido, clorado e biológico (gênero)



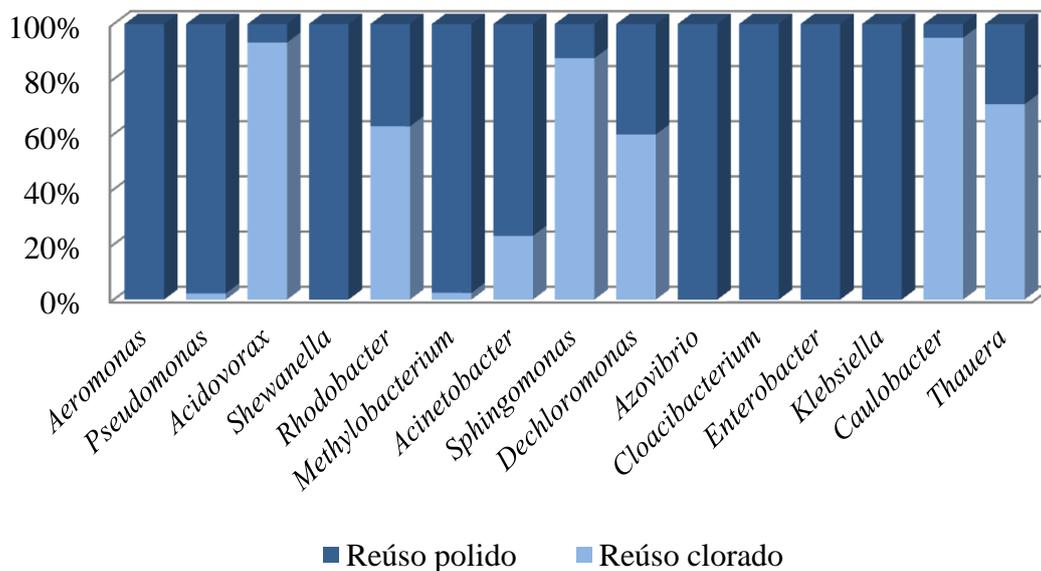
(b) Entre reúso polido e reúso clorado

Uma segunda forma de análise comparativa foi considerada somente a água de reúso produzida em estação de tratamento de grande porte, por empresa de saneamento, com origem direta das águas de esgoto sanitário das cidades. Nessa análise foi observado que todas as bactérias selecionadas foram detectadas no reúso polido, oito delas em 100% de percentual (*Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Methylobacter*, *Azovibrio*, *Cloacibacterium*, *Enterobacter* e *Klebsiella*) e as outras em proporções menores como pode ser visto no gráfico 16.

Em reúso clorado foi detectado percentuais acima de 40%: *Acidovorax*, *Rhodobacter*, *Sphingomonas*, *Dechloromonas*, *Caulobacter*, *Thauera* e com 20% *Acinetobacter*.

Com essa análise comparativa, observamos que houve uma predominância maior de bactérias em reúso polido do que reúso clorado, demonstrando a eficiência do cloro como saneante.

Gráfico 16: Comparação entre reúso polido e reúso clorado (gênero)

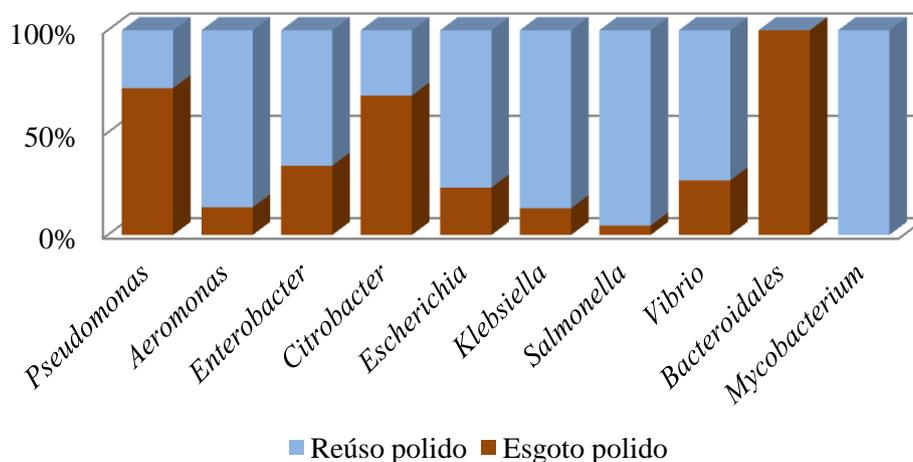


7.8 ANÁLISE COMPARATIVA DE IMPORTÂNCIA SANITÁRIA

7.8.1 Análise comparativa entre esgoto polido e reúso polido com ênfase em procariotos de importância sanitária

O gráfico 17, representa a análise comparativa entre esgoto e reúso polido com ênfase nos procariotos de importância sanitária. No esgoto polido *Pseudomonas*, *Citrobacter*, e *Bacteriodales* estiveram em percentuais acima de 40% e *Bacteriodales* em 100%. Os dados sinalizam que o tratamento de polimento dado a esse esgoto, não foi capaz de retirar os contaminantes, o que foi demonstrado nas proporções de bactérias acima de 40% no reúso polido, além de 100% de *Mycobacterium*.

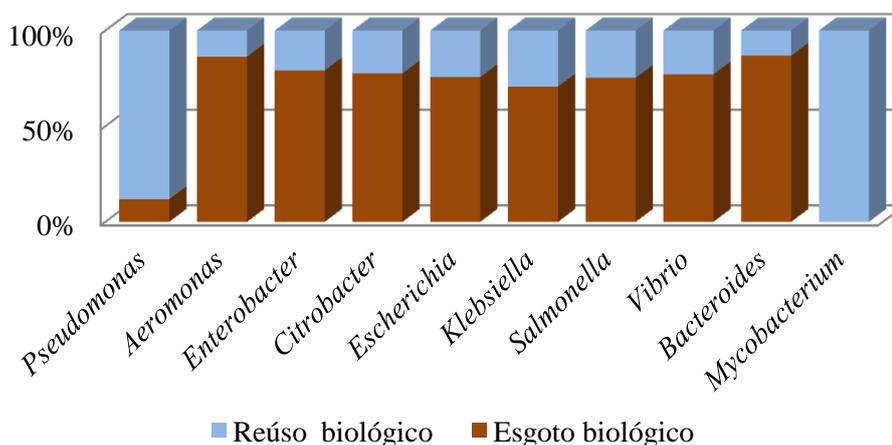
Gráfico 17: Comparação dos procariotos de importancia sanitária entre esgoto polido e reúso polido



7.8.2 Comparação entre esgoto biológico e reuso biológico com ênfase em procariotos de importância sanitária

O gráfico 18 mostra a análise comparativa entre esgoto e reuso biológico com ênfase nos procariotos de importância sanitária. Como esperado, a maior parte das bactérias pesquisadas estavam em proporções maiores no esgoto, estando reduzidos os percentuais a medida que essas águas foram sujeitas ao tratamento biológico. Em exceção, *Pseudomonas* que teve sua proporção aumentada no reuso e *Mycobacterium* que não foi detectada no esgoto, sendo detectada apenas após o tratamento, na água de reuso biológico.

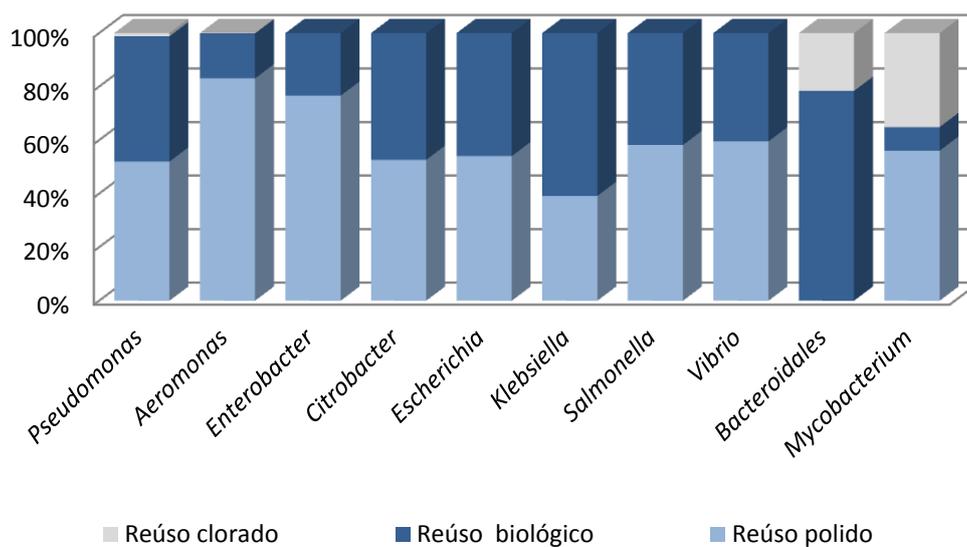
Gráfico 18: Comparação dos procariotos de importância sanitária entre esgoto biológico e reuso biológico



7.8.3 Comparação entre reúsos com ênfase em procariotos de importância sanitária

O gráfico 19 mostra a análise comparativa entre os reúsos com ênfase nos procariotos de importância sanitária. Foi observado que o reúdo clorado, pelos baixos percentuais de bactérias detectados, sendo elas: *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Bacteriodales* e *Mycobacterium*. O reúdo biológico apresentou percentuais menores que o reúdo polido, porém o processo de tratamento não foi capaz de retirar os *Bacteriodales*, que esteve ausente no reúdo polido. No reúdo polido, foi observado os maiores percentuais de bactérias de importância sanitária.

Gráfico 19: Comparação dos procariotos de importância sanitária entre os reúsos clorado, biológico e polido



7.9 MICRORGANISMOS ANALISADOS POR PCR E ENCONTRADOS NOS METAGENOMAS

O quadro 4 apresenta a análise da pesquisa *in silico* através do programa Krona Chart dos mesmos microrganismos pesquisados por ensaio de PCR. *Faecalibacterium*, *B. adolescentis*, *Giardia*, são microrganismos que não foram detectados por PCR, somente em análise *in silico*. Adenovírus, foi detectado na reação de PCR, porém não foi detectado *in silico*. Por PCR, todos os marcadores moleculares foram negativos em água potável, porém *in silico*, os hits correspondentes a *Bacteroides*, *M. smithii*, *E. coli*, *Faecalibacterium* e *B. adolescentis* foram encontrados. Não foram realizadas análises por PCR para as amostras de esgoto.

Quadro 5. Pesquisa no Krona Chart dos microrganismos pesquisados por ensaio de PCR.

Microrganismos	Reúso Clorado	Reúso Polido	Reúso Biológico	Esgoto Polido	Esgoto Biológico	Potável
<i>Bacteroides</i>	2%	3%	6%	23%	26%	23%
<i>M. smithii</i>	14%	2%	9%	10%	6%	10%
<i>E. coli</i>	1%	1%	10%	7%	2%	16%
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Faecalibacterium</i>	18%	6%	14%	10%	10%	21%
<i>B. dentium</i>	2%	2%	-	0,60%	2%	-
<i>B. adolescentis</i>	11%	0,30%	1%	5%	0,70%	2%
Polyomavirus humanos	-	-	-	-	-	-
Adenovirus	-	-	-	-	-	-
<i>Giardia</i>	0,004%	-	0,01%	-	-	0,01%

Legenda: ■ valores altos, ■ valores intermediários, □ valores baixos e "-" nenhum hit encontrado. Os números em branco, expressam resultados negativo no PCR, porém positivo na análise *in silico*. Os números em preto, confirmam positividade em ambas análises. Os valores percentuais, foram resultados de percentuais de hits dados pelo programa Khona Chart.

8. DISCUSSÃO

Em um cenário de crise hídrica severa, o Brasil em pouco tempo poderá estar adotando políticas de reúso para o consumo humano. Diante a uma crise hídrica, o reúso direto tende a ser a principal estratégia de gestão de abastecimento de algumas cidades.

A OMS (2011) especifica que para o consumo humano, o controle da qualidade química e microbiológica da água, requer o desenvolvimento de planos de gestão que forneçam base para a proteção e controle do sistema, a fim de garantir que o número de patógenos e as concentrações das substâncias químicas não representem risco à saúde pública, e que a água seja aceitável pelos consumidores. A Portaria Consolidada nº5/2017 do MS explicita a necessidade do responsável pelo sistema ou pela solução alternativa de abastecimento de água para consumo humano em manter a avaliação do sistema sob a perspectiva dos riscos à saúde, com base na qualidade da água distribuída, conforme os princípios dos planos de segurança da água recomendados pela OMS ou definidos em diretrizes vigentes no País. Por tais razões se faz necessário analisar como tem sido tratado o tema "água de reúso" no Brasil, e estudar os riscos relacionados com os diferentes tipos de usos. Buscamos conhecer os microrganismos que têm sido persistentes às etapas de tratamento nos processos de produção dos diferentes tipos de água de reúso para entender os riscos relacionados ao contato primário com humanos, com a disposição dela no ambiente, e indicar as doenças relacionadas a esses microrganismos.

Esse estudo avaliou três tipos de água de reúso, produzidas por diferentes processos, sendo estes reúso clorado, reúso polido e reúso biológico. E ainda uma amostra de água potável, para uso como controle de comparação e dois tipos de esgotos, também produzidos por diferentes processos, denominados de esgoto polido e esgoto biológico.

8.1 ANÁLISE TRADICIONAL DE MATRIZES DE ÁGUAS E ESGOTO

No Brasil, não existe uma legislação específica que estabeleça parâmetros de qualidade para água de reúso (MOURA *et al.*, 2019). Os dados gerados nesse trabalho foram analisados considerando as recomendações para balneabilidade previstas na

resolução CONAMA nº 274 (BRASIL, 2001) e os padrões de potabilidade definidos na Portaria de Consolidação nº 5 (BRASIL, 2017). E para água de reúso foram comparados com a ABNT, e ainda com a normativa do CONERH da Bahia, que indica parâmetros microbiológicos no uso agrícola desse tipo de matriz de água. Ainda, se torna relevante analisar os dados gerados com os critérios definidos para potabilidade, pois segundo Santos (2019) diante da crise atual de falta de água, muitos locais no Brasil estudam medidas para que as águas residuárias (esgoto) se tornem água potável. Os dados gerados pelas amostras de esgoto foram comparados seguindo a resolução CONAMA nº430 (BRASIL, 2011a) que dispõe sobre as condições e padrões de lançamentos de efluentes.

Os dados obtidos com os ensaios colimétricos indicaram que apenas a água de reúso polido esteve em conformidade com as recomendações para *E. coli* em uso balneável CONAMA nº274 (BRASIL, 2001), uma vez que a regulamentação vigente indica como satisfatória a presença de *E. coli* até 800 NMP/mL ou 3,9 UFC/mL (este último é o valor do dado convertidos em unidade formadora de colônia, segundo dados do trabalho de Gronewold; Wolpert, 2008. No entanto, em relação a coliformes totais, o valor obtido esteve 1,4 vezes maior do que o recomendado na referida legislação, conforme descritos na tabela 6.

Em relação à regulamentação da ABNT nº13969/97, o reúso polido esteve em conformidade em todas as classes abrangidas por essa normativa: classe 1 (lavagem de carros e outros usos que requerem o contato direto do usuário com a água), classe 2 (lavagens de pisos, calçadas e irrigação dos jardins, manutenção dos lagos e canais para fins paisagísticos), classe 3 (reúso nas descargas dos vasos sanitários) e classe 4.

Em relação à legislação da Bahia nº 75 (BAHIA, 2010), que define duas categorias de reúso, sendo categoria A (Irrigação por gotejamento, cultivos distantes do nível do solo, inclusive hidroponia (contato da parte da planta minimizado), de qualquer cultura incluindo produtos alimentícios consumidos crus) e categoria B (Irrigação, inclusive hidroponia, de produtos alimentícios não consumidos crus, produtos não alimentícios, forrageiras, pastagens, árvores, cultivos usados em revegetação e recuperação de áreas degradadas), o reúso polido esteve aproximadamente 1,2 vezes maior que o recomendado. Essa amostra também foi

comparada com as legislações internacionais da OMS (2006) para irrigação com água de reúso, amplamente adotada na Europa e outras regiões no mundo e o Guia de Reúso da EPA, (2012) para tipos I (onde há o contato com seres humanos, como em irrigação, água recreativa, represas, combate a incêndios e descarte de sanitários) e tipo II (onde não há contato com seres humanos, como em áreas restritas ou remotas).

O reúso polido esteve em não conformidade em 2,72 vezes maior para CT segundo a OMS (2006) e 1,73 vezes maior (CT) em relação a EPA (2012) tipo 1. Para o tipo 2, onde não há contato humano, esteve dentro do valor indicado, tabela 6.

O reúso clorado esteve em conformidade apenas na normativa ABNT n° 13969/97, classe 4 que considera o uso agrícola por irrigação pontual e pastagem de gado o valor máximo de 230 UFC/mL (dados convertidos por Gronewold; Wolpert (2008)). Nas outras legislações comparadas, o reúso clorado esteve em não conformidade sendo: CONAMA n°274/2011 (8,67 vezes maior em relação a CT e 5,13 vezes maior para E. coli), ABNT n°13969/97 classe 1 (4,3 vezes maior para CT), classes 2 e 3 (1,74 vezes maior para CT), e Bahia n° 75/2010 (8,42 e 8,3 vezes maior para CT nas categorias A e B, respectivamente), descritos na tabela 6. Comparada com as legislações internacionais, o reúso clorado não esteve em conformidade para CT, sendo 18 vezes maior, segundo padrão da OMS (2006), e 11,5 vezes maior em relação ao tipo I e 1,08 vezes maior ao tipo II do padrão da EPA (2012).

O reúso biológico, destinado para a irrigação agrícola por gotejamento, se enquadra na classe 2 e 4 da normativa ABNT n°13969/97 e categorias A e B, Bahia n° 75/2010. Comparado com as legislações para o referido uso, o reúso biológico esteve em não conformidade 1.153 vezes maior para CT que o recomendado na ABNT n°13969/97 e 5.600 e 5.541 vezes maior para CT, categorias A e B respectivamente, que o recomendado na Bahia n° 75/2010. Comparada com as legislações internacionais, o reúso biológico não esteve em conformidade para CT, sendo 12.090 vezes maior segundo segundo padrão da OMS (2006), 7.687 vezes maior em relação ao tipo I e 720 vezes maior ao tipo II do padrão da EPA (2012).

Em relação aos limites para potabilidade, nenhuma das águas de reúso atenderam aos critérios da Portaria de consolidação n° 5 (BRASIL, 2017). E conforme esperado,

não foi detectado a presença de coliformes na amostra de água potável, descritos na tabela 6.

Os dados obtidos com os ensaios colimétricos das amostras de esgoto polido, indicaram altos níveis de coliformes, 1.485 vezes maior em relação a CT e 14,10 vezes maior para *E. coli* em relação ao estabelecido como satisfatório no CONAMA n°274/2010, conforme esperado. Em esgoto biológico, os valores encontrados foram 177.874 vezes maiores em relação a CT e 528.205 vezes maior para *E. coli*, descritos na tabela 8.

A resolução vigente CONAMA n° 430 (BRASIL, 2011a), não prevê a indicação de valores limites para parâmetros colimétricos para amostras de esgoto. No entanto, caso esses esgotos fossem lançados em corpos hídricos, estariam comprometendo o ambiente com alta carga de poluentes, uma vez que os valores encontrados se classificam na categoria impróprio considerando a resolução do CONAMA n° 274 (BRASIL, 2001).

A qualidade microbiológica da água pode ser mantida pelo teor de cloro ativo que permanece após a cloração (COELHO *et al.*, 2017). As amostras de água de reúso e potável apresentaram níveis de cloro residual livre, em concentrações abaixo do recomendado na Portaria de Consolidação n°5 (BRASIL, 2017), conforme descrito na tabela 8. Essa, recomenda o valor máximo permitido de 2 mg/L e os valores detectados foram de 0,15 mg/L em reúso clorado, 0,05 mg/L em reúso polido e 0,19 mg/L em água potável. Isso pode ter contribuído na permanência de contaminantes nas águas de reúso analisadas e na detecção de DNA de procariotos e vírus em água potável, descritos no item 7.6.4. O processo de tratamento do reúso biológico, não foi adicionado cloro em nenhuma das etapas. A EPA (2012) recomenda um valor mais restritivo de 1mg/L de cloro livre.

A concentração de íons de cálcio e magnésio pode ser utilizada como parâmetro para determinar a dureza na água e pode levar a formação de precipitados, o que confere um sabor desagradável à água e efeitos laxativos (COELHO *et al.*, 2017). Apenas a amostra de reúso biológico estava em concentração acima do grau máximo de dureza total permitido na Portaria de Consolidação n°5 (BRASIL, 2017), em torno de

1,29 vezes maior que o indicado (tabela 8). No entanto como essa água é destinada para a agricultura, a mesma não confere risco direto de contato primário à saúde humana. Em relação à EPA (2012), essa amostra esteve 16 vezes maior que o indicado.

Apesar da Portaria de Consolidação n° 5 (BRASIL, 2017) não fazer menção a alcalinidade assim como ocorria na Portaria anterior n°

2914 do MS (BRASIL, 2011b), a maioria das águas naturais apresentaram valores na faixa de 30 a 500 mg L⁻¹ de CaCO₃ (COELHO *et al.*, 2017). As amostras de reúso polido e reúso biológico apresentaram níveis de carbonato de cálcio 1,43 e 1,39 vezes, respectivamente, maiores que os teores encontrados na natureza (tabela 8). Além disso, estiveram respectivamente 4,7 e 4,65 vezes acima do indicado pela EPA (2012).

A condutividade elétrica é um dos parâmetros que também não está referenciado nas legislações brasileiras. Os valores recomendados para água doce são na faixa de 10 a 1000 µScm⁻¹ e esse parâmetro indicaria a presença de esgoto recente introduzido nas águas (CHAPMAN; KIMSTACH, 1996). Para a irrigação Richards (1954) indicou que águas na faixa entre 0 a 250 µScm⁻¹ podem ser utilizadas para irrigação de culturas em quase todos os tipos de solo. A amostra, reúso biológico, que é destinada para a agricultura, apresentou a condutividade 17 µScm⁻¹ maior que o recomendado para água doce e 4 vezes maior que Richards (1954) indicou para uso agrícola, descrito na tabela 7. No entanto, essa amostra esteve dentro do valor recomendado pela EPA (2012).

A turbidez indica a presença de sólidos suspensos na água e dificulta o processo de desinfecção (APHA, 1998). A amostra reúso biológico, foi a única que se mostrou em não conformidade quanto ao nível de turbidez para a finalidade agrícola, classe 2 ABNT n°13969/97 e EPA (2012) sendo 8 vezes maior, enquanto as demais amostras se apresentaram apropriadas, (tabela 7).

O parâmetro cor aparente é um indicativo de partículas dissolvidas ou em suspensão na água (PINTO *et al.*, 2012), e sua não conformidade não implica, necessariamente, risco à saúde. Neste estudo todas as amostras se mostraram em não conformidade com a legislação vigente para potabilidade e EPA (2012), inclusive a água potável (tabela 8). O Ministério da Saúde (MS) no Manual de Procedimentos de Vigilância em Saúde Ambiental relacionada à qualidade da água para consumo humano

(BRASIL, 2006), descreve que entre os objetivos do tratamento de água potável, de ordem estética/organoléptica, enquadram-se a remoção de cor, além de turbidez, gosto e odor. Ainda esse manual menciona que apesar da cor ser um parâmetro de natureza estética e padrão de aceitação para consumo, pode ocorrer devido a substâncias orgânicas ainda presentes, que indicam a presença de precursores de formação de trihalometanos, um subproduto tóxico da cloração.

O parâmetro fluoreto está relacionado às concentrações de íons de fluoreto aplicados na água, que tem por objetivo a prevenção da cárie dentária, principalmente em consumidores até os 14 anos de idade (BRASIL, 2006). Todas as amostras apresentaram concentrações de fluoretos abaixo do valor máximo recomendado de 1,5 mg/L (BRASIL, 2017) e 1 mg/L EPA (2012), no entanto, estiveram dentro da conformidade (tabela 7). Leva-se em consideração que a concentração de íon fluoreto varia em função da média das temperaturas máximas diárias (BRASIL, 2006). Dosagens excessivas podem ser prejudiciais à saúde, provocando o desenvolvimento de fluorose dentária e osteoporose (BRASIL, 2006).

A concentração de cloretos está associada à alteração de sabor salgado e pelo efeito laxativo que pode provocar (COELHO *et al.*, 2017), conseqüentemente, à aceitação para consumo (BRASIL, 2006). Neste estudo todas as amostras se mostraram em conformidade a este parâmetro pela legislação nacional e internacional citadas (tabela 7). Os cloretos podem estar presentes naturalmente em água salobras ou como resultado de poluição por efluentes industriais ou domésticos, constituindo, portanto, um indicador auxiliar de poluição ou contaminação (BRASIL, 2006).

A presença de nitrato e nitrito na água caracteriza poluição por micronutrientes, em excesso, pode causar eutrofização dos mananciais (RESENDE, 2002). O nitrato é principal forma de nitrogênio associada a contaminação da água (RESENDE, 2002). A avaliação do parâmetro nitrato indica a presença de lixiviados, fertilizantes e esgoto na água. Apesar desse composto não apresentar relativa toxidez para os adultos, em concentrações maiores que 10 mg/L, o nitrato pode ser fatal para crianças com idades inferiores a seis meses (QUEIROZ, 2004). Crianças menores que 6 meses de idade, cujo o sistema digestivo ainda está em desenvolvimento, possuem bactérias que transformam nitrato em nitrito podendo causar envenenamento (MAHLER; COLTER;

HIRNYCK, 2007). A capacidade de transportar o oxigênio no sangue é comprometida e a criança pode sofrer asfixia ficando com a pele azulada, sintoma da síndrome chamada de “síndrome do bebê azul” (MAHLER; COLTER; HIRNYCK, 2007). Em relação ao nitrato, as amostras reúso clorado e reúso biológico estavam em não conformidade, com concentrações de 60,20 mg/L e 14,34 mg/L, respectivamente, indicando a presença de esgoto. Como essas águas não são destinadas ao consumo humano, o risco de contaminação se restringe a contaminação ambiental. Em relação a EPA (2012), apenas o reúso clorado esteve em não conformidade a esse parâmetro, 3 vezes maior (tabela 7).

No Brasil existem problemas de contaminação da água destinada ao consumo humano com doses crescentes de nitritos e nitratos (PONTALTI, 2011). Em relação ao parâmetro nitrito, todas as amostras apresentaram-se em conformidade com a regulamentação brasileira (BRASIL, 2017). No entanto, estiveram um pouco acima da recomendação internacional (EPA, 2012) que indica VMP de 0,05 mg/L, apresentando valores de 0,71 mg/L em reúso clorado e 0,06 mg/L em reúso polido (tabela 7).

Os sulfatos são íons abundantes em águas naturais, podendo ser de origem geológica, resultado de contaminação por águas residuais, fertilizantes, introdução salina, chuva ácida ou resultante do tratamento de água (PRADO, 2010). A presença de altas concentrações de sulfato na água, pode ocasionar sabor e efeito laxativo (PRADO, 2010). Tendo em vista que a Portaria de Consolidação nº5 (BRASIL, 2017) recomenda um limite de até 250 mg/L, todas as amostras encontraram-se em conformidade a esse parâmetro (tabela 7). O mesmo ocorre em relação a legislação internacional (EPA, 2012).

Os valores estabelecidos pela Agência Ambiental Americana para água de reúso (EPA, 2012), são mais restritivos em alguns parâmetros como cloro, dureza, fluoreto nitrato e nitrito, conforme descrito na tabela 7.

Para as amostras de esgoto polido foram avaliados cloro, dureza, alcalinidade, condutividade, pH, turbidez e cor aparente (tabela 9). Para o esgoto biológico, apenas DQO. Além da desinfecção, o cloro pode ser utilizado como agente oxidante para a remoção de nitrogênio amoniacal em esgotos (MELO *et al.*, 2006). Como regra geral, Bastos *et al.* (2019) recomenda que para uso de esgotos tratados na agricultura os

primeiros critérios a serem considerados são: baixa concentração de sólidos suspensos; baixas concentrações de bicarbonatos; baixos teores de sódio e cloro; baixa dureza da água; ausência de íons tóxicos. Estes itens também são recomendados no Programa de Pesquisas em Saneamento Básico (Prosab) por Melo et al. 2006.

8.2 ANÁLISE MOLECULARES EM REÚSOS

Nos ensaios de PCR em todas as amostras de água de reúso detectou-se a banda de 525 pb, que marca a presença de *Bacteroides* associados à humanos (item 7.3 e figura 1). Dados semelhantes foram encontrados por Harwood *et al.* (2009) em amostras de águas residuais da região do Golfo do México, por Sauer *et al.* (2011) com amostras de água de emissários de águas pluviais, por McQuaig *et al.* (2012) em amostras de águas obtidas de praias do mar da Califórnia, e por Moura (2015) em amostras de água de rios do Complexo de Manguinhos no Rio de Janeiro, utilizando os mesmos marcadores moleculares de contaminação para *Bacteroides* associados a humanos, referente ao gene 16S rRNA.

Nas amostras de água reúso também foram detectados *B. dentium* com a banda marcadora 387 pb. Análises realizadas com amostras de águas residuais (principalmente de origem humana), em esgoto proveniente de matadouro em atividades pecuárias e em águas de rio, também detectaram essa mesma contaminação respectivamente por Bonjoch *et al.* (2004), Roslev *et al.* (2011) e por Moura (2015,2019)

As análises por PCR mostraram a presença do gene *uidA*, marcador de *E. coli* nas amostras de água de reúso. Bower *et al.* (2005), utilizando o mesmo marcador, detectou a presença de *E. coli* em águas superficiais coletadas no Lago Michigan. Outros autores como Sauer *et al.* (2011) e Moura (2015) também detectaram esse contaminante em seus estudos utilizando o marcador para o gene *uidA* em amostras ambientais. Sauer *et al.* (2011) em amostras de emissários pluviais em Milwaukee nos Estados Unidos e Moura (2015) em amostras de águas de rios no complexo de Maguinhos no Rio de Janeiro, corroborando com os resultados desse estudo.

Na identificação molecular de *M. smithii*, Roslev e Bukh (2011) detectaram a presença deste microrganismo utilizando os iniciadores baseados no gene *nifH* em

amostras de águas residuais e em esgoto proveniente de atividades pecuárias, Sauer *et al.* (2011), do mesmo modo detectaram em amostras de emissários de águas pluviais, e McQuaig *et al.* (2012), em amostras de duas praias da Califórnia, produzindo um amplicon de 221 pb.

Wolf *et al.* (2010), com amostras de estações de tratamento de esgoto de diferentes origens, como de estação municipal, matadouros, moluscos contaminados com fezes, água de rios, observaram também contaminação por Adenovirus Tipos 40 e 41 nas amostras com a amplificação do fragmento de 137 pb, baseado no gene HadV.

No estudo realizado por Moura (2015) por PCR as amplificações produzidas com os mesmos iniciadores utilizados nesse trabalho, em amostras obtidas de rios do território de Manguinhos, que recebem esgoto doméstico das favelas do Rio de Janeiro, as sequências foram amplificadas pelo método de Sanger e confirmadas por análises de bioinformática confirmando os organismos alvos.

8.3 ANÁLISES DESCRITIVA DOS METAGENOMAS

Os índices de diversidade representam medidas que combinam a riqueza e abundância relativa das espécies de uma comunidade (PROVETE; SILVA; SOUZA, 2011). Os valores de diversidade alfa indicam o número de espécies em um habitat (MAGURRAN, 2004). Os dados encontrados nesse estudo, variaram entre 3 e 5, conforme descrito no quadro 3. Provete *et al.* (2011) descreveram que os valores desse índice raramente ultrapassam de 4 e quando atingem a 5, indicam que a comunidade tem mais de 10^5 espécies. Isso ocorreu na amostra de reuso clorado (5,358) e em reuso biológico (5,335). Nossos resultados são similares aos encontrado por Kauser *et al.* (2019) que avaliaram os efeitos da desinfecção por ultra violeta na composição da comunidade microbiana dos efluentes das águas residuais tratadas e no rio urbano receptor. Esses encontraram valores de diversidade alfa que também variaram entre 3,0 e 5,0, e consideraram como uma variação pequena para todos os tratamentos analisados.

Os valores de diversidade beta indicam a mudança de espécies ao longo de um gradiente ambiental (MAGURRAN, 2004). Os dados encontrados nesse estudo (quadro

2) para diversidade beta foram de 0,00635 em todas as amostras de reúso e 0,00212 entre amostras de esgoto. Nogueira *et al.* (2008) avaliaram a diversidade da comunidade fitoplanctônica de quatro lagos urbanos. Aplicou-se o índice de diversidade beta no intuito de quantificar a renovação ou substituição de espécies entre os ambientes. O índice de diversidade beta encontrado em seu estudo manteve-se acima de 40. Isso representou uma elevada diversidade beta, tendo apresentado uma elevada heterogeneidade ambiental (NOGUEIRA *et al.*, 2008). Em nosso estudo, a diversidade beta esteve na faixa de zero, demonstrando baixa heterogeneidade ambiental.

Na análise metagenômica em água de reúso clorado, foram encontradas com maior abundância as bactérias do gênero *Acidovorax*, apresentado na tabela 12. Microrganismos afiliados ao gênero *Acidovorax* (família *Comamonadaceae*, filo das Proteobactérias) são encontrados em solo, ambientes aquáticos, amostras clínicas (Battistus; Moraes; Kuhn, 2014). Esse gênero também foi encontrado segundo Schulze *et al.* (1999) em amostras de esgoto em estação de tratamento de esgoto e em lodo ativado sendo associado a bactérias desnitrificadoras (HEYLEN; LEBBE; DE VOS, 2008). As bactérias *Acidovorax* apresentam variados mecanismos de adaptação e sobrevivência, possuindo habilidade de comunicação intercelular para coordenação da atividade colonial (BATTISTUS; MORAES; KUHN, 2014), o que foi demonstrado na persistência deste gênero na água de reúso clorado. Destaca-se que as bactérias do gênero *Acidovorax* possuem espécies fitopatogênica, contaminado desde gramíneas à culturas de arroz, melancia, melão, alface entre outras culturas. Isso afeta negativamente plantas de grande importância econômica (BATTISTUS; MORAES; KUHN, 2014) além de comprometer a destinação da água de reúso clorado para fins agrícolas ou de regas ornamentais.

Entre os procariotos de importância sanitária, na água de reúso clorado, as bactérias do gênero *Mycobacterium*, foram as mais abundantes dentre as bactérias selecionadas para esta avaliação, apresentado no gráfico 2. As bactérias do gênero *Mycobacterium*, pertencem a família das *Mycobacteriaceae*, estiveram abundantes na análise de procariotos de importância sanitária em reúso clorado, gráfico 2. Organismos pertencentes a este gênero são bastante diversos com respeito à sua capacidade de causar doença em humanos (FORBES, 2017). Algumas espécies são patogênicas para seres humanos ou animais, causando doenças pulmonares e cutâneas,

linfadenite e infecções disseminadas (FALKINHAM, 1996). As micobactérias ambientais, também denominadas como micobactérias não tuberculosas (MNT), são saprófitas comuns em todos os ecossistemas naturais, incluindo água, solo, alimentos, poeira e aerossóis (COVERT *et al.*, 1999). Essas bactérias também podem ser encontradas em ambientes hospitalares tanto no suprimento de água hospitalar como também contaminando com medicamentos, produtos e equipamentos médicos (LE DANTEC *et al.*, 2002), sendo bactérias responsáveis por contaminações nosocomiais (ORIANI; SIERRA; BALDINI, 2018). Esses organismos são um risco crescente para a saúde, especialmente na crescente população imunodeficiente (LE DANTEC *et al.*, 2002). As micobactérias do tipo MNT foram encontradas em sistemas de tratamento e distribuição de águas em Paris, França (LE DANTEC *et al.*, 2002) e em sistemas de distribuição de água em Bahía Blanca na Argentina (ORIANI; GENTILI, 2016).

Na avaliação dos vírus em água de reúso clorado, *Sinorhizobium virus M12* esteve em maior abundância, apresentado na tabela 13 e gráfico 1. O vírus *Sinorhizobium virus M12*, é composto por DNA, pertencente a família *Myoviridae*, e foi o encontrado em maior abundância, (tabela 13 e gráfico 1). Esse tipo de vírus, é um fago que infecta bactérias do gênero *Sinorhizobium*. Estas são bactérias fixadoras de nitrogênio, criando nódulos na raiz ou no caule em plantas leguminosas, melhorando o desempenho e produtividade geral das plantas (WEIDNER; PÜHLER; KÜSTER, 2003). Apenas oito fagos de *Sinorhizobium* spp. foram identificados e descritos até o momento, entre eles o fago M12 (BREWER; STROUPE; JONES, 2014). Esses autores isolaram um grupo de 20 sequências do fago M12 a partir de amostras de solo de campos agrícolas, água doce e água marinha. Demonstraram que as sequências relacionadas ao fago M12 são encontradas em uma ampla variedade de ambientes (BREWER; STROUPE; JONES, 2014). O genoma do M12 é um dos poucos fagos líticos, completamente sequenciados que infectam bactérias rizóbias, filo Proteobactéria (BREWER; STROUPE; JONES, 2014).

Nas análises metagenômica em água de reúso polido, foram encontradas com maior abundância as bactérias do gênero *Aeromonas*, tabela 14. As mesmas também foram as mais abundantes na avaliação dos procaríotos de importância sanitária, no gráfico 4. As *Aeromonas* são bactérias pertencentes a família das *Aeromonadaceae*, filo Proteobactérias (JANDA; ABBOTT, 2010). Este gênero é encontrado no solo, nas fezes

(humanas e animais), na água e em produtos alimentares contaminados (geralmente de origem animal como carne e leite) (BIZANI; BRANDELLI, 2001). A água tem sido descrita como principal meio de disseminação de *Aeromonas*, portanto, a infecção pode ser direta, através da sua ingestão contaminada, ou por meio do alimento que tenha sido submetido a algum processo em contato com esta (TAVARES; CERESER; TIMM, 2015). Sendo assim são consideradas bactérias de importância para a saúde, atuando como patógenos em humanos e entre as doenças, podem causar gastroenterites e diarreias (WHO, 2017). *Aeromonas* spp. têm sido detectados em água potável tratada, nos sistemas de distribuição (BIZANI; BRANDELLI, 2001). Os fatores que afetam essa ocorrência não são totalmente compreendidos, no entanto, fatores como o teor orgânico, a temperatura, o tempo de permanência da água na rede de distribuição e a presença de cloro residual demonstram influenciar o tamanho da população (WHO, 2017).

Na análise dos vírus, *Escherichia virus T7* foi encontrado em maior abundância na água de reúso polido como descrito na tabela 15 e gráfico 3. O vírus *Escherichia virus T7*, é um vírus composto de DNA, pertencente à família *Podoviridae*. Também chamado de *Enterobacteria phage T7* ou bacteriófago T7, esse vírus possui um ciclo de vida lítico e infecta a maioria das cepas de bactérias *Escherichia coli* (HAUSER *et al.*, 2012). Pode se tornar não infecciosa a exposição UV (TEESALU; SUGAHARA; RUOSLAHTI, 2012). Niemi (2003), estudou a sobrevivência do fago *Escherichia coli* T7 em diferentes tipos de água e em diferentes temperaturas (3 e 20 °C). Concluiu que temperaturas mais baixas, aumentam a sobrevivência do vírus.

Na análise metagenômica em água de reúso biológico, foram encontradas com maior abundância as bactérias do gênero *Pseudomonas*, tabela 16. As mesmas também foram as mais abundantes na avaliação de procariotos de importância sanitária, no gráfico 6. As *Pseudomonas* são bactérias pertencentes a família das *Pseudomonadaceae* filo Proteobactérias (WHO, 2017). São encontradas no ambiente, em águas, solos e também pode ser encontrada em fezes e no esgoto. Em humanos, o *Pseudomonas aeruginosa* é a espécie associada a patógenos humanos mais comuns e também relacionada a infecções nosocomiais, com complicações potencialmente graves (WHO, 2017). Essa espécie é encontrada na pele de humanos (axilas, regiões anogenitais) e diante a uma porta de entrada, pode causar infecções como foliculite, bacteremia além de infecções respiratórias. *Pseudomonas aeruginosa* é sensível à desinfecção, e a entrada

nos sistemas de distribuição de água pode ser minimizada pela desinfecção adequada (WHO, 2017). Outra espécie que geralmente está presente em águas residuais são as *Pseudomonas putida* (BORDE *et al.*, 2003). O estudo de Kauser; Ciesielski; Poretsky (2019) mostrou que *Pseudomonas* podem sobreviver e permanecer ativos após tratamento em estações de tratamento de águas residuais.

Na análise dos vírus em água de reúso biológico, *Cronobacter virus CR9* esteve em maior abundância, tabela 17 e gráfico 5. O Vírus *Cronobacter CR9*, é um vírus composto de DNA, pertencente a família *Myoviridae*. Esse vírus infecta cepas de bactérias *Cronobacter spp.* (FEENEYY *et al.*, 2015). O *Cronobacter*, que costumava ser chamado de *Enterobacter sakazakii*, é encontrado principalmente em alimentos secos, como fórmula infantil em pó, leite em pó, chás de ervas e amidos. Além disso, também foi encontrado na água do esgoto (CDC, 2017). A bactéria *Cronobacter* é uma enterobactéria oportunista, associada à infecções em neonatos devido ao consumo de fórmulas infantis desidratadas e em idosos. A infecção urinária, é a síndrome mais comum neste grupo, o que explica a presença desses nas matrizes associadas a esgoto, no caso, no reúso biológico. Vale ressaltar, que casos de meningite causado por *Cronobacter* em neonatos a partir de fórmulas infantis desidratadas como veículo de contaminação, levou as agências de regulação a criarem medidas específicas para o controle destes patógenos nos produtos (BRANDÃO; UMEDA; FILIPPIS, 2018; FEENEYY *et al.*, 2015).

Na análise metagenômica em água potável, foram encontradas com maior abundância as bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, tabela 18. As bactérias *Bradyrhizobium* pertencem à família das *Bradyrhizobiaceae*, filo Proteobactérias, muitas das quais fixam nitrogênio, utilizado pelas plantas (NCBI, 1982). São encontradas no solo e possuem uma relação simbiótica com leguminosas associadas a fixação de nitrogênio. *Bradyrhizobium* foi identificada como um contaminante de reagentes de kits de extração de DNA o que pode levar a sua aparência errônea na microbiota do conjunto de dados de metagenômica (SALTER *et al.*, 2014). A presença de DNA contaminante é um desafio particular para pesquisadores que trabalham com amostras contendo baixa biomassa microbiana (KULAKOV *et al.*, 2002). No entanto, essa bactéria tem sido relatada por Kulakov *et al.* 2002 entre a população bacteriana presentes em sistemas de tratamento de água ultra pura. esse autor descreve a presença

das bactérias *Bradyrhizobium* spp. foram detectadas em todas as etapas de tratamento onde utilizou-se nitrogênio. Ressalta também a presença de sequências do gene nifH nas cepas de *Bradyrhizobium* spp. Destaca que encontrar cepas bacterianas com genes nif merecem uma investigação adicional, pois fornece a primeira evidência de que o uso disseminado de nitrogênio nos sistemas de tratamento na produção de águas ultra pura, podem contribuir para a contaminação bacteriana (KULAKOV *et al.*, 2002). *Bradyrhizobium* e *Pseudomonas* são algumas das bactérias mais abundantes na água clorada (GOMEZ-ALVAREZ; REVETTA; DOMINGO, 2012). Esses resultados sugerem que os desinfetantes podem desempenhar um papel na composição microbiana nos sistemas de distribuição de água potável (NORTON; CHEVALLIER, 2000). Embora os sistemas de distribuição de água potável sejam ambientes relativamente severos devido às condições oligotróficas e à presença de desinfetantes, há evidências de que algumas bactérias podem sobreviver nos sistemas tratamento e de distribuição de água (KULAKOV *et al.*, 2002). REVETTA, R.P., MATLIB (2011) mostraram que as Proteobactérias eram os membros dominantes na fração "ativa" da comunidade em água potável.

Na avaliação dos vírus, *Mycobacterium virus Che9c* esteve em maior abundância, como descrito na tabela 19 e gráfico 7. O vírus *Mycobacterium virus Che9c*, é composto por DNA e pertence a família *Siphoviridae*. Esse vírus infecta bactérias *Mycobacterium* spp. (EXPASY, 2019). Os micobacteriófagos são vírus que infectam hospedeiros micobacterianos, incluindo *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium smegmatis* e abrangem uma diversidade genética substancial (DEDRICK *et al.*, 2017). O gênero *Mycobacterium* inclui vários patógenos que causam doenças graves em seres humanos, como o *Mycobacterium tuberculosis*, o agente infeccioso causador da tuberculose (BORGERS *et al.*, 2019). Ainda, as *Mycobacterium*, foram as bactérias mais abundantes dentre as selecionadas na avaliação de importância sanitária, conforme demonstrado no gráfico 8. O estudo de Oriani, Sierra e Baldini (2018) se propôs a investigar a resistência de duas espécies de MNT isolados a partir de água potável, (*Mycobacterium gordonae* e *Mycobacterium chubuense*), em diferentes concentrações de cloro. Concluíram que as bactérias MNTs estudadas apresentaram resistência às concentrações utilizadas no tratamento de água potável (0,2 ppm). Sugerem que os procedimentos atuais de desinfecção da água nem sempre alcançam o controle efetivo dos MNTs no sistema público de abastecimento, com o conseqüente risco à saúde da

população suscetível (ORIANI; SIERRA; BALDINI, 2018). As bactérias MNTs, são patógenos emergentes capazes de causar um grande número de infecções oportunistas em humanos e animais (FALKINHAM, 2009; WILDNER *et al.*, 2014). Estudos epidemiológicos sugerem que a principal fonte de contaminação em humanos é água potável (HILBORN *et al.*, 2006). Análises bacteriológicas de rotina parecem ser insuficientes para garantir a ausência de MNTs. (ORIANI; SIERRA; BALDINI, 2018). Isso se torna um problema de saúde pública a ser considerado devido ao aumento de pessoas imunodeficientes na população, sendo mais suscetíveis a infecções oportunistas, como infecções de pele, linfadenite e doenças pulmonares (GRIFFITH *et al.*, 2007).

Na análise metagenômica em esgoto polido foram encontradas com maior abundância as bactérias do gênero *Pseudomonas*, anteriormente descrito nesse capítulo, tabela 20. As mesmas também foram as mais abundantes na avaliação de procariotos de importância sanitária tabela 10. Na análise dos vírus *Aeromonas phage vB_AsaM-56* esteve em maior abundância, tabela 21 e gráfico 9. O vírus *Aeromonas phage vB_AsaM-56*, é composto por DNA, pertencente a família *Myoviridae* e foi encontrado em abundância no esgoto polido, descrito na tabela 21 e gráfico 9. Esse vírus infecta bactérias *Aeromonas* spp. (NCBI, 2019). Os *Aeromonas* são bactérias amplamente distribuídas em vários ambientes, incluindo água, alimento e solo. São patógenos comuns dos peixes causando feridas vermelhas e infecções ulcerativas, sendo responsáveis por grandes perdas econômicas na indústria da aquicultura. Além disso, alguns *Aeromonas* estão ligados a doenças infecciosas humanas, por exemplo, *A. hydrophila*. Essa pode causar infecções humanas graves como bacteremia, pneumonia, endocardite, empiema, artrite, peritonite, infecções de pele e tecidos moles (BAI *et al.*, 2019). Esse fago foi encontrado por Bai *et al.* (2019) em amostras de sedimentos e água superficial no lago Dianchi, na China.

Na análise metagenômica em esgoto biológico, foram encontradas com maior abundância as bactérias do gênero *Aeromonas*, anteriormente descrito nesse capítulo, tabela 22. As mesmas também foram as mais abundantes na avaliação de procariotos de importância sanitária, gráfico 12. Na análise dos vírus, *Escherichia phage phiKT* esteve em maior abundância, tabela 23 e gráfico 11. O vírus *Escherichia phage phiKT*, é composto por DNA, pertencente a família *Podoviridae* (NCBI, 2018) e foi encontrado em abundância no esgoto biológico conforme descrito tabela 23 e gráfico 11. O

bacteriófago phiKT é idêntico ao bacteriófago PGT2 que foi recentemente isolado de fezes de cavalo usando uma cepa de *E. coli* coletada do meio ambiente (GOLOMIDOVA *et al.*, 2018).

Houve uma predominância de Proteobacterias nas amostras analisadas. De acordo com Zheng *et al.* (2016) as Proteobactérias, são os filos dominantes nos sistemas de tratamento de águas residuais. Revetta; Matlib (2011) analisou a composição bacteriana da água potável clorada usando bibliotecas de clones do gene 16S rRNA. Os dados obtidos demonstraram que as Proteobactérias foram abundantes nas amostras de água clorada seguidas de Actinobacteria, Cyanobacteria e Bacteroidetes.

No esgoto, Madigan; Martinko (2006) e Y.xu, (2013) ainda destacam que as Proteobactérias desempenham um importante papel na remoção de matérias orgânica das águas residuais. Liu (2015), resalta que no processo de tratamento de águas residuais, a quantidade de Proteobactérias diminui de 67,2% para 30,1% da fase de acidificação por hidrólise e subsequentemente aumenta para 52,1%. Esse resultado pode ser porque Firmicutes e Bacteroidetes começam a se multiplicar e ocupam alguns nichos ecológicos de Proteobacterias (LIU, 2015) através da fermentação anaeróbica.

Entre os vírus encontrados, houve a predominância dos bacteriófagos nas amostras analisadas. Bacteriófagos são vírus que infectam bactérias e a maioria dos vírus ambientais são fagos (DELWART, 2007). O resultado desse estudo corrobora com a pesquisa de Rosario *et al.* (2009), que caracterizou por metagenômica a comunidade viral encontrada em água de reúso e comparou com vírus em água potável. Concluiu que os bacteriófagos dominaram a comunidade viral de DNA tanto em água de reúso quanto em água potável (ROSARIO *et al.*, 2009). Ainda, destaca que as informações sobre os vírus presentes na água de reúso podem ser usados para identificar novos bioindicadores de qualidade de água (ROSARIO *et al.*, 2009).

8.4 ANÁLISES COMPARATIVAS DOS METAGENOMAS

A ecologia microbiana busca estudar como os microrganismos formam simbioses com eucariotos, competem e se comunicam com outros microrganismos, adquirem nutrientes e produzem energia (HANDELSMAN, 2004). A metagenômica possibilita

entender essas relações, e o desafio dessa área é vincular as informações genômicas ao organismo ou ecossistema do qual o DNA foi isolado (HANDELSMAN, 2004).

A metagenômica possibilita análises sobre a competição e comunicação microbiana, entendendo que a competição por recursos entre os membros da comunidade, seleciona diversos mecanismos de sobrevivência, incluindo antagonismo, análise das relações interespecíficas em que uma espécie impede pela sua presença o desenvolvimento de outra (DAJOZ, 2005), as análises de mutualismo (relação em que as duas espécies tiram vantagens) entre os membros (DAJOZ, 2005; HANDELSMAN, 2004). Nos gráficos 13, 14, 17, e 18 estão apresentados as comparações entre as amostras de esgoto e as de reúso. Observa-se que apesar do tratamento sanitário pelo qual as amostras passaram, alguns microrganismos como *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Aeromonas* entre outros, aumentaram a sua proporção. O estudo desenvolvido por Kauser; Ciesielski; Poretsky (2019) mostrou que embora alguns microrganismos, como os membros do gênero Bacteroidetes, sejam inibidos pela desinfecção por UV, e a diversidade geral da comunidade microbiana diminua após o tratamento de esgoto, muitos microrganismos não apenas sobrevivem, mas permanecem ativos. Isso inclui organismos comuns derivados da estação de tratamento, como *Comamonadaceae* e *Pseudomonas*, que foram mais abundantes no efluente tratado do que no efluente não tratado (KAUSER; CIESIELSKI; PORETSKY, 2019). Ainda, cita que esses organismos quando inseridos em água de rio para imitar as condições ambientais, podem persistir no meio ambiente e potencialmente melhorar suas funções microbianas, como nitrificação e resistência a antibióticos.

Os gráficos 15, 16 e 19 que trazem as comparações entre as amostras de reúso, demonstram que o tratamento sanitário que utilizou cloro, para a amostra de reúso clorado ocorreu menores percentuais de procariotos em relação a outras amostras de reúso, inclusive na análise de procariotos de importância sanitária. Francy *et al.*, (2012) demonstraram que a desinfecção por ultravioleta ou cloro após tratamento de esgoto proporciona remoções significativas de todos os indicadores bacterianos. Gomez-Alvarez, Revetta e Domingo (2012) citam que embora ambas as estratégias de desinfecção visem mitigar a presença de patógenos, elas não erradicam completamente o crescimento de microrganismos em estações de tratamento de água.

Abordagens metagenômicas fornecem dados para uma compreensão mais abrangente da ecologia microbiana do sistemas de distribuição de água em relação aos tratamentos (GOMEZ-ALVAREZ; REVETTA; DOMINGO, 2012).

9. CONCLUSÃO

A água de reúso é utilizada para consumo humano em países como Namíbia e Estados Unidos (MOURA *et al.*, 2020). No Brasil, as tecnologias utilizadas para o tratamento da água de reúso, não estão sendo capazes de retirar poluentes a nível de coliformes o que inviabiliza o uso potável. A presença de contaminantes foi demonstrada em todas as amostras de água de reúso.

Métodos moleculares independentes do processo de cultura celular para detectar marcadores genéticos de contaminação parecem promissores, uma vez que são uma medida sensível de identificação da contaminação fecal por diferentes origens, principalmente quando são relacionados com genes específicos ao hospedeiro. Foi possível associar o amplicon com as fontes poluidoras de origem humana, até mesmo em amostras que apresentaram ausência de *E. coli*. O emprego de conjunto de marcadores moleculares de poluição (marcadores de vírus, bactérias e protozoários) identificados nas análises metagenômicas pode ser utilizado em outros tipos de água para indicar a contaminação por esgoto doméstico.

A detecção de procariotos de importância sanitária em todas as amostras de água de reúso indicam que contaminantes persistem em todas as amostras analisadas. Até mesmo no reúso clorado, que teve menores proporções. Portanto as formas de tratamento sanitário utilizadas não têm sido eficientes para eliminá-los. Concluímos que houve a predominância de Proteobactérias e Bacteriófagos nas matrizes ambientais estudadas. E que pesquisas relacionadas a Bacteriófagos ambientais precisam ser ampliadas uma vez que existem poucos dados na literatura diante a relevante importância desses, como insumos em biotecnologia e nas terapias por fagos.

Os resultados das análises com reúso clorado demonstraram que este pode ser recomendado para atividades de contato humano direto (primário), como limpeza de pisos, limpeza urbana, descargas sanitárias, controle de incêndios. No entanto, não recomendado para agricultura ou rega paisagística, pois apresentou abundância de Acidovorax, que é um fitopatógeno.

Os resultados das análises com reúso polido e com reúso biológico demonstraram que essas águas podem oferecer risco de contato primário, devido a presença de bactérias patogênicas. Contudo são indicadas para rega agrícola por gotejamento, desde que não haja nenhum contato com humanos, nem com as partes superiores das plantas. As bactérias responsáveis pela fixação de nitrogênio, contribuem com o desenvolvimento das plantas. Em relação as bactérias patogênicas, leva-se em consideração que essas não são absorvidas pelas radículas das plantas.

A biodiversidade das espécies encontradas reforça a necessidade das pesquisas envolvendo água de reúso, de modo garantir a segurança sanitária para uso em diferentes fins. A persistência de contaminantes após tratamento para produção de água de reúso empregados no Brasil, sugere a necessidade de investigação de métodos que possam garantir a qualidade sanitária dessa matriz. A água de reúso que apresentou menor diversidade de contaminantes foi a de reúso clorado. Isso demonstra que o cloro ainda é um importante saneante, sendo, esse tratamento, o melhor dentre os avaliados a partir das amostras. É urgente adequar a legislação nacional para que a água de reúso atenda a parâmetros de qualidade existentes em outros países, e que assegure o padrão sanitário de importância para a saúde pública.

O esgoto biológico apresentou níveis sanitários em piores condições que o esgoto polido, sendo detectado níveis de Coliformes Totais 119 vezes maiores do que no esgoto polido, e para os níveis do bioindicador *E. coli* 37 vezes maiores.

A água potável como esperado apresentou os níveis dos parâmetros sanitários compatíveis com os recomendados pela normativa brasileiras. Contudo os dados das análises metagenômicas indicaram traços de DNA de procariontes de importância sanitária, como *Mycobacterium* e *Escherichia*.

Com esse estudo sugerimos o diagnóstico de um conjunto de microrganismos através de marcadores moleculares de acordo com a destinação que será dada a água de reúso. Para uso doméstico, descargas sanitárias, lavagem de pisos, lavagem de automóveis e fins similares que haja a possibilidade de contato primário, sugerimos a detecção dos seguintes microrganismos: *Mycobacterium*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, além dos já utilizados como *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Bacteroides*,

Faecalibacterium, *Methanobrevibacter smithii*. Destacamos a importância da pesquisa dos vírus Adenovirus e Polyomavirus humano pois são contaminantes que podem estar presentes mesmo na ausência de coliformes. Para agricultura, irrigação e fins similares que não haja contato primário sugerimos a detecção de *Acidovorax* por ser um fitopatôgeno. Para recarga de aquíferos, manutenção paisagística de lagos e canais que não haja contato primário sugerimos a detecção de *Aeromonas* por ser patógeno em peixes. Para dessedentação de animais sugerimos a detecção de microrganismo encontrados nas amostras de reuso que patógeno em animais como *Mycobacterium*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Bacteroides*. Para água de reuso destinada a consumo humano sugerimos a pesquisa dos mesmos microrganismos listados para atividades de contato primário por pesquisa molecular além dos ensaios de microbiologia já regulamentados. Destacamos que os parâmetros físico - químicos dão suporte aos ensaios biológicos sendo necessário para um diagnóstico definitivo.

Este estudo foi pioneiro no país, e poderá oferecer perspectivas para uma mudança nas políticas públicas voltadas para águas e efluentes. Além de contribuir para a discussão do futuro do saneamento, pois esse debate ainda é prematuro no Brasil.

A ciência tem o compromisso de fornecer dados para amparar as leis que regulam a utilização de água de reuso no Brasil, em especial, ao tocante qualidade sanitária, e assegurando que não haja danos à saúde pública e ao ambiente.

10. PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante ao volume de dados gerados por esse trabalho, alguns dos desdobramentos são listados a seguir:

- Padronizar ensaios multiplex PCR para a análise da qualidade da água de reúso com os indicadores sugeridos de acordo com a destinação prevista;
- Ampliar e aprofundar as análises metagenômicas a nível de gênero e espécie;
- Ampliar e aprofundar as análises dos vírus encontrados.
- Fazer correlações ecológicas
- Avaliar a presença de novos genes de importância sanitária, ou de resistência a antibióticos que possam ser explorados em sistemas de biorremediação ambiental.
- Contribuir para a discussão do plano de saneamento básico.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR. 13.969/97**: Tanques sépticos: unidades de tratamento complementar e disposição final dos efluentes líquidos. Projeto, construção e operação. Rio de Janeiro, 1997.
- AFRICA DO SUL. **National Services Water Services Act No. 108**. Pretoria Government Printers, 1997.
- AFRICA DO SUL. **National Services Water Act No. 36**. Pretoria Government Printers, 1998.
- AL-ALI, D.; FILION, Y. A Critical Review of Water Reuse in North America: The Historical Shift from Technological Priorities to Public Perception Studies. **American Society of Civil Engineers**, 2015.
- ANA. Agência Nacional das Águas. 2017. Disponível em: < <http://www.ana.gov.br>>. Acesso em: 23 agosto 2019
- ANGELAKIS, A.; GIKAS, P. Water reuse: Overview of current practices and trends in the world with emphasis on EU states. **Water Utility Journal**, v. 8, p. 67–78, 2014.
- AQUINO, S. F. DE; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. DE L. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 18, n. 3, p. 187–204, set. 2013.
- BAG, S. et al. An improved method for high quality metagenomics DNA extraction from human and environmental samples. **Scientific Reports**, v. 6, n. 4, p. 1–9, 2016.
- BAHIA. **Resolução CONERH n° 75 de 29/07/2010**. Estabelece procedimentos para disciplinar a prática de reúso direto não potável de água na modalidade agrícola e/ou florestal. Diário oficial da Bahia em 01 agosto de 2010. Disponível em: <<http://www.seia.ba.gov.br/legislacao-ambiental/resolucoes/resolu-o-conerh-n-75>> Acesso em: 23 agosto 2019.
- BAI, M. et al. Nine novel phages from a plateau lake in southwest china: Insights into aeromonas phage diversity. **Viruses**, v. 11, n. 7, p. 1–19, 2019.
- BARROS, M. CRISTINE PERES. **Custo efetividade de tecnologia alternativa de esgotamento sanitário para pequenos municípios**. 2014. Dissertação (Mestrado em Gestão Econômica do Meio Ambiente) - Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
- BLANKENBERG, D. et al. Galaxy: A web-based genome analysis tool for experimentalists. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 89, n. 1, p. 19.10.1-19.10.21, 2010.
- BONJOCH, X. et al. Multiplex PCR with 16S rRNA Gene-Targeted Primers of Bifidobacterium spp. To Identify Sources of Fecal Pollution. **Applies and**

Environmental Microbiology, v. 70, n. 5, 2004.

BORDE, X. et al. Synergistic relationships in algal–bacterial microcosms for the treatment of aromatic pollutants. **Bioresource Technology**, v. 86, n. 3, p. 293–300, 2003.

BOWER, P. A. et al. Detection of Genetic Markers of Fecal Indicator Bacteria in Lake Michigan and Determination of Their Relationship to Escherichia coli Densities Using Standard Microbiological Methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8305–8313, 2005.

BRANDÃO, M. L. L.; UMEDA, N. S.; FILIPPIS, I. DE. Cronobacter spp .: infecções, ocorrência e regulação em alimentos – uma revisão no Brasil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, n. 1–9, p. 1–9, 2018.

BRASIL. Lei nº9433. **Política Nacional de Recursos Hídricos**. Diário oficial de Brasília, 1997. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L9433.htm>. Acesso em: 24 outubro 2018.

BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução nº. 274/2000. **Diário Oficial de Brasília**, 2001. Disponível em: <<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=272>>. Acesso em: 2 outubro 2018.

BRASIL. **Manual de Procedimentos de Vigilância em Saúde Ambiental relacionada à qualidade da água para consumo humano**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília, 2006.

BRASIL. **Lei nº 11.445, de 5 de janeiro de 2007**. Estabelece as diretrizes nacionais para o saneamento básico; cria o Comitê Interministerial de Saneamento Básico; altera as Leis nos 6.766, de 19 de dezembro de 1979, 8.666, de 21 de junho de 1993, e 8.987, de 13 de fevereiro de 1995; e revoga a Lei nº 6.528, de 11 de maio de 1978. 2007. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2007/lei/11445.htm> Acesso em 19 de janeiro de 2018.

BRASIL. **Decreto nº 7.217, de 21 de Junho de 2010**. Regulamenta a Lei nº 11.445, de 5 de janeiro de 2007, que estabelece diretrizes nacionais para o saneamento básico, e dá outras providências. 2010. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/decreto/d7217.htm>. Acesso em 20 de janeiro de 2018.

BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução nº. 430. Dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA **Diário Oficial de Brasília**, 2011a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 2.914 de Dezembro 2011**. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Ministério da Saúde, Brasília, 2011b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria de Consolidação n.º 5 de 28 de setembro de 2017**. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. Ministério da Saúde, Brasília, p. 926, 2017.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Regional. **Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: 24º Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos – 2018**. Brasil, 2019. Disponível em: <<http://www.snis.gov.br>> Acesso em: 20 agosto 2019.

BRASIL. **Constituição da República Federativa do Brasil**: texto constitucional promulgado em 5 de outubro de 1988, com alterações determinadas pelas emendas Constitucionais de revisão n.º 1 a 6/94, pelas emendas Constitucionais n.º 1/92 a 91/2016 e pelo Decreto Legis. v. 1, 1988.

BREWER, T. E.; STROUPE, M. E.; JONES, K. M. The genome , proteome and phylogenetic analysis of Sinorhizobium meliloti phage M12 , the founder of a new group of T4-superfamily phages. **Virology**, v. 450–451, p. 84–97, 2014.

BUCHFINK, B.; XIE, C.; HUSON, D. H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. **Nature Methods**, v. 12, n. 1, p. 59–60, 2015a.

BUCHFINK, B.; XIE, C.; HUSON, D. H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. **Nature methods**, v. 12, n. 1, p. 59–60, 2015b.

BUCHMANN, J.; PROCHNOW, T. R. **Água, Agenda 21 e Você: uma aula para despertar consciência e senso crítico frente questões ambientais**. 5º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente, 2016.

CACCIÒ, S. M.; DE GIACOMO, M.; POZIO, E. Sequence analysis of the β -giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype Giardia duodenalis cysts from human faecal samples. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 8, p. 1023–1030, 2002.

CACCIÒ, S.; POZIO, E. Molecular identification of food-borne and water-borne protozoa. **The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, v. 32 Suppl 2, p. 156–8, 2001.

CANADA. Canada Minister of Health. **Canadian Guidelines for Domestic Reclaimed Water for Use in Toilet and Urinal Flushing**. Canada Minister of Health, 2010.

CARDOSO, A. et al. Metagenomics in polluted aquatic environments. *In*: **Water Pollution**. p. 89–104, 2016.

CARTA DE OTTAWA. **Primeira Conferência de Promoção da Saúde em Ottawa**. 1986.

CASTRAVECHI, D.; SHINODA, A. A. **Desenvolvimento de um Sistema para Armazenamento de Sequências Nucléicas**. p. 706–710, 2004.

CDC. **Centers for Disease Control and Prevotion**. Disponível em:

<<https://www.cdc.gov/cronobacter/index.html>>. Acesso em: 23 novembro 2019.

CHAPMAN, D.; KIMSTACH, V. Selection of water quality variables. *In*: CHAPMAN, D. (Ed.). **Water quality assessments: a guide to the use of biota, sediments and water in environmental monitoring**. Cambridge: University Press, p. 59–126, 1996.

CHEN, C. et al. Software for pre-processing Illumina next-generation sequencing short read sequences. **Source Code for Biology and Medicine**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2014.

CHEN, K.; PACHTER, L. Bioinformatics for whole-genome shotgun sequencing of microbial communities. **PLoS Computational Biology**, v. 1, n. 2, p. 0106–0112, 2005.

CHINA. The reuse of urban recycling water: **Classification Standard GB/T 18919**. China, 2002a.

CHINA. The reuse of urban recycling water: **Water quality standard for urban miscellaneous water consumption GB/T 18920**. China, 2002b.

CHINA. The reuse of urban recycling water: **Water quality standard for scenic environment use GB/T 18921**. China, 2002c.

CHINA. The reuse of urban recycling water: **Water quality standard for industrial water consumption GB/T 19923**. China, 2005a.

CHINA. The reuse of urban recycling water: **Water quality standard for groundwater recharge GB/T 19772**. China, 2005b.

CHINA. The reuse of urban recycling water: **Water quality standard for farm irrigation GB 20922**. China, 2007.

CNRH. Conselho Nacional de recursos hídricos. Resolução n° 54 de 28 de novembro de 2005. **Diário Oficial da União**, 2006.

CNRH. Resolução n. 121, de 16 de dezembro de 2010. Estabelece diretrizes e critérios para a prática de reúso direto não potável de água na modalidade agrícola e florestal, definida na Resolução CNRH n. 54, de 28 de novembro de 2005. **Diário Oficial da União**, p. 2, 2010.

COELHO, S. C. et al. Monitoramento da água de poços como estratégia de avaliação sanitária em Comunidade Rural na Cidade de São Luís, MA, Brasil. **Ambiente e Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 12, n. 1, p. 156, 2017.

CÔRTEZ, M. B. V. **Gestão da qualidade da água para consumo humano: diagnóstico microbiológico e parasitário dos rios Macacu, Caceribu e Guapi-Macacu**. Dissertação (Mestrado em Sistemas de Gestão) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2010.

CUADRAT, R. **Exploração da diversidade de policetídeo sintases (PKS) ambientais**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

DAJOZ, R. **Princípios de Ecologia**. Artmed ed. 2005.

DELWART, E. L. Viral metagenomics. **Reviews in Medical Virology**, v. 17, n. 2, p. 115–131, 2007.

DIAS, S. C. Planejando estudos de diversidade e riqueza: uma abordagem para estudantes de graduação. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 26, n. 4, p. 373–379, 2004.

EFTIM, S. E. et al. Occurrence of norovirus in raw sewage – A systematic literature review and meta-analysis. **Water Research**, v. 111, p. 366–374, 2017.

EPA. **Improved Enumeration Methods for the Recreational Water Quality Indicators**: Enterococci and Escherichia coli. Washington: U.S. Disponível em: <<https://www.epa.gov/beach-tech/improved-enumeration-methods-recreational-water-quality-indicators-enterococci-and>> . Acesso em: 1 novembro 2018.

EPA. **Guidelines for Water Reuse**. Washington: U.S. Disponível em: <<https://www3.epa.gov/region1/npdes/merrimackstation/pdfs/ar/AR-1530.pdf>>. Acesso em: 19 novembro 2018.

EUA. **Regulation n° 84 Reclaimed Water Control Regulation Colorado**. Department of Public Health and Environment, 2017. Disponível em: <<https://www.colorado.gov/pacific/cdphe/wq-reclaimed-water-reuse-permits>>. Acesso em: 3 março de 2018.

EWING, B. et al. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome research**, v. 8, n. 3, p. 175–85, 1998.

EXPASY. **Chenonavirus**. Bioinformatics Resource Portal. Disponível em: <<https://viralzone.expasy.org/6257>>. Acesso em: 23 novembro 2019.

FAO. **Fundo das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação**. Disponível em: <<http://www.fao.org/aquastat/en/overview/methodology/water-use/>>. Acesso em: 30 novembro 2019.

FATEMEH, D. et al. Rapid detection of coliforms in drinking water of Arak city using multiplex PCR method in comparison with the standard method of culture (Most Probable Number). **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 4, n. 5, p. 404–9, 2014.

FEENEYY, A. et al. Cronobacter sakazakii: Stress survival and virulence potential in an opportunistic foodborne pathogen. **Gut Microbes**, v. 5, n. 6, p. 711–718, 2015.

FIORI, S.; FERNANDES, V. M. C.; PIZZO, H. Avaliação qualitativa e quantitativa do reúso de águas cinzas em edificações. **Ambiente Construído**, v. 6, n. 1, p. 19–30, 2005.

FOLLADOR, K. et al. Saneamento Básico: Meio Ambiente e Saúde. **Revista**

UNINGÁ, v. 23, p. 24–28, 2015.

FRANCY, D. S. et al. Comparative effectiveness of membrane bioreactors, conventional secondary treatment, and chlorine and UV disinfection to remove microorganisms from municipal wastewaters. **Water Research**, v. 46, n. 13, p. 4164–4178, 2012.

FUNASA. **Manual técnico de Análises de Água para o Consumo Humano**. Fundação Nacional de Saúde. Ed. Brasília, Ministério da Saúde, 1999.

FUNASA. **Manual prático de análise de água**. Fundação Nacional de Saúde. 2º edição. Ed. Brasília, Ministério da Saúde, 2006.

FUNASA. **Manual de Saneamento Fundação Nacional de Saúde**. Ed. Brasília Ministério da Saúde, 2007.

GILBERT, J. A; DUPONT, C. L. Microbial metagenomics: beyond the genome. **Annual review of marine science**, v. 3, p. 347–371, 2011.

GOLOMIDOVA, A. K. et al. Complete Genome Sequence of Escherichia coli AS19. **Genome Announcements**, v. 6, n. 3, p. 1–2, 2018.

GOMEZ-ALVAREZ, V.; REVETTA, R. P.; DOMINGO, J. W. S. Metagenomic analyses of drinking water receiving different disinfection treatments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 17, p. 6095–6102, 2012.

GONÇALVES, R. F. **Uso Racional de Água e Energia: Conservação de água e energia em sistemas prediais e públicos de abastecimento de água**. ESABES, Vitória, 2009.

GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ. **Lei nº. 16.033** - Dispõe sobre a política de reúso de água não potável no âmbito do estado do Ceará. Diário oficial do Ceará, 2016. Disponível em: <www2.al.ce.gov.br/legislacao/legislacao5/leis2016/16033.htm>. Acesso em: 4 setembro de 2017

GOVERNO DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO. **Lei nº. 10.487** - Dispõe sobre o programa de reúso de efluentes das estações de tratamento de esgoto. Diário oficial do Espírito Santo, 2016. Disponível em: <<http://www3.al.es.gov.br/Arquivo/Documents/legislacao/html/LEI104872016.html>>. Acesso em: 5 outubro 2018

GOVERNO DO ESTADO DO PARANÁ. **Lei nº. 11.552** - Dispõe sobre a obrigatoriedade do reúso da água no município de Londrina e dá outras providências. Secretaria do Município de Londrina, 2012. Disponível em: <<https://leismunicipais.com.br/a/pr/l/londrina/lei-ordinaria/2012/1156/11552/lei-ordinaria-n-11552-2012-dispoe-sobre-a-obrigatoriedade-do-reuso-da-agua-municipio-de-londrina-e-da-outras-providencias?q=11552>>. Acesso em: 19 novembro 2018.

GOVERNO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO. **Lei nº 7424** - Dispõe sobre a obrigatoriedade da utilização de água de reúso pelos órgãos integrantes da administração pública estadual direta, das autarquias, das fundações instituídas ou

mantidas pelo poder público, das empresas em cujo capital do Estado, Diário oficial do rio de janeiro, 2016. Disponível em: <<http://alerjln1.alerj.rj.gov.br/contlei.nsf/f25edae7e64db53b032564fe005262ef/83e7b9336264d778832580200065d926?OpenDocument>>. Acesso em: 4 setembro 2017.

GOVERNO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO. **Lei n.º. 7599** - Dispõe sobre a obrigatoriedade de indústrias situadas no estado do rio de janeiro instalarem equipamentos de tratamento e reutilização de água. Diário oficial do Rio de janeiro, 2017. Disponível em: <<https://gov-rj.jusbrasil.com.br/legislacao/462625216/lei-7599-17-rio-de-janeiro-rj>>. Acesso em: 3 maio 2018.

GRIFFITH, J. F. et al. Evaluation of rapid methods and novel indicators for assessing microbiological beach water quality. **Water research**, v. 43, n. 19, p. 4900–7, 2009.

GRONEWOLD, A. D.; WOLPERT., R. L. Modeling the relationship between most probable number (MPN) and colony-forming unit (CFU) estimates of fecal coliform concentration. **Water Research**, p. 42:3327-3334., 2008.

GUIMARÃES, A. J. A.; CARVALHO, D. F.; SILVA, L. D. B. Saneamento básico. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de janeiro 2007.

HANDELSMAN, J. et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & biology**, 1998.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. **American Society for Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 669–685, 2004.

HARWOOD, V. J. et al. Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 6, p. 3163–70, 2005

HARWOOD, V. J. et al. Validation and field testing of library-independent microbial source tracking methods in the Gulf of Mexico. **Water research**, v. 43, n. 19, p. 4812–9, 2009.

HASSAN, M.; ESSAM, T.; MEGAHED, S. Illumina sequencing and assessment of new cost-efficient protocol for metagenomic-DNA extraction from environmental water samples. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 1–8, 2018.

HAUSER, R. et al. Bacteriophage Protein-Protein interactions. In: LABOCKA, M.; SZYBALSKI, W. T. (Eds.). **Advances in Virus Research: Bacteriophages**. San Diego, USA: Elsevier, 2012. p. 221–232.

HESPANHOL, I. Potencial de Reuso de Água no Brasil: Agricultura, Indústria, Municípios, Recarga de Aquíferos. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, p. 75–95, 2002a.

HESPANHOL, I. Potencial de reuso de água no Brasil: agricultura, indústria, municípios, recarga de aquíferos. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 7, n. 4, p. 75–95, 2002b.

HUSON, D. H. et al. MEGAN analysis of metagenomic data. **Genome Research**, v. 17, n. 3, p. 377–386, 2007.

HUSON, D. H. et al. MEGAN Community Edition- Interactive Exploration and Analysis of Large-Scale Microbiome Sequencing Data. **PLoS Computational Biology**, v. 12, n. 6, p. 1–12, 2016.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Introdução da PCR convencional e em tempo real para o diagnóstico laboratorial das meningites bacterianas no Instituto Adolfo Lutz. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 4, n. 40, 2007.

ISRAEL. **Ministry of the Environment. The Environment in Israel**. Ministry of the Environment, 2012. Disponível em: <<http://www.sviva.gov.il/English/Legislation/Pages/WasteAndRecycling.aspx>> Acesso: 9 fevereiro 2018.

JIANG, S.; NOBLE, R.; CHU, W. Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of Southern California. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 1, p. 179–84, 2001.

JIMÉNEZ-CISNEROS, B. Water Reuse and Recycling. **Comprehensive Water Quality and Purification**, v. 3, p. 296–323, 2014.

JORDÂNIA. **Ministry of Water & Irrigation National Water Strategy and related policies and action plans**. Ministry of Water & Irrigation, 2015.

JORDÃO, E. P.; PESSÔA, C. A. Tratamento de Esgotos Domésticos. 6a ed. Rio de Janeiro: **Associação Brasileira de Engenharia Sanitária**, 2011.

JOSHI, N. A.; FASS, J. N. Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33), 2011.

KAUSER, I.; CIESIELSKI, M.; PORETSKY, R. S. Ultraviolet disinfection impacts the microbial community composition and function of treated wastewater effluent and the receiving urban river. **PeerJ**, v. 7, p. e7455, 2019.

KRAMER, A.; POST, J. Lesson D1: **Guidelines and Standards for Wastewater Reusewater E-Learning Course**, 2001.

LEE, D.-Y. et al. Development and application of an oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR for detection of wastewater bacterial pathogens. **The Science of the total environment**, v. 398, n. 1–3, p. 203–11, 2008.

LIM, K. Y.; WU, Y.; JIANG, S. C. Assessment of Cryptosporidium and norovirus risk associated with de facto wastewater reuse in Trinity River, Texas. **Microbial Risk Analysis**, v. 5, p. 15–24, 2017.

LIPP, E. K.; FARRAH, S. A.; ROSE, J. B. Assessment and impact of microbial fecal pollution and human enteric pathogens in a coastal community. **Marine pollution**

bulletin, v. 42, n. 4, p. 286–93, 2001.

LIU, G. G. Microbial Community Succession of Excess Sludge Acidification Process Contral in Bench Scale. **Harbin Institute of Technology Harbin**, China, 2015.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M. **Brock Biology of Microorganisms**. 11th editi ed. New York, NY: Pearson Prentice Hall, 2006.

MAGURRAN, A. E. **Measuring biological biodiversity**. Malden: Blackwell, 2004.

MAHLER, R. L.; COLTER, A.; HIRNYCK, R. Nitrate and Groundwater. **Quality water for Idaho**, p. 1–4, 2007.

MANCUSO, P. C. S.; SANTOS, H. F. DOS. **Reúso de Água**. Manole ed. Baueri, São Paulo: 2003.

MCQUAIG, S.; GRIFFITH, J.; HARWOOD, V. J. Association of fecal indicator bacteria with human viruses and microbial source tracking markers at coastal beaches impacted by nonpoint source pollution. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 18, p. 6423–32, 2012.

MCQUAIG, S. M. et al. Quantification of human polyomaviruses JC Virus and BK Virus by TaqMan quantitative PCR and comparison to other water quality indicators in water and fecal samples. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 11, p. 3379–88, 2009.

MELO, H. N. DE S. et al. Utilização de Nutrientes de esgoto tratado em hidroponia. PROSAB, Rio de janeiro, **Associação Brasileira de Engenharia Sanitária**, 2006.

MÉXICO. **Mexican Standard NOM-001**. ECOL, 2006.

MOURA, P. G. **Avaliação de poluição biológica no Complexo de Manguinhos usando marcadores moleculares e filogenia molecular**. Dissertação (Mestrado em Biologia Computacional e Sistemas) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de janeiro, 2015.

MOURA, P. G. et al. Concepts and classification for water reuse in Brazil by different destinations. **American Journal of Engineering Research**, v. 8, n. 8, p. 156–159, 2019.

MOURA, P. G. et al. Água de Reúso: uma Alternativa Sustentável para o Brasil. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. *in press*, 2020.

NAKAZATO, T.; OHTA, T.; BONO, H. Experimental Design-Based Functional Mining and Characterization of High-Throughput Sequencing Data in the Sequence Read Archive. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e77910, 2013.

NAMÍBIA. **Water Resources Management Act.11**. Government Gazette of the Republic of Namibia, 2013. Disponível em: <<https://laws.parliament.na/annotated-laws-regulations/law-regulation.php?id=466>> Acesso: 25 outubro 2018.

NCBI. Taxonomy Browser Bradyrhizobium. National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <ncbi:txid374>. Acesso em: 20 nov. 2019.

NEW SOUTH WALES. **Environmental Guidelines**: Use of effluent by irrigation. Department of Environment and Conservation. Australia, 2004.

NIEMI, M. Survival of Escherichia coli phage T7 in different water types. **Water Research**, v. 10, n. 9, p. 751–755, 2003.

NOGUEIRA, I. DE S. et al. Diversidade (alfa, beta e gama) da comunidade fitoplanctônica de quatro lagos artificiais urbanos do município de Goiânia, GO. **Hoehnea**, v. 35, n. 2, p. 219–233, 2008.

O'LEARY, N. A. et al. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: Current status, taxonomic expansion, and functional annotation. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D733–D745, 2016.

OKUN, D. A. Realizing the benefits of water reuse in developing countries. **Water Environment & Technology**, v. 2, n. 11, p. 72–82, 1990.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Constituição da Organização Mundial da Saúde**. Documentos básicos, suplemento da 45a edição, 2006.

ONDOV, B. D.; BERGMAN, N. H.; PHILLIPPY, A. M. Interactive metagenomic visualization in a Web browser. **BMC Bioinformatics**, v. 12, n. 1, p. 385, 2011.

ONU. Organização das Nações Unidas. **Resolução n° 64/292** - Direito Humano à Água e ao Saneamento. Organização das Nações Unidas. Nova York, 2010.

ONU. Organização das Nações Unidas. Relatório Água doente. Programa do Meio Ambiente das Nações Unidas, 2019.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. **Microbiologia**. McGraw-Hil ed. São Paulo: Vol. II, 1981.

PENG, X. et al. Re-alignment of the unmapped reads with base quality score. **BMC Bioinformatics**, v. 16, n. 5, p. S8, 2015.

PINTO, F. DE A. et al. Interações simbióticas entre Escherichia coli e seres humanos: a instabilidade de uma relação. **Clinical & Biomedical Research**, v. 31, n. 4, p. 451–455, 2012.

PINTO, H. S. et al. **A Crise Hídrica e suas Consequências**. Núcleo de estudo e pesquisas, Senado Federal, p. 1–32, 2014.

PONTALTI, G. C. **Nitritos E Nitratos : Venenos Ou Nutrientes ?** Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, n. 2, p. 1–8, 2011.

PORTO, M. F. DE S. et al. Abordagens Ecosociais: Pensando a Complexidade na

Estruturação de Problemas em Saúde e Ambiente. *In Encontro da Associação Nacional de Pós Graduação e Pesquisa em Ambiente e Sociedade*, ANPPAS, 2004.

PRADO, E. L. DO. **Água destinada ao consumo humano: Riscos para a saúde humana resultantes da exposição de sulfatos**. Lisboa. Ministério da saúde de Portugal, 2010.

PREFEITURA DA CIDADE DE SÃO PAULO. **Lei nº 16174 de 2015** - Estabelece regramento e medidas para fomento ao reúso de água para aplicações não potáveis, oriundas do polimento do efluente final do tratamento de esgoto, de recuperação de água de chuva, da drenagem de recintos subterrâneos. São Paulo, Secretaria do Governo Municipal de São Paulo, 2015a. Disponível em: <<https://leismunicipais.com.br/a/sp/s/sao-paulo/lei-ordinaria/2015/1617/16174/lei-ordinaria-n-16174-2015-estabelece-regramento-e-medidas-para-fomento-ao-reuso-de-agua-para-aplicacoes-nao-potaveis-oriundas-do-polimento-do-efluente-final-do-tratamento-de-esgo>> Acesso em: 5 outubro 2018.

PREFEITURA DA CIDADE DE SÃO PAULO. **Lei nº 16.160 de 2015** - Cria o programa de reúso de água em postos de serviços e abastecimento de veículos e lava-rápidos no município de São Paulo, e dá outras providências. Secretaria do Governo Municipal de São Paulo, 2015b. Disponível em: http://www3.prefeitura.sp.gov.br/cadlem/secretarias/negocios_juridicos/cadlem/integra.asp?alt=14042015L161600000. Acesso em: 19 novembro 2018.

PREFEITURA MUNICIPAL DE CAXIAS DO SUL. **Lei nº 6616 de 2006** - Institui, no município de Caxias do Sul, o programa municipal de conservação, reúso e uso racional da água. Rio Grande do Sul, 2006. Disponível em: <https://leismunicipais.com.br/a/rs/c/caxias-do-sul/lei-ordinaria/2006/662/6616/lei-ordinaria-n-6616-2006-institui-no-municipio-de-caxias-do-sul-o-programa-municipal-de-conservacao-reuso-e-uso-racional-da-agua>. Acesso em: 19 novembro 2018

PROLAGOS. Concessionária de Serviços Públicos de Água e Esgoto. Disponível em: <http://www.prolagos.com.br/estacao-de-tratamento-de-agua-de-reuso-etar/>.

PROVETE, D. B.; SILVA, F. R.; SOUZA, T. G. Estatística aplicada à ecologia usando o RUNESP. **Universidade Estadual Paulista**, São Paulo, 2011.

QUEIROZ, E. T. **Diagnóstico de águas minerais e potáveis de mesa do Brasil. Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas**, Cuiabá, 2004.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. Austria, R Foundation for Statistical Computing, 2013. Disponível em: <<http://www.r-project.org/>>.

RESENDE, Á. V. DE. **Agricultura e Qualidade da Água: Contaminação da Água por Nitrato**. EMBRAPA, 2002. Disponível em: http://www.cpac.embrapa.br/publicacoes/search_pbl/1?q=Qualidade da água.

RICHARDS, L. A. Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. Washington: **U.S. Government Printing Office**, 1954.

RODRIGUES, N. et al. **Avaliação da qualidade da água superficial do igarapé quatro nações na cidade de Ariquemes-RO**. Monografia (Tecnologia em Gestão Ambiental) - Faculdade de Educação em Meio Ambiente, Roraima, 2015.

RODRIGUES, R. DOS S. **As dimensões legais e institucionais do reuso de água no Brasil: proposta de regulamentação do reuso no Brasil**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Sanitária) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

RODRIGUES, T. B. **Diversidade metagenômica microbiana de biomas terrestres e marinhos**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Genética) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

ROLIM, H. D. O. et al. Qualidade Dos Efluentes De Sistemas De Tratamento. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 9, n. 2, p. 393–414, 2016.

ROSARIO, K. et al. Metagenomic analysis of viruses in reclaimed water. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 2806–2820, 2009.

ROSLEV, P.; BUKH, A. S. State of the art molecular markers for fecal pollution source tracking in water. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 89, n. 5, p. 1341–55, 2011.

RUSCH, D. B. et al. The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: northwest Atlantic through eastern tropical Pacific. **PLoS biology**, v. 5, n. 3, p. e77, 13 mar. 2007.

SANTIAGO, F. S. et al. **Bioágua familiar: Reúso de água cinza para produção de alimentos no Semiárido**. Projeto Dom Helder Camara, Recife, 2012.

SANTIAGO, F. S. et al. **Manejo do Sistema Bioágua Familiar**. ATOS ed. Caraúbas: 2015.

SANTOS, V. S. DOS. **Água de reúso para consumo humano**. Disponível em: <https://brasilecola.uol.com.br/biologia/Agua-reuso-para-consumo-humano.htm>. Acesso em 3 março 2018.

SANZ, L. A.; GAWLIK, B. M. **Water reuse in Europe**. Relevant guidelines, needs for and barriers to innovation. A synoptic overview, European Commission, Joint Research Centre and Institute for Environment and Sustainability, Ispra, 2014.

SAUER, E. P. et al. Detection of the human specific Bacteroides genetic marker provides evidence of widespread sewage contamination of stormwater in the urban environment. **Water research**, v. 45, n. 14, p. 4081–4091, 2011.

SAYERS, E. W. et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D23–D28, 2019.

SCARPA, F. et al. **Reuse of Water - Methods to diminish non-biodegradable organic compounds**. WWT Project Work, KTH, 2011.

SCHWARTZ, J. Water Flowing From Toilet to Tap May Be Hard to Swallow. **The**

New York Times, New York, p. D1, 2015. Disponível em: <<https://www.nytimes.com/2015/05/12/science/recycled-drinking-water-getting-past-the-yuck-factor.html>>. Acesso em: 29 outubro 2018.

SENADO FEDERAL. **Projeto de Lei do Senado nº 415/2015** - Abastecimento de água por fontes alternativas. Senado Federal, p. 1–16, 2015.

SIMONI, E. C. DE. **A categoria território e sua incorporação nos estudos de saúde e ambiente**. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2016.

SINGH, J. et al. Metagenomics: Concept, methodology, ecological inference and recent advances. **Biotechnology Journal**, v. 4, p. 480–494, 2009.

SOTERO-MARTINS, A. Controle da qualidade microbiológica e parasitária em áreas de recreação. **Revista Eletrônica Gestão & Saúde**, v. 05, 2014.

SOTERO-MARTINS, A. et al. Methods for Sanitary Inspection of Microbiological and Parasitary Quality of Water and Sand of Recreation Areas. **American Journal of Engineering Research**, n. 6, p. 56–62, 2017.

SOULE, M. et al. Using DNA Microarrays To Identify Library-Independent Markers for Bacterial Source Tracking. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1843–1851, mar. 2006.

TEESALU, T.; SUGAHARA, K. N.; RUOSLAHTI, E. Mapping of Vascular ZIP Codes by Phage Display. **Methods in Enzymology**, v. 503, p. 35–56, 2012.

TUNÍSIA. Ministry of Agriculture. **Standard for the use of treated wastewater in agriculture NT 106-109**. Tunis: Ministry of Agriculture, 1989.

TURQUIA. Ministry of Environment. **Water Pollution Control Regulations**. Istanbul: Ministry of Environment, 1991.

UEMATSU, R. **Policies and Regulatory Frameworks on Wastewater Management and Water Reuse in Japan**. Japan, 2015.

UNESCO. **The United Nations world water development report 2019: leaving no one behind**. France: UNESCO World Water Assessment Programme, 2019.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Guidelines for Water Reuse**. Washington U.S. Agency for International Development Washington, D.C., 1992.

VAZ, F. L. Dos cortiços às favelas e aos edifícios de apartamentos — a modernização da moradia no Rio de Janeiro. **Análise Social**, vol. Xxix (127), (3.º), 581-597. 1994.

VENTER, J. C. et al. Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. **Science**, v. 304, n. 5667, p. 66 LP – 74, 2, 2004

VERLI, H. **Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular**. Hugo Verli, Porto Alegre, p. 282, 2014.

WAGNER, G. et al. STINGRAY: System for integrated genomic resources and analysis. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2014.

WEIDNER, S.; PÜHLER, A.; KÜSTER, H. Genomics insights into symbiotic nitrogen fixation. **Current opinion in biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 200–205, 2003.

WHO. **Reuse of effluents**: methods of wastewater treatment and health safeguards, report of a WHO meeting of experts. Ed. Geneva Technical report series, n. 517, 1973. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/41032>>. Acesso em

WHO. World Health Organization. UN reveals major gaps in water and sanitation – especially in rural areas. 2014. Disponível em: 15 setembro 2019.

<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/water-sanitation/en/>. Acesso em: 20 setembro 2019.

WOLF, S.; HEWITT, J.; GREENING, G. E. Viral multiplex quantitative PCR assays for tracking sources of fecal contamination. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 5, p. 1388–94, 2010.

ZHENG, G. et al. Development of Faecalibacterium 16S rRNA gene marker for identification of human faeces. **Journal of applied microbiology**, v. 106, n. 2, p. 634–41, 2009.

APÊNDICE 1 - INICIADORES UTILIZADOS NA PCR

Microrganismos	Iniciadores	Genes	Sequências	Bandas	Referências Bibliográficas
Bactérias					
<i>Bacteroides Humano</i>	HF183F Bac708R	16S rRNA	5'-ATCATGAGTTCACATGTCCG-3' 5'-CAATCGGAGTTCTTCGTG-3'	525 pb	(HARWOOD et al., 2009), (McQuaig et al., 2012), (Sauer et al., 2011)
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	Mnif-342f Mnif-363r	nifH	5'-AACAGAAAACCCAGTGAAGAG-3' 5'-ACGTAAAGGCACTGAAAAACC-3'	221 pb	(Sauer et al., 2011), (ROSLEV; BUKH, 2011), (MCQUAIG et al., 2009)
<i>Echerichia coli</i>	uidA298F uidA884R	uidA	5'-AATAATCAGGAAGTGATGGAGCA-3' 5'-CGACCAAAGCCAGTAAAGTAGAA-3'	600 pb	(Sauer et al., 2011), (BOWER et al., 2005)
<i>Enterococcus faecalis</i>	M66-M107 M66- M107EFR	16S rRNA	5'-TCTTTTCCTCACTACGCTAAGTG-3' 5'-CCTCTCCACTGTAAGGTCAAATC-3'	401 pb	(ROSLEV; BUKH, 2011), (SOULE et al., 2006)
<i>Faecalibacterium</i>	HFB F HFB R	16S rRNA	5'-GCTTTCAAAACACTGGTCG-3' 5'-GAAGAGAAAACGTATTTCTAC-3'	399 pb	(ROSLEV; BUKH, 2011), (ZHENG et al., 2009)
<i>Bifidobacterium dentium</i>	Bi-DEN 1 Bi-DEN 2	16S rRNA	5'-ATCCCGGGGGTTCGCCT-3' 5'-GAAGGGCTTGCTCCCGA-3'	387 pb	(ROSLEV; BUKH, 2011), (BONJOCH et al., 2004)
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Bi-ADO 1 Bi-ADO 2	16S rRNA	5'-CTCCAGTTGGATGCATGT-3' 5'-CGAAGGTTGCTCCCAGT-3'	279 pb	(ROSLEV; BUKH, 2011), (Bonjoch et al., 2004)
Virus					
Adenovirus	HAdVF HAdV R	HadV types 40,41	5'-GCCTGGGGAACAAGTTCAGA-3' 5'-GCGTAAAGCGCACTTTGTAAG-3'	137 pb	(Wolf et al., 2010)
Polyomavírus humano (HPyV)	SM2 F P6 R	T-antigen	5'-AGTCTTTAGGGTCTTCTACCTTT-3' 5'-GGTGCCAACCTATGGAACAG-3'	173 pb	(McQuaig et al., 2009) (Harwood et al., 2009)
Protozoários					
<i>Giardia spp.</i>	G7F G759R	beta-giardin	5'-AGCCCGACGACCTCACCCGCAGTG-3' 5'-AGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGA-3'	753 pb	(ZHENG et al., 2009) (CACCIÒ; POZIO, 2001)

APENDICE 2 - PROTOCOLOS DAS REAÇÕES DE PCR

PCR	Reações	Protocolos	Análises em gel de agarose
<i>Bacteroides humanos</i> <i>M. smithii</i> <i>E. coli</i> <i>B. adolescentis</i> <i>B. dentium</i> <i>Faecalibacterium spp.</i>	20 µL	6,25 µL de água mili – Q; 2,5 µL de tampão 10X; 4µL de cloreto de magnésio (25mM); (1 µL) 0,5µL de solução de cada iniciador (10mM); 5 µL de solução dNTP(2mM); 0,5 µL de TAQ polimerase (5U); 1 µL de DNA extraído.	<i>Bacteroides humanos</i> <i>M. smithii</i> <i>E. coli</i> } 2% <i>B. adolescentis</i> <i>B. dentium</i> } 3% <i>Faecalibacterium spp.</i> - 1%
<i>E. faecalis</i> Adenovírus HPyV <i>Giardia spp.</i>		1,25 µL de água mili – Q; 2,5 µL de tampão 10X; 8µL de cloreto de magnésio (25mM); (1 µL) 0,5µL de solução de cada iniciador (10mM); 5 µL de solução dNTP(2mM); 0,25 µL de TAQ polimerase (5U); 2 µL de DNA extraído.	<i>E. faecalis</i> Adenovírus } 2% HPyV <i>Giardia spp</i> } 1,5%

APÊNDICE 3 - CICLOS DE AMPLIFICAÇÃO

Microrganismos	Iniciadores	Ciclos	
Bactérias			
<i>Bacteroides</i> humanos	HF183F Bac708R	5 minutos de desnaturação a 95°C, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 51,5°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 5 minutos.	(HARWOOD et al., 2009) (MCQUAIG et al., 2009) otimizado
<i>M. smithii</i>	Mnif-342F Mnif-363R		
<i>E. coli</i>	uidA298F uidA884R	4 minutos de desnaturação a 95°C, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 6 minutos.	(BOWER et al., 2005)
<i>E. faecalis</i>	M66-M107 M66-M107R	2 minutos de desnaturação a 95°C, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 48°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 40 segundos e extensão final a 72°C por 2 minutos.	(SOULE et al., 2006)
<i>Faecalibacterium</i> spp.	HFB F HFB R	2 minutos de desnaturação a 95°C, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 7 minutos.	(ZHENG et al., 2009)
<i>B. dentium</i>	Bi-DEN 1 Bi-DEN 2	5 minutos de desnaturação a 95°C, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 58°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 5 minutos.	(BONJOCH et al., 2004)
<i>B. adolescentis</i>	Bi-ADO 1 Bi-ADO 2		
Vírus			
Adenovirus	HAdVF HAdV R	5 minutos de desnaturação a 95°C, seguido de 45 ciclos com desnaturação a 95°C por 15, anelamento a 59°C por 60 segundos, extensão a 72°C por 40 segundos e extensão final a 72°C por 6 minutos.	(MCQUAIG et al., 2009)
HPyV	SM2 F P6 R	2 minutos de desnaturação a 94°C, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 20 segundos, anelamento a 55°C por 20 segundos, extensão a 72°C por 20 segundos e extensão final a 72°C por 2 minutos.	(MCQUAIG et al., 2009)
Protozoários			
<i>Giardia</i> spp.	G7F G759R	5 minutos de desnaturação a 94°C, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 65°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 60 segundos e extensão final a 72°C por 7 minutos.	(CACCIÒ; DE GIACOMO; POZIO, 2002)

Concepts and classification for water reuse in Brazil by different destinations

Moura, P.G¹; Salles, M. J.²; Carvajal, E³; Jardim, Rodrigo⁴; Sotero-Martins, A⁵.
^{1,2,5}(Sérgio Arouca National School of Public Health -FIOCRUZ ,Rio de Janeiro,Brazil); ³(Rio de Janeiro State University - UERJ, Rio de Janeiro,Brazil); ⁴(Oswaldo Cruz Institute -FIOCRUZ ,Rio de Janeiro,Brazil)
 Corresponding Author: Moura, P.G

ABSTRACT : *The aim of this paper was to conceptualize water reuse based on different destinations, taking into account the quality required for water security. A systematic review of the Brazilian literature was carried out through bibliographical research focused on the themes: reuse water, wastewater use, gray water reuse, water reuse legislation. An updated classification on the types of reused water was proposed and the need for regulation at national level was noted, however considering the different types of reuse and destinations. Furthermore, depending on the source, different destinations may be given for water reuse, taking into account the risks to the present or persistent contaminant or pollutant after the producer treatment.*

KEYWORDS *water reuse, reuse types, reuse water legislation.* -----

Date of Submission: 06-08-2019

Date of Acceptance: 22 -08-2019

I. INTRODUCTION

The Brazilian National Water Resources Politics aims to ensure the present and future generations the necessary availability of water, in quality standards appropriate to respective uses; rational and integrated use of water resources for sustainable development; preservation and defense against critical hydrological events of natural origin or arising from the inappropriate use of natural resources [1].

Water is an essential right to life [2], therefore it is a priority issue for public health. The Brazilian Constitution of 1988 [3], in Article 225, argues the preserving and conserving water in quality and quantity is to protect the right to health, in addition, establishes the right of all to a balanced environment and a healthy quality of life, as well as as the public duty to act in this matter. However, the scenario of chemical pollution and biological contamination in water resources is increasing, reaffirming water as a finite natural resource. These actions limit the availability of water for human consumption, becoming reuse of water or the term "reuse water", the "current future", one of the main strategies for sustainable development in water management to ensure environmental balance and access to water for all in the future.

Indirect and unplanned reuse of water has been carried out by many municipalities and localities, where an upstream region discharges sewage into the environment due to poor sanitation, the untreated sewage follows, and water from the water resource is captured downstream. unintentionally and uncontrolled dilution in environmental water, and water is collected for treatment and drinking destination [4].

In Brazil there are few municipalities and states that had regulatory aspects regarding reuse water. In the federal constitution is writed that is a public duty ensure adequate and satisfactory legislation aimed at reducing or preventing health risks and to intervene in health problems against the environment given the set of health surveillance actions [3].

This paper aims to formulate the concept of reuse water in Brazil considered different destinations, to propose an updated classification of reused water types and to reinforce the need for national regulation.

II. METHODOLOGY

A systematic review study of the Brazilian literature was developed, and national bibliographic research focused on the themes: reuse water, wastewater use, gray water reuse, reuse water legislation. The bibliographic survey was conducted by consulting three electronic databases: Scientific Electronic Library Online (SciELO), Web of Science and Scopus, with no published year interval. The laws and regulations were consulted by the Google database.

Comparative analyzes were made through concepts, patterns and conceptions presented in the documents and articles, and was described the most cited.

III. RESULT AND DISCUSSION

Reuse water was defined as the reused of water from treated sewage [5,6]. Sanitary sewage is the liquid discharge consisting of domestic and industrial sewage discharged into public networks [7]. Domestic sewage comes mainly from public and commercial residences and buildings which contain toilets, laundries and kitchens [7, 8]. These authors divide the classification into black water and gray water. Black water is effluent from toilets, basically containing faeces, urine and toilet paper or from faeces and urine separating devices, having in its composition large amounts of faecal matter and toilet paper. On the other hand, it has a high organic load and the presence of largely sedimentable suspended solids in high quantity [3]. The gray waters are those effluent from washbasins, showers, tanks and washing machines and dishes [4]. Industrial sewage is waste resulting from industrial processes, depending on the type of industry it has very specific characteristics, being necessary to study each type of waste separately [7]. Although the general concept when describing water reuse seems to lead to the understanding which all the different origins can become the same type of reuse water (**Figure 1**). Ideally, depending on the source, different destinations may be given for water reuse, taking into account the risks to the type (s) of contaminant or pollutant present or persistent after the producer treatment.

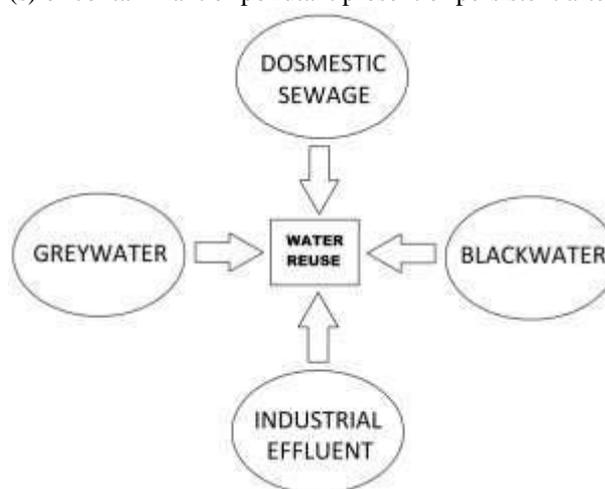


Fig.1. Different sources of water reuse production.

Thus the reuse water always come from different type of sanitary sewage, whether from black water, gray water or industrial sewage. Therefore, it was subjected to treatment steps in the Sewage Treatment Stations (STS) and was subjected to a treatment step in the process of transformation into reuse water by somehow.

In the few legislations in Brazil found on the subject, at the municipal and state levels is described that the use of rainwater is a type of reuse water [11-18]. However, rainwater had not been used in anthropogenic processes. Although it is environment recycled water and can be a very important tool for water resource management, but should not be confused with reuse water. Therefore, after it going through the natural hydrological cycle this water will have its first use [19] become necessary to update the concept in the regulatory aspects. According to the Brazilian federal constitution is a public duty to ensure adequate and satisfactory legislation aimed reducing or preventing health risks and to intervene in health problems arising from the environment, taking into account the set of sanitary surveillance actions [3].

The only Brazilian national regulation found was that of the Brazilian Association of Technical Standards - NBR 13.969 / 97 [20], which defines reuse water in processes such as:

- (i) Local reuse: sewage of essentially domestic or similar characteristics, treated sewage shall be reused for purposes requiring non-potable but sanitary safe water quality. The type of reuse can range from simple recirculation of rinse water from the washer, with or without treatment to toilets, to high-level removal of car wash pollutants;
- (ii) Domestic wastewater: from domestic bathing, cooking and floor washing. In that case, it would be from gray water;
- (iii) Unplanned indirect reuse of water: occurs when water used for some human activity is discharged into the environment and reused downstream in its diluted form unintentionally and uncontrolled. Walking to the point of capture for the new user, it is subject to the natural actions of the hydrological cycle (dilution, self-purification);

- (iv) Planned indirect water reuse: occurs when effluents, after being treated, are discharged in a planned manner into surface or groundwater bodies to be used downstream in a controlled manner to meet any beneficial use;
- (v) Planned direct water reuse: occurs when effluents, after being treated, are sent directly from their discharge point to the reuse site, not being discharged into the environment. This is the case with the highest occurrence, intended for use in industry or irrigation.

This regulation, NBR 13.969 / 97 [20], provides a classification according to use and details quality parameters, which are not in full agreement with the current legislation on bathing (CONAMA Resolution No. 274/2001) [21] and with Ordinance No. 5 [22], which provides for potability. In addition, there is no relationship of parameter values that applies to all classes that consider health risks for bathing and potability. It describes the following parameters by class:

- (vi) Class 1 - Car washes and other uses that require direct user contact with water, with possible aspiration of aerosols by the operator including fountains. Indicated parameters: Turbidity, Fecal coliform, Total dissolved solids, pH and Residual chlorine;
- (vii) Class 2 - Washing of floors, sidewalks and garden irrigation, maintenance of lakes and canals for landscape purposes, except fountains. Indicated parameters: Turbidity, fecal coliform and chlorine;
- (viii) Class 3 - Reuse of toilet flush. Indicated parameters: Turbidity and fecal coliform;
- (ix) Class 4 - Reuse in orchards, cereals, fodder, pasture for cattle and other crops by surface runoff or spot irrigation. Indicated parameters: fecal coliform and dissolved oxygen.

In the state of Ceará legislation, Law No. 16,033 of June 20, 2016 [18], a classification for reuse water was described as follows:

- Internal reuse: internal use of water reuse from activities carried out in the enterprise itself;
- External reuse: use of treated effluents from stations managed by sanitation service providers or third parties, whose characteristics allow their use.

In the article 24, paragraph 3, of the Federal Constitution, it is described that as there is no federal law on general rules, States must exercise full legislative competence to meet their peculiarities. Thus, in the absence of national regulations, some states have developed state laws to ensure the use of reuse water for urban, agricultural and industrial purposes. Only 7 of the 26 Brazilian states presented in their laws and regulations references on concepts, uses and applications of reuse water, they were: Rio de Janeiro (Law No. 7424/2016, Law No. 7599 24/2017), Espírito Santo (Law No. 10,487 / 2016), São Paulo (Law No. 16174/2015, Law No. 16,160 / 2015), Ceará (Law No. 16,033 / 2016), Bahia (Resolution No. 75/2010), Paraná (Law No. 11,552 / 2012) and Rio Grande do Sul (Law No. 6616/2006). On the other hand, these laws bring considerations about the use of rainwater as reuse water applications, which configures no guarantees for the process of technological treatment of this resource and nor does it fit with the definition of this type of matrix in scientific studies.

Based on the result found in the analysis of state laws and regulations only states of the Bahia (Resolution No. 75/2010) [11] and Paraná (Law No. 11522/2012) [17] considered parameters of reuse water quality. The legislation of the state of Ceará (Law n° 16.033 / 2016) [18] does not bring any notes on quality parameters, but it describes responsibility for its Secretariat of the Environment and the State Superintendent of Environment to oversee the quality of reuse water.

At national level, there is no specific wastewater legislation that includes concepts, classifications and quality standards which ensure the reuse water for different destinations, with safety necessary for humans, animals and the environment.

Resolution no. 54/2005 of the National Council of Environment (CONAMA) delegates to the specific guidelines, criteria and parameters for the reuse modalities, defined in the items which will be established by the competent organs. Whichever, there is no mention of the competent bodies to make specific regulation. The bill No. 54 of presented in the year 2016, provided for water supply from alternative sources, reused water. However, it did not cite any quality assessment parameters, and so far has not become national law.

Therefore, it is necessary to consider the creation of specific legislation for the different reuse systems to avoid risks to human and environmental health. Reuse water quality parameters should take into account the origin and destination of each type of reused water (**Figure 2**):

- Local or internal reuse - for new developments (building reuse systems) from gray water;
- External reuse - from water reuse treatment plants (WWTP);
- Industrial reuse - internal reuse of reused water from industrial activities of the enterprise itself or from external reuse.



Fig. 2. Relations considered for reused water.

In addition to the different types of use and quality parameters associated with the use of reused water, the law on the subject should contain or encourage discussion about the possibility of using reused water for potable purposes. Despite being controversial use and there is currently no safety for such use, provision should be made for use in critical cases.

IV. CONCLUSION

The classification for reused water should be made according to its origin, respecting the particularities of the water treatment. The quality parameters evaluated should take into consideration whether there is primary or secondary contact, regardless of origin, type, classification as it should not pose a risk to the handler. If there is primary contact in handling should be more restrictive, if there is no contact should still ensure quality not to endanger the environment.

REFERENCES

- [1]. Presidência da República, Casa Civil, Subchefia para Assuntos Jurídicos. Lei nº9433 - Política Nacional de Recursos Hídricos 1997.
- [2]. ONU. Resolução 64/A/RES/64/292 2010:1–4.
- [3]. Brasil. Senado Federal. Constituição da República Federativa do Brasil: texto constitucional promulgado em 5 de outubro de 1988, com alterações determinadas pelas emendas Constitucionais de revisão nº 1 a 6/94, pelas emendas Constitucionais nº 1/92 a 91/2016 e pelo Decreto Legis. vol. 1. 1988. doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2.
- [4]. Mancuso PCS, Santos HF dos. Reúso de Água. Manole. Baueri, São Paulo: 2003.
- [5]. Lavrador Filho J, Nucci NLR. Contribuição para o entendimento do reúso planejado da água e algumas considerações sobre suas possibilidades no Brasil. Universidade de São Paulo, 1987.
- [6]. Morais H, Barros M, Karinne M, Veriato L, Souza LDP, Chicó LR, et al. Reúso de água na agricultura. Rev Verde Agroecol e Desenvolv Sustentável 2015;10:11–6. doi:http://dx.doi.org/10.18378/rvads.v10i5.3868.
- [7]. Braga B, Hespanhol I, Conejo JGL, Mierzwa JC, Barros MTL de, Spencer M, et al. Introdução à Engenharia Ambiental. Pearson Pr. São Paulo: 2005.
- [8]. Bastos, Prezioso G, Palmieri F, Quagliariello E. Nutrientes de esgoto sanitário: utilização e remoção. J Bioenerg 2009;3:377–85. doi:10.1007/BF01516076.
- [9]. GONÇALVES RF. Uso Racional De Água E Energia: Conservação de água e energia em sistemas prediais e públicos de abastecimento de água 2009:354.
- [10]. Fiori S, Fernandes VMC, Pizzo H. Avaliação qualitativa e quantitativa do reúso de águas cinzas em edificações. Ambient Construído 2005;6:19–30.
- [11]. Bahia. Resolução CONERH nº 75 de 29/07/2010. Estabelece procedimentos para disciplinar a prática de reúso direto não potável de água na modalidade agrícola e/ou florestal. 2010.
- [12]. Governo do Estado do Espírito Santo. Lei nº 10.487 - Dispõe sobre o programa de reúso de efluentes das estações de tratamento de esgoto 2016.
- [13]. Prefeitura da Cidade de São Paulo. LEI Nº 16.160 - Cria o programa de reúso de água em postos de serviços e abastecimento de veículos e lava-rápidos no município de São Paulo, e dá outras providências 2015.
- [14]. Prefeitura da cidade de São Paulo. Lei nº 16174 2015 - Estabelece regramento e medidas para fomento ao reúso de água para aplicações não potáveis, oriundas do polimento do efluente final do tratamento de esgoto, de recuperação de água de chuva, da drenagem de recintos subterrâneos e de reb 2015.
- [15]. Governo do estado do Rio de Janeiro. Lei nº 7424 - Dispõe sobre a obrigatoriedade da utilização de água de reúso pelos órgãos integrantes da administração pública estadual direta, das autarquias, das fundações instituídas ou mantidas pelo poder público, das empresas em cujo capital do estado 2016:1.
- [16]. Governo do estado do Rio de Janeiro. Leis 7599 - Dispõe sobre a obrigatoriedade de indústrias situadas no estado do Rio de Janeiro instalarem equipamentos de tratamento e reutilização de água. 2017:2–3.
- [17]. Governo do estado do Paraná. Lei nº 11.552 - Dispõe sobre a obrigatoriedade do reúso da água no município de Londrina e dá outras providências 2012.
- [18]. Governo do Estado do Ceará. LEI Nº 16.033 - Dispõe sobre a política de reúso de água não potável no âmbito do estado do Ceará 2016:3.
- [19]. Aranha FN. Água de Reúso, uma Alternativa Sustentável. FIOCRUZ, 2017.

- [20]. ABNT. Reuso de água servida e/ou de esgotos tratados - Associação Brasileira De Normas Técnicas - NBR. 13.969/97 97AD:1-6.
- [21]. Brasil. Resolução CONAMA nº 274, de 29 de novembro de 2000 Publicada no DOU n 2001;18:70-1. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- [22]. Brasil. PORTARIA Nº 2914, de 12 de Dezembro de 2011 2011:1-38.

Moura, P.G" Concepts and classification for water reuse in Brazil by different destinations" American Journal of Engineering Research (AJER), vol. 8, no. 8, 2019, pp. 156-159

ARTIGO 2: ÁGUA DE REÚSO: UMA ALTERNATIVA SUSTENTÁVEL PARA O BRASIL.

Water Reuse, a Sustainable Alternative: Literature Review

Priscila Gonçalves Moura; Felipe Nicolau Aranha; Natasha Berendonk Handam; Luis Eduardo Martins; Maria José Salles; Elvira Carvajal; Adriana Sotero-Martins.

Resumo

As motivações para busca de soluções e alternativas que pode diminuir o estresse hídrico é evidentemente importante. Mesmo que renováveis, os recursos hídricos de qualidade e potabilidade são escassos. Como alternativa, o reuso pode ajudar a diminuir o uso de águas potáveis para atividades que não necessitam de potabilidade. Este trabalho teve como objetivo realizar revisão da literatura sobre água de reúso a partir da definição de alternativa sustentável e racional para uso da água. Realizou-se um levantamento bibliográfico do período de julho a dezembro de 2017 nas bases de dados MedLine, Lilacs, Embase e ISI. Com a revisão bibliográfica foi possível identificar que o tema reúso vem sendo debatido para a gestão, padronização e riscos associados à utilização. No Brasil não há uma a nível nacional que regule o uso e determine os padrões de qualidade da água de reúso, no entanto nas quatro regiões brasileiras foi observado que há sete estados brasileiros com legislações e normas sobre o tema. Legislações internacionais apresentam uma relação abrangente de parâmetros que podem ser utilizados como parâmetro no debate para a legislação brasileira. Trabalhos produzidos pela comunidade acadêmica fundamentam os riscos sobre esse tipo de água. Publicações científicas sobre água de reúso devem ser estimuladas, assim como legislações mais detalhadas descrevendo os tipos de água de reúso assim como os padrões de riscos relacionados.

Palavras- chave: Água de Reuso, Água Residuária, Legislação, Qualidade da água.

Abstract

The objective was to carry out a review of the literature on reuse water from the definition of a sustainable and rational alternative for water use. A bibliographical survey was carried out from July to December 2017 in the MedLine, Lilacs, Embase and ISI databases. A total of 4,802 articles were identified, of which 674 were excluded because they were duplicates. After evaluation of the titles, 3,305 articles were excluded

and from the reading of the abstracts of the 103 remaining articles, 19 articles were selected for the complete evaluation of the texts and 10 for the synthesis. Survey of national and international legislation on the subject was carried out until 2017. The bibliographic review showed that the reused topic has been discussed with notes to the management, standardization and risks associated with the use. There is no national Brazilian legislation that regulates the use and quality standards of reuse water. However, the literature points to only seven Brazilian states with legislation and norms on the subject, with the states of Ceará, Paraná, Bahia and São Paulo presenting the most detailed. International legislations present a comprehensive list of parameters that can be used in the discussion of Brazilian national legislation. Works have been produced by the academic community, basing the risks on this type of water. Scientific publications on reuse water should be encouraged as well as more detailed legislation describing the types of reuse water as well as related risk patterns.

Keywords: reuse water, legislation for reuse water, quality standards for reuse water; types of reuse water.

Título resumido do artigo: Água de Reúso no Brasil

INTRODUÇÃO

A escassez hídrica é uma problemática de regiões áridas, semi-áridas e de outras regiões com recursos hídricos sazonalmente abundantes, mas insuficientes para satisfazer demandas elevadas de consumo (HESPANHOL, 2002a). A utilização da água de reúso segura possibilita que a oferta de água potável seja destinada para fins essenciais, enquanto que a de reúso seja direcionada para outros fins, tais como atividades agrícolas, irrigação paisagística e limpeza urbana (PINTO et al., 2014).

Lavrador Filho (1987) descreve que a água de reúso é o “aproveitamento de águas previamente utilizadas, uma ou mais vezes, em alguma atividade humana, para suprir as necessidades de outros usos benéficos, inclusive o original”. A PROLAGOS (2015) cita que a água de reúso é o produto de uma técnica de refinamento do esgoto tratado e polido. BARROS *et. al.* (2015), define que água de reúso é a reutilização de águas, estas provenientes de efluentes tratados.

A água de reúso é o produto de um esgoto tratado e polido. Em algumas situações, o esgoto passa pelas etapas de tratamento nas Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) e posteriormente passa pelas etapas de tratamento de água de reúso

(ETAR) (PROLAGOS, 2015). Tecnologias alternativas visando o tratamento e refinamento de água de esgoto vem sendo levantadas como proposta para uso de fins potáveis.

Tratamentos como a adsorção em carvão ativado, oxidação com ozônio, dióxido de cloro e peróxido de hidrogênio, separação por membranas (microfiltração, ultrafiltração, nano-filtração e osmose reversa), eletrólise reversa, troca iônica, destilação e precipitação química são as principais tecnologias no que se refere ao tratamento das águas residuárias para reúso (MANCUSO E SANTOS, 2013; MIERZWA e HESPANHOL, 2005; TCHOBANOGLIOUS *et. al.*, 2003).

Contudo, há incertezas científicas entorno da destinação desta água, pois micropoluentes podem persistir a processos de tratamento pelo grande volume de água de reúso tratada diariamente (SCARPA *et al.*, 2011).

O reúso da água, até o momento, possui duas modalidades, dentre eles: água de reúso e água reciclada. A denominação do termo água de reúso confunde-se, no popular, com o aproveitamento de águas pluviais (água reciclada). O aproveitamento da água pluvial pode ser um instrumento muito importante para gestão dos recursos hídricos. Contudo não deve ser considerada como água de reúso, pois, após passar pelo ciclo hidrológico natural esta água captada terá sua primeira utilização (FIORI; FERNANDES; PIZZO, 2005).

Quanto à classificação, a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1973) define que a água de reúso pode ser classificada como reúso indireto (planejado e não planejado), reúso direto e reciclagem interna. No entanto, vários autores se empenham nesta discussão sobre a definição (LAVRADOR FILHO, 1987; WESTERHOFF, 1984). A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) n° 13.969/97 (ABNT, 1997), classifica quanto à forma de aproveitamento como reúso local, reúso direto planejado e reúso indireto (planejado e não planejado).

No Brasil, a água de reúso está sendo aplicada em diversas atividades não potáveis como na agricultura, irrigação paisagística, limpeza urbana, lavagem de veículos e em sanitários nos shopping centers. Em 2014 foram retomadas as discussões no sudeste sobre a utilização da água de reúso, por conta da crise de abastecimento no sistema Cantareira em São Paulo provocado pela estiagem de chuvas, já que havia a possibilidade de tornar a água de reúso distribuível para o consumo humano (MARENGO *et. al.*, 2015).

Contudo, esta medida pode representar riscos à saúde pública no Brasil. Não há legislações específicas e padrões reguladores no país para dar suporte a este instrumento de gestão ambiental, que garantam a qualidade e segurança na utilização da água de reúso para contato primário muito menos para o consumo humano. Neste cenário, pesquisas, discussões e debates são necessários para definir a utilização da água de reúso e os critérios de segurança sejam para fins potáveis e não potáveis acreditando que num cenário de escassez hídrica extrema possa utilizar este recurso como estratégia.

Neste sentido, o presente artigo teve como objetivo contribuir para a discussão sobre a legislação de água de reúso no Brasil, no que se refere a parâmetros de qualidade e uso seguro, em comparação com as legislações internacionais e nacionais vigentes, posto que não exista definição jurídica brasileira nacional até o momento.

METODOLOGIA

O estudo caracteriza-se como descritivo, com fonte de dados documentais. Buscando pela coleta de dados mais ampla possível, optou-se pela pesquisa de informações em três bases de dados eletrônicas: *Scientific Electronic Library Online* (SciELO), *Web of Science* e *Scopus*, sem intervalo de ano publicado.

Foram consultados também normatizações e padronizações, datadas até dezembro de 2017, sobre a utilização de água de reúso: nacionais brasileiras (níveis federal, estadual e municipal); e internacionais (países dos seis continentes do Mundo). Além da utilização da base de dados do Google para encontrar reportagens e documentos sobre o assunto.

O levantamento de informações aconteceu durante os meses de julho a dezembro de 2017. Utilizou-se os descritores na língua portuguesa “água de reúso” e “reúso de água cinza”, tendo como sinônimo “uso de águas residuais”. Os descritores equivalentes na língua inglesa foram “Wastewater use”, “Water reuse” e “Greywater reuse”.

Para os critérios de elegibilidade utilizados para inclusão dos artigos foram adotados: publicações nos últimos dez anos, documentos escritos nas línguas portuguesa e inglesa, artigos indexados e originais, artigos e documentos que abordam legislações e normas, publicações em anais de congressos, monografias, teses e dissertações.

Os critérios de exclusão foram: os documentos que não atenderam aos critérios de elegibilidade e que contenhas os termos e palavras chaves na língua portuguesa

“água de chuva”, “água reciclada”, tendo como sinônimo “água pluvial” e a busca na língua inglesa equivalente “Rainwater” e “Water Recycling”.

Dentro da temática do reúso foi observado nos artigos escolhidos o risco para saúde, métodos e tecnologias de tratamento, tipos de uso, gestão, padrões e legislações, estudo de casos, discussão sobre as possibilidades do uso, a percepção da sociedade sobre o tema. Foram identificados 4.802 artigos, destes 674 foram excluídos por serem duplicata. Após avaliação dos títulos dos artigos, 3.305 artigos foram excluídos e a partir da Leitura dos resumos dos 103 artigos restantes, 19 artigos foram selecionados para a avaliação completa dos textos e 10 para compor o Quadro 1 de síntese (em anexo).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção científica relacionada com o tema água de reúso

O tema reúso de água é datado desde a década de 60, porém somente após os anos 2000, que o assunto teve maior relevância no meio científico. O aumento das publicações científicas, pode ser explicado devido ao consenso mundial sobre a problemática da escassez de água potável no mundo. Além disto, eventos mundiais sobre meio ambiente ocorridos nas décadas passadas, como Eco 92, Agenda 21, entre outros também trataram sobre o tema (BUCHMANN e PROCHNOW, 2016).

“A Agenda 21, documento produzido pela Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente Desenvolvimento, realizada no Rio de Janeiro em 1992 com o objetivo de enfrentar os desafios ambientais do século XXI, também dedicou importância especial ao reúso, recomendando aos países participantes a implementação de políticas de gestão dirigidas para o uso e reciclagem de efluentes, integrando proteção da saúde pública de grupos de risco com práticas ambientais adequadas.” (HESPANHOL, 2002b)

A produção científica vem crescendo tanto em quantidade como em qualidade, nota-se que novas técnicas e tecnologias, análises de custos, métodos de monitoramento e gerenciamento dos recursos hídricos foram estudadas e aplicadas (ABOURACHED *et al.*, 2016; (AL-ALI; FILION, 2015)).

A síntese dos dez artigos de maior relevância selecionados neste estudo sobre o tema nos últimos 10 anos, apontam que a disponibilidade hídrica não uniforme nos contextos geográficos e temporal, e que as baixas disponibilidades hídricas por pressão de demanda em áreas populosas sejam os indicadores dos graves problemas relacionados ao uso de água (Quadro 1 – em anexo). Percebe-se que a destinação ou possível uso não é mais uma preocupação central, as discussões se basearam na gestão, padronização na qualidade da água e riscos associados à utilização.

Autores como Mujeriego *et al.* (2017) e Bizari e Cardoso (2016), argumentam que a gestão dos recursos hídricos é de suma importância, pois definirá o papel da água de reúso dentro do sistema. Além da gestão, deve-se considerar a aceitação por parte da população, visto que uma má imagem do recurso pode criar mitos e paradigmas que dificultam a adesão da sociedade ao tema (BAKARE *et al.*, 2015; HESPANHOL, 2008).

Entretanto, mesmo que se tenha uma excelente gestão e marketing da água de reúso, deve-se atentar quanto à segurança na utilização desse recurso. Os riscos associados ao uso devem ser mapeados e considerados em cada aplicação. Todos os autores listados no Quadro 1 destacam a importância da avaliação dos riscos.

A inexistência de padronização na qualidade da água de reúso para diferentes usos provoca insegurança por parte dos projetistas e executores para sua aplicação no Brasil (CASTILHO e OLIVEIRA, 2018). Em virtude disso, existe grande relevância em abranger a discussão acerca das normativas e legislações a respeito da água de reúso no Brasil. O país tem potencial para se tornar referência na temática, posto que é uma nação que seu maior poder econômico é a agricultura, detendo de grande potencial hídrico a ser preservado e com grande pressão de demanda por recursos hídricos no meio urbano. O debate sobre a percepção e mudança de paradigma para tornar a água de reúso uma realidade para ajudar na gestão dos recursos hídricos é de suma importância. Visto que se torna mais essencial a busca por soluções, à medida que o crescimento populacional não cessa.

Classificação ou tipos de reúso no Brasil

Destacaram-se duas propostas de classificação no Brasil: a da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) nº 13.969 de 1997 (ABNT, 1997), e a legislação estadual do Ceará nº 16.033 de 2016 (GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ, 2016). A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) nº 13.969 de

1997, que é a única norma de abrangência nacional, classifica quanto à forma de aproveitamento como: (i) **Reúso local** - esgoto de origem doméstica ou com características similares tratadas deve ser reutilizado para fins que exigem qualidade de água não potável, mas sanitariamente segura, tais como, irrigação, lavagem de pisos e dos veículos automotivos, descargas de vasos sanitários, manutenção paisagística dos lagos e canais, pastagens, entre outros. O tipo de reúso pode abranger desde a simples recirculação de água de enxágue da máquina de lavagem, com ou sem tratamento aos vasos sanitários, até uma remoção em alto nível de poluentes para lavagens de carros; (ii) **Reúso direto** - efluentes depois de tratados são encaminhados diretamente para o local do reúso de forma planejada; (iii) **Reúso indireto** - efluentes (tratados ou não tratados) são descarregados nos corpos superficiais ou subterrâneos. Estes efluentes podem ser captados na jusante de forma planejada ou não planejada. E estão sujeitos às ações naturais do ciclo hidrológico (depuração e autodepuração).

A legislação estadual do Ceará nº 16.033 de 2016 (GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ, 2016), que é o estado com a legislação regional mais atualizada, classifica como: (i) **Reúso interno**, como o uso interno de água de reúso proveniente de atividades realizadas no próprio empreendimento; (ii) **Reúso externo**, como o uso de efluentes tratados provenientes das estações administradas por prestadores de serviços de saneamento básico ou terceiros, cujas características permitam sua utilização.

Propomos neste trabalho uma classificação mais atualizada que considere a origem da água de reúso, sendo: (i) **Reúso local ou interno**, o proveniente de águas cinzas a partir de reúso residencial (casa ou prédio) e reúso de novos empreendimentos comerciais ou não. Considerando que segundo Fiori *et al.* (2005), as águas cinzas são aquelas provenientes dos lavatórios, chuveiros, tanques e máquinas de lavar roupa e louça; (ii) **Reúso externo**, o proveniente de águas negras (esgoto bruto) a partir de estações tratamento de esgoto e que passam na sequência por estações de tratamento de água de reúso (ETE+ETAR). Considerando que,, de acordo com (GONÇALVES, 2009), as águas negras são efluentes provenientes dos vasos sanitários, contendo basicamente fezes, urina e papel higiênico ou proveniente de dispositivos separadores de fezes e urina, tendo em sua composição grandes quantidades de matéria fecal e papel higiênico, por isto apresentam elevada carga orgânica e a presença de sólidos em suspensão, em grande parte sedimentáveis; (iii) **Reúso industrial**, o proveniente de águas a partir de atividades industriais do próprio empreendimento (reúso direto interno) ou a partir de reúso externo.

Riscos associados diante das modalidades de tipos de águas de reúso

Autores como Lee *et al.* (2008) e Harwood *et al.* (2005), descrevem sobre as incertezas da qualidade sanitária da água de reúso, que se relacionam a riscos associados à saúde mesmo por contato primário a coliformes, parasitas e vírus, os quais são encontrados em abundância nas águas residuais, e parte destes perpetuam nas diferentes etapas de tratamento dos efluentes.

A qualidade da água de reúso deve ser considerada de acordo com a sua origem:

(i) Reúso local - água de reúso de origem local, a partir de águas cinzas espera-se uma carga orgânica menor. Esta usada de forma direta, no domicílio, oferecerá menor risco à saúde. Podemos citar como exemplo o uso de água proveniente da lavagem de roupas para a limpeza de quintais. Outro exemplo seria a utilização de águas cinzas para a rega de plantas. Neste caso necessita-se de um tratamento prévio visando à retirada de detergentes; **(ii) Reúso externo** - considerando água de reúso a partir de estações de tratamento de esgoto, a carga orgânica é altíssima, sendo recomendados parâmetros de qualidade mais restritivos. Apesar do avanço das tecnologias de obtenção da água de reúso, micropoluentes podem persistir às etapas de tratamento devido ao grande volume de água tratada diariamente (SCARPA *et. al.*, 2011) e a própria resistência dos microrganismos a essas metodologias, dentre eles, microrganismos não cultiváveis como vírus, bacteroides, metanobacterias e outros indicadores de poluição por fontes humanas (MOURA, 2015). Destaca-se a preocupação com viroses que são humano específicas como Adenovírus (LEE *et. al.*, 2008; HARWOOD *et. al.*, 2005), pois estes patógenos tem sido detectados mesmo quando os indicadores de bactérias cultiváveis (*Escherichia coli*) não excedem os padrões recomendados ou até mesmo na ausência destes por metodologias tradicionais de cultivo (JIANG *et. al.*, 2001; LIPP *et. al.*, 2001). Com isto, este tipo de água de reúso oferece risco pelo contato primário e ao ambiente caso não seja avaliadas rigorosamente a qualidade e segurança em seu uso. **(iii) Reúso industrial**, que deve considerar o tipo de resíduo original que levou ao processo final de reúso industrial tratado. Necessita assegurar que não haverá risco de contaminação ao trabalhador que o manipula ou ser utilizado em áreas restritas onde não há contato humano. Os padrões de qualidade devem atender as necessidades da produção industrial e o risco de contato à saúde humana e ambiental.

Nas modalidades de **reúso direto e indireto** é preciso levar em consideração a destinação do resíduo sempre com padrões que não ofereçam riscos. O reúso indireto é

uma modalidade adotada por alguns países como, por exemplo, os EUA, no Texas utilizam o reúso tratado para abastecimento de mananciais e recarga de aquíferos. A água de reúso é encaminhada ao subsolo e aquíferos da região para ser diluída pelo abastecimento natural de águas. Esta medida reabastece os mananciais em estado de seca e renova os ecossistemas aquáticos. Especialistas estimam que após um período de dois anos a água é novamente captada para o abastecimento humano (SCHWARTZ, 2015).

Riscos associados à presença de poluentes químicos e microbiológicos

Os riscos associados a elementos presentes na água de reúso podem ser também devido à presença de poluentes químicos como hormônios sintéticos, medicamentos (analgésicos, antibióticos, reguladores lipídicos, anti-inflamatórios, hormônios sintéticos), substâncias utilizadas em produtos de limpeza e higiene pessoal; compostos aplicados na produção de resinas e plásticos, além de hormônios naturais (AQUINO *et al.*, 2013).

A presença destas substâncias em água têm sido verificada nas últimas décadas, sendo uma preocupação mundial (SANTOS *et al.*, 2013), pois estes podem afetar os receptores humanos e ambientais através de uma variedade de mecanismos, que podem ser disfunção endócrina, citotoxicidade e aumento da resistência dos microrganismos aos antibióticos (SCARPA *et al.*, 2011; FENT *et al.*, 2006; PRUDEN *et al.*, 2006).

Mesmo em baixas concentrações, da ordem de $\mu\text{g.L}^{-1}$ e ng.L^{-1} , apresentam risco potencial para a saúde humana e para o meio ambiente (ENDOCRINE SOCIETY, 2014; BILA e DEZOTTI, 2007). Dentre os riscos à saúde, diversos estudos têm verificado problemas relacionados à exposição à poluentes químicos, tais como: cânceres (SOTO; SONNENSCHNEIN, 2010), infertilidade em seres humanos e animais (LAGOS-CABRÉ e MORENO, 2012), feminização de peixes (BARBER *et al.*, 2012), resistência bacteriana (KÜMMERER, 2009), distúrbios neurológicos como transtorno do déficit de atenção e hiperatividade e transtorno do espectro do autismo, bem como depressão (ENDOCRINE SOCIETY, 2014), síndrome do ovário policístico, diminuição da produção de espermatozoides no homem (TESKE e ARNOLD, 2008).

Os poluentes químicos são continuamente e diariamente excretados no esgoto, e os tratamentos convencionais não foram projetados especificamente para eliminá-los, por isto as estações de tratamento de esgoto e de água não conseguem remover completamente estas substâncias (LUO *et al.*, 2014; MIÈGE *et al.*, 2008), com isto estas

são lançadas nos recursos hídricos, afetando a comunidade aquática, e podendo contaminar as fontes para abastecimento de água da população (AQUINO *et al.*, 2013), como uma forma de reúso indireto não planejado. Paralelo a isto, no Brasil ainda não existe uma legislação específica para água de reúso e mesmo nas legislações existentes, como Portaria de Consolidação nº 5 de 2017 (BRASIL, 2017) e nas Resoluções CONAMA 357 de 2005 (BRASIL, 2005) e 396/2008 (BRASIL, 2008) são deficitários os padrões de qualidade, como por exemplo, apenas cerca de 7% dos pesticidas utilizados no Brasil estão contemplados nestas Leis, além disto não são considerados os interferentes endócrinos nos padrões de qualidade sanitária da água (SANTOS *et al.*, 2010).

Existem tratamentos eficientes para a remoção dos micropoluentes. A desinfecção realizada com cloro possui potencial para a remoção e/ou transformação química de compostos como sulfametoxazol, bisfenol A, 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol, estrona, trimetoprim, acetaminofeno, nonilfenol e triclosan (CHEN *et al.*, 2007; ALUM *et al.*, 2004). No entanto outras tecnologias são mais eficientes como é o caso da ozonização e processos oxidativos avançados, que apresentam resultados bem sucedidos para o tratamento de águas residuais contendo produtos farmacêuticos e produtos para cuidados pessoais e compostos químicos desreguladores endócrinos (OLLER *et al.*, 2011; VIRKUTYTE *et al.*, 2010). Outra tecnologia para remoção dos micropoluentes da água são os processos de filtração com membranas por microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose reversa, que são eficientes na retirada de micropoluentes inorgânicos como, por exemplo, nitrato, arsênico e flúor; e orgânicos como, por exemplo, pesticidas, estrogênios (BOLONG *et al.*, 2009; NGHIEM *et al.*, 2004).

Quanto aos riscos microbiológicos, os patógenos presentes nas águas de reúso e que têm importância para a saúde humana e ambiental classificam-se nos seguintes grupos: bactérias, helmintos, protozoários e vírus (BARRELLA, 2008). Revisões recentes relatam a ocorrência de microrganismos patogênicos em água de reúso que podem causar riscos microbiológicos à saúde pública, mesmo após tratamento com desinfecção com cloro como norovírus (EFTIM *et al.*, 2017; FRANCY *et al.*, 2012), *Salmonella* spp. (FRANCY *et al.*, 2012), *Cryptosporidium* (LIM; WU; JIANG, 2017). Outros patógenos encontrados em água de reúso são as bactérias como *Escherichia coli* e o grupo de geohelmintos (MAY, 2009).

Pode ocorrer a contaminação por patógenos em qualquer modalidade de reúso. No entanto, possuem modalidades que apresentam menor risco como a irrigação de jardins por gotejamento utilizando água de reúso. Riscos de contaminação por microrganismos podem ocorrer principalmente quando acontece o contato dos indivíduos com a água de reúso, como por exemplo, realizando a irrigação por aspersão direta, que pode contaminar também os alimentos para consumo humano e animal, assim como pela inalação de aerossóis, e contato através da pele (MANCUSO; SANTOS, 2003).

No entanto, os riscos associados à exposição rotineira ou acidental a água de reúso contendo microrganismos não quer dizer que todos os indivíduos irão adquirir doenças. Além do grau de patogenicidade do microrganismo, isto dependerá também das condições do sistema imunológico, nutricional e do tipo de exposição de cada pessoa. O nível de patógenos na água indica que existe um risco aumentado de se contrair uma doença (CÔRTEZ, 2010; PINTO et al., 2012).

Algumas das doenças e agravos à saúde humana e ambiental associadas aos riscos microbiológicos e químicos provenientes de águas de reúso podem ser observadas na Tabela 1 em anexo.

Legislações

No Brasil, não há uma legislação específica para água de reúso que garanta qualidade sanitária a nível colimétrico e físico-químico para as diferentes possibilidades de destinação. Na Tabela 3 (anexo) estão comparados os parâmetros encontrados nas legislações e normativas. A norma da ABNT n° 13.969 de 1997 (ABNT, 1997) fornece instruções para “reúso de água servida” e/ ou de esgotos tratados para o Brasil, e define parâmetros de avaliação da qualidade da água de reúso de acordo com a classe de uso, seja para lavagem de carros, lavagem de pisos, uso em vaso sanitário e rega de hortaliças. Determina também como acondicionar e distribuir de forma segura, e alerta para o risco à saúde pública pelo contato direto do usuário com a água de reúso. Os parâmetros englobados pela norma n° 13.969 de 1997 não se encontram em concordância plena com as legislações vigentes para balneabilidade resolução CONAMA n° 274 (BRASIL, 2001) e potabilidade Portaria de Consolidação n° 5 de 2017 (BRASIL, 2017), além disto, não há uma relação de parâmetros que sejam aplicados para todas as classes. Na **Classe 1**, que trata sobre a lavagem de carros e outros usos que requerem contato direto do usuário com a água, os valores físico-químicos estão em conformidade com os parâmetros da Portaria de Consolidação n° 5

de 2017 e os padrões colimétricos em concordância com níveis excelentes de acordo com a resolução CONAMA n° 274 para a balneabilidade. Na **Classe 2**, que trata sobre as lavagens de pisos, calçadas e fins paisagísticos, o valor máximo permitido de cloro residual para potabilidade é de 2 mg/L, e os níveis de coliformes estão em conformidade para a balneabilidade. Na **Classe 3**, que aborda o reúso nas descargas dos vasos sanitários, o valor máximo permitido de turbidez é de 5 uT igual ao parâmetro para potabilidade, e os níveis de coliformes estão em concordância com o padrão para balneabilidade. **Classe 4**, que discute o reúso nos pomares, cereais, forragens, pastagens para gados e outros cultivos através de escoamento superficial ou sistema de irrigação pontual, os valores não se enquadram em nenhuma das legislações citadas acima.

Vale ressaltar que uma norma não tem a mesma função e importância que uma Lei. Na normativa, implementar as instruções é facultativo, em nível de legislação é obrigatório. A falta de legislação específica dificulta a aplicação da água de reúso no país, devido à falta de orientações técnicas para a implantação dos sistemas de reúso e a respectiva fiscalização de tais sistemas. Entre os objetivos da Política Nacional de Recursos Hídricos (BRASIL, 1997) consta que devemos assegurar à atual e às futuras gerações, a necessária disponibilidade de água, em padrões de qualidade adequados aos respectivos usos, contudo na realidade não é possível identificar todas as atividades de reúso de água no Brasil, sendo utilizada para fins agrícolas em algumas regiões de maneira informal sem garantir a segurança ambiental e para a saúde pública. Torna-se cada vez mais necessário institucionalizar, regulamentar e promover este setor, com a criação de estruturas de gestão, preparação de legislação, disseminação de informação, e do desenvolvimento de tecnologias (ANA, 2017).

Dentre normatizações nacionais para aplicação de água de reúso existe a Resolução do Conselho Nacional de Recursos Hídricos (CNRH) n° 54, de 28 de novembro de 2005 (BRASIL, 2006), que estabelece modalidades, diretrizes e critérios gerais para regulamentar e estimular a prática de reúso direto não potável de água, em todo território nacional. E traz em seu Art. 3° sobre as modalidades (e seus componentes) do reúso direto não potável de água: I – reúso para fins urbanos; II - reúso para fins agrícolas e florestais; III – reúso para fins ambientais; IV – reúso para fins industriais; V – reúso na aquicultura. A modalidade que se refere ao uso para a agricultura: “II - reúso para fins agrícolas e florestais: aplicação de água de reúso para produção agrícola e cultivo de florestas plantadas”, não traz as outras diretrizes sobre o tema, nem deixa claro quais são as legislações pertinentes que devem ser acessadas para

verificar os métodos de análises da água e do solo, e sobre os limites máximos permitidos dos parâmetros físicos, químicos, biológicos e de substâncias químicas no solo. Fica evidente que é uma normativa nacional que está incipiente e precisa fornecer mais informações e estabelecer os parâmetros e métodos para avaliação da qualidade sanitária da água de reúso e do solo que a recebe para a agricultura e para cultivo de florestas plantadas. Dessa forma, a Resolução nº 54 do CNRH apresenta as diversas modalidades, diretrizes e critérios gerais para regulamentar e estimular a prática de reuso direto não potável de água. Entretanto, apenas uma dentre as cinco modalidades teve avanços, foi a Resolução CNRH nº 121, que estabeleceu as diretrizes e critérios para a prática de reuso direto não potável de água nas modalidades agrícola e florestal. Portanto, há necessidade de agilizar as resoluções das demais modalidades.

Em 2016 surgiu um projeto de Lei no senado nº 58 de 2016 (BRASIL, 2016), que dispõe sobre abastecimento de água por fontes alternativas abrangendo as modalidades: I – **Reúso doméstico potável** (para ingestão, preparação de alimentos e higiene pessoal, em área urbana ou rural); II – **Reúso doméstico não potável** (para fins domésticos, exceto o potável); III – **Reúso urbano** (para fins não potáveis, tais como irrigação paisagística, lavagem de logradouros públicos e veículos, desobstrução de tubulações, construção civil, edificações e combate a incêndio, em área urbana); IV – **Reúso agrícola** (para produção agropecuária); V – **Reúso florestal** (para o cultivo de espécies florestais); VI – **Reúso industrial** (em processos, atividades e operações industriais); VII – **Reúso aquícola** (para criação de animais ou cultivo de vegetais aquáticos). Neste projeto de Lei obriga o abastecimento por fontes alternativas para as novas edificações residenciais, comerciais, industriais e as edificações, públicas ou privadas, construídas com recursos da União ou das agências federais de crédito.

Avaliando as legislações por regiões brasileiras, no sudeste, o estado do Rio de Janeiro tem a Lei nº 7424 de 2016 (GOVERNO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, 2016), que obriga à utilização de água de reúso não potável pelos órgãos integrantes da administração pública estadual direta, das autarquias, das fundações instituídas ou mantidas pelo poder público, das empresas em cujo capital do estado do Rio de Janeiro tenha participação, bem como pelas demais entidades por ele controladas direta ou indiretamente. Sinaliza que outros critérios podem ser estabelecidos em regulamentação posterior. Define que a utilização da água de reúso nas seguintes finalidades: I – Agricultura em geral; II - Irrigação de áreas verdes, parques, jardins, áreas turísticas,

campos de esporte; **III** - Lavagem de veículos públicos de qualquer tipo; **IV** - Lavagem de pisos, pátios e logradouros públicos; **V** - Outros usos similares.

Além desta, o estado do Rio de Janeiro tem a Lei nº 7599 de 2017 (GOVERNO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, 2017), que dispõe sobre a obrigatoriedade das indústrias situadas no estado instalarem equipamentos de tratamento e reutilização de água.

No Espírito Santo, a Lei nº 10.487 de 2016 (GOVERNO DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, 2016) dispõe sobre o programa de reúso de efluentes das estações de tratamento de esgoto, minimizando a utilização de água potável nos processos industriais que não requerem potabilidade. A Lei cria incentivos que permite que o Executivo estadual estabeleça mecanismos de estímulo para que as empresas públicas e privadas de grande porte e potencialmente poluidoras invistam na implementação do programa de utilização de água de reúso, proveniente de Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs). Além disso, a Lei determina que nos processos de licenciamento ambiental das empresas potencialmente poluidoras sejam definidas condicionantes que obriguem a utilização de água de reúso das ETEs, tanto da Companhia Espírito Santense de Saneamento (Cesan) como do Serviço Autônomo de Água e Esgoto (SAAE) nos municípios. O projeto aprovado na Assembleia exige que a qualidade do efluente seja monitorada pelas próprias ETEs e fiscalizado pelo Instituto Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos (IEMA).

Em São Paulo, a Lei nº 16174 de 2015 (PREFEITURA DA CIDADE DE SÃO PAULO, 2015a) estabelece regras e medidas para fomento ao reúso de água para aplicações não potáveis, oriundas do polimento do efluente final do tratamento de esgoto, de recuperação de água de chuva, da drenagem de recintos subterrâneos e de rebaixamento de lençol freático. Determina que a água de reúso seja destinada para: Lavagem de pisos, pátios e logradouros públicos; Lavagem de lagos e fontes ornamentais; Lavagem de caminhões e carretas de lixo e pátios de transbordo de resíduos sólidos urbanos (RSU); Lavagem de fachadas e jateamento para sua recuperação e envidraçamento, Operações de rescaldo após incêndios, realizadas por bombeiros. Construção civil: perfurações unidirecionais, em serviços de pavimentação asfáltica; Lavagem de veículos. Determina que a qualidade da água de reúso deve seguir os parâmetros de qualidade físico-químicas e microbiológicas compatíveis com as aplicações previstas e normas aplicáveis, porém não indica nenhuma legislação ou norma vigente para ser seguida como referencial. Diferentemente de outras legislações

estaduais pesquisadas, a Lei nº 16174 de São Paulo faz uma recomendação específica para o uso na irrigação, desde que: I - Assegurado por avaliação agrônômica que a qualidade não causará prejuízos à vegetação, nem desagregação de solo por acúmulo de sódio; II - Haja intervalo de tempo pós-aplicação, exposição ao sol, que limitem o risco de contaminação de pessoas, animais domésticos e silvestres em contato direto com a vegetação. Além disto, São Paulo tem uma legislação específica para o uso em lava-jatos, Lei nº 16.160 de 2015 (GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2015b), que estabelece que os postos de gasolina e lava-rápidos devem fazer o reúso da água utilizada na lavagem de veículos, após passar pelo processo de tratamento adequado. No entanto, não recomenda um processo de tratamento.

No Nordeste, a Bahia, a partir Conselho Estadual de Recursos Hídricos (CONERH), estipulou uma Resolução estadual nº 75 de 2010 (GOVERNO DO ESTADO DA BAHIA, 2010), que estabelece procedimentos para disciplinar a prática de reúso direto não potável de água, na modalidade reúso para fins agrícolas e/ou florestais: aplicação de água de reúso para produção agrícola e cultivo de florestas plantadas. A Lei utiliza as características microbiológicas recomendadas pela OMS para água em todos os tipos de reúso para fins agrícolas e/ou florestais. E define que para utilização do reúso de esgotos sanitários para fins agrícolas e/ou florestais não há restrição de DBO, DQO e SST, devendo as concentrações microbiológicas serem compatíveis com as definidas nesta resolução. Ademais, o monitoramento deve ser periódico, com definição do período pelo órgão competente. E a aplicação de água de reúso em solos agrícolas e/ou florestais deve ser obrigatoriamente condicionada à elaboração de projetos que atendam aos critérios estabelecidos pela resolução, entre outros.

O estado do Ceará, com a Lei n.º 16.033 de 20 de 2016 (GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ, 2016) dispõe sobre a política de reúso de água não potável no âmbito do estado do Ceará, estabelece critérios com o objetivo de viabilizar e estimular a sua ação no Ceará. Esta Lei proíbe o uso de água de reúso para o abastecimento humano e define as modalidades de reúso de água para fins: urbanos, agrícolas, florestais, ambientais, industriais e aquicultura. Responsabiliza a Secretaria de Recursos Hídricos a fiscalizar a gestão e infraestrutura relativa à água de reúso. A fiscalização da qualidade da água de reúso é de competência da Secretaria do Meio Ambiente e da Superintendência Estadual de Meio Ambiente. Cita que todos os equipamentos, tubulações e instrumentos utilizados com água de reúso, devem ser identificados e

diferenciados daqueles que utilizam água potável. Cria um selo de reúso para usuários de água de reúso interno e externos devidamente licenciados. E compete à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP, a responsabilidade por criar um programa de apoio ao desenvolvimento científico e tecnológico das práticas de reúso de água.

No sul do país, o estado do Paraná, Lei nº 11.552 de 2012 (GOVERNO DO ESTADO DO PARANÁ, 2012), dispõe sobre a obrigatoriedade do reúso de água no município de Londrina em edificações residenciais e comerciais a partir das águas cinzas das próprias edificações (reúso local ou interno). As disposições desta Lei se aplicam às obras novas e de ampliação e/ou reformas que tenham consumo de volume igual ou superior a 20 (vinte) metros cúbicos de água por dia. Esta apresenta os parâmetros de qualidade definidos pela Norma 13.969/97 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1997).

No Rio Grande do Sul, a Lei Nº 6616 de 2006 (PREFEITURA MUNICIPAL DE CAXIAS DO SUL, 2006), institui no município de Caxias do Sul, o programa municipal de conservação, reúso e uso racional da água. Este programa tem a previsão para ser aplicado dentro de 5 anos de forma a adequar as habitações, visando o uso racional da água e a utilização de fontes alternativas.

Com exceção da legislação do estado do Paraná, o Projeto de Lei do Senado nº 58 de 2016 e as legislações estaduais pesquisadas não apresentam parâmetros de avaliação da qualidade da água de reúso, seja para fins potáveis ou não, ficando algumas vezes a cargo das Secretarias do Meio Ambiente e das Superintendências Estaduais de Meio Ambiente a competência de fiscalizar a qualidade deste resíduo. Contudo de todas as legislações estaduais avaliadas, a que apresentou-se mais completa é a Lei n.º 16.033 de 2016 do estado do Ceará (GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ, 2016). Encontram-se em anexo as Tabelas 2 e 3 com a relação das legislações brasileiras e os parâmetros de qualidade relacionados. Consideramos necessária a criação de uma legislação específica para os diferentes sistemas de reúso para evitar riscos à saúde humana e ambiental. Os parâmetros de qualidade da água de reúso devem levar em conta a origem da água de reúso: reúso local/interno, reúso externo ou reúso industrial. É importante também em uma legislação, citar como deverá ser os diferentes sistemas de reúso: projetar sistema de abastecimento duplo, um para água potável e outro para água de reúso; cisternas e reservatórios separados, tubulações independentes identificadas com cores diferentes. Todo o conjunto deve receber sinalização indicando que aquela

tubulação ou torneira fornece água não potável.

Legislações internacionais

O reúso da água é praticado desde tempos antigos em países como China, Índia e Egito na agricultura. Entre os séculos 18 e 19 utilizava-se reúso direto, de efluente não tratado, para agricultura tanto na América do Norte quanto na Europa. No começo do século 20, os países desenvolvidos diminuíram a prática devido à poluição dos corpos hídricos, visto que a utilização de esgoto bruto era sem qualquer controle. Os países em desenvolvimento, como China, México, Peru, Egito, Líbano, Marrocos, Índia e Vietnã continuaram utilizando o reúso na agricultura devido à quantidade de nutrientes contidos na água (JIMÉNEZ-CISNEROS, 2014). Organizações internacionais elaboraram diretrizes estruturadas para a reutilização de águas. A Organização Mundial da Saúde (OMS) refere-se somente a utilização segura de águas residuais para agricultura, assim como a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO). As diretrizes do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (UNEP) são voltadas para irrigação de campos de golfe e recarga de aquíferos (SANZ e GAWLIK, 2014).

Na pesquisa realizada para o presente trabalho foi possível encontrar dados de diferentes legislações e normativas de 18 países que utilizam água de reúso, demonstrados nas Tabelas 4 e 5 em anexo. A estrutura destas tabelas tiveram como referência o documento “Water Reuse in Europa” elaborado pelo Comitê Europeu (SANZ e GAWLIK, 2014).

As primeiras diretrizes e padrões sobre reúso de água apareceram por volta do século 20, onde os Estados Unidos, no Estado da Califórnia, em 1918 padronizou o uso para irrigação agrícola, sendo revisado durante os anos seguintes até os dias atuais (ANGELAKIS e GIKAS, 2014; RODRIGUES, 2005). Nos EUA (1992), não há uma legislação nacional, ficando por responsabilidade dos estados (Arizona, Califórnia, Colorado, Florida, Texas e Washington), o desenvolvimento de suas Leis. Na maioria dos estados são permitidos os usos urbanos, doméstico (irrigação de gramados), industrial, agrícola, para construção civil, e definem classes e parâmetros para água de reúso. Na legislação norte americana foi encontrado o documento “Guidelines for Water Reuse” elaborado pela agência de proteção do Meio Ambiente Norte Americana (EPA - United States Environmental Protection Agency), que determina os tipos de usos possíveis e recomendações em parâmetros de qualidade, na Tabela 5 (anexo) (EUA,

1992). Além deste guia foram consultadas legislações dos estados Arizona, Califórnia, Colorado, Florida e Washington. No estado do Arizona existe a Lei “Title 18. Environmental Quality; Chapter 9. Department of Environmental Quality - Water Pollution Control” e “Title 18. Na Califórnia existe o documento “State Water Resources Control Board”, onde está compilado as legislações referentes aos recursos hídricos. No Colorado contém a “Regulation N°. 84 Reclaimed Water Control Regulation” (EUA, 2017). Na Florida, não dispõe de uma legislação em vigor, porém está em processo de aprovação da regulação “Reuse of Reclaimed Water and Land Application” (ANGELAKIS; GIKAS, 2014), esta segue como referência o documento da EPA, “Guidelines for Water Reuse” (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1992). No estado de Washington, não existe uma legislação em vigor, mas há um manual sobre a prática do reúso de água. Todas as legislações pesquisadas nos EUA possuem os parâmetros de qualidade recomendados pelo “Guidelines for Water Reuse”. Outro país na América do Norte que utiliza água de reúso é o Canadá, embora não exista uma legislação referente ao tema, existe a norma “Canadian guidelines for domestic reclaimed water for use in toilet and urinal flushing” (CANADA, 2010). Este documento recomenda a prática do reúso em sanitários e mictórios, e possui parâmetros microbiológicos e físico-químicos.

Na União Europeia não há padronização para reúso de água, no entanto estão fazendo estudos para elaboração de uma norma para diferentes usos e parâmetros para os países associados. Atualmente os países da comunidade europeia que contém padronização para o reúso são Chipre, França, Grécia, Itália, Portugal e Espanha. Os padrões de Chipre, França, Grécia, Itália e Espanha são incluídos como regulamentos na legislação nacional. Em Portugal, as normas relativas à reutilização das águas são diretrizes, tomado em consideração pelo governo nacional ao emitir todas as licenças da reutilização da água no campo. Todos os padrões avaliados referem-se à reutilização de efluentes urbanos e industriais, exceto os padrões de Chipre e de Portugal que se referem apenas às águas residuais urbanas (SANZ e GAWLIK, 2014).

Na África embora seja um continente que notoriamente tem uma alta demanda hídrica, sofre com escassez de água constantemente, e contém a maior concentração de pobreza no mundo. Na pesquisa não foram encontradas legislações na língua inglesa ou portuguesa sobre reúso de água na maioria dos países africanos. Foram encontradas legislações na África do Sul, Israel, Namíbia e Tunísia. Na África do Sul existem as regulações “Water Services Act of 1997 relating to grey-water and treated effluent”

(AFRICA DO SUL, 1997), o “National Water Act of 1998, 37” (AFRICA DO SUL, 1998), e os guias “The South African Guide for the Permissible Utilization and Disposal of Treated Effluent” e “The South African Water Quality Guidelines” (AFRICA DO SUL, 1998). Estas regulações e guias apresentam tipos de uso, entretanto nenhum parâmetro de qualidade é apresentado. Em Israel consultou-se o documento “The Environment in Israel 2002” (ISRAEL, 2012) elaborado pelo governo, onde são compiladas legislações e guias sobre o meio ambiente, incluindo a água de reúso. Observa-se neste documento que é permitida a utilização de água de reúso para agricultura, e os parâmetros de qualidade apresentados são DBO, sólidos suspensos, presença de cloro e salinidade, mas não há nenhuma referência a pesquisa de microrganismos patogênicos. Em contraste a utilização global, onde a predominância do reúso é na agricultura, a República da Namíbia trata o efluente de tratamento de esgoto sanitário para uso potável desde 1968, sendo o primeiro país no mundo a utilizar água de reúso para fins potáveis de forma indireta, fazendo recarga de aquífero (HESPANHOL, 2002). No país existe a legislação “Water Resources Management Act, 2013 (Act No. 11 of 2013)” (NAMÍBIA, 2013). O parâmetro de qualidade engloba a detecção microbiológica de *Escherichia coli* e análises físico-químicas como DBO, DQO e pH. Na Tunísia consultou-se a legislação “Standard for the use of treated wastewater in agriculture” (TUNÍSIA, 1989), sendo permitida a utilização de reúso na irrigação de culturas arbustivas, árvores e algumas raízes, e proibido para irrigação de vegetais.

Na América Latina só foi observada legislação na língua inglesa ou portuguesa no México. O México utiliza água de reúso na agricultura, sendo encontrada a legislação “Mexican Standard NOM-001-ECOL-1996” (MÉXICO, 2006), porém não possui parâmetros de qualidade.

No continente Asiático, a China possui as normatizações: “The reuse of urban recycling water- Classification Standard (GB/T 18919-2002)”(CHINA, 2002a) ; “The reuse of urban recycling water-Water quality standard for urban miscellaneous water consumption (GB/T 18920-2002)” (CHINA, 2002b); “The reuse of urban recycling water-Water quality standard for scenic environment use (GB/T -2002)” (CHINA, 2002c) ; “The reuse of urban recycling water-Water quality standard for industrial water consumption(GB/T 19923-2005)”(CHINA, 2005a); “The reuse of urban recycling water-Water quality standard for groundwater recharge (GB/T 19772-2005)” (CHINA, 2005b); “The reuse of urban recycling water-Water quality standard for farm irrigation

(GB 20922-2007)” (CHINA, 2007). Estas legislações definem os tipos de uso e os parâmetros de qualidade para utilização da água de reúso no país. No Japão, as informações obtidas foram através do documento “Policies and Regulatory Frameworks on Wastewater Management and Water Reuse in Japan” elaborado por Uematsu (2015). A Jordânia possui “National Water Strategy and related policies and action plans”(JORDÂNIA, 2015), onde existem os capítulos 5 e 10, “Water Substitution and Re-Use Policy” e “Decentralized Wastewater Management Policy” respectivamente, que abordam o tema reúso da água. Foi observado que a Jordânia permite a utilização na agricultura com os parâmetros físico-químicos para qualidade, Tabelas 4 e 5 (anexo). Na Turquia o reúso da água foi oficializado em 1991 através da legislação “Water Pollution Control Regulations” (TURQUIA, 1991). O país permitiu o uso para agricultura, com parâmetros de qualidade microbiológico e físico-químicos (KRAMER e POST, 2001) (Tabela 4 e 5 em anexo).

No continente da Oceania foi consultada a normativa da Austrália “Environmental Guidelines: Use of effluent by irrigation” (NEW SOUTH WALES /, 2004) elaborado pelo departamento de meio ambiente e conservação australiano. Este guia contém informações sobre métodos de tratamento e operações para utilização de água de reúso em diversos usos, além de determinar parâmetros físico-químicos para qualidade sanitária.

CONCLUSÕES

A preocupação com a escassez de água e o aumento do custo para o tratamento de água, podem ser motivadores para os gestores e investidores apostarem na prática do reúso. A recuperação de corpos d’água podem ter um aumento exponencial com a reutilização de efluentes. Contudo, deve ser estudado e observada a melhor forma de gerir os recursos, evitando que se aumente o estresse hídrico ou mude as características do meio.

Existe uma pequena tendência para criação de legislação e parâmetros para utilização da água de reúso no Brasil. Contudo, ainda está em um estágio incipiente, como evidenciado no texto, apenas 27% dos estados da federação contém alguma legislação estadual ou municipal. Das Leis ou normativas verificadas, 3 delas são estaduais e 4 municípios possuem alguma normativa sobre tema. Logo, quando se analisa em nível municipal a exposição do tema é menor, de maneira que 4 dos 5.570 municípios do país contém Leis sobre o tema, ou seja, menos que 1%.

É notório a necessidade do arcabouço legal para prática do reúso. Por mais que necessite de restrições de qualidade, deve-se ter cuidado na elaboração das legislações, pois não devem ser frágeis a ponto de permitir o uso indiscriminado da água de reúso, colocando em risco a saúde das pessoas e o meio ambiente, porém também não devem ser muito restritivas tornando a prática do reúso inviável.

Para que a prática do reúso de água seja ampliada no país deve-se elaborar diretrizes e programas através de legislação de nível federal, que deve conter as definições das origens da água de reúso, assim como as formas de utilização, parâmetros de qualidade, instrumentos nos quais ajude a melhorar a pesquisa e desenvolver o tema em todo âmbito nacional. Sendo assim, precisa-se de legislação específica que assegure todas as possibilidades de uso sem colocar em risco à saúde humana, animal e ambiental. Alertamos que todo tipo de água de reúso deve-se ter um mínimo de tratamento secundário, com ou sem filtração adicional para remoção da maioria dos contaminantes e deve ser monitorada constantemente.

REFERÊNCIAS

- ABOURACHED, C.; ENGLISH, M.J.; LIU, H. *Wastewater treatment by Microbial Fuel Cell (MFC) prior irrigation water reuse*. Journal of Cleaner Production, v. 137, 2016, p. 144–149.
- AFRICA DO SUL. *National Water Act No. 36*. Pretoria Government Printers, 1998.
- AFRICA DO SUL. *National Water Services Act No. 108*. Pretoria Government Printers, 1997.
- AL-ALI D.; FILION, Y. A. *Critical Review of Water Reuse in North America: The Historical Shift from Technological Priorities to Public Perception Studies*. World Environmental and Water Resources Congress: American Society of Civil Engineers; 2015. p. 1173–90.
- ALUM, A.; YOON, Y.; WESTERHOFF, P.; ABBASZADEGAN, M. *Oxidation of bisphenol A, 17 β -estradiol, and 17 α -ethynyl estradiol and byproduct estrogenicity*. Environmental Toxicology, v. 19, n. 3, 2004, p. 257–264.
- ANA. *Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil 2017, relatório pleno*. Agência Nacional de Águas, 2017, p. 169.
- ANGELAKIS, A.; GIKAS, P. *Water reuse: Overview of current practices and trends in the world with emphasis on EU states*. Water Utility Journal, v. 8, 2014, p. 67–78.
- AQUINO, S.F.; BRANDT, E.M.F.; CHERNICHARO, C.A.L. *Remoção de fármacos e*

desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. Engenharia Sanitária e Ambiental, v. 18, n. 3, 2013, p. 187–204.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 13.969. Rio de Janeiro, 1997. 60 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 13.969. Rio de Janeiro, 1997. 60 p. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 13.969. Rio de Janeiro, 1997. 60 p.

BAKARE, B.F.; MTSWENI, S.; RATHILAL, S. *A pilot study into public attitudes and perceptions towards greywater reuse in a low cost housing development in Durban, South Africa.* Journal of Water Reuse and Desalination, v. 06.2, 2015, p. 345–354.

BARBER, L. B.; VAJDA, A. M.; DOUVILLE, C.; NORRIS, D. O.; WRITER, J. H. *Fish Endocrine Disruption Responses to a Major Wastewater Treatment Facility Upgrade.* Environmental Science & Technology, v. 46, n. 4, 2012, p. 2121–2131.

BARROS, H. M. M.; VERIATO, M. K. L.; SOUZA, L. P.; CHICÓ, L. R.; BAROSI, K. X. L. *Reúso de água na agricultura.* Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável, v. 10, 2015, p. 11–16.

BILA, D.M.; DEZOTTI, M. *Endocrine disruptors in the environment: part 1 - effects and consequences.* Química Nova, v. 30, n. 3, 2007, p. 651–666.

BIZARI, D.R.; CARDOSO, J.C. *Reuse water and urban horticulture: alliance towards more sustainable cities.* Horticultura Brasileira, v. 34, n. 3, 2016, p. 311–317.

BOLONG, N, ISMAIL, A.F., SALIM, M.R., MATSUURA, T. *A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal.* Desalination, v. 239, 2009, p. 229–46.

BRASIL. Lei nº 9433/1997. Publicação DOU, de 09/01/1997.

BRASIL. Portaria de Consolidação nº 05, de 28 de setembro de 2017. Publicação Nº 190 – DOU de 03/10/17 – Seção 1 – Suplemento. p.360. 2017.

BRASIL. Projeto de Lei do Senado nº 58, DE 2016. 2016.

BRASIL. Resolução CNRH nº 121, de 16 de dezembro 2010. Brasília, DF, 16 de dezembro 2010.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 396, de 3 de abril de 2008 Publicada no DOU nº 66, de 7 de abril de 2008, Seção 1, páginas 64-68. 2008.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 274, de 29 de novembro de 2000. Publicada no DOU n, 2001.

BRASIL. Resolução do Conselho Nacional de Recursos Hídricos (CNRH) nº 54, de 28 de

novembro de 2005. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 09 de março de 2006.

BRASIL. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005 Publicada no DOU nº 053, de 18/03/2005, págs. 58-63. 2005.

BUCHMANN, J.; PROCHNOW, T. R. “Água, Agenda 21 e Você”: uma aula para despertar consciência e senso crítico frente questões ambientais. In: 5º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente, 2016.

CANADA. Canadian Guidelines for Domestic Reclaimed Water for Use in Toilet and Urinal Flushing. Canada Minister of Health, 2010.

CASTILHO, C.P.; OLIVEIRA, L.H. Avaliação durante operação de sistemas de água não potável em edifícios residenciais. Ambiente Construído, v. 18, n. 1, 2018, p. 409–421.

CHEN, C.Y.; WEN, T.Y.; WANG, G.S.; CHENG, H.W.; LIN, Y.H.; LIEN, G.W. Determining estrogenic steroids in Taipei waters and removal in drinking water treatment using high-flow solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Science of the Total Environment, v.378, n.3, 2007, p.352-365.

CHINA. The reuse of urban recycling water – Classification Standard GB/T 18919. China, 2002a.

CHINA. The reuse of urban recycling water - Water quality standard for urban miscellaneous water consumption GB/T 18920. China, 2002b.

CHINA. The reuse of urban recycling water - Water quality standard for scenic environment use GB/T 18921. China, 2002c.

CHINA. The reuse of urban recycling water-Water quality standard for industrial water consumption GB/T 19923. China, 2005a.

CHINA. The reuse of urban recycling water-Water quality standard for groundwater recharge GB/T 19772 China. 2005b.

CHINA. The reuse of urban recycling water-Water quality standard for farm irrigation GB 20922 China. 2007.

ENDOCRINE SOCIETY. *Introduction to endocrine disrupting chemicals (edcs) a guide for public interest organizations and policy-makers*. Washington, 2014.

EUA. Guidelines for Water Reuse. United State Environment Protection Agency, 1992.

EUA. Regulation No. 84 Reclaimed Water Control Regulation Colorado Department of Public Health and Environment, 2017.

EUA. Statutory Water Rights Law and Related California Code Section. State Water

- Resources Control Board, State of California, 2017.
- FENT, K., WESTON, A.A., CARMINADA, D. *Ecotoxicology of human pharmaceuticals*. *Aquat Toxicol*, v. 76, 2006, p. 122–59.
- FERNANDES, V.M.C. *Padrões para reúso de águas residuárias em ambientes urbanos*. In: II Simpósio Nacional sobre o Uso de Água na Agricultura, 2006, p. 17.
- FIORI, S.; FERNANDES, V.M.C.; PIZZO, H. *Avaliação qualitativa e quantitativa do reúso de águas cinzas em edificações*. *Ambiente Construído*, v. 6, n. 1, 2005, p. 19–30.
- GONÇALVES, R. F. *Uso Racional de Água e Energia: Conservação de água e energia em sistemas prediais e públicos de abastecimento de água*. ABES; 2009. p. 354.
- GOVERNO DO ESTADO DA BAHIA. Resolução CONERH nº 75 de 29/07/2010. Publicado no DOE em 01 de agosto de 2010.
- GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ. Lei no 16.033. Ceará, Diário oficial, 2016.
- GOVERNO DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO. Lei nº 10.487. Espírito Santo, Diário oficial, 2016.
- GOVERNO DO ESTADO DO PARANÁ. Lei nº 11.552. Londrina, Paraná. Secretaria do município de Londrina, 2012.
- GOVERNO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO. LEI Nº 7424 - dispõe sobre a obrigatoriedade da utilização de água de reúso pelos órgãos integrantes da administração pública, 2016.
- GOVERNO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO. Lei nº 7424 de 24 de agosto de 2016 do Rio de Janeiro. Data de publicação 08/25/2016.
- GOVERNO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO. Lei nº 7599 de 24 de maio de 2017. Data de publicação 25/05/2017.
- HARWOOD, V. J.; Levine, A. D.; Scott, T. M.; Chivukula, V.; Lukasik, J.; Farrah, S. R. *Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection*. *Appl. Environment. Microbiol*, v. 71, 2005, p. 3163–3170.
- HESPANHOL, I. *Potencial de Reuso de Água no Brasil: Agricultura, Indústria, Municípios, Recarga de Aquíferos*. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, 2002, p. 75–95.
- HESPANHOL, I. *Um novo paradigma para a gestão de recursos hídricos*. *Estudos Avançados*, v. 22, n. 63, 2008, p. 131–158.
- ISRAEL. The Environment in Israel Ministry of the Environment, 2012.
- JIANG, S.M.; WANG, L.; REEVES, P.R. *Molecular characterization of streptococcus pneumoniae type 4, 6b, 8, and 18c capsular polysaccharide gene clusters*. *Infect immune*,

v. 69, n. 3, 2001, p. 1244-55.

JIMÉNEZ-CISNEROS, B. *Water Reuse and Recycling*. Comprehensive Water Quality and Purification, v. 3, 2014, p. 296–323,.

JORDÂNIA. National Water Strategy and related policies and action plans, chapters 5 and 10. Ministry of Water & Irrigation, 2015.

KRAMER, A.; POST, J. *Lesson D1: Guidelines and Standards for Wastewater Reuse water*. E-Learning Course, EUA, 2001.

KÜMMERER, K. *Antibiotics in the aquatic environment--a review--part I*. Chemosphere, v. 75, n. 4, 2009, p. 417–434.

LAGOS-CABRÉ, R.; MORENO, R. D. *Contribution of environmental pollutants to male infertility: a working model of germ cell apoptosis induced by plasticizers*. Biological Research, v. 45, n. 1, 2012, p. 5–14.

LAVRADOR FILHO, J. *Contribuição para o entendimento do reúso planejado de água e algumas considerações sobre a suas possibilidades no Brasil*. São Paulo, 1987. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.

LEE, D.-Y.; LAUDER, H.; CRUWYS, H.; FALLETTA, P.; BEAUDETTE, L. A. *Development and application of an oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR for detection of wastewater bacterial pathogens*. The Science of the total environment, v. 398, n. 1–3, 2008, p. 203–11.

LIPP, E.K.; FARRAH, S.A.; ROSE, J.B. Assessment and impact of microbial fecal pollution and human enteric pathogens in a coastal community. *Marine pollution bulletin*, v. 42, n. 4, 2001, p. 286–93.

LUO, Y.; GUO, W.; NGO, H.H.; NGHIEM, L.D.; HAI, F.I.; ZHANG, J.; LIANG, S.; WANG, X.C. *A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment*. Science of the Total Environment, v. 473-474, 2014, p. 619–641.

MANCUSO, P.C.S.; SANTOS H.F. *Reúso de Água*. Barueri, SP: Manole, 2013.

MARENGO, J. A.; NOBRE, C. A.; SELUCHI, M. E. CUARTAS, A.; ALVES, L M.; MENDIONDO, E M.; OBRÉGON, G.; SAMPAIO, G. *A seca e a crise hídrica de 2014-2015 em São Paulo*. Revista USP, 31-44, 2005.

MÉXICO. Mexican Standard NOM-001-ECOL, 2006.

MIÈGE, C.; CHOUBERT, J. M.; RIBEIRO, L.; EUSÈBE, M.; COQUERY, M. *Removal efficiency of pharmaceuticals and personal care products with varying wastewater treatment processes and operating conditions - conception of a database and first results*.

Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research, v. 57, n. 1, 2008, p. 49–56.

MIERZWA, J.C.; HESPANHOL, I. *Água na indústria: uso racional e reúso*. São. In: Oficina de Textos, 2005.

MONTAGNER, C.C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. *Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios*. Química Nova, vol. 40, n. 9, 2017, p.1094-1110.

MOURA, P.G. *Avaliação de poluição biológica no Complexo de Manguinhos usando marcadores moleculares e filogenia molecular*. Instituto Oswaldo Cruz. Fundação Oswaldo Cruz, 2015.

MUJERIEGO, R.; GULLÓN, M.; LOBATO, S. *Incidental potable water reuse in a Catalanian basin: living downstream*. Journal of Water Reuse and Desalination, v. 7, n. 3, 2017, p. 253–263.

NAMÍBIA. Water Resources Management Act.11 Government Gazette of the Republic of Namibia, 2013.

NEW SOUTH WALES / DEPARTMENT OF ENVIRONMENT AND CONSERVATION. Environmental Guidelines: Use of effluent by irrigation. Department of Environment and Conservation Austrália, 2004.

NGHIEM, L.D.; MANIS, A.; SOLDENHOFF, K.; SCHÄFER, A.I. *Estrogenic hormone removal from wastewater using NF/RO membranes*. Journal of Membrane Science, v. 242, Issues 1-2, 2004, 242, p. 37-45.

OLLER, I.; MALATO, S.; SÁNCHEZ-PÉREZ, J.A. *Combination of Advanced Oxidation Processes and biological treatments for wastewater decontamination—A review*. Science of The Total Environment, v. 409, n. 20, 2011, p. 4141–4166.

PINTO, H. S.; Faria, I. D.; Baptista, R.; Kassmayer, K.; Abbud, A.; Pinto, V. C. *A Crise Hídrica e suas Consequências*. Núcleo de estudo e pesquisas - Senado Federal, 2014, p. 1–32.

PREFEITURA DA CIDADE DE SÃO PAULO. Lei n° 16174 2015. São Paulo, Secretaria do Governo Municipal de São Paulo, 2015 a.

PREFEITURA DA CIDADE DE SÃO PAULO. Lei n° 16.160. São Paulo, Secretaria do Governo Municipal de São Paulo, 2015b.

PREFEITURA MUNICIPAL DE CAXIAS DO SUL. Lei n° 6616. Rio Grande do Sul, 2006.

PROLAGOS. Estação de tratamento de Água de Reúso (ETAR). Disponível em:

<http://www.prolagos.com.br/estacao-de-tratamento-de-agua-de-reuso-etar/>

PRUDEN, A.; PEI, R.; STORTEBOOM, H.; CARLSON, K.H. *Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in Northern Colorado*. Environment Science Technology, v. 40, 2006, p. 7445–50.

RODRIGUES, R.S. *As dimensões legais e institucionais do reuso de água no Brasil: proposta de regulamentação do reuso no Brasil*. Universidade de São Paulo, 2005.

SANTOS, L.H.M.L.M.; ARAÚJO, A.N.; FACHINI, A.; PENA, A.; DELERUEMATOS, C.; SANTOS, L.H.; ARAÚJO, A.N.; FACHINI, A.; PENA, A.; DELERUE-MATOS, C.; MONTENEGRO, M.C. *Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment*. Journal of Hazardous Materials, v. 175, 2010, p. 45-95.

SANZ, L.A.; GAWLIK, B.M. *Water Reuse in Europe*. European Commission, 2014.

SCARPA, F.; MEGERSA, D. D.; KARIMI, S.; MELES, D. B. *Reuse of Water - Methods to diminish non-biodegradable organic compounds*. WWT Project Wort, KTH, 2011.

SCHWARTZ, J. *Water Flowing From Toilet to Tap May Be Hard to Swallow*. The New York Times, p. D1, 2015.

SOTO, A.M.; SONNENSCHNEIN, C. *Environmental causes of cancer: endocrine disruptors as carcinogens*. Nature Reviews. Endocrinology, v. 6, n. 7, 2010, p. 363–370.

TCHOBANOGLIOUS, G.; BURTON, F. L.; STENSEL, H. D. *Wastewater engineering: treatment and reuse*. 4.ed. Nova York, USA: McGraw-Hill Higher Education, 2003.

TESKE, S.S.; ARNOLD R.G. *Removal of natural and xeno-estrogens during conventional wastewater treatment*. Reviews in Environmental Science and Biotechnology, v. 7, n. 2, 2008, p.107-124.

TUNÍSIA. Standard for the use of treated wastewater in agriculture NT 106-109. Ministry of Agriculture, 1989.

TURQUIA. Water Pollution Control Regulations Ministry of Environment, 1991.

UEMATSU, R. *Policies and Regulatory Frameworks on Wastewater Management and Water Reuse in Japan*. Sewerage and Wastewater Management Department, Japan, 2015.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Guidelines for Water Reuse Washington U.S. Agency for International Development Washington, D.C., 1992.

VIRKUTYTE, J.; VARMA, R.S.; JEGATHEESAN, V. *Treatment of Micropollutants in Water and Wastewater*. IWA – The Internacional Water Association. 2010.

WESTERHOFF, G.P. *An update of research needs for water reuse*. In: WATER REUSE

SYMPOSIUM, 3° Proceedings. San Diego, California, 1984.

WHO - World Health Organization. Reuse of effluents: methods of wastewater treatment and health safeguards. Technical report series n° 517. Geneva, 1973.