



**UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA
FACULDADE
DE CEILÂNDIA
CURSO DE
FARMÁCIA**

Jonathas Pereira Lanna da Costa

Análise da Eficácia dos Métodos de Detecção de SARS-Cov-2 em Água Residual: Revisão Sistemática.

Brasília, 2023

Jonathas Pereira Lanna da Costa

Análise da Eficácia dos Métodos de Detecção de mSARS-Cov-2 em Água Residual: Revisão Sistemática.

Monografia de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico, Faculdade de Ceilândia,. Universidade de Brasília,

Orientador: Prof(a). Dr^a.

Thaís Alves da Costa

Lamounier

Brasília, 2023



Universidade de Brasília

Faculdade de Ceilândia – FCE/ UnB

Curso de Farmácia

Jonathas Pereira Lanna da Costa

**Análise da Eficácia dos Métodos de Detecção de SARS-Cov-2 em Água Residual:
Revisão Sistemática.**

BANCA EXAMINADORA

Orientador(a):

Prof^a. Dr^a. Thaís Alves da Costa Lamounier
Professora da Faculdade de Ceilândia (FCE/UnB)

Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferreira
Professor da Faculdade de Ceilândia(FCE/UnB)

Prof. Dr. Rodrigo Haddad
Professor da Faculdade de Ceilândia (FCE/UnB)

Brasília, 2023

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer a Deus, minha família e Maria Gláucia, por terem proporcionado conforto e apoio nos momentos difíceis, sendo base imprescindível para minha formação. Agradecer também a Universidade de Brasília, seu corpo docente e técnico, que influenciaram profundamente na caminhada rumo à graduação. Ainda, devo agradecer à professora Thaís Lamounier, que impactou direta e indiretamente na confecção deste trabalho e em todo direcionamento que tive em momentos decisivos da minha graduação. Por último agradecer à persistência, força e determinação que mantive durante esses anos que se passaram durante minha graduação.

Epígrafe

“Quando a caminhada é dura, apenas os
duros continuam caminhando”

- Mano Brown

RESUMO

Desde o começo da pandemia do COVID-19, é crescente a quantidade de estudos sobre SARS-Cov-2 e a presença em água residual. O processo de adsorção do SARS-Cov-2 e a presença de carga viral em água residual produziu diferentes trabalhos sobre métodos de detecção de SARS-Cov-2 em água residual. Logo, o objetivo deste trabalho é realizar uma revisão sistemática da literatura para descrever qual seria o método de detecção de SARS-Cov-2 mais eficaz. Foi realizada uma revisão sistemática que envolveu as etapas de identificação, seleção, elegibilidade e inclusão dos textos, de acordo com o guia PRISMA, que compreende um *checklist* de 27 itens e um fluxograma de quatro etapas, que auxilia autores no relato de revisões sistemáticas. A pesquisa na base de dados da Medline PubMed sem restrição de língua ou data, admitindo, à princípio, todo artigo encontrado de acordo com o algoritmo de descritores: (DETECTION) AND (SARS-COV-2) AND (WASTEWATER TREATMENT PLANTS). Foram incluídos artigos que descreviam em seu resumo assuntos relacionados à detecção de SARS-Cov-2 em água residual, descrevendo o método utilizado. Depois de feita a leitura em íntegra dos artigos, cinco foram selecionados compondo o presente trabalho. A partir da análise dos artigos apresentados, foi possível observar os métodos de detecção e as abordagens de tratamento de água e esgoto. Destacada a importância da epidemiologia baseada em água residual (EBAR) como uma ferramenta de alerta sobre novos casos de COVID-19, é importante estabelecer um método prático, econômico e replicável para a detecção de SARS-CoV-2 nas estações de tratamento de água e esgoto.

Palavras-chaves: SARS-CoV-2; Epidemiologia; Água residual; Detecção; RT-PCR.

ABSTRACT

Since the beginning of the COVID-19 pandemic, the number of studies on SARS-Cov-2 and its presence in wastewater is increased. The SARS-Cov-2 adsorption process and the presence of viral load in wastewater produced different works on methods of detection SARS-Cov-2 in wastewater. Therefore, the aim of this work is to perform a systematic review of the literature to describe which would be the most effective method of detecting SARS-Cov-2. A systematic review was performed that involved the stages of identification, selection, eligibility and inclusion of texts, according to the guide PRISMA, which comprises a 27-item checklist and a four-step flowchart, which assists authors in reporting systematic reviews. The research in the Medline PubMed database without restriction of language or date, admitting, at first, every article found according to the algorithm of descriptors: (DETECTION) AND (SARS-COV-2) AND (WASTEWATER TREATMENT PLANTS). Articles were included that described in their abstract subjects related to the detection of SARS-Cov-2 in wastewater, describing the method used. After reading the articles in full, five were selected to compose the present work. From the analysis of the articles presented, it was possible to observe the detection methods and approaches to water and sewage treatment. Demonstrated the importance of wastewater based epidemiology (WWBE) as an alert tool for new cases of COVID-19, it is important to establish a practical, cost-effective and replicable method for detecting SARS-CoV-2 in water and sewage treatment plants.

Key-words: SARS-Cov-2; Epidemiology, Wastewater; Detection; RT-PCR.

Lista de abreviações

- CAESB - Companhia de Saneamento Ambiental do Distrito Federal
- EBAR - Epimegiologia Baseada em Água Residual
- FLD - Flocculação com Leite Desnatado
- PEG - Polietilenoglicol
- PRISMA - *Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses*
- RdRp - *RNA dependent RNA polymerase*
- RT-qPCR - *Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction*
- RT-ddPCR - *Reverse Transcription Droplet Digital Polymerase Chain Reaction*

SUMÁRIO

Introdução.....	10
Método.....	11
Resultado.....	13
Figura 1.....	14
Tabela 1.....	15
Discussão.....	20
Referência.....	23
Anexo I.....	25
Anexo II.....	26

INTRODUÇÃO

A pandemia do coronavírus provocada pelo vírus SARS CoV-2, causador da síndrome respiratória aguda grave, impactou o planeta em todos os setores da sociedade a partir de novembro de 2019.¹

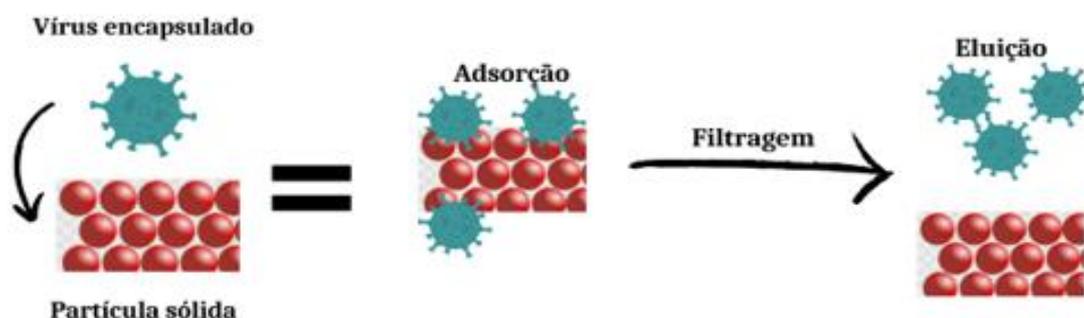
Desde o começo da pandemia do COVID-19, a quantidade de estudos sobre o SARS-CoV-2 aumenta e relata a detecção de carga viral em amostras de fezes e infecções gastrointestinais bem como a detecção de SARS-CoV-2 em estações de tratamento de água e esgoto. De acordo com Kocamemi et al. (2020), foram encontradas concentrações de fragmentos do ácido nucleico viral em diferentes estações de tratamento de esgoto em Istambul. A presença do SARS-CoV-2 em amostras de fezes de pacientes infectados também foi relatada em 2020 por Ahmed que também demonstrou a detecção do RNA viral através de reações em cadeia de polimerase quantitativa de transcriptase reversa (RT-qPCR) em água residual na Austrália.^{2,3,4}

A partir da técnica de RT-qPCR foi possível detectar SARS-CoV-2 nas estações de tratamento de água e esgoto, e assim realizar estudos epidemiológicos baseado em águas residuais. Há evidências de que o SARS-CoV-2 continua se replicando ativamente no trato gastrointestinal, mesmo após a remissão da infecção no trato respiratório, assim explicando a presença de partículas virais nas fezes, em até 12 dias, após o término da infecção do trato respiratório.⁴

Diferentes trabalhos foram feitos com o intuito de apontar a melhor forma de detecção de SARS-CoV-2 em diversos tipos de amostras, principalmente amostras de matriz aquática. Dentre estas amostras, as de água residual (ságua descartadas após o uso comercial, industrial ou residencial, termo mais utilizado para descrever água de esgoto) apresentam uma maior concentração de SARS-CoV-2 devido ao fato deste vírus ser encapsulado, ou seja, possuir uma camada lipídica que envolve o material genético. Por esse motivo, o SARS-CoV-2 sofre um processo de adsorção, saponificação, desinfecção e oxidação durante o processo de tratamento da água, devido ao uso de solventes, detergentes e desinfetantes. O processo de adsorção faz o SARS-CoV-2 se agregar em partículas sólidas presente na água e, conseqüentemente, decantar durante as fases de tratamento de água e esgoto. Assim, vírus encapsulados podem ser detectados por um método de adsorção/eluição, que compreende um processo de agrupamento da carga viral em

partículas sólidas, e depois um processo de separação do vírus destas partículas sólidas.⁵

Processo de Adsorção/Eluição



Relatado por Corpuz et al. (2020), esta característica do SARS-CoV-2, de ser um vírus encapsulado, confere uma suscetibilidade maior de ser inativado em águas residuais, quando comparado com outros vírus como o rotavírus e o adenovírus.⁵ Devido a isto, com intuito de destacar métodos e técnicas adequadas para a detecção e extração de SARS-CoV-2 em estações de tratamento de água e esgoto, este trabalho reuniu os resultados sobre a detecção do SARS-CoV-2 em água residual obtidos por outros autores. O presente trabalho almeja responder qual o método de detecção e extração de SARS-CoV-2 em estações de tratamento de água seria o mais eficaz. Assim como destacar a necessidade de estabelecer um protocolo padronizado para detecção de SARS-CoV-2 em água residual como ferramenta de epidemiologia baseada em água residual. Tudo isso em contribuição de uma abordagem ambiental sobre a pesquisa de partícula viral em rede de tratamento de água e esgoto.

METODOLOGIA

Esse trabalho trata de uma revisão sistemática da literatura sobre a presença de SARS-CoV-2 em água residual e na rede de tratamento de água e esgoto. As etapas de identificação, seleção, elegibilidade e inclusão dos textos, depois de feita

leitura integral dos mesmos, foram realizadas de acordo com o guia PRISMA (*Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses*). O guia PRISMA foi elaborado no Canadá em 2005 com a participação de 29 autores, entre eles autores de revisões, metodologistas, clínicos, editores. Ele consiste em um *checklist* de 27 itens e um fluxograma de quatro etapas, que auxilia autores em melhorar o relato de revisões sistemáticas, além de servir como avaliação crítica de revisões sistemáticas.⁶

Como questão chave para o desenvolvimento do presente artigo foi utilizada a seguinte pergunta: “Qual método de detecção e extração seria o mais eficaz para determinar SARS-CoV-2 nas estações de tratamento de água e esgoto?”.

Estratégia para busca de fontes e informações

Foi feita uma pesquisa na base de dados da Medline PubMed, sem restrição de data ou língua, admitido, à princípio, todo resultado encontrado de acordo com os descritores escolhidos. Utilizado o algoritmo de descritores: (DETECTION) AND (SARS-COV-2) AND (WASTEWATER TREATMENT PLANTS). Após indexados para o software de revisão inteligente *Rayyan*, feita a avaliação de título e resumo dos artigos. O aplicativo *Rayyan* foi desenvolvido por catarianos com intuito de melhorar a triagem inicial de resumos e títulos de artigos encontrados na pesquisa na base de dados. Este aplicativo utiliza processos semiautomáticos para tornar clara e objetiva a análise de título e resumo dos artigos indexados. A utilização desse aplicativo permite contornar desafios e complexidades das ferramentas disponíveis para o autor de revisão sistemática, tornando prático e dinâmico a leitura dos artigos de uma revisão.⁷ Dos 176 artigos encontrados na pesquisa, apenas um era duplicado, sendo excluído da leitura prévia.

Crítérios de elegibilidade

Foram observados e incluídos estudos que apresentaram no resumo assuntos relacionados à detecção de SARS-COV-2 em estações de tratamento de água residual, descrevendo a metodologia utilizada no processo. Após este passo, foram excluídos trabalhos que não apresentaram dados ou resultados sobre a detecção do SARS-CoV-2 nas estações de tratamento de água residual no resumo.

Extração dos dados

Depois de selecionados os estudos, cinco no total, foi feita a extração de dados de forma manual e analítica, lendo cada um dos artigos selecionados de forma integral.

Análises de dados

Os dados foram analisados buscando encontrar uma conexão entre dois pontos: métodos de detecção de SARS-CoV-2 em estações de tratamento e resultados da concentração de SARS-CoV-2 encontrado em amostras de água residual. Essa análise foi feita observando a contribuição dos trabalhos em responder a questão chave para o desenvolvimento do trabalho.

A metodologia foi embasada no *checklist* de procedimento PRISMA, que funciona como um guia de procedimento para uma produção fiel de revisões sistemáticas e metanálises. Após feita a pesquisa na base de dados PubMed, foram indexados os artigos selecionados para o software de revisão *Rayyan*, que auxilia na leitura de título e resumo de revisões sistemáticas. Por fim foi realizada a leitura e análise de título e resumo dos artigos.^{7,8}

RESULTADO

Dos 176 artigos encontrados durante a busca na base de dados do PubMed, 1 artigo foi excluído por apresentar duplicidade. Do total, 22 foram selecionados, por preencherem os critérios de elegibilidade, e lidos na íntegra. Na fase de leitura do texto completo, 17 artigos foram excluídos por não apresentarem informações sobre a detecção e concentração de SARS-CoV-2, conforme a Figura 1. A Tabela 1 demonstra as informações de cada artigo que compõem este estudo.

Figura 1. Fluxograma representativo das etapas realizadas na pesquisa e seleção dos artigos sobre a detecção de SARS-CoV-2 em estações de tratamento de água

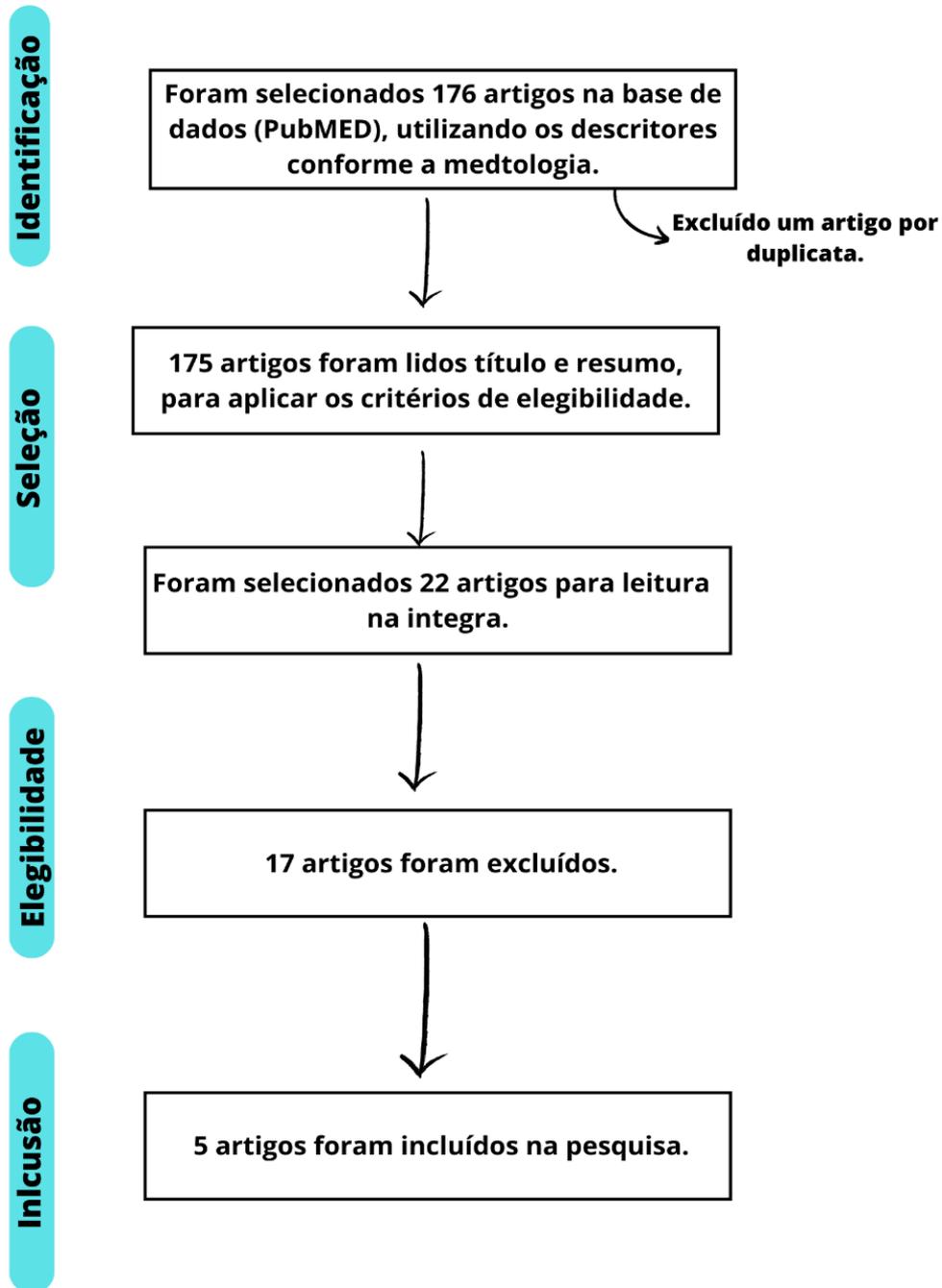


Tabela 1.

Caracterização dos artigos incluídos na revisão sobre técnicas de detecção dos SAR-CoV-2 em água residual.

Referência	Técnica de Extração	Técnica de Detecção e Concentração	Resultados	Número de Estações de Tratamento
Mark Ciesielski, et al. 2021. Estados Unidos	Utilizado o kit para extração <i>AllPrep PowerViral DNA/RNA Kit</i> (QIAGEN, Germatown).	RT-qPCR (<i>Reliance One-Step Multiplex Supermix</i>) Limite de Detecção: 12 cópias por microlitro. RT-ddPCR (<i>Bio-Rad's One-Step RT-ddPCR Advanced Kit</i>) Limite de Detecção : 0,066 cópias por microlitro.	A técnica de detecção utilizando RT-ddPCR, consegue ter um limite de detecção maior que o do RT-qPCR. Enquanto o RT-qPCR consegue ser realizado mais rapidamente.	9
Mojtaba Pourakbar, et al., 2021. Irã	Utilizado o kit para extração <i>RNJa Virus Kit</i> (ROJETechnologies, Irã)	COVID-19 ONE-STEP RT-PCR kit (Produção local). Encontrado um intervalo de concentração entre 0.71×10^4 e 3.1×10^4 cópias de genes por litro.	Utilizando o método de RT-PCR, foi possível assegurar que o gene de nucleocapsídeo do SARS-CoV-2 é o mais específico para identificar o material genético nos ensaios de detecção. Além disso, foi observado que o tratamento da água residual ainda é a última barreira para impedir a transmissão do vírus através de matrizes aquáticas.	2
Shadi W. Hasan, et al., 2020. Emirados Árabes Unidos	ABIOpure Viral DNA/RNA Extraction kits (Alliance Bio Inc.) -Protocolo de extração com reagente químico combinado	Utilizado um kit de <i>Real-Time qPCR</i> (Applied Biosystems) para detecção dos dois tipos de extração. Na extração utilizando ultracentrifugação, foi observado a concentração de	A combinação de ultracentrifugação e o kit de extração de RNA (ABIOpure Viral DNA/RNA, Alliance Bio Inc.) realizou uma contagem maior de partícula viral quando comparado com o protocolo de extração TRIzol (Thermo Fisher	11

	polietilenoglicol (PEG) e reagente TRIzol.	31,7 cópias de gene por mililitro, enquanto no utilizado o PEG/TRIzol, concentração de 2,6 cópias de gene por mililitro.	Cat#15596), utilizando o polietilenoglicol (PEG) para concentrar as partículas virais da amostra. Apesar dos resultados inferiores em questão de sensibilidade, o método de precipitação química, PEG/TRIzol, é mais barato e de fácil manuseio técnico. O método de filtração em coluna apresenta uma abordagem mais sensível, enquanto o método PEG/TRIzol uma abordagem menos sensível, porém mais barata e prática.	
Sandra Westhaus, et al., 2020. Alemanha	Kit de extração <i>NucleoSpin RNA Virus</i> (Macherey Nagel).	Utilizado <i>One-Step RT-qPCR Kit</i> (New England Biolabs); <i>Multiplex RNA Virus Master</i> (LightCycler®) e <i>C1000 Touch Thermal Cycler</i> (Bio-Rad). Na porção afluente, foi indetificada a concentração de 3 e 20 cópias por mililitro, utilizando o gene M e gen RdRp, respectivamente. Na porção efluente a concentração passou a ser 2.7 e 37 cópias por mililitro, respectivamente ao gene M e gene RdRp.	Mesmo utilizando diferentes protocolos e kits para detecção de SARS-CoV-2 em água residual, o que de fato é destacado neste trabalho é a indicação dos oligonucleotídeos utilizados – gene N, gene M, gene E e gene RNA-RNA polimerase dependente (RdRP). Foi observado que o gene RdRP apresenta uma maior especificidade e o gene M uma maior sensibilidade, entre os quatro genes observados (gene E, gene M, gene N e gene RdRP), para detecção de SARS-CoV-2.	9
Kadir Yanaç, et al., 2022. Canadá	Foi utilizado como método de concentração da amostra:	Utilizado o kit de detecção <i>TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix</i> (Life	O método de Floculação de Leite Desnatado (FLD), apesar de ser o mais demorado, demonstra	

	<p>Ultracentrifugação à 3000G e 7500G e o método de floculação de leite desnatado (FLD).</p> <p>Após a concentração, é utilizado o kit <i>RNeasy PowerMicrobiome</i> (QIAGEN) para extração.</p>	<p>Technologies) e então detectado através do kit <i>QuantStudio 5 Real-Time PCR System</i> (Life Technologies). Como avaliação, foi observado a reconstituição da amostra, onde foi observado 15,27% de reconstituição utilizado FLD; 13,38% em ultracentrifugação 3000G e 4,79% de reconstituição em ultracentrifugação 7500G.</p>	<p>maior eficácia para a detecção do SARS-CoV-2 em água residual, por apresentar maior percentual (15,27 ± 3,32%) de recuperação da amostra de água residual enriquecida. O método utilizado menos eficiente é o de ultracentrifugação 7500G, por apresentar o menor percentual (4,79%) de recuperação da amostra de água residual enriquecida. Além disso, ambos os métodos de ultracentrifugação necessitam de uma pré-filtragem, enquanto que o método FLD não necessita.</p>	<p>3</p>
--	--	--	--	----------

Cada um dos cinco artigos traz informações relevantes ao presente trabalho, identificado agora a seguir.

No artigo de Ciesielski et al. (2021), as amostras utilizadas são originárias principalmente de águas afluentes (montante). O método de preparo das amostras foi realizado da seguinte maneira: Coletadas as amostras, era ajustado o pH para 3,5, utilizando 10M HCl; com o auxílio de barras e placas magnéticas, a amostra era agitada para ressuspensão, logo em seguida, filtrado 50mL da amostra por um filtro de 0,45 µm em uma filtração à vácuo.⁷ Feito a separação sólida da suspensão, a extração e isolamento do RNA era feito utilizando um kit específico para o isolamento de material genético, o *AllPrep® PowerViral DNA/RNA* (QIAGEN). As amostras foram processadas pelas técnicas de RT-qPCR (*Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction*) e RT-ddPCR (*Reverse Transcription Droplet Digital Polymerase Chain Reaction*). O resultado mostrou que diferentes fluxos de água, ou diferentes locais de coleta da amostra, podem apresentar discrepância em resultados de uma mesma estação de tratamento.⁸ Após feito os testes, o trabalho de Ciesielski et al. definiu um limite de detecção menor feita a utilização de kits de detecção RT-ddPCR, quando comparados com o uso da técnica RT-qPCR – mais comumente utilizada. Em números exatos, o limite de detecção da técnica de RT-ddPCR encontrada foi de 0,066 cópias/µL, enquanto o limite do RT-

qPCR foi de 12,0 cópias/ μ L . O limite de detecção auxilia em medir qual método consegue ser mais sensível para a detecção do vírus, sendo inversamente proporcional, quanto menor o limite de detecção do método, maior eficiência em identificar o vírus, neste caso o SARS-CoV-2. ⁸

O trabalho de Mojtaba Pourakbar et al. (2021) levanta uma perspectiva para a escolha dos oligonucleotídeos e genes para identificação do SARS-CoV-2 em matrizes aquáticas. O processamento desse tipo de amostra começa com uma centrifugação, retirados o *pelet* da suspensão e em seguida adicionado hidróxido de alumínio para provocar o efeito de precipitação por adsorção em partículas virais, feito essa primeira triagem, as amostras foram acondicionadas a -80°C para as análises futuras. A técnica de RT-qPCR utilizada, com o kit *SARS-CoV-2 COVID-19 ONE-STEP RT-PCR (Pishtaz Teb Diagnostics, Tehran, Iran)*, identificou duas partes diferentes do genoma viral: a RNA-RNA polimerase dependente (RdRp); e a nucleocapsídeo (N). O gene RdRp demonstrou uma sensibilidade maior, ao passo que o gene N possui uma especificidade para rastreamento, triagem e detecção de primeira linha do SARS-CoV-2. ⁹

No estudo de Hasan et al. (2021) foi observado a detecção de SARS-CoV-2 nas águas residuais tratadas e não tratadas em estações de tratamento, bem como comparou a concentração viral. As amostras de águas na porção jusante (a parte afluente do curso de curso de água, ou seja, antes de determinado ponto) e montante (a porção efluente do curso de água, ou seja, a parte posterior a determinado ponto), foram coletadas em garrafas estéreis de polipropileno, preservadas e transportadas até o laboratório responsável. No laboratório, essas amostras foram submetidas a um banho maria a 60°C por 90 minutos para inativar o vírus e reduzir o risco de contaminação durante o manuseio das amostras. As amostras foram resfriadas a 4°C e processadas para extração do RNA e então detecção do genoma viral. As amostras passaram por um processo de filtração à vácuo, utilizando seringa de filtração de polietersulfona 0,22 μ m (Millex[®]) ou de poliestireno 0,22 μ m (Millipore SigmaTM) conectados a uma bomba de vácuo (WELCH[®] 2546 C-02A). A extração do RNA viral e a determinação, por meio de RT-qPCR, foram feitos com o kit *ABIOpure Viral DNA/RNA Extraction* e com o kit *GENESIG COVID-19 (Primerdesign Ltd., Cat#Z-Path-2019-nCoV)*, respectivamente. Foi utilizado também um método de detecção utilizando o reagente TRIzol[®] (Thermo Fisher), sendo feito como forma de comparação para o método de

ultracentrifugação, verificando qual é o melhor método adotado para amostras de água residual.¹⁰ O método de PEG/TRIzol foi feito utilizando 8000 de peso molecular médio de polietilenoglicol para concentrar o SARS-CoV-2. A amostra filtrada e transferida para um tubo falcon de 50mL, foi adicionado PEG e cloreto de sódio até atingir a concentração de 8% de polietilenoglicol e 1,8% de cloreto de sódio, e depois vortexado para dissolver o PEG e cloreto de sódio e precipitado o vírus. Descartado o sobrenadante, os *pelets* contendo o material viral foi ressuspendido em 1,5 mL de reagente TRIzol, centrifugado a 13.000G a 4°C por 15 minutos, e então observado as três fases da solução: aquosa, contendo RNA; interfase branca, contendo DNA; e a inferior contendo principalmente proteínas.¹¹ Como resultado, verificada a diferença de detecção entre as 11 estações de tratamento analisadas, onde foi evidenciado que a combinação de ultrafiltração em conjunto com kits comerciais de RNA resultaram em uma concentração maior, quando comparados com o uso de polietilenoglicol (PEG) e TRIzol, enquanto o método combinado de químicos, PEG/TRIzol, apresentou um custo reduzido na detecção, além de um fácil manuseio técnico e prático.¹⁰

As informações do trabalho desenvolvido por Westhaus et al. (2021), servem principalmente para mensurar os métodos de detecção do SARS-CoV-2 em amostras coletadas em estações de tratamento de água e esgoto. No primeiro momento, os testes realizados no trabalho procuram comparar a sensibilidade e seletividade de genes específicos para a detecção do SARS-CoV-2. Depois de coletadas, as amostras de água residual eram processadas e enviadas para o laboratório, congeladas a -18°C, e posteriormente aquecida até atingir os 4°C para realização dos devidos ensaios analíticos. Em seguida as amostras eram centrifugadas utilizando unidades de ultrafiltração (*Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Unit, Sigma*), passando posteriormente por processo de diluição e nova centrifugação.¹² Depois de extraído o RNA das amostras, era feito uma quantificação por meio de RT-qPCR, sendo utilizados os seguinte genes para a detecção do vírus: o gene E (oligonucleotídeos: E_Sarbeco_F1; E_Sarbeco_R1; e E_Sarbeco_P1); o gene M (oligonucleotídeos: M-475-F; M-574R; e M-507-P); o gene N (oligonucleotídeos: SARS-CoV-2 N-gene F; SARS-CoV-2 N-gene R; e SARS-CoV-2 Probe-N) e o gene RdRp (*RNA dependent RNA polymerase*).¹² O ensaio foi realizado utilizando o método de RT-qPCR, utilizando o kit de *One-Step RT-qPCR*

(*Luna Universal Probe One-Step RT-qPCR*). O gene RdRP mostrou uma sensibilidade muito alta, e uma boa seletividade para o SARS-CoV-2, em comparação com outros genes de teste viral.¹⁰ Em consonância com o trabalho descrito, os genes que se destacam no procedimento de RT-qPCR para SARS-CoV-2 são o M-gene e o gene RdRP, por apresentarem uma alta sensibilidade e especificidade, respectivamente, para a carga viral em amostras de água residual.¹²

Com o objetivo de identificar novas amostras e meios para detecção de SARS-CoV-2 nas estações de tratamento de água e esgoto, os pesquisadores do artigo de Yanaç et al. (2022) realizaram uma pesquisa observando materiais sólidos de água residual. Disposto a observar as amostras de três estações de tratamento – Terminal de Tratamento Norte, Terminal de Tratamento Oeste e Terminal de Tratamento Sul de Winnipeg, cidade da província de Manitoba, Canadá – as amostras coletadas passaram por três diferentes tipos de processo de concentração do SARS-CoV-2. As amostras coletadas nas estações Estação de Tratamento de Esgoto Terminal Norte e Estação de Tratamento de Esgoto Terminal Sul tiveram seu processo de concentração por meio da ultracentrifugação, sendo as velocidades 3000G e 7500G respectivamente. A Estação de Tratamento de Esgoto Terminal Oeste foi a única que utilizou o método de floculação de leite desnatado (FLD), onde ocorre adsorção das partículas virais às proteínas de leite desnatado, para concentrar o material genético das amostras coletadas. Para a extração de RNA foi utilizado um procedimento com *RNeasy PowerMicrobiome Kit* (Qiagen Sciences Inc., Germantown, MD, USA) sendo também adicionado durante o processo Fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e β -mercaptoetanol, para promover eficácia a extração.¹² A análise de RT-qPCR foi realizada utilizando primer/probe N1 e N2, cada um específico para detecção de uma parte específica do gene nucleocapsídeo (N) do SAR-CoV-2. Foi identificado que o método que utilizava a floculação de leite desnatado, mesmo sendo a que mais demanda tempo, demonstrou maior eficácia para a detecção do SARS-CoV-2 em água residual, além de não necessitar de pré filtração, como no caso dos métodos de ultracentrifugação.¹³

DISCUSSÃO

Como visto na leitura completa de cada artigo, há pontos cruciais para avaliação das formas de extração e detecção do SARS-CoV-2 em água residual tendo como prioridade, conseguir responder na prática a questão proposta por este

trabalho.

O serviço público de abastecimento de água do Brasil deve fornecer água saudável e de boa qualidade à população. Portanto, o tratamento apenas deverá ser adotado e realizado depois de demonstrada a necessidade e, sempre que for aplicado, deverá compreender apenas os processos imprescindíveis à obtenção da qualidade de água que deseja. Analisando a qualidade e estado da água a ser tratada, a Companhia de Saneamento Ambiental do Distrito Federal (CAESB) pode destacar métodos e etapas mais completos, chamado de tratamento convencional, como também utilizar métodos mais simples, como o processo de cloração e fluoretação.¹³

A análise técnica dos trabalhos apresentados, levanta uma série de pontos para reflexão sobre os métodos de extração e detecção como abordagem sobre o tratamento de água e esgoto. Cada artigo consegue trazer de forma exemplificada a dinâmica dos processos para extração e detecção de SARS-CoV-2, de acordo com a realidade social e de infraestrutura local dos artigos estudados.

No Brasil, a detecção do SARS-CoV-2 nas estações de tratamento de água e esgoto pode ser dificultada pela forma que o tratamento de água e esgoto acontece, que conta com métodos de Coagulação, Decantação, Floculação, Filtração, Desinfecção e Fluoretação, que são todos processos que favorecem a adsorção SARS-CoV-2 na água. Visto por Corpuz et al. (2020), o processo de adsorção do SARS-CoV-2 é bastante frequente nas estações de esgoto, principalmente quando envolver etapas de floculação e coagulação, e assim contribuir como um obstáculo para detecção de partículas virais em águas tratadas.^{4, 13}

Balboa et al. (2021) traz um fator dificultante para a detecção do SARS-CoV-2 em esgoto, que é a afinidade do vírus por partículas sólidas encontradas no esgoto, como sedimento, lodo e metais pesados. Neste mesmo trabalho, é evidenciada a presença do SARS-CoV-2 nos primeiros estágios de tratamento da água por decantação porém a carga viral não é mais detectada nos estágios posteriores, reforçando a hipótese de decantação do SARS-CoV-2 no percurso inicial do tratamento de águas residuais. A forma de tratamento que a CAESB emprega favorece para os efeitos de decantação e de adsorção do SARS-CoV-2, contribuindo novamente para que os métodos de detecção do SARS-CoV-2 seja interferido quando for realizado a pesquisa de partícula viral em água residual.¹⁴

Prado et al. (2021) destaca a epidemiologia baseada em água residual como

uma ferramenta para alertar as autoridades públicas sobre novos casos de COVID-19, e assim agir de forma preventiva de forma a intervir e controlar epidemias. Também destaca, no mesmo trabalho, a importância de incorporar programas de monitoramento de água e esgoto como pauta em políticas de saúde pública. O projeto de epidemiologia baseada em água residual (EBAR), iniciado em Niterói, traz uma nova formulação de trabalho interinstitucional como ferramenta de proteção e prevenção da saúde, trabalhando sobre a identificação de casos não reportados da doença, no caso da COVID-19. Essa abordagem ambiental do monitoramento, que utiliza como ferramenta a epidemiologia baseada em água residual, auxilia a saúde pública em direcionar corretamente a atenção e recursos para promoção e prevenção da saúde, identificando áreas endêmicas onde não há notificação de casos da doença, desenvolvendo uma espécie de sistema de geoinformação.¹⁵

No presente trabalho, foram destacados diferentes métodos de extração e detecção do SARS-CoV-2, com o intuito de identificar qual seria o método mais eficaz na detecção destas partículas virais. Os pontos positivos de implementar uma epidemiologia baseada em água residual, contribuindo para a promoção da saúde pública, revelam a importância de estabelecer um método prático, econômico e replicável para a detecção de SARS-CoV-2 nas estações de tratamento de água e esgoto, levando em conta o processo de tratamento da água e o método escolhido.

Com isso, a utilização de métodos dependentes de produto químico, como o polietilenoglicol e TRIzol, apresentam a característica de ser mais barato e de execução prática. A utilização dos oligonucleotídeos gene M e gene RdRP, mostraram ser mais específico e sensível na detecção do SARS-CoV-2, configurando outra parte essencial na escolha do método a ser utilizado, a eficácia.^{9,11}

Os resultados obtidos traz à exposição o método combinado, extração dependente de produtos químicos como o PEG/TRIzol e a escolha dos oligonucleotídeos gene M (oligonucleotídeos: M-475-F; M-574R; e M-507-P) e gene RdRP (RdRP_SARSr-F2; RdRP_SARSr-R1; RdRP SARSr-P2), como possível método mais eficaz para se implementar na rotina de detecção de SARS-CoV-2 em águas residuais, para aplicação de epidemiologia baseada em água residual como abordagem ambiental.

Referências

1. UNASUS, Estudo apresenta dados sobre Impactos da COVID-19, FioCruz, 08, novembro, 2021, Disponível em: <https://www.unasus.gov.br/noticia/estudo-apresenta-dados-sobre-os-impactos-da-covid-19> Acessado em: 21/02/2023.
2. KOCAMEMI, Bilge Alpaslan *et al.* SARS-CoV-2 Detection in Istanbul Wastewater Treatment Plant Sludges. **Medrxiv**, [S.L.], p. 1-12, 16 mai. 2020. Semanal. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/2020.05.12.20099358>. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2020.05.12.20099358>. Acesso em: 08 nov. 2022.
3. AHMED, Warish *et al.* First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: a proof of concept for the wastewater surveillance of covid-19 in the community. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 728, p. 1387641-1387648, 15 abr. 2020. Mensal. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138764>. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138764>. Acesso em: 08 nov. 2022.
4. XIAO, Fei *et al.* **Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2**. 2020. Comunicado breve, GASTROENTEROLOGY. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.02.055>. Acesso em: 10 nov. 2022.
5. CORPUZ, Mary Vermi Aizza *et al.* Viruses in wastewater: occurrence, abundance and detection methods. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 745, p. 1409101-14091026, 10 jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140910>. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140910>. Acesso em: 10 nov. 2022.
6. GALVÃO, Thais Freire *et al.* Principais itens para relatar Revisões sistemáticas e Meta-análises: a recomendação prisma. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, [S.L.], v. 24, n. 2, p. 335-342, jun. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.5123/s1679-49742015000200017>. Disponível em: <https://doi.org/10.5123/S1679-49742015000200017>. Acesso em: 01 fev. 2023
7. OUZZANI, Mourad *et al.* Rayyan—a web and mobile app for systematic reviews. **Systematic Reviews**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 1-10, dez. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13643-016-0384-4>. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13643-016-0384-4>. Acesso em: 01 fev. 2023.
8. CIESIELSKI, Mark *et al.* Assessing sensitivity and reproducibility of RT-ddPCR and RT-qPCR for the quantification of SARS-CoV-2 in wastewater. **Journal Of Virological Methods**. Virgínia, p. 1142301-1142308. 03 jul. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114230>. Acesso em: 01 nov. 2022.]
9. POURAKBAR, Mojtaba *et al.* Comprehensive investigation of SARS-CoV-2 fate in wastewater and finding the virus transfer and destruction route through conventional activated sludge and sequencing batch reactor. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 806, p. 1513911-1513919, 29 out. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151391>. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151391>. Acesso em: 01 nov. 2022
10. HASAN, Shadi W. *et al.* Detection and quantification of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and treated effluents: surveillance of covid-19 epidemic in the united arab emirates. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 764, p. 142929, 19 out. 2020. Mensal. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142929>. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142929>. Acesso em: 01 nov. 2022.
11. LAB. PROTOZOLOGIA – IMT – FMUSP (São Paulo). Imt. **Protocolo de extração de RNA de amostras conservadas em TriZol**. Disponível em: <https://www.imt.usp.br/wp-content/uploads/proto/protocolos/extracaoRNA.pdf>. Acesso em: 08 dez. 2022
12. WESTHAUS, Sandra *et al.* Detection of SARS-CoV-2 in raw and treated wastewater in Germany – Suitability for COVID-19 surveillance and potential transmission risks. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 751, p. 1417501-14175012, jan. 2021. Mensal. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141750>. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141750>. Acesso em: 01 nov. 2022

13. YANAÇ, Kadir *et al.* Detection of SARS-CoV-2 RNA throughout wastewater treatment plants and a modeling approach to understand COVID-19 infection dynamics in Winnipeg, Canada. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 825, p. 1539061-15390612, jun. 2022. Mensal. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153906>. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153906>. Acesso em: 01 nov. 2022
14. CAESB. Distrito Federal, Caesb. **Como a Água é Tratada?** 2020. Disponível em: <https://www.caesb.df.gov.br/como-a-agua-e-tratada.html>. Acesso em: 12 dez. 2022
15. BALBOA, Sabela *et al.* The fate of SARS-CoV-2 in WWTPS points out the sludge line as a suitable spot for detection of COVID-19. **Science Of The Total Environment**, DF, Brasil, v. 772, p. 1452681-1452687, 14 jan. 2021. Mensal. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145268>. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145268>. Acesso em: 21 jan. 2023.
16. PRADO, Tatiana *et al.* Wastewater-based epidemiology as a useful tool to track SARS-CoV-2 and support public health policies at municipal level in Brazil. **Water Research**, RJ, Brasil, v. 191, p. 1168101-11681011, 04 jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2021.116810>. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2021.116810>. Acesso em: 21 jan. 2023

ANEXO I – Submissão do artigo à revista Caderno de Saúde Pública – CSP

08/02/2023 16:08

SAGAS

O novo artigo foi submetido com sucesso!

Login: 07012150114

[Português](#) [English](#) [Español](#)



SAGAS

Sistema de Avaliação e Gerenciamento de Artigos
Cadernos de Saúde Pública / Reports in Public Health

[Início](#) [Autor](#) [Consultor](#) [Editor](#) [Mensagens](#) [Sair](#)

CSP_0236/23

Arquivos	Versão 1 [Resumo]
Seção	Artigo
Data de submissão	08 de Fevereiro de 2023
Título	Análise da eficácia dos métodos de detecção de SARS-Cov-2 em águas residuais: Revisão sistemática
Título corrido	Revisão Sistemática
Área de Concentração	Epidemiologia
Palavras-chave	SARS-Cov-2, Epidemiology, Wastewater, detection, RT-PCR
Fonte de Financiamento	Nenhum
Conflito de Interesse	Nenhum
Condições éticas e legais	Não se aplica (estudo não envolve pesquisa com seres humanos ou animais).
Registro Ensaio Clínico	Nenhum
Sugestão de consultores	Eduardo Antônio Ferreira <eduardoferreira@unb.br> Rodrigo Haddad <haddad@unb.br>
Autores	Jonathas Pereira Lanna da costa (Universidade de Brasília) <jonathasp.lanna@gmail.com>
STATUS	<i>Com Secretaria Editorial</i>

© Cadernos de Saúde Pública, ENSP, FIOCRUZ - 2023

ANEXO II – NORMAS DA REVISTA Caderno de Saúde Pública – CSP

Instruções aos autores

Forma e preparação de manuscritos

Cadernos de Saúde Pública/Reports in Public Health (CSP) publica artigos originais com elevado mérito científico que contribuem com o estudo da saúde pública em geral e disciplinas afins. Desde janeiro de 2016, a revista adota apenas a versão on-line, em sistema de publicação continuada de artigos em periódicos indexados na base SciELO. Recomendamos aos autores a leitura atenta das instruções antes de submeterem seus artigos a CSP.

Como o resumo do artigo alcança maior visibilidade e distribuição do que o artigo em si, indicamos a leitura atenta da recomendação específica para sua elaboração. ([leia mais](#)).

1. CSP aceita trabalhos para as seguintes seções:

- 1.1. Perspectivas: análises de temas conjunturais, de interesse imediato, de importância para a Saúde Coletiva (máximo de 2.200 palavras);
 - 1.2. Debate: análise de temas relevantes do campo da Saúde Coletiva, que é acompanhado por comentários críticos assinados por autores a convite das Editoras, seguida de resposta do autor do artigo principal (máximo de 6.000 palavras e 5 ilustrações);
 - 1.3. Espaço Temático: seção destinada à publicação de 3 a 4 artigos versando sobre tema comum, relevante para a Saúde Coletiva. Os interessados em submeter trabalhos para essa Seção devem consultar as Editoras;
 - 1.4. Revisão: revisão crítica da literatura sobre temas pertinentes à Saúde Coletiva, máximo de 8.000 palavras e 5 ilustrações. Toda revisão sistemática deverá ter seu protocolo publicado ou registrado em uma base de registro de revisões sistemáticas como por exemplo o PROSPERO; as revisões sistemáticas deverão ser submetidas em inglês ([leia mais](#)) ([Editorial 37\(4\)](#));
 - 1.5. Ensaio: texto original que desenvolve um argumento sobre temática bem delimitada, podendo ter até 8.000 palavras ([leia mais](#));
 - 1.6. Questões Metodológicas ([leia mais](#)): artigos cujo foco é a discussão, comparação ou avaliação de aspectos metodológicos importantes para o campo, seja na área de desenho de estudos, análise de dados ou métodos qualitativos (máximo de 6.000 palavras e 5 ilustrações); artigos sobre instrumentos de aferição epidemiológicos devem ser submetidos para esta Seção, obedecendo preferencialmente as regras de Comunicação Breve (máximo de 2.200 palavras e 3 ilustrações);
 - 1.7. Artigo: resultado de pesquisa de natureza empírica (máximo de 6.000 palavras e 5 ilustrações). Dentro dos diversos tipos de estudos empíricos, apresentamos dois exemplos: artigo de pesquisa etiológica ([leia mais](#)) na epidemiologia ([Editorial 37\(5\)](#)) e artigo utilizando metodologia qualitativa ([leia mais](#));
 - 1.8. Comunicação Breve: relatando resultados preliminares de pesquisa, ou ainda resultados de estudos originais que possam ser apresentados de forma sucinta (máximo de 2.200 palavras e 3 ilustrações);
 - 1.9. Cartas: comentário a artigo publicado em fascículo anterior de CSP (máximo de 1.400 palavras);
 - 1.10. Resenhas: Análise crítica de livro relacionado ao campo temático de CSP, publicado nos últimos dois anos (máximo de 1.400 palavras). As resenhas devem conter título e referências bibliográficas. A resenha contempla uma análise da obra no conjunto de um campo em que a mesma está situada, não se restringe a uma apresentação de seu conteúdo, quando obra única, ou de seus capítulos, quando uma obra organizada. O esforço é contribuir com a análise de limites e contribuições, por isto podem ser necessários acionamentos a autores e cenários políticos para produzir a análise, a crítica e a apresentação da obra. O foco em seus principais conceitos, categorias e análises pode ser um caminho desejável para a contribuição da resenha como uma análise crítica, [leia o Editorial 37\(10\)](#).
- Obs: A política editorial de CSP é apresentada por meio dos editoriais. Recomendamos fortemente a leitura dos seguintes textos: [Editorial 29\(11\)](#), [Editorial 32\(1\)](#) e [Editorial 32\(3\)](#).

2. Normas para envio de artigos

- 2.1. CSP publica somente artigos inéditos e originais, e que não estejam em avaliação em nenhum outro periódico simultaneamente. Os autores devem declarar essas condições no processo de submissão. Caso seja identificada a publicação ou submissão simultânea em outro periódico o artigo será desconsiderado. A submissão simultânea de um artigo científico a mais de um periódico constitui grave falta de ética do autor.
- 2.2. Não há taxas para submissão e avaliação de artigos.
- 2.3. Serão aceitas contribuições em Português, Inglês ou Espanhol.
- 2.4. Notas de rodapé, de fim de página e anexos não serão aceitos.
- 2.5. A contagem de palavras inclui somente o corpo do texto e as referências bibliográficas, conforme item 2.12.
- 2.6. Todos os autores dos artigos aceitos para publicação serão automaticamente inseridos no banco de consultores de CSP, se comprometendo, portanto, a ficar à disposição para avaliarem artigos submetidos nos temas referentes ao artigo publicado.
- 2.7. Serão aceitos artigos depositados em servidor de *preprint*, previamente à submissão a CSP ou durante o processo de avaliação por pares. É necessário que o autor informe o nome do servidor e o DOI atribuído ao artigo por meio de formulário específico (contatar cadernos@fiocruz.br). NÃO recomendamos a publicação em servidor de *preprint* de artigo já aprovado.

3. Publicação de ensaios clínicos

- 3.1. Artigos que apresentem resultados parciais ou integrais de ensaios clínicos devem obrigatoriamente ser acompanhados do número e entidade de registro do ensaio clínico.
- 3.2. Essa exigência está de acordo com a recomendação do Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde (BIREME)/Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS)/Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre o Registro de Ensaios Clínicos a serem publicados a partir de orientações da OMS, do International Committee of Medical

ANEXO II - NORMAS DA REVISTA Caderno de Saúde Pública – CSP

Journal Editors (ICMJE) e do Workshop ICTPR.

3.3. As entidades que registram ensaios clínicos segundo os critérios do ICMJE são:

[Australian New Zealand Clinical Trials Registry \(ANZCTR\)](#)
[ClinicalTrials.gov](#)
[International Standard Randomised Controlled Trial Number \(ISRCTN\)](#)
[Netherlands Trial Register \(NTR\)](#)
[UMIN Clinical Trials Registry \(UMIN-CTR\)](#)
[WHO International Clinical Trials Registry Platform \(ICTRP\)](#)

4. Fontes de financiamento

4.1. Os autores devem declarar todas as fontes de financiamento ou suporte, institucional ou privado, para a realização do estudo.

4.2. Fornecedores de materiais ou equipamentos, gratuitos ou com descontos, também devem ser descritos como fontes de financiamento, incluindo a origem (cidade, estado e país).

4.3. No caso de estudos realizados sem recursos financeiros institucionais e/ou privados, os autores devem declarar que a pesquisa não recebeu financiamento para a sua realização.

5. Conflito de interesses

5.1. Os autores devem informar qualquer potencial conflito de interesse, incluindo interesses políticos e/ou financeiros associados a patentes ou propriedade, provisão de materiais e/ou insumos e equipamentos utilizados no estudo pelos fabricantes.

6. Colaboradores

6.1. Devem ser especificadas quais foram as contribuições individuais de cada autor na elaboração do artigo.

6.2. Lembramos que os critérios de autoria devem basear-se nas deliberações do ICMJE, que determina o seguinte: o reconhecimento da autoria deve estar baseado em contribuição substancial relacionada aos seguintes aspectos: 1.

Concepção e projeto ou análise e interpretação dos dados; 2. Redação do artigo ou revisão crítica relevante do conteúdo intelectual; 3. Aprovação final da versão a ser publicada. 4. Ser responsável por todos os aspectos do trabalho na garantia da exatidão e integridade de qualquer parte da obra. Essas quatro condições devem ser integralmente atendidas.

6.3. Todos os autores deverão informar o número de registro do ORCID no cadastro de autoria do artigo. Não serão aceitos autores sem registro.

6.4. Os autores mantêm o direito autoral da obra, concedendo à publicação CSP o direito de primeira publicação, conforme a Licença Creative Commons do tipo atribuição BY (CC-BY).

6.5. Recomendamos a leitura do [Editorial 34\(11\)](#) que aborda as normas e políticas quanto à autoria de artigos científicos em CSP.

7. Agradecimentos

7.1. Possíveis menções em agradecimentos incluem instituições que de alguma forma possibilitaram a realização da pesquisa e/ou pessoas que colaboraram com o estudo, mas que não preencheram os critérios de coautoria.

8. Referências

8.1. As referências devem ser numeradas de forma consecutiva de acordo com a ordem em que forem sendo citadas no texto. Devem ser identificadas por números arábicos sobrescritos (p. ex.: Silva ¹). As referências citadas somente em tabelas e figuras devem ser numeradas a partir do número da última referência citada no texto. As referências citadas deverão ser listadas ao final do artigo, em ordem numérica, seguindo as normas gerais dos [Requisitos Uniformes para Manuscritos Apresentados a Periódicos Biomédicos](#). Não serão aceitas as referências em nota de rodapé ou fim de página.

8.2. Todas as referências devem ser apresentadas de modo correto e completo. A veracidade das informações contidas na lista de referências é de responsabilidade do(s) autor(es).

8.3. No caso de usar algum software de gerenciamento de referências bibliográficas (p. ex.: EndNote), o(s) autor(es) deverá(ão) converter as referências para texto.

9. Nomenclatura

9.1. Devem ser observadas as regras de nomenclatura zoológica e botânica, assim como abreviaturas e convenções adotadas em disciplinas especializadas.

10. Ética em pesquisas envolvendo seres humanos

10.1. A publicação de artigos que trazem resultados de pesquisas envolvendo seres humanos está condicionada ao cumprimento dos princípios éticos contidos na Declaração de Helsinki (1964, reformulada em 1975, 1983, 1989, 1996, 2000 e 2008), da Associação Médica Mundial.

10.2. Além disso, deve ser observado o atendimento a legislações específicas (quando houver) do país no qual a pesquisa foi realizada, informando protocolo de aprovação em Comitê de Ética quando pertinente. Essa informação deverá constituir o último parágrafo da seção Métodos do artigo.

10.3. Artigos que apresentem resultados de pesquisas envolvendo seres humanos deverão conter uma clara afirmação deste cumprimento (tal afirmação deverá constituir o último parágrafo da seção Métodos do artigo).

10.4. CSP é filiado ao COPE (Committee on Publication Ethics) e adota os preceitos de integridade em pesquisa recomendados por esta organização. Informações adicionais sobre integridade em pesquisa leia [Editorial 34\(1\)](#) e [Editorial 38\(1\)](#).

10.5. O Conselho Editorial de CSP se reserva o direito de solicitar informações adicionais sobre os procedimentos éticos executados na pesquisa.