

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Natasha Berendonk Handam

Qualidade Sanitária da Água de Reúso como Destino Sustentável para a Agricultura

Rio de Janeiro

2021

Natasha Berendonk Handam

Qualidade Sanitária da Água de Reúso como Destino Sustentável para a Agricultura

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de Concentração: Gestão e Saneamento Ambiental.

Orientadora: Prof.^a Dra. Adriana Sotero Martins.

Rio de Janeiro

2021

Título do trabalho em inglês: Sanitary Quality of Reused Water as a Sustainable Destination for Agriculture

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, bem como apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pela bolsa de Doutorado Nota 10.

Catálogo na fonte

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde

Biblioteca de Saúde Pública

H236q Handam, Natasha Berendonk.
Qualidade sanitária da água de reúso como destino sustentável para a agricultura / Natasha Berendonk Handam. -- 2021.
179 f. : il. color. ; graf. ; tab.

Orientador: Adriana Sotero Martins.
Tese (doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2021.

1. Uso de Águas Residuárias. 2. Agricultura. 3. Saúde Ambiental. 4. Agricultura Sustentável. 5. Poluentes Biológicos. 6. Qualidade da Água. I. Título.

CDD – 23.ed. – 628.3

Natasha Berendonk Handam

Qualidade Sanitária da Água de Reúso como Destino Sustentável para a Agricultura

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de Concentração: Gestão e Saneamento Ambiental.

Aprovada em: 30 de junho de 2021

Banca Examinadora

Prof.^a Dra. Elvira Carvajal

Universidade do Estado do Rio de Janeiro - Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes

Prof. Dr. José Augusto Albuquerque dos Santos

Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Oswaldo Cruz

Prof.^a Dra. Maria de Fátima Ramos Moreira

Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof.^a Dra. Maria José Salles

Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof.^a Dra. Adriana Sotero Martins (Orientadora)

Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Rio de Janeiro

2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me ajudado desde o processo de seleção para entrar no Doutorado até hoje. Nos momentos de dificuldades estava comigo, me ajudando com toda a sua paz e sabedoria. Sem ele eu não conseguiria chegar até aqui desta forma, com a certeza de que foi um doutorado maravilhoso, com tantas experiências boas e pessoas especiais que tive a oportunidade de conhecer. Se nada é impossível para Deus, se estamos com ele tudo é possível.

Agradeço a minha família pelo apoio e paciência, que esteve comigo nos momentos de dificuldade e de alegria, me ajudando sempre.

Agradeço ao meu marido João Claudio Vitoria Atico Leite, que me apoiou e me ajudou muito na minha Tese em todos os momentos. Foi fundamental e muito importante para mim.

Obrigada Dr^a. Adriana Sotero Martins por ter me ajudado sempre, você foi a melhor orientadora de Doutorado que eu poderia ter tido, aprendi muito com você, pois é uma profissional e pessoa exemplar.

Agradeço à Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (ENSP) pela oportunidade de fazer este Doutorado maravilhoso, com os melhores professores, cada um com grande conhecimento na área. Obrigada a todos os professores, vocês foram fundamentais para a minha formação. E à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil) pela Bolsa de Doutorado, assim como a FAPERJ (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro) pela bolsa de aluna nota 10, na qual fui contemplada.

Agradeço ao Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (LAPSA) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC); aos laboratórios do Departamento de Saúde e Saneamento Ambiental (DSSA), e ao Laboratório coordenado pela Adriana Regua-Mangia da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (ENSP) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ); ao Laboratório LEAS da UERJ coordenado pela Dr^a. Daniele Maia Bila; e ao Laboratório de Biotecnologia e Saúde Ambiental (BIOTECSA) do Departamento de Biologia Celular e Genética do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Agradeço aos profissionais e amigos da turma, pois foram muito importantes.

Obrigada às pessoas da equipe de trabalho que me ajudaram até o momento: Priscila

Gonçalves Moura, Felipe Nicolau Aranha, Thiago Almeida, George Ventura, Monica Teles.

Agradecimentos em especial para os estagiários voluntários Andrey Lima e Nathália Rose que me ajudaram no desenvolvimento da pesquisa em laboratório.

Agradeço aos alunos PIBICs Ana Beatriz Loureiro Gonçalves da Silva e Rodrigo Bezerra da Silva, que tive a oportunidade de ser coorientadora, e que me ajudaram muito na construção e apoio da pesquisa de doutorado. Eu ensinei e aprendi com eles. Muito obrigada a minha orientadora Adriana Sotero-Martins por ter me dado a oportunidade de aprender e ser uma orientadora também, aprendi muito sobre as dificuldades e benefícios.

RESUMO

A água de reúso definida como a reutilização de águas provenientes de efluentes tratados, pode ser uma fonte alternativa de água para agricultura, porém é importante a avaliação da sua qualidade sanitária para não causar agravos a saúde ambiental e humana. O objetivo foi avaliar a qualidade sanitária da água de reúso de diferentes origens para uso na agricultura com finalidade de emprego sustentável da água. Foram coletadas amostras de água de reúso de diferentes tipos de tratamento, denominadas no trabalho como “clorada, polida e biológica”. Foram realizadas análises bacteriológicas e físico-químicas da água de reúso, e do solo. Em sistema construído em laboratório foram cultivados *Petroselinum crispum*, regados por gotejamento com água de reúso e água potável. Foram feitas extrações de DNA total para verificação da quantidade de microbiota no solo durante os cultivos. Foi realizada Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), para busca no solo dos cultivos, dos bioindicadores de contaminação fecal *Escherichia coli*, Adenovírus sorotipos 40 e 41 e *Methanobrevibacter smithii*. Foi avaliado o desenvolvimento da planta como bioindicadora indireta de nutrientes no solo. Foi analisado o decaimento de *E. coli* e *Salmonella* spp. no solo com cultivo de *P. crispum* e solo nu, irrigados com águas de reúso e potável (controle). Análises de substâncias com atividade estrogênica foram feitas nas amostras de águas de reúso, por meio do ensaio YES (*Yeast Estrogen Screen*). As análises bacteriológicas e físico-químicas mostraram que apenas a água de reúso “polida” estava própria para reúso agrícola, segundo normativas nacionais e internacional. As quantificações de DNA indicaram que as amostras de água de reúso contribuíram para aumento de 1,6 vezes na quantidade de microbiota do solo, enquanto que os irrigados com água potável tiveram diminuição de 3,8 vezes. A água de reúso auxiliou para o maior desenvolvimento dos cultivos. A PCR mostrou que as amostras de água de reúso alteraram a microbiota do solo, pois ficaram retidos durante os cultivos, os microrganismos presentes nas águas de reúso, Adenovírus tipo 40 e 41 e *E. coli*. O decaimento de *Salmonella* spp. nos cultivos irrigados com água de reúso foi mais lento, em comparação com o grupo controle. A amostra “biológica” apresentou substâncias com atividade estrogênica na concentração de 115 ng L⁻¹. O estudo demonstrou que, se a água de reúso estiver dentro dos padrões de qualidade sanitária, se for feita irrigação por gotejamento, e com um tempo de parada entre irrigação e colheita das culturas, esta representa uma fonte de água segura e sustentável para irrigação da agricultura. Para isso é fundamental a criação de lei federal de reúso agrícola, a fim de evitar danos à saúde humana e ambiental.

Palavras-chave: Água de Reúso, Agricultura, Reúso Agrícola, Saúde Ambiental, Solo.

ABSTRACT

Water reuse, defined as the reuse of water from treated effluents, can be an alternative source of water for agriculture. However, the evaluation of its quality is important in order not to cause damage to human and environmental health. The objective of the study was to evaluate the sanitary quality of water reuse from different sources for use in agriculture for the purpose of sustainable use of water. Samples of water reuse were collected from different types of treatment, being named in the present work as "chlorinated", "polished" and "biological". Bacteriological and physical-chemical analyzes of the water reuse and of the soil were carried out. Analyzes of substances with estrogenic activity were made in the samples of water reuse, through the YES test (*Yeast Estrogen Screen*). In a laboratory-built system, plants of the species *Petroselinum crispum* were grown, dripped with water reuse and drinking water. Total DNA extractions were carried out to check the amount of microbiota in the soil during cultivation. Polymerase Chain Reaction (PCR) was carried out to search for the fecal contamination bioindicators *Escherichia coli*, Adenovirus serotypes 40 and 41 and *Methanobrevibacter smithii* in the soil of the crops. The development of the plant as an indirect bioindicator of nutrients in the soil was evaluated. The decay of *E. coli* and *Salmonella* spp. in soil with *P. crispum* cultivation and in bare soil, irrigated with water reuse and drinking water (control). Bacteriological and physical-chemical analyzes showed that only "polished" water reuse was suitable for agricultural reuse, according to national and international regulations. The "biological" sample presented substances with estrogenic activity at a concentration of 115 ng L⁻¹. DNA quantifications indicated that the water reuse samples contributed to a 1.6-fold increase in the amount of soil microbiota. Those irrigated with drinking water had a decrease of 3.8 times. The water reuse helped to further develop the crops. The PCR showed that the samples of water reuse altered the soil microbiota, because the microorganisms (Adenovirus types 40 and 41 and *E. coli*) present in the water reuse were retained during cultivation. The decay of *Salmonella* spp. in crops irrigated with water reuse it was slower compared to the control group. The study demonstrated that, if the water reuse is within the sanitary quality standards, if drip irrigation is done, and with a stop time between irrigation and crop harvesting, this represents a safe and sustainable source of water for irrigation of the agriculture. To this end, it is essential to create a federal law on agricultural reuse, in order to avoid damage to human and environmental health.

Keywords: Water Reuse, Agriculture, Agricultural Reuse, Environmental Health, Soil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Classificações de água de reúso e principais aplicações.....	27
Figura 2 -	Ilustração do momento da coleta de uma amostra de água de reúso.....	63
Figura 3 -	Diluições das amostras de água de reúso para análise bacteriológica.....	64
Figura 4 -	Equipamentos para a realização da análise bacteriológica: membrana quadriculada, meio de cultura, copo para sistema de filtração, e bomba a vácuo.....	65
Figura 5 -	Membrana quadriculada com colônias de <i>Escherichia coli</i> com coloração azul/violeta, os coliformes totais com coloração salmão/avermelhado.....	65
Figura 6 -	Diluição em série do solo para análise bacteriológica.....	69
Figura 7 -	Ilustrações de métodos físico-químicos realizados para solo.....	70
Figura 8 -	Dimensão do sistema elaborado para o desenvolvimento dos ensaios de cultura de plantas controlada em bancada de laboratório.....	73
Figura 9 -	Etapas para extração de DNA das amostras de água de rega.....	76
Figura 10 -	Padrões de bandas produzidos nas Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) nas amostras de água de reúso “biológica, clorada e polida” (MOURA, 2019), que foram utilizadas para comparação com os resultados de PCR das amostras de água de rega nos ensaios de cultivo do presente trabalho.....	77
Figura 11 -	Programação no Termociclador VERITI Applied Biosystems, otimizada, em gradiente, dos ciclos de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).....	81
Figura 12 -	Eletroforese em géis de agarose 2%, e visualização por meio de exposição à luz ultravioleta.....	82
Figura 13 -	Medição da altura média por cm da planta.....	83
Figura 14 -	Meios de cultura para análise de decaimento de <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella</i> spp. nos cultivos irrigados com água de reúso “clorada” e água potável.....	86
Figura 15 -	Instrumento liofilizador para realização do método de concentração de amostras de água por Liofilização.....	89
Figura 16 -	Instrumento SpeedVac utilizado para realização do método de concentração de amostras de água por centrifugação a vácuo.....	91

Figura 17 -	Instrumentos para o método de concentração de amostras de água em Extração por Fase Sólida.....	92
Figura 18 -	Realização no laboratório do ensaio YES.....	92
Figura 19 -	Esquema do sistema de expressão do bioindicador (levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> geneticamente modificada) para substâncias com atividade estrogênica.....	94
Figura 20 -	Placa de ensaio mostrando atividade estrogênica na amostra de água de reúso nos poços com coloração rosa/vermelho.....	96
Figura 21 -	(A) Estrutura construída para realização do experimento simulando o cultivo de plantas irrigadas com água de reúso em laboratório; (B) Posição do gotejamento de água diretamente para o solo através da torneira; (C) Temporizador digital para controlar a iluminação.....	112
Figura 22 -	Resultados da PCR dos bioindicadores de contaminação <i>Escherichia coli</i> (600 pb) e Adenovírus tipo 40 e 41 (137 pb) das amostras de água de rega dos três cultivos irrigados com água de reúso “clorada, polida e biológica”.....	116
Figura 23 -	Resultados da PCR do bioindicador de contaminação <i>Methanobrevibacter smithii</i> (221 pb) das amostras de água de rega dos três cultivos irrigados com água de reúso “clorada, polida e biológica”.....	116
Figura 24 -	Placa de ensaio da análise Yes da amostra de água de reúso “polida”.....	127
Figura 25 -	Placa de ensaio da análise Yes da amostra de água de reúso “Clorada”.....	128
Figura 26 -	Placa de ensaio da análise Yes da amostra de água de reúso “Biológica”..	129
Figura 27 -	Medidor de pH.....	174

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Níveis de contaminação por coliformes termotolerantes (UFC/mL) nas amostras de água de reúso de diferentes procedências do Brasil.....	101
Gráfico 2 -	Valores médios da concentração de DNA (ng/μL) de amostras de “água de rega” de solos irrigados com água de reúso “Clorada”, e com água potável (controle), no primeiro dia e depois de 15 dias de experimento.....	114
Gráfico 3 -	Valores médios da concentração de DNA (ng/μL) de amostras de “água de rega” de solos irrigados com água de reúso “Polido”, e com água potável (controle), no primeiro dia e depois de 15 dias de experimento.....	114
Gráfico 4 -	Valores médios da concentração de DNA (ng/μL) de amostras de “água de rega” de solos irrigados com água de reúso “Biológica”, e com água potável (controle), no primeiro dia e depois de 15 dias de experimento.....	115
Gráfico 5 -	Análise de decaimento de (A) <i>Escherichia coli</i> (UFC/mL) e (B) <i>Salmonella</i> spp. nos cultivos de planta com suplementação artificial de <i>E. coli</i> e <i>Salmonella</i> spp., irrigados com água de reúso e com água potável (controle). Região de corte do gráfico B entre 20 a 25.....	121
Gráfico 6 -	Análise de decaimento de (A) <i>Escherichia coli</i> (UFC/mL) e (B) <i>Salmonella</i> spp. nos cultivos de planta, sem suplementação, irrigados com água de reúso e com água potável (controle). Região de corte do gráfico B entre 20 a 25.....	121
Gráfico 7 -	Análise de decaimento de (A) <i>Escherichia coli</i> (UFC/mL) e (B) <i>Salmonella</i> spp. nos vasos com apenas solo, com suplementação artificial de <i>E. coli</i> e <i>Salmonella</i> spp., irrigados com água de reúso e com água potável (controle). Região de corte do gráfico B entre 14 a 20.....	123
Gráfico 8 -	Análise de decaimento de (A) <i>Escherichia coli</i> (UFC/mL) e (B) <i>Salmonella</i> spp. (UFC/mL) nos vasos com apenas solo, sem suplementação, irrigados com água de reúso e com água potável (controle). Região de corte do gráfico B entre 5 a 8.....	124
Gráfico 9 -	Curvas dose-resposta no ensaio YES de amostra de água de reúso “Polido”, concentradas por centrifugação a vácuo (SV) e por liofilização (Liof.), 17β-estradiol (controle positivo), e o controle negativo (Branco)..	127

Gráfico 10 -	Curvas dose-resposta no ensaio YES de amostra de água de reúso “Biológica”, concentradas por centrifugação a vácuo (SV) e por liofilização (Liof.), 17 β -estradiol (controle positivo), e o controle negativo (Branco).....	128
Gráfico 11 -	Curvas dose-resposta no ensaio YES de amostra de água de reúso “Clorada”, concentradas por centrifugação a vácuo (SV) e por liofilização (Liof.), 17 β -estradiol (controle positivo), e o controle negativo (Branco).....	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Doenças relacionadas com o saneamento inadequado (DRSAIs) que podem afetar humanos veiculadas pela água de reúso contaminada, dependendo da origem e da forma de tratamento para a produção de água de reúso.....	45
Tabela 2 -	Doenças e/ou agravos que podem afetar a saúde humana e ambiental, veiculadas pela água de reúso poluída por agentes químicos.....	51
Tabela 3 -	Iniciadores (<i>primers</i>) que serão utilizados para amplificação dos genes de DNA específicos para <i>Methanobrevibacter smithii</i> , e <i>Escherichia coli</i> e Adenovírus.....	78
Tabela 4 -	Protocolos das Reações de PCR do estudo para cada microrganismo alvo <i>Methanobrevibacter smithii</i> , e <i>Escherichia coli</i> e Adenovírus.....	79
Tabela 5 -	Programação no Termociclador otimizada, em gradiente, dos ciclos de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para os microrganismos alvos <i>Methanobrevibacter smithii</i> , e <i>Escherichia coli</i> e Adenovírus.....	80
Tabela 6 -	Concentrações finais da curva padrão de 17 β -estradiol em cada poço na microplaca de diluição.....	95
Tabela 7 -	Resultados físico-químicos das amostras de água de reúso e os padrões de qualidade sanitária de acordo com as normativas brasileiras.....	105
Tabela 8 -	Valores máximos permitidos dos parâmetros físico-químicos das normativas brasileiras sobre reúso agrícola em comparação com as normas dos EUA.....	108
Tabela 9 -	Resultados das análises bacteriológicas do Solo utilizado no estudo e valores máximos permitidos (VMP) pela lei. Média e desvio padrão.....	110
Tabela 10 -	Resultados das análises físico químicas do solo e seus valores de qualidade recomendados. Valores de qualidade (VQ).....	111
Tabela 11 -	Notas atribuídas às plantas irrigadas com água de reúso e regadas com água potável. Os vasos 1, 2 e 3 foram triplicatas de cada condição experimental.....	120
Tabela 12 -	Percentual que cada método de concentração conseguiu recuperar de equivalente de estradiol (EQ-E2), que foi inserido nas alíquotas das	

amostras dopadas (concentração final 2.000 ng L⁻¹ de E2), e desvio
padrão (DP) dos resultados..... 132

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BIOTECSA	Laboratório de Biotecnologia e Saúde Ambiental
C	Citosina
CaCO ₃	Carbonato de cálcio
CDPH	California Department of Public Health
CEDAE	Companhia Estadual de Águas e Esgotos do Rio de Janeiro
CPRG	Substrato cromogênico clorofenol vermelho-β-D-galactopiranosida
CPR	Clorofenol vermelho
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
COEMA	Conselho Estadual do Meio Ambiente
cmol _c	Centimol de carga
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CNRH	Conselho Nacional de Recursos Hídricos
CONERH	Conselho Estadual de Recursos Hídricos
CT	Coliformes Totais
°C	Graus célsius
dag/Kg	Decagrama por kilograma
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DBO	Demanda biológica de oxigênio
DESMA	Departamento de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente
DQO	Demanda Química de oxigênio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSSA	Departamento de Saúde e Saneamento Ambiental
E1	Estrona
E2	17β-estradiol
EE2	17α-etinilestradiol
EC	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Sal Dissódico de Etilenodiamina Tetracético
ENSP	Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

EPA	U.S. Environmental Protection Agency
ETA	Estação de Tratamento de Água
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
ETAR	Estação de Tratamento de Água de Reúso
FAPERJ	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
Fe ₂ (SO ₄) ₃	Sulfato de ferro
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FUNCAP	Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico
G	Guanina
g	Gramas
GPS	Aparelho de Georreferenciamento
HCl	Ácido clorídrico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
KOH	Hidróxido de Potássio
LAPSA	Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental
LED	<i>Light Emitting Diode</i>
LES	Laboratório de Engenharia Sanitária
mL	Mililitros
mg/L SO ₄	Miligramas por Litro de sulfato
mg/L Cl	Miligramas por Litro de Cloro
mg/L Cl ⁻	Miligramas por Litro de Cloreto
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
MS	Ministério da Saúde
NaCl	Cloreto de sódio
NBR	Norma técnica brasileira
NMP	Número Mais Provável
(NH ₄) ₂ SO ₄	sulfato de amônio
ODS	Objetivos do desenvolvimento sustentável
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas

pB	Pares de base
PCBs	Bifenilos policlorados
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pH	Potencial de hidrogênio
PVC	Policloreto de vinila
REh	Receptor de estrogênio humano
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
STD	Sólidos Totais Dissolvidos
T	Timina
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TDAH	Atenção transtorno do déficit de hiperatividade
TEA	Transtorno do espectro do autismo
U	Uracila
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFC/g	Unidade Formadora de Colônia por gramas
UFC/mL	Unidade formadora de colônia por mililitros
uT	Unidade de Turbidez
UV	Luz ultravioleta
μL	Microlitro
μm	Micrômetros
μS/cm	MicroSiemens por centímetros
VMP	Valores Máximos Permitidos
X	Veze concentrado
YES	<i>Yeast Estrogen Screen</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1	ESCASSEZ HÍDRICA E SEU IMPACTO SOCIAL.....	21
2.2	CONSUMO DE ÁGUA NA AGRICULTURA NO BRASIL E NO MUNDO.....	23
2.3	ÁGUA DE REÚSO.....	25
2.3.1	Conceito de Água de Reúso	25
2.3.2	Importância da Utilização da Água de Reúso	30
2.3.3	Reúso Agrícola	33
2.4	NORMATIZAÇÕES SOBRE A QUALIDADE SANITÁRIA DA ÁGUA DE REÚSO PARA FINS AGRÍCOLAS.....	36
2.4.1	Normatizações Brasileiras	36
2.4.2	Normatizações Internacionais	41
2.5	DOENÇAS E AGRAVOS POR EXPOSIÇÃO À ÁGUA DE REÚSO CONTAMINADA.....	43
2.5.1	Contaminantes Biológicos	43
2.5.1.1	Marcadores Moleculares Indicadores de Contaminação Fecal.....	45
2.5.2	Poluentes Químicos	47
2.6	PROCESSOS DE TRATAMENTO PARA A PRODUÇÃO DE ÁGUA DE REÚSO NO BRASIL E NO MUNDO.....	51
2.7	CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DO SOLO PARA USO NA AGRICULTURA.....	54
3	JUSTIFICATIVA	58
4	PERGUNTA DA PESQUISA	59
5	OBJETIVOS	60
5.1	OBJETIVO GERAL.....	60
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	60
6	METODOLOGIA	61
6.1	FLUXOGRAMA DAS ETAPAS REALIZADAS DURANTE A METODOLOGIA DO ESTUDO.....	61
6.2	COLETA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA DE REÚSO, DE ÁGUA POTÁVEL E DO SOLO UTILIZADO NOS ENSAIOS.....	61
6.3	PROCESSAMENTO LABORATORIAL PARA ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DE ÁGUA DE	

	REÚSO.....	63
6.3.1	Procedimentos para Análises Bacteriológicas das Amostras de Água de Reúso.....	64
6.3.2	Procedimentos para Análises dos Parâmetros Físico-Químicos das amostras de Água de Reúso.....	66
6.3.3	Processo de Avaliação da Qualidade Sanitária da Água de Reúso para Agricultura de acordo com Normatizações Brasileiras e Internacional.....	67
6.4	PROCESSAMENTO LABORATORIAL PARA ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DO SOLO UTILIZADO NO ESTUDO.....	69
6.5	PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISES DO EFEITO DA IRRIGAÇÃO COM ÁGUA DE REÚSO EM SOLO DE CULTIVO.....	71
6.5.1	Cultivo de Plantas em Laboratório.....	71
6.6	PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISES DE CONTAMINANTES NA ÁGUA DE REÚSO E AVALIAÇÃO INDIRETA DOS EFEITOS NA MICROBIOTA DO SOLO.....	75
6.7	PROCESSOS PARA AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DA PLANTA...	82
6.8	PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE DE DECAIMENTO DE PATÓGENOS NO SOLO AO LONGO DO TEMPO DEVIDO A UTILIZAÇÃO DE ÁGUA DE REÚSO.....	84
6.9	PROCESSOS PARA AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE POLUENTES NA ÁGUA DE REÚSO.....	87
6.9.1	Processos de Concentração de Substâncias com Atividade Estrogênica na água de reúso.....	87
6.9.1.1	Liofilização.....	88
6.9.1.2	Centrifugação a vácuo (Speed-vacuum).....	89
6.9.1.3	Extração por Fase Sólida (EFS).....	91
6.9.2	Ensaio <i>in vitro</i> YES (Yeast Estrogen Screen).....	92
6.9.2.1	Preparo das Soluções do Ensaio YES.....	97
6.9.2.2	Processos para Análise dos resultados do ensaio YES.....	98
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	100
7.1	ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DE ÁGUA DE REÚSO E DO SOLO.....	100
7.1.1	Caracterização Colimétrica e Físico-Químicos dos Diferentes Tipos de Amostras de Água de Reúso.....	100
7.1.2	Caracterização Colimétrica e Físico-Química do Solo utilizado nos	109

	ensaios.....	
7.2	ANÁLISES DA PRESENÇA DE CONTAMINANTES NA ÁGUA DE REÚSO E AVALIAÇÃO INDIRETA DOS EFEITOS NA MICROBIOTA DO SOLO.....	111
7.3	AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DA PLANTA IRRIGADAS COM ÁGUA DE REÚSO (INDICADOR INDIRETO DOS BENEFÍCIOS DO USO DE ÁGUA DE REÚSO).....	119
7.4	ANÁLISE DE DECAIMENTO DE PATÓGENOS AO LONGO DO TEMPO NO SOLO.....	120
7.5	RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE POLUENTES NA ÁGUA DE REÚSO.....	126
8	CONCLUSÕES.....	134
9	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	137
	REFERÊNCIAS.....	138
	APÊNDICE A – MÉTODOS PARA ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO SOLO.....	167
	APÊNDICE B - PROTOCOLO DA EXTRAÇÃO DE DNA COM O KIT POWERWATER STERIVEX MODIFICADO PARA AS AMOSTRAS (REGA DE SOLO).....	174
	APÊNDICE C – Atividades e participações em eventos científicos.....	176
	APÊNDICE D - Artigos científicos publicados.....	177
	Artigo - Estrogenic activity in reused water: comparison of concentration methods. DOI: 10.15406/ijh.2021.05.00274	
	Artigo - Agricultural reuse: comparison between Brazilian and international quality standards. DOI: 10.15406/ijh.2021.05.00262	
	Artigo - Água de reúso: uma alternativa sustentável para o Brasil. DOI: https://doi.org/10.1590/S1413-4152202020180201	
	Artigo - Quality of raw water in the Guandu Basin of the Rio de Janeiro state during water crisis of 2020. DOI: http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.2703	

1 INTRODUÇÃO

Em meio à escassez de água doce para abastecimento da população em diversas regiões do mundo e no Brasil, a água de reúso vem sendo estudada e utilizada como uma fonte alternativa de água para irrigação na agricultura (MORAIS et al., 2016). A água de reúso é definida como a reutilização de águas provenientes de efluentes tratados (MORAIS et al., 2016), e pode ser classificada de acordo com a sua origem, como reúso local ou interno - proveniente de águas cinzas a partir de residências e novos empreendimentos; e reúso externo - proveniente de águas negras (esgoto bruto) de estações tratamento de esgoto e que passam na sequência por estações de tratamento de água de reúso (ETE+ETAR) (Moura et al., 2020). A água de reúso é um recurso bastante utilizado na agricultura, porém é fundamental a realização de estudos que verifiquem quanto o seu uso altera as características originais do solo, alterando o meio ambiente ou mesmo oferecendo riscos na rega de cultivos, ou seja, quais parâmetros de qualidade sanitária poderiam ser verificados para que a utilização deste recurso seja segura para a saúde humana e ambiental.

A agricultura é a atividade que mais consome água doce no mundo e no Brasil, cerca de 70% (FAO, 2018), e devido à escassez das fontes hídricas para esta atividade em diversas regiões, a água de reúso se torna uma alternativa para enfrentamento desse problema (URKIAGA et al., 2008). A irrigação da agricultura, geralmente, não permite o reaproveitamento direto da água utilizada nas culturas, pois é evapotranspirada pelas plantas e transformada em vapor d'água na atmosfera, e também parte da água se infiltra no solo chegando na camada subterrânea no lençol freático (CUBA et al., 2015).

A utilização de água de reúso na agricultura pode trazer benefícios como nutrientes e água, favorecendo o crescimento de plantas e reduzindo o uso de fertilizantes artificiais (EPA, 2012). A irrigação com água de reúso pode ser uma forma de fertirrigação natural, proveniente de nutrientes, como nitrogênio, potássio e fósforo, fundamentais no cultivo em solos pobres (OTENIO, 2015). Além disso, pode diminuir a pressão da demanda de água sobre os mananciais, e reduzir a quantidade de esgotos lançados nos rios (MANCUSO e SANTOS, 2013).

No entanto, a água de reúso deve ser bem gerenciada e com qualidade sanitária adequada, para que não ofereça riscos à saúde humana e ambiental (WHO, 2006). Visto que dependendo da origem e do tratamento empregado para a produção da água de reúso, pode ou não ser segura para a saúde humana e ambiental. E pode conter poluentes e contaminantes,

tais como produtos químicos e microrganismos, que podem causar agravos à saúde ambiental (MOURA et al, 2020). Além disso, a transmissão de doenças pode ser diminuída e controlada por fatores agronômicos como prática de irrigação utilizada, como por gotejamento, práticas de cultura e de colheita (MORAIS et al., 2016).

No Brasil existe uma legislação federal sobre água de reúso para agricultura, que é a Resolução CNRH nº 121 de 2010, no entanto, esta não estabelece parâmetros para avaliação da qualidade sanitária para o reúso agrícola. Existem padrões de qualidade em normatizações como a Norma técnica da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), nº 13.969/97 (ABNT, 1997), que traz poucos padrões, e não é específica sobre água de reúso. Ademais, existem normatizações pontuais de alguns estados brasileiros que possuem parâmetros de qualidade sanitária para reúso agrícola. Internacionalmente, existem normatizações como nos Estados Unidos da América o “*Guidelines for Water Reuse*” da *U.S. Environmental Protection Agency* (EPA) de 2012, que trata de forma mais completa sobre água de reúso, com parâmetros físico-químicos e biológicos, baseados em estudos científicos, de modo que esta água se torne mais segura para aqueles que a utilizam.

A busca por fontes alternativas de água para a agricultura torna a utilização da água de reúso um recurso importante para atingir a sustentabilidade. Com isto, o estudo teve como objetivo avaliar a qualidade sanitária da água de reúso de diferentes origens para uso na agricultura com finalidade de emprego sustentável da água.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESCASSEZ HÍDRICA E SEU IMPACTO SOCIAL

A água é um recurso natural finito, e a água doce com qualidade sanitária está cada vez mais escassa para atender a demanda crescente para a população. A escassez de água tem aumentado em diversos países, assim como no Brasil, especificamente, nas regiões nordeste e mais recentemente na região sudeste (HANDAM, 2016).

Até 2030, cerca de 2 bilhões de pessoas no mundo viverão em regiões com absoluta escassez (ONU, 2015). No Brasil existe irregularidade de distribuição da disponibilidade hídrica, por conta dos contextos geográficos. Enquanto que nas regiões Norte e Centro-Oeste se encontram 89% dos recursos hídricos, ao mesmo tempo é onde possui 13% da população brasileira. Nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul onde se encontram 9% dos recursos hídricos, se concentram mais de 85% da população e é onde possui as maiores atividades industriais no Brasil. As condições mais precárias da qualidade sanitária e da falta de água ocorrem na região nordeste, em seguida a região norte, que é a única que aparece com uma situação confortável, abastecida pelas chuvas da Amazônia e de seus grandes rios (ANA, 2017).

Em diversas áreas do mundo a disponibilidade de água doce excede a demanda humana, principalmente nas semiáridas ou áridas. Contudo existem locais onde ocorrem altos índices de precipitações pluviométricas, por conta do próprio ambiente e condições geográficas, no entanto em outras ocorre baixos níveis de chuvas (MANCUSO e SANTOS, 2013).

Em relatório produzido pelo Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (2019), estudo entre os anos de 2000 e 2017, demonstrou que cerca de 2,2 bilhões de pessoas no mundo têm acesso a água potável, 3 bilhões não possuem instalações básicas para a higienização pessoal, e 4,2 bilhões de pessoas não têm serviços de saneamento adequado. Os casos de precariedade no saneamento atingem especialmente as pessoas em situação de pobreza, e os avanços são lentos para estas regiões (WHO, 2014).

A escassez de água, segundo a Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável do Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento, acomete mais de 40% da população no mundo, e deverá aumentar por conta das mudanças climáticas e da falta de gestão

adequada da água. Um dos objetivos do desenvolvimento sustentável (ODS) é o 6 – Água Potável e Saneamento, para assegurar a disponibilidade e a gestão sustentável da água e saneamento para todos. É possível atingir este objetivo, por meio da cooperação internacional, proteção às nascentes, rios e bacias e compartilhamento de tecnologias de tratamento de água (PALMA, 2017). Em meio à escassez de água para o consumo humano, a seca em diferentes regiões, a desigualdade no acesso à água com qualidade sanitária em diversas regiões do mundo, a água de reúso vem sendo estudada como uma fonte alternativa e sustentável para a sociedade.

A desigualdade na distribuição de água tanto em quantidade quanto em qualidade sanitária acometem, principalmente, as regiões urbanas e rurais de baixa renda socioeconômica (CUNHA et al., 2012). A diminuição da qualidade e da quantidade da água doce se deve a má gestão dos recursos hídricos por conta de ações antrópicas como, por exemplo, o lançamento de esgotos domésticos e industriais sem tratamento nos mananciais (HANDAM, 2016). O despejo de resíduos sem tratamento adequado acaba alterando a dinâmica dos ecossistemas, e traz sérios riscos à saúde pública como organismos patogênicos, que podem transmitir doenças (REGO, 2010; SOTERO-MARTINS et al, 2014). A falta de água também é causada pelos desmatamentos do entorno dos mananciais, pois as vegetações e florestas são fundamentais para a manutenção das nascentes. Quando chove a água vai escoar pela superfície, assim como vai se infiltrar no subsolo, porém quanto mais vegetação melhor é a infiltração de água nos mananciais (MMA, 2016).

Em 2010 a legislação da Assembleia Geral da Organização das Nações Unidas, Resolução A/RES/64/292 (UNGA, 2010), reconheceu e determinou formalmente que a água e também o esgotamento sanitário são um direito a todas as populações humanas. Após este marco, todas as cidades devem proporcionar e garantir o abastecimento de água e o esgotamento sanitário às residências (NEVES-SILVA e HELLER, 2016). A água é considerada um direito humano fundamental e se torna mais relevante nos contextos onde a água é escassa, e se constitui fonte de disputas que ocorrem em regiões do mundo e no Brasil, principalmente no Semiárido (CAMPOS et al., 2013).

A água é utilizada das formas mais variadas, dentre as quais podemos destacar o abastecimento de água residencial e industrial, a geração de energia, a irrigação, a harmonia paisagística, a dessedentação de animais, a preservação da fauna e da flora, recreação e a diluição (VON SPERLING, 2005). Dentre estas formas, a agricultura é a responsável por cerca de 70% do consumo global de água (FAO, 2018).

Consequências da crise hídrica não afetam só o abastecimento, mas também a economia, a produção de energia, a produção de alimentos, as indústrias que utilizam a água como insumo, assim como a saúde humana. A qualidade sanitária da água se altera consideravelmente em níveis mais baixos (TUNDISI, 2015).

O uso de água limpa é fundamental para a higiene pessoal, cultivo, limpeza e preparação de alimentos, além, obviamente, da hidratação. Portanto, a situação crítica da água afeta diretamente a nutrição e tem sido um problema delicado, especialmente entre as crianças (WHO, 2014).

A falta de água causa diversos impactos negativos, como doenças, e aumentam os gastos públicos e privados em saúde para tratamento de doenças, sobrecarregando o Sistema Único de Saúde (SUS). Estas doenças são uma das principais causas de óbitos, que poderiam ser evitados (SIQUEIRA et al., 2017). O SUS possui fundamental importância no saneamento e saúde ambiental, pois além de outras atribuições, ao SUS compete a formulação de políticas e execução das ações de saneamento básico (BRASIL, 1988), o que demonstra também as interrelações entre a saúde pública e meio ambiente para a saúde da população.

2.2 CONSUMO DE ÁGUA NA AGRICULTURA NO BRASIL E NO MUNDO

De acordo com a *Food and Agriculture Organization* (FAO), da Organização das Nações Unidas (ONU) (FAO, 2018), a irrigação é maior responsável pelo consumo de água doce no Brasil e no Mundo, aproximadamente, 70%. Verifica-se também que no Brasil, ao longo dos anos, ocorreu um aumento de 32% de irrigação na agricultura em comparação ao ano de 2006 (ANA, 2013). No Mundo, o consumo de água para a irrigação equivale a um sexto dos solos agricultáveis (THEIVEYANATHANA et al., 2004).

A agricultura constitui uma atividade que possui técnicas aplicadas no solo com a finalidade de realizar um plantio viável. Há vários fatores vinculados a produção agrícola, como o clima, o solo e a ação humana. A escassez ou o excesso de chuva, e outras variações climáticas, tem efeito direto sobre o plantio. O desenvolvimento da agricultura pode ser voltado para a subsistência local ou para a venda em mercados internos e internacionais (MACEDO, 2015).

Visando conseguir índices de produtividade maiores, a agricultura irrigada vem se destacando como uma tecnologia necessária. Entretanto, deve-se buscar o uso sustentável e

racional da água, devido ao fato desta atividade representar o maior consumo dentre todos os setores produtivos (SILVA, 2018).

Atualmente, a agricultura não se remete mais somente ao aumento da produção através da expansão de terra cultivada. Há a necessidade especial de uma reformulação na gestão dos recursos hídricos. Sem essa mudança, a sustentabilidade da produção de alimentos não poderá ser mantida devido à grande dependência de água para a irrigação (MELO, 2010).

No entanto, apesar do alto consumo de água na agricultura, por se tratar de um uso consuntivo, onde a água utilizada na irrigação é evapotranspirada pelas plantas e depois incorporada ao vapor d'água da atmosfera, esta água não pode ser reaproveitada diretamente pelo homem (CUBA et al., 2015).

Nos dias atuais, há um efeito direto da falta de água sobre as atividades agrícolas, tendo reflexos diretos na economia e no acesso aos alimentos. É importante salientar que a água não é utilizada somente na irrigação, mas também para produzir e higienizar os alimentos (EUFIC, 2015). Devido a escassez de água em consequência da crise hídrica, se observa vários efeitos diretos sobre a produção agrícola, tais como a redução das safras e da qualidade dos produtos bem como impacto sobre a redução da higienização e conservação das colheitas. Desta maneira, diversas doenças podem ser transmitidas em qualquer lugar do mundo pela contaminação dos alimentos, se constituindo um grave problema. Tais doenças são ocasionadas geralmente por bactérias, vírus, protozoários ou toxinas. Dentre outras maneiras, uma forma de evitar estas consequências tão prejudiciais é o planejamento e o gerenciamento da água, assim como a utilização de técnicas de irrigação, com o objetivo também de economizar água nas plantações (MACEDO, 2015).

A irrigação é uma técnica muito antiga e se baseia na aplicação de água nos plantios. Tem como finalidade o fornecimento de água em quantidade necessária para o plantio e colheita da cultura. Com o objetivo de verificar o método mais oportuno a cada condição em particular, os sistemas de irrigação devem ser observados frente ao solo e aos produtos cultivados. A irrigação vem sendo uma importante alternativa para atenuar a crise hídrica como pode ser analisada na região nordeste do Brasil (SUASSUNA, 1994).

Uma das formas de irrigação utilizadas é a irrigação por gotejamento, que se caracteriza pela disposição de tubos com pequenos diâmetros com furos, ou dispositivos que permitem o gotejamento uniforme, ao longo de toda a extensão. Dentre as vantagens desta forma de irrigação é permitir a rega próxima ao solo, deixando a água disponível ao sistema radicular das plantas; e redução no consumo de água de irrigação. Entretanto possui a

desvantagem de ocorrer entupimentos dos orifícios por onde sai a água no sistema de gotejamento (MANCUSO e SANTOS, 2013).

2.3 ÁGUA DE REÚSO

2.3.1 Conceito de Água de Reúso

O conceito de água de reúso tem sido bastante discutido na literatura científica, porém existe discrepância, o que provoca dificuldade no entendimento da definição do termo.

A definição de água de reúso tem sido confundido com o conceito de aproveitamento de água de chuva, esse último é um instrumento importante na gestão de recursos hídricos, mas não deve ser considerado dentro do conceito de água de reúso, pois após passar pelo ciclo hidrológico natural, esta água captada terá sua primeira utilização (FIORI; FERNANDES; PIZZO, 2005).

A água de reúso é definida como o aproveitamento das águas anteriormente utilizadas, uma ou mais vezes, para atender atividades humanas, no seu uso original ou em outras demandas de uso (LAVRADOR FILHO, 1987).

A água de reúso pode ser entendida também de forma mais simplificada, como a reutilização de águas, estas provenientes de efluentes tratados (MORAIS et al., 2016).

São considerados efluentes as águas cinzas e águas negras. As águas cinzas são os esgotos oriundos dos chuveiros, lavatórios, tanques e máquinas de lavar roupa (FIORI; FERNANDES; PIZZO, 2005). Enquanto que as águas negras são os esgotos provenientes dos vasos sanitários, que possuem principalmente fezes e urina (GONÇALVES, 2009; AL-HAMAIEDEH, 2010; GHUNMI et al., 2011).

Para a produção de água de reúso, um dos exemplos pode ser aquela resultante do tratamento do esgoto doméstico que passa por uma Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) e depois por mais etapas de tratamentos complementares em uma Estação de Tratamento de Água de Reúso (ETAR) (MOURA et al., 2020; MANCUSO e SANTOS, 2013; JORDÃO e PESSÔA, 2014; OENNING-JÚNIOR e PAWLOSKY, 2007).

Existem outros dois termos importantes, são eles: quando se faz o reúso interno de água de reúso proveniente de atividades realizadas no próprio empreendimento é chamado de

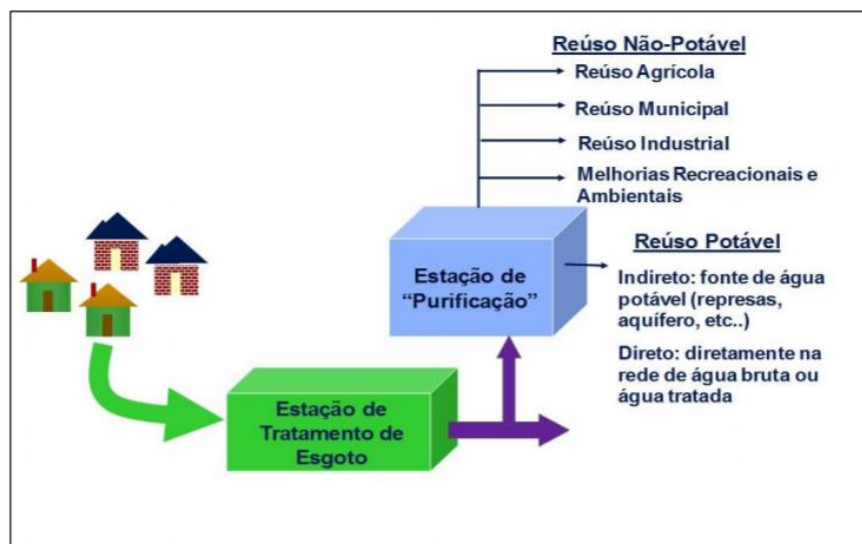
reúso interno de água; e quando se faz o uso de efluentes tratados provenientes de estações de tratamento administradas por prestadores de serviços de saneamento básico ou terceiros, cujas características permitam sua utilização é chamado de reúso externo (CEARÁ, 2016).

Neste trabalho foi considerado o conceito de água de reúso como a reutilização de águas provenientes de efluentes tratados (MORAIS et al., 2016), sendo classificada de acordo com Moura et al. (2020), que conceitua considerando 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 de 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.” (Moura et al., 2020)

As possibilidades de utilização de água de reúso podem ser divididas em duas grandes categorias: não-potável e potável. As mais proeminentes na categoria de não-potável são reúso agrícola, industrial, municipal e recreacional/ambiental. E na classificação como reúso potável as principais formas são recarga de aquíferos para reúso potável indireto, e fonte de água para consumo humano, como reúso direto potável, como ilustrado na Figura 1 (KUBLER; FORTIN; MOLLETA, 2015).

Figura 1 - Classificações de água de reúso e principais aplicações.



Nota: "Purificação" é a palavra que o público mais facilmente entende e apoia, particularmente para reúso potável (baseado em estudos sobre aceitação social feitos pela CH2M como parte de vários projetos, incluindo NWater e o projeto de reúso potável indireto em Perth).

Fonte: Kubler; Fortin; Molleta (2015).

A água de reúso pode ser conceituada como reúso indireto ou direto, decorrendo de ações planejadas ou não planejadas (MORAIS et al., 2016). Sendo classificada em:

1) Reúso Indireto

Ocorre quando a água usada anteriormente, uma ou mais vezes para uso doméstico ou industrial é descarregada nas águas superficiais ou subterrâneas e utilizadas novamente a jusante, de forma diluída (WHO, 1973). O reúso pode ser adotado de forma planejada ou não planejada:

- Reúso planejado: ocorre quando há conhecimento de que o está sendo realizado, e com isso, todos os cuidados necessários para sua prática são previstos (RODRIGUES, 2005). Ocorre quando os efluentes, depois de tratados, são descarregados de forma planejada nos corpos de águas superficiais ou subterrâneas, para serem utilizadas a jusante, de maneira controlada, no atendimento de algum uso benéfico (WHO, 1973). Para isto deve-se ter controle sobre as eventuais novas descargas de efluentes no caminho que também atendam ao requisito de qualidade do reúso objetivado (CETESB, 2018).
- Reúso não planejado: normalmente ocorre quando há o reúso indireto, e aqueles que fazem uso das águas a jusante dos lançamentos de efluentes, não tem consciência desta ocorrência (RODRIGUES, 2005). Outra forma de definição deste conceito é quando são os lançamentos de esgotos (tratados ou não) e a coleta a jusante para tratamento e abastecimento público, praticados em cadeia, por diversos municípios (HESPANHOL, 2015).

No mundo em diversas cidades no Brasil e no mundo, por conta da falta de saneamento, ocorre a prática de despejo dos esgotos, tratados ou não, em corpos hídricos, estes mesmos servirão posteriormente como mananciais para obtenção de água para abastecimento da população, ou seja, acabam consumindo um tipo de água de reúso indireto (SOTERO-MARTINS et al, 2021). Esta prática se trata do conceito de reúso de água indireto não planejado, sendo reutilizada por diversas vezes, pelas cidades, indústrias, agricultura, e por todas as atividades que necessitam de água. Mujeriego et al. (2017) mostraram que em diversas cidades no mundo utilizam água de reúso de forma indireta não planejada (MUJERIEGO et al., 2017). No Brasil, em geral, regiões realizam este tipo de prática, como é

o caso no estado do Rio de Janeiro, que os esgotos são despejados no Rio Paraíba do Sul, e depois a estação de tratamento de água capta água no mesmo rio para abastecimento (MANCUSO e SANTOS, 2013). Nesse caso, o Rio Paraíba do Sul também foi afetado com os rejeitos de minérios, pelo crime do rompimento de barragens de rejeitos de mineração nos municípios de Mariana e Brumadinho, Estado de Minas Gerais (OLIVEIRA, 2019). Outro caso de reúso indireto não planejado ocorre no Rio Guandu, Rio de Janeiro, onde a estação de tratamento de água (ETA Guandu), acaba captando a água contaminada e poluída para tratar e abastecer a população (SOTERO-MARTINS et al, 2021). Embora existam exemplos no mundo do reúso indireto não planejado, também existem exemplos de reúso indireto planejado, como ocorre no estado da Califórnia, onde possui uma legislação para recarga gerenciada de aquíferos para fim potável. A lei estabelece uma retenção de seis meses da água no manancial, baseada na hipótese de que cada mês de retenção proporciona a redução de uma ordem de magnitude (99%) de vírus (CDPH, 2008). Esta prática poderia ser avaliada e adaptada para condições brasileiras. O reúso indireto planejado também ocorre na cidade de Catalunha na Espanha, onde acontece o lançamento de esgotos tratados no corpo d'água (MUJERIEGO et al., 2017).

2) Reúso Direto

Segundo WHO (1973) a modalidade de reúso direto é definida como o uso planejado e deliberado de esgotos tratados para certas finalidades como irrigação, uso industrial, recarga de aquíferos e água potável. É possível produzir água potável por meio de água de reúso com tratamentos avançados de purificação da água, este conceito é definido como a reutilização do esgoto para fins potáveis sem dispô-lo antes no meio ambiente (MANCUSO e SANTOS, 2013). No entanto, também o reúso direto pode ser utilizado na modalidade de reúso para fins não potáveis para uso urbano, industrial e agrícola. Neste tipo de reúso os esgotos são tratados com qualidade inferior ao uso potável e podem ser utilizados para (MANCUSO e SANTOS, 2013):

- Irrigação de parques, praças, jardins, áreas verdes públicas e parques esportivos;
- Lavagem de veículos, ruas e pisos;
- Ornamentação, fontes, cachoeiras, lagoas;
- Produção de concreto;
- Controlar incêndios;
- Descarga de aparelhos sanitários (águas cinzas);

- Processos industriais de resfriamento; Lavagem de equipamentos e instalações; Aplicação em processos industriais;
- Irrigação de culturas alimentícias, não alimentícias, processadas, de forrageiras para consumo animal e hidroponia.

3) Reciclagem de Água

Outra forma de reúso é chamada de Reciclagem de Água, segundo a OMS (1973) é quando ocorre o reúso da água internamente a instalações industriais, tendo como objetivo a economia de água e o controle da poluição. Atualmente autores dizem que é a utilização da água internamente para outros usos além do industrial (MONTGOMERY, 1985). Entretanto, Jiménez-Cisneros (2014) define como a utilização de efluentes tratados ou não pra o mesmo uso que o gerou, ou seja, não envolve mudança de uso, por exemplo, a recirculação de água em torres de resfriamentos, a utilização de efluentes de esgoto sanitário para alimentar reatores anaeróbios. Segundo Lavrador-Filho (1987) é um reúso interno em que recupera os esgotos gerados por um uso para atender ao mesmo uso. E de acordo com Moura et al. (2020) é considerado um reúso industrial, em que águas de atividades industriais do próprio empreendimento (reúso direto interno) são reutilizadas.

2.3.2 Importância da Utilização da Água de Reúso

O incentivo a utilização da água de reúso está incluída dentro dos objetivos do desenvolvimento sustentável. Dentre estes estão, reduzir à metade a proporção de águas residuais não tratadas, e aumentar substancialmente a reciclagem e reutilização segura globalmente, e o apoio ao desenvolvimento de capacidades para os países em desenvolvimento em atividades e programas relacionados a água e ao saneamento, incluindo a reciclagem e as tecnologias de reúso (PALMA, 2017).

A água de reúso tem potencial para ser utilizada em diversas atividades como, por exemplo, na agricultura, na indústria, em atividades domésticas, lavagem de carro, limpeza urbana, rega de canteiros (ABNT, 1997). Um dos possíveis benefícios do uso da água de reúso é o emprego na agricultura, que é a atividade econômica do país que mais demanda água, e devido à escassez das fontes de água para esta atividade em diversas regiões do país,

seria uma alternativa para enfrentamento desse problema. Além disto, a água de reúso representa uma alternativa para diminuir a pressão da demanda sobre os mananciais (URKIAGA et al., 2008).

Países no mundo têm utilizado água de reúso para diversas aplicações. E na agricultura países tem utilizado como Chipre, Israel, Estados Unidos, México, China, Jordânia, Turquia, Espanha, França, Grécia, Itália, Portugal, Austrália. São países populosos, porém possuem um histórico de escassez hídrica. E com a crescente demanda de água pela população, uma das formas de obtenção de água é o uso de esgotos tratados e não tratados, que é utilizado principalmente na agricultura e na conservação paisagística. Adotam estas medidas também, pois outro objetivo é diminuir o volume dos esgotos produzidos pela população, sendo ideal ser contabilizado, tratado e reintroduzido com segurança sanitária nos mananciais de água para futura utilização (MOURA et al., 2020).

Além disto, diversos países como Estados Unidos, Israel, Cingapura e Europa estão transformando a água de Reúso em água potável com a utilização de tecnologias de membranas, porém são necessários altos investimentos para a obtenção deste produto.

O interesse em utilizar a água de Reúso nas práticas agrícolas e industriais tem sido o objetivo de estudos mais recentes (AZEVEDO et al., 2007; AL-ZBOON e ALANANZEH, 2008; BONINI et al., 2014). Além disto, se tornou uma opção importante, pois pode reduzir a quantidade de resíduos pelo lançamento do esgoto tratado nos corpos hídricos, permitindo a utilização mais racional dos recursos hídricos, e sendo uma fonte alternativa de água disponível (MARTÍNEZ et al., 2013). Com isto, o uso deste recurso pode se tornar importante ferramenta na gestão da água, e contribuir para transformar a imagem negativa do esgoto em uma prática economicamente e ambientalmente segura, no sentido de preservar os recursos hídricos (HESPANHOL, 2002). A utilização da água de Reúso pode representar uma fonte de água e de nutrientes disponíveis para aplicação na agricultura, mesmo durante os períodos de seca (SHAER-BARBOSA et al., 2014).

No Brasil a Companhia de Saneamento Básico do São Paulo (Sabesp) utiliza água de reúso para a indústria (SABESP, 2019), e a concessionária responsável pelos serviços de saneamento básico dos municípios de Cabo Frio, Búzios, Iguaba Grande, Arraial do Cabo e São Pedro da Aldeia – Rio de Janeiro (PROLAGOS), vem utilizando este tipo de água para algumas atividades como rega de grama e atividades industriais (PROLAGOS, 2019).

Além disso, a utilização de água de reúso pode ser uma fonte de criação de empregos, renda, e economia de recursos financeiros para os municípios (ASSANTI, 2020). E no Brasil, por exemplo, onde o setor da agricultura possui o maior poder

econômico (MOURA et al., 2020), com a utilização de água de reúso, pode-se ter uma economia na prática agrícola, pois ao invés da compra de água potável, poderia ser produzida e utilizada água de reúso para irrigação na agricultura. Em municípios, onde existe uma estação de tratamento de esgoto (ETE), o planejamento de produção de água de reúso se torna mais fácil, tendo menor custo, e pode diminuir custos para a sua implementação. Em médio e longo prazo, com a produção e uso de água de reúso, teria retorno financeiro ao município, no sentido de utilizar uma fonte alternativa de água com custo menor (ASSANTI, 2020). O retorno econômico também poderia ocorrer, pois reduziriam os gastos com fertilizantes artificiais para a agricultura (MANCUSO e SANTOS, 2013). Araujo, Santos e Souza (2017) verificaram que em até uma distância de 110 km no estado do Rio de Janeiro, por exemplo, entre o produtor de água de reúso e o comprador desse tipo de água, possui vantagem econômica da compra de água de reúso ao invés da compra de água potável. O preço de água de reúso no Rio de Janeiro chega ser 11,8 vezes inferior ao preço para compra de água potável, na cidade existem duas ETEs que produzem água de reúso, que são as ETEs Alegria e Penha.

Entretanto, esta alternativa é questionável, se a análise da qualidade sanitária da água de reúso for realizada por técnicas tradicionais que avaliam apenas os coliformes totais e a *Escherichia coli* (*E. coli*), pois micropoluentes de difícil detecção, como vírus e produtos químicos têm sido persistentes nas amostras (MOURA, 2019; SANZ e GAWLIK, 2014). Além disto, pouco se sabe sobre a microbiota que resiste ao polimento e que permanece nesta água, sendo importante a realização de pesquisas com relação à qualidade da água de reúso para prevenir problemas à saúde pública e ao meio ambiente. Para tanto, se faz necessária a criação de normas para regulamentar o reúso de águas residuárias, a determinação de parâmetros de análise para garantir a qualidade da água e a criação de um arcabouço legal específico a fim de que esta solução não se transforme em outro problema, disseminando doenças e comprometendo a saúde humana (ALMEIDA, 2011). Pois dependendo da origem e do tratamento empregado para a produção da água de reúso pode ser ou não segura para a saúde humana e ambiental (MOURA et al, 2020).

Cabe ressaltar que estudos de revisão da literatura mostram que em regiões mais desenvolvidas os empreendimentos de reúso normalmente são de grande porte, com tecnologias mais avançadas, objetivando menores riscos associados a pratica. Nestes países, nem sempre os casos de reúso estão associados à escassez hídrica, mas pelo desenvolvimento social e econômico da região. Enquanto que em países menos desenvolvidos, esta prática normalmente envolve usos menos nobres e tecnologias mais simples para tratamento do

efluente que será reusado. E geralmente aplicam o reúso, quando se encontram em situação de escassez hídrica (SILVIA; SANTOS; SANTOS, 2016).

Contudo a utilização da água de reúso ainda pode enfrentar o problema do preconceito por parte da população, no entanto:

“A água deve ser julgada por sua qualidade, e não por sua origem, portanto, sob o ponto de vista estritamente de tecnologias existentes, pode-se afirmar que é possível converter todo o efluente de uma indústria ou cidade em água de alta qualidade que pode ser amplamente reutilizada.” (VALLERO, 2015).

Para a conscientização da população, a mesma deve aumentar o conhecimento sobre o tema e sobre os processos de tratamentos para a produção da água de reúso. Em países como Singapura, projeto NEWATER, e nos EUA, Denver, estes possuem um centro de visitantes com o objetivo de mostrar as formas de tratamento da água de reúso produzida pelos mesmos, e com isto conscientizar a população de que as formas de tratamento produzem uma água segura de ser utilizada para os fins que se propõe. Com o aumento da aceitação popular, consequentemente ocorrerá o aumento de utilização de água de reúso no decorrer dos anos (KUBLER; FORTIN; MOLLETA, 2015).

A educação ambiental deve propor o debate com a sociedade de modo que evite o preconceito do uso desse tipo de água, como também o conhecimento seguro por parte da população, para ter a segurança sobre a qualidade sanitária desse subproduto do esgoto tratado. Vale ressaltar que em diversos países, como Estados Unidos (EPA, 2004), Israel (FRIEDLER, 2001) e países europeus (MONTE, 2007), a tecnologia empregada na produção de água de reúso é tão avançada que este tipo de água se torna potável.

2.3.3 Reúso Agrícola

O reúso da água para a irrigação na agricultura remete à Grécia antiga (3000 a 1200 a.C), sendo os primeiros registros conhecidos sobre este tema. Estão associados às construções dos sistemas de esgoto dos palácios e das cidades antigas da Civilização Minoica, na Ilha de Creta (FELIZATTO, 2001). Atualmente, no Brasil e no Mundo, observam-se vários exemplos da utilização de água de reúso na agricultura. A região semiárida do Nordeste no Brasil é a que mais utiliza água de reúso para a irrigação da agricultura. É uma região caracterizada por apresentar longos períodos de seca, temperatura elevada, alta taxa de

evaporação, e deficiência hídrica no solo para a agricultura, e por isto utiliza a água de reúso na agricultura para obter fonte de água para a cultura das vegetações, estas que são fontes de renda para a população e também de alimento para o gado e outros animais. Além disto, esse recurso hídrico alternativo também atenua o problema da escassez hídrica no semiárido brasileiro, para utilização em outros fins, como limpeza de quintais, e uso em descargas dos vasos sanitários (MANCUSO e SANTOS, 2013; SOUSA et al., 2003).

Israel é um país que tem uma atuação importante no reúso de água para a irrigação, assim como a Tunísia, Chipre e Jordânia (ANGELAKIS e BONTOUX, 2001). Mais de 60% do volume total do esgoto urbano de Israel vem sendo reutilizado na irrigação de plantações, jardins públicos e revitalização de rios. O estudo realizado pelo projeto da região de Dan, sobre a viabilidade de conversão do deserto de Neguev em área fértil e produtiva para a agricultura, por meio do aproveitamento das águas residuárias está proporcionando o adiamento dos grandes investimentos feitos para dessalinização da água do mar (VOMERO et al., 2000).

No México, o reúso de água é uma atividade difundida. De acordo com Galan (2006), no Mundo, o país mexicano só perde para a China no que diz respeito à utilização de águas residuárias na agricultura, sendo que 83% do efluente recuperado é utilizado na irrigação, 10% em atividades urbanas e 7% na indústria. Segundo Tomaz (2001), o México foi o primeiro a realizar projeto de reúso de água utilizando esgoto sanitário na agricultura. Em todo o país, segundo dados de 1995, são irrigados 257.000 hectares com vazão de 102m³/s, correspondendo a 8.812.000.000 L/dia. A utilização das águas residuárias na agricultura teve seu início no Vale do Mezquital, localizado na bacia vulcânica central do altiplano México, no final do século XIX, tendo sido utilizado um volume de 1.356 milhões m³ de esgotos tratados a cada ano, correspondente a 43 m³/s, sobre uma área de 70 mil hectares, onde se encontram 45 mil famílias de agricultores (LÉON e CAVALLINI, 1999).

Dos efluentes tratados em sistemas de reúso na Arábia Saudita, cerca de 130 mil m³/dia, 91% são destinados ao reúso agrícola, 7% para sistemas de refrigeração no setor industrial e os demais 2% para reúso urbano. A proposta de estratégia para o desenvolvimento de Riad, capital do país, é que no ano de 2021 aproximadamente 50% do reúso de água seja destinado ao setor urbano (LEWIN et al, 2002). Em 2001, no Chipre, eram utilizadas cerca de 16 milhões de m³ de águas residuárias tratadas, principalmente na capital do país (Nicósia). Nesta, aproximadamente 11 milhões de m³/ano são reutilizados na agricultura com a finalidade de destinar 40 volumes de água de fontes convencionais para atender as demandas domésticas e industriais, que necessitam de água com qualidade sanitária melhor (AEMA,

2001). No continente europeu, a agricultura também é o maior alvo das águas residuárias. Entretanto, a prática de reúso urbano não potável e industrial é uma realidade em vários países, que exercem essa prática de maneira extensiva.

Nos Estados Unidos, diversos exemplos de reúso de água na irrigação são conhecidos, como por exemplo, na cidade de Bakersfield localizada no Estado da Califórnia. Nesta cidade, efluentes domésticos são empregados na irrigação desde o ano de 1912, nas formas de esgoto bruto, efluente primário e atualmente na forma de efluente secundário. Numa fazenda em Lubbock, Texas, se utiliza efluentes secundários na irrigação desde o ano de 1938. Em Orange County, Flórida, um projeto chamado de CONSERV II vem fornecendo, desde 1986, água residuária para irrigação. Na cidade de Monterey County, Califórnia, em uma estaca com capacidade de 110 mil m³/d, a água que passa por filtração e desinfecção é empregada na irrigação de plantações que são comidas cruas, como alface, brócolis e morangos, após a segurança desta prática ter sido comprovada através de estudos (KUBLER; FORTIN; MOLLETA, 2015). Em 2010, na Flórida, foram reutilizados cerca de 2,5 milhões m³/d de efluente tratado. Mais da metade desse volume foi destinado à irrigação e paisagismo (NRC, 2012).

A utilização de água de reúso traz diversos benefícios à agricultura como fonte de nutrientes que auxiliam o crescimento de cultivos e de água, entretanto deve-se ter segurança da qualidade sanitária para não prejudicar a saúde humana e ambiental. A água de reúso pode conter micropoluentes, tais como produtos químicos e microrganismos, podendo oferecer riscos à saúde pública e ambiental. Ao aplicar este recurso no solo, sem critérios agronômicos e ambientais, a água de reúso pode se infiltrar até atingir o lençol freático; pode ser incorporado pela vegetação, ou para a atmosfera pela transpiração; pode ser incorporada ao solo, por reações químicas ou na forma de umidade, podendo ser transitória ou permanente; ou pode ser evaporada diretamente para a atmosfera (MANCUSO e SANTOS, 2013). No entanto se a irrigação for feita de forma planejada e de forma segura, pode trazer benefícios como nutrientes e água para plantas, redução do uso de fertilizantes (ERTHAL et al., 2010).

Estudos realizados para verificar os efeitos da utilização da água de reúso na microbiota do solo, que podem ou não beneficiar estes organismos do solo, variando de acordo com a quantidade aplicada e composição da água de reúso. Quando aplicada em alta quantidade e possuir uma grande carga de nutrientes como fósforo e nitrogênio, patógenos, metais pesados e antibióticos, o solo não consegue realizar a sua função de reciclabilidade, e assim pode alterar as características do solo (MATOS, et al., 2004; LIU et al., 2013).

Alves et al. (2008) mostraram que a utilização de água de reúso no solo provocou uma diminuição na densidade de microrganismos em relação à análise inicial, sugerindo que o uso contínuo de água de reúso no solo tenha modificado progressivamente as características físico-químicas do solo e tenha sido prejudicial a sobrevivências dos organismos vivos.

De acordo com Guidolin (2006), e Erthal et al. (2010), o reúso agrícola, sendo realizado de forma adequada possui várias vantagens sob a ótica econômica, social e ambiental. Alguns exemplos são: a recuperação e economia de água, tendo em vista que o consumo médio per capita de água é de e 110 litros/pessoa/dia (ONU, 2015); a redução dos custos da produção agrícola com fertilizantes químicos; a maior fertilidade dos solos através das incorporações de matérias orgânicas presentes nos esgotos brutos, de nutrientes essenciais aos vegetais, como o nitrogênio, fósforo e potássio; Aumento da produção agrícola (EPA, 2012).

A prática de reúso agrícola assume grande importância, devido a fatores como:

“dificuldade crescente de identificar fontes alternativas de águas para irrigação; custo elevado de fertilizantes; a segurança de que os riscos de saúde pública e impactos sobre o solo são mínimos, se as precauções adequadas são efetivamente tomadas; os custos elevados dos sistemas de tratamento, necessários para descarga de efluentes em corpos receptores; a aceitação sociocultural da prática do reúso agrícola; o reconhecimento, pelos órgãos gestores de recursos hídricos, do valor intrínseco da prática.”(HESPANHOL, 2002, p. 81).

2.4 NORMATIZAÇÕES SOBRE A QUALIDADE SANITÁRIA DA ÁGUA DE REÚSO PARA FINS AGRÍCOLAS

2.4.1 Normatizações Brasileiras

No Brasil ainda não há uma legislação federal específica de água de reúso, que estabeleça os critérios e parâmetros de avaliação da qualidade sanitária para a agricultura, como os biológicos e os físico-químicos. Isso reflete a uma baixa maturidade do sistema brasileiro quanto ao controle de poluentes hídricos e aproveitamento de águas residuais.

Atualmente no Brasil, assim como ocorre para água de reúso, em normativas como na Portaria de Consolidação nº 5 de 2017 (BRASIL, 2017), e nas Resoluções CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005) e 396/2008 (BRASIL, 2008), que tratam da qualidade das águas

potável, superficiais e subterrâneas, respectivamente, os parâmetros para avaliação da qualidade de águas também se encontram deficitários. Estas não possuem parâmetros importantes suficientes para avaliação da qualidade sanitária da água para consumo humano, e que deveriam estar contemplados, como por exemplo, os contaminantes químicos. Dentre os poluentes químicos que são lançados nos corpos hídricos diariamente no Brasil, apenas cerca de 7% (27) de aproximadamente 380 poluentes, contém seus valores máximos permitidos nas legislações brasileiras, Portaria de Consolidação 5/2017 e/ou nas Resoluções CONAMA 357/2005 e 396/2008. Além disto, a produção destas substâncias químicas é mais rápida do que o tempo de estudos dos testes toxicológicos sobre os impactos que estas podem causar a saúde humana e ambiental. Ademais, não são considerados nas mesmas leis os interferentes endócrinos nos padrões de qualidade sanitária da água, assim como não consideram os efeitos estrogênicos dos poluentes, pois se fossem considerados os valores máximos permitidos deveriam ser até mil vezes menores que os valores atuais nas normativas vigentes citadas acima (MONTAGNER; VIDALA; ACAYABAB, 2017).

Dentre as normatizações nacionais para aplicação de água de reúso existe a Resolução do Conselho Nacional de Recursos Hídricos (CNRH) nº 54, de 28 de novembro de 2005, 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. 3º sobre as modalidades do reúso direto não potável de água, e dentre estas uma modalidade 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” (BRASIL, 2005). Esta normativa apenas estabelece a modalidade de utilização de água de reúso na agricultura, porém não traz os parâmetros de qualidade para reúso agrícola.

Em 16 de dezembro 2010 a Resolução CNRH nº 121 estabeleceu as diretrizes e critérios para a prática de reúso direto não potável de água na modalidade agrícola e florestal, incentivada pela Resolução CNRH no 54, de 28 de novembro de 2005. Nesta normatização possui informações específicas sobre a utilização de água de reúso na agricultura e em cultivo de florestas plantadas. No entanto, não trata sobre os padrões para a avaliação da qualidade sanitária da água de reúso para a agricultura, apenas diz que “as 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” (BRASIL, 2010). Para a caracterização e monitoramento periódico da água a lei recomenda que seja realizado de acordo com os critérios do órgão ou entidade competente, que no caso é o produtor da água de reúso o responsável, e que observe: a natureza da água de reúso; a tipologia do processo de

tratamento; o porte das instalações e vazão tratada; a variabilidade dos insumos; as variações nos fluxos envolvidos; o tipo de cultura. Nesta norma é apresentado que a utilização da água de reúso para fins agrícolas e florestais não pode oferecer riscos ou causar danos ambientais e a saúde coletiva. No entanto, em caso de acidente ou impacto ambiental que comprometa os demais usos da água no entorno, devido à aplicação da água de reúso, o órgão ou entidade competente e o respectivo Comitê de Bacia Hidrográfica, deve ser informado imediatamente pelo produtor, manipulador, transportador e ou responsável técnico. No art. 6º da legislação diz que “as concentrações recomendadas de elementos e substâncias químicas no solo, para todos os tipos de reúso para fins agrícolas e florestais, são os valores de prevenção que constam da legislação pertinente” (BRASIL, 2010). Além disso, recomenda que o solo que recebe a água de reúso também deve ser caracterizado e monitorado periodicamente de acordo com critérios definidos pelo órgão ou entidade competente, sendo o produtor da água de reúso o responsável. Os métodos de análises da água e do solo devem atender as normas nacionais que disciplinem a matéria (BRASIL, 2010). Esta legislação não deixa claro sobre 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. Entretanto, acredito que a Resolução CNRH nº 121/10 esteja se referindo a parâmetros e métodos que estejam na legislação sobre água potável estabelecida na Portaria de Consolidação 5/2017 e normativas regionais, pois não existe legislação nacional, sobre a qualidade sanitária do solo, apenas leis pontuais como a Lei nº 7666 de 28 de agosto de 2017 (RIO de JANEIRO, 2017), do Estado do Rio de Janeiro, que estabelece valores de referência de saúde ambiental para a qualidade das areias utilizadas em parques, praças, tanques, clubes, creches e escolas para fins de lazer, recreação e atividades educativas, esportivas e culturais, em áreas públicas e privadas do estado do Rio de Janeiro. Enfim, 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.

No Brasil existem poucas regulamentações sobre água de reúso com padrões de qualidade sanitária, o que dificulta a utilização deste recurso hídrico com segurança no território brasileiro, sem causar riscos para a saúde coletiva. Foram encontradas apenas normativas pontuais de alguns estados brasileiros, que contém os parâmetros de qualidade microbiológicos, físicos e químicos de água de reúso para a agricultura, são estas as leis: Norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 13969/97 (ABNT, 1997); Resolução Estadual do Conselho Estadual de Recursos Hídricos (CONERH) da Bahia nº 75

de 2010 (BAHIA, 2010); e Resolução do Conselho Estadual do Meio Ambiente (COEMA) do Ceará nº 2 de 02 de fevereiro de 2017 (CEARÁ, 2017).

A Norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 13969 de 1997, que dispõe sobre “Tanques sépticos - Unidades de tratamento complementar e disposição final dos efluentes líquidos - Projeto, construção e operação”, não trata especificamente sobre água de reúso, porém traz alguns padrões para utilização na agricultura (ABNT, 1997). Fornece instruções para “reúso de água servida” e/ ou de esgotos tratados para o Brasil, além disto, a 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. Nesta, a utilização de água de reúso para irrigação da agricultura se caracteriza como reúso local, que se trata da reutilização do esgoto doméstico para fins que exigem qualidade de água não potável. No entanto, indica que mesmo realizada a desinfecção da água de reúso, esta não deve ser usada para irrigação de frutas de ramas rastejantes (por exemplo, melão e melancia) e de hortaliças. E permite a rega de cultivos como trigo, milho, arroz, café e outras árvores frutíferas, por meio de escoamento no solo, desde que tenha o cuidado que seja interrompida a irrigação com pelo menos 10 dias antes da colheita (ABNT, 1997).

Alguns parâmetros da qualidade sanitária da água de reúso e diretrizes para irrigação da agricultura estão definidas na classe 4 da norma:

“Classe 4: reúso nos pomares, cereais, forragens, pastagens para gados e outros cultivos através de escoamento superficial ou por sistema de irrigação pontual. Coliforme fecal inferior a 5000 NMP/100 mL e oxigênio dissolvido acima de 2,0 mg/L. As aplicações devem ser interrompidas pelo menos 10 dias antes da colheita.” (ABNT, 1997).

Na Bahia o Conselho Estadual de Recursos Hídricos (CONERH) publicou a Resolução Estadual nº 75 de 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, portanto quantifica os coliformes por UFC/100 mL, sendo dividido em duas categorias:

- Categoria A (Irrigação, inclusive hidroponia, de qualquer cultura incluindo produtos alimentícios consumidos crus) - 1×10^3 UFC de coliformes termotolerantes por 100 mL, ou seja, 1.000 UFC/100 mL. No entanto no caso de irrigação localizada, por gotejamento, de cultivos que se desenvolvem distantes do nível do solo ou técnicas

hidropônicas em que o contato com a parte comestível da planta seja minimizado o limite é até 1×10^4 de UFC coliformes termotolerantes por 100 mL, ou seja, 10.000 UFC/100 mL.

- 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) - 1×10^4 UFC de coliformes termotolerantes por 100mL, ou seja, 10.000UFC/100 mL. Porém, pode ter até 1×10^5 por 100mL, ou seja, 100.000/100 mL no caso da existência de barreiras adicionais de proteção ao trabalhador (Barreiras adicionais de proteção encontradas em agricultura de elevado nível tecnológico, incluindo o emprego de irrigação localizada e equipamentos de proteção individual. Exclui-se desta nota a irrigação de pastagens e forrageiras destinadas à alimentação animal). É facultado o uso de efluentes (primários e secundários) de técnicas de tratamento com reduzida capacidade de remoção de patógenos, desde que associado ao método de irrigação subsuperficial (neste caso não se aplicam os limites estipulados de coliformes e ovos de helmintos, sendo a qualidade do efluente uma consequência das técnicas de tratamento empregadas).

A lei define ainda outros parâmetros físico-químicos para reúso agrícola que são: cloreto com faixa limite de 100 a 350 meq/L; alumínio até 5 mg/L, arsênio até 0,10 mg/L, berílio até 0,10 mg/L, boro até 0,5 mg/L, cádmio até 0,01 mg/L, chumbo até 5,00 mg/L, cobalto até 0,05 mg/L, cobre até 0,20 mg/L, cromo até 0,1 mg/L, ferro até 5 mg/L, fluoreto até 1,00 mg/L, lítio até 2,50 mg/L, manganês até 0,20 mg/L, mercúrio até 0,002 mg/L, molibdênio até 0,01 mg/L, níquel até 0,20 mg/L, selênio até 0,02 mg/L, sódio até 70,0 mg/L, vanádio até 0,10 mg/L e zinco até 2 mg/L (BAHIA, 2010). Ademais a resolução define que o monitoramento deve ser periódico, com definição do período pelo órgão competente. E a aplicação em solos agrícolas e/ou florestais deve ser obrigatoriamente condicionada à elaboração de projetos que atendam aos critérios estabelecidos pela resolução (BAHIA, 2010).

No estado do Ceará foi aprovada a Lei nº 16.033 de 20 de Junho de 2016, que 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. 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 relativa à água de reúso. A fiscalização da qualidade sanitária 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 entanto esta lei não possui parâmetros de qualidade para avaliação da água de reúso (CEARÁ, 2016). Parâmetros de qualidade em relação a reúso externo para fins agrícolas e florestais no Estado do Ceará podem ser encontrados na Resolução do Conselho Estadual do Meio Ambiente (COEMA) nº 2 de 02 de fevereiro de 2017, que dispõe sobre padrões e condições para lançamento de efluentes líquidos gerados por fontes poluidoras (CEARÁ, 2017). Nesta lei, reúso externo é “o uso de efluentes tratados provenientes das estações administradas por prestadores de serviços de saneamento básico ou terceiros, cujas características permitam sua utilização”. Os parâmetros estabelecidos para reúso externo para fins agrícolas e florestais são (CEARÁ, 2017):

- Coliformes termotolerantes: Culturas a serem consumidas cruas cuja parte consumida tenha contato direto com a água de irrigação, não pode ser detectado coliformes termotolerantes (ausência). Enquanto que as demais culturas podem conter até 1.000 NMP/100 mL;
- Ovos de geohelmintos: Culturas a serem consumidas cruas cuja parte consumida tenha contato direto com a água de irrigação, não pode ser detectado ovo de helminto. Nas demais culturas, pode até 1 ovo geohelmintos/L de amostra;
- Condutividade elétrica: até 3000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ III. pH entre 6,0 e 8,5;
- Razão de Adsorção de Sódio - RAS: $(15 \text{ mmolL}^{-1})^{1/2}$.

Para a utilização da água de reúso para agricultura é fundamental a criação de legislação de nível nacional, para se sejam cumpridas pelos gestores e para evitar riscos à saúde humana e ambiental. A falta de legislação traz um desafio para a aplicação da água de reúso, devido à inexistência de orientações técnicas para a implantação dos sistemas de reúso e sua fiscalização. A legislação federal sobre água de reúso deve possuir a origem da água de reúso, os padrões de qualidade sanitária, bem como as formas de tratamento para produção da mesma (MOURA et al., 2020).

Além disso 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 (SOTERO-MARTINS et al., 2019).

2.4.2 Normatizações Internacionais

Internacionalmente, existem normatizações como as da *United States Environmental Protection Agency* (EPA) de 2012, e da *World Health Organization* (WHO) de 2006, que tratam de forma mais completa sobre água de reúso para agricultura, com parâmetros físico-químicos e biológicos, baseados em estudos científicos, de modo que esta água se torne mais segura para aqueles que a utilizam (HANDAM et al., 2021b).

A OMS reconheceu a importância de se criar diretrizes sobre a utilização da água de reúso para a prevenção de agravos a saúde coletiva em 1971. E em 1989 estabeleceu critérios de qualidade sanitária da água de reúso, após períodos de estudos epidemiológicos, voltados para a agricultura e aquicultura, intitulado “Health Guidelines for use of Wastewater in Agriculture and Acquaculture”. Depois foi realizada uma reunião para revisão da normativa que abarcou o uso de águas residuárias, excretas e águas cinzas, chamado de “Guidelines for the safe use of Wastewater, Excreta and Greywater” (WHO, 2006). Quanto aos parâmetros microbiológicos (WHO, 2006) estão:

“Para a irrigação de culturas que são ingeridas cruas, campos esportivos e parques públicos devem ter ≤ 1 ovo de nematóide/L, e ≤ 1000 UFC de Coliformes fecais/100mL; Para Irrigação de culturas cerealíferas, a serem industrializadas, forragens, pastagens e arbóreas devem ter ≤ 1 ovo de nematóide/L.” (WHO, 2006).

A EPA estabeleceu em sua normativa chamada “Guidelines for Water Reuse” (EPA, 2012, pág.131), os tipos de usos possíveis e recomendações de parâmetros de qualidade sanitária para reúso agrícola. Segundo EPA (2012), a água deve ter concentração de coliformes termotolerantes de até 200/100 mL, e na irrigação de cultivos por aspersão deve ter ausência de coliformes termotolerantes. Para usos em que a água terá provável contato direto ou indireto recomenda-se a desinfecção para produzir água de reúso com ausência de coliformes fecais e totais detectáveis por 100mL (EPA, 2012, pág.131).

Quanto aos parâmetros físico-químicos, de acordo com EPA (2012): o cloreto em irrigação de superfície para valores < 4 meq/L não apresentam riscos, de 4 a 10 meq/l o risco

é moderado e >10 meq/l o risco é alto; para irrigação por aspersão valores abaixo de 3 meq/l não apresentam riscos e acima de 3 meq/l o risco é moderado; Fluoreto até 5,00 mg/L; Chumbo até 1,00 mg/L; Boro até 0,75 mg/L; pH faixa permitida entre 6,0 e 8,4; cloro residual livre até 1 mg/L.

Segundo WHO (2006), o cloreto nas irrigações em superfície para valores < 3 meq/L não apresentam riscos, e > 3 meq/L apresentam um risco de leve a moderado; faixa de pH é 6,5 - 7,0; cloro residual livre < 4 meq/L não apresenta riscos, de 4 a 10 meq/L apresenta risco de leve a moderado e > 10 meq/L apresentam altos riscos.

O parâmetro condutividade elétrica EPA (2012), WHO (2006), os valores abaixo de 0,7 dS/m não possuem riscos, de 0,7 dS/m até 3,0 dS/m é moderado e valores >3 dS/m são de alto risco. A condutividade elétrica indica indiretamente a concentração total de sais na água, e geralmente é o parâmetro escolhido para verificar a salinidade da água (SILVA, 2018). Quanto maior a condutividade elétrica, maior é o grau de salinidade e a capacidade de infiltração de água no solo, o que afeta a disponibilidade hídrica para as culturas agrícolas (EPA, 2012).

Outros locais também desenvolveram diretrizes como o Estado da Califórnia, pelo Departamento de Saúde do Estado, que estabeleceu padrões de qualidade sanitária para irrigação da agricultura em 1918, intitulada “*Wastewater Reclamation Criteria*”. Esta exige que a água de reúso para irrigação da agricultura tenha menos de 2,2 UFC/100mL de coliformes termotolerantes. Atualmente é considerada a normativa mais restritiva e complexa em relação as outras normas sobre reúso agrícola (HESPANHOL, 2002).

Outro país que foi um dos precursores da utilização da água de reúso é Israel, que possui a normativa para a irrigação de vegetais que podem ser comidos crus, intitulado “*The Environment in Israel 2002*”. Neste documento mostra que é permitida a prática de reúso agrícola, e possui alguns parâmetros de qualidade como sólidos suspensos, DBO, presença de cloro e salinidade, mas não há nenhum padrão quanto à presença de microrganismos patogênicos (ASANO, 1998).

O México também possui uma legislação para reúso agrícola chamada “*Mexican Standard NOM-001-ECOL-1996*”, no entanto não possui parâmetros de qualidade sanitária (MOURA et al., 2020).

Na Jordânia possui apenas parâmetros físico-químicos da água de reúso para a irrigação da agricultura e possui as normativas: “*National Water Strategy and related policies and action plans*”, “*Water Substitution and Re-Use Policy*” e “*Decentralized Wastewater Management Policy*” (MOURA et al., 2020).

E na Turquia o reúso de água foi reconhecido em 1991, por meio da norma “*Water Pollution Control Regulations*”, permitindo o uso para agricultura, com parâmetros de qualidade microbiológicos e físico-químicos (KRAMER e POST, 2001).

2.5 DOENÇAS E AGRAVOS POR EXPOSIÇÃO À ÁGUA DE REÚSO CONTAMINADA

2.5.1 Contaminantes Biológicos

A avaliação da qualidade sanitária dos esgotos brutos e tratados pelos parâmetros microbiológica em função apenas da presença ou ausência de indicadores de contaminação fecal como coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* não é satisfatória, pois outros patógenos como protozoários e vírus podem estar presentes. A presença de protozoários, por exemplo, em recursos hídricos superficiais em várias regiões do país está relatada na literatura, mostrando que estes são disseminados em diversas fontes de abastecimento de água do Brasil (INCT, 2018).

McQuaig, Griffith e Harwood (2012) indicaram que vírus entéricos podem estar presentes na água mesmo com a ausência de coliformes totais e de *E. coli*. Com isto, possivelmente, pode ter a presença também de outros microrganismos patogênicos incultiváveis, sendo capaz de acessá-los apenas pelas técnicas de biologia molecular.

Uma das formas de maior perigo para contaminação por patógenos aos consumidores, assim como aos trabalhadores rurais estão relacionados à utilização de água de reúso na irrigação de lavouras (WHO, 2006).

No entanto com a utilização de efluentes de esgotos tratados como é o caso da água de reúso, conjuntamente com a aplicação de irrigação por gotejamento, este perigo de contaminação se torna menor (MANCUSO e SANTOS, 2013). A transmissão de doenças é controlada também por fatores agronômicos como prática de irrigação utilizada, práticas de cultura e de colheita (MORAIS et al., 2016; AYRES e WESTCOT, 1991). Assim, a utilização de água de reúso na agricultura se torna uma fonte de água alternativa importante, favorecendo o desenvolvimento social e econômico dos agricultores nas regiões rurais, que possuem escassez de água (MORAIS et al., 2016).

Cairncross e Feachem (1993) fizeram uma classificação das doenças relacionadas ao saneamento ambiental inadequado (DRSAI), que podem ser veiculadas pela água contaminada. As DRSAIs ocorrem quando há falta ou precariedade no saneamento ambiental e de moradias. Nesta classificação possuem as principais doenças infecto-parasitárias veiculadas pela água (CAIRNCROSS e FEACHEM, 1993), e pode ser utilizada em relação a água de reúso também.

A água de reúso, assim como outros tipos de água como, por exemplo, para consumo humano e para balneabilidade, se não for tratada adequadamente, de forma a retirar microrganismos e, inclusive, poluentes químicos (como será mostrado no item 2.5.2) pode transmitir doenças e agravos à saúde humana e ambiental. Na Tabela 1 se encontram algumas das doenças relacionadas com o saneamento inadequado (DRSAIs) que podem afetar humanos.

Tabela 1 - Doenças relacionadas com o saneamento inadequado (DRSAIs) que podem afetar humanos veiculadas pela água de reúso contaminada, dependendo da origem e da forma de tratamento para a produção de água de reúso.

Microrganismos Patogênicos	Doença Associadas
<i>Escherichia coli</i>	Gastroenterite
<i>Campylobacter jejuni/ coli</i>	Gastroenterite
<i>Legionella spp.</i>	Doença Respiratória
<i>Salmonella typhi/ paratyphi</i>	Febre Tifoide
<i>Salmonella spp.*</i>	Salmonelose, Gastroenterite (diarreia, vômito, febre)*
<i>Shigella spp.</i>	Desinteira
<i>Vibrio cholera</i>	Cólera
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Gastroenterite
<i>Adenovirus (40 y 41)*</i>	Doença respiratória, infecções oculares, gastroenterite*
<i>Agente Norwalk</i>	Gastroenterite
<i>Astrovirus</i>	Gastroenterite
<i>Calicivirus</i>	Gastroenterite
<i>Entamoeba spp.*</i>	Amebíase (desinteira amebiana) *
<i>Giardia spp.*</i>	Giardíase (gastroenterite) *
<i>Cryptosporidium spp.*</i>	Cryptosporidíase, diarreia, febre*
<i>Ascaris spp.*</i>	Ascaridíase*
<i>Ancylostoma*</i>	Ancilostomíase*

Fonte: Sanz e Gawlik (2014); Cairncross e Feachem (1993), adaptado; * referência - EPA (2012).

2.5.1.1 Marcadores Moleculares Indicadores de Contaminação Fecal

Os estudos sobre a qualidade sanitária de amostras ambientais têm utilizado análises de biologia molecular, por exemplo, a avaliação de marcadores moleculares de contaminação pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Com o auxílio de técnicas de biologia molecular como esta, podem ser identificados microrganismos bioindicadores de contaminação fecal, e dessa forma ficam mais evidentes os perigos eminentes, e assim poder

realizar medidas para a prevenção da saúde humana e ambiental (MCQUAIG et al., 2012; WOLF et al., 2010).

Os microrganismos que podem ser cultiváveis, por meios de cultivo seletivos, representam por volta de 1% dos seres vivos, um pequeno percentual das espécies no mundo, por isso a metodologia de cultivo não consegue identificar muitos microrganismos que não são cultiváveis. Por meio da biologia molecular é possível a detecção de microrganismos que não são cultiváveis. Estudos utilizam marcadores moleculares (detectam a presença dos genes de microrganismos nas amostras) que podem indicar contaminação fecal, assim como a possível existência de outros microrganismos (SANTOS et al., 2009; AMANN et al., 1995).

A PCR é uma técnica moleculares independente de cultivo, que permite detectar a presença de genes marcadores para verificação da presença de microrganismos nas amostras. A realização desse método é feita após a etapa inicial de extração do DNA total da amostra a ser analisada. A PCR envolve a utilização de oligonucleotídeos (primers), que são sequências de nucleotídeos complementares a sequências específicas para amplificação, que é a síntese de milhões de cópias de sequências de genes alvos de DNA. Para a PCR são utilizados componentes básicos, que são enzima DNA polimerase, magnésio, iniciadores (primers), água ultrapura, tampão. Na metodologia envolvem as etapas de desnaturação, anelamento e extensão das sequências de DNA alvo (YE et al., 2012; MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2001).

Como marcadora molecular, a bactéria coliforme termotolerante, *Escherichia coli* têm sido utilizada como bioindicadora de contaminação por análises biologia molecular, por meio da PCR, e usualmente utilizadas em análises colimétricas. Esse microrganismo é uma bactéria, que faz parte do grupo dos coliformes termotolerantes, e possuem a capacidade de fermentar a lactose com produção de ácido e gás em 24 horas a 42 °C. É considerada a principal espécie, mais encontrada, dos coliformes termotolerantes, e também é específica indicadora de contaminação fecal recente, sendo abundante em fezes humanas e de animais. Por isso é bastante encontrada em esgotos, efluentes, águas naturais e solos contaminados (APHA, 2017; Sotero-Martins et al., 2014). A bactéria *E. coli* costuma ser uma bactéria comensal do intestino, porém cepas de *E. coli* enteroinvasivas são patogênicas e podem causar gastroenterites nos seres humanos (SANZ e GAWLIK, 2014; MURRAY, 2014; GUION et al., 2008).

Outra bactéria que também é utilizada como marcador molecular de contaminação fecal em amostras ambientais é a *Methanobrevibacter smithii* (SIDHU et al., 2013), pois é arqueobactéria anaeróbica, comuns no trato intestinal humano (MCLELLAN e EREN, 2014; JOHNSTON et al., 2010). E são importantes bioindicadoras de possível presença de outros

microrganismos de origem fecal, pois quando saem do hospedeiro é improvável que consigam persistir no ambiente (MCLELLAN e EREN, 2014).

A detecção de vírus também é de fundamental importância em saúde pública, e como bioindicador de contaminação fecal (SILVA et al., 2010), e têm sido utilizados em estudos em matrizes de esgoto e efluentes como em pesquisa realizada por FONG et al., (2010), pois são considerados uns dos mais prevalentes em amostras ambientais e em esgotos (PARASIDIS et al. 2013). Os adenovírus são considerados um dos principais agentes virais encontrados em amostras ambientais contaminadas, e um dos maiores responsáveis por surtos de gastroenterite de veiculação hídrica no mundo. Fazem parte do grupo dos vírus entéricos, presentes no trato gastrointestinal humano, e por meio da transmissão fecal-oral podem causar infecções gastrointestinais (BOSCH et al., 2008). Especificamente, os adenovírus sorotipos 40 e 41 humanos (HAdVs), que foram os utilizados como bioindicadores moleculares no presente estudo, são da família Adenoviridae, gênero Mastadenovirus (KING et al., 2011), não são envelopados, possuem 90 nm de diâmetro, simetria icosaédrica, e genoma de DNA fita dupla (WOLD et al., 2013). São patogênicos, causam doença respiratória, infecções oculares, gastroenterites em humanos (EPA, 2012; MENA e GERBA, 2009). Cabe destacar que a detecção molecular de adenovírus não significa a presença de patógenos viáveis ou infecciosos, pois a técnica de PCR detecta ácidos nucleicos (DNA ou indiretamente de RNA), podendo detectar apenas um fragmento, e não a partícula viral (KONEMAN et al., 2014).

Pesquisas vêm sendo feitas utilizando bioindicadores moleculares de contaminação fecal em amostras de água, como adenovírus sorotipos 40 e 41, *Methanobrevibacter smithii* (SIDHU et al., 2013) e *Escherichia coli* (MOURA, 2019) por meio da técnica de PCR.

2.5.2 Poluentes Químicos

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), e estes são lançadas nos recursos hídricos, afetando a comunidade aquática, podendo contaminar as fontes para abastecimento de água da população (AQUINO et al., 2013). Visto isto, é importante o monitoramento destas

substâncias nos recursos hídricos para poder prevenir malefícios para a saúde humana e ambiental.

A presença destas substâncias em água têm sido verificada nas últimas décadas, sendo uma preocupação mundial (SANTOS et al., 2013). Houve uma maior incorporação do número de substâncias em legislações ao longo do tempo no Brasil e no mundo, no entanto é infactível contemplar todos os poluentes químicos que oferecem malefícios à saúde em normatizações, pois a velocidade com que se produz e disponibiliza estes poluentes é muito mais rápida do que a realização de todos os testes toxicológicos (MONTAGNER; VIDALA; ACAYABAB, 2017). Estes podem afetar tanto os receptores humanos e ambientais através de uma variedade de mecanismos, incluindo disfunção endócrina, citotoxicidade e aumento da resistência aos antibióticos (FENT et al., 2006; PRUDEN et al., 2006, SCARPA et al., 2011). Os hormônios presentes na água, por exemplo, podem causar desequilíbrios hormonais e reprodutivos nos seres humanos e nos animais (PESSOA et al., 2012).

Formas de tratamento de esgoto empregadas, e de produção de água de reúso inadequadas para a remoção dos poluentes químicos, permitem a persistência destes na água, podendo ser encontrados hormônios e produtos químicos 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).

Dentre os poluentes químicos, grande parte possui capacidade de desregular as funções do sistema endócrino (desreguladores endócrinos), causando efeitos adversos para a saúde animal, humana, ou em seus descendentes. Mesmo em baixas concentrações (da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1}) os poluentes químicos apresentam risco potencial para a saúde humana e para o meio ambiente (GORE et al., 2014; BILA e DEZOTTI, 2007). Ademais, possuem uma grande quantidade de substâncias químicas, o que torna um desafio para identificação, quantificação, regulamentação e, principalmente, para o tratamento dessas substâncias (INCT, 2018).

Os desreguladores endócrinos são definidos como “um agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação dos hormônios naturais no corpo que são responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento” (USEPA, 1998). Os mecanismos dos desreguladores endócrinos são: bloquear a ação natural desses hormônios (antagonistas); substituir os hormônios naturais do organismo (agonistas) ocorrendo respostas diferentes e fora do tempo às células; aumentar ou

diminuir a quantidade natural de hormônios (KABIR; RAHMAN; RAHMAN, 2015; GHISELLI, 2006; SANTAMARTA, 2001).

Neste grupo dos desreguladores endócrinos destacam-se na literatura as substâncias com atividade estrogênica, estas podem interagir com receptores de estrogênio e podem exercer efeito adversos sobre um organismo (GHISELLI e JARDIM, 2007). Segundo Daston et al. (1997), é conceituada como a capacidade de produção de respostas biológicas qualitativamente similares àquelas produzidas pelos hormônios endógenos, como o 17 β -estradiol.

As principais moléculas encontradas, em águas residuais e que possivelmente podem ser encontradas em águas de reúso, que apresentam alta atividade estrogênica são os hormônios naturais estrona (E1) e 17 β -estradiol (E2), e o hormônio sintético 17 α -etinilestradiol (EE2), que é a principal substância ativa do contraceptivo oral (PESSOA et al., 2012), e alquilfenóis e etoxilatos de alcalfenol (TESKE S.S., ARNOLD, 2008). No entanto, os estrogênios sintéticos apresentam maior atividade estrogênica em comparação com os hormônios naturais (SVENSON *et al.*, 2003). Outras substâncias também possuem atividade estrogênica como as utilizadas ou produzidas por indústrias, tais como bifenilas policloradas, pesticidas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, ftalatos, alquilfenóis, e têm sido encontradas em águas naturais e esgoto (bruto e tratado) (GHISELLI e JARDIM, 2007).

Para analisar a presença e quantificação de substâncias com atividade estrogênica em amostras de água, Routledge e Sumpter (1996) desenvolveram um método de análise *in vitro*, que é o método empregado no estudo. Essa técnica utiliza a levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada. Este ensaio permite a identificação de substâncias químicas que são capazes de interagir com o receptor de estrogênio humano e elucidar uma resposta estrogênica. O método conhecido por YES (*Yeast Estrogen Screen*) vem sendo largamente empregado devido à rapidez, à reprodutibilidade e à sensibilidade.

Antes das análises de atividade estrogênica em amostras de água é preciso fazer previamente a concentração dessas substâncias. O método comumente utilizado para concentração é realizado através de cartucho (com matriz adsorvente), pelo método de extração em fase sólida (EFS) (ROSSI e MILLER, 2004; AMPARO, 2013), esse processo é eficiente, porém é oneroso, e utiliza solventes como o hexano e metanol que poluem o ambiente e oferecem risco a saúde humana (ASSIS *et al.*, 2017; FREITAS e ARCURI, 2000). Outros métodos têm sido utilizados para concentração de substâncias (ANDRADE et al., 2017; BARTOLOMEU, 2014; BONATO et al., 2014; RODRIGUES JUNIOR, 2011; XAVIER, 2006), que são os métodos de liofilização e de centrifugação a vácuo, que foram

testados nesse estudo. Esses possuem princípios semelhantes no sentido de preservar a composição química da amostra, apenas a água é retirada.

Em relação ao método de liofilização, segundo Bartolomeu (2014), o processo é realizado a baixa temperatura, e esta é mantida durante todo o processo, evitando qualquer alteração química das substâncias sensíveis ao calor e umidade. Por este motivo, um produto concentrado por esta técnica mantém inalterado a composição química original.

A liofilização é um processo no qual uma substância é previamente congelada e então a quantidade de solvente (geralmente água) é reduzida, primeiro por sublimação e posteriormente por dessorção, para valores tais que impeçam a manutenção de atividade biológica e reações químicas; e passam pelos processos de congelamento inicial, concentrações primária e secundária (MARQUES, 2008).

De acordo com Terroni *et al.* (2011) a principal área de aplicação da liofilização é na produção de bio-produtos não vivos, como: enzimas, hormônios, antibióticos, vitaminas, hemoderivados, anticorpos, vacinas inativadas, fármacos. Xavier (2006) realizou liofilização para desidratação de amostras contendo genisteína, que é o flavonoide da soja, que possui atividade estrogênica.

Quanto ao método de concentração por centrifugação a vácuo, esse possui uma tecnologia de centrifugação para remover solventes e concentrar amostras, mantendo a integridade da amostra. Este oferece rápida e eficaz concentração e secagem de pequeno volume de amostras, geralmente empregado para concentrar DNA ou RNA (SPEEDVAC, 2011). As referências de centrifugação a vácuo, consistem geralmente de amostras de DNA (BONATO *et al.*, 2014), RNA (RODRIGUES JUNIOR, 2011) e proteínas (ANDRADE *et al.*, 2017).

Dentre os riscos à saúde, diversos estudos têm verificado problemas relacionados à exposição a poluentes químicos, tais como: cânceres (SOTO e SONNENSCHNEIN, 2010), infertilidade em seres humanos e animais (LAGOS-CABRÉ e MORENO, 2012), feminização de peixes (BARBER *et al.*, 2012), resistência bacteriana (KÜMMERER, 2009), síndrome do ovário policístico, diminuição da produção de espermatozoides no homem (TESKE e ARNOLD, 2008).

Dentre os distúrbios mentais, estão incluídos: transtorno de déficit de hiperatividade (TDAH) e transtorno do espectro do autismo (TEA), bem como depressão e outros transtornos de humor, dificuldades de aprendizagem, função executiva deficientes e transtornos de conduta. Como classe, os PCBs têm as associações mais fortes e mais conhecidas com as doenças neurológicas (GORE *et al.*, 2014).

Na Tabela 2 se encontram alguns dos agravos a saúde humana e ambiental causadas pela água de reúso contaminada.

Tabela 2 - Doenças e/ou agravos que podem afetar a saúde humana e ambiental, veiculadas pela água de reúso poluída por agentes químicos.

Agentes Químicos	Malefícios para a saúde humana e ambiental
Matéria Orgânica	Eutrofização de corpos d'água
Óleos, gorduras, celuloses, ligninas e etc.	Condições Anóxicas para ecossistema aquático
Micronutrientes (B, Ca, Cu, Fe, Mg, Na, Co e etc.)	Acúmulo no solo é tóxico para as plantas e para a saúde humana
Metais (Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Zn e etc.)	Tóxico para plantas, biota aquática, e para a saúde humana
Sais Inorgânico (Cloridos, sulfúricos, nitratos e etc.)	A salinidade no solo pode causar estresse osmótico para as plantas, salinização dos solos, salinização de aquíferos e risco a saúde humana
Resíduos Industriais	
Defensivos agrícolas	
Químicos Naturais (Hormônios, fitoestrogênios e etc.)	Efeitos cancerígenos, mutação genética, risco para saúde humana (ciano toxinas), bioacumulação, tóxicos para as plantas, infertilidade em seres humanos e animais ^a , feminização de peixes ^b , resistência bacteriana ^c
Drogas Farmacêuticas e metabólicas (antibióticos, antiepiléticos, analgésicos, anticonceptivos, antidepressivos e etc.)	
Produtos de cuidados pessoais (fragrâncias, pigmentos e etc.)	Além de vários efeitos não explorados.
Produtos de limpeza doméstica	

Fonte: Sanz e Gawlik (2014), adaptado; a – Lagos-Cabré e Moreno (2012); b – Barber et al. (2012); c - Kummerer (2009).

2.6 PROCESSOS DE TRATAMENTO PARA A PRODUÇÃO DE ÁGUA DE REÚSO NO BRASIL E NO MUNDO

As tecnologias de tratamento são fundamentais, permitindo a reutilização da água, conseqüentemente ocorre à redução da escassez hídrica, e produz recursos hídricos com qualidade sanitária para abastecer as populações (MANCUSO e SANTOS, 2013). Contudo possuem atualmente custos elevados para a purificação do esgoto, porém com a falta cada vez

maior de água, se torna fundamental a utilização de água de reúso de forma direta, e o monitoramento da qualidade da mesma é essencial para que seja um recurso hídrico seguro e acessível (LEVERENZ et al., 2011).

As tecnologias de tratamento das águas necessitam de um conjunto de processos físico-químicos com o objetivo de retirar matéria orgânica, partículas suspensas e coloidais, microrganismos e outras substâncias prejudiciais à saúde humana (LIBÂNIO, 2010).

Para tanto as Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) e de Água (ETA) brasileiras não conseguem retirar totalmente os microrganismos e não foram projetadas especificamente para eliminar poluentes químicos, tornando estas espécies químicas capazes de serem transportadas através do sistema de tratamento sem sofrer ação dos mecanismos de remoção. Geralmente, são empregados nas ETEs processo primário, secundário e, opcionalmente, processos terciários de tratamento. Este último é utilizado quando se faz necessário um efluente de melhor sanitária, como reúso de água, pois ainda consegue remover patógenos mais resistentes às etapas anteriores. Mesmo assim, não se demonstra eficaz para a total remoção de poluentes químicos, como poluentes orgânicos (LUO et al. 2014).

Uma das formas de tratamento para a produção de água de reúso é a partir de uma Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) e depois por uma Estação de Tratamento de Água de Reúso (ETAR). O processo comumente utilizado para tratar o esgoto sanitário passa pelas etapas de uma ETE da seguinte forma: 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, remoção da matéria orgânica) e tratamento terciário (lagoas de maturação, remoção de nutrientes como fósforo e nitrogênio, filtração final, desinfecção), e após a avaliação microbiológica e físico-química, de acordo com a Resolução 357/2005, este se torna apropriado para retornar ao ambiente. Para o esgoto tratado ser transformado em água de reúso, o esgoto precisa passar por mais etapas de tratamento, que comumente, são realizadas em Estações de Tratamento de Água de Reúso (ETARs) (MOURA et al., 2020; JORDÃO e PESSÔA, 2014; OENNING JÚNIOR e PAWLOSKY, 2007). Existem diversos tratamentos nas ETARs, tais como: cloração; separação por membranas (microfiltração, ultrafiltração, nano-filtração e osmose reversa); oxidação com ozônio; dióxido de cloro e peróxido de hidrogênio, adsorção em carvão ativado; troca iônica; destilação; eletrólise reversa e precipitação química (PROLAGOS, 2018; MIERZWA, 2005; MANCUSO e SANTOS, 2013; METCALF e EDDY, 2003).

Segundo a norma NBR 13969/97 da ABNT todos os efluentes que tenham como destino final o reúso devem sofrer desinfecção. A água de reúso deve passar pelo processo de desinfecção por adição de cloro. Os métodos de cloração podem ser por gotejamento (hipoclorito de sódio) e por pastilha (hipoclorito de cálcio), ficando a água em contato com o cloro por no mínimo 30 minutos, contudo no caso de hipoclorito devem ser observadas as especificações encontradas na NBR 11887 (ABNT, 2003). Ao final o período da cloração, o esgoto clorado deve conter uma concentração de pelo menos 0,5 mg/L de cloro livre.

Entretanto, além da cloração, a norma recomenda que podem ser feitos outros processos de desinfecção da água de reúso (ABNT, 1997).

O processo de desinfecção mais difundido no Brasil é a cloração, por apresentar vantagens econômicas e favorecer a remoção de microrganismos e compostos químicos. Através do tempo de contato do cloro com o efluente é possível a remoção de hormônios 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol, estrona (PEREIRA, 2011; CHEN et al., 2007), e remoção e/ou transformação química de compostos como sulfametoxazol, bisfenol A, trimetoprim, acetaminofeno, nonilfenol e triclosan (CHEN et al., 2007; HUBER et al., 2005; ALUM et al., 2004). A remoção de hormônios através da cloração está diretamente relacionada à concentração inicial da substância, com o tempo de contato e da presença de cloro residual livre (PEREIRA, 2011). Em Monterey County (CA), nos Estados Unidos a água de reúso para a irrigação de agricultura que são consumidas cruas como alface, brócolis, morangos é tratada por filtração e desinfecção em uma estação com capacidade de 110 mil m³/d (KUBLER; FORTIN; MOLLETA, 2015).

No entanto outras tecnologias são mais eficientes para remoção tanto de microrganismos como de poluentes químicos, como é o caso da ozonização e processos oxidativos avançados, que apresentam resultados bem sucedidos também para o tratamento de águas residuais contendo produtos farmacêuticos e produtos para cuidados pessoais e compostos químicos desreguladores endócrinos (OLLER; MALATO; SÁNCHEZ-PÉREZ, 2011; VIRKUTYTE; VARMA; JEGATHEESAN, 2010). Outra tecnologia para remoção dos microrganismos e poluentes químicos da água são os processos de filtração com membranas por microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose reversa, que são eficientes na retirada de poluentes inorgânicos como, por exemplo, nitrato, arsênico e flúor; e orgânicos como, por exemplo, pesticidas, estrogênios (LUO et al. 2014; BOLONG et al., 2009; NGHIEM et al., 2004; VAN e VANDECASTEELE, 2003). No entanto estes tratamentos de alta qualidade requerem maiores custos de investimentos para construção, operação e

manutenção dos sistemas, o que dificulta a sua implementação em países em desenvolvimento (PRADO e SATO, 2017)

2.7 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DO SOLO PARA USO NA AGRICULTURA

Estima-se que existam mais de 4000 espécies de microrganismos por gramas de solo (MONTESINOS, 2003), dentre estes estão bactérias, fungos, protozoários, algas e nematoides (HINSINGER et al., 20011), sendo as bactérias os organismos de maior número no solo, estas podem ser encontradas em número de 10¹⁴ por m² de solo representando a aproximadamente 50 g de biomassa (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). As bactérias são um dos organismos responsáveis pela ciclagem de nutrientes no solo para liberação às plantas (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003).

Um grupo expressivo de bactérias no solo são os coliformes, estes são, inclusive, bioindicadores de contaminação por fezes nos esgotos domésticos, pois estão presentes nas fezes humanas, e indicam outros microrganismos patogênicos como vírus e outras bactérias (CUTOLO e ROCHA, 2000). A concentração dos coliformes totais e termotolerantes no solo tem grande importância como bioindicadores da existência de outros microrganismos causadores de doenças como, causadores da febre tifoide, febre paratifoide, disenteria bacilar e cólera (CUTOLO e ROCHA, 2000). Dentre os coliformes estão as bactérias *Escherichia coli*, que conseguem sobreviver e multiplicar-se em temperaturas de 22 a 37 °C por um período de até dois meses no solo (ELVING, 2009). Segundo Mubiru et al. (2000) em solos úmidos sob temperaturas entre 6,5 e 19,6 °C podem ser detectadas, aproximadamente, por até noventa e nove dias. Bactérias podem se adaptar ou “naturalizar” no ambiente (ISHII; SADOWSKY, 2008). Porém a sobrevivência destas bactérias depende de diversos fatores como o tipo e a densidade dos microrganismos no solo, condições físico-químicas do solo, condições atmosféricas, interações biológicas (UNC et al., 2004).

O solo possui uma rica microbiota especializada em processos de mineralização da matéria orgânica para disponibilizar nutrientes essenciais para o desenvolvimento das plantas. Como o solo é formado por parte orgânica e inorgânica provenientes das rochas e minerais também, os microrganismos presentes no solo são responsáveis pelas reações químicas para decomposição da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes. Por isto, o solo tem grande

capacidade de inativar substâncias potencialmente prejudiciais ao ambiente, através de reações químicas e de processos microbiológicos de decomposição (ERTHAL et al., 2010).

“A remoção de microrganismos como bactérias, vírus, protozoários e helmintos (ovos), contidos nos esgotos, por meio da disposição no solo, é efetuada por sedimentação, filtração na camada orgânica superficial do terreno e da vegetação, por adsorção às partículas do solo, por dessecação durante os períodos secos, pela radiação, pela predação e pela exposição a outras condições adversas” (MANCUSO e SANTOS, 2013, p. 383).

Além disto o solo por meio da filtração física consegue remover microrganismos com tamanhos maiores que 25 μm (bactérias, helmintos, protozoários). E no caso dos vírus, a adsorção às partículas do solo é eficiente para a remoção destes microrganismos. Outro fator importante é a competição que ocorre com os microrganismos nativos do solo, que conseguem eliminar os novos que foram inseridos, por meio de esgotos, por exemplo. E depois de eliminados são convertidos em nutrientes ao solo como dióxido de carbono e amônia. Nas camadas mais superficiais do solo a ação dos microrganismos decompositores é mais eficaz por conta dos processos aeróbios mais intensivos (MANCUSO e SANTOS, 2013).

As plantas conseguem adquirir os nutrientes do solo mediante o crescimento de suas raízes que podem interagir com os componentes bióticos e o abiótico do solo como os nutrientes. Esta interação se dá de acordo com as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (HINSINGER et al., 2011).

No entanto a planta tem a capacidade de evitar a entrada de microrganismos em seus tecidos, mesmo expostas a fungos, bactérias, vírus e helmintos (PASCHOLATI, 1994). As plantas não possuem sistema imunológico, e possui característica de imobilidade, por isto desenvolveram em suas células defesas contra patógenos (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000), por meio das suas características estruturais que são barreiras físicas; reações bioquímicas e produzem substâncias que são tóxicas ou inibem o patógeno (AGRIOS, 2004).

No ambiente os microrganismos sofrem com as condições ambientais que nem sempre são favoráveis aos mesmos, por isso acaba ocorrendo o decaimento natural no ambiente. Com relação ao decaimento bacteriano no solo algumas condições favorecem como: radiação solar, temperatura, condições físico-químicas do solo, toxicidade de outras bactérias, predação. Essas condições são variáveis dependendo do clima de cada local, e favorecem o decaimento natural de bactérias, principalmente, a temperatura e a radiação solar (BEDA, 2011). Por isso

estudos de decaimento de bactérias são fundamentais para conhecer o comportamento desses microrganismos em cada ambiente.

A decomposição do material parental do solo e matéria orgânica resultam em propriedades químicas do solo de extrema importância para fertilidade e fornecimento de disponibilidade de nutrientes às plantas (SCHOENHOLTZ, MIEGROET, BURGER, 2000). Os parâmetros químicos relativos à fertilidade são os teores de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio e os outros são acidez, capacidade de troca de íons, matéria orgânica do solo, saturação bases, entre outros. Um elemento essencial é o nitrogênio, sendo importante para aumentar o desenvolvimento dos vegetais, pois está relacionado com a produção de novas células e crescimento dos tecidos vegetais, por isto é bastante importante para a produção agrícola ter a presença deste elemento no solo (SOUZA e FERNANDES, 2006). Outro nutriente fundamental às plantas se trata do fósforo, pois está envolvido com os processos metabólicos como transferência de energia, síntese de ácidos nucleicos, glicose, respiração, ativação e desativação de enzimas (FERNANDES, 2006). Quando o solo está ácido tem maior capacidade de reter o fósforo, enquanto que em solos alcalinos, a fixação ocorre devido à presença de cálcio, causando baixa eficiência na solubilização de fertilizantes fosfatados (GYANESHWAR et al., 2002).

Nesse sentido, nota-se que as análises físico-químicas do solo são necessárias para caracterização e análise do comportamento do solo no longo prazo, tendo em vista que isso auxilia no uso e manejo do solo, além de estratégias para correção do mesmo (BARRIOS, COUTINHO, MEDEIROS, 2011).

É necessário salientar que os processos biológicos são afetados diretamente por muitas propriedades químicas. Assim, esses processos juntamente com os processos físicos determinam se o solo é capaz de fornecer e reter nutrientes, além da mobilidade e disponibilização de água. O solo pode apresentar não só boas condições, como más em virtude da degradação em função das ações antrópicas (VEZZANI e MIELNICZUK, 2009). A degradação do solo pode ser ocasionada pela falta de conservação, seja pelo mau uso ou ocupação desordenada, o que influenciam gerando problemas como erosão, poluição, deslizamentos ou assoreamento de cursos d'água (MUGGLER, PINTO-SOBRINHO, MACHADO, 2006). Como o solo é considerado um vetor de transmissão de doenças, algumas bactérias como *Escherichia coli* e *Salmonella* podem ser encontradas no mesmo (SOTERO-MARTINS et al., 2013), estas bactérias podem causar gastroenterites nos humanos (EPA, 2012; SANZ e GAWLIK, 2014; GUION et al., 2008; OWINO et al., 2016). Além disso, não há uma normativa sobre a qualidade sanitária do solo no Brasil, assim como não há

para utilização na agricultura. Existem apenas legislações pontuais normativas regionais como a Lei nº 7666 de 28 de agosto de 2017, do Estado do Rio de Janeiro, que estabelece valores de referência de saúde ambiental para a qualidade das areias utilizadas em parques, praças, tanques, clubes, creches e escolas para fins de lazer, recreação e atividades educativas, esportivas e culturais, em áreas públicas e privadas do estado do Rio de Janeiro.

Existem indicadores de qualidades do solo que podem ser classificados como físicos (CRITTENDEN et al., 2015), químicos (CHERUBIM et al., 2015), biológicos (GARBISU et al., 2011) e visuais (MELLONI et al., 2008; NIERO et al., 2010), sendo o último um dos métodos mais simples, pelo fato de apresentarem resultados objetivos e satisfatórios (ARRUDA et al., 2012). As evidências visuais indicam se a qualidade do solo está ameaçada ou não, e podem ser através da resposta de plantas (ALVES et al., 2015). Desta forma, as plantas podem ser bioindicadoras da qualidade do solo acompanhando o comportamento da mesma através de diversos fatores, como o crescimento e o grau de acamamento. Este último é um fator definido que é caracterizado pela queda ou arqueamento das plantas, sendo ocasionado pela flexão da haste ou má ancoragem das plantas provocando uma maior proximidade da planta ao solo (BALBINOT-JÚNIOR, 2012).

3 JUSTIFICATIVA

Há grande urgência em buscar fontes alternativas seguras de água para a realização das atividades humanas frente à escassez de água para abastecimento público, bem como para promover a sustentabilidade. As práticas agrícolas são responsáveis pelo grande consumo de água doce disponível no Brasil e no mundo, assim a utilização da água de reúso na agricultura pode se tornar uma importante estratégia na gestão da água (HANDAM et al., 2021b). Além disto, a água de reúso possui características como matéria orgânica e nutrientes que podem, com o manejo adequado, trazer benefícios quando aplicados na produção agrícola (EPA, 2013). Este trabalho pode contribuir para uma melhor destinação da água de reúso, com dados sobre a segurança para uso na agricultura. Trata-se de um estudo pioneiro no Brasil, que oferece perspectivas para uma mudança nas políticas públicas voltadas para águas e efluentes que pode ser destinado para o agronegócio.

Vale ressaltar que a água para ser utilizada no consumo humano deve estar dentro de padrões de qualidade sanitária estabelecidos em leis. Contudo, no Brasil ainda não há uma legislação específica para água de reúso, que determine padrões adequados para avaliar a eficiência do tratamento. A pesquisa pode auxiliar com dados para subsidiar uma legislação nacional de água de reúso para utilização na agricultura, que contenha os padrões de qualidade sanitária, e formas de tratamento para sua produção. E uma vez implementada a legislação, os Estados deverão adotar medidas e políticas públicas para produzir e utilizar água de reúso, resultando no aumento de água para irrigação da agricultura, assegurando uma fonte alternativa de água segura que não afete a saúde humana e ambiental.

4 PERGUNTA DA PESQUISA

O emprego da água de reúso na agricultura altera a qualidade sanitária do solo e a saúde ambiental?

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

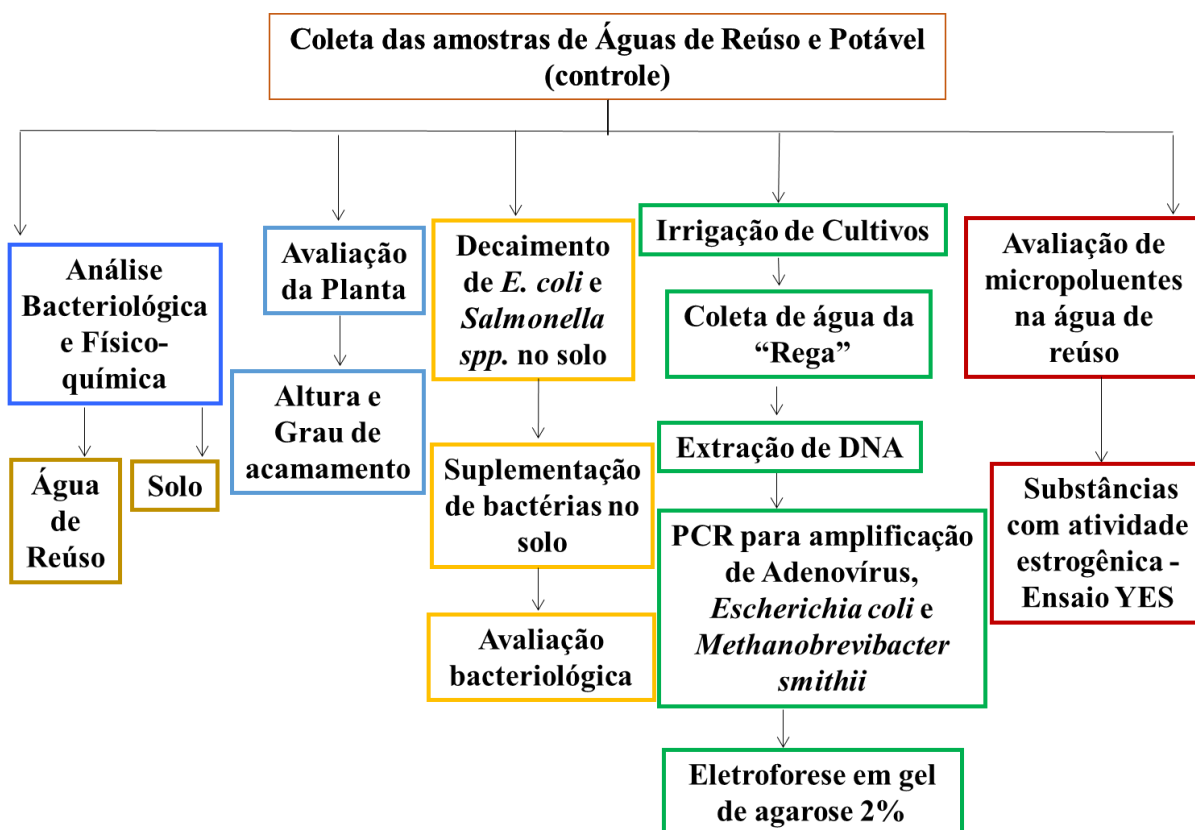
Avaliar a qualidade sanitária da água de reúso de diferentes origens para uso na agricultura com finalidade de emprego sustentável da água de efluentes.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os parâmetros bacteriológicos e físico-químicos das amostras de água de reúso e do solo utilizado;
- Analisar a presença de bioindicadores moleculares de contaminação na água de reúso e indiretamente avaliar os efeitos desse tipo de água sobre a microbiota do solo;
- Avaliar o desenvolvimento da planta (hortaliça, *Petroselinum crispum*) durante o cultivo como bioindicadora indireta da qualidade de nutrientes no solo;
- Avaliar o decaimento de bactérias (*Escherichia coli* e *Salmonella spp.*) no solo irrigado com água de reúso;
- Avaliar a presença de poluentes na água de reúso como resquício de elementos do esgoto sanitário.

6 METODOLOGIA

6.1 FLUXOGRAMA DAS ETAPAS REALIZADAS DURANTE A METODOLOGIA DO ESTUDO



6.2 COLETA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA DE REÚSO, DE ÁGUA POTÁVEL E DO SOLO UTILIZADO NOS ENSAIOS

As amostras de água de reúso obtidas foram coletadas de três procedências diferentes, e por razões legais não foram descritos os nomes das empresas, foram denominadas nesse trabalho da seguinte forma:

- “Amostra de água de reúso clorada” – foi a proveniente de uma estação de tratamento de esgoto (ETE) da cidade do Rio de Janeiro, RJ, cujo efluente tratado dentro da ETE (tratamentos primário e secundário) foi na sequência submetido ao processo de

cloração dentro de carro-pipa da companhia de saneamento (desinfecção com o cloro ocorre em um período de no mínimo 30 minutos, na concentração final de 0,5 ng/L, conforme Norma ABNT (1997). A amostra foi coletada no dia 15 de março de 2017.

- “Amostra de água de reúso polida” – foi a obtida de uma estação de tratamento de água de reúso (ETAR) da Região dos Lagos do Rio de Janeiro, RJ, cujo o efluente do esgoto tratado em ETE (tratamentos primário e secundário), e passou por mais três etapas de tratamento (filtração, ultrafiltração e osmose reversa). A amostra foi coletada no dia 22 de novembro de 2017.
- “Amostra de água de reúso biológica” – foi a proveniente de quatro sistemas de filtro biológico e físico (quatro residências que tinham sistema para tratamento de águas cinzas), de projeto de utilização de água de reúso em agricultura familiar do Estado do Ceará, essa amostra se caracterizou como uma amostra composta, sendo coletada no dia 10 de outubro de 2017. Para produção desta água de reúso, as águas cinzas (esgoto vindos de chuveiro, lavatório, pia de cozinha, tanque ou máquina de lavar, com exceção de vaso sanitário), passaram por um sistema de filtragem por mecanismos físicos (camada de raspa de madeira, areia lavada, brita e seixo) e biológicos, sendo a matéria orgânica biodegradada por população de microrganismos e minhocas (*Eisenia foetida*), em que ocorreu a retirada de poluentes e depositada em reservatório (POBLETE, 2010).

E foi coletada e utilizada água potável como controle nos experimentos, proveniente da água potável da torneira do Laboratório de Biotecnologia e Saúde Ambiental (BIOTECSA) do Departamento de Biologia Celular da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Foram utilizados 5,0 litros ($DP \pm 0,5$) de água de reúso e de água potável coletadas em galões de polipropileno, que possui a composição de polipropileno, devidamente esterilizados (sabão extran 5% enxague 10 vezes, para total remoção do sabão; rinsado acetona P.A.; enxaguado 5 vezes com água deionizada; rinsado com etanol P.A.; enxague 3 vezes com água deionizada), para serem utilizados para a irrigação dos cultivos.

Para as análises físico-químicas foram coletadas amostras de água de reúso em garrafas plásticas de 500 mL, e armazenadas em geladeira até o momento das análises. Para análises colimétricas 100 mL de água foram coletados em tubos tipo falcons estéreis, e armazenados em geladeira por até duas semanas. Para a determinação da presença de substâncias com atividade estrogênica foram coletados 2 litros de amostras em frasco de vidro âmbar, e foram mantidas em freezer $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ no laboratório, para realização das análises. Todas as amostras foram transportadas para o laboratório dentro de caixa de transporte, contendo

placa de gelo para melhor conservação, no caso de permanência de mais de 4 horas em campo. Vale ressaltar que as coletas das amostras foram por amostragem de conveniência, mas que garantiram três diferentes tipos clássicos de origens de água de reúso, apenas o tipo de origem industrial não foi considerado nesse trabalho (Figura 2).

Foi utilizado solo comercial da marca Terral (terra preta), proveniente da cidade de Ihauma, Minas Gerais, MG. Todo o experimento foi conduzido com o mesmo solo proveniente do fornecedor, da cidade de Ihauma, Minas Gerais, MG, do mesmo lote. Antes da coleta de solo para realização das análises, o mesmo foi homogeneizado dentro do saco.

Figura 2 – Ilustração do momento da coleta de uma amostra de água de reúso.



Fonte: própria autora.

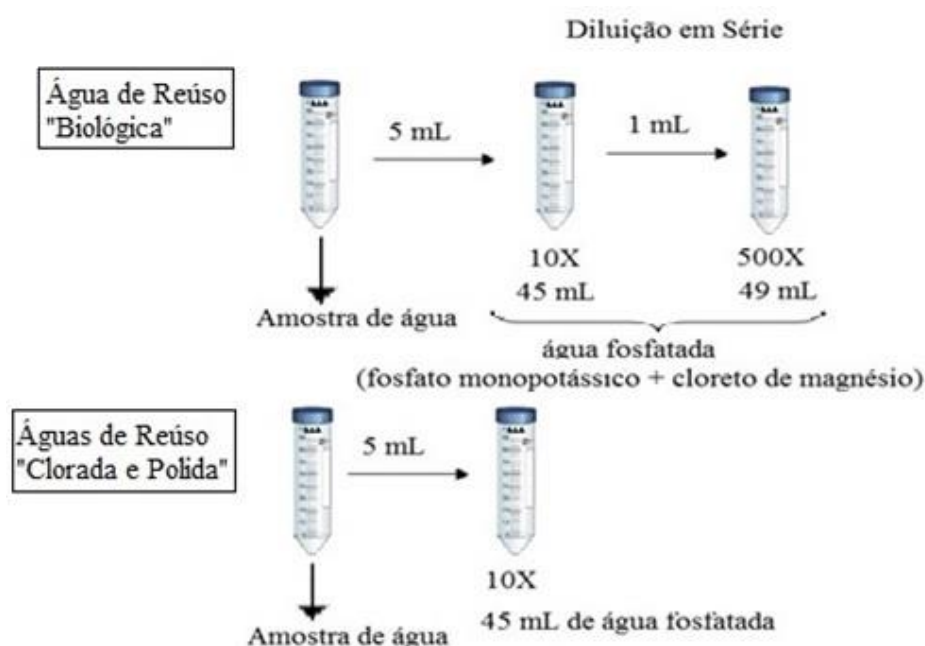
6.3 PROCESSAMENTO LABORATORIAL PARA ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DE ÁGUA DE REÚSO

As análises bacteriológicas e físico-químicas das amostras de água de reúso coletadas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Saúde e Saneamento Ambiental (DSSA) da ENSP, FIOCRUZ, e no Laboratório de Biotecnologia e Saúde Ambiental (BIOTECSA) do Departamento de Biologia Celular da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

6.3.1 Procedimentos para Análises Bacteriológicas das Amostras de Água de Reúso

Após a coleta de água de reúso foi realizada análise bacteriológica - níveis de coliformes totais (CT), de *Escherichia coli* (EC). A metodologia foi realizada conforme o Manual da Merck (2010), utilizando o meio de cultura cromogênico indicador Chromocult Coliform Agar (Cat. No. 1.10426.0100/500 Merck®), combinado com o método de Membrana Filtrante descrito em *Standard Methods for the Examination of the Water and Wasterwater* (APHA, 2017). O processamento laboratorial das amostras foi realizado em duplicata, sendo feitas diluições da seguinte forma: “amostra de água de reúso biológica” - passou por diluição de 1/500, que consistiu de 5 mL de amostra em um falcon contendo 45 mL de água fosfatada, na sequência, uma alíquota de 1 mL desta primeira diluição foi transferida para outro falcon contendo 49 mL de água fosfatada, de acordo com Handam et al. (2020); “amostras de água de reúso clorada e polida” passaram por uma diluição de 1/10, que consistiu de 5 mL da amostra de água em um falcon com 45 mL de água fosfatada (HANDAM et al., 2020) (Figuras 3 e 4). Foi retirada alíquota de 10 mL para análise pelo método de membrana filtrante.

Figura 3 – Diluições das amostras de água de reúso para análise bacteriológica.



Fonte: própria autora.

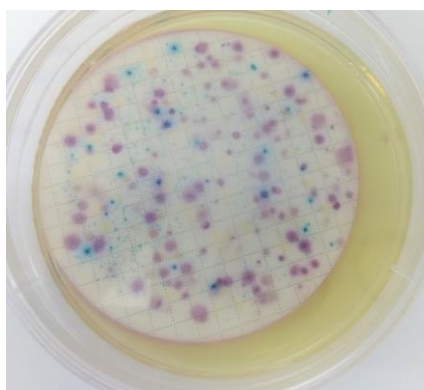
Figura 4 – Equipamentos para a realização da análise bacteriológica: membrana quadriculada, meio de cultura, copo para sistema de filtração, e bomba a vácuo.



Fonte: própria autora.

No momento da leitura o meio de cultura cromogênico Chromocult da Merck® diferencia as colônias, sendo de *Escherichia coli* com coloração azul/violeta, os coliformes totais com coloração salmão/avermelhado. O total de colônias nas colorações vermelhas e azuis representam a quantificação dos coliformes totais. Os coliformes podem ser identificados pela capacidade do substrato enzimático de detectar β -D-galactosidase (APHA, 2017), enquanto que *E. coli* produz as duas enzimas β -D-galactosidase e β -D-glucuronidase, e são facilmente diferenciadas dos outros coliformes pela coloração azul (MANAFI, 2000; MERCK, 2010) (Figura 5).

Figura 5 – Membrana quadriculada com colônias de *Escherichia coli* com coloração azul/violeta, os coliformes totais com coloração salmão/avermelhado.



Fonte: própria autora.

Os dados da contagem das colônias de coliformes totais e *E. coli* foram inseridos em planilha Excel, considerando as diluições nos cálculos estatísticos que foram realizados (média e desvio padrão). A quantificação bacteriológica foi realizada por unidades formadoras de colônia (UFC) por mL de água de amostra analisada (HANDAM et al., 2020).

Foi verificado o resultado da análise bacteriológica da água potável, realizado por Moura (2019), que foi a mesma fonte de água potável utilizada no presente estudo como água controle dos ensaios. Este resultado foi comparado com as qualidades sanitárias dos tipos de amostras de água de reúso “clorada, polida e biológica”.

6.3.2 Procedimentos para Análises dos Parâmetros Físico-Químicos das amostras de Água de Reúso

As amostras de água de reúso coletadas para as realizações dos experimentos do estudo foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do DSSA/ENSP, FIOCRUZ.

As avaliações físico-químicas da água de reúso foram realizadas de acordo com *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2017). Os parâmetros físico-químicos avaliados nas amostras de água de reúso foram: pH, alcalinidade total, turbidez, cloro residual livre, nitrogênio nitrito, cloretos, dureza total, condutividade, fluoreto, nitrogênio nitrato, e sulfato.

Em campo no momento da coleta de água de reúso foram realizadas as medidas de pH e dosagem de cloro total e residual livre. Os outros parâmetros físico-químicos foram realizados em laboratório.

As metodologias correspondentes a cada parâmetro físico-químico foram: Titulometria com indicadores para alcalinidade total; Titulometria com Sal Dissódico de Etilenodiamina Tetracético (EDTA) para dureza total; Metodologia instrumental para pH; Comparação visual – DPD para cloro total e residual livre; Diazotação para nitrogênio nitrito; Titulometria de Mohr para cloretos; Metodologia instrumental para condutividade; Espectrofotometria para sulfato, nitrato e fluoreto; e Nefelometria para turbidez (APHA, 2017).

Foram verificados os resultados das análises físico-químicas da água potável realizado por Moura (2019), que foi a mesma fonte de água potável utilizada no presente

estudo como água controle nos ensaios. Este resultado foi comparado com as qualidades sanitárias dos tipos de amostras de água de reúso “clorada, polida e biológica”.

6.3.3 Processo de Avaliação da Qualidade Sanitária da Água de Reúso para Agricultura de acordo com Normatizações Brasileiras e Internacional

Para verificar a qualidade sanitária das amostras de água de reúso para a irrigação da agricultura, quanto aos parâmetros colimétricos e físico-químicos, foi verificado o trabalho de levantamento das normativas nacionais e internacionais realizado por Moura et al. (2020).

Depois, foram verificados e comparados os parâmetros de qualidade sanitária (microbiológicos e físico-químicos) para reúso agrícola descritos nas normativas do Brasil e nas principais normativas dos Estados Unidos, pois estas últimas normativas são mais completas quanto a qualidade sanitária de água de reúso para agricultura. Dessa forma, para os critérios de elegibilidade utilizados para inclusão de normativas brasileiras foram consideradas as normatizações dos três níveis federal, estadual e municipal, em vigência até o período de consulta (junho de 2021), e que tivessem descritos parâmetros de qualidade (microbiológicos e físico-químicos) para reúso agrícola. Foram utilizados os seguintes descritores: “água de reúso e agricultura” e “reúso agrícola”, “uso de águas residuais”. Os critérios de exclusão foram as normativas que não possuíam parâmetros de qualidade microbiológicos e físico-químicos, e que continham os termos e palavras-chave na língua portuguesa brasileira “água de chuva”, “água pluvial”, “água reciclada” (HANDAM et al., 2021b).

As normativas americanas consideradas na comparação com as normativas brasileiras foram “*Guidelines for Water Reuse*” da *U. S. Environmental Protection Agency - EPA* (EPA, 2012), e “*Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater*” da *World Health Organization – WHO* (WHO, 2006). As normativas Brasileiras verificadas com padrões de qualidade foram: Norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 13969/97 (ABNT, 1997); Resolução Estadual do Conselho Estadual de Recursos Hídricos (CONERH) da Bahia nº 75 de 2010 (BAHIA, 2010); e Resolução do Conselho Estadual do Meio Ambiente (COEMA) do Ceará (CEARÁ, 2017) nº 2 de 02 de fevereiro de 2017 (HANDAM et al., 2021b).

Mediante o estudo mencionado acima, os resultados bacteriológicos encontrados nas amostras de água de reúso foram avaliados, de acordo com o padrão nacional existente, estabelecido na Norma NBR da ABNT 13.969/1997 (ABNT, 1997), classe 4, que define padrão de coliformes termotolerantes (*Escherichia coli*) para reúso agrícola. E para fins de comparação e discussão, os resultados foram comparados com a Resolução Estadual do Ceará 2/2017 (CEARÁ, 2017), e a Resolução Estadual da Bahia nº 75 de 2010 (BAHIA, 2010). Os valores dos padrões da norma ABNT (5.000 NMP/100 mL) e da Resolução do Ceará 2/2017 (1.000 NMP/100 mL) foram convertidas para valores em UFC/mL, considerando que a quantificação em números mais prováveis (NMP) é 2,167 vezes maior do que em UFC (SOTERO-MARTINS et al., 2017), conforme dados estatísticos observados no trabalho de Gronewold e Wolpert (2008). Portanto, o padrão de coliformes termotolerantes da Resolução do Ceará 2/2017 foi convertido para 4,6 UFC/mL, e da norma ABNT 13.969/97 foi convertido para 23 UFC/mL. Como o padrão estabelecido na Resolução Estadual nº 75 de 2010 da Bahia está em UFC/100mL, o valor foi convertido para UFC/mL, ou seja, foi convertido para 100 UFC/mL.

Os resultados das análises físico-químicas foram comparados com as normatizações que possuem padrões dos parâmetros estudados. Por isso foram utilizadas como referências as normatizações estaduais brasileiras - Resolução estadual do Ceará nº 2/2017 (CEARÁ, 2017), e Resolução Estadual da Bahia nº 75/2010 (BAHIA, 2010). Quando não existia padrões nacionais recomendados para os parâmetros estudados foi utilizada como referência a normativa internacional dos Estados Unidos da América “*Guidelines for Water Reuse*” da *U. S. Environmental Protection Agency - EPA* (EPA, 2012), que possui mais parâmetros de qualidade sanitária de água de reúso para agricultura. Estes padrões podem auxiliar a elaboração de padrões de qualidade de água de reúso para agricultura para a normativa Brasileira, pois são estabelecidos baseados em estudos científicos. E como não haviam padrões para reúso agrícola dos parâmetros estudados dureza total, alcalinidade total, nitrogênio-nitrito e sulfato, utilizou-se como indicadora de qualidade, a lei de potabilidade, Portaria de Consolidação do Ministério da Saúde nº 5 de 2017 (BRASIL, 2017). Para o parâmetro dureza total foi verificada classificação do grau de dureza, por meio do documento da Embrapa “Qualidade da Água para irrigação” (ALMEIDA, 2010), que foi utilizado para avaliação do mesmo.

6.4 PROCESSAMENTO LABORATORIAL PARA ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DO SOLO UTILIZADO NO ESTUDO

As análises bacteriológicas e físico-químicas do solo utilizado no estudo foram realizadas no Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (LAPSA) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ.

Foi utilizado solo comercial da marca Terral (terra preta), proveniente da cidade de Ihauma, Minas Gerais, MG. Todo o experimento foi conduzido com o mesmo solo proveniente do fornecedor, da cidade de Ihauma, Minas Gerais, MG, do mesmo lote.

Foi realizada análise bacteriológica do solo (CORREA, 2015), através da técnica de membrana filtrante (APHA, 2017), usando meio de cultura cromogênico Chromocult Coliform Agar (Cat. No. 1.10426.0100/500 Merck®), que revela a quantidade de *Escherichia coli*, que faz parte do grupo de coliformes termotolerantes, e coliformes totais. Antes da realização do método de membrana filtrante, o solo foi homogeneizado dentro do saco, sendo retirado 30 g de solo, e em duplicata, foi feita diluição inicial em 200 mL de solução tampão de água fosfatada, e depois por diluição em série de 1/500, conforme descrito em Handam (2016). O resultado foi quantificado em Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/g (Figura 6).

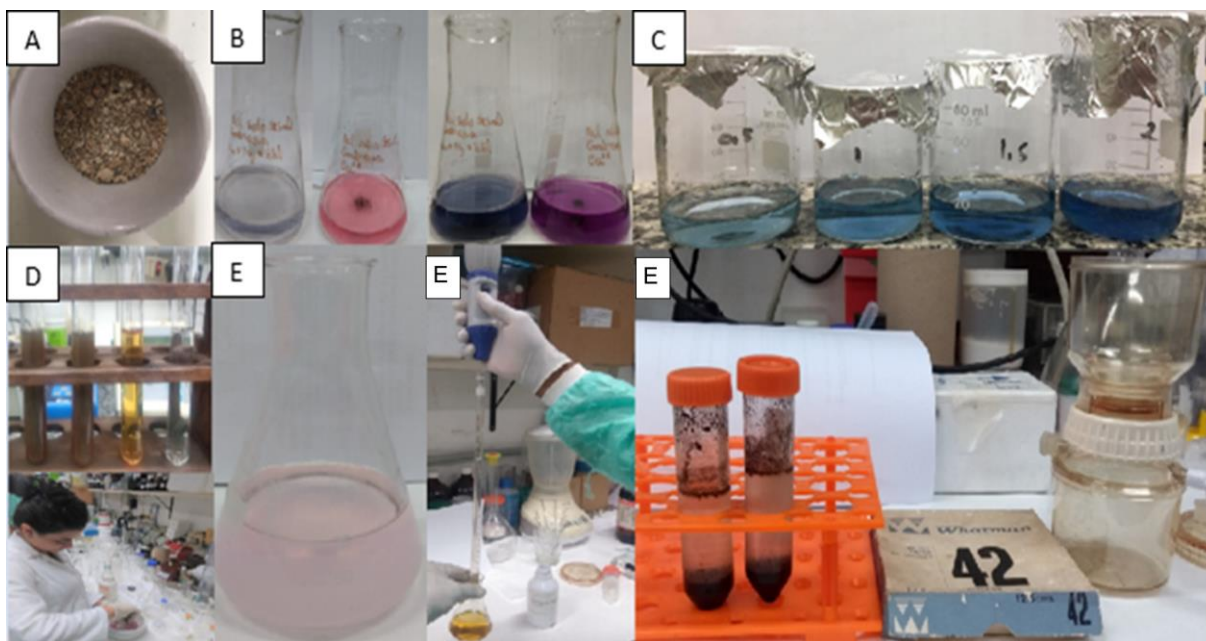
Figura 6 – Diluição em série do solo para análise bacteriológica.



Fonte: própria autora.

Foram realizadas análises físico-químicas por meio de metodologias adaptadas baseadas no “Manual de métodos de análise de solo” (EMBRAPA, 2017) (**APÊNDICE A**). Os parâmetros físico-químicos avaliados foram: cálcio e magnésio trocáveis, cálcio trocável, Magnésio trocável; pH; Nitrogênio amônia; Condutividade; Acidez trocável; Saturação; Fósforo; e Matéria orgânica (Figura 7).

Figura 7 - Ilustrações de métodos físico-químicos realizados para solo.



Legenda: (A) Matéria Orgânica; (B) Cálcio e magnésio trocáveis; (C) Fósforo; (D) Nitrogênio Amônia; (E) Acidez Trocável. Fonte: própria autora.

Foi comparado o resultado bacteriológico de acordo com o padrão estabelecido na Lei nº 7666 de 28 de agosto de 2017 do estado do Rio de Janeiro (RIO DE JANEIRO, 2017). Esta lei estabelece padrões de parâmetros microbiológicos e parasitários para avaliação da saúde ambiental relacionada a qualidade das areias utilizadas para recreação no estado do Rio de Janeiro, não sendo específica para a agricultura. Esta lei foi utilizada, pois não há lei federal no Brasil sobre a qualidade sanitária exigida para o solo utilizado na agricultura.

Os resultados das análises físico-químicas foram comparados com os valores de qualidade recomendados pelos documentos da Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária – Embrapa: “Guia Prático para Interpretação de Resultados de Análises de Solo” (EMBRAPA, 2015), e “Manual de métodos de análise de solo” (EMBRAPA, 2017).

6.5 PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISES DO EFEITO DA IRRIGAÇÃO COM ÁGUA DE REÚSO EM SOLO DE CULTIVO

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia e Saúde Ambiental (BIOTECSA) do Departamento de Biologia Celular da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), para simulação, em ambiente controlado, da utilização da água de reúso em irrigação voltada para a agricultura.

6.5.1 Cultivo de Plantas em Laboratório

Foi elaborado um sistema, construído com estrutura de madeira, com rede elétrica e hidráulica adaptado para a bancada do laboratório, com vasos para cultivo de plantas, contendo irrigação por gotejamento e iluminação controlada, conforme citado abaixo.

Os cultivos foram realizados com temperatura ambiente controlada através de ar condicionado (24°C), e foi verificada por meio de termômetro, e foto período de iluminação por vaso (300 Lumens, produzidos especificamente por lâmpada de Led de potência 3 Watt) controlados. De acordo com Rothenberger (2021), a distância de 30 cm entre a planta e a fonte de luz, e pelo menos 260 lúmens de iluminação é favorável ao crescimento das plantas. Os cultivos ficaram 12 horas expostos a iluminação direta e 12 horas sem receber iluminação direta (luzes do sistema apagadas).

Os vasos utilizados foram frascos de vidro esterilizados (dimensões: altura 10 cm, largura 8 cm, diâmetro 8 cm), e possuíam uma abertura de 0,5 cm de diâmetro na parte inferior, para o escoamento da água de irrigação que passou pelo solo, sendo denominada de água de rega. Embaixo de cada vaso foi colocada uma base para apoio para o vaso, essa estrutura era constituída em plástico maleável, e permitiu o posicionamento do vaso na altura da torneira, para receber o gotejamento no nível do solo, e ainda permitiu colocar um recipiente em embaixo do vaso de cultura, para receber a água proveniente da rega.

O sistema de irrigação foi por gotejamento controlado, direcionado para irrigação do solo dos cultivos. Previamente foi realizado um experimento de padronização de gotas por segundos, avaliando a umidade do solo. Foi feito cálculo de gotejamento realizado com todas as torneiras gotejando por 5 minutos (1 gota de água por 40 segundos) e ao final foi realizada

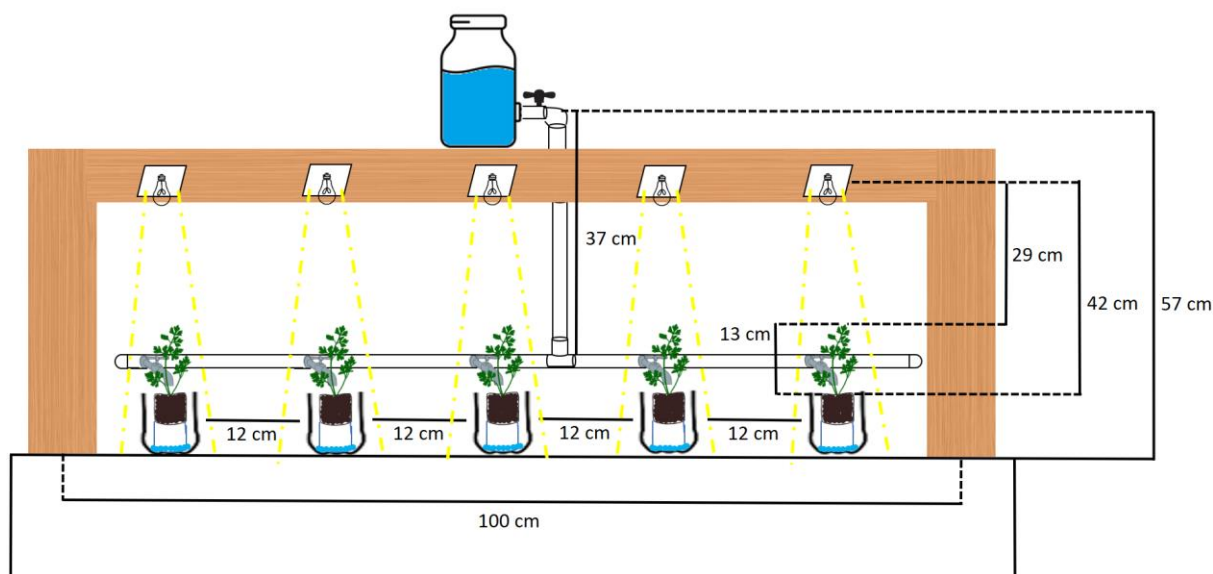
uma média, e depois foi feito o cálculo matemático, regra de três, para que o valor do gotejamento seja extrapolado para o dia inteiro de cultivo. O controle do gotejamento de água por vaso foi realizado de modo a fornecer 15,59 mL ($\pm 6,22$) de água ao longo de 24 horas de cultivo, sempre mantendo o solo úmido. A cada dois dias de experimento foi feita a verificação para que todas as torneiras estivessem gotejando da mesma forma, de modo a garantir um volume médio de água de rega uniforme em todos os vasos, e o volume de água dentro do reservatório fosse suficiente para a realização do experimento em batelada (processo de um conjunto contínuo).

Os experimentos foram realizados com o cultivo da hortaliça *Petroselinum crispum*, popularmente chamada de salsa. Cada vaso continha 320 g de solo comercial da marca Terral (terra preta), proveniente da cidade de Ihauma, Minas Gerais, MG. Todo o experimento foi conduzido com o mesmo solo proveniente do mesmo fornecedor, da cidade de Ihauma, Minas Gerais, MG, do mesmo lote.

A hortaliça salsa (*Petroselinum crispum*) foi escolhida para os experimentos de cultivo agrícola, devido a sua resistência às condições ambientais adversas como, por exemplo, à variação de temperatura (entre 10 a 24°C) e iluminação (EMBRAPA, 2013). Além disto, o cultivo desta planta pode durar de dois a três anos (ZÁRATE et al., 2003; FILGUEIRA, 2007). Portanto, a utilização desta planta foi ideal para os períodos que foram conduzidos os experimentos durante a realização do trabalho de avaliação das culturas. A salsa ou salsinha, pertence ao grupo de hortaliças da família das Apiáceas, e é consumida como um dos principais condimentos na culinária brasileira (ESCOBAR et al., 2010).

O sistema para ensaio de cultivo de plantas em laboratório foi construído de modo ficar disposto em duas bancadas do laboratório com as mesmas dimensões (Figura 8).

Figura 8 – Dimensão do sistema elaborado para o desenvolvimento dos ensaios de cultura de plantas controlada em bancada de laboratório.



Fonte: própria autora.

O sistema construído permitiu o cultivo simultâneo de um grupo de dez vasos, cinco vasos para o grupo experimental (irrigado com água de reúso), e cinco vasos para o grupo controle (irrigado com água potável, proveniente da torneira do laboratório). De modo geral, o sistema montado para acompanhamento do efeito da irrigação com água de reúso em solo submetido ou não ao cultivo foi constituído de:

- 8 mudas da hortalica *Petroselinum crispum* (salsa), contendo pelo menos 4 ramas de folhagem. Foram compradas da empresa Agromineira Plantas Nativas, Holambra – SP, CEP 13825-000. Segundo a empresa, as mudas utilizadas foram produzidas de acordo com a resolução SMA 08/2008, com registro no Ministério da Agricultura (RENASEM 012117/2007). As mudas foram germinadas no próprio viveiro da empresa com a semeadura de sementes, e foram colhidas para comercialização, quando chegam a um tamanho de mais ou menos 30 cm (AGROMINEIRA, 2014);
- 2 recipientes de vidro com torneira com capacidade para 3,5 litros cada, para o armazenamento de água que seria conduzida até o solo dos vasos por gotejamento pelo sistema hidráulico acoplado;
- 10 vasos de vidro contendo 10 cm de altura, 6,5 cm de diâmetro de porção superior aberta, com capacidade para 300 mL;

- 10 lâmpadas de LED da marca Led Spot light (300 Lumens, produzido por lâmpada de Led de potência 3 Watt) com iluminação branca fria, ficando disposta uma lâmpada acima de cada vaso por 20 cm de distância da parte superior do vaso;
- 1 Temporizador digital da marca Exatron, para controlar a iluminação, que permitiu realizar os ensaios mantendo 12 horas de iluminação contínua e 12 horas sem iluminação direta na planta ou solo, pelo sistema. O temporizador foi conectado a iluminação da estrutura para realização dos ensaios simultâneos;
- 2 canos de PVC (cano pvc para esgoto de 100 mm), medindo 1 metro cada um. Este foi utilizado para conectar as torneiras e realizar o gotejamento (cano de gotejamento) diretamente no solo, sem que houvesse o contato da água com as folhas das plantas;
- 2 canos de PVC (cano pvc para esgoto de 100 mm), medindo 40 cm cada um, para conectar o cano de gotejamento ao recipiente de vidro;
- 2 placas de Madeira do tipo Pinus, com as seguintes medidas: 1 metro de comprimento por 20 cm de largura, para fazer a colocação das lâmpadas de Led (parte de cima da estrutura);
- 4 placas de madeiras do tipo Pinus com 50 cm de comprimento por 20 cm de largura, destinadas a sustentação das luminárias;
- Pregos e cantoneiras para conectar as madeiras utilizadas para a disposição das lâmpadas;
- 10 torneiras do tipo para jardim da marca Plastilit, que foram utilizadas para fazer a irrigação por gotejamento.

Durante os cultivos da hortaliça *Petroselinum crispum* foram avaliadas as condições físicas do solo, descrita abaixo, a cada dois dias de experimento com o cultivo, e ao final foram calculadas as médias e desvios padrão. As condições do solo avaliadas foram:

- Peso por gramas de solo (g) - os vasos de vidro foram pesados com auxílio de balança (balança eletrônica de precisão 1kg x 0,2g, marca marte científica) sem o cultivo, e durante o experimento foram anotados os pesos encontrados com o cultivo.
- Nível de compactação (altura da coluna de solo) – foi anotada a altura inicial do solo colocado no vaso de vidro, e ao longo do experimento foi registrado a altura (cm) do solo no vaso, com auxílio de uma marcação realizada previamente no vaso de vidro;
- Umidade do solo - medida por meio de papel filtro 80 g com o tamanho de 10 cm de altura e 1 cm de largura durante 1 min em cada vaso, e depois foi medido por cm de altura que a umidade atingiu sobre o papel filtro. A utilização do papel-filtro foi empregada para medir a

umidade do solo, baseada no princípio de que quando o solo úmido entra em contato com o material poroso do papel filtro, ele adsorve a água, que transferida para o papel por capilaridade por uma unidade de tempo, vai indicar a umidade do solo (MARINHO e OLIVEIRA, 2006).

6.6 PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISES DE CONTAMINANTES NA ÁGUA DE REÚSO E AVALIAÇÃO INDIRETA DOS EFEITOS NA MICROBIOTA DO SOLO

As análises foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia e Saúde Ambiental (BIOTECSA) do Departamento de Biologia Celular da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

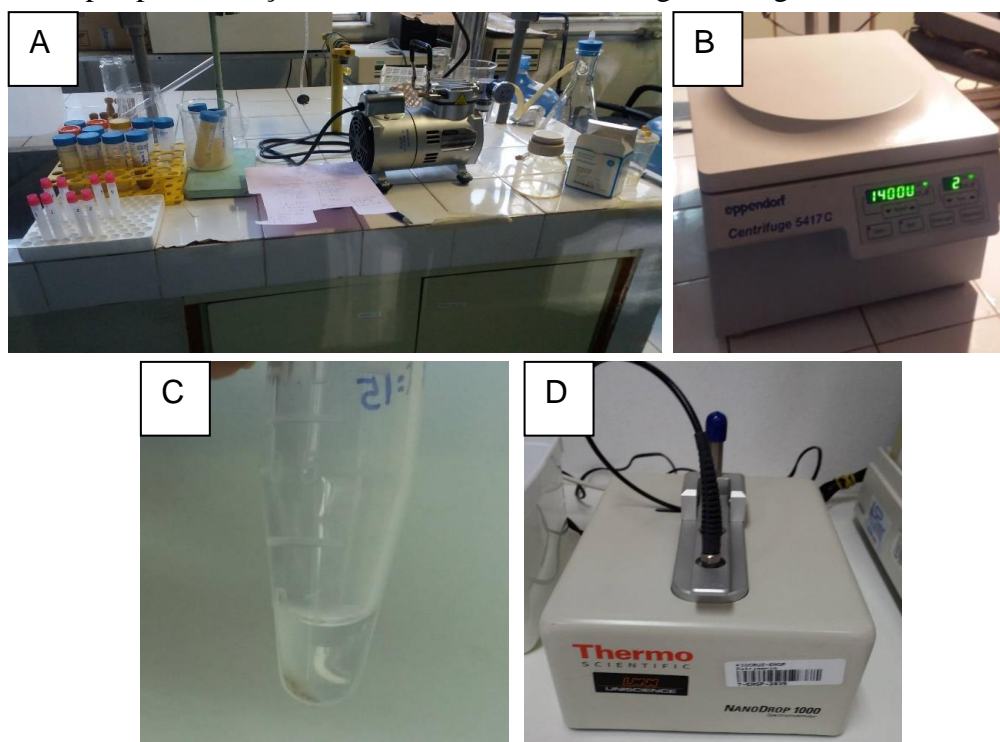
Para verificar a presença de contaminantes na água de reúso, e indiretamente avaliar os efeitos desse tipo de água sobre a microbiota do solo foi verificada a presença e ausência de indicadores de contaminação, descritos na literatura (MOURA, 2019; MCQUAIG et al., 2012; SIDHU et al., 2013; BOWER *et al.*, 2005), por método de biologia molecular de PCR. Primeiramente foram realizadas extrações de DNA das amostras de água de rega, provenientes dos cultivos de hortaliças *Petroselinum crispum* irrigados com água de reúso “clorada, polida e biológica”, assim como dos irrigados com água potável (controle). Para isso, no primeiro e após 15 dias dos ensaios de cultivo de plantas, os vasos foram irrigados com 80 mL de água de 10 em 10 mL diretamente no solo, assim que o primeiro volume era absorvido totalmente pelo solo. Para a coleta de água de rega, embaixo de cada vaso, no dia da coleta, foi colocado frasco de vidro esterilizado para receber a água de rega que saia pelo orifício do vaso. Foi recuperado, para realização dos ensaios, volume médio de 60 mL de amostras de água de rega (desvio padrão $\pm 17,7$), água depois de ter passado pelo solo, dos vasos regados com água de reúso e de vasos regados com água potável (controle dos experimentos). Como não passavam o mesmo volume de água de rega em todos os vasos, o volume mínimo coletado foi de 30 mL de água de rega, portanto para a análise de biologia molecular por PCR foram utilizados 30 mL de água de rega de cada cultivo.

Depois das coletas, os 30 mL de amostras de água de rega de cada vaso do cultivo, foram filtrados em um conjunto de quatro membranas de papel filtro (especificação técnica do papel 80 g), para a retirada dos resíduos grosseiros, com auxílio de bomba à vácuo. Posteriormente, o volume filtrado de 30 mL de amostra foi distribuído em microtubos com

capacidade de 1,5 mL (total de 20 microtubos), e depois as alíquotas dos 30 mL da amostra foram centrifugadas à 14.000 Xg, por 5 minutos à 25°C, por meio de centrífuga da marca Eppendorf Centrifuge 5417C. Depois, em cada microtubo, foram descartados os sobrenadantes, e os precipitados foram passados para um único microtubo, e foram armazenados em freezer a -20°C até o momento da extração de DNA da amostra.

As extrações de DNA das amostras da água de rega foram realizadas através do Kit “PowerWater Sterivex™ DNA Isolation Kit Sample da marca MO BIO Laboratories® (Catalog nº 14600-S), de acordo com as instruções do fabricante adaptadas. O protocolo completo se encontra descrito no **APÊNDICE B**. Foi necessária adaptação, pois dentro do kit de extração não estava incluído o filtro Sterivex™, indicado pelo fabricante. Para realizar a etapa de filtragem indicada pelo fabricante, esta foi realizada conforme está descrito no item 6.4.2. E todos os reagentes do Kit, e as demais recomendações do protocolo do fabricante foram consideradas para a extração de DNA das amostras. Sempre que possível foi quantificado o DNA pelo equipamento NanoDrop™ 1000 spectrophotometers (Figura 9), de modo ter a menor perda possível de material do ensaio, utilizando para quantificação apenas 2 µL de amostra.

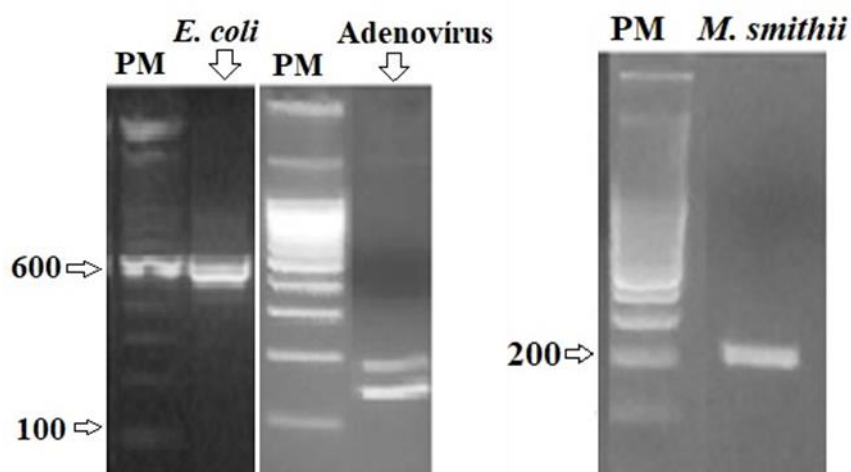
Figura 9 – Etapas para extração de DNA das amostras de água de rega.



Legenda: (A) Filtração das amostras utilizando membranas de papel filtro 80g com auxílio de bomba à vácuo; (B) instrumento para centrifugação das amostras da marca Eppendorf Centrifuge 5417C; (C) exemplo de *pellet* que é acumulado durante a centrifugação em microtubo de 1,5 mL; (D) Espectrofotômetro da marca NanoDrop™ 1000 para quantificação do DNA. Fonte: própria autora.

Foram realizadas Reações em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando-se iniciadores (primers) específicos de microrganismos associados à contaminação hídrica por esgoto doméstico (Moura, 2016), que foram: *Escherichia coli* (*E. coli*), Adenovírus sorotipos 40 e 41 e *Methanobrevibacter smithii* (*M. smithii*). Foram utilizados estes microrganismos (marcadores moleculares), pois os mesmos foram verificados como presentes nas amostras de água de reúso, realizado por Moura (2019), que foram as mesmas amostras de água de reúso utilizadas no presente estudo (Figura 10). Nessa Figura 10 mostra os padrões de bandas esperados, mostrando a presença de cada microrganismo indicador de poluição, que foram avaliados após eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo (0,5µg/mL). Este perfil foi utilizado para comparação com os resultados de PCR e eletroforeses das amostras de “água de rega” coletadas após 15 dias de irrigação com água de reúso nos vasos planta, que foram dois cultivos irrigados por cada amostra de água de reúso “clorada, polida e biológica”, totalizando 6 amostras.

Figura 10 – Padrões de bandas produzidos nas Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) nas amostras de água de reúso “biológica, clorada e polida” (MOURA, 2019), que foram utilizadas para comparação com os resultados de PCR das amostras de água de rega nos ensaios de cultivo do presente trabalho.



Legenda: Padrão de bandas mostrando presença de *Methanobrevibacter smithii*, com 221 pb; *Escherichia coli*, com 600 pb; e Adenovírus, com 137 pb. Peso molecular de 100 kb nos géis de agarose 2%, corados com brometo de etídeo (1 µg.mL⁻¹). Fonte: Moura (2019).

Os pares de iniciadores e protocolos das Reações de PCR do estudo para cada microrganismo alvo indicador de contaminação, se encontram nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Iniciadores (*primers*) que serão utilizados para amplificação dos genes de DNA específicos para *Methanobrevibacter smithii*, e *Escherichia coli* e Adenovírus.

Microrganismo	Iniciadores	Genes	Sequências	Bandas	(TA)*	Referências
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	Mnif-342f	nifH	5'-AACAGAAAACCCAGTGAAGAG-3'	221 pb	52,8°C	Sauer et. al. (2011); Roslev e Bukh (2011); McQuaig et al. (2009); Moura (2019)
	Mnif-363r		5'-ACGTAAAGGCACTGAAAAACC-3'			
<i>Escherichia coli</i>	uidA298F	uidA	5'-AATAATCAGGAAGTGATGGAGCA-3'	600 pb	58°C	Sauer et. al. (2011); Bower et al. (2005); Moura (2019)
	uidA884R		5' CGACCAAAGCCAGTAAAGTAGAA-3'			
Adenovírus	HAdVF HAdV R	HadV 40,41	types 5'-GCCTGGGGAACAAGTTCAGA-3' 5' GCGTAAAGCGCACTTTGTAAG-3'	137 pb	59°C	Wolf; Hewitt; Greening (2010); Moura (2019)

Fonte: própria autora.

Tabela 4 - Protocolos das Reações de PCR do estudo para cada microrganismo alvo *Methanobrevibacter smithii*, e *Escherichia coli* e Adenovírus.

Microrganismos	Volume de Reação PCR	Protocolos PCR para cada amostra	Referências
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	20 µL	<p>Água mili – Q (volume inicial 3,5 µL); Tampão 10X, conc. final de 1,25 µL; Cloreto de magnésio (25mM), conc. final de 5 µL; 0,25 µL de cada iniciador do par (10mM); 0,5 µL de solução dNTP (2mM); 1 µL de TAQ polimerase (5U); 3 µL de DNA extraído.</p>	<p>(Bower et al., 2005) (McQuaig et al., 2012) (Soule et al., 2006) (Harwood et al., 2009) (Moura, 2019)</p>
<i>Escherichia coli</i>	20 µL	<p>Água Milli-Q (volume inicial 1,5 µL); Tampão 10X, conc. final de 1,25 µL; Cloreto de magnésio (25mM), conc. final de 7,5 µL;</p>	<p>(Moura, 2019) (Bower et al., 2005)</p>
Adenovírus	20 µL	<p>0,25 µL de cada iniciador do par (10mM); 0,5 µL de solução dNTP (2mM); 1 µL de TAQ polimerase (5U); 3 µL de DNA extraído.</p>	<p>(Wolf et al., 2010) (Fong et al., 2005) (McQuaig et al., 2009) (Harwood et al., 2009)</p>

Nota: Os protocolos de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) foram obtidos de Moura (2019; 2016), sendo observados os protocolos das demais referências que constam na tabela para cada microrganismo. A taq polymerase utilizada foi da marca Invitrogen. Fonte: própria autora.

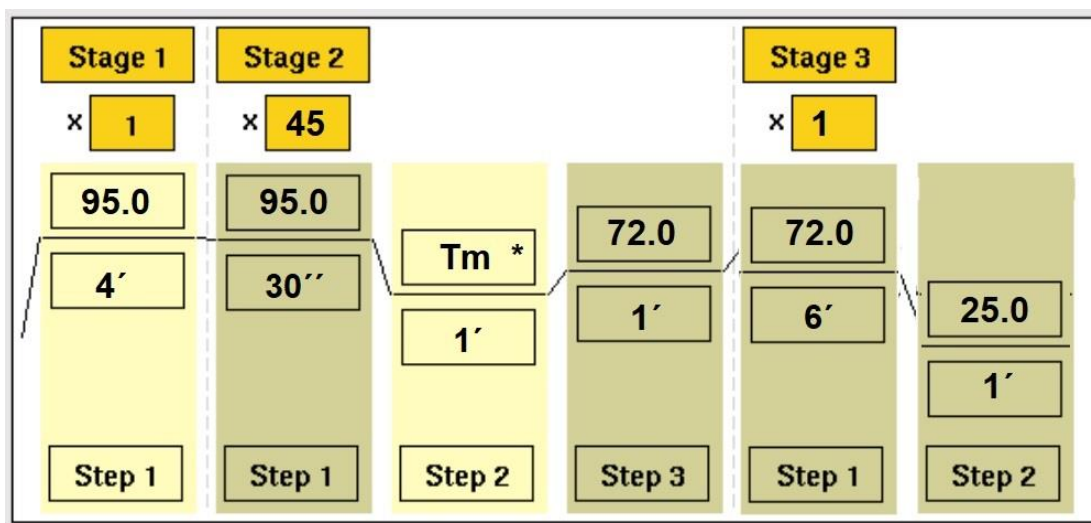
A PCR foi realizada com volume de 3 µL (20 ng) de DNA, utilizando-se um termociclador VERITI Applied Biosystems. Para que fosse feita a PCR dos três microrganismos alvos ao mesmo tempo o protocolo de Moura (2019) foi otimizado, sendo as etapas de ciclagem da máquina realizadas da seguinte forma apresentada na tabela 5 e figura 11.

Tabela 5 - Programação no Termociclador otimizada, em gradiente, dos ciclos de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para os microrganismos alvos *Methanobrevibacter smithii*, e *Escherichia coli* e Adenovírus.

Microrganismos	Iniciadores	Programação da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	Referências
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	Mnif-342F	4 minutos de desnaturação a 95°C, seguido de 45 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a gradiente* por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 6 minutos. Tempo total 2:24h.	Harwood et al. (2009); Mcquaig et al. (2009); Moura (2019) otimizado
	Mnif-363R		
<i>E. coli</i>	uidA298F	*Gradiente 52,8°C (coluna 1-2), 54,8 (coluna 3-4), 56,8 (coluna 5-6), 58,8 (coluna 7-8), 60,8 (coluna 9-10), 62,8 (coluna 11-12).	Bower et al. (2005); Moura (2019) Otimizado
	uidA884R		
Adenovírus	HAdVF HAdV R	As amostras com par de iniciadores de <i>M. smithii</i> ficaram na coluna 1-2, e amostras com iniciadores de <i>E. coli</i> e Adenovírus ficaram na coluna 7-8.	Mcquaig et al. (2009); Moura (2019) Otimizado

Nota: O protocolo de Reação de PCR foi otimizado proveniente de Moura (2019), sendo observados os protocolos das referências que constam na tabela para cada microrganismo. Fonte: própria autora.

Figura 11 - Programação no Termociclador VERITI Applied Biosystems, otimizada, em gradiente, dos ciclos de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).



Tm - por coluna no sistema de gradiente do termociclador

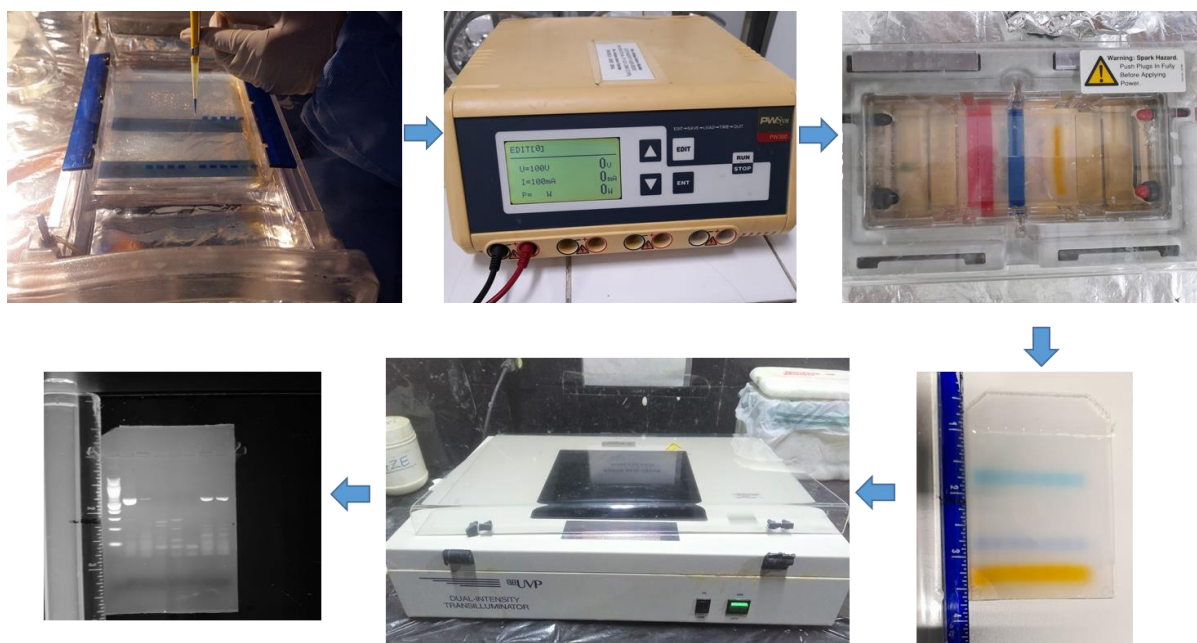
MS	EC e AD				
52.8	54.8	56.8	58.8	60.8	62.8
1 - 2	3 - 4	5 - 6	7 - 8	9 - 10	11 - 12
*Temperature difference between adjacent zones <= 2.0					

MS = <i>M. smith</i>	→ 52.8
EC = <i>E. coli</i>	→ 58,0
AD = adenovirus	→ 59.0

Fonte: própria autora.

Após a PCR, 10µL das reações foram submetidas à eletroforese na voltagem de 100W, em géis de agarose 2%, utilizando tampão TAE 1X (Tris-acetato 40 mm, EDTA 2mm, pH 8,5), corados com brometo de Etídio (1µg/mL). Foi usado 6µL do padrão de peso molecular da marca *O'GeneRuler 100 pb DNA Ladder* (Fermentas®). Depois da eletroforese, foram feitas as visualizações das bandas de amplificação nos géis, por meio de exposição à luz ultravioleta (UV) em um Transluminador Dual-Intensity Transilluminator da marca UVP (Figura 12).

Figura 12 – Eletroforese em géis de agarose 2%, e visualização por meio de exposição à luz ultravioleta.



Fonte: própria autora.

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético foi cadastrada no SisGen sob o nº AAC8F2F, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015, visto que o material genético proveniente do solo foi armazenado para futuras análises.

6.7 PROCESSOS PARA AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DA PLANTA

Foi realizado experimento de cultivo da hortaliça salsa (*Petrocelinum crispum*), com amostra de água de reúso, para a avaliação da planta durante o experimento para verificar o desenvolvimento desta como uma bioindicadora indireta de nutrientes presentes no solo. Neste caso, a qualidade da planta, como alimento, não foi considerada de forma direta no estudo, mas indicou de forma indireta a qualidade do solo em relação aos nutrientes inseridos por meio da irrigação com água de reúso, em comparação com o grupo controle irrigado com água potável. Essa análise foi feita durante a realização do cultivo irrigado com água de reúso “clorada”, sendo a amostra por conveniência, que estava disponível no momento da avaliação. E também serviu para indicar o andamento das condições experimentais, visto que nos dois fins de semana que não foram realizadas observações, poderia indicar como estava o

andamento do gotejamento. Portanto foram 15 dias de observação das características fenotípicas da planta. Nesta análise foram avaliadas no 1º, no 8º dia e depois no 15º dia de experimento, sendo elas:

- Altura média das plantas ao longo do tempo do experimento. Para isto foram feitas as medidas diretas da altura entre o solo e o ápice das folhas das salsas (BAUMGARTNER et al., 2007), para avaliação do desenvolvimento das plantas em função das águas utilizadas para irrigação (um grupo irrigado com água de reúso, e outro com água potável) (Figura 13).
- Grau de acamamento. O acamamento de plantas caracteriza-se na queda ou no arqueamento das folhas, o que provoca maior proximidade das plantas ao solo, e indica que algo prejudicial está ocorrendo à planta (BALBINOT JUNIOR, 2012). Para isto foi utilizada uma escala de notas atribuídas visualmente, comparada com o ensaio controle: 1 = Nenhuma planta acamada ou com ramo principal quebrado; 2 = de 1 a 5% de plantas acamadas ou com o ramo principal quebrado; 3 = de 6 a 10% de plantas acamadas ou com o ramo principal quebrado; 4 = de 11 a 20% de plantas acamadas ou com o ramo principal quebrado; 5 = acima de 20% de plantas acamadas ou com o ramo principal quebrado (CARVALHO et al., 2013).

Figura 13 – Medição da altura média por cm da planta.



Fonte: própria autora.

6.8 PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE DE DECAIMENTO DE PATÓGENOS NO SOLO AO LONGO DO TEMPO DEVIDO A UTILIZAÇÃO DE ÁGUA DE REÚSO

A análise de decaimento foi conduzida no Laboratório de Biotecnologia e Saúde Ambiental (BIOTECISA) do Departamento de Biologia Celular da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), reproduzindo as condições do solo no campo de forma controlada, seguindo as mesmas condições de irrigação por gotejamento, temperatura, iluminação, conforme descrito no item 6.4 deste trabalho. Foi utilizada a amostra de água de reúso “clorada” para realização desta etapa do estudo, por ser o tipo mais propenso a ser comercializado e destinado para a agricultura, e o que tínhamos mais facilidade em conseguir volumes em grande quantidade e frescos para a realização dos experimentos, no caso de necessitarmos repetir ensaios.

Para realização da análise de decaimento de patógenos de *Escherichia coli* e *Salmonella spp.* (FARIA, 2015; PEREIRA et al., 2014) foram obtidos os indicadores: cepa de *Escherichia coli* (*Escherichia coli*, INCQS 00178, CDC H34) e *Salmonella spp.* (*Salmonella enterica subsp. Enterica*, INCQS 00236, BM/NIH-T). As cepas foram adquiridas da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária-CMRVS, FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro, RJ. Em cada grupo experimental (irrigados com água de reúso e outro grupo irrigado com água potável) foram dois contendo cobertura vegetal (hortaliça *Petroselinum crispum* – salsa, plenamente desenvolvida), e dois vasos contendo apenas solo nu (grupo reúso e controle). Todos os vasos contendo 320 g de solo comercial Terral, proveniente da cidade de Ihauma, Minas Gerais, MG.

Para garantir a presença de carga conhecida de *Escherichia coli* e *Salmonella spp.* na amostra de água de reúso, partindo do pressuposto de que a água de reúso pode conter contaminantes, foram inseridos patógenos tanto no grupo experimental como no grupo controle.

Foram realizados cinco dias de acréscimo de suplemento de microrganismos exógenos indicadores (*Escherichia coli* e *Salmonella spp.*) ao solo nos vasos com cobertura vegetal e nos vasos com solo nu, cada grupo (n=4). O acréscimo dos patógenos ao longo dos 5 dias foi feito, a cada dia, por meio de pipetagem externa de 1 mL, em diferentes posições do vaso, contendo concentração de 5 UFC/mL, totalizando 25 UFC/mL de *Escherichia coli* e 25 UFC/mL de *Salmonella spp.*

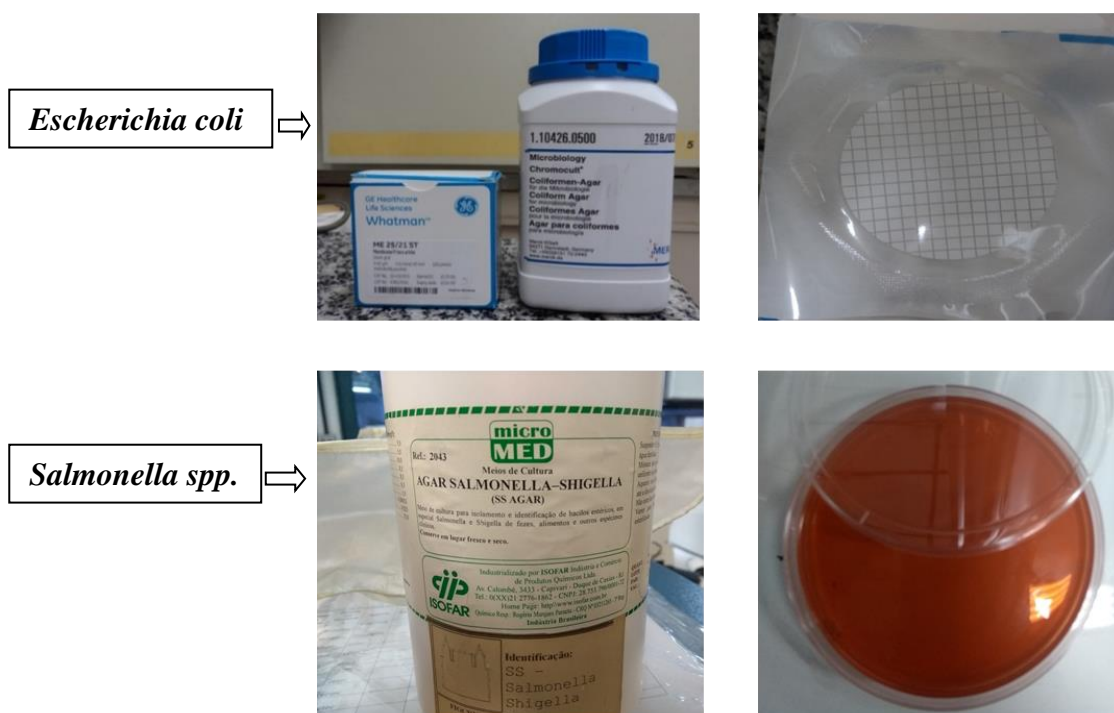
Foram irrigados, nestes cinco dias, da seguinte forma:

- 1) cultivo irrigado com água de reúso com contaminação artificial;
- 2) cultivo irrigado com água de reúso sem contaminação artificial, ou seja, com sua própria microbiota;
- 3) cultivo irrigado com água potável com contaminação artificial (condição controle);
- 4) irrigado com água potável sem contaminação artificial (condição controle).

No primeiro dia de acompanhamento do decaimento (após o período de suplementação, no 8º dia [T=0] foi feita a irrigação com 70 mL de água destilada em todos os vasos, e foi realizada a coleta de água de rega (água coletada que passou pelo solo após irrigação) na 1ª, 2ª, 4ª, 6ª, 8ª, 10ª, 11ª, 14ª, 16ª, 18ª e 20ª semanas. O experimento teve acompanhamento de 140 dias, sendo os vasos regados com água destilada estéril por gotejamento, para que não houvesse uma contaminação de uma fonte de água externa, sendo desprezada a de origem do ar, que poderia acontecer igualmente no grupo ensaio com água de reúso e no grupo controle com água potável.

No mesmo dia das coletas, as amostras de água de rega foram processadas. A metodologia para verificar *Escherichia coli* foi realizada pelo método de membrana filtrante descrito em Standard Methods for the Examination of the Water and Wasterwater (APHA, 2017), utilizando o meio de cultura cromogênico Chromocult Coliform Agar (Cat. No. 1.10426.0100/500 Merck®), conforme o Manual da Merck (2010). Para as análises de cada amostra foram feitas diluições em série de 500 vezes, segundo descrito em Sotero-Martins et al. (2017). A análise de *Salmonella* spp. foi feita através do meio de cultura SS AGAR (*Salmonella – Shigella*), de acordo com o protocolo da Marca MicroMED, sendo este o meio específico para *Salmonella* spp (Figura 14). Depois que o meio de cultura estava seco em uma placa de petri, foi feito espalhamento de 1 mL da amostra de água de rega com auxílio de alça drigauský, e foi colocada em estufa por 48h. A quantificação das colônias de coliformes termotolerantes e *Salmonella* spp. foi realizada por UFC/mL de água de rega.

Figura 14 – Meios de cultura para análise de decaimento de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. nos cultivos irrigados com água de reúso “clorada” e água potável.



Fonte: própria autora.

Foi considerado nível aceitável de *Escherichia coli* de até 23 UFC/mL, que é o padrão estabelecido na norma ABNT 13969 (ABNT, 1997), classe 4, que define padrão de coliformes termotolerantes (*Escherichia coli*) para água de reúso para agricultura. O valor do padrão foi convertido para valores em UFC/mL, conforme Sotero-Martins et al. (2017), de acordo com dados estatísticos observados no trabalho de Gronewold e Wolpert (2008), por isso foi de 23 UFC/mL. Para *Salmonella* spp. apenas foi aceitável quando ocorreu a ausência da mesma no solo, de acordo com Instrução Normativa nº 07 de 12/04/2016, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2016) e Faria (2015).

Os dados da contagem das colônias de *E. coli* e *Salmonella* spp. foram inseridos em planilha Excel, considerando as diluições nos cálculos estatísticos. Foram feitas avaliações de decaimento das contagens de *Escherichia coli* e de *Salmonella* spp. recuperadas em cultivo ao longo do tempo, e os gráficos foram produzidos utilizando o programa *Sigmaplot 10.0*.

6.9 PROCESSOS PARA AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE POLUENTES NA ÁGUA DE REÚSO

Para avaliar a presença de poluentes nas amostras de água de reúso foram realizadas análises de substâncias com atividade estrogênica no Laboratório de Engenharia Sanitária (LES) do Departamento de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente (DESMA/UERJ), e no Laboratório de Biotecnologia e Saúde Ambiental (BIOTECSA) do Departamento de Biologia Celular da UERJ. A avaliação da presença de substâncias com atividade estrogênica foi realizada pelo ensaio *in vitro* YES (Yeast Estrogen Screen), desenvolvido por Routledge e Sumpter (1996), com adaptações descrito por Dias e colaboradores (2015).

6.9.1 Processos de Concentração de Substâncias com Atividade Estrogênica na água de reúso

Antes de realizar o processamento de concentração de substâncias com atividade estrogênica na água de reúso, as amostras foram descongeladas de um dia para o outro em ambiente refrigerado a 8°C (geladeira), e foram homogeneizadas.

Para fazer as análises de substâncias com atividade estrogênica as amostras foram primeiramente concentradas pelos métodos de concentração por liofilização e centrifugação a vácuo (speed-vacuum). Como não se conhecia quais desses métodos seriam mais eficientes para concentrar atividade estrogênica nesse tipo de matriz, optou-se por compará-los com o método de Extração em Fase Sólida (EFS), que é uma metodologia consolidada para concentração de atividade estrogênica realizadas em diversos estudos (ARGOLO; GOMES; BILA, 2021; DIAS et al., 2015; FERNANDES *et al.*, 2011). O método de extração em fase sólida não foi empregado para todas as amostras devido a limitação de recursos financeiros, pois os materiais e reagentes para a sua realização são onerosos, com isso foram utilizados os métodos de liofilização e centrifugação a vácuo para concentração de substâncias com atividade estrogênica nas amostras.

Para verificar a eficácia dos métodos de concentração por centrifugação à vácuo e por liofilização foi feito um experimento com alíquotas da amostra de água de reúso “polida”. Com isso, para garantir que a amostra contivesse uma quantidade conhecida de 17β-estradiol,

as alíquotas da amostra foram dopadas com 17- β -estradiol, na concentração final de 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ (2.000 ng L^{-1}), antes de serem concentradas pelos três métodos: Liofilização, Extração em Fase Sólida (EFS), e Centrifugação a vácuo. Foi utilizada uma solução estoque de 17- β -estradiol de 54,48 $\mu\text{g L}^{-1}$ em etanol absoluto 99,8% de pureza da marca Merk. Foram utilizadas alíquotas de 250 mL de amostra para cada método de concentração: Liofilização e EFS. Na concentração pelo método de Centrifugação a vácuo utilizou-se alíquotas de 10 mL da amostra de água de reúso. As mesmas quantidades de volumes de alíquotas da amostra foram também concentradas pelos três métodos de concentração sem terem sido contaminadas artificialmente com a adição de 17- β -estradiol. Isso permitiu verificar o percentual de recuperação de cada método de concentração após a determinação de atividade estrogênica pelo ensaio YES (*Yeast Estrogen Screen*) (HANDAM et al., 2021a).

Depois foram realizadas as análises das amostras de água de reúso estudadas, sendo concentradas pelos métodos de centrifugação a vácuo e por liofilização.

6.9.1.1 Liofilização

O protocolo para realização do método de liofilização para concentração das amostras de água foi o seguinte (HANDAM et al., 2021a):

- 1) Limpar o vidro do liofilizador (novo) (Figura 15) com água sanitária e etanol; se tiver sido usado lavar como recomendado para o ensaio YES. Para lavar deve ser feito da seguinte ordem: sabão extran 5% enxague 10 vezes, para total remoção do sabão; rinsar com acetona P.A., enxague 5 vezes com água deionizada; rinsar com etanol P.A., enxague 3 vezes com água deionizada;
- 2) Após homogeneizar a amostra, reserve para congelar os 250 mL em freezer – 70°C ou 80°C; essa etapa deve ser feita aos poucos, distribuindo cerca de 20 mL nas paredes do frasco em cada momento, de 10 em 10 min.
- 3) Quando colocar os próximos 20 mL da amostra posicione o frasco em outra posição de modo que a amostra congele em outro lugar da parede do vidro, para ficar camadas finas em cada posição. Por isso não se coloca todos os 250 mL de uma só vez dentro do frasco de liofilização.

- 4) Preencha com amostra nas paredes do frasco de liofilização até a posição de 400 mL marcado no frasco do vidro, isso para que a mostra no final possa ser recuperada mais facilmente;
- 5) Acoplar o vidro com a amostra ao liofilizador (Liofilizador K105, marca Liobras) a -100°C, 220 Vca e 49 µHg por 24 horas.
- 5) Guardar a amostra seca no freezer; e no dia que for fazer o ensaio YES, ou um dia antes, ressuspender no volume final que se pretende usar no ensaio;
- 6) No dia da análise com ensaio YES, ou um dia antes, ressuspender a amostra seca pelo processo de liofilização aos poucos, em 3 vezes, com 0,5 mL de álcool absoluto 99,9% (EMSURE ACS, ISSO, Reag. Ph Eur da marca Merk®). Ao final deixar secar um pouco e transferir para um microtubo de capacidade volumétrica de 1,5 mL, completando no microtubo até 0,75 mL (750 microlitros), ou seja, dos 250 mL / 0,75 mL = 333 vezes concentrada.

Figura 15 – Instrumento liofilizador para realização do método de concentração de amostras de água por Liofilização.



Fonte: própria autora.

6.9.1.2 Centrifugação a vácuo (Speed-vacuum)

O método centrifugação a vácuo utilizou o equipamento Concentrador Savant DNA 110 SpeedVac da marca Thermo Fisher Scientific (Figura 16), que possui uma tecnologia de centrifugação a vácuo para remover água presente e concentrar amostras, mantendo a integridade da amostra. Este oferece rápida e eficiente concentração e secagem de pequeno

volume de amostras, geralmente empregado para concentrar DNA (BONATO et al., 2014), RNA (RODRIGUES JUNIOR, 2011), e proteínas (ANDRADE et al., 2017).

O protocolo para realização do método de centrifugação a vácuo para concentração das amostras de água foi o seguinte (HANDAM et al., 2021a):

- 1) Pipetar 0,1 mL da amostra em cada um dos 48 microtubos de capacidade para 2,2 mL, e colocar para congelar no freezer – 70°C por 5 min;
- 2) Pegar 24 destes microtubos com as amostras congeladas e rodar no SpeedVac Concentrator® por mais ou menos 40 minutos, após o processo verificar se ficou algum líquido;
- 3) Pegar os outros 24 microtubos que restaram no freezer e fazer a etapa 2 com estes microtubos;
- 4) Nos 24 microtubos iniciais que saíram da etapa 2, colocar mais 0,1 mL em cada um destes e colocar de novo no congelador por no mínimo 5 minutos, como descrito na etapa 1;
- 5) Repetir os procedimentos 1, 2 e 3 nos microtubos até completar os 10 mL de amostra reservados para concentração por esse método; ou seja, serão distribuídos nos 48 tubos a amostra;
- 6) No final, pegar os microtubos contendo as amostras secas, e ressuspender com 0,1 mL de etanol absoluto 99,8%, e passar de um para o outro microtubo, mantendo os tubos em banho de gelo para evitar evaporação do álcool;
- 7) Fazer depois mais uma lavagem dos tubos com etanol, passando a amostra de um tubo para outro. Tomar cuidado para não deixar ficar amostra nas paredes do tubo e na ponteira;
- 8) Ao final deixar secar o etanol do último tubo, retire e mantenha o microtubo em temperatura ambiente (RT) 24 °C, na bancada;
- 9) Guardar a amostra seca (o mais seca possível) no freezer – 40 °C, e no dia que for fazer o ensaio YES, ou um dia antes, ressuspender no volume final que se pretende usar no ensaio;
- 10) No dia da análise com ensaio YES, ressuspender os 10 mL concentrados de amostra até 0,2 mL no microtubo com o uso de etanol 99%, ou seja $10 \text{ mL} / 0,2 \text{ mL} = 50$ vezes concentrada.

Figura 16 – Instrumento SpeedVac Concentrator® utilizado para realização do método de concentração de amostras de água por Centrifugação a vácuo.

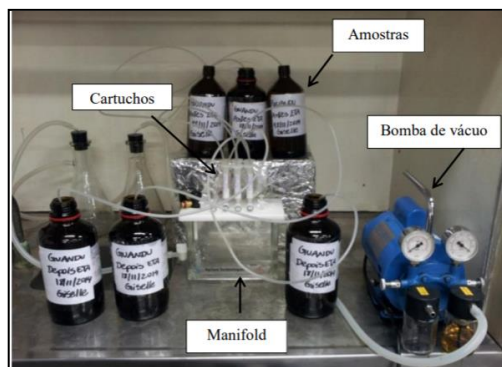


Fonte: própria autora.

6.9.1.3 Extração por Fase Sólida (EFS)

Primeiramente antes deste método de concentração as amostras foram filtradas por membranas de fibra de vidro de 1,2 μm (Merck), e depois em membranas de acetato de celulose de 0,45 μm (Merck). Será separado 250 mL de amostra para esta concentração. Na extração por fase sólida foram utilizados cartuchos Strata-X (Phenomenex®) de 500 mg / 6 mL. Previamente os cartuchos foram condicionados pela lavagem com: 3 X 2 mL de hexano; 1 X 2 mL de acetona; 3 X 2 mL de metanol (marca Tedia); e 5 X 2 mL de água ultrapura com pH ajustado para 3, com solução de HCl 3M. Posteriormente, as amostras foram percoladas nos cartuchos com auxílio de bomba a vácuo, com vazão aproximada de 3mL/min. Foi realizada em Manifold Agilent (VacElut 12), em capela, e para cada amostra é usado um cartucho (Figura 17). Os analitos foram eluídos com 4 X 1 mL de acetona, sendo está totalmente evaporada por uma corrente de nitrogênio. Depois as amostras foram reconstituídas com 2 mL de etanol e armazenadas a -20 °C até o ensaio YES (DIAS et al., 2015; CORDEIRO, 2009), ou seja, 250 mL / 2 mL = 125 vezes concentrada.

Figura 17 – Instrumentos para o método de concentração de amostras de água em Extração por Fase Sólida.

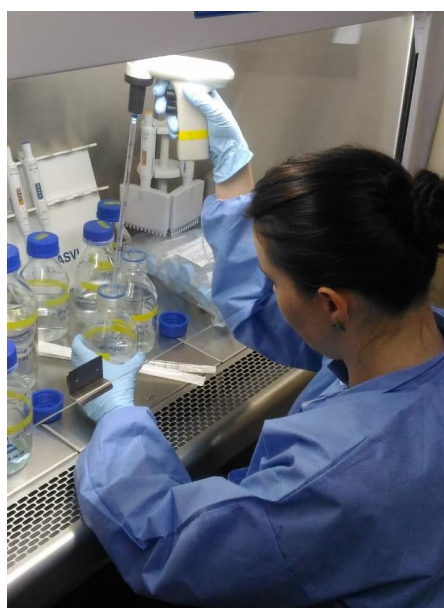


Fonte: Silva (2015).

6.9.2 Ensaio *in vitro* YES (*Yeast Estrogen Screen*)

O ensaio *in vitro* YES (*Yeast Estrogen Screen*) foi realizado de acordo com o método desenvolvido por Routledge e Sumpter (1996), com adaptações descrito por Dias et al. (2015) (Figura 18).

Figura 18 – Realização no laboratório do ensaio YES.

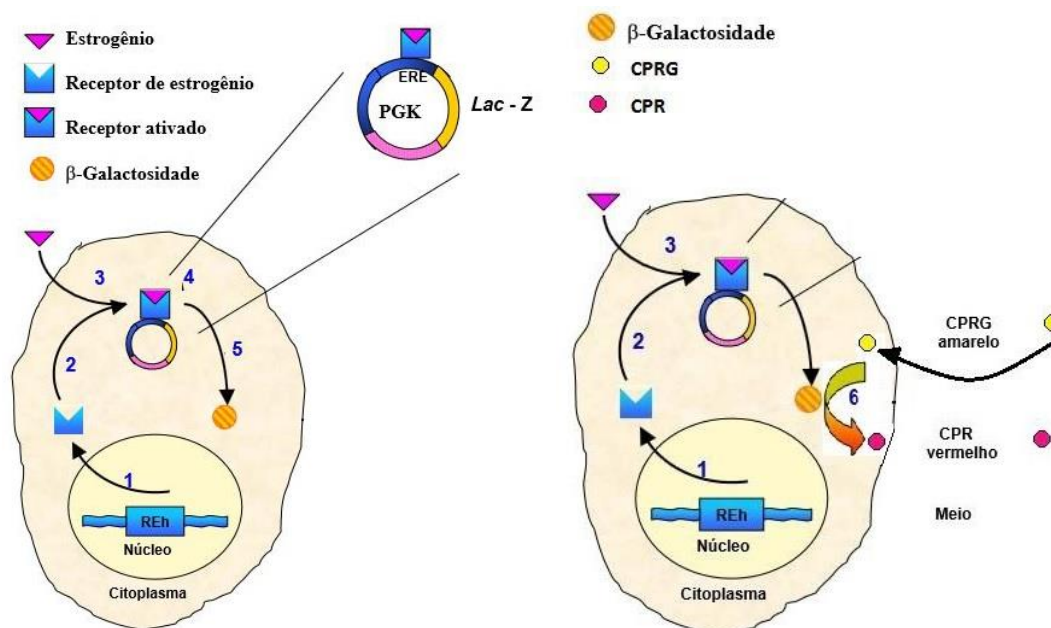


Fonte: própria autora.

Neste ensaio Routledge e Sumpter (1996) desenvolveram um método de análise *in vitro* utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada desenvolvida no departamento de genética da Glaxo para uso em um teste para identificar substâncias com atividade estrogênica que podem interagir com o receptor de estrogênio humano (REh). Em resumo, uma sequência de DNA do receptor de estrogênio humano foi inserida no genoma da levedura *Saccharomyces cerevisiae* com o objetivo de avaliar compostos com atividade estrogênica. E depois foi inserido um plasmídeo de expressão com o gene repórter lac-Z. A ligação da proteína REh a uma substância com atividade estrogênica causa a expressão do gene repórter lac-Z, que expressa a enzima β -galactosidase, que consegue transformar o substrato cromogênico clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosida (CPRG) em substrato clorofenol vermelho (CPR), passando da coloração amarela para a rosa/vermelha, que pode ser medido por absorvância a 575 nm. Portanto, quanto maior for a quantidade de substâncias com atividade estrogênica maior será a coloração vermelha (ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996).

Na Figura 19 está apresentado o sistema de expressão estrogênio-induzível na levedura *Saccharomyces cerevisiae* desenvolvido por Routledge e Sumpter (1996), que foi reavaliado no trabalho de Pós-Doc por Sotero-Martins (2016), mostrando que a enzima β -galactosidase não é excretada ao meio, o substrato cromogênico CPRG entra na levedura pela membrana plasmática, e ocorre a mudança para substrato cromogênico CPR, mudando a coloração amarela para a vermelha.

Figura 19 - Esquema do sistema de expressão do bioindicador (levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada) para substâncias com atividade estrogênica.



Fonte: Routledge e Sumpter (1996), reavaliado no trabalho de Pós-Doc. de Sotero-Martins, 2016.

O ensaio YES permite a identificação de substâncias químicas que são capazes de interagir com o receptor de estrogênio humano e elucidar uma resposta estrogênica. O método conhecido por YES (*Yeast Estrogen Screen*) vem sendo largamente empregado devido à rapidez, à reprodutibilidade e à sensibilidade. O ensaio é prático e altamente sensível, e pode detectar concentrações baixas de 17β -estradiol na ordem mínima de 2 ng L^{-1} (ROUTLEDE E SUMPTER, 1996).

A cepa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada no processo de transformação foi a BJ1991 (BISTAN et al., 2012).

As análises foram realizadas em microplacas de 96 poços (marca TPP) e preparadas em uma capela de fluxo laminar. Para o ensaio YES foram utilizadas duas placas: a placa de diluição e a placa de ensaio. Primeiramente cada placa foi identificada com o nome das amostras a serem analisadas, assim como o dia e o horário de início do ensaio, e quais foram as fileiras nas placas do branco (controle negativo - somente etanol e meio de análise), amostra e 17β -estradiol (controle positivo). Em cada ensaio uma nova curva padrão foi realizada, para isto utilizou-se uma solução estoque na concentração de $54,48 \mu\text{g L}^{-1}$ de 17β -estradiol (> 98% da marca Sigma-Aldrich) em etanol absoluto grau HPLC (marca Tedia). As amostras foram sempre analisadas em duplicata, e intercaladas com uma fileira de branco na

placa de ensaio, para garantir que não ocorra contaminação cruzada. Além disso, a fileira do branco foi adicionada primeiramente, para reduzir as chances de contaminação.

As diluições foram preparadas em microplacas de 96 poços, sendo diluídas na proporção 1+1. As amostras e a curva padrão (17 β -estradiol) foram realizadas da mesma forma, onde foram diluídos serialmente, na placa de diluição para isto seguiu-se a seguinte metodologia:

- Adicionar 100 μ L de etanol (grau HPLC) nos poços da fileira de diluição do extrato, com exceção do primeiro poço;
- No 1 $^{\circ}$ poço adicionar 200 μ L de amostra ou padrão de E2;
- Retirar 100 μ L da amostra no 1 $^{\circ}$ poço e passar para o 2 $^{\circ}$ poço e agitar ressuspensando com a própria pipeta; retirar 100 μ L da amostra no 2 $^{\circ}$ poço e passar para o 3 $^{\circ}$ poço e agitar com a própria pipeta; e assim, sucessivamente até o ultimo poço da fileira, que ficará com o volume final de 200 μ L.

As diluições com as concentrações finais da curva padrão de 17 β -estradiol ficaram na faixa de 2724 ng L $^{-1}$ a 1,330078 ng L $^{-1}$, conforme Tabela 6.

Tabela 6 - Concentrações finais da curva padrão de 17 β -estradiol em cada poço na microplaca de diluição.

Poços	Concentração ng L $^{-1}$
1 $^{\circ}$ poço	2724
2 $^{\circ}$ poço	1362
3 $^{\circ}$ poço	681
4 $^{\circ}$ poço	340,5
5 $^{\circ}$ poço	170,25
6 $^{\circ}$ poço	85,125
7 $^{\circ}$ poço	42,5625
8 $^{\circ}$ poço	21,28125
9 $^{\circ}$ poço	10,64063
10 $^{\circ}$ poço	5,320313
11 $^{\circ}$ poço	2,660156
12 $^{\circ}$ poço	1,330078

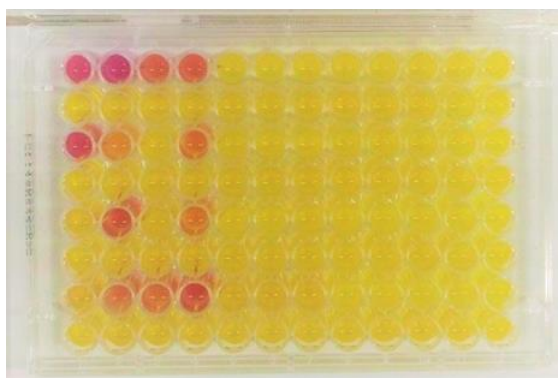
Fonte: Silva (2015).

Depois das diluições foram transferidos imediatamente 10 µL das amostras para cada poço das placas de ensaio em duplicata. Vale ressaltar que foi importante passar os 10 µL ao término de cada diluição para somente depois realizar a próxima diluição, pois nessa etapa foi necessário minimizar a evaporação para que a concentração dos analitos não seja modificada.

Posteriormente deixou-se evaporar totalmente. Em seguida foram adicionados 200 µL do meio de análise em cada poço com auxílio de uma pipeta multicanal. As placas foram fechadas com fita de autoclave e agitadas vigorosamente durante 2 min no agitador de placas de 96 poços da marca IKA, modelo MS-3, e foram incubadas em estufa a 30 °C, por 72 horas. Após a incubação, o desenvolvimento da cor do meio foi verificado a uma absorbância de 575 nm, para cor, e 620 nm para turbidez em espectrofotômetro (Marca Softmax, modelo SpectraMax M3).

Depois do tempo de incubação foi possível verificar a mudança de coloração de amarelo a tons de rosa/vermelho nos poços, isto ocorre quando há atividade estrogênica e aumento da turbidez nos poços, pois foi resultado da produção da β-galactosidase e do crescimento da levedura respectivamente (Figura 20).

Figura 20 – Placa de ensaio mostrando atividade estrogênica na amostra de água de reúso nos poços com coloração rosa/vermelho.



Fonte: própria autora.

Vale ressaltar que os resíduos contendo o organismo geneticamente modificado foram autoclavados antes de serem descartados, a fim de inativar o organismo, de acordo com a normativa de biossegurança, Resolução nº 18, de 23 de março de 2018 (BRASIL, 2018).

6.9.2.1 Preparo das Soluções do Ensaio YES

Todos os reagentes foram obtidos da Sigma-Aldrich, e os recipientes de vidro foram rinsados com etanol absoluto da Merck, sendo utilizada água apirogênica (< 0.001 Endotoxina / mL) obtida pelo sistema Milli-Q Biocell. O meio mínimo (pH 7,1) é preparado para 1L de água ultrapura pela adição de 13,61 g de KH_2PO_4 , 1,98 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4,2 g de KOH, 0,2 g de MgSO_4 , 1mL de solução de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (40mg/50mL de água ultrapura), 50 mg de L-leucina, 50 mg de L-histidina, 50 mg de adenina, 20 mg de L-arginina, 20 mg de L-metionina, 30 mg de L-tirosina, 30mg de L-isoleucina, 30 mg de L-lisina-HCl, 25 mg de L-fenilalanina, 100 mg de ácido glutâmico, 150 mg de L-valina, 375 mg de L-serina. A solução foi armazenada em temperatura ambiente em frascos de vidro, esterilizadas a 121°C por 10 min (BILA, 2005).

A solução vitamínica foi preparada para 180 mL de água ultrapura pela adição de 8 mg de tiamina, 8 mg de piridoxina, 8 mg de pantetonato de cálcio, 40 mg de inositol, 20 mL de solução de biotina (2 mg/100 mL de água ultrapura). A solução foi filtrada em membrana de $0,2 \mu\text{m}$ estéril, e estocada em frascos de vidro em alíquotas de 10 mL a 4°C . Foram preparadas algumas soluções, todas com água ultrapura e armazenadas em frascos de vidro âmbar estéreis, as soluções foram: solução de glicose - 20% m/v (20 g/100 mL); solução de ácido L-aspartico - concentração de 4 mg.mL⁻¹; solução de L-treonina - concentração de 24 mg.mL⁻¹ (600 mg/25 mL); solução de sulfato de cobre (II) - concentração de 20 mM (0,5g/100mL); Solução de CPRG (Clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosida) - concentração de 10 mgmL⁻¹. As soluções de L-treonina, vitamina e de CPRG foram armazenadas em geladeira a 4°C , as demais em temperatura ambiente (SILVA, 2015).

Foi preparado o meio de cultivo da cepa de *Saccharomyces cerevisiae* adicionando 5 mL de solução de glucose, 1,25 mL de solução de ácido L-aspartico, 0,5 mL de solução de vitamina, 0,4 mL de solução de L-treonina, 125 μL de solução de sulfato de cobre (II), 45 mL de meio mínimo. Os frascos de cultivo foram incubados a 28°C por 24 horas a 150 rpm, em incubadora de bancada com agitação orbital (Marca Quimis, modelo Q816M20). E prepara-se o meio de análise pela adição de 250 μL de substrato cromogênico CPRG em 25 mL de meio de cultivo. O meio foi inoculado com 4×10^7 células de levedura de uma cultura (BILA, 2005).

6.9.2.2 Processos para Análise dos resultados do ensaio YES

Foi realizada a correção da resposta estrogênica, por meio do cálculo da absorbância corrigida ($Abs_{\text{Corrigida}}$) de cada amostra, esta foi aplicada para os dados de cada poço da microplaca de ensaio de 96 poços, utilizando os valores de absorbâncias obtidos nos dois comprimentos de onda para cada concentração na curva. Para calcular esta correção, utilizou-se a média dos valores das absorbâncias das duas fileiras de brancos correspondentes às amostras, resultando na média de 24 amostras de branco. Também foram calculados os desvios padrão de cada curva. Assim, os dados apresentados correspondem à média das absorbâncias das amostras analisadas em duplicata, conforme a fórmula 1 de Absorbância corrigida da amostra. Dessa forma as medições de absorbâncias foram verificadas em 575 e 620 nm para calcular atividade estrogênica (FENT; ESCHER; CAMINADA, 2006) apresentada abaixo:

$$Abs_{\text{Corrigida}} \text{ Amostra} = Abs_{575\text{nm}} \text{ da Amostra} - (Abs_{620\text{nm}} \text{ da Amostra} - Abs_{620\text{nm}} \text{ do Branco})$$

A curva padrão, controle positivo 17 β -estradiol (E2), foi construída relacionando-se os valores de absorbância corrigida de E2, a concentração de E2 (ng/L), o desvio padrão (considerando absorbância 575 nm), a absorbância do branco 575nm. Para fazer as curvas dose-resposta das amostras foi utilizado o fator de diluição em porcentagem, valores de absorbância corrigida das amostras, o desvio padrão (considerando absorbância 575 nm), absorbância do branco 575nm, valor de absorbância corrigida de E2, desvio padrão de E2 (considerando absorbância 575 nm). Para construção das curvas dose-resposta foram realizados gráficos por meio do programa Origin 6.0, em escala logarítmica (BILA, 2005).

Depois da construção das curvas dose-resposta das amostras foram utilizados os parâmetros A1, A2, X₀ e p obtidos por meio da função sigmoideal da curva padrão de 17 β -estradiol, feita para cada bateria de ensaio, para a realização da fórmula 2 de equivalente de 17 β -estradiol (EQ-E2) nas amostras de água de reúso.

O cálculo foi determinado por meio da fórmula que usa o método dos mínimos quadrados (BILA, 2005; ROUDLEDGE e SUMPTER, 1996), informada abaixo:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x/x_0)^p} + A_2$$

Onde: y = valor de Absorbância corrigida da amostra; A1 = máxima indução da atividade estrogênica; A2 = limite de detecção; X₀ = valor de EC50 (concentração que elucida uma atividade igual a 50% do controle positivo 17β-estradiol); p = inclinação da região mediana da curva como estimado de uma regressão linear/log da parte linear da curva dose-resposta; X = concentração da substância estrogênica no ensaio.

Após a aplicação da fórmula, para se chegar ao valor real de EQ-E2 da amostra foi realizado mais um cálculo multiplicando: X (valor encontrado na fórmula 2) x 20 x Fator de diluição de cada x fator de concentração da amostra utilizados nos métodos de concentração.

Foi considerado um ponto central de inclinação da curva sigmoideal dose-resposta para determinação do valor real de EQ-E2 da amostra, sendo o ponto que se encontra na faixa de linearidade da curva dose-resposta (SANSEVERINO et al., 2009).

Vale ressaltar que a atividade estrogênica superior a 10% do valor do branco reacional foi considerada como positiva (SILVA, 2015).

Foi realizada um cálculo para verificar se houve inibição do crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, pois compostos presentes em amostras podem ser tóxicos inibindo o crescimento da levedura. Foi efetuado o cálculo de acordo com Frische et al. (2009):

$$\text{Toxicidade} = 1 - (\text{Abs620 amostra} / \text{Abs620 branco})$$

No cálculo acima Abs620(amostra) foi a média da leitura a 620 nm da duplicata de cada um dos poços da placa de ensaio (24 poços). E o Abs620(branco) foi da mesma forma, porém com a média dos poços com o controle negativo (branco) (24 poços).

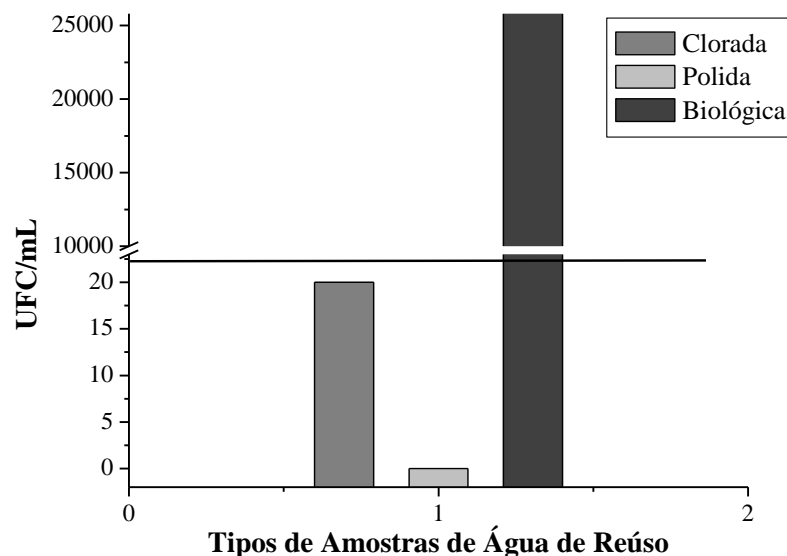
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DE ÁGUA DE REÚSO E DO SOLO

7.1.1 Caracterização Colimétrica e Físico-Química dos Diferentes Tipos de Amostras de Água de Reúso

As análises bacteriológicas mostraram que a amostra de água de reúso “clorada” apresentou níveis médios de 20 UFC/mL (± 3) de coliformes termotolerantes e 40 UFC/mL (± 5) de coliformes totais, e a amostra “polida” teve ausência de coliformes termotolerantes e 6 UFC/mL (± 2) de coliformes totais, ou seja, as amostras “clorada e polida” estavam com qualidade própria, dentro do padrão de qualidade sanitária para reúso agrícola recomendado pela Norma NBR nº 13.969/97, que estabelece valor limite, convertido para UFC, de até 23 UFC/mL de coliformes termotolerantes (ABNT, 1997). No entanto a amostra de água de reúso “biológica”, que era amostra composta representativa do tratamento por filtro biológico, apresentou 25.800 UFC/mL (± 13) de coliformes termotolerantes e 26.600 (± 10) UFC/mL de coliformes totais, apresentando-se imprópria, ou seja, 1.122 vezes acima do limite recomendado para aplicação na agricultura, segundo a Norma NBR nº 13.969/97 (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Níveis de contaminação por coliformes termotolerantes (UFC/mL) nas amostras de água de reúso de diferentes procedências do Brasil.



Legenda: “clorada” - a partir de esgoto tratado (ETE) e depois clorado; “polida” - proveniente de esgoto tratado (ETE) e tratamento de água de reúso (ETAR - filtração, ultrafiltração e osmose reversa); e “biológica” - a partir de águas cinzas tratadas por filtro físico e biológico. Linha de corte em preto é o valor máximo permitido (23 UFC/mL de coliformes termotolerantes) da qualidade sanitária própria de água de reúso para agricultura, de acordo com a Norma NBR ABNT n° 13.969/97, considerando trabalho de Sotero-Martins et al. (2017), baseado no estudo de Gronewold Wolpert (2008). Fonte: própria autora.

Comparando os resultados, com os limites descritos na Resolução estadual do Ceará n° 2/2017 (CEARÁ, 2017), que determina parâmetros para reúso de água para fins agrícolas e florestais, a amostra de água de reúso “biológica” ficou 5.608 vezes acima do limite padrão, que seria no máximo 4,6 UFC/mL de coliformes termotolerantes. Além disso, nessa resolução esta determinado que deve ter ausência de coliformes termotolerantes em culturas a serem consumidas cruas, cuja parte consumida tenha contato direto com a água de irrigação. E comparando os resultados com os descritos na Resolução Estadual da Bahia n° 75/2010 (BAHIA, 2010), que possui níveis menos restritivos de bactérias em comparação com as outras normativas, a qualidade sanitária da amostra de água de reúso “biológica” também estava imprópria, estando 258 vezes acima do padrão estabelecido. Essa resolução determina um valor máximo permitido (VMP) de coliformes termotolerantes de 10 UFC/mL para categoria A, que trata da “Irrigação, inclusive hidroponia, de qualquer cultura incluindo produtos alimentícios consumidos crus”, e com irrigação por gotejamento estabelece um VMP de 100 UFC/mL; e determina VMP de 100 UFC/mL de coliformes termotolerantes para categoria B, que trata da “Irrigação, inclusive hidroponia, de produtos alimentícios não

consumidos crus, produtos não alimentícios, forrageiras, pastagens, árvores, cultivos usados em revegetação e recuperação de áreas degradadas” (BAHIA, 2010).

Segundo a Resolução da Bahia (2010), mesmo sendo feita a irrigação por gotejamento, a amostra de água de reúso “biológica” estaria imprópria para irrigação de cultivos, devido os níveis de bactérias estarem 258 vezes acima do VMP. A irrigação por gotejamento é uma estratégia de rega de água próxima ao solo, deixando a água disponível apenas ao sistema radicular das plantas, tornando o risco de contaminação menor (MANCUSO e SANTOS, 2013).

As águas cinzas não são efluentes provenientes de vasos sanitários, por isso não possuem contribuição fecal direta, mas podem ser contaminadas com coliformes termotolerantes por meio da lavagem de mãos, higienização das partes íntimas durante o banho, lavagem de alimentos e de roupas, e até mesmo a lavagem de fraldas (Peters, 2006). Segundo Barbosa (2019), que também analisou essa amostra composta de água de reúso “biológica”, apesar de ter acompanhamento técnico para o sistema de filtro, possivelmente, pode ter ocorrido uma saturação do filtro biológico por conta do grande aporte de água, e ter causado a mortalidade das minhocas, que faziam parte do sistema de produção, prejudicando o tratamento das águas cinzas. E o resultado encontrado pode ter sido uma condição imprópria pontual, no entanto, os gestores de acompanhamento desse sistema de filtro recomendaram atenção as famílias durante o tratamento desse efluente, para garantir a qualidade para o reúso agrícola, sendo recomendado acrescentar mais um processo de desinfecção. Porém muitas famílias não possuíam recursos para essas medidas. Segundo Bakopoulou et al. (2011) o tratamento com cloração poderia contribuir para a eliminação de coliformes.

Corroborando com o resultado, Dombroski et al. (2013) também realizou estudo similar de amostras de água de reúso proveniente de sistema de tratamento de águas cinzas, e identificaram 692,82 UFC/mL de coliformes termotolerantes, nível acima do permitido para reúso agrícola segundo a Norma NBR nº 13.969/97 (ABNT, 1997).

Pesquisas indicam que águas de reúso produzidas por estações de tratamentos de esgoto, junto com cloração e/ou realização de tratamento por ultrafiltração conseguem diminuir o nível de coliformes na água, reduzindo os riscos associados à presença também de outros microrganismos (BAKOPOULOU et al., 2011; YOUN-JOO et al., 2007). Os dados do presente estudo corroboram com os trabalhos desses autores, pois foi demonstrado através das análises colimétricas que os tratamentos da água de reúso dos tipos “clorada e polida” foram eficazes, tendo em vista que a amostra de água “clorada” apresentou nível de 20 UFC/mL de

coliformes termotolerantes, estando 1,1 vezes abaixo do limite da Norma da ABNT nº 13.969/97, e a amostra de água “polida” teve ausência de coliformes.

Como esperado na água potável utilizada como água controle nos experimentos neste estudo, não foram identificadas as presenças de coliformes totais e coliformes termotolerantes, ou seja, na água potável apresentou ausência dos microrganismos, e estava de acordo com o padrão de potabilidade pela Portaria de Consolidação do Ministério da Saúde nº 5 de 2017 (MOURA, 2019).

Quanto as análises físico-químicas os resultados mostraram para todas as amostras, que os níveis dos parâmetros cloro residual livre, condutividade, pH, fluoreto estavam de acordo com os Valores Máximos Permitidos (VMP) estabelecidos pelas normativas brasileiras e internacional: Resoluções estaduais Ceará nº 2/2017 (CEARÁ, 2017), da Bahia nº 75/2010 (BAHIA, 2010), *Guidelines for Water Reuse* - EPA (2012).

A amostra de água de reúso “biológica” apresentou parâmetros físico-químicos fora do padrão, como turbidez, cor aparente, pois apresentou valores 22 e 2,3 vezes, respectivamente acima do permitido, segundo a normativa de EPA (2012). A turbidez indica a presença de sólidos suspensos na água e dificulta o processo de desinfecção, podendo estar presentes também microrganismos patogênicos (APHA, 2017). O parâmetro cor aparente é um indicativo de partículas dissolvidas na água (VON SPERLING, 1996), e sua não conformidade não implica necessariamente em risco à saúde, no entanto precisa ser observado como indicador de contaminação por esgoto.

O parâmetro de condutividade, apesar de estar dentro do VMP segundo a normativa do Ceará (2017), que estabelece limite de até 3000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, a amostra apresentou valor elevado de condutividade, tendo 1017 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Nas normativas da Bahia (2010) e EPA (2012) o padrão limite para condutividade foi de 1.000 vezes menor do que a normativa do Ceará (2017), sendo estabelecido limite de até 3,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Segundo Ayres e Westcot (1991), as águas de reúso com condutividade elétrica na faixa de 700 a 3000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ são classificadas com salinidade moderada, necessitando de moderada restrição de uso para irrigação. A classificação moderada de salinidade indica que pode ocorrer uma moderada redução da taxa de infiltração de água no solo, portanto, estas águas se tornam mais apropriadas para irrigação de solos com culturas tolerantes ao sal. A condutividade é um parâmetro importante para a agricultura como uma medida indireta da salinidade, e quanto maior a condutividade da água maior o grau de salinidade, o que afeta a disponibilidade hídrica das culturas vegetais (EPA, 2012). O resultado encontrado de condutividade elétrica foi similar ao valor identificado em

estudo de Rolim et al. (2016), que encontrou 1.200 $\mu\text{S}/\text{cm}$, o mesmo também utilizou a condutividade como indicador de salinidade.

A amostra de água de reúso “clorada” foi caracterizada como imprópria para o parâmetro de nitrogênio nitrato, com nível de 60,2 mg/L, ou seja, acima do valor padrão recomendado pela normativa *Guidelines for Water Reuse* (EPA, 2012), que estabelece limite de até 30 mg/L de nitrato.

Os parâmetros nitrogênio nitrato, assim como nitrogênio nítrito são macronutrientes importantes para a fertilidade do solo e a produtividade de culturas (ROLIM et al., 2016), porém em grandes quantidades, acima de 30 mg/L pode colocar em risco a saúde pública, e tornar prejudicial ao desenvolvimento das plantas. Acima desse nível, as plantas podem absorver o nitrogênio, sendo muito perigoso para algumas culturas, pois provoca o crescimento vegetativo excessivo (AYRES; WESTCOT, 1991). No ambiente, em solos arenosos, principalmente, a o nitrogênio consegue atingir o lençol freático mais facilmente, e é considerado altamente solúvel em água (MANCUSO e SANTOS, 2013). O resultado demonstra que o tratamento por ETE e cloração não apresentou boa eficiência na remoção de nutrientes.

As amostras de água de reúso “clorada” e “biológica” foram caracterizadas como impróprias quanto ao nível de turbidez para a finalidade agrícola, segundo EPA (2012), pois o padrão de qualidade é de 2 uT. A amostra “clorada” estava 1,3 vezes maior do que o padrão recomendado pela normativa, e a amostra “biológica” estava 22 vezes acima do permitido, ou seja, mostrou um nível elevado de turbidez, acima do permitido para reúso agrícola. Resultados de análises de água de reúso por Rolim et al. (2016) também mostraram níveis não aceitáveis para o parâmetro turbidez, com um valor médio de 32,4 uT, e não recomendaram a irrigação irrestrita na agricultura, pois não foram próprios para o uso em sistemas irrigação por gotejamento ou aspersão.

Para a redução de turbidez da água de reúso, segundo Bakopoulou et al. (2011) recomenda-se a utilização de tratamento por filtração em areia, pois é considerado um método eficaz e essencial antes do processo de desinfecção do efluente. Com uma unidade de filtração o tratamento pode resultar em uma melhor retirada de coliformes na etapa de desinfecção Bakopoulou et al. (2011). Visto isso, o tratamento para a produção da água de reúso “biológica”, que teve nível mais alto de turbidez, precisa ser melhorado, pois não está sendo eficaz na sua remoção. Poderiam ser aumentadas as camadas de areias do filtro, e assim favorecer também a maior remoção de coliformes na água de reúso.

Os resultados dos parâmetros físico-químicos da amostra de água de reúso “polido” mostraram que a mesma se encontra dentro dos VMP segundo as normativas da EPA (2012), e do Ceará (2017). Apenas o parâmetro cloreto apresentou-se valor de 16,6 mg/L, estando abaixo da faixa de 100 a 350 mg/L, padrão estabelecido pela Resolução da Bahia nº 75/10. E estava um pouco acima do limite recomendado por EPA (2012), que é de 10 mg/L. De acordo com Ayres e Westcot (1991), a presença de cloreto no nível acima de 10 mg/L, como apresentou a amostra de água de reúso “polida”, pode oferecer uma leve toxicidade às plantas. Em comparação as outras amostras de água de reúso, a “polida” foi a que teve menor nível de cloreto, isto pode ser explicado pelo método de tratamento com a tecnologia de ultrafiltração, que segundo Rolim et al. (2016) é considerada eficaz na maior remoção de sais.

Os resultados das análises físico-químicas das amostras de água de reúso se encontram na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados físico-químicos das amostras de água de reúso e os valores máximos permitidos (VMP) para qualidade sanitária, de acordo com as normativas brasileiras.

Parâmetros	Dados das Amostras				VMP		
	Clorado	Polido	Biológico	*Água Potável	EPA 2012	Ceará 2/2017	Bahia 75/2010
Cloro livre mg/L	0,15	0,05	0	0,19	1	ND	ND
Dureza total mg/L	68,5	14	645	25,8	ND	ND	ND
Alcalinidade CaCO ₃ mg/L	31,8	715	698	8,10	ND	ND	ND
Condutividade elétrica µS/cm	554	284	1017	114	3,0	3000	3,0
pH	7,0	7,0	7,0	6,99	6,5 – 8,4	6,0 – 8,5	ND
Turbidez uT	2,55	0,3	44	0,30	2	ND	ND
Cor aparente	44,2	19	340	21	150	ND	ND
Fluoreto mg/L	0,61	0,42	0,77	0,57	1,0	ND	1,0
Cloreto mg/L	97,68	16,6	146,24	12,84	10	ND	100 – 350
Nitrato mg/L	60,20	1,35	14,34	4,60	30	ND	ND
Nitrito mg/L	0,71	0,06	0	0,00	ND	ND	ND
Sulfato mg/L	38,93	22,37	15,56	16,00	ND	ND	ND

Resolução CONERH da Bahia nº 75/2010; Resolução Estadual do Ceará nº 2/2017; e normativa internacional “Guidelines for water reuse 2012” - EPA - U.S. Environmental Protection Agency. *E dados de água potável do estudo de Moura (2019). ND - Não descritos valores máximos permitidos do parâmetro na normativa para reúso agrícola. *Análises físico-químicas da água potável realizado por Moura (2019), que foi a mesma fonte de água potável utilizada no presente estudo. Fonte: própria autora.

Como não há no Brasil padrão para reúso agrícola para parâmetros como dureza total, alcalinidade total, nitrito e sulfato (HANDAM et al., 2021b), a análise de normatizações para outras finalidades, e também estudos podem indicar o nível de qualidade sanitária em relação a estes parâmetros para a finalidade agrícola. Em todas as amostras de água de reúso analisadas, os parâmetros nitrito e sulfato estavam de acordo com o padrão de potabilidade descrito na Portaria de Consolidação do Ministério da Saúde nº 5 de 2017 (BRASIL, 2017), indicando, portanto, ser própria para a agricultura também.

O parâmetro sulfato, em todas as amostras esteve de acordo com o valor máximo permitido estabelecido para potabilidade, Portaria de Consolidação nº5 (BRASIL, 2017), que estabelece um limite de até 250 mg/L, indicando ter boa qualidade também para a agricultura. A presença de sulfato em águas geralmente se deve às descargas de esgotos domésticos e industriais (CETESB, 2014).

Quanto ao parâmetro nitrogênio nitrito, as amostras apresentaram valores abaixo de 10 mg/L, que é o padrão de qualidade sanitária de reúso agrícola realizada por gotejamento em Bogotá apresentado em EPA (2012), indicando que esse parâmetro das amostras de água de reúso do presente trabalho estava próprio. Além disso estava também dentro do padrão de potabilidade (BRASIL, 2017).

A dureza total se apresentou imprópria na amostra de água de reúso “biológica”, se fosse considerado o padrão para potabilidade, que estabelece valor máximo de 500 mg/L (BRASIL, 2017). Considerando documento da Embrapa (ALMEIDA, 2010) sobre qualidade sanitária de águas para irrigação da agricultura, as amostras de água de reúso “biológica e clorada” foram classificadas, segundo grau de dureza, como muito duras, pois apresentaram valores acima de 54 mg/mL, estando 11,94 e 1,27 vezes maiores, respectivamente. A dureza total é definida como a soma das concentrações de íons cálcio e magnésio na água, expressos como carbonato de cálcio (FUNASA, 2017). Quando a água possui dureza total elevada pode causar incrustações nas tubulações (ALMEIDA, 2010). Deste modo, para sistemas de irrigação por gotejamento pode ser prejudicial, pois o carbonato de cálcio se deposita dentro das tubulações em volta dos orifícios dos gotejadores, o que provoca o entupimento, impedindo a saída da água. Esse parâmetro químico é de fundamental importância para avaliação da qualidade de água para irrigação da agricultura (ALMEIDA, 2010; AYERS e WESTCOT, 1991), e que esteja na legislação federal para reúso agrícola no Brasil. De acordo com Almeida (2010) para diminuir a dureza da água pode-se fazer aeração, pois induz uma

precipitação do cálcio, no entanto, em solos com sódio elevado foi indicado utilizar águas com maior grau de dureza.

Quanto à alcalinidade total, as amostras de água de reúso “polida e biológica” apresentaram níveis elevados, em comparação com a amostra “clorada”, com teores de 715 mg/L, 698 mg/L, 31,8 mg/L, respectivamente. Este parâmetro possui grande importância para a agricultura, pois mostra a capacidade que a água tem de neutralizar ácidos nela existentes, que é medida pela concentração total de hidróxidos, carbonatos e bicarbonatos. A presença destas substâncias neutraliza os efeitos de substâncias ácidas, por exemplo, devido a ocorrência de chuvas ácidas (FUNASA, 2017). E no solo se torna fundamental verificar a alcalinidade, pois quando o solo se apresenta ácido as substâncias antes presentes na forma mineral se transformam em íons, sendo alguns desses tóxicos para as plantas, como os íons de alumínio e cádmio (CARMO et al., 2016; SILVA, 2012).

Para produção de água de reúso para a agricultura é fundamental uma lei federal no Brasil, contendo formas de tratamento, parâmetros de qualidade sanitária tanto bacteriológicos quanto físico-químicos, para que em todo território brasileiro os governos tivessem a obrigação de cumprir. Esta lei poderia seguir as normatizações americanas, que estão mais aprofundadas e detalhadas em relação a qualidade sanitária da água de reúso para a agricultura, pois são estabelecidos parâmetros físico-químicos e microbiológicos, baseados em estudos científicos, a fim de garantir a sociedade a qualidade dos alimentos, e evitar danos à saúde humana e ambiental (HANDAM et al., 2021b).

As análises dos parâmetros físico-químicos da água potável demonstraram que todos parâmetros estavam de acordo a Portaria de Consolidação do Ministério da Saúde nº 5 de 2017, sendo a amostra de água de reúso “biológica” o tipo de água que apresentou níveis mais distantes dos níveis apresentados pela água potável (Moura, 2019).

Outro resultado do presente estudo, que se encontra publicado em artigo de Handam et al. (2021b) foi a verificação e comparação dos padrões de parâmetros de qualidade sanitária para reúso agrícola de normatizações encontradas no Brasil e dos Estados Unidos da América. No Brasil poucas são as regulamentações sobre água de reúso com padrões de qualidade sanitária para agricultura, o que dificulta a utilização deste recurso hídrico com segurança no território brasileiro, sem causar riscos para a saúde coletiva. As normativas brasileiras existentes, em geral, são menos restritivas em relação as normas internacionais. A Resolução CONERH da Bahia nº 75/2010 apresentou-se como a mais completa em termos de parâmetros de qualidade microbiológicos e físico-químicos. Nesta lei, os padrões de qualidade da maioria dos parâmetros físico-químicos estão similares a norma internacional estabelecida em

Guidelines for water reuse - EPA (2012), e os parâmetros microbiológicos são os mesmos estabelecidos em Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater - WHO (2006). A Norma da ABNT 13969/97 (ABNT, 1997), que é a única norma em nível federal que possui alguns parâmetros de qualidade para utilização de água de reúso, recomenda valores máximos permitidos menos restritivos, acima do determinado pelas normativas internacionais (HANDAM et al., 2021b).

Na tabela 8 se encontram os parâmetros físico-químicos comparados entre as normatizações nacionais com as principais diretrizes dos Estados Unidos (HANDAM et al., 2021b).

Tabela 8 - Valores máximos permitidos dos parâmetros físico-químicos e bacteriológico das normativas brasileiras sobre reúso agrícola em comparação com as normas dos EUA.

Parâmetros	ABNT (1997)	BAHIA (2010)	CEARÁ (2017)	WHO (2003)	EPA (2012)
Coliformes termotolerantes (UFC/mL)	23	100	4,6	10	2
pH	ND	ND	6,0 - 8,5	6,6 – 7,0	6,0 – 9,0
Condutividade elétrica (dS/cm)	ND	3,0	3000	< 0,7(B); 0,7-3,0 (M); >3 (A)	< 0,7 (B); 0,7-3,0 (M); >3 (A)
Cloreto (mg/L Cl ⁻)	ND	100-350	ND	> 3	< 4 (B); 4– 0 (M); >10 (A)
Chumbo (mg/L)	ND	5,00	ND	5,00	5,00
Alumínio (mg/L)	ND	5,00	ND	5,00	5,00
Arsênio (mg/L)	ND	0,10	ND	0,10	0,10
Berílio (mg/L)	ND	0,10	ND	0,10	0,10
Boro (mg/L)	ND	0,5	ND	ND	0,75
Cádmio(mg/L)	ND	0,01	ND	ND	0,01
Cobalto(mg/L)	ND	0,05	ND	0,05	0,05
Cobre(mg/L)	ND	0,20	ND	0,20	0,20
Cromo(mg/L)	ND	0,1	ND	0,1	0,1
Ferro (mg/L)	ND	5	ND	5	5

Fluoreto (mg/L)	ND	1	ND	1	1
Lítio (mg/L)	ND	2,50	ND	2,50	2,50
Manganês (mg/L)	ND	0,20	ND	0,20	0,20
Mercurio (mg/L)	ND	0,002	ND	ND	0,002
Molibdênio (mg/L)	ND	0,01	ND	0,01	0,01
Níquel (mg/L)	ND	0,02	ND	0,02	0,02
Sódio (mg/L)	ND	70	ND	<3 (B); >3 (M) <3 (B); 3 – 9 (M); >9 (A)	70
Vanádio (mg/L)	ND	0,10	ND	0,10	0,10
Zinco (mg/L)	ND	2	ND	2	2

Fonte: Handam et al. (2021b).

Normatizações: Norma da ABNT 13969/97; Resolução CONERH da Bahia nº 75/2010; Resolução Estadual do Ceará nº 2/2017; EPA - U.S. Environmental Protection Agency; Guidelines for water reuse, 2012; WHO - World Health Organization. Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater, 2006. Padrões de coliformes termotolerantes das normatizações estão em UFC/mL. ND = Não estão descritos padrões nas leis; B= risco baixo; M= risco moderado; A= risco alto. Padrões de coliformes termotolerantes da norma ABNT 13969/97 e da Resolução Estadual do Ceará nº 2/2017 estão em UFC/mL, de acordo com trabalho de Sotero-Martins et al. (2017), baseado no estudo de Gronewold e Wolpert (2008).

7.1.2 Caracterização Colimétrica e Físico-Química do Solo utilizado nos ensaios

A análise bacteriológica do solo utilizado nos ensaios, assim como os valores máximos permitidos pela lei nº 7666 de 28 de agosto de 2017 (BRASIL, 2017) estão apresentados na Tabela 9. Os níveis de coliformes totais e de *Escherichia coli* ficaram acima do padrão de qualidade sanitária estabelecido pela lei. Vale ressaltar, que do ponto de vista epidemiológico e imunológico, a presença de microrganismos patogênicos em solos não quer dizer que as pessoas vão adquirir doenças (MANCUSO e SANTOS, 2013). Contudo, a sinalização de cuidados frente aos riscos para solos contaminados, e com presença de potenciais poluentes, que podem ser adicionados no solo com o uso de certos tipos de água de reúso, que afetam a vida humana e animal, são dados fundamentais para ações em saúde. Os trabalhadores, principalmente, os que lidam continuamente com a agricultura, podem ficar

expostos ao solo contaminado com elementos que podem ser carregados através da utilização da água de reúso, sendo veículo para transmissão de doenças. No entanto, o risco pode ser reduzido através de boas práticas, com uso de equipamentos de proteção individual (EPIs) na agricultura (WHO, 2006), por isso é fundamental saber os contaminantes e poluentes que possam estar na água de reúso.

Tabela 9 – Resultados das análises bacteriológicas do Solo utilizado no estudo e valores máximos permitidos (VMP) pela lei nº 7666 de 28 de agosto de 2017 do Rio de Janeiro. Média e desvio padrão.

Bactérias UFC/g	Resultados	VMP
Coliformes totais	220 ± 13	>138,44
<i>Escherichia coli</i>	30 ± 4	>1,85

Fonte: própria autora.

As análises físico-químicas do solo utilizado nos experimentos apresentaram valores que não estão, em sua maioria, dentro dos valores estabelecidos aos comparados com as normas da Embrapa (2015; 2017). O nível de nitrogênio amônia no solo foi adequado, pois apresentou níveis menores que 1 mg/Kg. Comparando os resultados com as normas percebe-se que o pH apresentou em média o valor de 6,22 mg/Kg, de modo que o solo foi classificado como ácido. Os valores ideais para o cultivo são os que apresentam pH na faixa de 6,0 a 9. O valor de condutividade foi 297,5 µS/cm, sendo o solo classificado como um solo salino-sódico. A quantidade de matéria orgânica no solo estava alta com valor de 10,48 dag/Kg, pois apresentou valores maiores que 3 dag/kg, demonstrando que a presença de grande quantidade de nutrientes. Valores acima do indicado pela norma indicam acúmulo de matéria orgânica no solo, que pode ser ocasionada por acidez elevada (EMBRAPA, 2015). Além disso, o nível de matéria orgânica indica indiretamente a disponibilidade de nitrogênio no solo, macronutriente essencial ao crescimento de vegetais (PES e ARENHARDT, 2015). Teores de matéria orgânica dentro do recomendado promovem melhorias na estrutura do solo, pois permite uma melhor infiltração de água no solo (SÁ et al., 2015).

Os teores de fósforo presentes no solo foram classificados como médio por apresentar o valor de 14,4 mg/dm³, para ser considerada quantidade adequada teria que estar com mais de 15 mg/dm³, portanto se aproximou do adequado. Os teores de Magnésio e Cálcio trocáveis deveriam apresentar valores até 4 cmol/kg, mas a amostra de solo utilizada e analisada apresentou valores altos e fora da faixa estabelecida. A análise de acidez trocável mostrou que

o solo apresentou 11 cmol_c/Kg, sendo considerado um resultado alto, tendo em vista que alta quantidade de alumínio no solo inibe o crescimento radicular e influenciar na disponibilidade de outros nutrientes. Além disso, o percentual de saturação foi de 34,44%, sendo considerado baixo havendo a necessidade de correção por calagem, que tem o objetivo de corrigir a acidez do solo, e fornecer suplemento de cálcio e magnésio para as plantas (EMBRAPA, 2015) (Tabela 10).

Tabela 10 - Resultados das análises físico químicas do solo e seus valores de qualidade recomendados. Valores de qualidade (VQ).

Parâmetros	Resultados	VQ
pH	6,22	>6 (alto) ⁽³⁾
Acidez trocável (cmol _c /Kg)	11	0,5 ⁽³⁾
Saturação	34,44%	<50,0 (baixa) ⁽³⁾
Condutividade (μS/cm)	297,5	≥ 4,0 ⁽³⁾
N- amônia (mg/kg)	1,1	0,5 - 2 ⁽²⁾
Fósforo (mg/dm ³)	14,4	7,1 - 15 ⁽³⁾
Matéria orgânica (dag. kg ⁻¹)	10,482	> 3 (alta) ⁽³⁾
Cálcio + magnésio trocáveis (cmol _c .kg ⁻¹)	1694,4	>4 (alto) ⁽³⁾
Cálcio trocável (mmol.kg ⁻¹)	117,81	>3 (alto) ⁽³⁾
Magnésio trocável (mmol.kg ⁻¹)	51,63	>1 (alto) ⁽³⁾

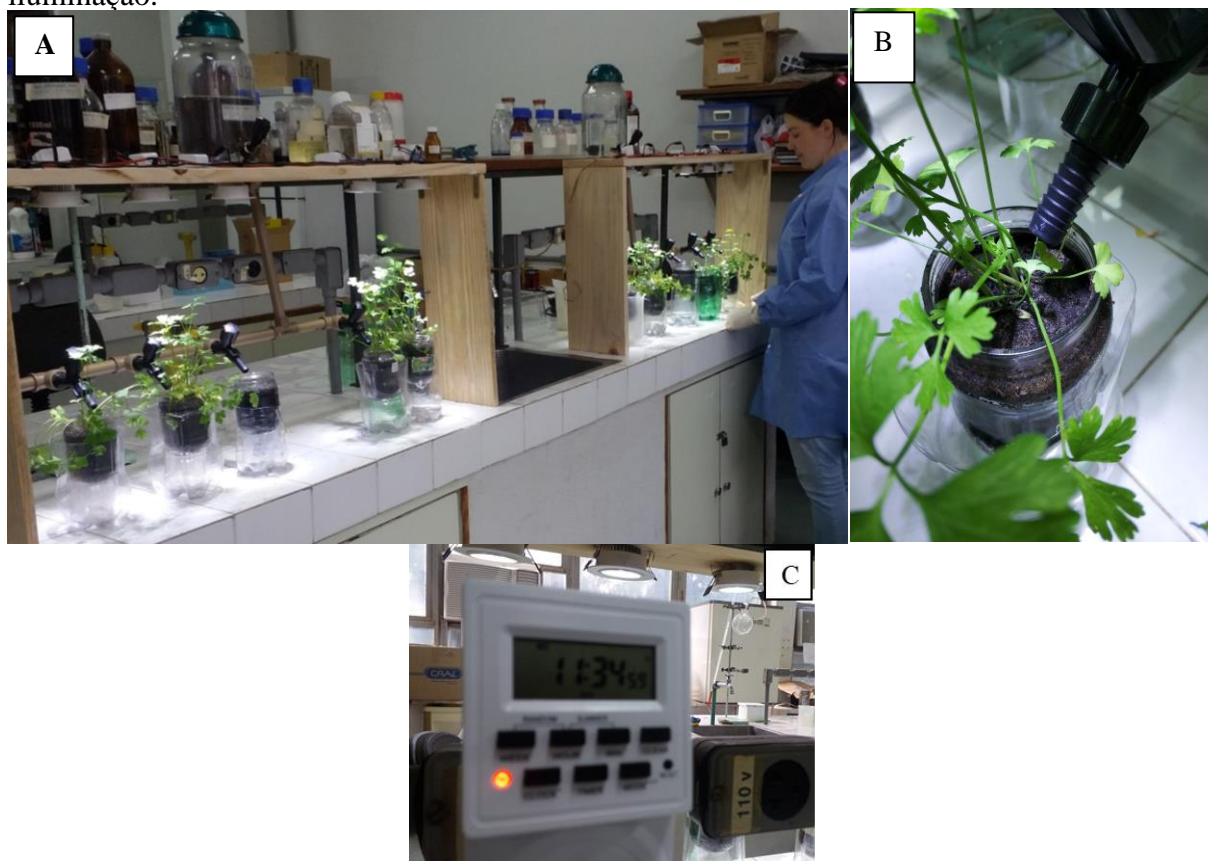
²EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária. Manual de métodos de análise de solo. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CNPQ, 3, 2017.

³EMBRAPA. Guia prático para interpretação de resultados de análises de solos. 2015.

7.2 ANÁLISES DA PRESENÇA DE CONTAMINANTES NA ÁGUA DE REÚSO E AVALIAÇÃO INDIRETA DOS EFEITOS NA MICROBIOTA DO SOLO

O sistema para ensaio de cultivo de plantas em laboratório foi construído, e permitiu a irrigação do cultivo por gotejamento direto ao solo, sem o contato da água com as folhas, assim como permitiu uma iluminação controlada, por meio de temporizador digital, com 12 horas de iluminação direta nos cultivos. Foi possível fazer dois sistemas com as mesmas características para comparação com o grupo controle irrigado com água potável (Figura 21).

Figura 21 – (A) Imagem do sistema construído para realização do experimento de cultivo de plantas irrigadas com água de reúso em laboratório; (B) Posição do gotejamento de água diretamente para o solo através da torneira; (C) Temporizador digital para controlar a iluminação.



Fonte: própria autora.

Durante a realização dos três cultivos de salsa irrigados com as amostras de água de reúso, as condições físicas do solo mostraram que a perda de volume de solo foi proporcional com o tempo, e com o aumento da compactação do solo. Teve diminuição de 19% no peso do solo em relação ao inicial, pois apresentou peso médio de 259 g (± 29 g). Houve aumento na compactação de 10%, estando depois de 15 dias com altura de 245 cm (± 32 g). A umidade se manteve constante ao longo dos ensaios, tendo média de 2,7 cm ($\pm 0,6$ cm) de altura que a umidade atingiu sobre o papel filtro.

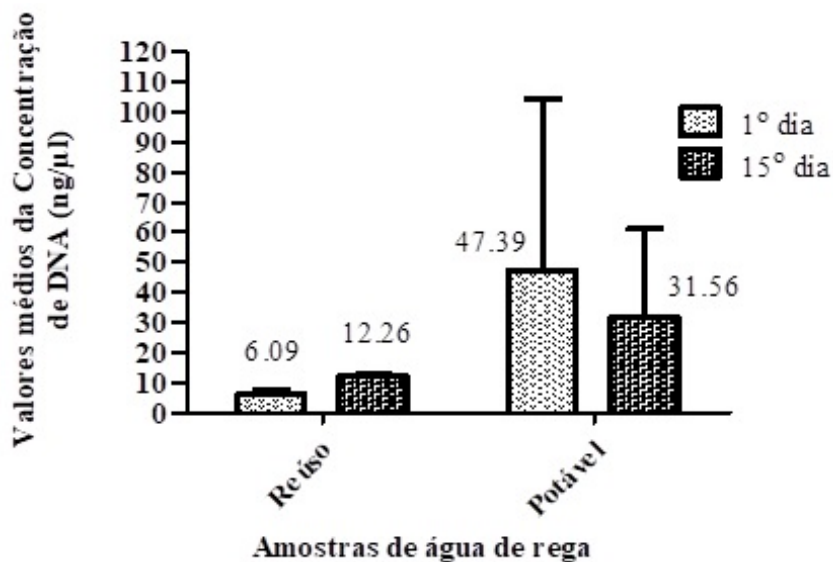
A quantificação de DNA (ng/ μ L) das amostras de “água de rega” mostrou que os cultivos irrigados com água de reúso “clorada” apresentaram um aumento da microbiota

depois de 15 dias de irrigação, com aumento de 2,01 vezes de DNA total em relação ao primeiro dia de cultivo, enquanto que com a água potável (controle) apresentou uma diminuição de 1,5 vezes da microbiota do solo. Os cultivos irrigados com água de reúso “polida” aumentaram 1,42 vezes o DNA total depois de 15 dias de irrigação, aumentando a microbiota do solo, enquanto que os cultivos irrigados com água potável (controle) apresentaram uma diminuição de 1,16 vezes da microbiota do solo. Quanto aos irrigados com água de reúso “biológica”, os cultivos tiveram aumento de 1,49 vezes de DNA total depois de 15 dias de irrigação, enquanto que os cultivos irrigados com água potável (controle) tiveram uma diminuição da microbiota do solo de 8,63 vezes. O estudo indicou que a água de reúso acrescentou uma carga de microrganismos e/ou favoreceu a manutenção e o crescimento dos preexistentes no solo devido a entrada de nutrientes, enquanto que os cultivos irrigados com água potável tiveram diminuição da microbiota do solo após 15 dias (Gráficos 2, 3 e 4).

A maior quantidade de microrganismos pode ajudar na decomposição de nutrientes no solo e disponibilização de minerais para as plantas, o que favorece o crescimento dos cultivos (MANCUSO e SANTOS, 2013). As águas de reúso podem conter grande quantidade de microrganismos, em sua maioria não patogênicos, no entanto, podem conter microrganismos patogênicos, e por isso possui o risco de transmissão de doenças afetando a saúde humana e ambiental (MONTE; ALBUQUERQUE, 2010). A transmissão de doenças se torna menor ou mesmo controlada por meio de práticas de irrigação, de cultura e de colheita utilizadas, por exemplo, aplicação de irrigação por gotejamento, e uso de equipamentos de proteção individual pelos agricultores (MORAIS et al., 2016; MANCUSO e SANTOS, 2013; WHO, 2006).

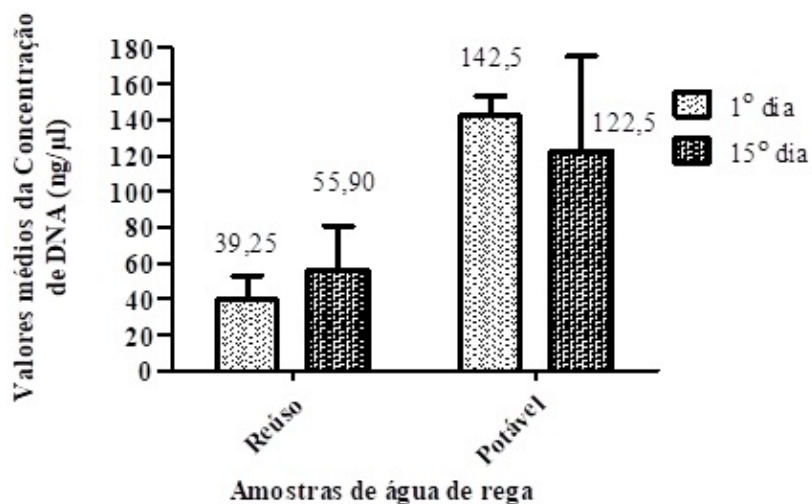
Gatta et al (2016) verificaram que apesar da identificação de microrganismos como *E. coli* e *Salmonella* spp. em amostras de esgoto por tratamento secundário e terciário, os cultivos de alcachofra, irrigados com essas amostras, não foram contaminados. E que a redução desses bioindicadores no solo pode ser devido ao sistema de irrigação por gotejamento, que evita o contato da água com a planta, e/ou pela morte das bactérias no solo, assim como pela barreira por meio das raízes das plantas. Além disso teve aumento na produção dos cultivos de 33 a 55% quando comparados com os cultivos irrigados com água doce, controle do estudo (GATTA et al., 2016).

Gráfico 2 - Valores médios da concentração de DNA (ng/ μ L) de amostras de “água de rega” de solos irrigados com água de reúso “Clorada”, e com água potável (controle), no primeiro dia e depois de 15 dias de experimento.



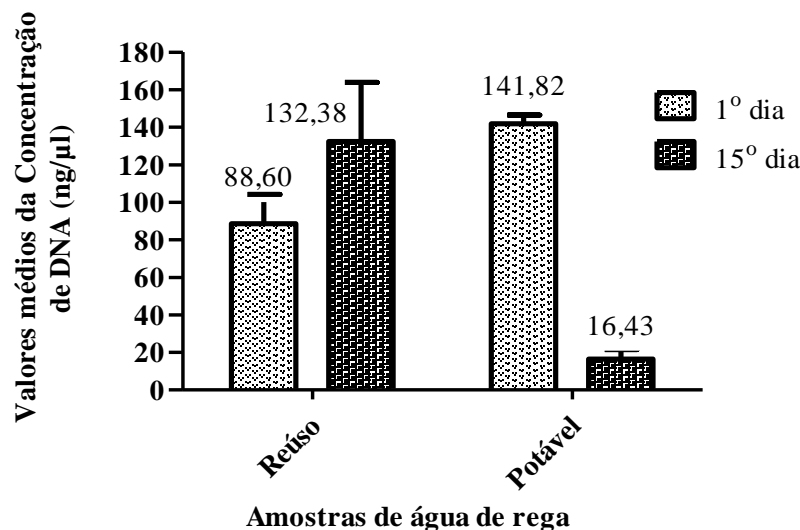
Fonte: própria autora.

Gráfico 3 - Valores médios da concentração de DNA (ng/ μ L) de amostras de “água de rega” de solos irrigados com água de reúso “Polida”, e com água potável (controle), no primeiro dia e depois de 15 dias de experimento.



Fonte: própria autora.

Gráfico 4 - Valores médios da concentração de DNA (ng/μL) de amostras de “água de rega” de solos irrigados com água de reuso “Biológica”, e com água potável (controle), no primeiro dia e depois de 15 dias de experimento.

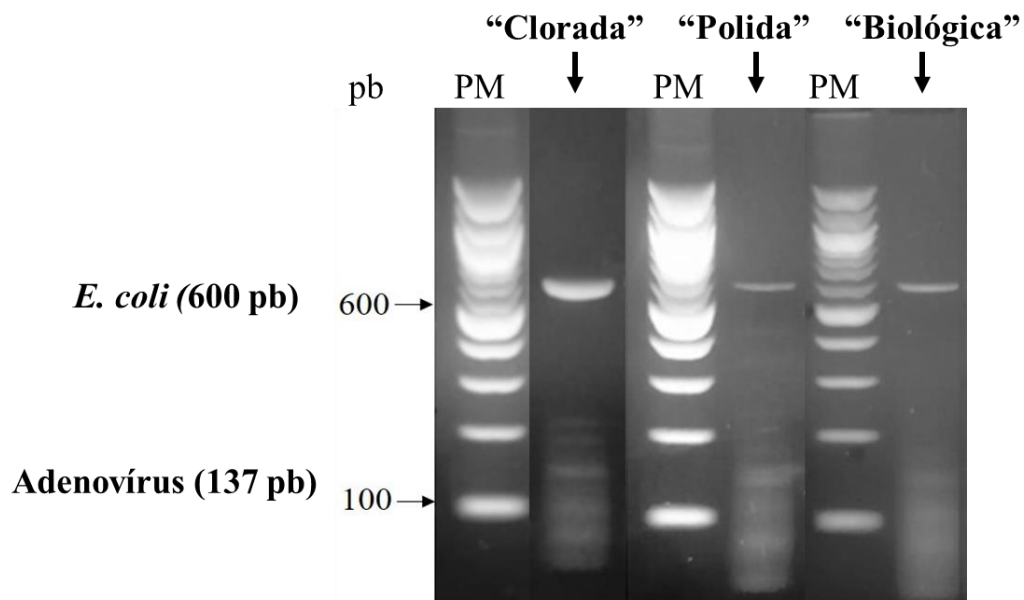


Fonte: própria autora.

Nos resultados a partir das primeiras PCRs realizadas, as amostras de água de rega estavam com níveis altos de DNA, em média acima de 20 ng/μL ($\pm 9,35$), e não amplificaram, sugerindo a presença de substâncias químicas provenientes da água de reuso e/ou do solo que interferiam na reação, inibindo a enzima DNA polimerase, por isto não ocorria à amplificação do DNA. O mesmo foi verificado também em trabalho de Rodrigues (2012). Visto isso, para padronizar todas as amostras na mesma concentração de DNA genômico capaz de produzir amplificação na PCR dos marcadores moleculares foram feitos cálculos para que as amostras ficassem na concentração final de DNA de 20 ng/μL.

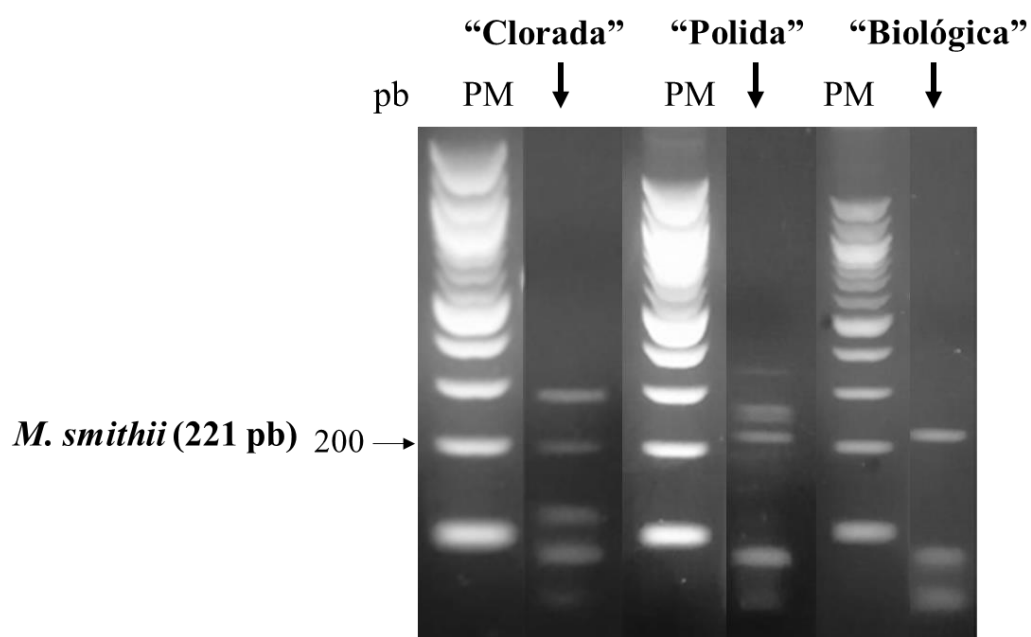
Os resultados da PCR dos bioindicadores de contaminação ambiental mostraram que os marcadores moleculares como o Adenovírus tipo 40 e 41 (HADv) e *E. coli* (gene uidA) estavam presentes em todas as amostras de água de rega originadas de irrigações com água de reuso “clorada, polida e biológica” (Figura 22). O marcador molecular *M. smithii* (*nifH*) foi detectado nos cultivos irrigados com amostras de água de reuso “polida e biológica”, sendo ausente nas amostras de água de rega dos cultivos irrigados com água de reuso “clorada” (Figura 23).

Figura 22 – Resultados da PCR dos bioindicadores de contaminação *Escherichia coli* (600 pb) e Adenovírus tipo 40 e 41 (137 pb) das amostras de água de rega dos três cultivos irrigados com água de reúso “clorada, polida e biológica”.



Legenda: As setas indicam as posições das bandas de 600pb e de 100pb do padrão de peso molecular. PM – peso molecular com 100 kb. *E. coli* e Adenovírus, com 600 pb e 137 pb, respectivamente. Fonte: própria autora.

Figura 23 – Resultados da PCR do bioindicador de contaminação *Methanobrevibacter smithii* (221 pb) das amostras de água de rega dos três cultivos irrigados com água de reúso “clorada, polida e biológica”.



Legenda: A seta indica a posição da banda de 200pb de peso molecular. Poços: PM – peso molecular com 100 kb; *M. smithii*, com 221 pb. Fonte: própria autora.

A irrigação com água de reúso alterou a microbiota do solo, pois passou a apresentar microrganismos no solo que estavam presentes na água de reúso, ficando retidos no solo durante o cultivo.

Estudo semelhante também encontrou a presença de adenovírus no solo, depois de analisar a água que percolou pelo solo (nesse estudo esse tipo de água está sendo chamada de água de rega), por meio da técnica de PCR também (MEHNERT, 2003). No estudo dos autores comparados acima, foi detectada a presença de adenovírus em uma profundidade de 3 a 4 metros de solo, simulando o nível do lençol freático (MEHNERT, 2003). Pesquisas verificaram a presença de adenovírus no solo, e verificaram que os mesmos podem atingir grandes profundidades no solo, sendo possível a contaminação das águas subterrâneas (MEHNERT, 2003; DE SERRES, 1999). Ward e Irving (1987) verificaram no solo irrigado com água de reúso a presença de vírus depois de 13 dias. Hurst et al. (1980) verificaram o deslocamento de vírus de 10 cm no solo a cada 10 dias, diante da lixiviação com ajuda de irrigação e chuva. Além disso, Gerba et al. (1981) observaram que as partículas virais em geral são adsorvidas pelo solo em 98 a 99%, sendo um filtro frente a contaminação por vírus vindos, por exemplo, da água de reúso. O solo age como um filtro que consegue remover geralmente microrganismos com tamanhos maiores que 25 μm (bactérias, helmintos, protozoários) (MANCUSO e SANTOS, 2013).

Vale ressaltar que os microrganismos identificados através da amplificação por PCR podem não estar viáveis ou infecciosos, no caso dos vírus, e não vivos no caso das bactérias *E. coli* e *M. smithii*, pois essa técnica permite verificar a presença dos genes estudados em um ambiente.

As plantas conseguem evitar o acesso de microrganismos em seus vasos capilares (PASCHOLATI, 1994; AGRIOS, 2004), pois absorvem partículas e solutos encontrados na água, como os sais minerais com a dimensão de 0,001 μm , enquanto que as dimensões de vírus, bactérias, são respectivamente, 0,1 e 1 μm (SCHÄFER, 1999 apud SCHNEIDER; TSUTIYA, 2001). Dessa forma, são mais de 100 vezes maiores do que a dimensão do sistema utilizado pelas plantas para absorver, por isso a chance de contaminação dos alimentos provenientes da parte interna das plantas é pequena. O risco maior existe do contato da água de reúso com a parte externa, de permanecer resíduos contaminantes e poluentes sobre as folhas e caules. Segundo WHO (2006) técnicas de irrigação, de forma próxima ao solo, como por exemplo, por gotejamento, diminui a chance de contaminação dos cultivos com patógenos que estão no solo, pois não ocorre o contato com as partes aéreas superficiais das plantas, como as folhas e caules (WHO, 2006). No entanto, os agricultores devem ter cuidado em

contato direto com o solo contaminado com microrganismos como adenovírus e *E. coli*, pois podem causar gastroenterites. Por isso, para o reúso agrícola, é essencial um período de interrupção entre as culturas irrigadas com água de reúso, para que microrganismos como vírus sejam inativados no solo, por meio do próprio tempo de atividade no ambiente de solo, e pelas condições de temperatura, desinfecção através do sol, que ocorre com menos de 20 dias, segundo WHO (2006). Dessa forma, o agricultor terá mais segurança quando for manusear o solo, e o consumidor a segurança da inexistência desses contaminantes, pois garantiria o desaparecimento dos patógenos bioindicadores de contaminação no solo, evitando danos à saúde dos trabalhadores. Além disso, recomenda-se o uso de equipamentos de proteção individual, como luvas, máscaras e botas impermeáveis, para evitar o contato do agricultor com o solo irrigado com água de reúso.

O resultado das análises por PCR da “amostra de água de reúso biológica” mostrou que a bactéria *E. coli* estava ausente nessa amostra (MOURA, 2019). Porém na PCR da amostra de “água de rega”, que havia sido irrigada com a água de reúso “biológica”, o gene marcador para a presença de *E. coli* foi amplificado. Apesar desse resultado, a análise bacteriológica mostrou que tinha *E. coli* na amostra de água de reúso “biológica”, pois apresentou 25.800 UFC/mL. No entanto, a presença de *E. coli* na “água de rega” pode ser atribuída a presença dessa bactéria no próprio solo, visto que na análise bacteriológica do solo também havia a bactéria, tendo 30 UFC/g de *E. coli* no solo.

Os tratamentos do esgoto, para produção dos diferentes tipos de água de reúso que foram utilizadas nesse trabalho, não conseguiram retirar os traços dos microrganismos indicadores de contaminação, como o adenovírus tipos 40 e 41 e a *E. coli* que são patogênicos ao ser humano, causadores de gastroenteritis (MCQUAIG *et al.*, 2012).

Em outros estudos (MOURA, 2019; JIANG, NOBLE, CHU, 2001; PINA *et al.*, 1998) que utilizaram o adenovírus, a *E. coli* e a *M. smithii* como bioindicadores de contaminação fecal humana em águas, relataram que a presença desses organismos indicam a possível presença também de outros microrganismos de origem fecal humana, que podem ser comensais ou patógenos, sendo estes últimos um perigo à saúde humana (SINIGALLIANO *et al.*, 2010).

7.3 AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DA PLANTA IRRIGADAS COM ÁGUA DE REÚSO (INDICADOR INDIRETO DOS BENEFÍCIOS DO USO DE ÁGUA DE REÚSO)

Em relação a avaliação da altura média das plantas, comparando o grupo irrigado com água de reúso e grupo irrigado com água potável (grupo controle), foi observado ao final do experimento que as plantas regadas com água de reúso tiveram uma altura média de 11,3 cm ($\pm 1,68$), enquanto que as irrigadas com água potável com uma altura média de 9 cm ($\pm 1,65$). A utilização da água de reúso pode representar uma fonte de nutrientes disponíveis para aplicação na agricultura (SHAER-BARBOSA et al., 2014). Segundo Werner (1999), essa adição pode melhorar algumas propriedades físico-químicas como retenção de água, absorção de nutrientes e variações de temperatura no interior, e assim favorecer o crescimento dos cultivos. Andrade et al. (2012) também verificaram que as plantas irrigadas com água de reúso tiveram maiores valores médios de altura (cm) em relação as regadas com água de abastecimento.

Outro fato observado foi o maior desenvolvimento das plantas irrigadas com água de reúso, pois as plantas do grupo irrigado com água de reúso ficaram com as folhas mais verdes, em comparação com o grupo de plantas irrigadas com água potável. Costa et al. (2012) encontraram resultados que também apontam que as plantas irrigadas 100% com água de reúso foram as que obtiveram os melhores resultados de desenvolvimento, inclusive de tamanho. Isto corrobora com a hipótese da contribuição da presença de mais nutrientes provenientes de matéria orgânica que permanece na água de reúso, quando comparada com a água potável. E aponta que a água de reúso pode oferecer uma quantidade maior de nutrientes que auxiliaram no desenvolvimento das plantas. O solo e os cultivos agem como biofiltros naturais, e a utilização de água de reúso na irrigação pode diminuir os gastos com a fertilização dos cultivos (HARUVY, 1997).

Quanto à análise do grau de acamamento, os resultados mostraram que tiveram diferenças entre os cultivos irrigados com água de reúso e os regados com água potável (controle), tendo em vista que os irrigados com água potável tiveram menor grau de acamamento, com notas 4, 1 e 2, em comparação com os irrigados com água de reúso, que obtiveram notas 5, 2, 5. Percebe-se que dois dentre os três cultivos irrigados com água de reúso, apresentaram maior grau de acamamento, com nota 5 (Tabela 11). Este resultado pode se dar pela quantidade maior de nutrientes no solo sendo irrigado com água de reúso, pois

segundo Mann et al. (2001), altas doses de fósforo e potássio favorecem o acamamento por causar um crescimento vegetativo maior.

Tabela 11 - Notas atribuídas às plantas irrigadas com água de reúso “clorada” e regadas com água potável. Os vasos 1, 2 e 3 foram triplicatas de cada condição experimental.

Tipo de água usada na irrigação	Vasos	1º dia	8ª dia	15º dia
Com água de reúso	1	3	5	5
	2	1	3	2
	3	3	5	5
Com água potável (controle)	1	2	3	4
	2	1	1	1
	3	2	2	2

Fonte: própria autora.

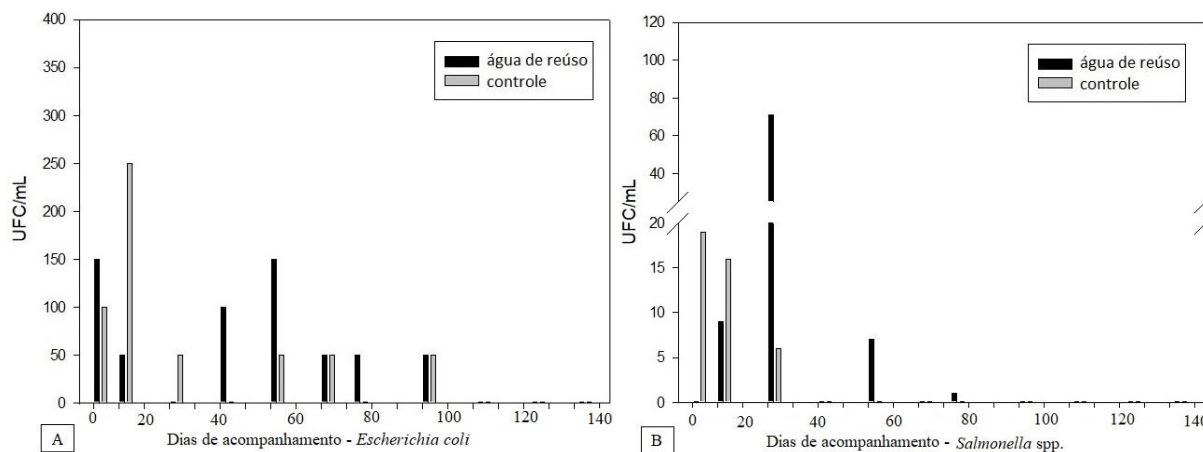
7.4 ANÁLISE DE DECAIMENTO DE PATÓGENOS AO LONGO DO TEMPO NO SOLO

Na análise de decaimento dos patógenos indicadores de contaminação acrescentados no solo para acompanhamento (*Escherichia coli* e *Salmonella spp.*), foi observado um decaimento para *E. coli* e *Salmonella spp.* de 106 e 91 dias, respectivamente, no vaso com cultivo da hortaliça *Petroselinum crispum* (salsa) irrigado com água de reúso contendo a contaminação artificial. Enquanto que no cultivo irrigado com água potável (controle) exposto a contaminação artificial foi observado decaimento para *E. coli* e *Salmonella spp.* de 106 e 35 dias, respectivamente (Gráfico 5). Mostrando que o tempo de sobrevivência do indicador *E. coli* não foi afetado durante o tempo de realização dos ensaios, ou seja, foi similar a curva de decaimento, tanto no vaso irrigado com água de reúso quanto com água potável. Porém para o indicador *Salmonella spp.*, a curva de decaimento foi 2,6 vezes mais acelerada no vaso irrigado com água potável em comparação com o irrigado com água de reúso.

Em relação aos vasos com cultivos da hortaliça *Petroselinum crispum* que não tiveram contaminação artificial, no vaso irrigado com água de reúso foi verificado decaimento para *E. coli* e *Salmonella spp.* de 120 e 106 dias, respectivamente. Enquanto que o cultivo irrigado com água potável o decaimento foi de *E. coli* e de *Salmonella spp.* 120 e 63 dias, respectivamente (Gráfico 6). Sempre o decaimento para *Salmonella spp.* foi mais rápido em

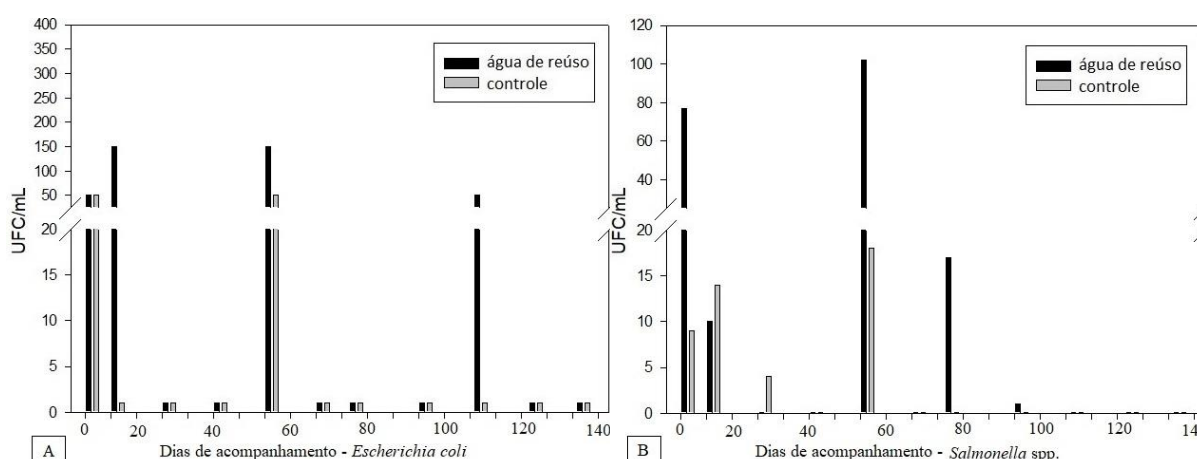
comparação ao decaimento de *E. coli*, ou seja, irrigados com água potável foi 1,7 vezes mais acelerado do que com água de reúso.

Gráfico 5 – Análise de decaimento de (A) *Escherichia coli* (UFC/mL) e (B) *Salmonella* spp. nos cultivos de planta com suplementação artificial de *E. coli* e *Salmonella* spp., irrigados com água de reúso “clorada” e com água potável (controle). Região de corte do gráfico B entre 20 a 25.



Fonte: própria autora.

Gráfico 6 – Análise de decaimento de (A) *Escherichia coli* (UFC/mL) e (B) *Salmonella* spp. nos cultivos de planta, sem suplementação, irrigados com água de reúso “clorada” e com água potável (controle). Região de corte dos gráficos A e B entre 20 a 25.



Fonte: própria autora.

Foi verificado que o tempo de decaimento de *Salmonella* spp. nos cultivos irrigados com água de reúso foi mais lento em comparação com os cultivos irrigados com água potável. Em média, o decaimento nos irrigados com água de reúso foi de 98 dias (± 10), e nos vasos

irrigados com água potável tiveram tempo médio de 49 dias (± 19), ou seja, com água de reúso foi o dobro do tempo. Isso demonstra que a água de reúso pode estar contribuindo para a sobrevivência do microrganismo patógeno indicador, pois pode oferecer mais nutrientes ao solo, o que favorece diretamente a manutenção da microbiota. Portanto, os dados considerados para o patógeno indicador *Salmonella spp.*, indicam que para utilização de água de reúso na agricultura, precisaria de um tempo de interrupção entre os plantios irrigados com água de reúso. Esse tempo de espera entre uma cultura e outra, garantiria o desaparecimento do patógeno bioindicador de contaminação no solo, e diminuiria o risco de agravos à saúde do agricultor que manipularia o solo, e os cultivares. De acordo com Paganini (2003), depois da última irrigação nos cultivos, tanto a *Salmonella spp.* como a *Escherichia coli* conseguem sobreviver por até dez dias. E durante a irrigação do cultivo com água de reúso, o agricultor deve ter cuidados, por isso recomenda-se o uso de equipamentos de proteção individual, como luvas, máscaras e botas impermeáveis, para evitar o contato do agricultor com o solo irrigado com água de reúso.

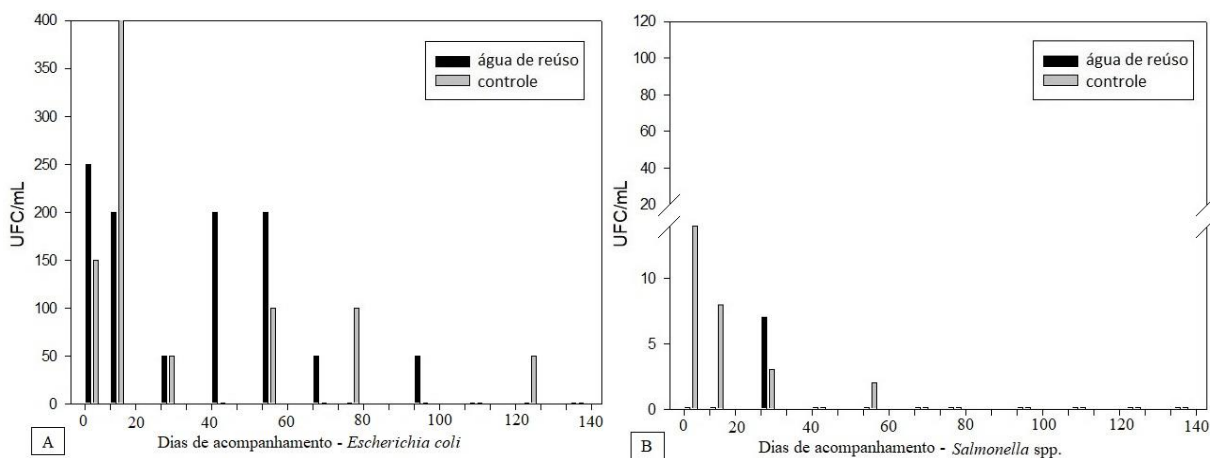
O tempo de sobrevivência da bactéria *E. coli* foi maior em comparação com a *Salmonella spp.*, e não teve distinção em relação a irrigação com água potável. Em média o tempo de decaimento nos vasos irrigados tanto com água de reúso quanto com água potável foi de 113 dias ($\pm 9,8$). Portanto, maior tempo de acompanhamento da *E. coli* seria necessário, pois não foi possível estabelecer o tempo de espera (de parada) entre a cultura e a colheita, irrigada com esse tipo de água de reúso. Porém, trabalhos como de Faria et al. (2020) indicaram que em solo agrícola cultivado com *Eucalyptus* contendo fertilizantes provenientes de esgoto, demoraram 54 semanas, 379 dias para decaimento desse patógeno bioindicador, e voltar ao nível de *E. coli* encontrado no solo. Faria et al. (2020) ressaltam que o tempo de sobrevivência de *E. coli* depende também da temperatura do ambiente, sendo maior em climas tropicais em relação a climas temperados. Ngole et al. (2006) e Estrada et al. (2004) identificaram em climas temperados Espanha e Botswana, decaimento de *E. coli* com 90 e 80 dias, respectivamente. No presente estudo os cultivos estavam em temperatura ambiente controlada em 24°C, possuindo temperatura de clima tropical, o que favoreceu o tempo mais prolongado de sobrevivência de *E. coli*.

A continuidade no acompanhamento do decaimento do estudo não foi possível, devido a limitação do estoque da amostra de água de reúso coletada, com isso não teriam condições de acompanhar com o mesmo lote de água. Recomenda-se que novos estudos sejam realizados, e que tenham maior tempo de acompanhamento do decaimento de *E. coli*.

Sobre o resultado da análise de decaimento no vaso com solo apenas (solo nu) irrigado com água de reúso com contaminação artificial foi observado o tempo de decaimento de *E. coli* e *Salmonella* spp. de 106 e 35 dias, respectivamente. Enquanto que o vaso com solo nu irrigado com água potável com contaminação artificial foi verificado tempo de decaimento de *E. coli* e *Salmonella* spp. de 134 e 63 dias, respectivamente (Gráfico 7).

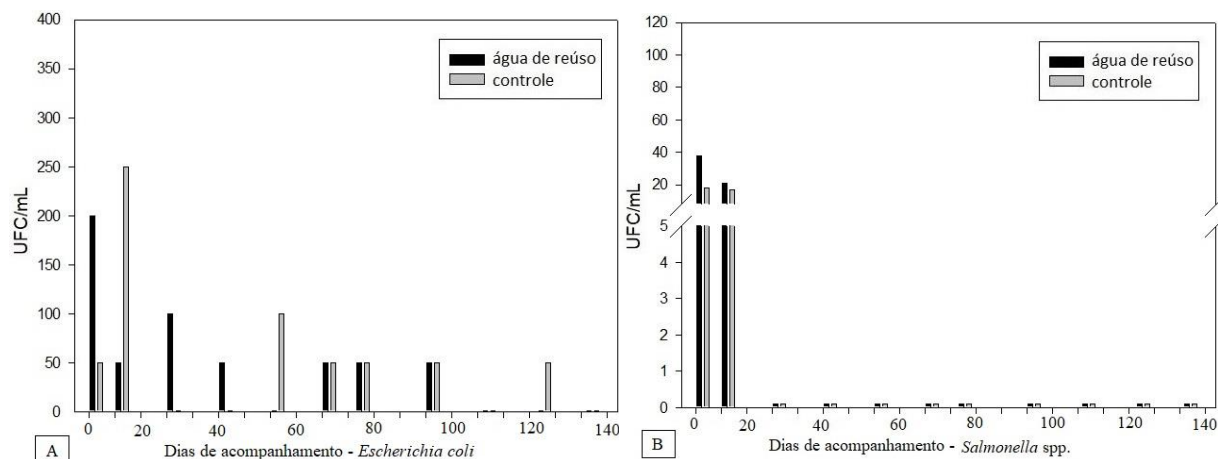
Em relação aos vasos com solo nu que não tiveram contaminação artificial (controle negativo), no vaso irrigado com água de reúso foi verificado tempo de decaimento de *E. coli* e *Salmonella* spp. de 106 e 21 dias, respectivamente. Enquanto que o cultivo irrigado com água potável o tempo de decaimento foi de *E. coli* e de *Salmonella* spp. 134 e 21 dias, respectivamente (Gráfico 8).

Gráfico 7 – Análise de decaimento de (A) *Escherichia coli* (UFC/mL) e (B) *Salmonella* spp. nos vasos com apenas solo, com suplementação artificial de *E. coli* e *Salmonella* spp., irrigados com água de reúso “clorada” e com água potável (controle). Região de corte do gráfico B entre 14 a 20.



Fonte: própria autora.

Gráfico 8 – Análise de decaimento de (A) *Escherichia coli* (UFC/mL) e (B) *Salmonella* spp. (UFC/mL) nos vasos com apenas solo, sem suplementação, irrigados com água de reúso “clorada” e com água potável (controle). Região de corte do gráfico B entre 5 a 8.



Fonte: própria autora.

Observa-se que o tempo de decaimento de *Salmonella* spp. nos vasos apenas com solo, que não foram contaminados artificialmente (controle negativo) foi mais rápido (21 dias) em comparação com os vasos contaminados artificialmente, levando tempo médio de 49 dias (\pm 19). O decaimento de *Salmonella* spp. nos vasos com solo nu também foi mais acelerado (3,7 vezes) em comparação com vasos com cultivos de hortaliça *Petroselinum crispum* (salsa). Isto pode ser devido a maior incidência de luminosidade direta no solo, assim como de infiltração mais rápida de água, o que diminui o tempo de sobrevivência desses microrganismos no solo.

A radiação ultravioleta é considerada um fator abiótico tóxico para microrganismos, e interfere no tempo de sobrevivência dos mesmos (THOMAS-SOCCOL et al., 2010; ROZEN e BELKIN, 2001). Isto mostra que os cultivos da hortaliça *Petroselinum crispum* podem ter inferido também na sobrevivência de *Salmonella* spp., pois com a cobertura vegetal fazia sombreamento do solo, diminuindo a incidência de luz passagem de luz diretamente ao solo. A planta também ajuda para retenção de água no solo, por meio das raízes, o que segundo Rosa et al. (2003) pode favorecer a manutenção da umidade do solo, auxiliando na sobrevivência dos microrganismos.

Zaleski et al. (2005) verificaram também em estudo de avaliação do tempo de sobrevivência de *Salmonella* spp. entre duas e três semanas no solo. Isso corrobora com os resultados obtidos nos vasos somente com solo e sem contaminação artificial, que apresentaram decaimento de 21 dias. Porém Thomaz-Soccol et al. (2010) relataram que o tempo de sobrevivência da *Salmonella* spp. no solo pode variar de menos de uma semana a

até seis meses, dependendo das condições de umidade e temperatura a que estes microrganismos estão expostos. Na normativa de WHO (2006) indica que o tempo de sobrevivência de *Salmonella* spp. no solo pode ser por até 70 dias.

No vaso com planta e no vaso com solo nu, irrigados com água de reúso com contaminação artificial não foi possível começar a análise de decaimento na primeira semana, pois apresentaram ausência de crescimento de *Salmonella* spp. na água de rega. Enquanto na segunda semana de coleta foram verificados a presença desses microrganismos na água de rega. Considerando a segunda semana como o início do acompanhamento do decaimento, os tempos de decaimento no vaso com cultivo de hortaliça e no vaso com solo nu ocorreram em 84 e 28 dias, respectivamente.

Em estudo de Faria (2015) foram observadas diminuições nos níveis de contagem de colônias de *Salmonella* spp., aumentos nos níveis de unidades de colônias cultivadas ao longo do experimento. Isto também foi verificado na maioria dos cultivos no ensaio do presente estudo.

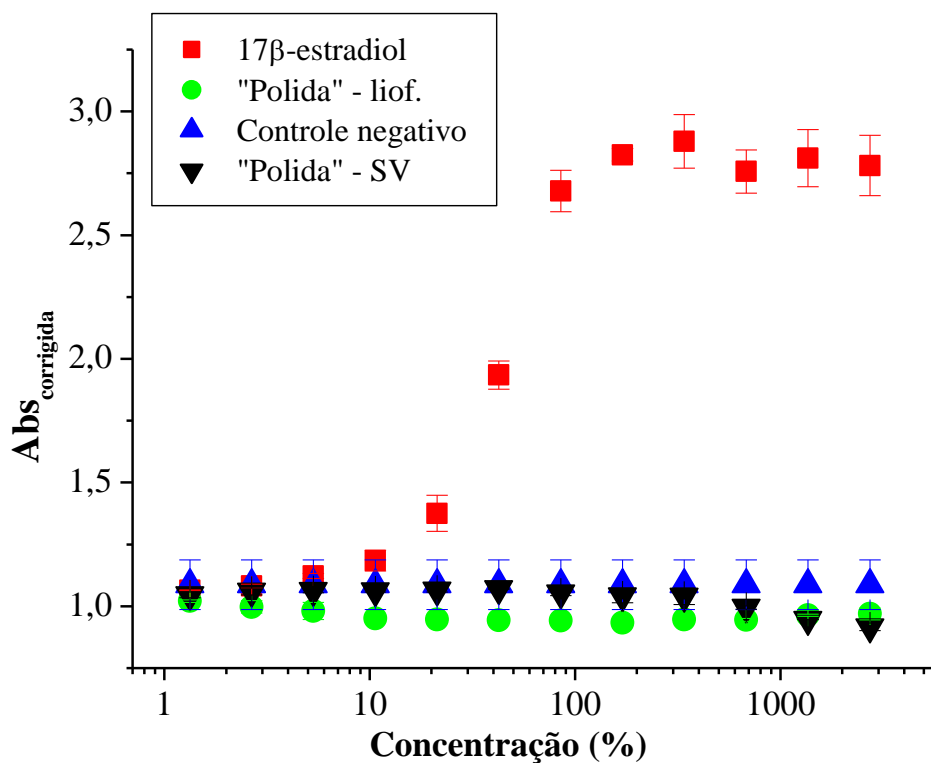
A quantificação da bactéria *Escherichia coli* nos cultivos com a salsa, no presente estudo, apresentou aumento e diminuição nos níveis de contagem de colônias de *Escherichia coli* durante as semanas após o início do experimento. Os níveis aumentados de *E. coli* podem ser justificados segundo Ishii e Sadowsky (2008) pela introdução de mais nutrientes originários da água de reúso, que faz com que aumente a concentração de *E. coli* no solo, e com isso parte dessas bactérias conseguem se adaptar no solo e ser cultivada.

Segundo Edmonds (1976) a mortalidade da *Escherichia coli* está diretamente relacionada com fatores como temperatura, umidade, pH, composição física do solo e competição microbiana. Dessa forma, os fatores ambientais pelas condições controladas do laboratório sobre os cultivos agrícolas, podem favorecer a manutenção e cultivo da *E. coli* no solo. Scherer (2016) sugere que a irrigação de hortaliças com águas que apresentam altos níveis de coliformes podem contribuir para o aumento ou manutenção da população de microrganismos. Isto corrobora com o estudo, pois os vasos irrigados com água de reúso sem contaminação artificial tiveram níveis médios de concentração de *E. coli* 1,8 vezes mais elevados em comparação ao grupo controle.

7.5 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE POLUENTES NA ÁGUA DE REÚSO

Os resultados das análises de substâncias com atividade estrogênica nas amostras de água de reúso demonstraram que as amostras de água de reúso “polida e clorada” não apresentaram substâncias com atividade estrogênica, segundo cálculo proposto por Routledge e Sumpter (1996), ou seja, com resultados abaixo do limite de detecção (Gráficos 9 e 10; Figuras 24 e 25). Dessa forma o resultado pode indicar também a possível inexistência de poluentes, advindos do esgoto sanitário, nessas amostras de água de reúso estudadas. No entanto, a amostra de água de reúso “biológica” apresentou substâncias com atividade estrogênica, com um valor médio de EQ-E2 de 115 ng L^{-1} ($\pm 24 \text{ ng L}^{-1}$). Atividade estrogênica nessa amostra foi verificada nas duas alíquotas analisadas concentradas por dois diferentes métodos de concentração. O resultado de 115 ng L^{-1} foi detectado a partir de 10 mL da amostra concentrada por centrifugação a vácuo (50 vezes de concentração), que mostrou uma quantidade 5,2 vezes maior de substâncias com atividade estrogênica do que a alíquota da mesma amostra concentrada por liofilização, que também mostrou equivalente de estradiol, tendo um valor médio de 22 ng L^{-1} ($\pm 12 \text{ ng L}^{-1}$) (Figura 26 e Gráfico 11). Isto pode ter ocorrido, pois a amostra que passou por uma maior concentração, poderia ter maior quantidade de poluentes tóxicos que foram capazes de inibir em 21% o crescimento do crescimento da levedura utilizada no bioensaio YES. Autores em outro estudo mostraram que amostras provenientes de esgoto provavelmente contém compostos tóxicos, e inibiram 50% do crescimento da levedura do bioensaio YES (BISTAN; LOGARE; TIŠLER, 2011).

Gráfico 9 - Curvas dose-resposta no ensaio YES de amostra de água de reúso “Polida”, concentradas por centrifugação a vácuo (SV) e por liofilização (Liof.), 17 β -estradiol (controle positivo), e o controle negativo (Branco).



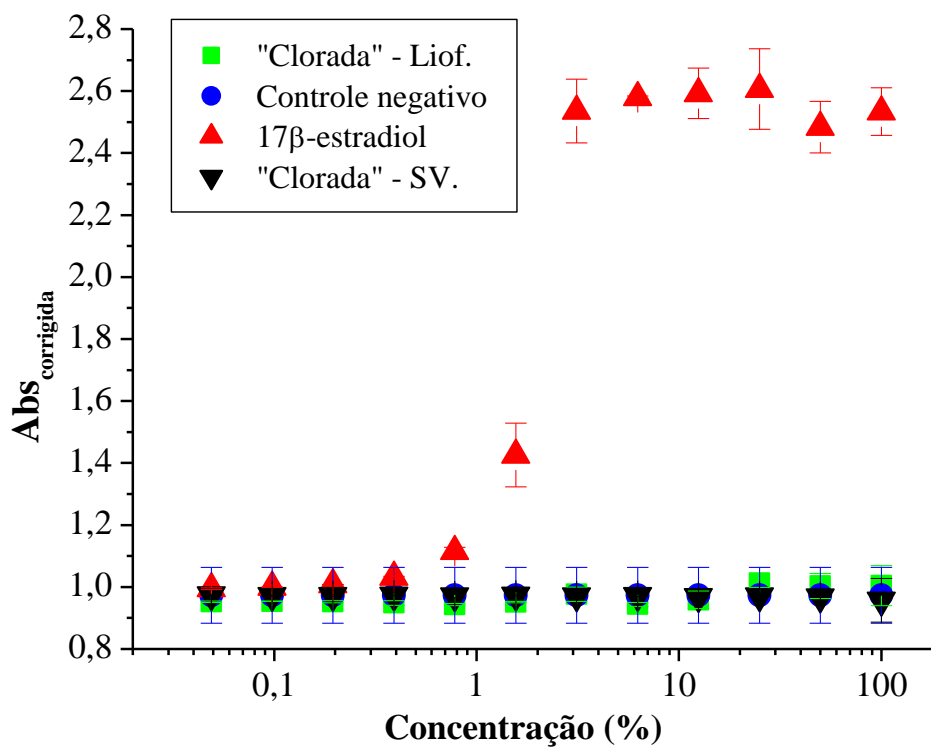
Fonte: própria autora.

Figura 24 – Placa de ensaio da análise Yes da amostra de água de reúso “polida”.



Fonte: própria autora.

Gráfico 10 - Curvas dose-resposta no ensaio YES de amostra de água de reúso “Clorada”, concentradas por centrifugação a vácuo (SV) e por liofilização (Liof.), 17 β -estradiol (controle positivo), e o controle negativo (Branco).



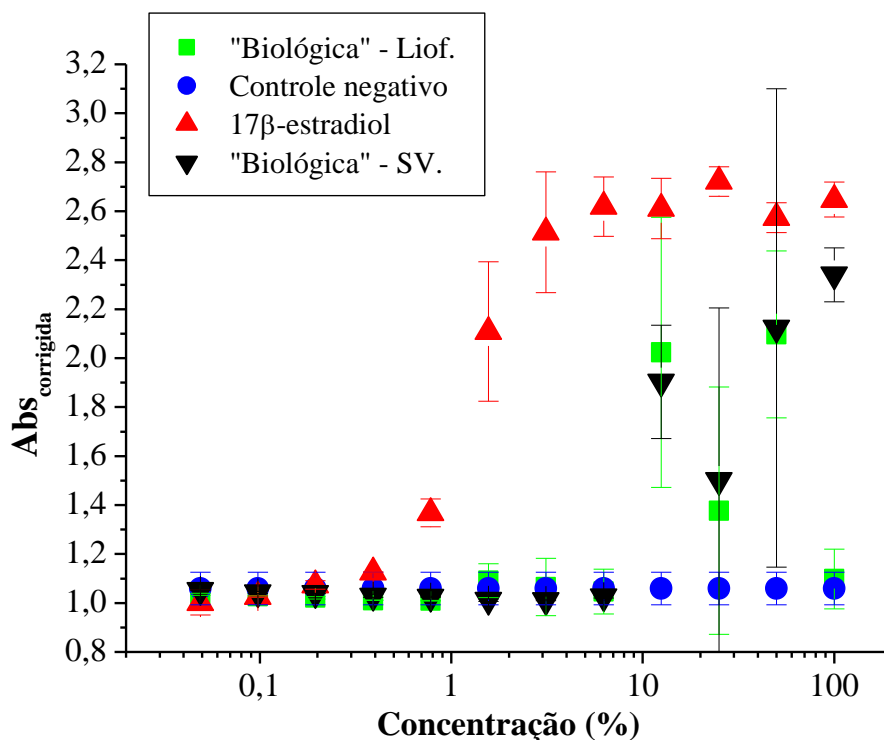
Fonte: própria autora.

Figura 25 – Placa de ensaio da análise Yes da amostra de água de reúso “Clorada”.



Fonte: própria autora.

Gráfico 11 - Curvas dose-resposta no ensaio YES de amostra de água de reúso “Biológica”, concentradas por centrifugação a vácuo (SV) e por liofilização (Liof.), 17 β -estradiol (controle positivo), e o controle negativo (Branco).



Fonte: própria autora.

Figura 26 – Placa de ensaio da análise Yes da amostra de água de reúso “Biológica”



Fonte: própria autora.

Antes de realizar o bioensaios Yes, como dito na metodologia, foi feita a análise de toxicidade para verificar possível inibição do crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* no ensaio YES, e com isso não seria possível quantificar atividade estrogênica nas amostras (BISTAN; LOGARE; TIŠLER, 2011). A análise mostrou que a amostra de água de reúso “polida” não apresentou toxicidade. As amostras “clorada e biológica” apresentaram toxicidade de 21%, nas amostras concentradas por liofilização, porém segundo Bistan, Logare e Tišler (2011) podem ser consideradas não tóxicas, pois ficaram bem próximos dos percentuais de até 20%, que não são consideradas amostras tóxicas para o crescimento da

levedura, não interferindo no resultado da quantificação de atividade estrogênica. Amostras provenientes de esgoto podem conter compostos tóxicos e inibir 50% do crescimento da levedura (BISTAN; LOGARE; TIŠLER, 2011). Além disso os autores citados mostraram que o percentual de inibição foi maior quando a levedura foi exposta a extratos de amostras mais concentradas. Foi o que pode ter ocorrido com a amostra concentrada por liofilização, que concentrou 333 vezes, enquanto que a centrifugação a vácuo concentrou 50 vezes.

A amostra de água de reúso “biológica” foi produzida a partir de esgoto obtido de águas cinzas, que são provenientes de pias da cozinha, chuveiros e máquinas de lavar, e depois passou por tratamento por um sistema de filtro físico e biológico. Provavelmente as substâncias com atividade estrogênica identificadas sejam provenientes de hormônios e produtos químicos sintéticos, como produtos de higiene e limpeza, como por exemplo, detergentes, sabonetes líquidos, tinturas, produtos para cabelo e banho. Esses produtos possuem atividade estrogênica, de acordo com Aquino et al. (2013) e Pessoa et al. (2012). Hormônios sintéticos ou naturais nesse tipo de água de reúso, por águas cinzas podem ser provenientes das águas de chuveiro, pois as pessoas possuem o costume de urinar enquanto tomam banho, e de acordo com Bila e Dezotti (2007) acabam excretando hormônios diariamente, tanto hormônios naturais por mulheres e homens, estes últimos em menor quantidade, quanto hormônios sintéticos por mulheres que usam anticoncepcional, e assim são lançados no esgoto doméstico.

O estudo mostrou que essa forma de tratamento de esgoto e produção de água de reúso não conseguiu eliminar as substâncias com atividade estrogênica da água e possivelmente não removeu poluentes químicos, que acabam persistindo na água de reúso. Segundo Aquino et al. (2013) tratamento de esgoto e de produção de água de reúso inadequados para a remoção de poluentes químicos, permitem a persistência destes na água.

A amostra de água de reúso “biológica” quando aplicada para irrigação da agricultura pode se infiltrar no solo e chegar até as águas subterrâneas, podendo contaminar a água. Nessa concentração de 115 ng L⁻¹ de equivalente de estradiol, segundo Sumpter (2005) e Segner et al. (2003) se forem hormônios estrogênicos poderiam afetar negativamente os seres vivos. Níveis de atividade estrogênica também foram verificados em amostras de água de reúso em ETAR na Itália e Holanda, 150 ng L⁻¹ e 200 ng L⁻¹, respectivamente, sendo concentrações de 17β-estradiol, 17α-etinilestradiol, estrona e estriol (BARONTI et al., 2000; JOHNSON; BELFROID; CORCIA, 2000).

De acordo com Länge et al. (2001) e Routledge et al. (1998) têm sido observados efeitos de desregulação endócrina, por meio do hormônio 17α-estradiol, causando a

feminização em peixes expostos a concentrações de 1 ng L^{-1} , mostrando que nessa concentração pode ser prejudicial à saúde dos seres vivos. Nas normativas relacionadas a reuso agrícola no Brasil, não se encontram padrões relacionados a poluentes químicos com relação a substâncias com atividade estrogênica, nem portanto não se tem um parâmetro para garantir a qualidade sanitária da água de reuso para a saúde ambiental e humana. No entanto como concentrações de 1 ng L^{-1} oferecem prejuízos para a saúde de seres vivos, sugere-se que seja um risco para a saúde ambiental e humana o uso de água de reuso para a irrigação com nível de 115 ng L^{-1} de equivalente de estradiol. O valor de 1 ng L^{-1} equivale a $0,001 \mu\text{m}$, que é o tamanho de solutos que a planta consegue absorver, como os sais minerais e pesticidas (SCHÄFER, 1999 apud SCHNEIDER; TSUTIYA, 2001).

Os pesticidas, que grande parte possui atividade estrogênica, quando entram em contato com o solo podem se comportar de diversas formas no ambiente, como por exemplo, podem ser absorvidos pelas plantas, pode ocorrer a lixiviação, podendo atingir outras regiões, adsorção, volatilização, escoamento superficial (APPLEBY e DAWSON, 1994).

Em análises de água de reuso de ETAR na Itália, Holanda foram verificados 150 ng L^{-1} , 200 ng L^{-1} , respectivamente, de concentrações de 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol, estrona e estriol (BARONTI et al., 2000; JOHNSON; BELFROID; CORCIA, 2000).

O estudo mostrou que os tratamentos de produção das amostras de água de reuso “clorada e polida” foram eficazes para a remoção de substâncias com atividade estrogênica na água. Segundo autores o tratamento de esgoto (tratamento primário e secundário) e depois por tratamentos com membranas, filtração, ultrafiltração e osmose reversa são particularmente efetivos na remoção de poluentes inorgânicos (tais como, nitrato, arsênico e flúor) e orgânicos (tais como, pesticidas, estrogênios) (MANCUSO e SANTOS, 2013; BOLONG *et al.*, 2009; OENNING JÚNIOR e PAWLOSKY, 2007).

Segundo Chen et al. (2007) os processos de tratamento convencionais de esgoto por (coagulação/floculação, sedimentação e filtração) não são eficazes na eliminação de atividade estrogênica, porém mostrou que a desinfecção com cloração possuiu potencial para a retirada dessas substâncias. A amostra da água de reuso “clorada” durante a sua produção pode ter perdido atividade estrogênica ao ser colocada em contato direto com o cloro ativo durante um tempo. Segundo Pereira et al. (2011) em seu estudo mostrou que ocorreu a remoção de 97% de substâncias com atividade estrogênica em 10 minutos de contato direto com o cloro. Westerhoff et al. (2005) verificaram 100% de remoção com tempo de contato por 24 horas, utilizando dose de cloro ativo de $3,6 \text{ mg.L}^{-1}$. De acordo com Lee et al. (2004) o cloro é um agente ativo e tem maior eficiência na remoção da atividade estrogênica conforme o maior

tempo de contato com o mesmo. Dias et al. (2015) também evidenciaram a eficiência da cloração para diminuir e remover substâncias com atividades estrogênica, no entanto sugeriu mais uma etapa para a completa remoção, como o tratamento por ozonização.

A forma de desinfecção de água e de efluentes de esgoto mais realizada no Brasil é a cloração, pois traz a vantagem de ser econômica e promove a eliminação de compostos como, por exemplo, o grupamento fenólico (PEREIRA et al., 2011). A cloração é eficaz na remoção de hormônios dependendo da concentração dessas substâncias, da quantidade e do tempo de contato de cloro residual livre com as mesmas. Entretanto há evidências de que depois da desinfecção por cloração pode ocorrer a produção de subprodutos da oxidação com o cloro que apresentam atividade estrogênica (PEREIRA et al., 2011).

Outro resultado do presente estudo, que se encontra publicado em artigo de Handam et al. (2021a) foi a verificação da eficácia dos métodos alternativos para concentração de substâncias com atividade estrogênica em água. O estudo mostrou que dentre os métodos de concentração, a técnica por centrifugação a vácuo foi a que menos interferiu com perdas de substâncias, tendo maior recuperação de equivalente de estradiol. Dos 2.000 ng L⁻¹ de E2 inseridos na amostra dopada foi detectado equivalente de estradiol (EQ-E2) de 895 ng L⁻¹ (\pm 5 ng L⁻¹), correspondendo a 45% do que foi acrescentado inicialmente. E o método de extração em fase sólida recuperou 790 ng L⁻¹ (\pm 23 ng L⁻¹), 40% de equivalente estradiol (EQ-E2); seguido do método por liofilização que recuperou 610 ng L⁻¹ (\pm 6 ng L⁻¹) 31% da concentração de equivalente de estradiol (EQ-E2) acrescentada inicialmente na amostra (Tabela 12). As amostras que não foram dopadas apresentaram resultados abaixo do limite de detecção, por meio da fórmula matemática segundo Routledge e Sumpter (1996), mostrando a inexistência de substâncias com atividade estrogênica na amostra de água de reúso estudada.

Tabela 12 - Percentual médio que cada método de concentração conseguiu recuperar de equivalente de estradiol (EQ-E2), que foi inserido nas alíquotas das amostras dopadas (concentração final 2.000 ng L⁻¹ de E2), e desvio padrão (DP) dos resultados.

Métodos	Recuperação (%)	(EQ-E2) ng L ⁻¹	DP
Centrifugação a vácuo	45	895	5
Extração em fase sólida	40	790	23
Liofilização	31	610	6

Fonte: própria autora.

Vale ressaltar, no entanto, que os métodos de liofilização e centrifugação a vácuo permitem fazer a concentração total das substâncias estrogênicas (sólidos dissolvidos e suspensos), não sendo necessária a filtragem da água antes da concentração (HANDAM et al., 2021a). As substâncias estrogênicas têm sido encontradas em maior quantidade na fase aquosa dissolvida (WILLIAMS, 1999), porém a adsorção à fase sólida da matriz não pode ser negligenciada, pois as substâncias estrogênicas possuem alta lipofilicidade e baixa volatilidade (BIRKETT e LESTER, 2019; DAGNINO *et al.*, 2010; YARAHMADI *et al.*, 2018). Estudos nacionais e internacionais demonstraram por meio de resultados efetivos a importância da análise dos sólidos dissolvidos e sólidos suspensos em matrizes ambientais aquosas para a quantificação da atividade estrogênica total (BILA *et al.*, 2019; YARAHMADI *et al.*, 2018; DAGNINO *et al.*, 2010).

Os métodos de centrifugação a vácuo e de liofilização utilizados para concentrar substâncias com atividade estrogênica são métodos que não precisam do uso de solventes químicos para a concentração de amostras. Nesse sentido são menos poluentes em comparação com o método EFS, em que se utiliza solventes como metanol, hexano (HANDAM et al., 2021a). De acordo com o documento FISPQ (2011), os solventes utilizados para a realização da extração em fase sólida são produtos inflamáveis e tóxicos, sendo poluentes ao ambiente e podem causar agravos a saúde humana e animal. O metanol, por exemplo, pode causar cegueira ou até a morte por ingestão de 30 a 100 mL do mesmo (FISPQ, 2011). Além disto necessitam de cuidados ao manuseio, em que se deve evitar o contato com a pele, olhos e roupas, e ter boas práticas de higiene.

8 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados das análises físico-químicas e bacteriológicas realizadas no estudo, apenas a água de reúso “polida” estava em condições sanitária própria para uso agrícola, de acordo com as normativas brasileiras e internacional. As demais amostras de água de reúso, “biológica e clorada”, não estavam em condições sanitárias próprias, segundo as normas vigentes que determinam padrões para o reúso agrícola.

Os resultados das análises colimétricas, físico-químicas e de substâncias com atividade estrogênica demonstraram que as metodologias empregadas na produção da amostra de água de reúso “biológica”, que utilizaram filtro físico e biológico, não foram capazes de retirar os microrganismos e poluentes de forma eficaz. A revisão da literatura e os dados de contaminantes e poluentes encontrados na água de reúso “biológica”, permitem sugerir que se faz necessário a inclusão de mais uma etapa de tratamento ou mais cuidados na manipulação dos cultivares e do solo pelos agricultores. Águas de reúso provenientes de tratamentos similares aos empregados na produção das águas de reúso analisadas nesse estudo, podem ser empregadas na agricultura desde que passem por um tratamento complementar, com o objetivo de reduzir os impactos no solo, e assim garantir um aporte de nutrientes aos cultivos, diminuindo custos com fertilizantes artificiais, e garantindo que não irão oferecer riscos à saúde pública e ambiental.

O estudo da qualidade sanitária das três amostras de água de reúso com procedências diferentes, reforça a importância da forma de tratamento e produção de água de reúso para que a mesma possua qualidade para utilização segura, e que não afete a saúde pública e ambiental. Além disso, a revisão da literatura realizada nesse trabalho sobre os padrões de qualidade nacionais e internacionais para reúso agrícola, permitiu verificar o quanto é importante a existência de uma legislação a nível nacional, que apresente os parâmetros de qualidade sanitária, para minimizar os riscos e garantir o uso de uma matriz sustentável e segura para a irrigação agrícola. Dessa forma, por lei cada Estado teria a obrigação de cumprir com o padrão de qualidade sanitária da água de reúso, visando evitar danos à saúde humana e ambiental.

Os resultados das análises de substâncias com atividade estrogênica mostraram que as amostras de água de reúso “clorada e polida” não apresentaram substâncias com atividade estrogênica, o que indica a inexistência de poluentes advindos do esgoto sanitário, e que estas formas de tratamento para a produção das águas de reúso foram eficazes para a remoção de

poluentes. Como esperado, a amostra “biológica” apresentou substâncias com atividade estrogênica, com a concentração média de EQ-E2 igual a 115 ng L⁻¹, pois provavelmente poluentes de materiais de higiene e de limpeza dos domicílios persistiram após o tratamento de produção da água de reúso. O tratamento para produção dessa água de reúso não se mostrou eficaz, e, portanto, a amostra de água de reúso “biológica”, apresentou-se imprópria para a irrigação na agricultura. Essa concentração de substâncias com atividade estrogênica poderia ser prejudicial à saúde de seres vivos, e poderia ser absorvida pelas plantas.

As quantificações de DNA mostraram que a água de reúso contribuiu para o aumento na quantidade de microbiota no solo, enquanto que os cultivos irrigados com água potável tiveram diminuição da microbiota após 15 dias. O resultado indicou que a irrigação diária e a composição da água de reúso acrescentou uma carga de microrganismos e/ou favoreceu a manutenção e o crescimento dos preexistentes no solo devido a entrada de matéria orgânica (nutrientes). O aumento da microbiota do solo pode ajudar na decomposição e disponibilização de minerais para as plantas, o que favorece o crescimento das culturas.

Os resultados da PCR indicaram que ao final dos ensaios os bioindicadores de contaminação Adenovírus tipo 40 e 41 e *Escherichia coli* estavam presentes no solo dos três cultivos. E a bactéria *Methanobrevibacter smithii* estava presente nos solos irrigados com as águas de reúso “polida e biológica”. A irrigação com água de reúso alterou a microbiota do solo, pois foram amplificados os marcadores dos microrganismos analisados no solo, que estavam presentes na água de reúso, ficando retidos no solo durante o cultivo. A presença dos bioindicadores podem indicar a possível existência de outros microrganismos de origem fecal humana, por isso deve-se ter cuidado com o contato direto com o solo, pois podem causar doenças. Por isso, recomenda-se um período de interrupção entre a irrigação de plantios com água de reúso, pois o agricultor terá mais segurança quando for manusear o solo e o consumidor a segurança da inexistência desses contaminantes.

Diante dos estudos realizados nessa pesquisa, assim como pela revisão da literatura, sugere-se que a irrigação utilizando água de reúso seja por meio de aplicação por gotejamento, onde a água vai direto para o solo, não entra em contato com as folhas das plantações.

A avaliação do desenvolvimento das plantas durante o experimento indicou que a água de reúso pode oferecer uma quantidade maior de nutrientes ao solo, o que auxilia no desenvolvimento das plantas. Dessa forma, o reúso agrícola poderia diminuir os gastos com a fertilização do solo.

Os resultados sobre análise de decaimento de *Salmonella spp.* nos cultivos de *Petroselinum crispum* (salsa), demonstraram que a água de reúso pode ter influenciado na manutenção das bactérias, oferecendo mais nutrientes. Para utilização de água de reúso na agricultura, o estudo mostrou que se deve ter um tempo de interrupção entre os plantios irrigados com água de reúso. Essa espera garantiria o desaparecimento do patógeno bioindicador de contaminação no solo, para que não cause danos à saúde dos agricultores que manipularia o solo, e os cultivares. Durante o reúso agrícola o agricultor deve ter cuidados, por isso recomenda-se o uso de equipamentos de proteção individual, como luvas, máscaras e botas impermeáveis, para evitar o contato do agricultor com o solo irrigado com água de reúso.

Os resultados encontrados nos vasos com solo nu demonstraram que o decaimento também foi mais rápido em comparação aos vasos com cobertura vegetal (salsa). Isto pode indicar que a incidência de luminosidade direta no solo, assim como a infiltração mais rápida de água, devido à falta de cobertura vegetal diminui o tempo de sobrevivência desses microrganismos no solo. A planta pode ter interferido na sobrevivência de *Salmonella spp.*, pois fazia sombreamento no solo, assim como manutenção da umidade do solo, auxiliando na sobrevivência dos microrganismos.

O estudo demonstrou que, se a água de reúso estiver dentro dos padrões de qualidade sanitária, se for feita irrigação por gotejamento, e com um tempo de interrupção entre as culturas irrigadas com água de reúso, esta representa uma fonte de água segura e sustentável para irrigação da agricultura. Independente da origem do esgoto, o tratamento pode produzir água de reúso com qualidade para reúso agrícola. Para isso é fundamental a criação de lei federal de água de reúso para agricultura, a fim de evitar danos à saúde humana e ambiental.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante do volume de dados gerados nesse trabalho, e devido a pandemia por coronavírus, SARS-CoV-2 (doença Covid-19), que impossibilitou a realização de alguns ensaios programados, relato algumas perspectivas futuras que podem ser desdobradas futuramente:

- Realizar experimento a partir das extrações de DNA realizadas das amostras de água de rega dos cultivos, utilizando método de RFLP para a avaliação das alterações da microbiota do solo antes e depois dos ensaios de rega com água de reúso;
- Analisar por metagenômica as alterações na microbiota do solo, a partir das amostras de água de rega, antes e depois dos cultivos irrigados com água de reúso;
- Verificar nas amostras de água de rega irrigadas com água potável os biomarcadores moleculares;
- Realizar experimento utilizando amostras de água de reúso de origens industriais para irrigação de cultivos;
- Contribuir para a inclusão de parâmetros de qualidade sanitária na lei federal de água de reúso para utilização na agricultura.

REFERÊNCIAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 13.969 de 30 de outubro de 1997. Unidades de tratamento complementar e disposição final dos efluentes líquidos. Rio de Janeiro, out. 1997. 60p.

AEMA: Sustainable water use in Europe. Part 2: Demand management. n. 19. Environmental issue report. European Environment Agency, 2001. Disponível em: <http://www.eea.eu.int>

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5 ed. San Diego: Academic Press, 2004. 922 p.

AGROMINEIRA. Mudanças nativas. 2014 [Website Internet]. Disponível em: <http://www.agromineira.com.br/viveiro/>. Acesso em: 18 março 2019. 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.

ALBUQUERQUE, M. A. et al. Comparação entre coeficientes similaridade um aplicação em ciências florestais. **Matemática e Estatística em Foco**, v. 4, n. 2, p. 102–114, 2016.

AL-HAMAIIEDEH, H. D. The impact of greywater reuse in irrigation on public health and safety. **Electronic Journal of Geotechnical Engineering**, v. 15, p. 1131–1138, 2010.

ALMEIDA, R. G. DE. Aspectos legais para a água de reúso. **Vértices**, v. 13, n. 2, p. 31–43, 2011.

ALMEIDA, O. A. DE. **Qualidade da água de irrigação**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2010.

ALUM, A. et al. Oxidation of bisphenol A, 17 β -estradiol, and 17 α -ethynyl estradiol and byproduct estrogenicity. **Environmental Toxicology**, v. 19, n. 3, p. 257–264, 1 jun. 2004.

ALVES, M. V. et al. Macrofauna do solo influenciada pelo uso de fertilizantes químicos e dejetos de suínos no Oeste do Estado de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 589-598, 2008.

AL-ZBOON, K.; AL-ANANZEH, N. Performance of wastewater treatment plant in Jordan and suitability for reuse. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 15, p. 2621–2629, 2008.

ANA- Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico. **Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil**. BRASÍLIA - DF, 2017. p. 169.

ANA- Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico. **Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil**. BRASÍLIA - DF, 2013. p. 169.

ANDRADE, S. M. DE; SILVA, M. DA; SILVA, F. S. Q. DA. Análise de interferon humano recombinante presente em formulações farmacêuticas. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia (Health Surveillance under Debate: Society, Science & Technology) – Visa em Debate**, v. 5, n. 3, p. 66–75, 31 ago. 2017.

ANDRADE, L.O. et al. Crescimento de girassóis ornamental em sistema de produção orgânica e irrigada com água residuária tratada. **Irriga**, v. 1, n. 01, p. 69–82, 23 maio 2012.

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.

APHA, American Public Health Association. **Standard Methods for the examination of water and wastewater**. 23 ed. Washington, 2017. 1496 p.

APPLEBY, A.P.; DAWSON, J.H. Microbial and non-microbial breakdown of herbicides in soil. In: Intensive course on the activity, selectivity, behavior, and fate of herbicides in plants and soils. West Lafayette, USA: Purdue University, Departments of Horticulture, **Agronomy, Botany and Plant Pathology, and Forestry and Natural Resources**, p. 446-462, 1994.

ARAÚJO, B. M.; SANTOS, A. S. P.; DE SOUZA, F. P. Comparativo econômico entre o custo estimado do reúso do efluente de efluente para fins industriais não potáveis e o valor da água potável para a região sudeste do Brasil. **Revista Perspectivas Online: Exatas & Engenharias**, v. 17, n. 07, p. 51-61, 2017.

ARGOLO, A. D. S.; GOMES, G.; BILA, D. M. Insights into total estrogenic activity in a sewage-impacted urban stream assessed via ER transcriptional activation assay: Distribution between particulate and dissolved phases. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, p. 111574, 15 jan. 2021.

ASANO, T. Wastewater reuse for non-potable applications. UNEP (United Nations Environment Programme). 1998. Disponível em: <<http://www.unep.or.jp/ietc/publications/reportseries>>. Acesso em: 20 mar. 2019. 1998.

ASSANTI, I. B. DOS R. **Água de reúso: uma possível solução para a escassez hídrica no Nordeste**. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Gestão e Tecnologias do Saneamento) – Escola Nacional de Saúde Pública – ENSP, Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, RJ, 17 fev. 2020.

ASSIS, C. S. et al. Uso do metanol e risco de exposição dos trabalhadores de uma usina de biodiesel. **Revista Brasileira de Medicina do Trabalho**, v. 15, n. 1, p. 29-41, 2017.

AZEVEDO, M. et al. Efeito da irrigação com água residuária tratada sobre a produção de milho forrageiro. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 2, p. 63- 68, 2007.

AYERS, R. S.; WESTCOT, D. W. **A qualidade da água na agricultura**. Campina Grande. UFPB. 218p. Estudos FAO: Irrigação e Drenagem, 29. rev.1 1991.

BAHIA (Estado). Resolução CONERH nº 75 de 29 de julho de 2010. **Estabelece modalidades, diretrizes e critérios gerais para prática de reúso direto não potável de água**. Lex: coletânea de legislação e jurisprudência, Bahia, 1 ago. 2010.

BAKOPOULOU, S.; EMMANOUIL, C.; KUNGOLOS, A. Assesdment of wastewater effluent quality in Thessaly region, Greece, for determining its irrigation reuse potential. **Ecotoxicolog y and Environmental**, v. 74, p. 188-194, 2011.

BAUMGARTNER, V.; HOLH, C.; SCHWACK, W. R. Rolling - A new application technique for luminescent bacteria on high-performance thin-layer chromatography plates. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, 2692–2699, 2011.

BARBER, L. B. et al. Fish Endocrine Disruption Responses to a Major Wastewater Treatment Facility Upgrade. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 4, p. 2121–2131. 2012.

BARRETO, J. C. N. **Caracterização de toxicidade de efluentes de usina siderúrgica mediante bioensaios com microrganismos**. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, 1995.

BARTOLOMEU, A. M. L. Liofilización: ciencia ou arte? **Saber y Hacer**, v. 1, n. 1, p. 93–102, 2014.

BALBINOT JUNIOR, A. A. Acamamento de plantas na cultura da soja. **Revista Agropecuária Catarinense**, v. 25, n. 1, mar. 2012.

BARONTI C. et al. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. **Environmental Science & Technology**, v. 34, p. 5059-5066, 2000.

BAUMGARTNER, D. et al. Reúso de águas residuárias da piscicultura e da suinocultura na irrigação da cultura da alface. **Engenharia Agrícola**, v. 27, n. 1, p. 152–163, abr. 2007.

BEDA, J. N. **Determinação do coeficiente de decaimento bacteriano em wetland - alagado construído**. 2011. 50f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Sanitária) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN, 22 set. 2011.

BILA, D. M. et al. **II-226 – Atividade estrogênica em matriz ambiental: contribuição dos sólidos suspensos totais**. 2019. Trabalho apresentado ao 13º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Rio Grande do Norte, RN, 2019.

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

BILA, D. M. **Degradação e Remoção da Atividade Estrogênica do Desregulador Endócrino 17 β -estradiol pelo Processo de Ozonização**. 2005. 303 f. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

BISTAN, M. et al. Yeast Estrogen Screen Assay as a Tool for Detecting Estrogenic Activity in Water Bodies. **Food Technology and Biotechnology**, v. 50, n. 4, p. 427–433, 2012.

BISTAN, M.; LOGAR, R. M.; TISLER, T. Detection of estrogenic activity in Slovenian wastewaters by bioassay. **Central European Journal of Biology**, v. 6, n. 5, p. 829-837, 2011.

BOLONG, N. et al. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. **Desalination**, v. 239, p. 229–46. 2009.

BONATO, A. L. V. et al. **Otimização do método de extração de DNA de *Magnaporthe oryzae* de trigo**. Comunicado Técnico online 343. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2014. 5 p.

BONINI, M. A. et al. Alterações nos atributos químico e físicos de um Latossolo Vermelho irrigado com água residuária e vinhaça. **Revista Biociências**, Taubaté, v. 20, p. 56-63, 2014.

BOSCH, A. et al. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. **Curr Opin Biotechnol**, v. 19, p. 295-301, 2008.

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.

BRASIL. Resolução nº 18, de 23 de março de 2018. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações/Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, ed. 58, seção 1, p. 6, 26 março 2018.

BRASIL. Portaria de Consolidação nº 05, de 28 de setembro de 2017. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Ministério da Saúde, Brasília, série E, v. 190, 3 outubro 2017. Seção 1, p. 360. 2017.

BRASIL. Resolução CNRH nº 121, de 16 de dezembro 2010. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de dezembro 2010.

BRASIL. RESOLUÇÃO CONAMA nº 396, de 3 de abril de 2008. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, 7 de abril de 2008, Seção 1, p. 64-68. 2008.

BRASIL. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, n. 053, 18 mar. 2005, p. 58-63. 2005.

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 março 2006.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 274, de 29 de novembro de 2000. Publicada no DOU n, 656, 2001.

BRASIL. Constituição (1988). Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília, DF: Senado Federal: Centro Gráfico, 1988.

CAIRNCROSS S, FEACHEM R. Environmental health engineering in the tropics: an introductory text. 2nd ed. Chichester (UK): Wiley & Sons; 1993.

CALIXTO, B. As regiões que podem sofrer a próxima crise da água no Brasil: Mapa mostra quais partes do Brasil estão mais vulneráveis em relação ao abastecimento. 2016. Disponível em: <<https://epoca.globo.com/colunas-e-blogs/blog-do-planeta/noticia/2015/03/regioes-que-podem-sofrer-bproxima-crise-da-aguab-no-brasil.html>>. Acesso em: 10 dez. 2018. 2016.

CAMPOS, C. H. et al. Convivência com o Semiárido Brasileiro: Autonomia e Protagonismo Social. **Ministério do Desenvolvimento Social e Combate à Fome - MDS / Editora IABS**, Brasília-DF, Brasil - 2013.

CARMO, A. H. D. et al. Os efeitos da chuva ácida na fertilidade do solo e em cultivares agrícolas. **META**, Belo Horizonte, v.1, n.1, p.393 – 399, 2016.

CARPENTIERI-PÍPOLO, V. et al. Comparison between methods of demarcation of probe of RFLP R2430E used in the selection of resistance of peanut to *Meloidogyne arenaria*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 4, p. 783–788, 2008.

CARVALHO, A. et al. **Grau de acamamento e tipo de porte de linhagens de feijão-caupi do grupo prostrado e semi-prostrado, no norte de Minas Gerais**. 2013. Trabalho apresentado ao III CONAC - Congresso Nacional de Feijão-Caupi, Recife, Pernambuco. 22 a 24 de abril de 2013.

CDPH – California Department of Public Health. **Groundwater Recharge Reuse Draft Regulations**. Sacramento, California Health and Human Services Agency, 2008.

CEARÁ (Estado). Resolução do Conselho Estadual do Meio Ambiente (COEMA) nº 2, de 02 de fevereiro de 2017. Lex: coletânea de legislação e jurisprudência, Ceará, fev. 2017.

CEARÁ (Estado). Lei nº 16.033 de 20 de junho de 2016. Lex: coletânea de legislação e jurisprudência, Ceará, jun. 2016.

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Reúso de Água. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/informacoes-basicas/tpos-de-agua/reuso-de-agua/>>. Acesso em: 16 de jan. 2019. 2018.

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Variáveis de qualidade das águas, 2014. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/%C3%81guas-Superficiais/34-Vari%C3%A1veis-de-Qualidade-das-%C3%81guas#condutividade>. Acesso em: 04 out. 2014.

CHEN, C. Y. et al. 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, p.352-365, 2007.

CORDEIRO, D. **Uso de bioindicador de efeito endócrino e validação do método para determinação de hormônios na água da Represa Municipal de São José do Rio Preto**. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

COSTA, M. S. et al. Produção de mudas de timbaúba sob diferentes concentrações de efluente doméstico tratado. **Revista Irriga**, Edição Especial, p. 408-422, 2012.

COWAN, D. et al. Metagenomic gene discovery: past, present and future. **TRENDS in Biotechnology**, v. 23, n. 6, 2005.

CUBA, R. S. et al. Potencial de efluente de esgoto doméstico tratado como fonte de água e nutrientes no cultivo hidropônico de alface. **Revista Ambiente e Água**, v. 10, n. 3, Taubaté, 2015.

CUNHA, I. N. et al. **Aspectos Regulatórios para Reúso de Água no Brasil**. 2012. Trabalho apresentado ao III Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental, 2012.

CRESTE, S.; NETO, A. T.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Report**, v. 19, p. 299-306, 2001.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético**. v. 1, 3 ed., Viçosa: UFV, 480p. 2004.

CAVINATTO, A. DE S.; PAGANINI, W. DA S. Os microrganismos nas atividades de disposição de esgotos no solo—estudo de caso. **Engenharia Santária e Ambiental**, v. 12, n. 1, p. 42–51, 2007.

CORREA, T. P. **Persistência de cepas de Escherichia coli genérica e de Stec não-O157 em solos agricultáveis**. 2015. vii, 60 p. Tese (doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, 2015.

CUTOLO, A. S.; ROCHA, A. A. Uso de parasitas como indicadores sanitários para análise da qualidade das águas de reúso. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL; AIDIS. Américas y la acción por el medio ambiente en el milênio, Rio de Janeiro, ABES, 2000. p. 1-7.

DAGNINO, S. et al. Estrogenic and AhR activities in dissolved phase and suspended solids from wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 2608–2615, 2010.

DE SOUZA, L. M. et al. Estrutura metabólica e genética de comunidades bacterianas em solo de cerrado sob diferentes manejos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 2, p. 269–276, 2012.

DASTON, G. P. et al. Environmental Estrogens and Reproductive Health: a Discussion of the Human and Environmental Data. **Reproductive Toxicology**, v. 11, n. 4, p. 465-481, 1997.

DOMBROSKI, S. A. G. et al. **Eficiência de tratamento de água cinza pelo bioágua familiar**. Trabalho apresentado ao 7º Encontro Internacional das Águas – Gestão de água: água, meio ambiente e saúde, Universidade Católica de Pernambuco, 15 a 17 de maio 2013.

DIAS, A. C. V. et al. Analysis of estrogenic activity in environmental waters in Rio de Janeiro state (Brazil) using the yeast estrogen screen. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 120, p. 41–47, out. 2015.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v. 22, n. 1, p. 107–149, 2003.

DOMINGUES, L.; GUIMARÃES, P. M.R.; OLIVEIRA, C. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lactose/whey fermentation. **Bioengineered Bugs**, v. 1, n. 3, p. 164-171, 2010.

EDMONDS R. L. Survival of coliform bacteria in sewage sludge applied to a forest clearcut and potential movement into groundwater. **Applied and environmental microbiology**, v. 32, n. 4, p. 537–546, 1976. <https://doi.org/10.1128/AEM.32.4.537-546.1976>.

EUFIC - European Food Information Council. Uso da água na produção de alimentos. Disponível em: <<https://www.eufic.org/pt/food-production/article/uso-da-agua-na-producao-de-alimentos>>. Acesso em: 12 abr. 2018. 2015

ELVING, J. Pathogen Inactivation and Regrowth in Organic Waste during Biological Treatment. **Department of Chemistry, Environment and Feed Hygiene, National Veterinary Institute (SVA), SE-751 89, 2009.**

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária. **Manual de métodos de análise de solo.** Rio de Janeiro: EMBRAPA-CNPS, 3, 2017.

EMBRAPA. **Guia prático para interpretação de resultados de análises de solos.** Aracaju, SE: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2015.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Agroindústria Tropical. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plantas condimentares: cultivo e utilização.** Rita de Cassia Alves Pereira, Odécia Gomes dos Santos. – Fortaleza, 2013.

ERTHAL, V. J. T. et al. Alterações físicas e químicas de um Argissolo pela aplicação de água residuária de bovinocultura. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, p. 467-477, 2010.

ESCOBAR, A. C. N. et al. Avaliação da produtividade de três cultivares de salsa em função de diferentes substratos. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 2671-2676, 2010.

ESTRADA, I. B. et al. The survival of *Escherichia coli*, faecal coliforms, and enterobacteriaceae in general in soil treated with sludge from wastewater treatment plants. **Bioresource Technology**, v. 93, p.191-198, 2004.

FAO, Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura. A escassez de água em várias partes do mundo ameaça a segurança alimentar e os meios de subsistência. A Agricultura Continuará a ser a Maior Consumidora de Água. 2018. Disponível em <http://www.fao.org/news/story/pt/item/283456/icode/>. Acesso em: 25 nov. 2020. 2018.

FARIA, M. F. et al. Survival of thermotolerant coliforms in municipal biosolids after application in tropical soil cultivated with Eucalyptus. **Journal of Environmental Management**, v. 274, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111116>.

FARIA, M. F. et al. Avaliação parcial da influência da temperatura e do tempo sobre microrganismos patogênicos presentes no lodo de esgoto compostado. In: Forum Internacional de Resíduos Sólidos-Anais. 2017.

FARIA, M. F. et al. **Avaliação da persistência de agentes patogênicos em solo agrícola cultivado com eucalipto e fertilizado com lodo de esgoto sanitário.** Trabalho apresentado

ao XXXV Congresso Brasileiro de Ciências do Solo, agosto de 2015. p. 5. Disponível em: <https://www.eventossilos.org.br/cbcs2015/arearestrita/arquivos/115.pdf>

FARIA, M. F. **Avaliação da persistência de microrganismos patogênicos em solo cultivado com eucalipto e fertilizado com lodo de esgoto sanitário**. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, São Paulo, SP. Julho de 2015.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3 ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2007, 293p.

FELIZATTO, M. R. ETE CAGIF: Projeto integrado de tratamento avançado e reúso direto de águas residuárias. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 21, 2001, João Pessoa: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental. João Pessoa, 2001.

FENT, K., WESTON, A. A., CARMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, v. 76, p. 122–59. 2006.

FENT K.; ESCHER C.; CAMINADA D. Estrogenic activity of pharmaceuticals and pharmaceutical mixtures in a yeast reporter gene system. **Reproductive Toxicology**, v. 22, p. 175-185, 2006.

FERNANDES, A. N. et al. Remoção dos hormônios 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol de soluções aquosas empregando turfa decomposta como material adsorvente. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1526–1533, set. 2011.

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, p. 19–30, 2005.

FISPQ - Ficha de informações de segurança de produto químico. METANOL 2822-P Rev. 16 25/04/2011. 2011. Disponível em: <http://www.hcrp.fmrp.usp.br/sitehc/fispq/metanol.pdf>. Acesso em: 9 dez. 2019

FONG, T. T. et al. Quantitative Detection of Human Adenoviruses in Wastewater and Combined Sewer Overflows Influencing a Michigan River. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 3, p. 715–723, 2010.

FRIEDLER E. Water reuse an integral part of water resources management: Israel as a case study. **Water Policy**, v. 3, p. 29–39, 2001.

FRISCHE, T. et al. Toxic masking and synergistic modulation of the estrogenic activity of chemical mixtures in yeast estrogen screen (YES). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 16, n. 5, p. 593-603, 2009.

FUNASA. Fundação Nacional da Saúde. **Manual Prático de Análise de Água**. 4ª ed. rev. 2013.

Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS). **Progress on household drinking water, sanitation and hygiene 2000-2017. Special focus on inequalities**. New York: United Nations Children's Fund (UNICEF) and World Health Organization, 2019.

GALAN, J. México, el segundo país que más aguas negras reutiliza para riego. LA JORNADA. Disponível em: <<https://www.jornada.com.mx/2006/02/26/index.php?section=sociedad&article=046n1soc>>. Acesso em: 10 jan. 2018.

GATTA, G. et al. Reuse of treated municipal wastewater for globe artichoke irrigation: Assessment of effects on morpho-quantitative parameters and microbial safety of yield. **Scientia Horticulturae**, v. 213, p. 55–65, 14 dez. 2016.

GATIDOU, G. N. et al. Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 1138, n. 1, p. 32-41, 2007.

GYANESHWAR, P. et al. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil, Dordrecht**, v. 245, p. 83-93, 2002.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. Editora: COLD SPRING HARBOR, edição: 4 ESTADOS UNIDOS DA AMERICA, Páginas: 2028, 2012.

GHUNMI, L. A. et al. Grey water treatment systems: A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 41, n. 7, p. 657–698, 2011.

GHISELLI, G. E JARDIM, F.J. Interferentes endócrinos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 30, n. 3, 2017.

GHISELLI, G. **Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP)**. Tese (Doutorado na área Química Analítica) - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Química, 2006.

GONÇALVES, R. F. **Uso Racional de Água e Energia: Conservação de água e energia em sistemas prediais e públicos de abastecimento de água**. Rio de Janeiro: ABES, p. 354, 2009.

GONÇALVES, R. F. et al. **Uso Racional de Água e Energia**. p. 354, 2009.

GORE, A. C. et al. **Introduction to endocrine disrupting chemicals (EDCs) a guide for public interest organizations and policy-makers**. The Endocrine Society and IPEN, 2014. p. 76.

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

GUIDOLIN, J.C. **Reúso de efluentes**. Brasília: Secretaria de Recursos Hídricos, Ministério do Meio Ambiente, 2006.

GUION C. E. et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by use of melting-curve analysis and real-time multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 1752-1757, 2008.

HAMMOND-KOSACK, K.; JONES, J. D. G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. *Biochemistry & molecular biology of plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists, p.1102-1156. 2000.

HANDAM, N. B. et al. Estrogenic activity in reused water: comparison of concentration methods. **International Journal of Hydrology**, v. 5, n. 3, p. 125–130, junho de 2021a. DOI: 10.15406/ijh.2021.05.00274

HANDAM, N. B. et al. Agricultural reuse: comparison between Brazilian and international quality standards. **International Journal of Hydrology**, v. 5, n. 1, p. 28-31, fevereiro de 2021b. DOI: 10.15406/ijh.2021.05.00262

HANDAM, N. B. et al. Drinking water quality in Brazilian urban slums. **Revista Ambiente e Água**, v. 15, n. 3, 2020. <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.2532>

Handam N. B., et al. **II-242 - Água de reúso: normativas nacionais e do nordeste do Brasil**. 2019. Trabalho apresentado ao 30º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Rio Grande do Norte, RN, p. 5, 2019.

HANDAM, N. B. **Condições Sanitárias da Água Residencial, do Solo Peridomiciliar e dos Rios das Comunidades do Território de Manguinhos, RJ**. 2016. 141 p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública e Meio Ambiente) - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2016.

HARUVY, N. Agricultural reuse of wastewater: nation-wide cost-benefit analysis. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 66, p. 133-119, 1997.

HESPANHOL, I. Reúso potável direto e o desafio dos poluentes emergentes. **Revista USP**, São Paulo, n. 106, p. 79-94, 2015.

HESPANHOL, I. Potencial de Reúso de água no Brasil – agricultura, indústria, municípios e recarga de aquíferos. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 7, p. 75-95, 2002.

HINSINGER, P. et al. P for two, sharing a scarce resource: soil phosphorus acquisition in the rhizosphere of intercropped species. **Plant Physiology**, v. 156, n. 3, p. 1078–86, jul. 2011.

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. 4812–4819, 2009.

HUBER, M. M. et al. Oxidation of pharmaceuticals during ozonation of municipal wastewater effluents: a pilot study. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 11, p. 4290-4299, 2005.

JACCARD, P. Etude comparative de la distribution florale dans une portion des alpes et des jura. **Bulletin de la Societe Voudoise des Sciences Natureller, Payot**, vol. 37, p. 547–579, 1901.

INCT, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em ETEs Sustentáveis. **Microcontaminantes, nutrientes e água de reúso ETEs Sustentáveis**. Disponível em: <http://etes-sustentaveis.org/?page_id=1269>. Acesso em: 16 jan. 2019. 27 set. 2018.

ISHII, S., SADOWSKY, M. J. *Escherichia coli* in the Environment: Implications for Water Quality and Human Health. **Microbes Environmental**, v. 23, n. 2, p.101-108. 2008.

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. 179–184, 2001.

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

JOHNSON, A. C.; BELFROID, A.; DI CORCIA, A. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. **Science of the Total Environment**, v. 256, n 2-3, p. 163-173, 2000.

JORDÂNIA. **National Water Strategy and related policies and action plans, chapters 5 and 10**. Ministry of Water & Irrigation, 2015.

JOHNSTON, C. et al. A real-time qPCR assay for the detection of the *nifH* gene of *Methanobrevibacter smithii*, a potential indicator of sewage pollution. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 6, p. 1946–1956, 2010.

JORDÃO, E. P; PESSÔA, C. A. **Tratamento de Esgotos Domésticos**. 7^a ed. Rio de Janeiro: ABES, 2014.

JOSÉ DE CARVALHO, A. et al. **Grau de Acamamento e Tipo de Porte de linhagens de feijão Caupi do grupo prostado e semi-prostado, no norte de Minas Gerais**. Trabalho apresentado ao III CONAC, Congresso Nacional de Feijão-Caupi, Recife, Pernambuco, 22 a 24 de abril de 2013.

KABIR, E. R.; RAHMAN, M. S.; RAHMAN, I. A review on endocrine disruptors and their possible impact on human health. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, p. 241-258, 2015.

KING, A. M. Q. et al. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, **Elsevier, Academic Press**, San Diego, p. 125-141, 2011.

KONEMAN, E. et al. **Diagnóstico Microbiológico**, 6. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2014.

KRAMER, A.; POST, J. **Guidelines and Standards for Wastewater Reuse water**. E-Learning Course, EUA, 2001.

KUBLER, H.; FORTIN, A.; MOLLETA, L. Reúso de água nas crises hídricas e oportunidades no Brasil. **ABES – Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental**. Outubro de 2015.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment--a review--part I. **Chemosphere**, v. 75, n. 4, p. 417–434, 2009.

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, p. 5–14. 2012.

LAVRADOR FILHO, J. **Contribuição para o entendimento do reúso planejado da água e algumas considerações sobre suas possibilidades no Brasil**. 1987. Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, 1987.

LEE, H. B.; PEART, T. E.; SVOBODA, M. L. Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1094, n. 1, p. 122-129, 2005.

LÉON, S. G.; CAVALLINI, J. M. **Tratamento e uso de águas residuárias**. Campina Grande, UFPB. 151p. 1999.

LEVERENZ, H. L.; TCHOBANOGLOUS, G.; ASANO, T. Direct potable reuse: a future imperative. **Journal of Water Reuse and Desalination**, v. 1, n. 1, p. 2, 2011.

LEWIN, M. Enhancing and maintaining water quality for metropolises. COMMISSION'S REPORT. World Association of the Major Metropolises. Disponível em: <www.metropolis.org>. Acesso em: 02 jan. 2018. 2002.

LIMA, A. A. et al. Diversidade e capacidade simbiótica de rizóbios isolados de nódulos de Mucuna-Cinza e Mucuna-Anã. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, n. 2, 2012.

LIBÂNIO, M. **Fundamentos de qualidade e tratamento de água**. 3 ed. Campinas: Átomo, 2010.

LIU, L. et al. Potential effect and accumulation of veterinary antibiotics in *Phragmites australis* under hydroponic conditions. **Ecological Engineering**, v. 53, p. 138–143, 2013.

LUO, Y. et al. 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, p. 619–641, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.065>.

MACEDO, M. F. S. Técnicas de Irrigação, o Desenvolvimento da Agricultura e do Agronegócio: uma Análise à Luz da Proteção Humana e da Cidadania Frente à Crise Hídrica Nacional. **Campo jurídico**, v. 3, n. 2, p. 39-54–54, 22 out. 2015.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 07 de 12/04/2016. 2016.

MARQUES, L. G. **Liofilização de frutas tropicais**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP, 255p. 2008.

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, p. 6423–6432, 2012.

MMA, Ministério do Meio Ambiente (Brasil). **Desmatamento e mudança climática reduzem chuva e provocam crise**. Disponível em: <<http://redd.mma.gov.br/pt/noticias-principais/328-desmatamento-e-mudanca-climatica-reduzem-chuva-e-provocam-crise>>. Acesso em: 05 fev. 2018. 2016.

MANAFI, M. New developments on chromogenic and fluorogenic culture media. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, p. 205-218, 2000.

MANCUSO, P. C. S.; SANTOS H. F. **Reúso de Água**. Barueri, SP: Manole, 2013.

MARINHO, F.A.M.; OLIVEIRA, O.M. The filter paper method revisited. **Geotechnical Testing Journal**, v. 29, p. 1-9, 2006.

MARTÍNEZ, S. et al. Reuse of tertiary municipal wastewater effluent for irrigation of *Cucumis melo* L. **Irrigation Science**, v. 31, p. 661–672, 2013.

MATOS, A. T.; LEMOS, A. F.; BARROS, F. M. Mobilidade de nitrato em solos de rampas de tratamento de águas residuárias por escoamento superficial. **Engenharia na Agricultura**, Viçosa, v. 12, n. 1, p. 57-65, 2004.

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. 3379–3388, 2009.

MCLELLAN SL, EREN AM. Discovering new indicators of fecal pollution. **Trends Microbiol**, v. 22, n. 12, p. 697-706, 2014

MEHNERT, D. U. Reuso de efluente doméstico na agricultura e a contaminação ambiental por vírus entéricos humanos. **Biológico**, São Paulo, v. 65, n.1/2, p. 19-21, 2003.

MELO, G. K. R. M. M. O reúso de água como instrumento de gestão dos recursos hídricos: Necessidade de regulamentação do reúso para fins agrícolas. *Revista Educação Agrícola Superior*. Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior – ABEAS. v.25, n.2, p.93-98, 2010.

MENA, K. D.; GERBA, C. P. Waterborne adenovirus. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 198, p. 133-1367, 2009. Doi: 10.1007/978-0-387-09647-6_4. PMID: 19253037.

MERCK. Merck Microbiology Manual 12th Edition. 2010. Disponível em: <https://www.analytics-shop.com/media/Hersteller/Kataloge/merck-e/Merck_Microbiology_Manual_12th_edition.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2018.

METCALF; EDDY, INC. **Wastewater engineering: treatment and reuse**. 4th. ed. New York: McGraw-Hill, 2003. 1819 p.

MIÈGE, C. et al. 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, p. 49–56, 2008.

MIERZWA, J. C.; HESPANHOL, I. **Água na indústria: uso racional e reúso**. São Paulo: 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**, v. 40, n. 9, 2017.

MONTE, H. M. DO; ALBUQUERQUE, A. **Reutilização de Águas Residuais**. Série GUIAS TÉCNICOS. Edição Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos Instituto Superior de Engenharia de Lisboa. ERSAR, Lisboa, Portugal, v. 14, 2010.

MONTE MHM. *Water Reuse in Europe*. E-Water Official Publication of the European Water Association (EWA). 2007.

MONTESINOS E. Plant-associated microorganisms: a view from the scope of microbiology. **International Microbiology**, v. 6, p. 221–223, 2003.

MONTGOMER, J. M. **Water treatment principles & design**. Nova York: John Wiley & Sons, 1985.

MORAES, M. H.; BENEZ, S. H.; LIBARDI, P. L. Efeitos da compactação em algumas propriedades físicas do solo e seu reflexo no desenvolvimento das raízes de plantas de soja. **Bragantia**, Campinas, v. 54, n. 2, p.393-403, 1995.

MORAIS, M. A. et al. Contaminação microbiológica no perfil do solo por águas residuárias. **Holos**, v. 3, p. 76, 23 jun. 2016.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2006.

MOURA, P. G. et al. Água de reúso: uma alternativa sustentável para o Brasil. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 25, n. 6, p. 791–808, dez. 2020.

MOURA, P. G. **Metagenômica de água de reúso, Esgoto e Água potável. 2019. 173p**. Tese (Doutorado em Saúde Pública e Meio Ambiente). Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz, Rio de Janeiro. 2019.

MOURA, P.G. **Avaliação de poluição biológica no Complexo de Mangueiros usando marcadores moleculares e filogenia molecular**. Dissertação (Biologia Computacional e Sistemas). Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz- Fiocruz, Rio de Janeiro. 2016.

MUBIRU, D. N.; COYNE, M. S.; GROVE, J. H. Mortality of *Escherichia coli* O157:H7 in two soils with different physical and chemical properties. **Journal Environmental Quality**, n. 29, p. 1821–1825, 2000.

MUJERIEGO, R.; GULLÓN, M.; LOBATO, S. Incidental potable water reuse in a Catalonian basin: living downstream. **Journal of Water Reuse and Desalination**, v. 7, n. 3, p. 253–263, 2017.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 73, p.127, 1998.

NEVES-SILVA, P.; HELLER, L. O direito humano à água e ao esgotamento sanitário como instrumento para promoção da saúde de populações vulneráveis. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 21, n. 6, p. 1861–1870, 2016.

NGHIEM, L. D. et al. Estrogenic hormone removal from wastewater using NF/RO membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 242, n. 1-2, p. 37-45, 2004.

NASU, M. et al. Study on endocrine disrupting chemicals in wastewater treatment plants. **Water Science Technology**, v. 43, p. 101-108, 2000.

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THE NATIONAL ACADEMIES. **Water Reuse: potential for expanding the nation's water supply through reuse of municipal wastewater**. Washington D.C.; The National Academy Press, 2012.

NGOLE, V.; MPUCHANE, S.; TOTOLO, O. Survival of faecal coliforms in four different types of sludge-amended soils in Botswana. **European Journal of Soil Biology**, v. 42, p. 208- 218, abr. 2006.

OENNING JÚNIOR, A.; PAWLOSKEY, U. Avaliação de tecnologias avançadas para o reúso de água em indústria metal-mecânica. **Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 3, p. 305 – 316, 2007.

OLIVEIRA, J. A. **Impactos socioambientais provocados pelo rompimento de barragens de contenção de rejeitos de mineração no estado de Minas Gerais**. Monografia - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto Três Rios, Departamento de ciências do meio ambiente - DCMA. p. 61, 2019.

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, p. 4141–4166, 2011.

ONU - Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura, encarando os desafios estudos de caso e indicadores. Contribuição da UNESCO à edição de 2015 do Relatório Mundial sobre o Desenvolvimento dos Recursos Hídricos 7, Place de Fontenoy, France. 2016.

ONU - Organização das Nações Unidas. United Nations World Water Assessment Programme (WWAP). World Water Development Report 2015: Water for a Sustainable World. Paris: UNESCO; 2015b. Disponível em: <http://www.unesco.org/new/en/naturalsciences/environment/water/wwap/wwdr/2015-water-for-a-sustainable-world/>. Acesso em: 05 de abril, 2020. 2015.

OTENIO, M. H. **Reaproveitamento de água residuária em sistemas de produção de leite**. Capítulo 7. In: Sustentabilidade ambiental, social e econômica da cadeia produtiva do leite: Desafios e perspectiva. 2015.

PALMA, A. **Como as AFES podem ser articuladas a uma abordagem multidimensional alinhada com a Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável?** Relatório Nacional de Desenvolvimento Humano do Brasil. PNUD. 2017.

PARASIDIS, T. A.; KONSTANTINIDIS, T. G.; ALEXANDROPOULOU, I. Environmental Monitoring of enteric viruses in waste water. **Virology and Mycology**, v. 2, n. 1, 2013.

PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. In.: FERNANDES, J. M.; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C. (Ed.). Revisão anual de patologia de plantas. Passo Fundo: Revisão anual de patologia de plantas, v. 2, cap. 1, p. 1-51. 1994.

PESSOA, G. P. et al. Desenvolvimento de metodologia para avaliar remoção de estrogênios em estações de tratamento de esgotos. **Química Nova**, v. 35, p. 968–73, 2012.

PEREIRA, R. O. et al. Removal of estrogens through water disinfection processes and formation of by-products. **Chemosphere**, v. 82, n. 6, p. 789-799, 2011.

PEREIRA, M. S. et al. Decaimento de Bactérias do Grupo Coliformes em Solos com Cobertura Vegetal e Nu. **Revista Engenharia na Agricultura - REVENG**, v. 22, n. 6, p. 575–582, 31 dez. 2014.

PEREIRA, R. O. **Formação de subprodutos do estrona e 17 β -estradiol na oxidação utilizando cloro e o ozônio em água**. 2011. 192p. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2011.

PEREIRA, M. G. et al. Reúso de águas residuárias no cultivo de arroz (*Oryza sativa*). 22º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, Joinville - Santa Catarina, 2003.

PES, L. Z.; ARENHARDT, M. H. **Fisiologia Vegetal**. Santa Maria – RS: Universidade Federal de Santa Maria, Colégio Politécnico, Rede e-Tec Brasil, 2015.

PINA, S. et al. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 9, p. 3376–3382, 1998.

POBLETE, C. P. C. **Estudio del Comportamiento de una Mezcla de Aserrín y Grasa Láctea de Desecho**. Valdivia: Universidad Austral de Chile, 2010.

PONTES JÚNIOR, M. D. **Sucessão bacteriana durante o desenvolvimento de frutos de café (*Coffea arabica*)**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2010.

PUIATTI, G. et al. Comparação dos métodos de agrupamento de Tocher e UPGMA no estudo de divergência genética em acessos de alho. **Revista da Estatística da Universidade Federal de Ouro Preto**, v. 3, n. 3, p. 275-279, 2014.

PEREIRA, M. S. et al. Decaimento de Bactérias do Grupo Coliformes em Solos com Cobertura Vegetal e Nu. **Revista Engenharia na Agricultura - REVENG**, v. 22, n. 6, p. 575–582, 31 dez. 2014.

PRADO, T.; SATO M. I. Z. **Impactos das mudanças ambientais globais e desastres sobre a epidemiologia das doenças de veiculação hídrica no Brasil**. Reduction of vulnerability to disasters: from knowledge to action. Chapter 15. Victor Marchezini, Ben Wisner, Luciana R. Londe e Silvia M. Saito (organizadores). Edição 1, 620 páginas. 2017.

PROLAGOS. Estação de tratamento de Água de Reúso (ETAR). Disponível em: <<http://www.prolagos.com.br/estacao-de-tratamento-de-agua-de-reuso-etar/>>. Acesso em: 18 março 2019. 2019.

PRUDEN, A. et al. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in Northern Colorado. **Environment Science Technology**, v. 40, p. 7445–50. 2006.

QUINTAES, B. R. et al. Uso de Ferramentas Moleculares para Estudos de Comunidades Microbianas em Lixiviado de Aterro de Resíduos Sólidos Urbanos. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**, n. 31, março de 2014.

REGO, J. C. V. **Qualidade sanitária de água e areia de praias da Baía de Guanabara**. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública e Meio Ambiente) - Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

RIO DE JANEIRO (Estado). Lei nº 7666 de 28 de agosto de 2017. Estabelece valores de referência de saúde ambiental para a qualidade das areias utilizadas em parques, praças, tanques, clubes, creches e escolas para fins de lazer, recreação e atividades educativas, esportivas e culturais, em áreas públicas e privadas do estado do Rio de Janeiro. 2017.

RODRIGUES, I. C. B. **Métodos Moleculares Aplicados a Biotecnologias Relacionadas ao Ciclo do Enxofre**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto. (2012)

RODRIGUES JUNIOR, C. F. **Estudo das bases moleculares envolvidas no efeito lipolítico do hormônio tireoidiano no tecido adiposo branco**. Dissertação - Universidade de São Paulo, 2011.

RODRIGUES, R. S. **As dimensões legais e institucionais do reúso de água no Brasil: proposta de regulamentação do reúso no Brasil**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 6 jun. 2005.

ROLIM, H. O. et al. Qualidade dos Efluentes de Sistemas de Tratamento Biológico UASB e UCT para Reúso Agrícola. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 9, n. 2, 2016.

ROSA, M. E. C. et al. Formas de carbono em latossolo vermelho eutrófico sob plantio direto no sistema biogeográfico do cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, n. 4, p. 911-923, 2003.

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. 1341–1355, 2011.

ROTHENBERGER, R. R. **Lighting Indoor Houseplants**. Disponível em: <https://extension2.missouri.edu/g6515>. 2021.

ROUTLEDGE, E. J. et al. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 2. In Vivo Responses in Trout and Roach. **Environmental Science & Technology**, v. 32, p. 1559-1565, 1998.

ROUTLEDGE, E. J.; SUMPTER, J. P. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 241-248, 1996.

ROZEN, Y.; BELKIN, S. Survival of enteric bacteria in seawater. **Federation of European Microbiological Societies - FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, p. 513-529, 2001.

SÁ, F. V. S. et al. Balanço de Sais e Crescimento Inicial de Mudanças de Pinheira (*Annona squamosa* L.) sob Substratos Irrigados com Água Salina. **Revista Irriga**, v. 20, n. 3, p. 544-556, 2015.

SABESP – Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo. Água de reúso para indústrias. [Internet]. Disponível em: <<http://site.sabesp.com.br/site/interna/Default.aspx?secaoId=569>>. Acesso em: 18 março 2019.

SCHERER, K. et al. Avaliação bacteriológica e físico-química de águas de irrigação, solo e alface (*Lactuca sativa* L.). **Revista Ambiente e Água**, Taubaté, v. 11, n. 3, p. 665-675, 2016.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. (eds.). 4. ed. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 1-3, 372 p. 2012.

SANTAMARÍA, J., TORANZOS, G. A. Enteric pathogens and soil: a short review. **International Microbiology**, v. 6, p. 5-9, 2003.

SANTAMARTA, J. A ameaça dos disruptores endócrinos. **Revista Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**. Porto Alegre: v, 2, n.3, 2001.

SANTOS, L. H. M. L. M. et al. Remoção de fármacos e DE em ETE aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, p. 45-95, 2013.

SANSEVERINO, J. et al. Screening of potentially hormonally active chemicals using bioluminescent yeast bioreporters. **Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology**, 1, v. 107, p. 122–34, 2009.

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

SIDHU, J. P. S. et al. Sewage pollution in urban stormwater runoff as evident from the widespread presence of multiple microbial and chemical source tracking markers. **Science of the Total Environment**, v. 463–464, p. 488-496, 2013.

SIQUEIRA, M. S. et al. Hospitalizations due to diseases associated with poor sanitation in the public health care network of the metropolitan region of Porto Alegre, Rio Grande do Sul State, Brazil, 2010-2014. **Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 26, n. 4, p. 795-806, out-dez 2017.

SVENSON, B.; ANN-SOFIE, A.; MATS, E. K. Removal of Estrogenicity in Swedish Municipal Sewage Treatment Plants. **Water Research**, v. 37, 4433, 2003.

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

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, p. 507-512, 1974.

SEGNER, H. et al. Potencies of estrogenic compounds in in vitro 836M. Bistan et al. screening assays and in life cycle tests with zebrafish in vivo. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, p. 315-322, 2003.

SHAER-BARBOSA, M.; SANTOS, M. E. P.; MEDEIROS, Y. D. P. Viabilidade do reúso de água como elemento mitigador dos efeitos da seca no semiárido da Bahia. **Ambiente e Sociedade**, v. 17, n. 2, p. 17-32, 2014.

SILVA, T. L. Qualidade da água residuária para reúso na agricultura irrigada. **Irriga**, Botucatu, v. 1, n. 1, p. 101-111, Edição Especial 30 anos PG Irriga, 2018.

SILVIA, K. C.; SANTOS, R. A.; SANTOS, A. S. P. Estudo sobre a atual situação do reúso de águas servidas tratadas no brasil e no mundo. XVII SILUBESA. ABES – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL. 2016.

SILVA, G. G. M. **Avaliação da qualidade de águas superficiais e de sedimentos quanto à toxicidade e atividade estrogênica**. Dissertação (Mestrado em engenharia Ambiental) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), 2015.

SILVA, Í. N. et al. Qualidade de água na irrigação. **ACSA - Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 7, p. 01-15, 2011.

SILVA, H. D. et al. Molecular detection of adenoviruses in lakes and rivers of Goiânia, Goiás, Brazil. **Food and Environmental Virology**, v. 2, n. 1, p. 35- 40, 2010.

SINIGALLIANO, C. D. et al. Traditional and molecular analyses for fecal indicator bacteria in non-point source subtropical recreational marine waters. **Water Research**, v. 44, n. 13, p. 3763–3772, 2010.

SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. **Nitrogênio**. In: Fernandes MS (Ed.) *Nutrição mineral de plantas*. Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. p. 215-252. 2006.

SOTERO-MARTINS, A. et al. Quality of raw water in the Guandu Basin of the Rio de Janeiro state during water crisis of 2020. **Ambiente e Água**, v. 16, n. 4, e2703, 2021.

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 (AJER)**, v. 6, n. 2, p. 56-62, 2017.

SOTERO-MARTINS, A. **Relatório Técnico da Pesquisa de Pós-Doutorado Pleno no Exterior (PDE): Otimização do Sistema de Detecção de Atividade Estrogênica por Teste YES (Yeast Estrogen Screen) para Amostras Ambientais**. Processo 200628/2015-1, Programa Ciência Sem Fronteiras – CNPq, 2016.

SOTERO-MARTINS, A. et al. Otimização e Detecção de Atividade Estrogênica nas Águas do Rio Douro? Porto/Portugal utilizando Yeast Estrogen Screen (YES). In: 68ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC), Porto Seguro. 2016.

SOTERO-MARTINS, A. et al. Controle da Qualidade Microbiológica e Parasitária em Áreas de Recreação. **Revista Eletrônica Gestão & Saúde**, v. 4, n. 3, p.1075-92, 2014.

SOTO, A. M.; SONNENSCHNEIN, C. Environmental causes of cancer: endocrine disruptors as carcinogens. *Nature Reviews*. **Endocrinology**, v. 6, n. 7, p. 363–370. 2010.

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

STOLTE, S. et al. Ionic liquids as lubricants or lubrication additives: An ecotoxicity and biodegradability assessment. **Chemosphere**, v. 89, p. 1135–1141, 2012.

SOUSA, J. T. et al. Efluentes tratados utilizados na agricultura. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS HÍDRICOS. 15. Anais Simpósio brasileiro de recursos hídricos. Curitiba-PR, Brasil, p.1- 12, 2003.

SUASSUNA, J. A Pequena Irrigação no Nordeste: Algumas Preocupações. **Revista Ciência Hoje**, v. 18, 1994.

SUMPTER, J. P. Endocrine disrupters in the aquatic environment: An overview. **Acta hydrochimica et hydrobiologica**, v. 33, p. 9-16, 2005.

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, p.107-124, 2008.

TERRONI, H. C. et al. **Liofilização**. Revista Científica Unilago. 2013.

THEIVEYANATHANA, S. et al. An irrigation-scheduling model for application of saline water to tree plantations. **Forest Ecology and Management**, Ringwood, v. 193, p. 97-112, 2004.

THOMAZ-SOCCOL, V. et al. **Organismos patogênicos presentes em lodo de esgoto a ser aplicado no solo e a Resolução nº 375 do CONAMA**. In: COSCIONE, A. R.; NOGUEIRA, T. A. R.; PIRES, A. M. M. **Uso agrícola do lodo de esgoto: avaliação após a Resolução nº 375 do CONAMA**. Botucatu: FEPAF, 2010. p. 83-111.

TOMAZ, P. Economia de água. Nas empresas e residências. Um estudo atualizado sobre medidas convencionais e não-convencionais do uso racional da água. EDITORA NAVEGAR. 17 de abril de 2001.

SCHÄFER, A. I. Natural organics removal using membranes. Phd thesis, 410pp. UNESCO Center for Membrane Science and Technology, University of New South Wales, Sydney, NSW, Australia, 1999 apud SCHNEIDER, R. P.; TSUTYA, M. **Membranas Filtrantes para o Tratamento de Água, Esgoto e Água de Reuso**. São Paulo: ABES, 2001

SCHNEIDER, R. P.; TSUTIYA, M. T. **Membranas filtrantes para o tratamento de água, esgoto e água de reúso**. Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, São Paulo, Brasil, 234p. 2001.

TUNDISI, J. G.; DANTAS, T. **Falta de água já afeta 46 milhões de brasileiros: Estiagem aguda ameaça fornecimento de água e luz no Sudeste e Nordeste e afeta economia**. 2015. Disponível em: <<https://oglobo.globo.com/brasil/falta-de-agua-ja-afeta-46-milhoes-de-brasileiros-15144980#ixzz5Si0NZNDwstest>>. Acesso em: 20 Ago. 2018. 2015.

UNC, A.; GOSS, M. Transport of bacteria from manure and protection of water resources. **Applied Soil Ecology**, v. 25, p. 1-18, 2004.

SOUZA, L. M. et al. Estrutura metabólica e genética de comunidades bacterianas em solo de cerrado sob diferentes manejos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 2, p. 269–276, 2012.

UNGA - UNITED NATIONS GENERAL ASSEMBLY. **Human Right to Water and Sanitation**. Geneva: UNGA; 2010. UN Document A/RES/64/292.

URKIAGA, A. et al. Development of analysis tools for social, economic and ecological effects of water reuse. **Desalination**, v. 218, p. 81-91, 2008.

EPA – U. S. Environmental Protection Agency. **Guidelines for Water Reuse**. Washington U.S. Agency for International Development Washington, D.C., 2012.

EPA - United States Environmental Protection Agency. **Guidelines for water reuse**. U.S. Washington, DC, september, 2004. EPA/625/R-04/108. 2004.

EPA – United States Environmental Protection Agency. **Research Planfor Endocrine Disruptors**. Washington, 1998.

VALLERO, M. Especializada em tratamento de água e efluentes. **Reúso de água: alternativa para preservar e economizar**. Revista TAE. 2015. Disponível: <<http://www.revistatae.com.br/9252-noticias>>. Acesso em: 25 Jun. 2018. 2015.

VAN, D. B.; VANDECASTEELE, C. Removal of pollutants from surface water and groundwater by nanofiltration: overview of possible applications in the drinking water industry. **Environmental Pollution**, v. 122, n. 3, p. 435–445, 2003.

VERBINNEN, R. T.; NUNES, G. S.; VIEIRA, E. M. Determinação de hormônios estrógenos em água potável usando CLAE-DAD. **Química Nova**, v. 33, p. 1837–42, 2010.

VIRKUTYTE, J.; VARMA, R.S.; JEGATHEESAN, V. **Treatment of Micropollutants in Water and Wastewater**. IWA – The International Water Association. 2010.

VOMERO, M. F. et al. A era da falta d'água. **Super interessante**. São Paulo, n. 7, p. 48- 54, 2000.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos: princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. 3ª ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – DESA - UFMG; 2005.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Un. Federal de Minas Gerais, 243p, 1996.

VAN, D. H. W. et al. Urban wastewater: a valuable resource for agriculture. A case study from Horoonabad, Pakistan. **Colombo, Sri Lanka: International Water Management Institute**, p. 29, 2002.

XAVIER, C. R. **Associação da isoflavona genisteína com beta-ciclodextrina: avaliação da penetração cutânea**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. 2006.

WALSH, K. A. et al. Molecular characterization of bacteria in a wetland used to remove ammoniacal-N from landfill leachate. **Waste Management and Research**, v. 20, p. 529, 2002.

WARD, B. K.; IRVING, L. Virus survival on vegetables spray-irrigated with wastewater. **Water Research**, v. 21, p. 57-63, 1987.

WARNECKE, F.; HESS, M. A. Perspective: Metatranscriptomics as a tool for the discovery of novel biocatalysts. **Journal of Biotechnology**, v. 142, p. 91–95, 2009.

WESTERHOFF, P. et al. Fate of endocrine-disruptor, pharmaceutical, and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment processes. **Environmental Science and Technology**, v. 39, p. 6649-6663, 2005.

WILLIAMS, R. J.; JURGENS; M. D.; JOHNSON, A. C. Initial predictions of the concentrations and distribution of 17 β -oestradiol, oestrone and ethinyl oestradiol in 3 English rivers. **Water Research**, v. 33, n. 7, p. 1663-1671, 1999.

WHO, World Health Organization. **UN reveals major gaps in water and sanitation – especially in rural areas.** 19 de novembro de 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/water-sanitation/en/>>. Acesso em: 20 nov. 2014.

WHO, World Health Organization. **Water Security & the Global Water.** Agenda AUN-Water Analytical Brief. Canada, 2013. (Report of a WHO meeting of experts). Disponível em: <<http://whqlibdoc.who.int/publications/9241545747.pdf>>. Acesso em: 19 jun. 2020.

WHO, World Health Organization. **Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater.** Vol. 2. Geneva, Suíça. 2006.

WHO - World Health Organization. **Health guidelines for the use of wastewater in agriculture and aquaculture.** Technical Report Series. 778. Geneva: World Health and Organization, 74p. 1989.

WHO - World Health Organization. **Reuse of effluents: methods of wastewater treatment and health safeguards.** Technical report series n° 517. Geneva, 1973.

WOLD, W. S.; ISON, M. G. **Adenoviruses.** In: Knipe DM, Howley PM, editors. Fields virology. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 1732-67, 2013.

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. 1388–1394. 2010

YARAHMADI, H. et al. Seasonal variations of steroid hormones released by wastewater treatment plants to river water and sediments: Distribution between particulate and dissolved phases. **Science of the Total Environment**, v. 635, p. 144-155, 2018.

YOUN-JOO, A. et al. Estimating the Microbial risk of E. Coli Reclaimed Wastewater Irrigation on Paddy Field. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 129. p. 53-60, 2007.

ZALESKI, K. L. et al. Potential regrowth and recolonization of Salmonella and indicators in biosolids and biosolid amended soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 3701-3708, 2005.

ZÁRATE, N. A. H. et al. Produção e renda bruta de cebolinha e de salsa em cultivo solteiro e consorciado. **Revista Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 3, p. 574-577, 2003.

APÊNDICE A

Métodos para Análises Físico-químicas do solo

Os métodos para as análises físico-químicas foram adaptados baseadas nas metodologias apresentadas por EMBRAPA (2017).

1. Condutividade elétrica e % de saturação

Saturação por alumínio indica a proporção de alumínio solúvel em relação aos teores de bases trocáveis e alumínio na CTC do solo. Saturação por sódio indica a proporção de sódio solúvel em relação a CTC total do solo.

1.1 Procedimento para condutividade elétrica

1. Pesar 180g de solo.
2. Adicionar 60mL.
3. Misture até observar que a massa do solo desliza suavemente pela espátula.
4. Se observar que ainda cabe água sem encharcar, coloque água aos poucos até observar a saturação. Salienta-se a importância de registrar o volume adicionado.
5. Deixar em repouso por 4 horas a noite inteira.
6. Calcular a % de saturação

$$(\%) \text{ de água na pasta saturada} = \frac{100 \times V(mL)}{P(g)}$$

7. Filtre em kitsato com papel de filtro de 0,8 µM.
8. Medir a temperatura e ajustar o equipamento no condutivímetro, de modo que fosse possível coletar os dados e fazer uma média das amostras.

2. Nitrogênio Amôniacal (N-amônia)

Método Nessler adaptado para solo.

2.1. Reagentes

1. Cloreto de amônio (NH_4Cl) 0,3819g/1L.
2. Solução padrão de amônia – 0,5mg/L. É necessário ressaltar que o preparo deve ser feito no dia de uso (5mL em 100mL de água).

3. Solução A de nessler contendo 36g de iodeto de potássio (KI) em 20mL de água; 13,55g de cloreto de mercúrio $HgCl_2$ em 100mL. Junte as soluções A e B e complete o volume até 1L.
4. Solução B de nessler: Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 30% (30g em 100mL).
5. Preparar o reagente Nessler no dia de uso: 10mL de solução A e 3mL de solução B.
6. Reação para o desenvolvimento de cor: Em um tubo de ensaio de vidro: 10mL do padrão NH_4 . Em um tubo de ensaio de vidro: 10mL água (Branco), 10mL amostra do extrato de solo. Acrescentar 1mL do reagente e esperar 10 minutos.
7. Ler no espectrofotômetro em cubeta de 1cm de caminho óptico 425nm.

8. Calcule

$$NNH_3 = \frac{AXB}{C}$$

A= N-NH₃ padrão (mg/L).

B= Absorbância de amostra.

C= Absorbância do padrão

3. Matéria orgânica

A amostra é submetida ao processo de combustão com aquecimento programado e perda de massa pela incineração em mufla. O teor de matéria orgânica é quantificado pela diferença entre a massa do solo seco em estufa e a massa do resíduo obtido após a incineração em mufla.

3.1 Procedimento

1. Pesar 5,00 g de solo (TFSA)(13), macerado e peneirado a 80 mesh.
2. Dispor em cadinho de porcelana.
3. Deixar para estufa a 65 °C por 24 horas.
4. Retirar da estufa e deixar em dessecador até esfriar.
5. Pesar e anotar a massa do solo seco no cadinho de porcelana.
6. Retornar o solo seco no cadinho de porcelana para a mufla, regular a temperatura a 600 °C e deixar por 6 horas.
7. Retirar o cadinho de porcelana e deixar em dessecador até esfriar.
8. Pesar o resíduo (solo incinerado) no cadinho de porcelana frio.
9. Calcular através da fórmula.

$$MOS = \frac{(MS - MR)}{MS} \cdot 1000$$

Em que:

MOS – concentração de matéria orgânica do solo, em g kg⁻¹ .

MS – massa do solo seco em estufa a 65 °C, em g.

MR – massa do resíduo após mufla a 600 °C, em g.

Em seguida foi possível calcular seu desvio padrão, bem como a variância.

$$DP = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (xi - Ma)^2}}{n}$$

Em que:

Xi = Massa do solo

Ma = Média dos resultados

N= Quantidade de amostras

$$Variância = \frac{\sum_{i=1}^n (xi - Ma)^2}{n}$$

Em que:

Xi = Massa do solo

Ma = Média dos resultados

N= Quantidade de amostras

4. Cálcio + Magnésio Trocáveis

4.1. Reagentes e soluções

1. Solução tampão pH 10.
2. Coquetel tampão (Solução tampão, trietanolamina e cianeto de potássio): Foram utilizados 100mL deste coquetel.
3. Solução de EDTA 0,909 mol L⁻¹.
4. Indicador negro de eriocromo – dissolver 100 mg do indicador em 25mL de álcool metílico contendo 16 g de bórax por litro. Essa solução deve ser usada recém preparada devido à facilidade de se deteriorar com o tempo.
5. Murexida – pesar 0,25 g do indicador, colocar em gral de porcelana e misturar com 50g de cloreto de sódio seco em pó, triturando bem no grau. Guardar em vidro âmbar.
6. Solução de KOH a 10% – pesar 10 do sal, colocar em balão volumétrico de 100mL contendo água destilada ou deionizada, dissolver completamente e completar o volume. Homogeneizar.
7. Cálculo.

$$[Ca^{+2} + Mg^{+2}] = V.F$$

8. Como não há cianeto no laboratório será realizada uma comparação entre a metodologia Embrapa sem o cianeto e o protocolo do Augusto sobre dureza total a fim de verificar qual método é mais efetivo.

5. Cálcio Trocável

5.1. Reagentes e soluções

1. Ácido ascórbico
2. Solução de EDTA 0,0125 mol L⁻¹ – pesar 4,653 g de EDTA p.a. previamente seco em estufa e dissolver em água destilada ou deionizada contida em balão volumétrico de 1 L, completando o volume. Padronizar a solução conforme item 3.1.3.2.3.1.
3. Solução de KOH 10% – pesar 100 g de KOH. Passar para balão volumétrico de 1 L, adicionar água destilada ou deionizada, homogeneizar e completar o volume com água.
4. Indicador ácido calconcarbônico + sulfato de sódio – pesar 99,0 g de sulfato de sódio anidro p.a. e colocar em gral de porcelana. Adicionar 1 g de ácido calconcarbônico (C₂₁H₁₄N₂O₇S). Triturar bem a mistura até obter um pó fino e homogêneo. Guardar em frasco escuro.

5.2. Procedimento

1. Em uma das alíquotas de 25,00 mL obtida na extração com KCl 1 mol L⁻¹ (item 3.1.2.3), adicionar 3 mL de KOH a 10% e uma “pitada” de ácido ascórbico (aproximadamente 30 mg) e uma “pitada” do indicador ácido calconcarbônico + sulfato de sódio.
2. Titular com solução padronizada de EDTA 0,0125 mol L⁻¹ até virada da cor vermelho intenso para azul intenso.
3. Anotar o volume de EDTA gasto.

6. Acidez Trocável do solo

Extração da acidez potencial do solo com acetato de cálcio tamponado a pH 7,0 e determinação volumétrica com solução de NaOH em presença de fenolftaleína como indicador.

1. Colocar 10g de solo em erlenmeyer de 125mL e adicionar 50mL de KCl. A amostra deve ser pesada e colocada em um tubo falcon e agitado no vórtex a fim de deixá-lo um dia para o outro decantando na geladeira ou no tubo falcon em temperatura ambiente.

Preparo de KCl:

Regra de 3:

74,5 – 1000

X - 100 ∴ x = 7,45

2. Agitar manualmente algumas vezes e deixar em repouso durante 30 minutos.
3. Filtrar em papel de filtro tipo Whatman nº 42 de 5,5cm de diâmetro. Usar três membranas no kitasato no copo de microbiologia.
4. Adicionar ao filtrado 12 gotas de fenolftaleína com ponteira de 1000 a 0,1% e titular com NaOH 1N com pipeta de 25mL e pêra de sucção.

Cálculo:

$$\text{Acidez trocável} \left(\frac{\text{cmol}}{\text{Kg}} \right) = \frac{V \times N \times 100}{p}$$

Digite a equação aqui.

Em que:

V = Volume de NaOH gasto na titulação

N = Normalidade do NaOH

P = Peso da amostra em gramas

Obs: Não foi preciso adicionar mais 20mL de KCl após filtrar, pois não alterou a coloração rosa verificada após a titulação com NaOH (1N).

7. Fósforo Disponível

Fração do teor total de fósforo no solo, correspondente ao teor utilizado pelas plantas. Formação de complexo fósforomolibdico de cor azul obtido após redução do molibdato com ácido ascórbico e determinação por espectrofotometria. Baseia-se no princípio da dissolução de minerais contendo P e/ou deslocamento de P retido nas superfícies sólidas do solo para a solução, por ânions capazes de competir com o P pelos sítios de retenção.

7.1. Procedimento

1. 5g de solo em Erlenmeyer + 50mL de solução extratora.
2. Agitar 5 minutos em agitador
3. Deixar decantar “overnight”
4. Pipetar, sem filtrar o ressuspensão; 25mL de extrato
5. 5mL pipetados do extrato + 10 mL de solução ácida molibdato de amônio.
6. Deixar formar cor até 1 hora e ler em 660nm.
7. Caso seja necessário diluir por apresentar grande quantidade de fósforo:

$$5+15 = \frac{5}{15} = \frac{1}{3} (3x)$$

Cálculo P(mg/Kg)

$$P = L \times F \times 10$$

Em que:

L = densidade óptica em 610nm.

F= Coeficiente angular da curva padrão

7.2. Reagentes

1. Solução extratora: HCl 0,05M + H_2SO_4 0,25M.
2. Solução de molibdato de amônio (concentrada): 0,022g de subcarbonato de bismuto sendo necessário secar na estufa, dissolver em 0,3mL de ácido sulfúrico e completar o balão de 100mL.
3. Solução ácida de molibdato de amônio (diluída: 25mg/L): 50mL de solução concentrada. Adicionar até 100mL e homogeneizar. Guardar em frasco escuro.
4. Fazer os padrões a partir de 25mg/L.
 - a) 1mL em 25mL de solução extratora.
 - b) 2mL em 25mL de solução extratora.
 - c) 3mL em 25mL de solução extratora.
 - d) 4mL em 25mL de solução extratora.
5. Solução reagente (Solução de molibdato de amônio ácido): 30mL da solução concentrada em balão de 100mL de água e guardar em frasco escuro.

7.3 Leitura (610nm):

1. Utiliza-se o espectrofotômetro e a água destilada como branco para zerar.
2. Em seguida as amostras foram lidas.
3. Fazer a diluição 10x das amostras (3mL de amostra e 3mL de água).
- 4 – Novamente foi realizada uma leitura obtendo os valores esperados.

7.4. Determinação do Fator

1. Foi realizada a leitura, bem como foi feito nas etapas anteriores. É necessário salientar que foi colocado 5mL de cada padrão diluído no becker e em cada recipiente foi introduzido 10mL de solução ácida de molibdato de amônio diluída e uma pitada de ácido ascórbico. Agite e deixe por 1 hora.

Cálculo:

$$P = \frac{(L - B)}{a} \times D \times 10$$

Em que:

P – Concentração do fósforo disponível no solo em mg/Kg.

L – Leitura da amostra, em absorbância.

A – Coeficiente angular da reta dos padrões.

B - Coeficiente linear da reta dos padrões.

D - Fator de diluição do extrato.

Valor 10 – Diluição do solo extrator.

É necessário salientar que as concentrações foram localizadas no eixo x e as leituras no eixo y.

8. Determinação do pH

A análise foi feita por meio do equipamento Medidor de pH (Potenciométrico), que através de um eletrodo de vidro imerso na amostra fornece numericamente o fator de pH da solução em análise. Na 27 encontra-se o equipamento utilizado no estudo.

Figura 27 - Medidor de pH.



Fonte: própria autora.

APÊNDICE B

Protocolo de Extração de DNA com o Kit PowerWater Sterivex modificado para as Amostras (Rega de Solo)

Preparo das Amostras

1. Pegar o volume de água de rega que vasar do pote com solo (regado com 100 mL);
2. Medir o volume e filtrar em 4 membranas de papel filtro 80g. Usar bomba e Kitasato da Millipore. Recuperar dentro de um frasco adaptado e passar com pipeta para microtubos de 1,5 mL;
3. Centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos o volume filtrado;
4. Concentrar o “pellet” em um só microtubo, lavando de 3 em 3 para um único tubo;
5. Centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos e desprezar o sobrenadante;
6. Ressuspender o pellet (precipitado) no restante de volume que permanecer no frasco mais ou menos 0,1 mL (100 mL);

Extração de DNA

7. Preparar a solução ST1B com a adição de ST1A (*). Aquecer as soluções ST2 e ST4 antes do uso;
8. Adicionar 10 µl da solução ST1B* na amostra;
9. Vórtex na velocidade mínima por 3 minutos (até misturar bem o pellet com a solução);
10. Adicionar direto na amostra 10 µl da solução ST2 (tampão de lise) que deve estar previamente quente a 65 °C;
11. Colocar em temperatura ambiente por 2 minutos;
12. Vórtex velocidade máxima por 3 minutos;
13. Adicionar ao lisado (na amostra) mais ou menos 0,1 g das esferas de vidro (1 colher baixa) ~10 µl marca;
14. Vórtex por 3 minutos velocidade máxima;
15. Centrifugar a 10000 rpm (10600 Xg) por 1 minuto em temperatura ambiente;
16. Transferir o sobrenadante para novo tubo de 1,5 mL. ~ 0,1 mL (100 µl);
17. Adicionar 20 µl de ST3. Agitar para misturar e incubar a 4 °C por 5 minutos, colocando no gelo (ou overnight na geladeira);

18. Centrifugar a 14000 rpm por 1 minuto em temperatura ambiente. $\sim 90 + 20 = 110 \mu\text{l}$;
19. Transferir o sobrenadante para novo tubo de 1,5 mL. Adicionar 150 μl da solução ST4 (aquecido a 65 °C);
20. Pegar coluna e acoplar embaixo de um tubo coletor de 2,2 mL (16);
21. Carregar dentro da coluna a amostra ($\sim 260 \mu\text{l}$) e tampar;
22. Centrifugar até chegar a 5000 rpm que dura quase 8 segundos;
23. Adicionar 40 μl de ST5 (resfriado em banho de gelo);
24. Centrifugar até chegar a 5000 rpm que dura quase 8 segundos;
25. Adicionar 40 μl da solução ST6;
26. Centrifugar até chegar a 5000 rpm que dura quase 8 segundos;
27. Adicionar 40 μl da solução ST5;
28. Centrifugar a 14000 rpm por 2 minutos – para secar bem;
29. Trocar o tubo coletor por um novo de 2,2 mL;
30. Adicionar 50 μl da solução ST7 no centro da coluna;
31. Centrifugar a 14000 rpm por 1 minuto;
32. Fazer novamente o número 30. Adicionar 50 μl de água Milli-Q (fez duas vezes – A) no centro da coluna, que será o segundo eluado da coluna;
33. Adicionar 50 μl da solução ST7 no centro da coluna (no mesmo microtubo, fazer novamente);
34. Centrifugar a 14000 rpm por 1 minuto;
35. Fechar o tubo e guardar a amostra no freezer -20°C (TP);
36. No final guardar a resina no freezer.

APÊNDICE C

Atividades e participações em eventos científicos

Foi submetido e encontra-se em revisão o Capítulo de livro “Alternativa Hídrica: Água de Reúso” no Livro “Água, Saúde Humana e Ambiental” ENSP – FIOCRUZ. Foram apresentados Trabalhos em Eventos Científicos: “Indicativos de qualidade sanitária da Água e Reúso destinada à agricultura: Parâmetros Internacionais e Nacionais”, no 17º Congresso Nacional de Meio Ambiente de Poços de Caldas, realizado em 2020; “Avaliação bacteriológica e físico-química de amostras de água de reúso para agricultura” no Congresso I Congresso Brasileiro de Ciências Biológicas on-line, CONBRACIB, 2020; “Método alternativo de concentração de amostra de água para avaliação da presença de atividade estrogênica” no Congresso Ecotox 2018; “Água de reúso: normativas nacionais e do nordeste do Brasil” no 30º Congresso ABES 2019; “Qualidade de água de reúso agrícola utilizada em comunidade rural do estado do Ceará” no IV Simpósio Brasileiro de Recursos Naturais do Semiárido – SBRNS 2019; “Evaluation of bacteriological parameters of reuse water for safe use as an alternative source of water” no SIMBAF - IV simpósio e 5º workshop em pesquisa, desenvolvimento e inovação em doenças bacterianas e fúngicas 2018; “Soil microbiota DNA watered with reuse water” no Brazilian-international Congress of genetics 2017; “utilização da água de reuso com alternativa sustentável para sociedade” no I webcongresso internacional de direito sanitário 2017.

Participação como co-orientadora dos alunos PIBIc, Ana Beatriz Loureiro Gonçalves da Silva e Rodrigo Bezerra da Silva. Participação em atividades de extensão como professora colaboradora junto a Cooperação Social da Presidência da Fiocruz – no Curso extensão de saneamento ambiental e produção Audiovisual de 2020. Participação como professora colaboradora no Curso de Especialização em Gestão e Tecnologias do Saneamento de 2019. Participação no grupo de pesquisa de Saúde Ambiental e Saneamento da Ensp/Fiocruz com a Dra. Adriana Sotero Martins como coordenadora, em atuação na consulta pública online no processo de concessão da Cedae (2020), assim como atuação nas análises da qualidade da água do Rio Guandu, Rio de Janeiro, em 2020.

APÊNDICE D

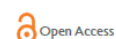
Artigos científicos publicados

DOI: 10.15406/ijh.2021.05.00262



International Journal of Hydrology

Research Article



Agricultural reuse: comparison between Brazilian and international quality standards

Abstract

Reused water is increasingly requested by farmers worldwide, but there is no legislation in Brazil that contains all the parameters for assessing its quality. This study aimed to compare the legal provisions in Brazil related to the quality parameters of reused water for agriculture (microbiological, physical and chemical) with those described in the main regulations of the United States, drawing a parallel with the Brazilian reality. The study is descriptive, based on queries and collections of regulations in electronic documentary data source on Google Scholar. The existing parameters described in the Brazilian regulations for agricultural reuse have been compared with the standards established in the international regulations of the United States Environmental Protection Agency and the World Health Organization. The main results showed that there is a discrepancy between international and Brazilian legislations according to physical, chemical and microbiological parameters. Therefore, the work suggests a creation of new Brazilian legislations about agricultural reuse whereas the control of hydraulic pollutants and water reuse is immature comparing to international levels.

Keywords: water reuse, agricultural reuse, water quality, legislations, Brazilian standards, public health

Volume 5 Issue 1 - 2021

Natasha Berendonk Handam,¹ Ana Beatriz Loureiro Gonçalves da Silva,² Adriana Sotero-Martins,³ José Augusto Albuquerque dos Santos⁴

¹Program of Doctor's Degree in Public Health and Environment, Sergio Arouca National School of Public Health, Oswaldo Cruz Foundation (ENSP/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

²Chemical Engineering Graduate Student, Senai CETIQT, PIBIC/CNPQ Scholarship, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

³Department of Sanitation and Environmental Health, Sergio Arouca National School of Public Health, Oswaldo Cruz Foundation (DSSA/ENSP/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

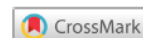
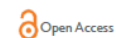
⁴Laboratory for Assessment and Promotion of Environmental Health, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (IOC/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

DOI: 10.15406/ijh.2021.05.00274



International Journal of Hydrology

Research Article



Estrogenic activity in reused water: comparison of concentration methods

Abstract

Determining the presence of endocrine disrupting substances in waters is a relevant aspect for monitoring environmental health. Given its relevance, it is important to use methods that can make the total concentration of substances with estrogenic activity (eg endocrine disruptors), being faster, and without the use of compounds that pollute the environment. The purpose of the study was to compare the effectiveness of the methods of concentration by lyophilization and by vacuum concentration of substances with estrogenic activity present in reused water, using the commonly used methodology, solid phase extraction. Three methods were compared: solid phase extraction, lyophilization, and vacuum centrifugation. Sample aliquots of reused water received 17 β -estradiol at a final concentration of 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ and were concentrated by the three methods. The analysis of estrogenic activity was performed by the in vitro YES (Yeast Estrogen Screen) assay. The results showed that the vacuum centrifugation, solid phase extraction and lyophilization methods had different percentages in the recovery of substances with estrogenic activity, being 45%, 40%, and 31%, respectively. The study pointed out that the lyophilization and vacuum centrifugation methods were effective as alternative methods for concentrating samples containing substances with estrogenic activity.

Keywords: estrogenic activity, concentration methods, YES assay, reused water, endocrine disrupting chemicals

Volume 5 Issue 3 - 2021

Natasha Berendonk Handam,¹ Daniele Maia Bila,² Giselle Gomes Moreira da Silva,² Allan dos Santos Argolo,² Nathalia Rose da Silva Gomes,³ Priscila Gonçalves Moura,⁴ Elvira Carvajal,⁵ Adriana Sotero-Martins⁶

¹Doctoral Program in Public Health and Environment, Sergio Arouca National School of Public Health (ENSP), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

²Laboratory of Sanitary Engineering (LES), Sanitary and Environmental Engineering Department (DESM), State University of Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

³Specialization in Sanitation Management and Technologies, Sergio Arouca National School of Public Health (ENSP), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

⁴Postdoctoral Program in Public Health and Environment, Sergio Arouca National School of Public Health (ENSP), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

⁵Biology and Cellular Department (DBC), Roberto Alcântara Gomes Institute of Biology (IBRAG), UERJ, Rio de Janeiro, RJ

DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-4152202020180201><https://doi.org/10.1590/S1413-4152202020180201>

Revisão de Literatura

Água de reúso: uma alternativa sustentável para o Brasil

Water reuse: a sustainable alternative for Brazil

Priscila Gonçalves Moura^{1*} , Felipe Nicolau Aranha¹ ,
Natasha Berendonk Handam¹ , Luis Eduardo Martin² , Maria José Salles¹ ,
Elvira Carvajal³ , Rodrigo Jardim⁴ , Adriana Sotero-Martins¹ 

RESUMO

As motivações para a busca de soluções e alternativas que podem diminuir o estresse hídrico são evidentemente importantes. Mesmo que renováveis, os recursos hídricos de qualidade e potabilidade são escassos. Como alternativa, o reúso pode ajudar a diminuir o uso de águas potáveis para atividades que não necessitam de potabilidade. Este trabalho teve como objetivo realizar uma revisão da literatura sobre água de reúso a partir da definição de alternativa sustentável e racional para o uso da água. Realizou-se um levantamento bibliográfico do período de julho a dezembro de 2017 nas bases de dados Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (MedLine), Literatura Latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), Embase e Institute for Scientific Information (ISI). Com a revisão bibliográfica foi possível identificar que o tema "reúso" vem sendo debatido para a gestão, a padronização e os riscos associados à utilização. No Brasil, não há uma legislação 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 com legislações e normas sobre o tema. Legislações internacionais apresentam uma relação abrangente de parâmetros que podem ser utilizados 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 reúso; água residuária; legislação; qualidade da água.

ABSTRACT

The motivations for seeking solutions and alternatives that can reduce water stress is clearly important. Even though renewable, water resources of quality and potability are scarce. As an alternative, reuse can help reduce the use of drinking water for activities that do not require drinking. The objective was to carry out a review of the literature on reuse water based on 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. The bibliographic review showed that the reused topic has been discussed with notes to the management, standardization, and risks associated with its use. There is no national Brazilian legislation that regulates the use and quality standards of reuse water. However, in the four Brazilian regions, the literature points to only seven Brazilian states with legislation and norms on the subject. 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 of this type of water. Scientific publications on reuse water should be encouraged, as well as more detailed legislation describing the types of reuse water and related risk patterns.

Keywords: reuse water; wastewater; legislation; water quality.









DOI: <http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.2703>



Quality of raw water in the Guandu Basin of Rio de Janeiro state during water crisis of 2020

ARTICLES doi:[10.4136/ambi-agua.2703](https://doi.org/10.4136/ambi-agua.2703)

Received: 01 Feb. 2021; Accepted: 24 May 2021

Adriana Sotero-Martins^{1*} ; Aloysio da Silva Ferrão-Filho² ;
José Augusto Albuquerque dos Santos² ; Priscila Gonçalves Moura³ ;
Natasha Berendonk Handam⁴ ; Nelson Peixoto Kotowski-Filho⁵ ;
Rodrigo Jardim Monteiro da Fonseca⁵ ; Elvira Carvajal⁶ 

ABSTRACT

At the beginning of 2020, about 9 million inhabitants of the Metropolitan Region of Rio de Janeiro, dependent on the Guandu Basin, experienced a water-supply crisis when their water tasted badly and gave off an odor. This work presents the results of analyses of the sanitary quality of raw water in this system at two different times during the water crisis, with respect to the presence of cyanobacteria found using metagenomic studies, and cyanotoxins, microcystin (MC) and saxitoxin (SXT) quantified by ELISA. Analyses of raw water quality parameters were carried out through the determination of total coliforms and *Escherichia coli* levels and some physical-chemical parameters. The raw water collected in both periods presented levels of *Escherichia coli* levels above the maximum allowed values (MAV) described in Resolution 357/2000 of the National Environmental Agency, as well as the levels of MC in a filter sample. The physical-chemical parameters analyzed and the SXT levels were in accordance with this resolution. The most abundant cyanobacterial genus in the critical period was *Planktothricoides sp.* Therefore, it is necessary to implement basic sanitation in cities upstream from the point of capture of raw water from this source, so that events similar to those that occurred in the 2020 water crisis do not recur.

Keywords: cyanotoxins, public health, raw water quality.