



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
CENTRO DE FORMAÇÃO INTERDISCIPLINAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SOCIEDADE, AMBIENTE E
QUALIDADE DE VIDA**

JOSCIANE CARNEIRO OLIVEIRA

**DETECÇÃO E MONITORAMENTO DO SARS-COV-2 EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS
EM SANTARÉM, PARÁ**

**SANTARÉM – PA
2022**

JOSCIANE CARNEIRO OLIVEIRA

**DETECÇÃO E MONITORAMENTO DO SARS-COV-2 EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS
EM SANTARÉM, PARÁ**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Sociedade, Ambiente e Qualidade de Vida da Universidade Federal do Oeste do Pará, em cumprimento às exigências para obtenção do título de mestre; Área de avaliação “Interdisciplinar”.

Orientador: Prof. Dr. Israel Nunes Henrique
Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Prado Lima

**SANTARÉM - PA
2022**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA

- O48d Oliveira, Josciane Carneiro
Detecção e monitoramento do SARS-COV-2 em águas residuárias em Santarém,
Pará. / Josciane Carneiro Oliveira. – Santarém, 2022.
77 p. : il.
Inclui bibliografias.
- Orientador: Israel Nunes Henrique
Coorientador: Marcos Prado Lima
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós Graduação e Inovação Tecnológica, Programa de Pós-Graduação em Sociedade, Ambiente e Qualidade de Vida.
1. Pandemia. 2. Epidemiologia das águas residuárias. 3. COVID-19. I. Henrique, Israel Nunes, *orient.* II. Lima, Marcos Prado, *corrient.* III. Título.

CDD: 23 ed. 616.2414

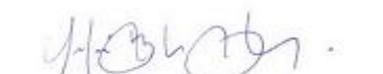


UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA
CENTRO DE FORMAÇÃO INTERDISCIPLINAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SOCIEDADE, AMBIENTE E QUALIDADE DE VIDA

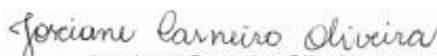
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

No nono dia do mês de março do ano de dois mil e vinte e dois, às catorze horas, por meio remoto [Link da videochamada: <https://meet.google.com/avg-qfz-dho>], instalou-se a banca examinadora de dissertação de mestrado da Discente **Josciane Carneiro Oliveira**. A banca examinadora foi composta pelos professores: Dr. André Bezerra dos Santos, Examinador Externo a Instituição, UFC, Dr. Maxwell Barbosa de Santana, Examinador Interno, Dr. Israel Nunes Henrique, orientador da discente. Deu-se início a abertura dos trabalhos por parte do professor, Israel Nunes Henrique, presidente da banca que, após apresentar os membros da banca examinadora e esclarecer a tramitação da defesa, solicitou a discente que iniciasse a apresentação da dissertação, intitulada "Detecção e Monitoramento do Sars-Cov-2 em Águas Residuárias em Santarém, Pará", marcando um tempo de quarenta minutos para a apresentação. Concluída a apresentação, o professor Israel Nunes Henrique, passou a palavra aos examinadores para arguir a discente. Terminadas as arguições, o presidente da banca solicitou aos presentes que se retirassem da sala, para a realização do julgamento do trabalho, concluindo a Banca Examinadora por sua Aprovação, conforme as normas vigentes na Universidade Federal do Oeste do Pará. A versão final da dissertação deverá ser entregue ao programa, no prazo máximo de sessenta dias, contendo as modificações sugeridas pela banca examinadora. Conforme o Artigo 57 do Regimento Interno do Programa, a discente não terá o título se não cumprir as exigências acima.


Prof. Dr. Israel Nunes Henrique
Presidente


Prof. Dr. André Bezerra dos Santos
Membro Externo - UFB


Prof. Dr. Maxwell Barbosa de Santana
Membro Interno


Josciane Carneiro Oliveira
Discente

À Deus que me deu forças e não me deixou fraquejar e a minha família que sempre me apoiou e acreditou em mim, em especial ao meu pai João Batista (*in memoriam*), com todo o meu amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus por ter me guiado e ser o meu porto seguro durante a minha pesquisa.

Agradeço também aos meus filhos Yuri e Ana Caroline pelo carinho, ao meu marido José Maria pela paciência e incentivo nos meus estudos, a minha mãe Ana Maria, meu pai (*in memoriam*) e irmãos que me incentivaram de todas as maneiras e sempre me apoiaram em todos os momentos.

Agradeço ao meu orientador professor Israel, pelas palavras de incentivos, pelos conhecimentos repassados, pela paciência e credibilidade, e também ao meu coorientador professor Marcos Prado pela disponibilidade e dedicação.

A toda equipe do Laboratório de Tratamento de Águas Residuárias e do Laboratório de Biologia Molecular os meus sinceros agradecimentos pela parceria e conhecimento.

À Instituição UFOPA pela oportunidade dada através do PPGSAQ de obter o título de mestre, e por todo o suporte com todos os materiais necessários para a realização da pesquisa e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pela concessão de bolsa.

RESUMO

Os vírus são partículas infecciosas, altamente adaptáveis e capazes de infectar diferentes tecidos humanos, como o SARS-CoV-2, (Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2) responsável pela doença COVID-19. Diante do exposto, objetivou-se monitorar e identificar a presença SARS-COV-2 em águas residuárias em pontos estratégicos, com uso de método analítico, rápido e preciso. O estudo ocorreu na área urbana de Santarém em três pontos amostrais para coleta de águas residuais: (i) EEE do Residencial Salvação (ii) Poço úmido ETE Irurá e (iii) ETE do Hospital Regional. A coleta ocorreu de forma manual, onde a cada 12 minutos coletou-se 500 ml durante 4 h, e no final obteve-se 2L de amostra composta. As análises ocorreram paralelamente com as coletas quinzenalmente no período de março a setembro de 2021, totalizando 13 determinações. No Laboratório de Tratamento de Águas Residuárias foram analisados os parâmetros físico-químico das amostras (Temperatura; pH; Alcalinidade; Oxigênio Dissolvido; Fósforo; Sólidos; Nitrogênio, Amônia; Demanda Química de Oxigênio, Nitrito e Nitrato) e submetidas aos métodos analíticos do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. No Laboratório de Biologia Molecular as amostras passaram por quatro etapas: concentração do vírus pelo método de filtração por membrana eletronegativa MCE hidrofílica (0.45- μ m-pore-size); extração do RNA com o kit comercial *Maxwell RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit*, detecção e quantificação do vírus por meio de reação Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da DNA polimerase (PCR) em tempo real realizada no equipamento 7500 Real Time PCR System, no qual utilizou-se o kit comercial *Kit Molecular SARS-CoV-2 (E/RP) Bio-Manguinhos*. As águas residuárias das três estações de tratamento apresentaram características físico-química peculiares para a diminuição do vírus, como a temperatura, a DQO e os sólidos. A aplicação qualitativa para a detecção da molécula de RNA do vírus SARS-CoV-2 foi para o diagnóstico positivo ou negativo (+/-) e quantitativa para a quantificação absoluta (carga viral/nº cópias). O vírus foi detectado em 24% das amostras, com maior número de amostras positivas no hospital, não houve presença na ETE, e apenas uma amostra foi positiva na EEE. O estudo constatou que é possível realizar o monitoramento epidemiológico baseado em águas residuárias para a detecção da carga viral do vírus SARS-CoV-2 em pontos estratégicos de esgotamento sanitário.

Palavras chaves: Pandemia. Epidemiologia em águas residuárias. COVID-19.

ABSTRACT

Viruses are infectious particles, highly adaptable and capable of infecting different human tissues, such as SARS-CoV-2, (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) responsible for the disease COVID-19. In view of the above, the aim was to monitor and identify the presence of SARS-COV-2 in wastewater at strategic points, using a rapid and accurate analytical method. The study occurred in the urban area of Santarem at three sampling points for wastewater collection: (i) EEE of Residencial Salvação (ii) ETE Irurá wet well and (iii) ETE of Hospital Regional. The collection occurred manually, where 500 ml was collected every 12 minutes for 4 h, and at the end 2L of composite sample was obtained. The analyses occurred in parallel with the biweekly collections in the period from March to September 2021, totaling 13 determinations. In the Laboratory of Wastewater Treatment the physical-chemical parameters of the samples were analyzed (Temperature, pH, Alkalinity, Dissolved Oxygen, Phosphorus, Solids, Nitrogen, Ammonia, Chemical Oxygen Demand, Nitrite, and Nitrate) and submitted to the analytical methods of the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. In the Molecular Biology Laboratory the samples went through four steps: virus concentration by the hydrophilic MCE electronegative membrane filtration method (0.45- μ m-pore-size membrane filtration method); RNA extraction with the commercial Maxwell RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, detection and quantification of the virus by reverse transcription reaction and real-time DNA polymerase chain reaction (PCR) performed in the 7500 Real Time PCR System equipment, which used the commercial Bio-Manguinhos SARS-CoV-2 (E/RP) Molecular Kit. The wastewater from the three treatment plants presented peculiar physical-chemical characteristics for virus reduction, such as temperature, COD, and solids. The qualitative application for the detection of the SARS-CoV-2 virus RNA molecule was for positive or negative diagnosis (+/-) and quantitative for absolute quantification (viral load/number of copies). The virus was detected in 24% of samples, with the highest number of positive samples in the hospital, there was no presence in the TEE, and only one sample was positive in the EEE. The study found that it is possible to perform wastewater-based epidemiological monitoring for the detection of the SARS-CoV-2 viral load at strategic points of sewage disposal.

Keywords: Pandemic Epidemiology in wastewater. COVID-19.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informações de dimensionamento da Estação de Esgoto de Tratamento do Irurá..	29
Tabela 2 - Determinações realizadas por pontos das amostras águas residuárias mensais no ano de 2021.....	31
Tabela 3 - Determinações realizadas em cada ponto amostral de água residuárias.....	34
Tabela 4 - Parâmetros Físicos e Químicos e os respectivos métodos utilizados.....	34
Tabela 5 - Reagentes utilizados para mix.....	39
Tabela 6 - Sequências de iniciadores e sondas utilizados na RT- qPCR em tempo real para o novo coronavírus.....	40
Tabela 7 - Reagentes fornecidos e utilizados para a mistura E/RP.....	40
Tabela 8 - Critérios para aceitação do Controle Negativo e do Controle Positivo.....	42
Tabela 9 - Interpretação do resultado para detecção ou não detecção dos alvos E/RP.....	42
Tabela 10 - Interpretação do resultado para os alvos E/RP.....	42
Tabela 11 - Valores médios e desvios padrão dos Sólidos Totais e Suspensos registrados na EEE, ETE, HRBA.....	53
Tabela 12 - Resultados dos controles Negativo e Positivo.....	54
Tabela 13 – Carga viral dos alvos E/RP detectada nas amostras de água residuária.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo da partícula viral e do genoma b-coronavírus. A: partícula viral; B: genoma viral.....	17
Figura 2 - Esquema representativo do período de detecção do RNA viral e dos anticorpos em indivíduos infectados com o SARS-CoV-2.....	17
Figura 3 - Esquema ilustrativo com outras possíveis rotas de transmissão do SARS-CoV-2..	19
Figura 4 - Fluxograma explicativo das características, físicas, químicas e biológicas do esgoto.....	24
Figura 5 - Mapa de localização dos pontos de coleta e do local do experimento das amostras de águas residuárias.....	28
Figura 6 - Procedimento realizado para a coleta de água residuária nos pontos amostrais. A: Amostra composta; B: Conservação da amostra; C: Amostra final; D: Descarte das amostras composta.....	33
Figura 7 - Sistema de filtração a vácuo utilizado para a concentração viral das amostras de águas residuárias.....	37
Figura 8 - Processo realizado após a filtração das amostras. A: Membrana concentrada; B: Picotamento da membrana; C: Membrana dentro de um micro tubo (<i>ependorf</i>) de 2 ml.....	37
Figura 9 - Processo de eluição viral realizado nas amostras após a concentração viral. A: ressuspensão do material; B: Separação do material por centrifugação.	38
Figura 10 - Equipamento utilizado para a extração do RNA do SARS-CoV-2 das amostras de água residuárias.....	39
Figura 11 - <i>Box-plot</i> dos valores de temperatura registrados na EEE, ETE, HRBA.....	45
Figura 12 - <i>Box-plot</i> dos valores de pH registrados na EEE, ETE, HRBA.....	46
Figura 13 - <i>Box-plot</i> das concentrações de Alcalinidade Total registrados na EEE, ETE, HRBA.....	47
Figura 14 - <i>Box-plot</i> das concentrações de AGV registrados na EEE, ETE, HRBA.....	48
Figura 15 - <i>Box-plot</i> das concentrações de Fósforo Total registrados na EEE, ETE, HRBA..	49
Figura 16 - <i>Box-plot</i> das concentrações de Ortofosfato solúvel registrados na EEE, ETE, HRBA.....	49
Figura 17 - <i>Box-plot</i> das concentrações de DQO Total registrados na EEE, ETE, HRBA.....	50
Figura 18 - <i>Box-plot</i> das concentrações de concentrações de DQO Filtrada registrados na EEE, ETE, HRBA.....	50

Figura 19 - <i>Box-plot</i> dos valores da Amônia registrados na EEE, ETE, HRBA.....	51
Figura 20 - <i>Box-plot</i> das concentrações de Nitrato registrados na EEE, ETE, HRBA.....	52
Figura 21 - <i>Box-plot</i> das concentrações de Nitrito registrados na EEE, ETE, HRBA.....	53
Figura 22 - Gráfico de quantificação do material genético de PCR em termociclador em Tempo Real.....	55
Figura 23 - Gráfico de comparação dos alvos E/RP nas amostras de água residuárias coletadas na ETE, HRBA e ETE.....	56
Figura 24 - Gráfico de porcentagens para a presença e ausência do vírus SARS-CoV-2 nas amostras de água residuárias coletadas na ETE, HRBA e ETE.....	57
Figura 25 - Percentuais das amostras dos três pontos amostrais, que testaram positivo e negativo para ocorrência do novo coronavírus nos respectivos períodos de monitoramento...	58
Figura 26 - Gráficos das concentrações do RNA viral (SARS-CoV-2) determinadas no esgoto, para o alvo E referentes às amostras que foram positivas durante os meses de monitoramento em águas residuárias no município de Santarém.....	61
Figura 27 - Gráfico dos números de casos confirmados no município de Santarém durante o período de coleta das amostras de águas residuárias.....	62
Figura 28 – Gráfico da quantidade de leitos disponíveis para pacientes infectados pelo vírus da COVID-19 no HRBA no período de coleta das amostras de águas residuárias.....	63
Figura 29 - Gráfico do total de leitos no HRBA no período de coleta das amostras de águas residuárias.....	64
Figura 30 - Gráfico dos dados clínicos da COVID-19 no HRBA no período de coleta das amostras de águas residuárias. A: Números de casos positivos; B :Casos suspeitos.....	64
Figura 31 - Carga de RNA (número de cópias por dia) do SARS-CoV-2 no esgoto bruto afluente à ETE do HRBA.....	66

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	Objetivo geral.....	15
2.2	Objetivos específicos.....	15
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
3.1	Os vírus SARS-CoVs.....	15
3.2	Vias de transmissão do vírus SARS-CoV-2.....	18
3.3	Fontes de SARS-CoVs em águas residuais.....	20
3.4	Sobrevivência de SARS-CoVs em água e esgoto e as variáveis ambientais.....	21
3.5	Deteccção do vírus SARS-CoV-2 em água residuária.....	22
3.6	Sistema de esgotamento sanitário no Brasil.....	23
3.7	Caracterização do esgoto.....	23
3.8	Monitoramento epidemiológico a partir do esgoto no mundo e no brasil.....	25
4	METODOLOGIA.....	27
4.1	Área de estudo.....	27
4.2	4.2 Caracterização dos pontos amostrais.....	28
4.2.1	Estação de Tratamento de Esgoto do Irurá (ETE).....	29
4.2.2	Estação Elevatória de Esgoto do Residencial Salvação (EEE).....	30
4.2.3	Hospital Regional.....	30
4.3	Procedimentos da coleta das amostras de água residuárias.....	31
4.3.1	Caracterização do local da coleta e das amostras de água residuárias.....	32
4.4	Análises físico-químicas das amostras de água residuárias.....	34
4.5	Análises biológicas das amostras de água residuárias	35
4.5.1	Concentração viral.....	35
4.5.2	Eluição viral.....	37
4.5.3	Extração do RNA viral.....	38
4.5.4	Deteccção e quantificação do SARS-CoV-2 por RT-qPCR.....	40
4.5.5	Estimativa da população infectada.....	42
4.6	Medidas de biossegurança.....	43
4.7	Análise estatística.....	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	44

5.1	Caracterização Física e Química das amostras de água residuária.....	44
5.2	Concentração de SARS-CoV-2 em águas residuais.....	54
5.2.1	Controles.....	54
5.2.2	Amplificações da PCR.....	55
5.3	Resultados qualitativos.....	56
5.4	Resultados quantitativos.....	58
5.5	Concentração de RNA viral do SARS-CoV-2 por reação.....	60
5.6	Comparação com a concentração viral detectada nos pontos amostrais com os índices de saúde pública no município de Santarém.....	62
5.7	Estimativa populacional de infectados com o coronavírus.....	66
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68
	REFERÊNCIAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

O SARS-CoV-2 é um vírus identificado como a causa de um surto da doença respiratória, detectado pela primeira vez em Wuhan - China em dezembro de 2019. Em 30 de janeiro de 2020, foi declarado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) o surto da doença causada pelo novo coronavírus (COVID-19) em caráter de Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional.

No Brasil, em 03 de fevereiro de 2020, o Ministério da Saúde/Gabinete do Ministro, por meio da Portaria nº 188, declara Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional em decorrência da infecção humana pelo novo coronavírus. E em decorrência do aumento acelerado e a rápida expansão do novo coronavírus em outros países, a OMS declarou como pandemia a doença causada pelo COVID-19.

Milhares de indivíduos no mundo todo já foram infectados pela Covid-19. Portanto, compreende-se que a doença está em constante expansão através de transmissões entre os seres humanos, na qual ocorre principalmente pela via respiratória, através de gotículas expelidas pela pessoa contaminada, e pelo contato, uma vez que essas gotículas podem se depositar sobre superfícies (nas quais o vírus permanece viável durante um período de tempo) com as quais outras pessoas podem ter contato.

Semelhantemente, foi detectado material genético do SARS-CoV-2 em amostras de esgotos provenientes do Aeroporto Amsterdã-Schiphol, Holanda, bem como em amostras das Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) das cidades de Kaatsheuvel e de Tilburg, Holanda, após duas semanas da confirmação do primeiro paciente com COVID-19 (Randazzo et al., 2020b). Em março de 2020 o INCT – ETEs Sustentáveis Brasileiro divulgou uma nota técnica alertando para os efeitos da presença do coronavírus no esgoto.

De acordo com o texto, a possibilidade da transmissão fecal-oral do vírus Sars-CoV-2 têm várias implicações, especialmente em áreas carentes de infraestrutura de saneamento básico (coleta e tratamento). Esgoto sem o adequado tratamento degrada a qualidade das águas receptoras com forte impacto na saúde da população ao comprometer os usos a jusante, como abastecimento humano, balneabilidade e irrigação, dentre outros.

Uma realidade preocupante, se tratando de Brasil, é que apenas 46% dos esgotos gerados recebem tratamento adequado. Ainda os dados do Sistema Nacional de Informações Sobre Saneamento (SNIS) mostram que os índices relativos à coleta e tratamento de esgotos são bastante variados regionalmente. Nas regiões Norte e Nordeste, respectivamente, os

percentuais referentes à existência de rede coletora são de 13,0% e 34,8%, e correspondem aos mais baixos do país. Por outro lado, observa-se uma elevação desses percentuais nas regiões Sul (50,6%), Centro-Oeste (59,5%) e Sudeste (83,2%).

Contudo, a falta de saneamento no país, visto que existe desigualdades entre as regiões brasileiras, pode não ser um fator primário para o aumento de casos da COVID-19, porém é uma realidade que não deve ser ignorado, pois outras doenças encontram nesse déficit as circunstâncias favoráveis de proliferação.

Portanto, desde que o novo coronavírus foi reconhecido, vários relatórios sobre a apresentação clínica da epidemiologia e estratégias de tratamento vem sendo publicadas. A epidemiologia baseada em águas residuais representa uma estratégia atraente para vigiar a evolução da circulação do vírus nas populações, pois pode ser uma via importante de contágio, facilitando a transmissão fecal-oral (HOLSHUE et al., 2020; MAO et al., 2020).

Nessa perspectiva, pesquisadores da Cranfield University no Reino Unido, estão trabalhando em um novo teste para detectar o SARS-CoV-2 nas águas residuárias das comunidades infectadas pelo vírus. Os autores afirmam que uma abordagem epidemiológica baseada em águas residuárias pode fornecer uma maneira rápida e eficaz de prever a possível propagação de novas pneumonias por coronavírus (MAO et al., 2020).

Para tal, utilizam biomarcadores nas fezes e na urina dos portadores de doenças que entram no sistema de esgoto, através de Kits de testes rápidos, usando dispositivos analíticos baseados em papel, que detectam em tempo real a presença do SARS-CoV-2 no esgoto, permitindo triagem simples e imediata, assegurando a quarentena e prevenção pelos órgãos de saúde.

Também se alerta para a descoberta do vírus nos esgotos tornando viável prevenir futuras pandemias, uma vez que a partir da detecção do novo vírus ou de outros patógenos nas águas residuárias, é possível rapidamente alertar as autoridades de saúde e saneamento local, evitando ou atenuando a proliferação de doenças infecciosas (BRASIL, 2020).

O aumento de casos de infectados vem se expandindo no mundo, e no Brasil a situação não é diferente, e como consequência, os leitos nas unidades de saúde estão se esgotando e os sistema de saúde pública entrando em colapso. Mesmo com medidas rígidas e decretos estabelecidos em cada estado, casos de infectados e mortes permanecem em alta em maior parte do território brasileiro.

A situação epidemiológica da Covid-19 no Brasil é de 26.533.010 casos acumulados até o dia 06 de fevereiro de 2022, bem como o número de óbitos é de 632.193. No Pará, nesta

mesma data, identificou-se 664.513 casos confirmados e 17.441 óbitos acumulados. Em Santarém, os números de infectados pelo SARS-COV-2 ultrapassaram 34.734 casos com 1.236 óbitos confirmados, segundo o painel de monitoramento (MS,2022; SESP, 2022; SEMSA,2022).

A rede hospitalar de Santarém conta com o Hospital Regional do Baixo Amazonas que é referência no tratamento de doenças crônicas, e, na atual situação de pandemia, vem dando suporte no tratamento emergencial para pacientes com coronavírus, no município, bem como em toda a região Oeste do Pará.

Com a pandemia e o aumento de internações de pacientes com COVID-19, o governo estadual, em janeiro de 2021, ampliou a unidade com novos leitos, exclusivos para pacientes com o novo coronavírus. A cobertura desse suporte de atendimento é voltada à população residente em 30 municípios do Oeste do Pará, Baixo Amazonas e Xingu.

Na sustentação dos dados acima, é relevante para um projeto de pesquisa, voltado para o monitoramento do vírus SARS – CoV-2 e o seu potencial de transmissão em águas residuárias produzidas pela população, com a finalidade de fornecer indicadores microbiológicos e georreferenciais que direcionem ações de combate a disseminação do COVID-19.

Conseqüentemente, a epidemiologia baseada em águas residuais pode contribuir para identificar curvas de contágio, comunidades infectadas e contribuições de assintomáticos, de modo a fomentar sistemas de alerta rápido para a presença de cargas virais. Quanto a vigilância em saúde, os resultados poderão subsidiar mapas de contágio e a conseqüente mobilização de recursos e profissionais para regiões prioritárias de maneira mais rápida e efetiva.

Além disso, campanhas de conscientização e ações associadas poderão ser realizadas em comunidades, seja via mídias sociais e audiovisuais, bem como de maneira presencial em ambientes escolares, comerciais e hospitalares, por exemplo. Ainda, em futuro próximo, a epidemiologia em águas residuais pode ser empregada para verificar a efetividade de vacinas para controle da COVID-19 em escala comunitária.

Portanto, diante do exposto, o presente estudo pretende através da “testagem indireta” da circulação viral incluindo tanto os portadores sintomáticos quanto os assintomáticos da COVID-19, identificar e monitorar a presença do vírus SARS-CoV-2 em águas residuárias no município de Santarém, Pará, em pontos estratégicos, com uso de um método analítico, rápido e preciso para evitar a propagação da doença do novo coronavírus.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Realizar a detecção do SARS-CoV-2 em principais Estações de Tratamento de Esgotos da cidade de Santarém (PA) que atendem a população local, propiciando a geração de indicadores que possam contribuir no mapeamento do processo de disseminação do vírus.

2.2 Objetivos específicos

- Detectar o vírus SARS-CoV-2 em águas residuárias provenientes da Estação de Tratamento de Esgoto, Elevatória de Esgoto e Sistemas de Tratamento de Esgotos Sanitários hospitalar presentes na cidade de Santarém (PA), como um indicador para a presença da doença COVID-19 no município;
- Realizar o tratamento das amostras com análises físico-química e biológicas para identificação e quantificação do RNA do SARS-CoV-2 nas águas residuárias,
- Associar os dados biológicos como indicadores da presença do vírus SARS-CoV-2 nos pontos amostrais e correlacionar com os índices de saúde pública no período do monitoramento em águas residuárias no município de Santarém, Pará.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Os vírus SARS-CoVs

Os vírus são seres pequenos infecciosos, formados basicamente por uma cápsula proteica envolvendo o material genético (DNA, RNA ou os dois juntos) geralmente sofrem mudanças na sua estrutura, desde a simples cápsula helicoidais para construções complexas. Essas mudanças ocorrem no tamanho, nos mecanismos de replicação (brotamento para lítico) e no ciclo de vida que podem durar minutos ou horas (BOGLER et al., 2020).

Os vírus coronas (CoVs) eram considerados pequenos patógenos para humanos no início deste século, mas nas últimas décadas causaram surtos significativos. Nos anos de 2002 e 2003 houve a síndrome respiratória aguda grave (SARS) e 9 anos depois a síndrome

respiratória do Oriente Médio (MERS) ocorrida no ano de 2012 (YU Chen, LIU e GUO, 2020).

No final do ano de 2019, em Wuhan, província de Hubei, China, as autoridades locais de saúde relataram aglomerados de pacientes com pneumonia de causa desconhecida, epidemiologicamente ligados a um mercado de frutos do mar (WANG et al., 2020). Diante da situação, pesquisadores chineses buscaram identificar o vírus causador desse surto local.

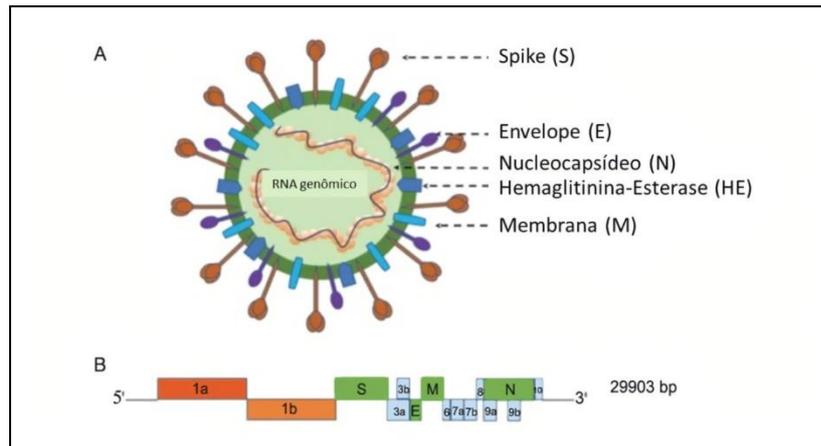
Portanto, o vírus causador das infecções pulmonares nos pacientes, é o SARS-CoV-2 (Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2) responsável pela doença COVID-19, que após a identificação, pesquisadores compartilharam a sequência genética (WRAPP et al., 2020; HUANG et al., 2020).

A saber o vírus do SARS-CoV-2 é de RNA de fita simples com envelope pertencente ao gênero β -coronavírus, pertence à família Coronaviridae (LU et al., 2020; MALIK et al., 2020). O vírus detém de polaridades positivas e não segmentadas, são responsáveis por uma extensa sucessão de gripes e infecções comuns do trato respiratório, envolvidos em doenças como bronquite, bronquiolite, pneumonias afetando principalmente recém-nascidos, crianças e idosos e também pacientes imunocomprometidos (GELLER et al., 2012).

O genoma do SARS-CoV-2 codifica 14 poliproteínas *Open Reading Frames* (ORF). Na extremidade 5', a ORF1ab é o maior gene e está envolvido na codificação de 14 proteínas não estruturais, quanto aos genes das proteínas estruturais, na extremidade 3': E (envelope); M (membrana); N (nucleocapsídeo) necessário à síntese viral, S (Spike) e HE (hemaglutinina-esterase), que permite a entrada e a infecção da célula hospedeira (Figura 1 - A), além dos genes de proteínas acessórias (ORF3a, ORF6, ORF8 e ORF10) (JIN Y et al., 2020; ORTZ-PRADO et al., 2020).

A ordem dos genes do SARS-CoV-2 é 5' – replicase ORF1ab-S-E-M-N-3', ORF3ab, ORF6, ORF7ab, ORF8, ORF9ab e ORF10 conforme demonstrada na figura 1-B como 1a, 1b, 3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8, 9a, 9b, 10 (JIN Y et al., 2020).

Figura 1 – Esquema representativo da partícula viral e do genoma b-coronavírus. A: partícula viral; B: genoma viral.

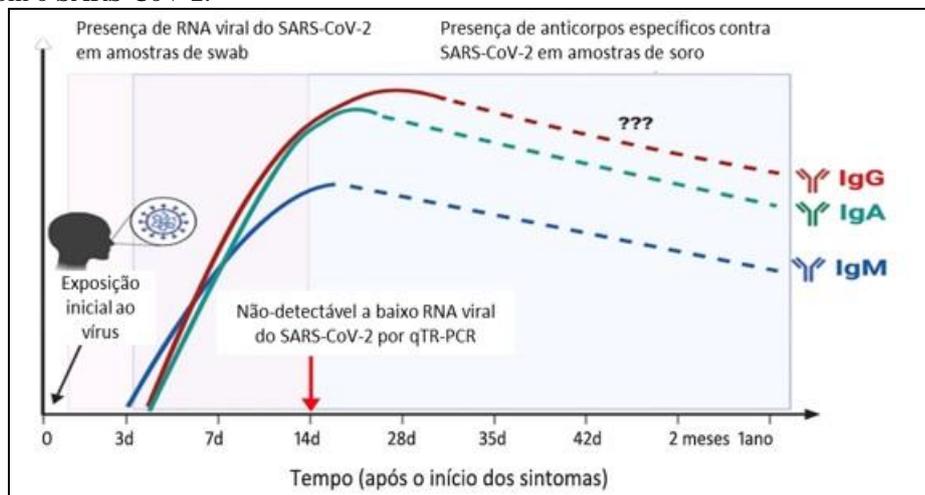


Fonte: Adaptado de Jin Y et al. (2020).

Os vírus não possuem aparato enzimático suficiente para replicação, necessitando de células hospedeiras para completar o seu ciclo (BUSTIN, 2020). A entrada do SARS-CoV-2 em células humanas é mediada por glicoproteínas (*spike – S protein*) que se projetam da superfície viral e interagem fortemente com a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) (LU et al., 2020; VIEIRA, 2011).

Para acontecer a replicação viral, é necessário um tempo entre a adsorção do vírus nas células hospedeiras até a liberação do vírus, de maneira que ainda não está claro o tempo de replicação viral, assim como, não se sabe ao certo o tempo da resposta imune e consequente do aparecimento de IgA, IgM e IgG no sangue (MENEZES, 2020). Lee CY-P et al. (2020) apresenta um esquema do período de detecção tanto do RNA viral quanto dos anticorpos contra o SARS-CoV-2 (Figura 2).

Figura 2 - Esquema representativo do período de detecção do RNA viral e dos anticorpos em indivíduos infectados com o SARS-CoV-2.



Fonte: Adaptado de Lee CY-P, et al, 2020.

Quando os humanos são infectados, podem disseminar partículas virais de SARS-CoV-2 que se mantém viáveis sob diferentes condições ambientais e em diferentes superfícies (XIAO AT et al., 2020). Ressalta-se que o vírus não está imune a infecção e replicação no sistema gastrointestinal (ZANG et al., 2020; ZHANG et al., 2020).

3.2 Vias de transmissão do vírus SARS-CoV-2

O vírus é transmitido especialmente por contato do indivíduo com gotículas e aerossóis durante a expiração, tosse (ou sem tosse), espirros e diferentes maneiras de exalação de pessoas que estejam infectadas. Entretanto, há probabilidade de contaminação por vias oral-fecal, devido a estudos de células do sistema digestório infectadas pelo vírus (DING e LIANG, 2020; ZANETI et al., 2020; RANDAZZO et al., 2020b, GUPTA et al., 2020).

Independente da via de transmissão, quer seja respiratória ou via oral-fecal do coronavírus, ele possui o potencial de afetar vários órgãos humanos, comprometendo a funcionalidade normal do organismo (DING e LIANG, 2020). Especialistas chineses em pesquisas conjuntas com especialistas do Hospital Renmin da Universidade de Wuhan e do Instituto Wuhan de virologia da Academia Chinesa de Ciências, notaram que a diarreia era o sintoma inicial de alguns pacientes infectados com o coronavírus. Logo o sintoma em pacientes infectados até então mais comum era a febre.

A partir dessa observação fizeram amostragem retal anal dos pacientes e encontraram ácidos nucleicos virais nas fezes e em cotonetes utilizados nos exames. Mediante os resultados, os pesquisadores alertaram sobre a possível transmissão do coronavírus através do sistema digestório (XINHUA, 2020).

Há possibilidade da transmissão do SARS-CoV-2 por via oral-fecal por outros vetores, como pelo contato de animais contaminados e/ou insetos que circulam por ambientes possivelmente contaminados, como os esgotos e resíduos hospitalares, que podem transportar o vírus em seu corpo e trato digestivo, contaminando a superfície por onde passam e defecam (HELLER et al., 2020). O autor esquematizou essas possíveis rotas de transmissão que estão representadas na figura 3.

Figura 3 - Esquema ilustrativo com outras possíveis rotas de transmissão do SARS-CoV-2.



Fonte: Adaptado de Heller et al. (2020).

O ser humano infectado é capaz de disseminar partículas virais de SARS-CoV-2 que permanecem acessíveis sob diferentes condições ambientais e em inúmeras superfícies (KAMPF et al., 2020). Mesmo que a transmissão direta de gotículas seja um importante via de transmissão, a excreção fecal e a subsequente contaminação ambiental também podem levar à presença de partículas viáveis de SARS-CoV-2 (YEO et al., 2020).

Contudo, faz-se necessário estudos mais aprofundados sobre essa possibilidade de transmissão do coronavírus via oral-fecal, bem como a relação com sistema saneamento ambiental. A água é um veículo de diversas doenças, o que traz a importância de tratar dessa relação saneamento ambiental quanto a presença do vírus ou de seus fragmentos no esgoto como uma ferramenta para o monitoramento epidemiológico.

Alguns autores consideram que o baixo nível de atendimento em saneamento ambiental somado a alta densidade populacional e ao baixo poder econômico, promovem condições facilitadas à propagação da doença (ADELODUN et al., 2020). Outros concordam que regiões com estrutura precária de saneamento podem ser mais afetadas com a possibilidade de transmissão via oral-fecal do coronavírus (ZANETI et al., 2020; HELLER et al., 2020).

Em países desenvolvidos, onde se alcança universalização dos serviços de abastecimento de água e tratamento de esgoto, alguns autores tendem a concordar com a baixa probabilidade de contaminação pelo SARS-CoV-2, por essa via. Entretanto, autores que convivem com uma realidade diferente quanto à abrangência universal desses serviços, preferem ser mais cuidadosos em relação a essa possibilidade (GONZAGA, 2020).

3.3 Fonte do SARS-CoVs em águas residuárias

Com o surgimento da COVID-19, alguns pesquisadores passaram a utilizar meios para verificar se a carga genômica do vírus SARS-CoV-2 estaria presente nas águas residuárias, principalmente pela falta de evidências quanto à transmissão por vias oral-fecal desse vírus (RANDAZZO et al., 2020a). A identificação do SARS-CoV-2 se dá por meio da análise da presença de sua carga genômica nas amostras, e para o monitoramento das águas residuárias ocorre a verificação da presença de alguns *primers* específicos obtidos durante o sequenciamento genético.

A técnica de transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase - PCR-qRT é amplamente utilizada nos estudos para identificar e quantificar o RNA em amostras de águas residuárias. Pesquisadores vem utilizando essa técnica em seus estudos em vários países na identificação e quantificação do RNA do SARS-CoV2 em águas residuárias, após os primeiros estudos divulgados (MEDEMA et al., 2020; WU et al., 2020; WURTZER et al., 2020).

Segundo pesquisadores, as águas residuárias podem conter um número considerável de vírus infecciosos (NADDEO et al., 2020; MEDEMA, 2020; WOLFEL, 2020; WU et al., 2020). Porém nas águas cinzas, não se aplica esse conceito, tornando um meio inviável para a transmissão do SARS-CoV-2 (WOLFEL, 2020), uma vez, que nas águas cinzas, geralmente contém detergentes, sabões e outros desinfetantes, aos quais o SARS-CoV-2 se torna sensível, o mesmo pode ocorrer nas águas residuárias hospitalares, onde a concentração do vírus é abaixo do limite de detecção devido ao uso intenso de desinfetantes e diversos surfactantes (KAMPF et al., 2020; CHIN et al., 2020).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, partículas de SARS-CoV-2 em águas residuárias tem meia-vida curta, o que possivelmente está relacionado com as condições adversas à manutenção de seu envelope viral lipídico, contudo, não há estudos sobre a viabilidade de SARS-CoV-2 em esgotos 22.

Mesmo assim, há diferentes estratégias para detecção de partículas viáveis e não-viáveis que podem ser empregadas para identificar a presença do vírus no esgoto, 14 dentre as estratégias, há preocupação com a possibilidade de transmissão fecal-oral da COVID-19, especialmente em áreas com falta de saneamento, onde a capacidade de diagnóstico pode ser limitada.

3.4 Sobrevivência de SARS-CoVs em águas residuárias e as variáveis ambientais

O conhecimento sobre a sobrevivência de espécies do gênero coronavírus na água e no ambiente, é importante para evitar futuras síndromes respiratórias com potencial de transmissão ambiental. A inativação do Coronavírus na água, depende essencialmente da temperatura, dos níveis de matéria orgânica e da presença de bactérias antagonistas (*Escherichia coli*, *Enterococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Clostridium spp.*, etc.) (GUNDY et al., 2009).

Os vírus do SARS-CoVs e outros envelopados mantêm-se infectantes por vários dias sob várias condições ambientais, porém, fatores como, temperatura, pH, e matéria orgânica afetam a infectividade dos SARS-CoVs em água e esgoto. Em geral a temperatura é a variável mais importante para a sobrevivência dos vírus, e em particular do SARS-CoVs (CHIN et al., 2020; GELLER et al., 2012; WANG et al., 2005).

De acordo com estudos realizados por Wang et al. (2005) sobre a resistência do coronavírus associado à síndrome respiratória aguda grave, a retenção mais longa da infectividade dos SARS-CoVs foi observada em temperaturas mais baixas (por exemplo, 14 dias a 4 °C versus 2 dias a 25 °C em águas residuais).

Por outro lado, estudos comprovam que temperaturas acima de 56 °C inativam com segurança o SARS-CoV-1 e o SARS-CoV-2 após 90 minutos e 30 minutos, respectivamente, provavelmente devido à desnaturação de proteínas e bicamadas lipídicas (DUAN et al., 2003; JOHN & ROSE, 2005; CHIN et al., 2020).

Em relação a presença de bactérias antagonistas, elas podem inativar os vírus por meio da atividade enzimática extracelular. Por essa razão, quanto maior a concentração de matéria orgânica menor é o tempo de sobrevivência do vírus em águas residuais brutas. Mas no contexto do tratamento de águas residuais, a matéria orgânica pode adsorver não especificamente ao envelope dos vírus SARS-CoVs, de maneira que irá protegê-los de danos oxidativos, cloração, radiação ultravioleta (UV) e predação por protozoários ou metazoários (YE et al., 2016; CASANOVA et al., 2005; GUNDY et al., 2009).

Lai et al. (2005) observaram um impacto relevante no SARS-CoV-1 em relação ao pH nas fezes de recém-nascido e de adultos com variação de horas e dias respectivamente, atingindo pH de até 9. Já nos estudos de Chin et al. (2020) o SARS-CoV-2 em suspensão, não apresenta grande redução na qualidade de infecção após 60 minutos em uma ampla faixa de pH (3–10).

3.5 Detecção do vírus SARS-CoV-2 em água residuária

A técnica da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em tempo real com transcrição reversa (RT-qPCR) é considerada padrão ouro pela Organização Mundial da Saúde para a detecção do novo coronavírus (SARS-CoV-2) causador da Covid-19. Consiste, portanto, na transcrição reversa do RNA isolado das amostras de esgoto para cDNA e posterior amplificação do material genético no equipamento de PCR em Tempo Real.

A detecção é realizada no formato RT-qPCR onde a transcrição reversa e a subsequente amplificação da sequência alvo específica ocorrem no mesmo poço de reação. O alvo de RNA isolado é transcrito gerando DNA complementar pela transcriptase reversa que é seguida pela amplificação de uma região conservada dos genes ORF1ab e N para SARS-CoV-2 usando iniciadores específicos e uma sonda marcada com fluorescência.

A presença de uma sequência específica do patógeno na reação é detectada por um aumento na fluorescência observada a partir da sonda correspondente duplamente marcada, e é relatado como o valor limiar de ciclo (CT) pelo termociclador em Tempo Real. É importante garantir a qualidade do processo, incluindo a sensibilidade e especificidade para o vírus alvo; portanto, controles positivos e negativos devem ser incluídos em cada teste, bem como o marcador interno RP.

Na PCR convencional os resultados das reações são visualizados em padrões de bandas por eletroforese, quanto ao método de RT-PCR em tempo real utilizam-se *primers* e dNTPs marcados por compostos fluorescentes. A emissão e detecção de fluorescência ocorrem durante a reação de PCR (MENEZES, 2020).

Uma fluorescência mínima (eixo y) da fase exponencial de amplificação gênica corresponde ao *threshold*, que é traçado horizontalmente no gráfico, e é utilizado para calcular o limite de ciclo (CT) de cada amostra. O CT corresponde ao número de ciclos de PCR necessários para o início da amplificação, ou seja, o momento em que a fluorescência emitida ultrapassa a linha do limite. Dessa forma, o CT tem relação inversamente proporcional à quantidade de sequência alvo presente na amostra (MENEZES, 2020).

O diferencial da RT-PCR em tempo real, no entanto, é a utilização de termocicladores especiais que, além de realizar os ciclos de temperatura, possuem leitores de fluorescência que fornecem dados sobre a quantidade de DNA formada durante a reação. Cada nucleotídeo fluoresce em um determinado comprimento de onda que é captado pelo leitor do termociclador e os dados são analisados por um programa (VIEIRA, 2011).

3.6 Sistema de esgotamento sanitário no Brasil

A qualidade de vida da sociedade está diretamente associada ao saneamento básico, que se define como um conjunto de serviços, infraestrutura e instalações operacionais de abastecimento de água, esgotamento sanitário, limpeza urbana, drenagem urbana, manejos de resíduos sólidos e de águas pluviais, afim de prevenir doenças, promover a saúde e melhorar a qualidade de vida da população (BRASIL, 2007).

Dentre as intervenções para a promoção de saúde pública, o esgotamento sanitário apresenta atividades como a coleta e o tratamento de esgotos essenciais para o saneamento básico, que por sua vez, apresenta déficit perceptível nas áreas periféricas dos centros urbanos e nas zonas rurais, cujo dados confirmam essa percepção.

No Brasil, apenas 2.807 municípios contam com sistemas públicos de esgotamento sanitário, porém, a universalização desse serviço abrange apenas alguns desses municípios, atendendo um pouco mais de 10% da população residente em área urbana (SNIS, 2021; IBGE, 2020). Salienta-se para os 1.937 municípios que utilizam soluções alternativas individuais como fossa séptica, fossa rudimentar, vala a céu aberto e lançamento em cursos d'água apenas a fossa séptica é considerada adequada pelo Plano Nacional de Saneamento Básico.

Uma vez que os índices de atendimento total e urbano para as macrorregiões apresentaram maiores índices para o Sudeste (80,5% e 84,9%, respectivamente) e os menores, para o Norte (13,1% e 17,2%), retratando uma desigualdade na distribuição dos serviços de esgotamento sanitário, onde regiões são mais beneficiadas em relação a outras, na qual a população vive desassistida pelo governo e pelas políticas públicas (SNIS, 2021).

Desse modo, pode-se afirmar que não há universalização dos serviços de saneamento, e está longe de se cumprir os Objetivos do Desenvolvimento Sustentável – ODS definidos pelos países membros da ONU para ser cumprida até 2030, tampouco, a meta da Política Nacional de Saneamento, que deveria assegurar a disponibilidade e gestão sustentável da água e saneamento para todos.

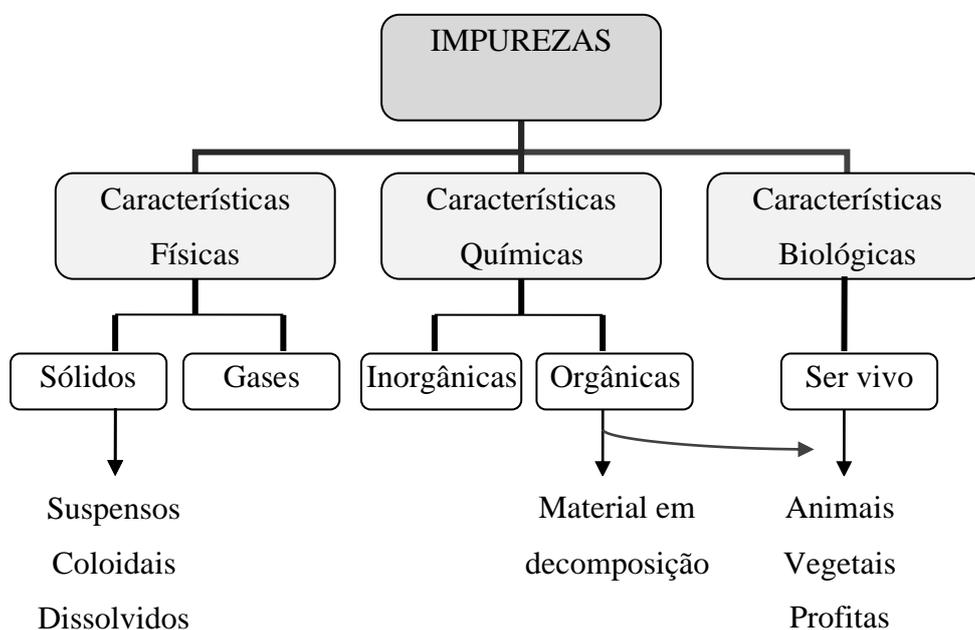
3.7 Caracterização do esgoto

A norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR nº 9.648/86 define esgoto sanitário como "despejo líquido constituído de esgotos doméstico e industrial,

água de infiltração e a contribuição pluvial parasitária". O esgoto doméstico constitui a parcela de despejo líquido resultante do uso da água para higiene e necessidades fisiológicas humanas. É composto, em quase sua totalidade, por água e por diversos componentes (impurezas) que alteram sua qualidade.

Tais impurezas podem ser representadas de forma simplificada por suas características físicas, químicas e biológicas (Figura 4). As características físicas são relacionadas ao tamanho e ao estado das impurezas. As químicas se relacionam às substâncias que apresentam o carbono como elemento principal, substâncias orgânicas, e as inorgânicas, que não apresentam o carbono como elemento principal. Já as características biológicas dizem respeito aos seres vivos (microrganismos), que podem produzir doenças ou não (VON SPERLING, 2005).

Figura 4 - Fluxograma explicativo das características, físicas, químicas e biológicas do esgoto.



Fonte: VON SPERLING (2005) - Adaptado de BARNES et al. (1981).

A nova composição da água utilizada envolve diversas impurezas que a torna prejudicial ao meio ambiente e à saúde de seres humanos e de animais, podendo agir, também, como agente veiculador de doenças. Essa água recebe o nome de esgoto, águas servidas ou águas residuárias, e seu lançamento direto ao meio ambiente, principalmente em corpos hídricos, pode contribuir para a deterioração da qualidade ambiental e da saúde humana, entre outros problemas.

3.8 Monitoramento epidemiológico a partir do esgoto no mundo e no Brasil

Com o avanço da pandemia ocasionada pelo SARS-CoV-2, a nível mundial, os pesquisadores vêm alertando para a necessidade de monitoramento das águas residuárias. Atualmente, vários estudos detectaram RNA do SARS-CoV-2 em águas residuárias (AHMED et al., 2020; LA ROSA et al., 2020; LODDER e DE RODA HUSMAN, 2020; MEDEMA et al., 2020; RIMOLDI et al., 2020; WU et al., 2020a; WURTZER et al., 2020), e o teste de águas residuais foi sugerido como uma ferramenta de alerta precoce não invasiva para monitorar o status e a tendência da infecção por COVID-19 e como um instrumento para ajustando a resposta de saúde pública (DAUGHTON, 2020; MALLAPATY, 2020; NADDEO e LIU, 2020).

Os primeiros resultados positivos para a presença de SARSCoV-2 em amostras de esgoto foram publicados na Holanda em março de 2020. O Instituto Nacional Holandês de Saúde Pública e Meio Ambiente (Dutch National Institute for Public Health and the Environment) detectou o novo coronavírus em amostras de águas residuárias provenientes do Aeroporto de Amsterdã-Schiphol e de sete ETEs das cidades de Kaatsheuvel e de Tilburg, em amostras coletadas, após duas semanas da confirmação do primeiro paciente com COVID-19 (MEDEMA et al., 2020)

Segundo os autores, os resultados encontrados corresponderam parcialmente com a sensibilidade observada em análises clínicas de SARS-CoV-2, evidenciando a capacidade inequívoca do uso de águas residuárias para monitoramento da dispersão viral, bem como para a criação de um sistema de vigilância em saúde baseado na análise de esgotos. Passados alguns dias da divulgação dos resultados na Holanda, foram detectados altos títulos de SARS-CoV-2, por qRT-PCR e sequenciamento direto de DNA, em águas residuárias coletadas em março em uma grande ETE de Massachusetts, nos Estados Unidos (WU et al., 2020).

Além dos resultados pioneiros obtidos na Holanda e nos Estados Unidos, a revista Nature noticiou no início de abril que vários grupos de pesquisa já iniciaram análises de águas residuárias para investigar a presença do novo coronavírus (MALLAPATY, 2020). Conforme a notícia, resultados positivos já haviam sido encontrados em amostras coletadas na Suécia, e também uma mobilização crescente de diferentes grupos de pesquisa de todo mundo que estão se alinhando em busca do compartilhamento de protocolos e experiências.

No período de março a abril a Espanha detectou RNA do SARS-CoV-2 em água residuárias tratadas em amostras de esgoto em seis diferentes estações de tratamento de águas

residuais (ETARs) nas principais cidades do Região de Murcia, Espanha. O estudo confirmou a eficácia dos tratamentos terciários implementados nas ETARs contra o SARS-CoV-2 (RANDAZZO, 2020b). Outros países estão fazendo o monitoramento das águas residuárias, como Austrália, Nova Zelândia, Portugal, Canadá e Malásia.

No Brasil, pesquisadores do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Escola de Engenharia da UFMG iniciaram a investigação de águas residuárias de Belo Horizonte e Contagem (MG). A detecção e quantificação do coronavírus em amostras de esgoto nas cidades de Belo Horizonte e Contagem conta com a colaboração entre a Agência Nacional de Águas (ANA), o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Estações Sustentáveis de Tratamento de Esgoto (INCT - ETEs Sustentáveis – UFMG), a Companhia de Saneamento de Minas Gerais (Copasa), o Instituto Mineiro de Gestão das Águas de Minas Gerais (Igam) e a Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais (SES) (CHERNICHARO et al., 2020).

Os dados obtidos e utilizados foram a partir da análise de amostras colhidas em 24 pontos localizados nas bacias hidrográficas dos Ribeirões Arrudas e Onça. Esses pontos selecionados permitiu o monitoramento do esgoto de forma regionalizada, em locais representativos de diferentes estratos sociais da população e também de alguns *hot spots* como os hospitais de referência para tratamento da COVID-19. O monitoramento dos esgotos é considerado pelos autores como uma forma de “testagem indireta” da circulação viral já que inclui tanto os portadores sintomáticos quanto os assintomáticos da COVID-19.

No Rio de Janeiro, na cidade de Niterói está sendo desenvolvido o Projeto de vigilância epidemiológica do SARS-CoV-2 por pesquisadores da Fundação Oswaldo Cruz em parceria com a prefeitura de Niterói a partir da análise de amostras do esgoto coletados semanalmente em 29 pontos da rede coletora do município. O estudo apresentou detecção em 94% das amostras coletadas logo nas quatro primeiras semanas de junho.

O monitoramento epidemiológico a partir do esgoto pode ser uma ferramenta de vigilância epidemiológica e acompanhamento da evolução ou ressurgimento da circulação do vírus em setores de um município, principalmente a partir do relaxamento das medidas de isolamento social, bem como no auxílio ao estabelecimento de ações emergenciais e áreas prioritárias para o enfrentamento da doença. Também pode servir como um alerta, após o estabelecimento de seu controle (FIOCRUZ, 2020).

Há indícios que a circulação do vírus em diversas comunidades tenha se iniciado meses antes do surgimento dos primeiros casos oficialmente relatados de infecção, como

demonstra o estudo realizado pela UFSC a partir de amostras de esgoto coletadas entre outubro de 2019 e março de 2020 na cidade de Florianópolis, em Santa Catarina. As amostras haviam sido congeladas, o que permitiu a análise posterior quanto à presença da carga genômica do SARS-CoV-2 neste período que precede o registro oficial do primeiro caso de COVID-19 na cidade.

No estudo, Fongaro et al. (2020) confirmaram a presença do vírus nas amostras analisadas, demonstrando a importância do monitoramento do esgoto em tomadas de decisão, visto que a detecção do SARS-CoV-2 ocorreu em amostras coletadas 90 dias antes do primeiro caso registrado em território nacional. Dessa forma, o monitoramento do SARS-CoV-2 em águas residuais a implementação de estações de tratamento de esgoto e a melhoria do saneamento e da qualidade da água, podem ser significativos ao combate deste e outros agentes patogênicos transmitidos pela água (ADELODUN et al., 2020).

4 METODOLOGIA

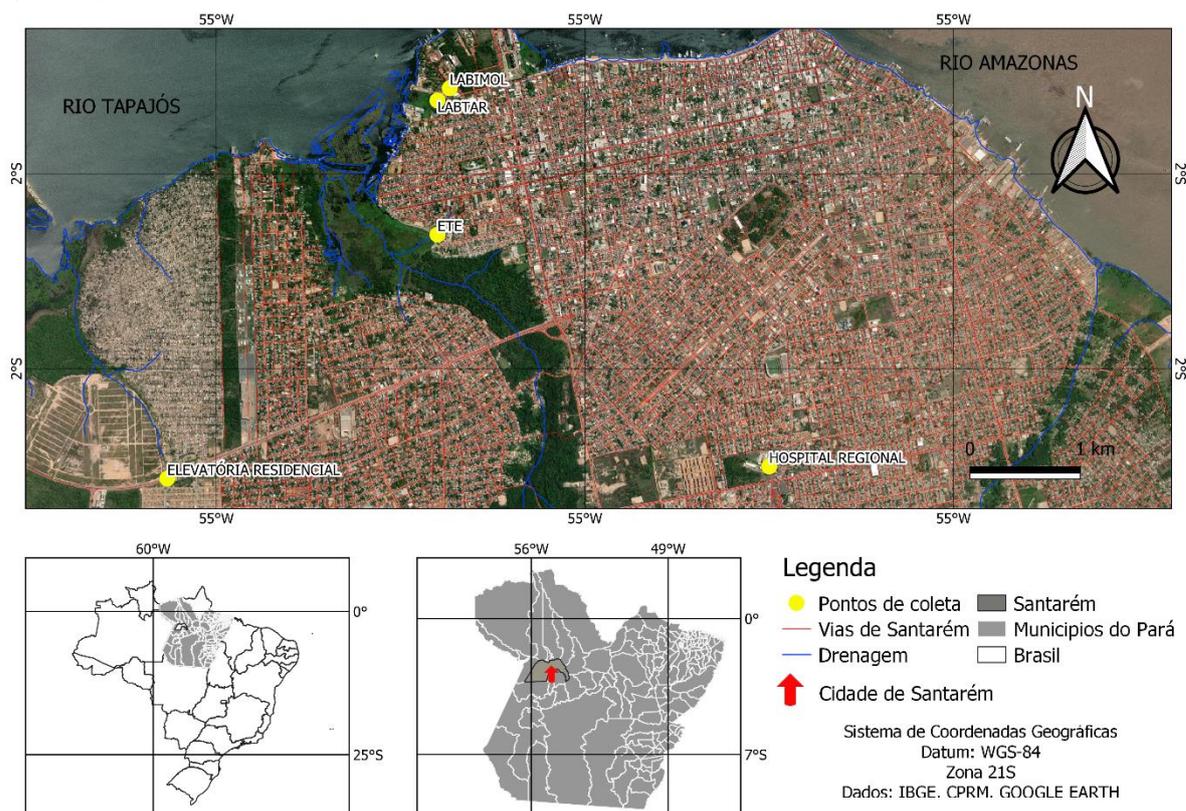
4.1 Área de estudo

A pesquisa foi desenvolvida no município de Santarém, região Oeste do Pará, considerado o 3º município mais populoso do estado do Pará, o 7º de toda a região Norte e o 83º do Brasil (IBGE, 2017). O município possui uma população de 304.589 habitantes, que está dividida em 48 bairros distribuídos em uma área de 17.898,390 km² (IBGE, 2019).

O estudo ocorreu na área urbana de Santarém em três pontos amostrais determinados para coleta de águas residuárias: (i) Poço úmido ETE Irurá (ii) Estação de Tratamento do Hospital Regional e (iii) Estação Elevatória de Esgoto do Residencial Salvação.

O tratamento das amostras foi realizado em dois distintos ambientes: Laboratório de Biologia Molecular – LABIMOL e o Laboratório de Tratamento de Águas Residuárias – LabTAR, localizados na UFOPA Santarém, unidade Tapajós (Figura 5).

Figura 5 - Mapa de localização dos pontos de coleta e do local do experimento das amostras de águas residuárias.



Fonte: Autor (2022).

4.2 Caracterização dos pontos amostrais

Os critérios de seleção dos pontos de coleta priorizaram a população conectada com o sistema de esgotamento sanitário do município, principalmente as que estão inseridas em locais que estão em condições de alta vulnerabilidade social, habitacional e econômica e, a influência de um hospital regional que tem referência no atendimento de casos graves da doença COVID-19 no Oeste do estado, tendo em vista a eventual carga viral mais elevada em função do atendimento a pacientes com casos suspeitos e confirmados da doença.

Em tempos de pandemia a abordagem da epidemiologia baseada em águas residuárias é importante correlacionar o tamanho da população conectada ao sistema de esgoto com a concentração de vírus entéricos presentes nas águas residuárias, como uma ferramenta para o monitoramento epidemiológico. A população conectada ao sistema de esgoto tem um impacto direto na concentração de SARS-CoVs em águas residuárias e, portanto, tem o potencial de disseminação (BOGLER et al., 2020).

A realização dessa abordagem em países e regiões mais suscetíveis a escassez de bens e recursos torna-se eficaz e sustentável, uma vez que, as taxas de teste para a COVID-19 são

baixas em comparação com os países desenvolvidos devido à falta de kits de teste adequados e instalações (KAVANAGH et al., 2020; JOHN NKENGASONG, 2020).

4.2.1 Estação de Tratamento de Esgoto do Irurá (ETE)

É um componente do sistema de esgotamento sanitário do município de Santarém, gerido pela Companhia de Saneamento do Pará (COSANPA), no qual o sistema de coleta e transporte corresponde ao tipo separador, ou seja, projetado para transportar apenas esgoto.

As águas residuárias tratadas na ETE consistem em esgotos sanitários oriundos principalmente de residências, edifícios comerciais, instituições e edificações que contêm instalações de banheiros, lavanderias, cozinhas e demais dispositivos que utilizam água para fins domésticos, que possuem a composição de afluente de higienização e limpeza doméstica, urina, fezes, papel, restos de comida, sabão e detergente.

A ETE – Irurá foi dimensionada considerando uma população equivalente de 40.000/50.000 habitantes, para contribuição hidráulica de 165-192 litros/habitante/dia (Tabela 1). Porém, o atendimento de esgotamento sanitário é parcial, com contribuição de esgoto apenas do Residencial Salvação e algumas empresas locais, atendendo em torno de 25 mil habitantes.

Portanto, o serviço não abrange toda área urbana, logo a responsabilidade é de o morador instalar sumidouros e fossas sépticas para tratar o seu esgoto de acordo com o Código de Posturas do Município. Atualmente estão sendo ampliadas obras de esgotamento sanitário no município, como instalação de rede, construção de mais uma elevatória e reator do tipo D-BOX.

Tabela 1 - Informações de dimensionamento da Estação de Esgoto de Tratamento do Irurá.

População	40.000 – 50.000 habitantes
Contribuição	165 -192 litros / habitantes- dia
Vazão diária	7680 m ³ /dia
Vazão média	320 m/ hora (88,88 L/s)
Vazão máxima	360 m ³ / hora (100,0 L/s)

Fonte: Melo Azevedo (2016).

4.2.2 Estação Elevatória de Esgoto do Residencial Salvação (EEE)

De acordo com o projeto de lei 211/2021 o Residencial Salvação possui uma extensão territorial considerada a maior do Brasil do Programa Minha Casa minha Vida, possuindo cerca de 17 mil moradores e o Projeto vem ao encontro dos anseios da população local, tendo em vista que já consideram o residencial um bairro de fato.

O bairro possui uma boa infraestrutura em comparações a outros bairros da cidade, no que diz respeito ao esgotamento sanitário, que conta com uma rede coletora de 21,9 km de tubulação com diâmetros entre 150 e 350 mm em PVC, 387 poços de visita e 3.195 ligações prediais.

A rede que interliga a elevatória do Residencial Salvação até a ETE-Irurá possui extensão de 53.174,90 m, que recalca o esgoto pela Rodovia Fernando Guilhon no ponto alto, de onde escoar por gravidade por um emissário construído na rodovia, que ultrapassa o igarapé Irurá e se estende até a ETE Irurá, constituindo a principal vazão de esgoto entrante e ao tratamento em reatores UASB.

4.2.3 Hospital Regional

O Hospital Regional do Baixo Amazonas do Pará Dr. Waldemar Penna, sediado no município de Santarém (PA), é uma unidade de saúde pública pertencente ao Governo do Pará e administrado pela Organização Social Pró-Saúde Associação Beneficente de Assistência Social e Hospitalar. É a principal referência no Oeste do estado para atendimento de casos graves da doença COVID-19.

Em 2020, ano marcado pela pandemia, o número de internações na UTI do HRBA aumentou em 41% na comparação com 2019. Das 1.153 internações na Unidade de Terapia Intensiva, 671 foram relacionadas à Covid-19. Contudo, houve a necessidade de implantação de novos leitos para atendimento específico ao coronavírus.

Portanto, em janeiro de 2021, o HRBA abriu 41 novos leitos, totalizando 69 leitos exclusivos para pacientes com o novo coronavírus, dedicados ao atendimento da população residente em 30 municípios do oeste do Pará, Baixo Amazonas e Xingu. Deste total, 51 são de UTI e 18 clínicos (para a estabilização de pacientes) (HRBA, 2021).

No ano de 2021 a unidade atendeu uma estimativa mensal 36.251 pacientes e com o quadro de funcionários de 1.458 atuando diretamente no hospital, atendendo a demanda originária da Central de Regulação do município de Santarém.

4.3 Procedimento da coleta das amostras de água residuárias

Neste estudo utilizou-se amostras de água residuárias coletadas antes do tratamento, ou seja, esgoto bruto, referentes aos três pontos de coletas anteriormente definidos. A escolha pela coleta do esgoto bruto se justifica pelos estudos realizados por diversos pesquisadores em vários países, onde apontam a presença do vírus no esgoto antes do tratamento.

Na Espanha foram analisadas amostras de esgoto bruto e tratadas de seis estações de tratamento de águas residuárias por Randazzo et al. (2020b), apresentando presença da carga genômica do vírus SARS-CoV-2 nas amostras de esgoto bruto e para as amostras nas fases de tratamento secundário os resultados foram contrários de forma total ou parcial.

Na Itália, Austrália também tiveram amostras de esgoto bruto coletadas de estações de tratamento com resultados positivos para a carga genômica do vírus, esses estudos foram respectivamente realizados por Rosa et al. (2020) e Ahmed et al. (2020). De acordo com o CDC, o novo coronavírus ainda não foi detectado em amostras de água tratada.

Nesse sentido priorizou as amostras de esgoto, coletadas quinzenalmente, compreendendo um período de 7 meses (março a setembro de 2021) totalizando 13 determinações (Tabela 2). A coleta aconteceu de forma paralela nos três pontos amostrais, sempre no horário da manhã. Os códigos foram determinados por letras referentes as estações de coleta e por ordem da coleta definidos por números.

Tabela 2 - Determinações realizadas por pontos das amostras águas residuárias mensais no ano de 2021.

Determinação	Códigos	Data	Mês
1°	T ₁ ; H ₁ , E ₁	30/03/2021	Março
2°	T ₂ ; H ₂ , E ₂	13/04/2021	Abril
3°	T ₃ ; H ₃ , E ₃	27/04/2021	
4°	T ₄ ; H ₄ , E ₄	11/05/2021	Maio
5°	T ₅ ; H ₅ , E ₅	25/05/2021	
6°	T ₆ ; H ₆ , E ₆	08/06/2021	Junho
7°	T ₇ ; H ₇ , E ₇	22/06/2021	
8°	T ₈ ; H ₈ , E ₈	06/07/2021	Julho

9°	T ₉ ; H ₉ , E ₉	20/07/2021	
10°	T ₁₀ ; H ₁₀ , E ₁₀	03/08/2021	
11°	T ₁₁ ; H ₁₁ , E ₁₁	17/08/2021	Agosto
12°	T ₁₂ ; H ₁₂ , E ₁₂	31/08/2021	
13°	T ₁₃ ; H ₁₃ , E ₁₃	14/09/2021	Setembro

Fonte: Autor (2022).

Atentou-se para organização dos materiais utilizados na coleta, para a caracterização do local, bem como, o condicionamento e armazenamento das amostras em campo, todos esses critérios foram observados e registrados em uma ficha de coleta de amostras para análise físico-química e biológica para a garantia da realização da coleta e durabilidade das amostras.

4.3.1 Caracterização do local da coleta e das amostras de água residuárias

Foi feita uma observação sistemática *in loco* baseada em uma estrutura pré-formulada para facilitar a análise do material coletado segundo os tipos de observações de Gil (2006). Esse tipo de observação sistemática permitiu a produção de dados quantitativos.

Na sequência foi feita a identificação do ponto de amostragem, a determinação referente ao dia da coleta e gerado um código de Identificação. Atentou-se para data, hora do início e término da coleta, bem como os intervalos de uma para outra durante a coleta, procedência da amostra composta e final: a primeira refere-se quantidade de amostra coletada a cada intervalo de tempo (minutos) e segunda a quantidade total coletada e retirada no final da amostragem para fins de análises laboratoriais.

Outras características também foram observadas e registradas *in loco*, como: a temperatura local, evidências de chuvas nas 24h precedente a coleta, o fluxo do esgoto bem como, o tanque de coleta, dentre outras informações relevantes para a pesquisa. Para o registro das informações foi utilizado de forma cursiva, para o melhor entendimento após a coleta, ou seja, são melhor detalhadas posteriormente (BELEI et al., 2008).

Feitas essas observações e registros, iniciou-se a coleta de forma manual, com todo o os equipamentos de proteção necessários para proteção da saúde do coletor. A coleta seguiu conforme o protocolo utilizado no *Projeto-piloto Covid Esgotos* realizado pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Estações Sustentáveis de Tratamento de Esgoto (INCT ETEs Sustentáveis - UFMG), com iniciativa conjunta da Agência Nacional de Águas (ANA)

em parceria com a Companhia de Saneamento de Minas Gerais (COPASA), o Instituto Mineiro de Gestão das Águas (IGAM) e a Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais (SES).

A cada 12 minutos coletou-se 500 ml de amostra (Figura 6 - A) e reservou-se em um balde dentro de um isopor com gelo para conservação da amostra em temperatura a 4° C durante o período da coleta (Figura 6 - B), e no final da coleta, retirou-se uma amostragem de 2 L de afluyente que foram submetidos para as análises físico-química e biológicas (Figura 6 - C), e o restante das amostras foram descartadas novamente no tanque (Figura 6 - D).

Figura 6 - Procedimento realizado para a coleta de água residuária nos pontos amostrais. A: Amostra composta; B: Conservação da amostra; C: Amostra final; D: Descarte das amostras composta.



Fonte: Autor (2022).

As técnicas de preservação são vitais para minimizar alterações das amostras, e neste estudo seguiu-se a metodologia utilizada por Randazzo (2020) sob refrigeração a 4° C durante a coleta e o transporte para a concentração viral em 24 h. Contudo, preservou-se as características físicas, químicas e biológicas durante a coleta e o transporte até o laboratório em curto prazo (< 24 horas).

Durante o monitoramento realizado nos três pontos, obteve-se 38 amostras de águas residuárias no total, nas quais foram analisadas para fins de dados qualitativos para presença/ausência do vírus no esgoto e, quantitativos quanto ao número de cópias de RNA do vírus para estimativa da população infectada (Tabela 3).

Das treze determinações cumpriu-se o total no HRBA e na EEE. Na ETE cumpriu-se 12 determinações, por motivos de manutenção operacional realizada no tanque úmido (ponto de chegada do esgoto), impossibilitou a realização da coleta no dia 11/05/2021.

Tabela 3 - Determinações realizadas em cada ponto amostral de água residuárias.

Pontos amostrais	Amostras coletadas e analisadas
ETE	12
HRBA	13
EEE	13
Total	38

Fonte: Autor (2022).

4.4 Análises físico-química das amostras de água residuárias.

As análises ocorreram paralelamente com as coletas no período de março a setembro de 2021, realizadas quinzenalmente, totalizando 13 determinações. No LabTAR as amostras de esgoto coletadas em campo (mantidas a 4° C durante o tempo de coleta) passaram por análises físico-química e foram submetidas aos métodos analíticos e recomendações preconizadas pelo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012), conforme a tabela 4 abaixo:

Tabela 4 - Parâmetros Físicos e Químicos e os respectivos métodos utilizados.

Parâmetros	Métodos analíticos	Referência
Temperatura (°C)		2550 / APHA (2012)
pH	Potenciométrico	4500 / APHA (2012)
Alcalinidade Total (mgCaCO ₃ . L ⁻¹)	Kapp	BUCHAUER (1998)
Alcalinidade AGV (mg. L ⁻¹)	Kapp	BUCHAUER (1998)
Fósforo total (mg. L ⁻¹) Ortofósforo solúvel (mg. L ⁻¹)	Ácido Ascórbico	4500-P E. / APHA (2012)
Sólidos Totais (mg. L ⁻¹):	Gravimétrico	2540 D. / APHA (2012)

(ST; SV; SF) Sólidos Suspensos (mg. L ⁻¹): (SST; SSV; SSF)		
Amônia (mgN-NH ₄ ⁺ . L ⁻¹)	Semi-Micro Kjeldahl	4500-NH ₃ /APHA (2012)
Nitrito (mgN-NO ₂ ⁻ . L ⁻¹)	Colorimétrico Diazotização	4500 -NO ₂ B. / APHA (2012)
Nitrato (mgN-NO ₃ ⁻ . L ⁻¹)	Salicilato de Sódio	Rodier (1975)
DQO total e filtrada (mgO ₂ . L ⁻¹)	Titulométrico Refluxação Fechada	5220 C. / APHA (2012)

Fonte: Autor (2022).

*DQO - Demanda Química de Oxigênio; pH - Potencial Hidrogeniônico; ST - Sólidos Totais; SV - Sólidos Voláteis; SF – Sólidos Filtrados; SST – Sólidos Suspensos Totais; SSV – Sólidos Suspensos Voláteis; SSF - Sólidos Suspensos Filtrados.

A viabilidade de CoVs como o SARS-CoV-2 diminui em águas residuais devido algumas variáveis ambientais, como a temperatura, pH, sólidos, micropoluentes. Contudo, os parâmetros que foram avaliados representam as principais características físico-química e biológica das águas residuárias, que auxiliaram na interpretação dos resultados das análises biológicas, principalmente nas concentrações do vírus, e a relação com as características de diluição do esgoto provenientes consumos *per capita* de água e contribuições de infiltração e de água de chuva.

4.5 Análises biológicas das amostras de água residuárias

4.5.1 Concentração viral

Para a concentração do vírus, as amostras foram processadas de acordo com a metodologia adaptada de Symonds et al. (2014) e Ahmed et al. (2015), assim como buscou-se seguir a adaptação desse mesmo protocolo realizada pela Universidade Estadual do Paraíba (UEPB). No LABIMOL, as amostras de esgoto coletadas em campo (logo após a coleta) passaram por várias etapas de processamento.

Primeiramente as amostras foram acidificadas, utilizando Cloreto de Magnésio (MgCl₂ 2,5 mM) que auxiliou na amplificação dos ácidos nucleicos, aumentando a atividade das Taqs Polimerases e, o ácido acético (HAc 10 M) que permitiu maior aderência das partículas virais na membrana carregada eletronegativa durante a filtração. Contudo, iniciou-se o processo de concentração do vírus conforme as etapas abaixo:

- Primeiro houve a preparação das amostras. Em um Becker, foi separado uma alíquota de 200 ml (volume filtrado) de cada amostra, em seguida, foi adicionado 10 ml de MgCl₂ 2,5

mM, e no pHmetro, após a leitura da pH, com auxílio de um agitador, foi-se adicionando gotas de HAc 10 M até atingir o pH na faixa de 3,0 a 3,5.

- Após a acidificação, foram colocadas alíquotas das amostras em tubos Falcon de 15ml (para obter os 200 ml utilizou-se 12,5 ml em 16 tubos) e centrifugadas a 5500 rpm, por 5 minutos para a separação do material particulado.
- Com as amostras centrifugadas, houve a filtração para concentração viral em membrana. Foi utilizado uma bomba e um sistema de filtração a vácuo (Figura 7). A filtração ocorreu em membrana MCE hidrofílica (0.45- μ m-pore-size) em duplicata (200 ml em cada membrana).
- Com o auxílio de uma pinça, usando luvas de Nitrilo, colocou-se a membrana no kit de filtração, pingou-se sobre a membrana 5 a 6 gotas de ácido acético (HAc 1 M) para umedecê-la e em seguida retirado o excesso do ácido antes de despejar a amostra para a filtração.
- O tempo de filtração, levou em média de 1 a 2h para cada amostra. No término de cada filtração, o kit de filtração foi lavado e esterilizado com água destilada para uso da próxima amostra, e o material filtrado foi descartado (processo repetido em todas as amostras).
- Após a filtração, foi retirada cuidadosamente a membrana do kit (Figura 8 - A), e picotada com auxílio de uma tesoura sobre papel alumínio (Figura 8 - B), e colocada em um micro tubo (ependorf) de 2 ml (devidamente identificado) (Figura 8 - C) e armazenado no freezer a - 20° C durante 24h no máximo, e depois armazenada no ultra freezer – 80° C até o processo de extração viral.

O método de filtração através da membrana eletronegativa para concentração de RNA viral, são especificamente usadas para a concentração de vírus entéricos em amostras de esgoto e outros efluentes (SYMONDS et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2017), com eficiência de recuperação de 31% a 78% para adenovírus humano e poliomavirus (AHMED et al., 2015). Vírus envelopados, como o SARS-CoV-2, apresentam alta afinidade de adsorção à membrana eletronegativa (HARAMOTO et al., 2009) e à fração sólida presente no esgoto, quando comparado aos vírus não envelopados (YE et al., 2016).

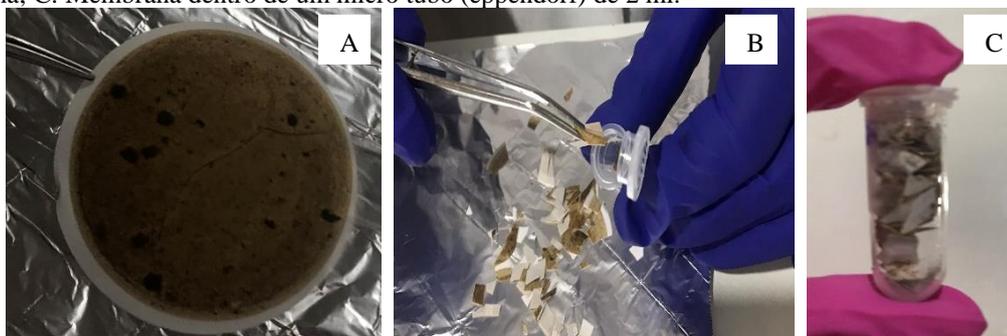
O método de adsorção em membrana eletronegativa e extração do RNA viral diretamente da membrana é um método simples, de baixo custo e relativamente rápido para processar grande número de amostras, se comparado a outros métodos (Ahmed et al., 2020b).

Figura 7 - Sistema de filtração a vácuo utilizado para a concentração viral das amostras de águas residuárias.



Fonte: Autor (2022).

Figura 8 – Processo realizado após a filtração das amostras. A: Membrana concentrada; B: Picotamento da membrana; C: Membrana dentro de um micro tubo (ependorf) de 2 ml.



Fonte: Autor (2022).

4.5.2 Eluição viral

A eluição viral, ocorreu no final de todo o processo envolvendo a coleta e filtração (7 meses após primeira coleta). Foram retiradas do ultra freezer as amostras (membrana picotada no tubo) e adicionada ao micro tubo de cada amostra 1,7 ml de solução Phosphate-buffered saline¹ 1x (PBS) e 3 pérolas de vidro (2-3 mm de diâmetro). Em seguida o material foi agitado em vórtex-mixer durante 10 minutos para favorecer a eluição do vírus (Figura 9 - A).

Após a ressuspensão, as amostras foram centrifugadas a 7000 rpm, por 10 minutos (Figura 10 - B). Na cabine foi transferido para um novo micro tubo de 2 ml devidamente etiquetado, o volume do sobrenadante de 1,5 ml.

¹ Solução utilizada nas etapas de concentração de SARS-CoV-2 de águas residuárias e ensaios para detecção de PCR dos estudos de Randazzo et al. (2020).

Figura 9 - Processo de eluição viral realizado nas amostras após a concentração viral. A: ressuspensão do material; B: Separação do material por centrifugação.



Fonte: Autor (2022).

A ressuspensão com o uso da solução de Phosphate-buffered saline (PBS) objetivou-se manter o pH constante nas amostras, ou seja, como uma solução tampão durante o processamento das amostras. Ressalta-se para os reagentes, utilizou-se para esta solução: Cloreto de Sódio (NaCl), Cloreto de Potássio (KCL), Monofosfato Dibásico (Na_2HPO_4) e Fosfato de Dibásico (KH_2PO_4).

4.5.3 Extração do RNA viral

As amostras foram extraídas de acordo com o kit comercial *Maxwell RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit* catálogo AS1330 (PROMEGA) através do instrumento automatizado Maxwell RSC (Figura 10). Antes da extração houve o procedimento de sanitização na cabine de segurança biológica (CSB) por 15 (quinze) minutos através de luz ultra UV, para a garantia de desinfecção do local para não haver contaminação das amostras.

Figura 10 - Equipamento utilizado para a extração do RNA do SARS-CoV-2 das amostras de água residuárias.



Fonte: Autor (2022).

Antes de funcionar o sistema automático de extração, foram realizados alguns processos manuais, como a configuração do equipamento Banho Maria a 56°C, a preparação do mix (Tampão de Lise (*Lysis Buffer*) e proteinase K (*proteinase k solution*)) conforme a tabela 5 abaixo.

Tabela 5 - Reagentes utilizados para o mix.

Reagente	Volume por amostra	Mix para 48 amostras*
Tampão Lise (<i>Lysis Buffer</i>)	270 µl	15,9 ml
Proteinase K (<i>proteinase k solution</i>)	30 µl	1.590 µl

Fonte: kit Maxwell RSC Viral Total Nucleic Acid Purification.

*adicional de 10%.

Em seguida na placa KingFisher™ Deepwell 96 poços, foi adicionado 120 µl de amostra em cada poço e 300 µl do mix de tampão de Lise/proetinase K. Com a placa selada com filme adesivo transparente foi agitado a 900 rpm por 10 segundos. Em seguida a placa foi encubada por 10 minutos em Banho-Maria a 56 °C.

Houve a preparação dos cartuchos na bandeja e a identificação dos microtubos de 0,5 ml de acordo com o desenho da placa (A1 até F5). Cada bandeja corresponde de 1 a 48, nesta foi adicionado 100 µl de água livre de nucleases (*nuclease-Free water*) em cada tubo de 0,5 ml e transferido 450 µl de cada amostra no seu respectivo cartucho (antes foi retirado cuidadosamente o lacre um a um).

O processo automatizado é programado para realizar a extração em 30 minutos de operação, fazendo todo o processo de extração, tempo determinado pelo sistema. Após o processamento foi retirado 5 µl e colocado em uma placa de PCR para quantificação por RT-qPCR.

4.5.4 Detecção e quantificação do SARS-CoV-2 por RT-qPCR

As amostras de águas residuárias após extraídas o RNA, foram submetidas a etapa de amplificação e detecção do material genético pela tecnologia de PCR no equipamento 7500 Real Time PCR System, no qual utilizou-se o kit comercial *Kit Molecular SARS-CoV-2 (E/RP) Bio - Manguinhos (CHARITÉ)* seguindo o protocolo de Berlim. As sequências de iniciadores e sondas do protocolo são do Corman et al. (2020) conforme indicados na tabela 6. O processo de amplificação específica do alvo com sondas marcadas com fluorescência é usado para determinar a presença do SARS-CoV-2 e de RNase P.

Tabela 6 - Sequências de iniciadores e sondas utilizados na RT- qPCR em tempo real para o novo coronavírus.

Gene	Oligonucleotídeo	Sequência
RdRP	RdRp_SARSr-F	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG
	RdRp_SARSr-P2	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ
	RdRp_SARSr-P1	FAM-CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC-BBQ
	RdRp_SARSr-R	CARATGTAAASACACTATTAGCATA
E	E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT
	E_Sarbeco_P1	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ
	E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA

Fonte: Corman et al. (2020).

O produto foi desenvolvido para ser realizado em ensaio duplex da transcrição reversa, amplificação, detecção e diferenciação do material genético (RNA viral) do coronavírus, portanto, o kit é aplicado no diagnóstico e vigilância epidemiológica do coronavírus.

O procedimento do ensaio de Amplificação Real Time 7500 ocorreu um dia após a extração do material genético, com as amostras acondicionadas e armazenadas conforme orientações do laboratório visando a potencial detecção do material genético do coronavírus. Houve a preparação manual das misturas E/RP e a respectiva identificação do tubo de 1,5 ml para a adição do volume de reagentes de acordo com o número de reações (Tabela 7).

Tabela 7 - Reagentes fornecidos e utilizados para a mistura E/RP.

Conjunto de reagentes	1 reação	48 reações	96 reações
	Volume (µl)	Volume (µl)	Volume (µl)
Mistura de PCR	3,75	202,5	393,8

Rox	0,075	4,1	7,9
Mix E/RP	6,18	333,7	648,9

Fonte: Protocolo Charité.

Para o ensaio das amostras de águas residuárias coletadas foram no total de 38 reações, neste caso utilizou-se volumes dos reagentes estabelecidos para 48 reações. Foram distribuídas a mistura de RT-PCR E/RP na placa de amplificação, configurando o desenho da placa (Quadro 1) abaixo. Foi adicionado 10 µl da mistura de RT-PCR E/RP nos poços da placa óptica compreendidos entre A1 até F5 para 38 amostras. Para a distribuição do Controle Negativo, do Controle Positivo e das amostras de águas residuárias adicionou-se:

- 5 µl de Controle Negativo no poço G5;
- 5 µl de Controle Positivo no poço H5,
- 5 µl de amostra de água residuárias nos poços compreendidos de A1 até F5.

Quadro 1 - Desenho da placa de amplificação para as amostras de água residuárias.

Placa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33							
B	2	10	18	26	34							
C	3	11	19	27	35							
D	4	12	20	28	36							
E	5	13	21	29	37							
F	6	14	22	30	38							
G	7	15	23	31	CNEG							
H	8	16	24	32	CPOS							

Fonte: Adaptado do protocolo Charité (2020)

*CNEG – Controle Negativo / CPOS – Controle Positivo.

Após a adição das amostras e controles na placa óptica da mistura de PCR E/RP, a placa foi selada com selo óptico para homogeneização em vórtex e centrifugação, após esses processos deu-se início a reação de RT-PCR no equipamento 7500 Real Time PCR System.

Os dados foram analisados conforme os critérios para aceitação dos Controle Negativo e do Controle Positivo (Tabela 8) e da Interpretação dos resultados para detecção dos alvos E/RP (Tabela 9 e 10).

Tabela 8 - Critérios para aceitação do Controle Negativo e do Controle Positivo.

Controle	CT	Resultado
Negativo	Não detectável	Rotina válida
	$CT \leq 40$	Rotina Inválida, repetir o teste, possível contaminação
Positivo	$CT \leq 37$	Rotina válida
	$CT > 37$	Rotina inválida, repetir o teste, possível perda de amostras e/ou problema durante a preparação das misturas de RT-PCR

Fonte: Bio-Manguinhos / FIOCRUZ.

Tabela 9 - Interpretação do resultado para detecção ou não detecção dos alvos E/RP.

Alvos	CT	Resultados
E	$CT \leq 40$	Detectável (+)
	$CT > 40$	Não detectável (-)
RP	$CT \leq 35$	Detectável (+)
	$CT > 35$	Não detectável (-)

Fonte: Bio-Manguinhos / FIOCRUZ.

Tabela 10 - Interpretação do resultado para os alvos E/RP.

E	RP	Resultado
+	+ ou -	SARS-CoV-2 detectável
-	+	SARS-CoV-2 não detectável
-	-	RP não detectável, repetir extração e RT-PCR
$40 < CT \leq 45$	+	Inconclusivo, repetir RT-PCR
$40 < CT \leq 45$	-	Inconclusivo, repetir extração e RT-PCR

Fonte: Bio-Manguinhos / FIOCRUZ.

*Alvo E - presença do SARS-Cov-2 (envelope viral); Alvo RP – presença de RNase P (controle interno).

De acordo com o protocolo Charité a análise de PROBIT (IC de 95%) indicou uma sensibilidade para o alvo E: LOD de 0,97 de cópias/reação (50% positividade) e de 1,99 cópias/reação (95% positividade). Resumindo, estabeleceu-se o limite de detecção para o coronavírus de 50 cópias/reações.

4.5.5 Estimativa da população infectada

Para estimar a população infectada, utilizou a equação 1 com dados da carga viral detectada no esgoto, vazão média de esgoto dos pontos, e a carga viral média *per capita*. Para obter a vazão média das ETEs monitoradas, foi utilizada a equação 2 cujo os valores da contribuição *per capita* (200) e do coeficiente de retorno (0,8) são encontrados partir da

norma da ABNT 12209/11 e valores usualmente utilizados pela literatura, conforme a equação 1. Neste estudo não foi possível obter os dados de vazão média diária com os operadores responsáveis nas ETEs no momento da coleta.

$$PI = \frac{CT * Q_{med}}{\text{Carga viral per capita}} \quad (1)$$

$$Q_{med} = \frac{P * q + C}{\frac{d/s}{L/m^2}} \quad (2)$$

Onde:

Q_{med} é a vazão média, em L/s

P: População (número estimado de habitantes local)

q: Contribuição *per capita*

C: Coeficiente de retorno

Para a carga viral *per capita* considerou uma carga viral *per capita* equivalente a 10^7 número de cópias de RNA (material genético) viral por pessoa por dia, o que é equivalente a 10^5 número de cópias de RNA viral por grama de fezes por dia, segundo Zhang et al. (2020) e Woelfel et al. (2020). Adotou-se esse valor com base nas referências internacionais citadas (para amostras de fezes), considerando que uma pessoa excreta cerca de 200 g de fezes por dia (WU et al., 2020a). Estudos do grupo de pesquisa da UFMG apontam para a confirmação desse valor médio de carga viral *per capita*, considerando amostras de esgoto hospitalar utilizada por Bressani Ribeiro et al. (2020).

4.6 Medidas de Biossegurança

A equipe da coleta utilizou equipamento de proteção individual apropriado para coletar as amostras residuárias como uso de jaleco, luvas de borracha, touca, máscara (cirúrgica ou máscara de proteção respiratória), protetor facial e botas de segurança. No laboratório usou-se equipamento de proteção individual (EPI) apropriado para manipulação de amostras biológicas.

Os procedimentos com potencial para geração de aerossóis de partículas finas (por exemplo: preparação de amostras em tubo aberto) foi realizado em uma cabine de segurança biológica (CSB). Para a centrifugação foram utilizados dispositivos adequados de contenção física (por exemplo, tubetes de segurança de centrifugação e rotores selados). Todo procedimento realizado dentro do laboratório, que gerou aerossóis foi realizado fora de uma CSB (ou limpeza de vazamentos de amostras altamente suspeitas, por exemplo), foi realizado usando uma máscara N95. Após o processamento das amostras, foi descontaminado as superfícies de trabalho e o equipamento utilizado com desinfetantes apropriados.

4.7 Análise estatística

Através da estatística descritiva, os dados das análises físico-químico foram analisados, com extração de média, desvio padrão e porcentagens, além de confecção de gráficos com o auxílio do *software* R- Studio. Através da ferramenta gráfica boxplot permitiu visualizar a distribuição e valores discrepantes (outliers) dos dados, bem como a disposição gráfica comparativa, fornecendo assim um meio complementar para desenvolver uma perspectiva sobre o caráter dos dados.

Quanto aos dados biológicos (RT-qPCR) foram analisados por meio de estatística do Qui-quadrado para avaliar a associação entre as variáveis qualitativas. Neste caso, os valores observados e esperados foram muito próximos, ressalta-se para 1 valor de 4 (25%) das observações a frequência mínima esperada foi de $2,13 < 5$, concluindo, portanto, que as amostras são independentes, ou seja, não há uma associação, e o tamanho do efeito é pequena. Para tal, aplicou-se o teste exato de Fisher que é adequado para esse tamanho de efeito (amostras pequenas). Os testes foram feitos com o auxílio do *software* R-Studio.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização Física e Química das amostras de água residuária

Os resultados obtidos para a caracterização dos afluentes estão apresentados graficamente com os seguintes parâmetros: T (°C), pH, AGV, Alcalinidade total, DQOt, DQOf, N-amoniaco, Pt, PO₄³⁻ e em tabelas os ST, STV, STF, SST, SSV e SSF com

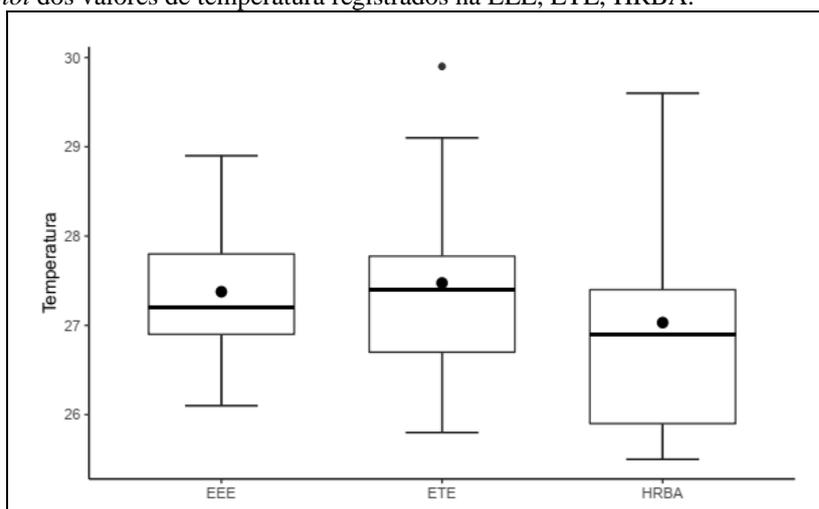
objetivo de auxiliar na interpretação dos resultados biológicos para a concentrações do vírus SARS-CoV-2 em esgoto.

Por meio da análise estatística descritiva os resultados estão apresentados na forma de mínimo, médias, máximo, primeiro quartil, segundo quartil (mediana) e terceiro quartil, representados em boxplot dos períodos coletados durante a pesquisa, a qual foram executadas em três pontos de coleta a saber EEE, ETE e HRBA.

Desse modo, a faixa média da temperatura registrada nos afluentes da EEE, ETE, HRBA foi 27.29°C. Houve uma discrepância, valor acima do limite de detecção de outliers na ETE. Observa-se que 75% das amostras apresentaram temperaturas até 27.7 °C com médias entre 27 e 27.5°C. (Figura 11).

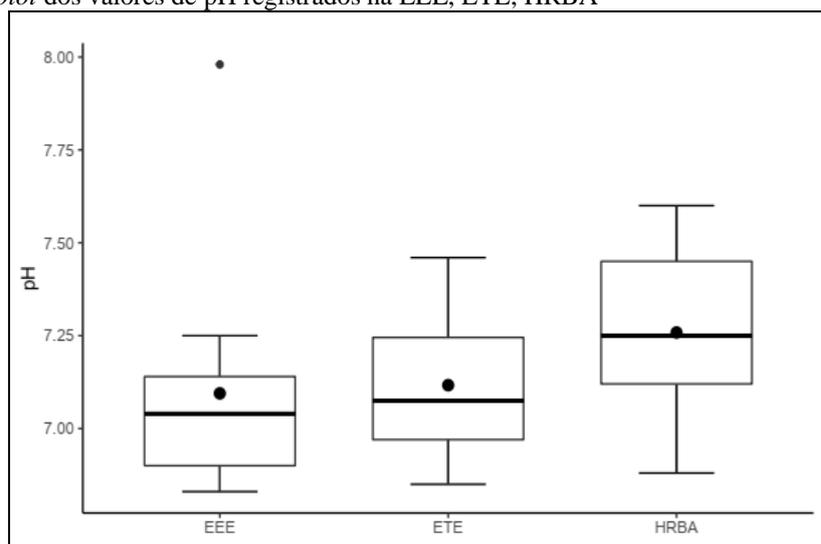
Quanto a média de pH registrado nos três referidos pontos de coleta durante o período de monitoramento foi 7,15 unidade de pH, conforme o resultado, apresentou uma discrepância, valor acima do limite de detecção de outliers na EEE. Percebe-se ainda que 75% das amostras apresentaram pH até 7,30 com médias entre 7,09 e 7,25 unidades de pH (Figura 12).

Figura 11 - *Box-plot* dos valores de temperatura registrados na EEE, ETE, HRBA.



Fonte: Autor (2022).

Figura 12 – *Box-plot* dos valores de pH registrados na EEE, ETE, HRBA



Fonte: Autor (2022).

A importância de obter valores da temperatura e pH em estações de tratamento de esgoto é entender o destino e a viabilidade do SARS-CoV-2, vírus da COVID-19 em águas residuárias provenientes de instalações domésticas, comerciais e industriais que fluem ao longo da rede de esgoto com um tempo de retenção hidráulica de algumas horas até a chegada na ETE dos referidos pontos.

Os valores de temperatura registrados nas amostras de água residuárias, valores acima do que seria ideal para influência para a sobrevivência do vírus no esgoto, uma vez que, 75% das amostras apresentaram temperaturas até 27.7 °C. O vírus tem capacidade de sobrevivência de horas ou dias em fezes excretadas tornando infectantes até a chegada nas estações de tratamento, o que vai determinar essa sobrevivência é o T_{90} (tempo necessário para que o título do vírus diminua em 90%), que geralmente é mais longo em baixas temperaturas.

Algumas observações experimentais sobre SARS-CoV-2 ou outros vírus CoVs em relação a estabilidade em água, aponta que a temperatura tem um fator de influência. Temperaturas a 4 °C o SARS-CoV-2 é altamente estável, tornando infeccioso após 14 dias (CHIN et al., 2020), quanto que a 20 °C os CoVs permanecem infecciosos por 2 dias, quando lançados em esgoto (WANG et al., 2005) e a 70 °C por 5 min, o SARS-CoV-2 é inativado (CHIN et al., 2020).

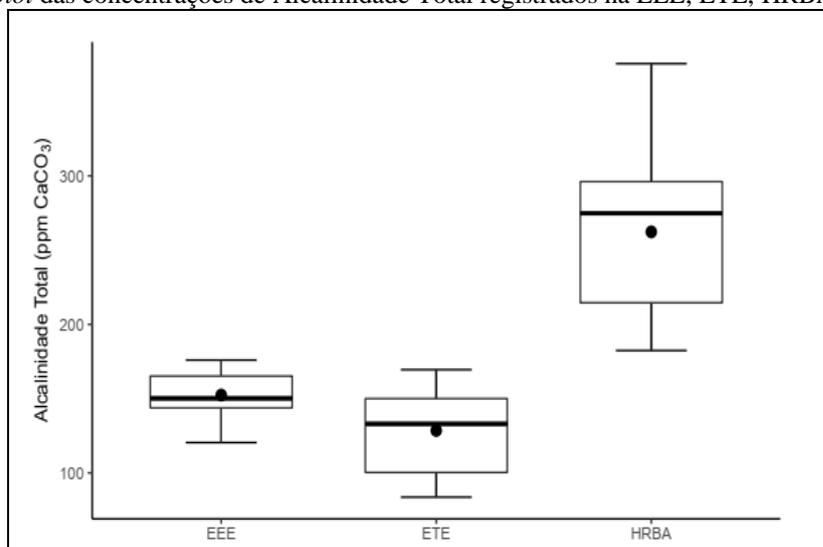
Quanto aos valores de pH encontrados revelando que 75% das amostras apresentaram pH até 7,30 unidades de pH indicando neutralidade nas amostras. O pH só tem interferência para a sobrevivência do vírus no esgoto, quando for ácido, o que causa a diminuição da viabilidade dos vírus CoVs em água residuárias, assim como, a temperatura, ocasionando

credibilidade quanto a infectividade viral, que pode ser reduzida pelas fezes para esgoto, seguidamente para as estações e assim até chegar no meio ambiente (LA ROSA et al., 2020).

O mesmo apresenta relações fundamentais com acidez e alcalinidade, portanto, as amostras residuárias dos três pontos amostrais EEE, ETE, HRBA, registraram Alcalinidade Total com valor médio de 182,49 mgCaCO₃.L⁻¹, que por sua vez, 75% das amostras apresentaram alcalinidade total até 213,77 mgCaCO₃.L⁻¹ com médias entre 127,19 mgCaCO₃.L⁻¹ e 262,31 mgCaCO₃.L⁻¹ (Figura 13).

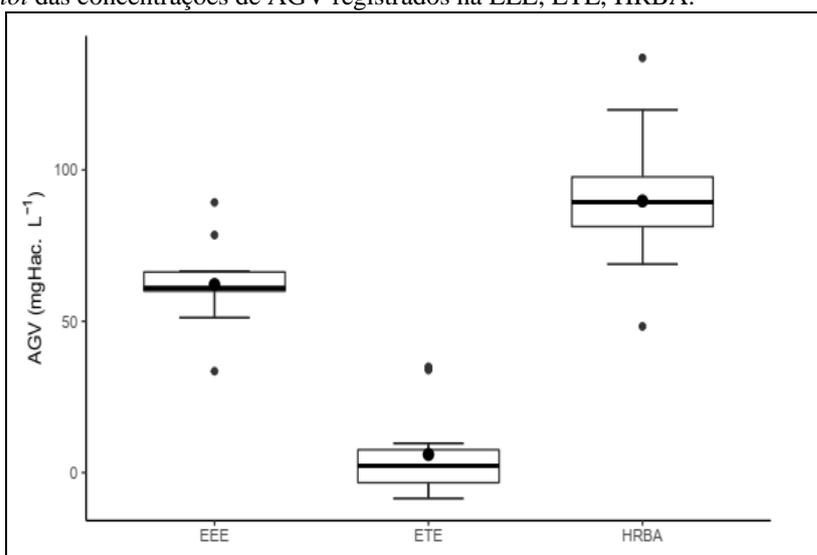
Em relação aos Ácidos Graxos Voláteis (AGV) foram registradas concentrações destes compostos nas amostras, com valor médio de 53,860 mgHAc.L⁻¹. Nota-se que 75% das amostras apresentaram AGV até 81.397 mgHAc.L⁻¹ com médias entre 6,01 mgHAc.L⁻¹ e 89,73 mgHAc.L⁻¹ (Figura 14).

Figura 13 - *Box-plot* das concentrações de Alcalinidade Total registrados na EEE, ETE, HRBA.



Fonte: Autor (2022).

Figura 14 - *Box-plot* das concentrações de AGV registrados na EEE, ETE, HRBA.

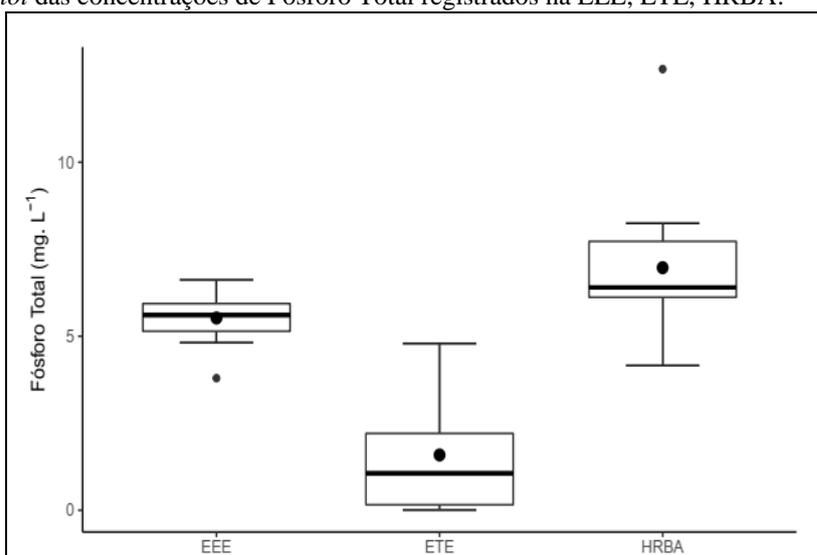


Fonte: Autor (2022).

Foi possível observar que a alcalinidade encontrada nas amostras cujo a média do pH foi de 7,15 unidades de pH mantiveram valores baixos, o que pode ser causada pela presença de substâncias dissolvidas que neutralizam ácidos, bem como, relacionado com o equilíbrio de dióxido de carbono na água, uma vez que, a alcalinidade da água é representada pela presença dos íons hidróxido, carbonato e bicarbonato. Quanto aos ácidos graxos voláteis também devem estar em equilíbrio com a alcalinidade e com o pH.

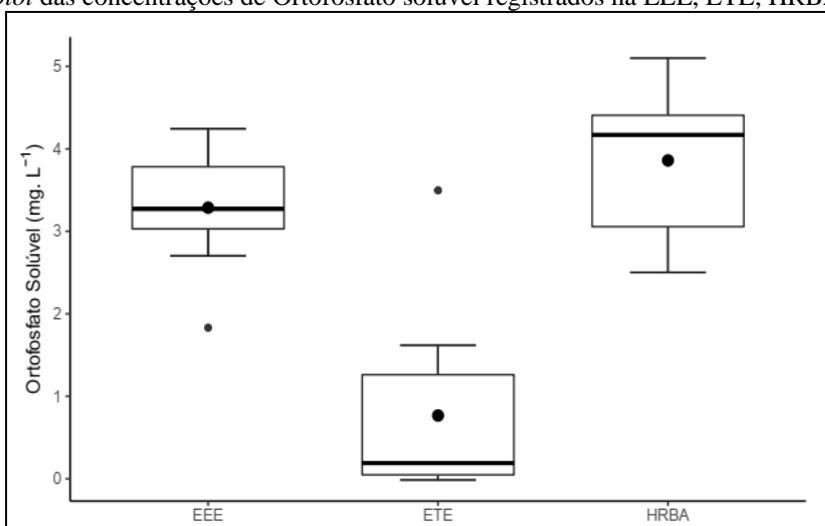
Sobre a concentração de Fósforo Total registradas nas águas residuárias dos três pontos monitorados o valor médio foi de 4,77 mgP.L⁻¹. Observa-se que 75% das amostras apresentaram Fósforo Total até 5,43 mgP.L⁻¹ com médias entre 1,59 e 6,97 mgP.L⁻¹ (Figura 15). Quanto ao Ortofosfato Solúvel, registrou concentração média de 2,68 mgP-PO₄³⁻. L⁻¹. As amostras apresentaram 75% de Ortofosfato Solúvel até 3,05 mgP-PO₄³⁻. L⁻¹ com médias entre 0,77 e 3,86 mgP-PO₄³⁻. L⁻¹ (Figura 16).

Figura 15 - *Box-plot* das concentrações de Fósforo Total registrados na EEE, ETE, HRBA.



Fonte: Autor (2022).

Figura 16 - *Box-plot* das concentrações de Ortofosfato solúvel registrados na EEE, ETE, HRBA.



Fonte: Autor (2022).

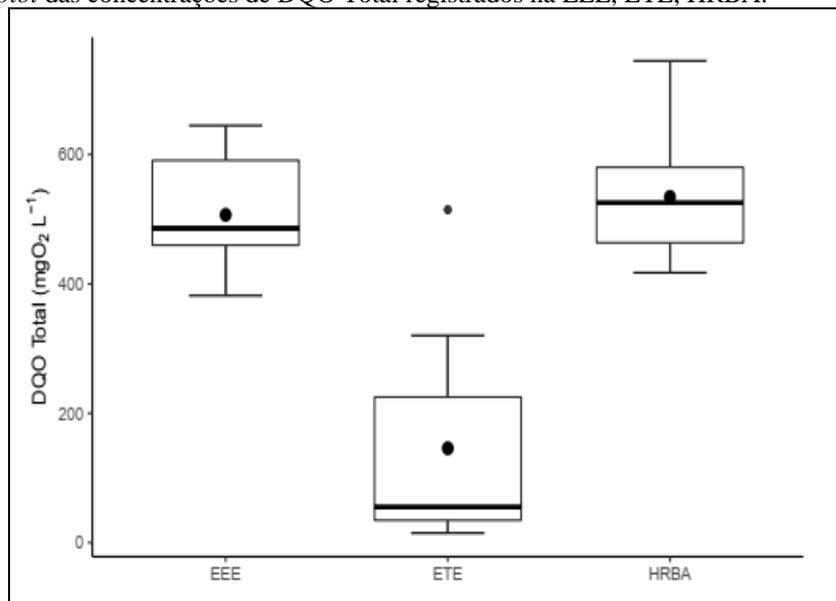
Os resultados inerentes à concentração de fósforo total e ortofosfato encontrados nas amostras de águas residuárias demonstram uma diferença com relação à literatura brasileira. Os resultados revelam que 75% das amostras apresentaram fósforo total até $5,43 \text{ mgP.L}^{-1}$, e ortofosfato (fração solúvel) até $3,05 \text{ mgP-PO}_4^{3-} \cdot \text{L}^{-1}$, enquanto os dados na literatura variam entre 5 mgP.L^{-1} e 20 mgP.L^{-1} em esgotos domésticos, no qual o fósforo em frações orgânicas e inorgânicas estejam distribuídos em 40% e 60% em média respectivamente (VON SPERLING et al., 2009; RANDALL et al., 2010; JORDÃO e PESSÔA, 2011).

A atividade urbana, consumo de produtos industrializados à base de fósforo (produtos de limpeza e alimentos) são alguns fatores que contribuem para as frações de fósforo nos esgotos sanitários, se apresentando como fosfato, podendo ser encontrado nas formas orgânica

e inorgânica. Logo, essas frações variam de acordo com a cultura e perfil socioeconômico do local, bem como, a infraestrutura que recebe o esgoto, por muitas vezes havendo infiltração e contribuição das águas pluviais, contribuindo para diluição desses compostos nos sistemas.

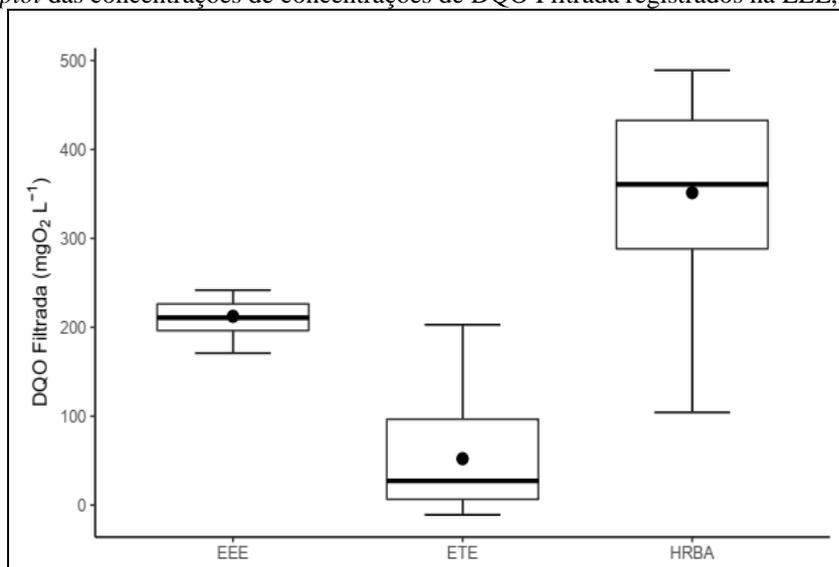
Em relação as concentrações de DQO Total registrados na EEE, ETE, HRBA o valor médio foi 402,18 $\text{mgO}_2\text{L}^{-1}$. As amostras apresentaram 75% de DQO Total até 468,98 $\text{mgO}_2\text{L}^{-1}$ com médias entre 146 e 534 $\text{mgO}_2\text{L}^{-1}$ (Figura 17). Quanto a DQO Filtrada o valor médio foi de 209,33 $\text{mgO}_2\text{L}^{-1}$, com 75% de DQO até 210,71, médias entre 52 e 351 $\text{mgO}_2\text{L}^{-1}$ (Figura 18).

Figura 17 - *Box-plot* das concentrações de DQO Total registrados na EEE, ETE, HRBA.



Fonte: Autor (2022).

Figura 18 - *Box-plot* das concentrações de concentrações de DQO Filtrada registrados na EEE, ETE, HRBA.



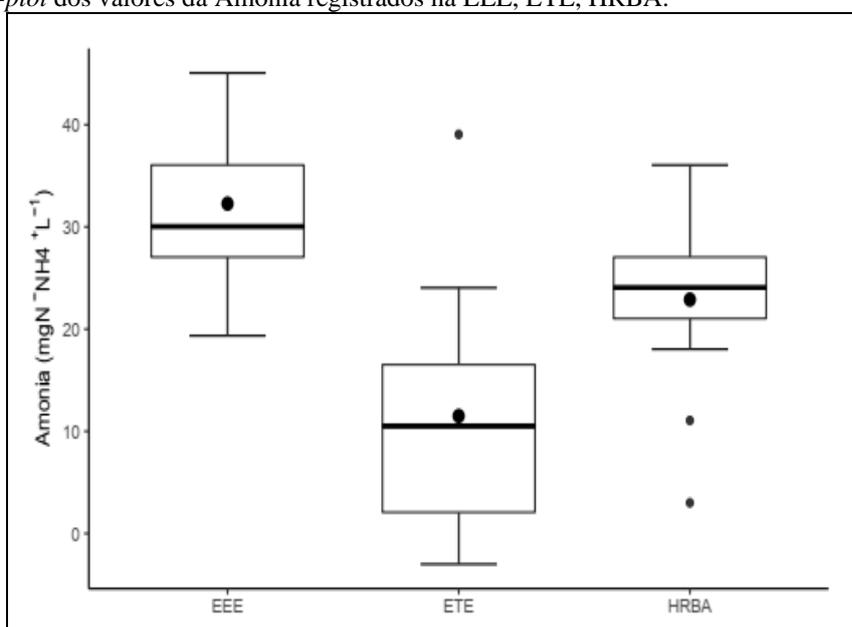
Fonte: Autor (2022).

Os resultados referentes à concentração DQO Total e Filtrada encontrados nas amostras de águas residuárias apresentam valores próximos ao que se tem registrados na literatura. Os resultados revelam que 75% das amostras apresentaram até 468,98 $\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ de DQO total e 210,71 $\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ da DQO filtrada, e na literatura valores médios observados em diferentes regiões do Brasil foram de 400 e 700 $\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ DQO total e de 185 $\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ para DQO solúvel.

A Demanda Química de Oxigênio apresenta como um dos principais parâmetros para a caracterização dos esgotos domésticos por fornecerem dados referentes à concentração de matéria orgânica total, biodegradável e não biodegradável (ROSS, 2015). Portanto, é importante conhecer o volume e composição do esgoto, para entender que tipo de efluente está chegando até a ETE para analisar qualidade e quantidade de material recebido. Ressalta-se que embora os efluentes domésticos possuam propriedades características típicas, elas podem variar em diferentes locais, devido à diferentes hábitos alimentares e as diferentes condições socioeconômicas da população.

Além deste, parâmetro como Nitrogênio amoniacal foi mensurado, apresentando valor médio nas amostras de água residuárias coletadas na EEE, ETE e HRBA de 22,50 $\text{N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$. Pode-se observar que 75% das amostras apresentaram valores de 24,03 $\text{N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ com médias entre 11,5 e 32,27 $\text{N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ (Figura 19).

Figura 19 - Box-plot dos valores da Amônia registrados na EEE, ETE, HRBA.



Fonte: Autor (2022).

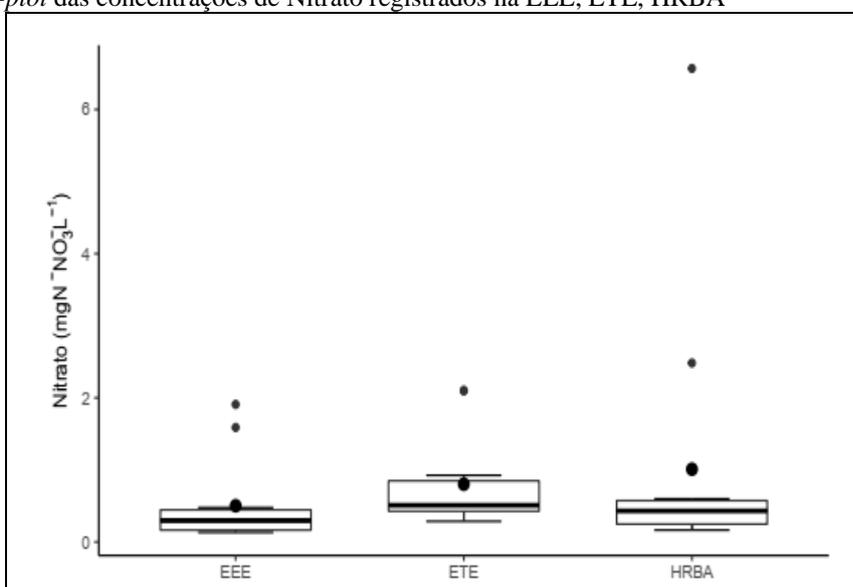
Os valores encontrados de Nitrogênio Amoniacal em 75% das amostras com valores até $24,03 \text{ N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ indicam que a fração formada pela adição de uma solução alcalina resultou da destilação do Nitrogênio Amoniacal como indicador de poluição orgânica, ou seja, apresentou a presença de excretas, urinas, fezes de seres vivos, bem como a presença de aminoácidos.

As frações encontradas nas amostras analisadas podem ser tóxicas e a não tóxicas como matéria orgânica não ionizada livre (NH_3) e ionizada (NH_4^+) amônia inorgânica, dependendo sempre do pH, temperatura, uma vez, que em pH neutro, a forma ionizada da amônia (NH_4^+) se torna mais presente, já em pH básico, a forma livre (NH_3) é a mais comum. A toxicidade do nitrogênio amoniacal se intensifica a partir da elevação do pH (ZOPPAS et al., 2016).

Logo, está diretamente relacionado ao consumo do oxigênio, tornando necessário durante o processo de nitrificação do nitrogênio, ou seja, a transformação do nitrogênio amoniacal a nitrito e em seguida a nitrato. Neste sentido foi analisado as concentrações de Nitrito e Nitrato durante o monitoramento epidemiológico.

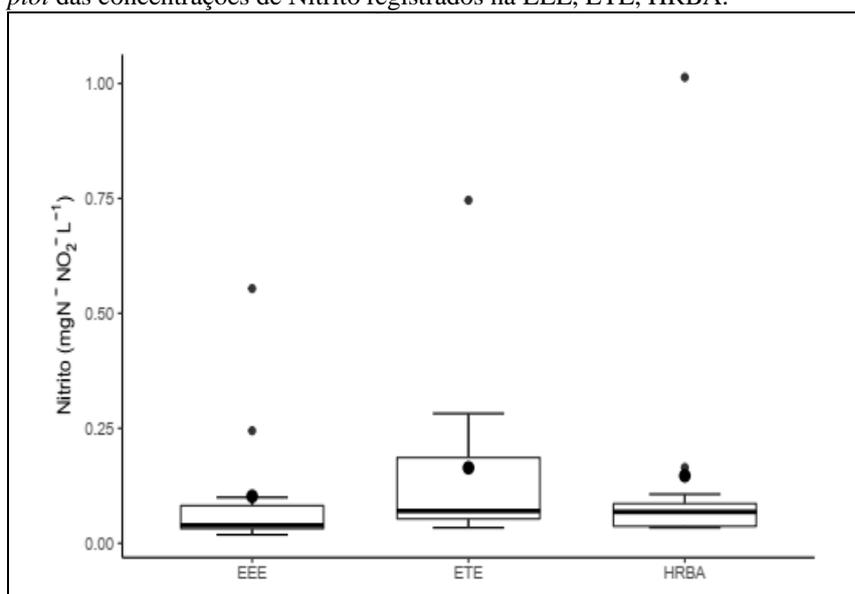
A concentração média de nitrito apresentou valor médio nas amostras de água residuárias coletadas na EEE, ETE e HRBA de $0,13 \text{ mgN-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$ com 75% das amostras apresentaram concentrações até $0,09 \text{ mgN-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$ com médias entre $0,10$ e $0,16 \text{ mgN-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$ (Figura 20). Quanto ao valor médio da concentração de Nitrato resultou em $0,77 \text{ mgN-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$ registrando-se concentração com 75% de nitrato até $0,59 \text{ mgN-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$ com média entre $0,50$ e $1,01 \text{ mgN-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$ (Figura 21).

Figura 20 - Box-plot das concentrações de Nitrato registrados na EEE, ETE, HRBA



Fonte: Autor (2022).

Figura 21 - Box-plot das concentrações de Nitrito registrados na EEE, ETE, HRBA.



Fonte: Autor (2022).

De acordo com as concentrações de Nitrito e Nitrato registrados em 75% das amostras com valores até $0,09 \text{ mgN-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$ e $0,59 \text{ mgN-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$ respectivamente, registraram concentrações baixas o que indica a fonte de matéria orgânica presente na água residuária estava muito distante do ponto de coleta onde foi realizado a amostragem para a análise, ao contrário, concentrações elevadas, indicaria a presença da matéria orgânica mais próxima.

Destaca-se que a diluição do esgoto em diferentes pontos de esgotamento sanitário, com diferentes consumos *per capita* de água e contribuições de infiltração assim como água de chuva, pode estar associado aos resultados, por sua vez, a diluição ocasionada pela entrada de águas pluviais nos coletores reduz as concentrações de sólidos, compostos orgânicos e compostos inorgânicos.

No que se refere à concentração média de Sólidos Totais presente nas amostras (Tabela 11), do valor registrado, $271,2 \text{ mg/L}$ foram voláteis e $401,3 \text{ mg/L}$ filtráveis, totalizando $672,5 \text{ mg/L}$. Quanto aos Sólidos Suspensos foi registrado à concentração média de $85,33 \text{ mg/L}$ desse total $68,86 \text{ mg/L}$ foram voláteis e $16,97 \text{ mg/L}$ filtráveis.

Tabela 11 - Valores médios e desvios padrão dos Sólidos Totais e Suspensos registrados na EEE, ETE, HRBA.

	Média	Desvio Padrão (\pm)
ST	672,5	469,43
STV	271,2	157,66

STF	401,3	332,98
SST	85,33	45,26
SSV	68,86	39,93
SSF	16,97	12,81

Fonte: Autor (2022).

ST: sólidos totais; STV: sólidos totais voláteis; STF: sólidos totais filtrados; SST: sólidos suspensos totais; SSV: sólidos suspensos voláteis; SSF: sólidos suspensos filtrados.

Os valores registrados para a quantidade total de sólidos presentes nas amostras apontam parte desses sólidos estavam em estado de suspensão e a outra parte quimicamente em matéria orgânica, que por sua vez, são indicadores de matéria orgânica, nitrogênio, fósforo assim como indicadores de contaminação fecal oral, no qual todos esses contaminantes contribuem para a carga de sólidos presentes em esgotos domésticos.

5.2 Concentração de SARS-CoV-2 em águas residuais

5.2.1 Controles

O resultado para os controles Positivo e Negativo de acordo com os critérios de aceitação estabelecido pelo protocolo Charité (Alemanha) apontaram valores satisfatório para o teste. O controle Negativo indicou rotina válida para o teste, apresentando valores negativos para o vírus SARS-CoV-2 e para o RNase P controle interno (E/RP). Assim como validou a rotina para o controle Positivo, com concentrações virais para os alvos E/RP de 35,57 e 33,71 respectivamente, valores no qual estão dentro do limite estabelecido, que são valores < 37 (Tabela 12).

Tabela 12 - Resultados dos controles Negativo e Positivo.

Controle	Alvos	
	E	RP
Negativo	–	–
Positivo	35,57	33,71

Fonte: Adaptado por protocolo Charité (Alemanha).

No processo de amplificação dos alvos E/RP com sondas marcadas com fluorescência determinou a presença do SARS-CoV-2 e de RNase P nas amostras de águas residuárias

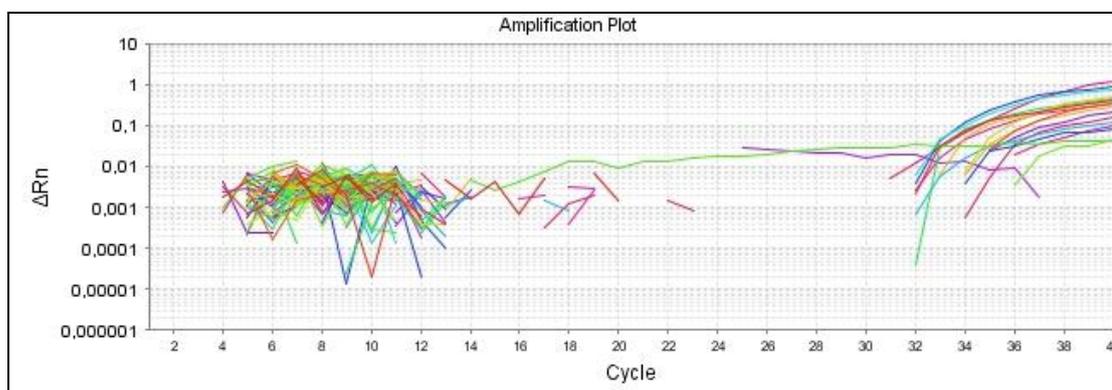
coletadas, na qual demonstrou a recuperação bem-sucedida do RNA, bem como a integridade do reagente de extração.

5.2.2 Amplificações da PCR

A detecção foi realizada no formato RT-qPCR onde as amostras de água residuárias e os alvos E/RP foram submetidos à amplificação e detecção do material genético. O processo de amplificação específica do alvo com sondas marcadas com fluorescência foi usado para determinar a presença do SARS-CoV-2 e de RNase P.

A presença do SARS-CoV-2 foi detectada por um aumento na fluorescência (eixo y) na fase final da fase linear, aproximadamente no ciclo 34 até a fase platô no ciclo 38 conforme relatado no valor limiar de ciclo (CT) pelo termociclador em Tempo Real (Figura 22).

Figura 22 - Gráfico de quantificação do material genético de PCR em termociclador em Tempo Real.



Fonte: Autor (2022).

* ΔRn : Magnitude do sinal gerado por um determinado conjunto de condições da PCR

As aplicações utilizadas são classificadas como qualitativa, para a detecção da molécula de RNA do vírus SARS-CoV-2 com diagnóstico positivo ou negativo (+/-) e quantitativa para a quantificação absoluta (carga viral/nº cópias). Nesta situação o gráfico mostra os dados detectados representando a quantificação absoluta, ou seja a quantidade de moléculas de RNA em função do números de ciclos.

Observa-se no gráfico da amplificação (*Amplification Plot*) em comparação ao número do ciclo, nos ciclos iniciais da PCR, não há sinal de fluorescência, que são as Baseline para o gráfico de amplificação, porém, o aumento na fluorescência ocorreu acima do Baseline indicando a detecção de alvo acumulado. Neste caso o ponto no tempo onde a reação cruza o

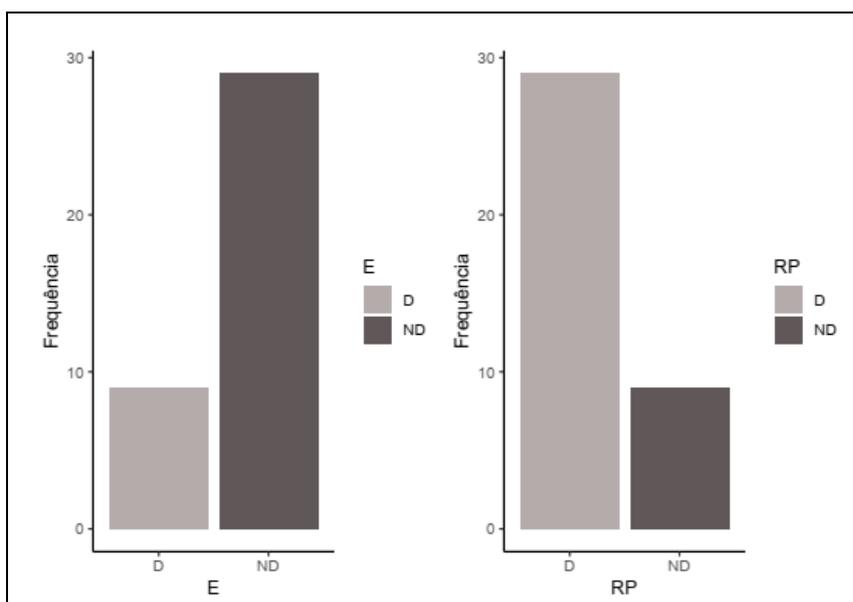
limiar de detecção, foi ajustado acima do Baseline, na qual essa fluorescência ultrapassou o *threshold* definindo o número de ciclo (CT).

5.3 Resultados qualitativos

A aplicação utilizada classificada como qualitativa, para a detecção da molécula de RNA do vírus SARS-CoV-2 nas amostras de águas residuárias com diagnóstico positivo ou negativo (+/-) demonstrou na comparação entre os alvos E/RP, o gene E apresentou 23,68% (n=9) de amostras detectáveis e 76,32% (n=29) não detectáveis, quanto ao gene RP as amostras detectáveis foram de 76,32% (n=29) e não detectáveis 23,68% (n=9) conforme apresentado na figura 23.

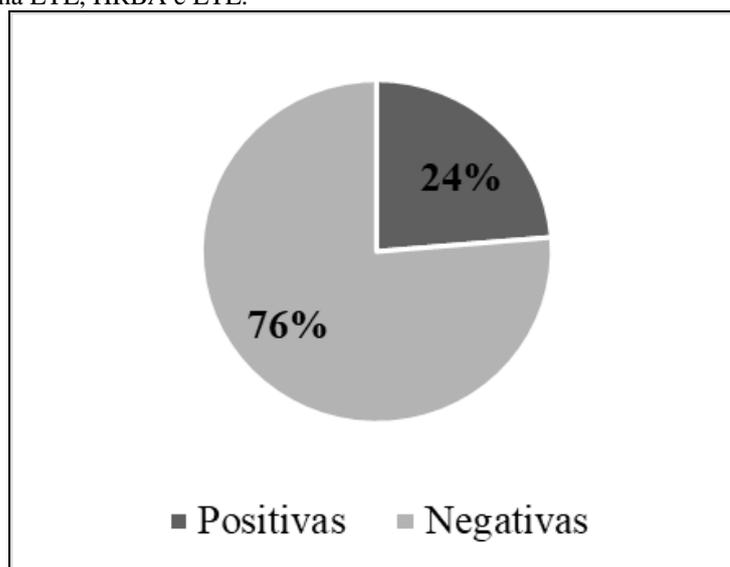
Sintetizando, a presença do vírus SARS-CoV-2, do total (n=38) das amostras analisadas, apenas 24% (n=9) foram detectáveis e 76% (n=29) não detectáveis para a presença do vírus nas amostras de água residuária (Figura 24).

Figura 23 - Gráfico de comparação dos alvos E/RP nas amostras de água residuárias coletadas na ETE, HRBA e ETE.



Fonte: Autor (2022).

Figura 24 - Gráfico de porcentagens para a presença e ausência do vírus SARS-CoV-2 nas amostras de água residuárias coletadas na ETE, HRBA e ETE.



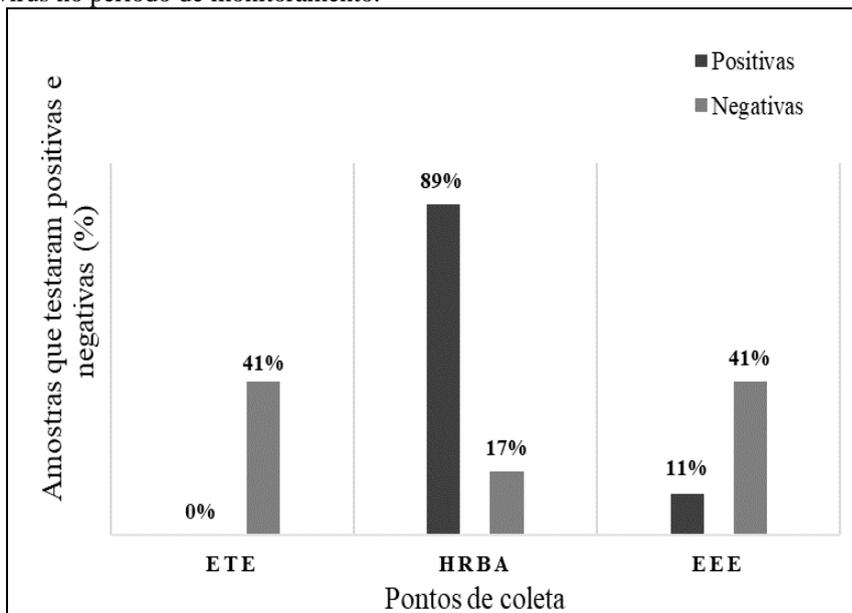
Fonte: Autor (2022).

De acordo com os resultados acima, houve diferenças bem expressivas em relação aos alvos E/RP, pois o número de amostras detectadas com a presença do vírus SARS-CoV-2 foram pequenas mesmo considerando o número pequeno de amostras.

Bustin et al. (2009), são categóricos quanto ao rigor para o uso da técnica de RT-qPCR aplicada ao diagnóstico clínico, o que para um resultado ser considerado positivo para a presença do vírus SARS-CoV-2 os dois alvos testados têm que amplificar o sinal genético ultrapassando o limiar de detecção antes de 40 ciclos da reação. Ao contrário disso, ou quando a amplificação ocorrer após 40 ciclos, os resultados são considerados inconclusivos.

Dentre esse percentual de amostras positivas detectadas durante o monitoramento do vírus no esgoto nos três pontos amostrais, em relação ao total de amostras coletadas e analisadas (N=38) a ETE não apresentou amostras positiva para a presença do vírus SARS-CoV-2 (N=0) o HRBA obteve 89% (N=08) e a EEE 11% (N=01). Quanto ao percentual de amostras negativas a ETE e EEE apresentaram 41% (N=12) respectivamente e o HRBA 17% (N=05) conforme a figura 25.

Figura 25 - Percentuais das amostras nos três pontos amostrais, que testaram positivo e negativo para ocorrência do novo coronavírus no período de monitoramento.



Fonte: Autor (2022).

As águas residuárias podem conter potencialmente uma certa concentração do Coronavírus, além dos vírus entéricos, o que difere para a detecção ou não, por vezes está relacionado com a forma de coleta, o tempo de amostragem bem como o armazenamento das amostras durante a coleta, dentre outros fatores ambientais também que devem ser considerados neste estudo quanto a viabilidade do vírus em água residuárias.

O percentual de amostras positivas para o vírus SARS-CoV-2 foi maior na rede hospitalar, o que pode estar atribuído a infraestrutura do sistema de esgotamento local (sistema fechado), sem contribuição de águas pluviais e infiltração, uma vez que a distância da rede de distribuição do esgoto é bem curta, que proporcionalmente o esgoto chega mais concentrado, conseqüentemente há maior concentração viral presente, tornando favorável para sensibilidade analítica.

5.4 Resultados quantitativos

Contudo, as amostras que foram analisadas referentes aos pontos de amostragem, apresenta cada nucleotídeo que teve a fluorescência em um determinado comprimento de onda, captado pelo leitor do termociclador, onde esses dados foram analisados por um programa resultando no diagnóstico quantitativo (carga viral/nº cópias).

A concentração viral do SARS-CoV-2 (gene E) foi detectada com presença em 9 amostras (H₁, H₂, H₃, H₄, H₅, H₆, E₆, H₇ e H₈). Em relação as amostras que não detectaram a

presença de RNase P também foram 9 (T₁, H₁, T₂, H₂, T₃, T₅, T₆, E₈, T₉). E amostras que detectaram o gene RP e não detectaram o gene E foram 22 (E₁, E₂, E₃, E₄, E₅, T₇, E₈, T₈, H₉, E₉, T₁₀, H₁₀, E₁₀, T₁₁, H₁₁, E₁₁, T₁₂, H₁₂, E₁₂, T₁₃, H₁₃, E₁₃) conforme os dados expostos na tabela 13.

Tabela 13 – Concentração viral dos alvos E/RP detectada nas amostras de água residuária.

Amostras	E	RP
T ₁	–	–
H ₁	36,4	–
E ₁	–	33,93
T ₂	–	–
H ₂	34,78	–
E ₂	–	34,12
T ₃	–	–
H ₃	36,81	34,41
E ₃	–	33,46
T ₄	Não houve análise	Não houve análise
H ₄	37,51	34,4
E ₄	–	34,68
T ₅	–	–
H ₅	34,34	39,66
E ₅	–	33,8
T ₆	–	–
H ₆	35,82	32,81
E ₆	36,02	34,08
T ₇	–	36,48
H ₇	35,63	32,8
E ₇	–	30,97
T ₈	–	30,81
H ₈	38,52	31,91
E ₈	–	–
T ₉	–	–
H ₉	–	32,42
E ₉	–	33,5
T ₁₀	–	37,75
H ₁₀	–	30,24
E ₁₀	–	31,7
T ₁₁	–	35,99
H ₁₁	–	32,75
E ₁₁	–	33
T ₁₂	–	36,04
H ₁₂	–	36,16

E ₁₂	–	34,11
T ₁₃		38,23
H ₁₃	–	34,54
E ₁₃	–	34,87

Fonte: Autor (2022).

Observa-se nos dados analisados conforme os critérios para aceitação dos Controle Negativo e do Controle Positivo e da interpretação dos resultados para detecção dos alvos E/RP estabelecidos pelo protocolo, que nas amostras que não detectaram a presença de RNase P, é importante mencionar que duas amostras (H₁ e H₂) apresentaram gene E com CT de 36,4 e 34,78 respectivamente, esses valores são menores que 40 ($40 < CT \leq 45$) atribuindo ao um resultado inconclusivo e neste caso é recomendado repetir extração e RT-PCR. Contudo, os resultados descartados foram apenas que não ocorreram a detecção de amplificação para o alvo viral gene E nas amostras.

As amostras que detectaram RP e não detectaram o gene E, imediatamente não houve a detecção da presença do SARS-CoV-2. Em relação as amostras que houveram presença do gene E, todas apresentaram $CT \leq 40$ resultando na detecção do vírus do SARS-CoV-2 em água residuária.

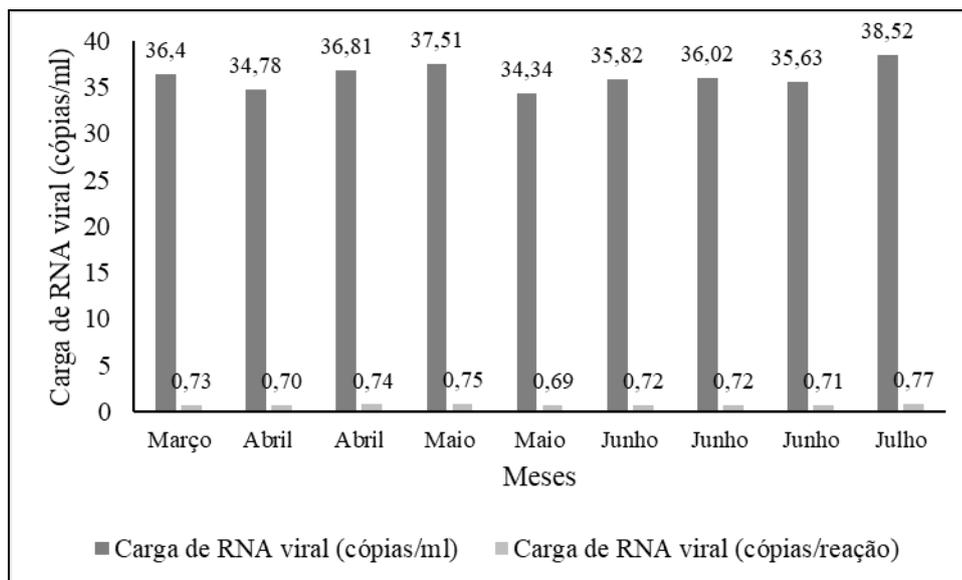
Porém Li Yao et., (2020) alegam que quando um resultado é positivo para SARS-CoV-2, existe um prognóstico de confirmação do diagnóstico de COVID-19, ainda que não haja sintomas, porém um resultado não detectável há a probabilidade de infecção pelo SARS-CoV-2, em virtude da coleta inadequada da amostra e a baixa carga viral que são capazes de converter na presença de ácido nucleico viral abaixo da sensibilidade analítica.

5.5 Concentração de RNA viral do SARS-CoV-2 por reação

Conforme o limite mínimo de cópias/reação estabelecido pelo protocolo Charité (Alemanha) de 50 cópias por reações, os resultados apresentados na figura 26, têm-se números mínimos de cópias amplificadas nas reações.

Observa-se que o alvo E apresentou resultado positivo de amplificação em concentrações baixas como reportados no mês de maio com limite mínimo de 0,69 cópias/reações em concentração de 34,34 cópias/ml, essas concentrações não ultrapassaram de 0,77 cópias/reações, valor mínimo detectado em 38,52 cópias/ml no mês de julho e todo o período de monitoramento.

Figura 26 - Gráfico da carga de RNA viral (SARS-CoV-2) determinadas no esgoto, para o alvo E referentes às amostras que foram positivas durante os meses de monitoramento em águas residuárias no município de Santarém.



Fonte: Autor (2022).

Os dados relatam apenas para os resultados que apresentaram presença do vírus SARS-CoV-2 em todas as amostras analisadas. Neste caso não foi realizado o limite mínimo para o alvo RP. A sensibilidade está relacionada ao número mínimo de cópias que pode ser avaliado com precisão em uma amostra, o que quer dizer, o número mínimo de cópias amplificadas na reação e, logo, se tem a menor concentração que pode ser detectada na amostra em número de cópias por ml (NALLA et al., 2020).

Na literatura existe trabalhos que relataram valores para a região alvo da presença e quantificação do material genético do SARS-CoV-2 com valores baixos e outros acima do que o registrado neste trabalho. Ahmed et al. (2020) detectaram 0,12 cópias/ml em amostras de esgoto na Austrália, em contra partida Wu et al. (2020) detectaram de 10 a 100 cópias/ml nos Estados Unidos e Randazzo et al. (2020) na Espanha, registraram 553 cópias/ml para o alvo N2, para amostras de esgoto afluentes a ETEs.

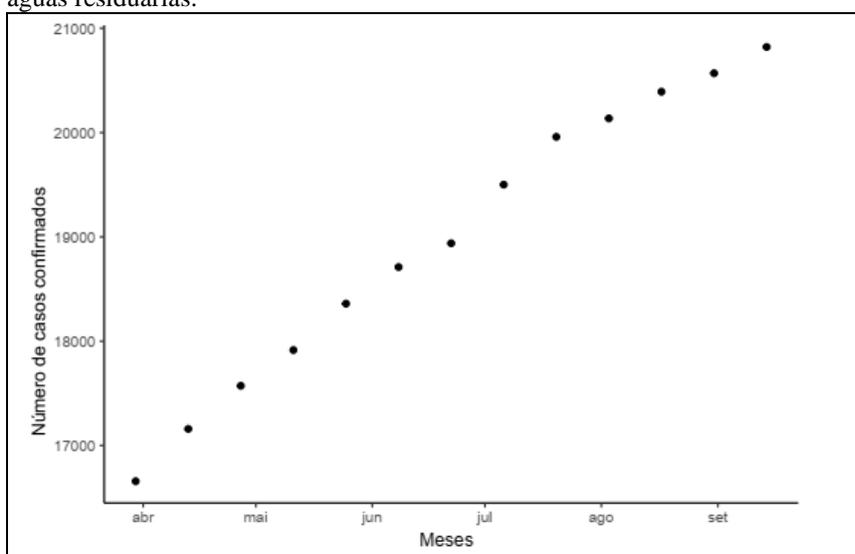
Portanto, percebe-se que na literatura ainda não um consenso desses valores adequados para a região alvo da presença e quantificação do material genético do SARS-CoV-2, os resultados acima, ainda que baixos, demonstrou ser adequado para avaliação das amostras de esgoto coletas nos pontos de amostragens que foram amostras de afluentes de ETEs.

5.6 Comparação com a concentração viral detectada nos pontos amostrais com os índices de saúde pública no município de Santarém.

Paralelamente, foi realizado um levantamento de informações relacionadas aos dados de saúde no âmbito da pandemia, divulgados pela Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Pará (SESPA), em conjunto com a Prefeitura do município de Santarém que atualiza e divulga o boletim da Covid-19 a cada 24h. O boletim informa os casos confirmados, quantidade de pessoas recuperadas, números de óbitos, casos descartados (negativos), quantidade de leitos clínicos hospitalares disponíveis e ocupados no município, bem como na rede hospitalar.

A primeira determinação das coletas ocorreu no fim do mês de março, onde os casos confirmados eram 16.657 no município, na 2ª e 3ª determinação ocorreram no mês de abril na ocasião tinham 17.159 e 17.572 casos confirmados respectivamente. No mês de maio (4ª e 5ª determinação) tinha 17.915 e 18.360 casos confirmados respectivamente, seguindo para o mês de junho (determinações 6ª e 7ª) com 18.711 e 18.939 respectivamente. Em julho (determinação 8ª e 9ª) tinha 19.501 e 19.959 casos confirmados. Agosto (determinações 10ª, 11ª e 12ª) os casos eram de 20.136, 20.392, 20.569 e no final das coletas no mês de setembro (determinação 13ª) tinha 20.821 casos confirmados no município (Figura 27).

Figura 27 - Gráfico dos números de casos confirmados no município de Santarém durante o período de coleta das amostras de águas residuárias.



Fonte: Autor (2022).

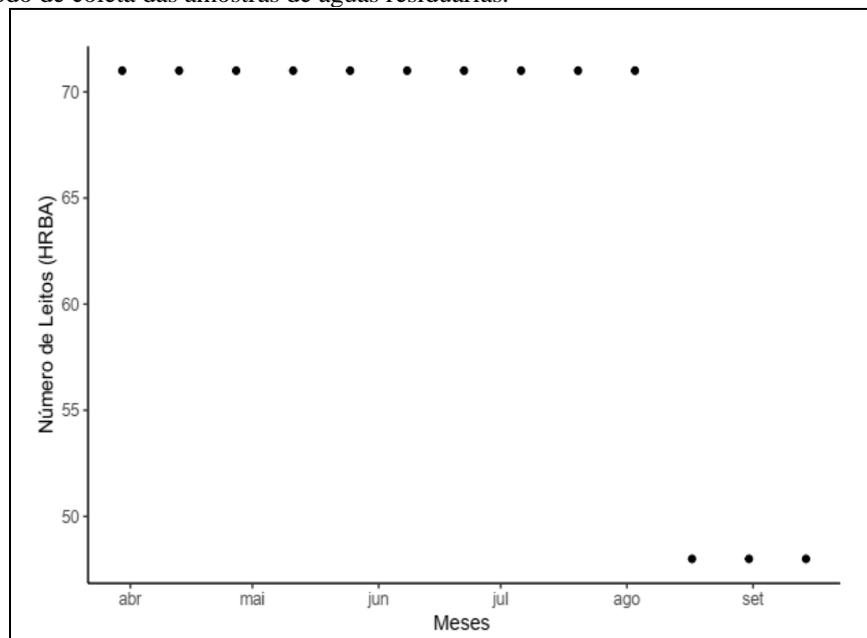
O intervalo de uma coleta para outra foi de 15 (quinze) dias, conforme os dados, o número de casos confirmados estava aumentando em média de 347 novos casos neste intervalo. Quanto aos dados clínicos do hospital no mesmo período relatados acima

(determinações) o hospital regional tinha no momento 71 leitos de UTI exclusivo para covid-19 disponíveis até início de agosto, na segunda quinzena de agosto, esse número de leitos caiu para 48 mantendo-se até setembro, mês da última coleta. Paralelamente, atendendo pacientes positivados e suspeitos com o vírus da COVID-19 (Figura 28).

Desse total de leitos disponível (n=71) havia 60 leitos (84,51%) ocupados com 55 pacientes positivados e 05 suspeitos na 1ª determinação que ocorreu no final do mês de março. Nas determinações seguintes (2ª e 3ª) no mês de abril haviam 56 e 57 pacientes ocupando leitos, dentre esses pacientes 2 e 3 eram suspeitos respectivamente. Em maio (4ª e 5ª) a quantidade de leitos ocupados começaram a diminuir para 54 e 47 leitos, no qual 5 e 10 casos eram suspeitos (Figura 29) a visualização dos casos confirmados e suspeitos estão apresentados nas (Figura 30 – A e B).

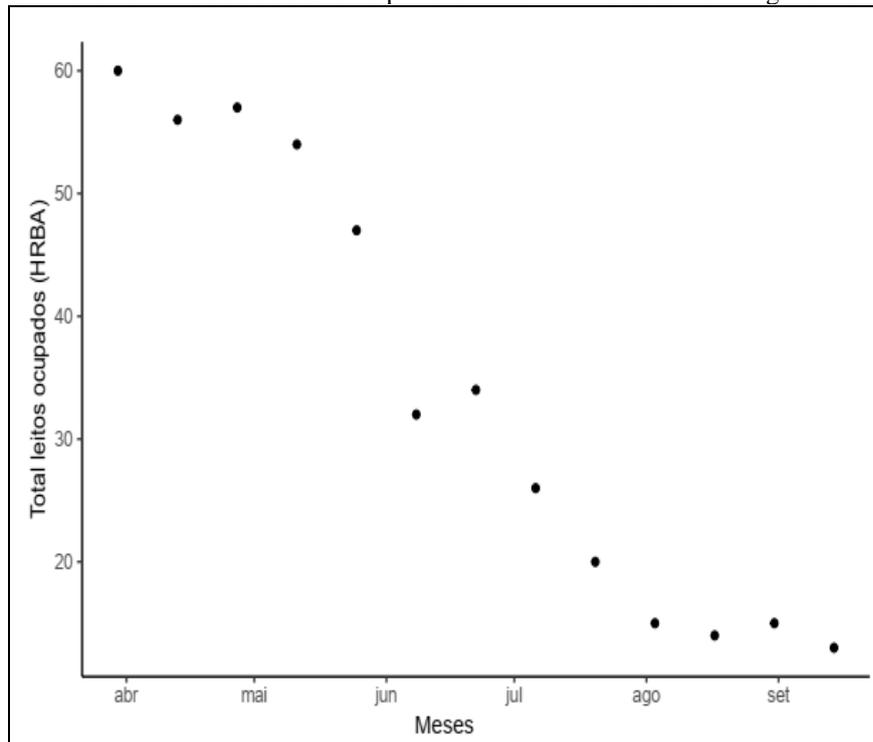
Ainda na figura 30 na 6ª e 7ª determinações que ocorreram no mês de junho haviam 21 e 26 pacientes positivados, 11 e 08 casos suspeitos ocupando 32 e 34 leitos. No mês de julho (8ª e 9ª) os casos positivados eram 18 e 14 e os casos suspeitos 08 e 06 ocupando apenas 26 e 20 leitos do total disponível. Em agosto, houve três determinações (10ª, 11ª e 12ª) nesse período os números de casos positivos eram bem mais baixos mantendo com 12 casos suspeitos e diminuindo para 11 no final do mês, e com 3, 2 e 4 casos suspeitos ocupando 15, 14 e 15 leitos respectivamente. Em setembro na última determinação (13ª) na ocasião tinha apenas 9 casos positivados, 4 suspeitos ocupando 13 leitos do total disponível.

Figura 28 – Gráfico da quantidade de leitos disponíveis para pacientes infectados pelo vírus da COVID-19 no HRBA no período de coleta das amostras de águas residuárias.



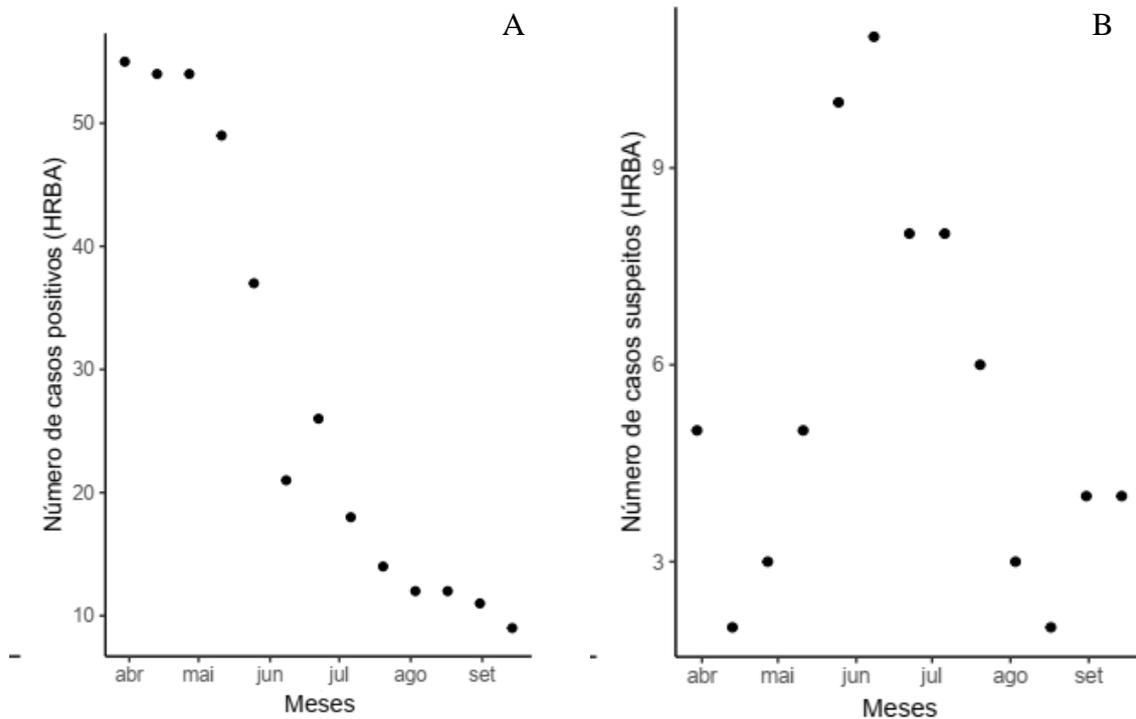
Fonte: Autor (2022).

Figura 29 - Gráfico do total de leitos no HRBA no período de coleta das amostras de águas residuárias.



Fonte: Autor (2022).

Figura 30 - Gráfico dos dados clínicos da COVID-19 no HRBA no período de coleta das amostras de águas residuárias. A: Números de casos positivos; B: Casos suspeitos.



Fonte: Autor (2022).

A concentração viral, avaliada a partir da contribuição que chegava à estação de tratamento do hospital antes do tratamento, com base no número de leitos ocupados na data da coleta de água residuária, observa-se durante o monitoramento (30/04 até 14/09) a concentração viral detectada no esgoto hospitalar apresenta uma relação com a quantidade de infectados internados naquele período, ainda que em alguns momentos o número de leitos ocupados diminui, a concentração viral continua detectável para o SARS-CoV-2.

Ressalta-se para as últimas 5 coletas onde não houve a detecção do vírus, mesmo que, naquele período apresentava leitos ocupados com pacientes infectados e suspeitos, o que pode estar relacionado com a diminuição dos casos positivos, uma vez que, do dia 20 de julho até 14 de setembro houve diminuição no total de leitos disponíveis (n=71) para 41 leitos, respectivamente nesse período estavam ocupados com 20, 14, 15 e 13 pacientes positivados e suspeitos, e sem pacientes na fila de espera para ocupar leitos.

Da mesma maneira a concentração viral detectada no dia 06 de julho era muito baixa (38,52), com 26 pacientes positivados e suspeitos internados ocupando leitos, o que nas próximas data de coletas não houve mais a detecção do vírus SARS-CoV-2 e paralelamente houve a diminuição de pacientes infectados e suspeitos internados.

Em virtude dessa diminuição, pode-se dizer também que houve a diminuição da carga orgânica excretada, visto que no esgoto, as fezes sofrem diluição e a carga viral diminui consideravelmente nas águas residuais que entram em uma estação de tratamento, bem como a viabilidade do SARS-CoV-2 diminui em águas residuárias, devido a fatores ambientais como, temperatura, pH, sólidos, micropoluentes, e também a produtos surfactantes.

Conforme as características físico-química das águas residuárias, apresentaram características peculiares para a diminuição do vírus, como a temperatura, a DQO e os sólidos, este, afeta diretamente a massa viral de RNA do vírus.

Contudo, estudos relataram a presença do vírus SARS-CoV-2 antes mesmo dos testes clínicos (MEDEMA et al., 2020 e TROTTIER et al., 2020). Porém a detecção de RNA do SARS-CoV-2 em água residuárias podem coincidir com as datas dos testes virológicos de laboratórios, sendo detectável entre 5 a 8 dias após a infecção, que em seguida acontece a hospitalização que geralmente ocorre entre 3 e 9 dias após o início dos sintomas, em vista disso, são eventos que podem contribuir e coincidir para a presença do vírus no esgoto (NEMUDRYI et al., 2020).

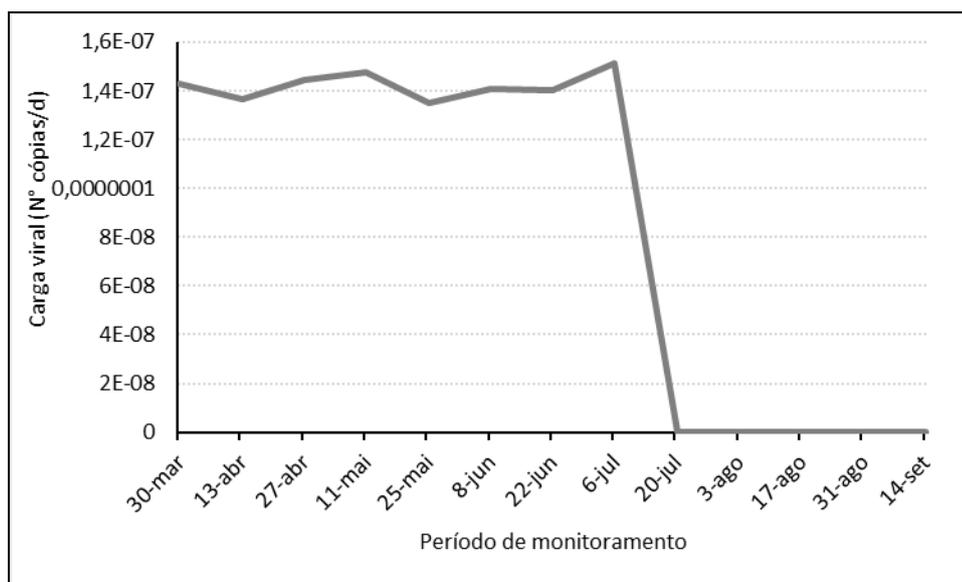
Nghiem et al. (2020) citam que o coronavírus resiste a curtos períodos em água residuárias, 99,9% deles são inativados em 2 ou 3 dias, mas não descartam a possibilidade de contaminação via oral fecal, reiterando que esse potencial de transmissão precisa ser mais explorado.

5.7 Estimativa populacional de infectados com o coronavírus

Não foi possível realizar a estimativa de casos de infectados na área abrangente a ETE e EEE por apresentarem resultados insuficientes (negativos) exceto na EEE que apresentou a presença do vírus inativo em um dia apenas. Portanto, os resultados apresentados e estimativa serão feitos com base nos resultados detectados para a presença do vírus SARS-CoV-2 no hospital.

A Figura 31 apresenta a tendência da carga viral (cópias/dia) associada ao SARS-CoV-2 detectada no hospital de referência para COVID-19 no período de monitoramento do esgoto realizado em Santarém, no qual esse período compreende de 30 de março de 2021 a 14 de setembro de 2021.

Figura 31 - Carga de RNA (número de cópias por dia) do SARS-CoV-2 no esgoto bruto afluente à ETE do HRBA.



Fonte: Autor (2022).

A população infectada estimada, obtida a partir da conversão da carga viral apresentada, estimou-se que cada pessoa infectada ou suspeitos excretava uma carga viral de 2×10^7 (carga viral *per capita*), considerando que uma pessoa excreta 200g de fezes por dia, por se tratar de amostras coletadas em hospital, onde possui uma probabilidade maior de fezes

depositada na rede de esgoto. Esse valor adotado foi obtido com base nas referências internacionais citadas (para amostras de fezes), considerando que uma pessoa excreta cerca de 200g de fezes por dia (WU et al., 2020a).

E com base na caracterização físico-química realizada nas amostras, os parâmetros como a Demanda Química de Oxigênio (Figura 18) e o Nitrogênio Amoniacal (Figura 19) apresentaram características importantes para uma avaliação mais contundente dos dados obtidos da concentração viral detectada, que serviram de indicadores para a poluição orgânica, ou seja, apresentou a presença de excretas, urinas e fezes de seres vivos.

Nota-se também a detecção do vírus foi possível identificar e quantificar logo no início do monitoramento até a 8ª coleta, em seguida os resultados foram negativos para a presença do vírus. Interessante observar que neste período haviam pessoas infectadas confirmadas e suspeitas, conforme mostrado na figura 30 – A e B, o que se pode relacionar indiretamente entre o incremento das cargas virais e o aumento e a diminuição do número de casos confirmados e suspeitos a cada mês de coleta das amostras de água residuárias.

Logo, a diminuição no número de casos confirmados não significa que houve diminuição da circulação do vírus, no contrário podemos dizer que houve a redução das cargas virais detectadas a partir do monitoramento do esgoto. Também pode-se relacionar os valores negativos e muito baixos, pelo fato de as amostras estatisticamente serem independentes, por se tratar de amostras pequenas. Hart e Halden (2020) relatam que um indivíduo infectado pode ser detectado em até 2.000.000 de pessoas, o que está associado ao limite de detecção da carga viral por reação.

Apesar desse fator de conversão da carga viral detectada no esgoto com o número de pessoas infectadas ainda ser incerto, uma vez que pode haver variação em uma faixa bastante ampla, de mais de 5 ordens de grandeza (WÖLFEL et al., 2020; WU et al., 2020; MIURA et al., 2021). Contudo, o indicador utilizado neste estudo foi possível expressar de forma clara e direta, a evolução da circulação do novo coronavírus em Santarém conforme as variações decorrentes do início do monitoramento do material genético do vírus.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da detecção via análise molecular por PCR quantitativo-qPCR em tempo real, foi determinado a presença do SARS-CoV-2 (inativo) e de RNase P nas amostras de águas residuárias coletadas. Considerou-se as aplicações classificadas qualitativa, para a detecção da molécula de RNA do vírus SARS-CoV-2 para o diagnóstico positivo ou negativo (+/-) e quantitativa para a quantificação absoluta (carga viral/nº cópias).

As amostras detectadas com a presença do vírus SARS-CoV-2 apresentaram carga viral abaixo do valor limite permitido, o que confirmou a detecção do vírus do SARS-CoV-2 em água residuária, com limite mínimo de cópias/reação. A partir dos valores encontrados no ciclo limiar estimou a população infectada, não foi possível realizar na ETE e EEE, foi feita apenas no hospital a partir da conversão da carga viral detectada no esgoto.

As águas residuárias das três estações de tratamento apresentaram características físico-química peculiares para a diminuição do vírus, como a temperatura, a DQO e os sólidos, que afetam diretamente a massa viral de RNA do vírus.

A partir do entendimento do comportamento sazonais na região, compreendendo entre período chuvoso e não chuvoso, ressalta-se que em sistemas precários pode haver infiltração e contribuição das águas pluviais, bem como, baixa carga orgânica, logo, as fezes sofrem diluição e a carga viral diminui consideravelmente nas águas residuais que entram em uma estação de tratamento, bem como a viabilidade do SARS-CoV-2 diminui em águas residuárias, devido a alguns fatores ambientais.

O estudo constatou que é possível realizar o monitoramento epidemiológico baseado em águas residuárias para a detecção da carga viral do vírus SARS-CoV-2 em pontos estratégicos de esgotamento sanitário, ainda que sistemas apresente dificuldades na infraestrutura e baixos índices de esgotamento no município.

REFERÊNCIAS

ADELODUN, B.; AJIBADE, F. O.; IBRAHIM, R. G.; BAKARE, H. O.; CHOI, K.-S. Snowballing transmission of COVID-19 (SARS-CoV-2) through wastewater: Any sustainable preventive measures to curtail the scourge in low-income countries? **Science of the Total Environment**, v. 742, 2020.

AHMED W., BERTSCH P.M., BIVINS A., BIBBY K., FARKAS K., GATHERCOLE A., HARAMOTO E., GYAWALI P., KORAJKIC A., MCMINN B. R., MUELLER J. F., SIMPSON S. L., SMITH W. J. M., SYMONDS E. M., THOMAS K. V., VERHAGEN R., KITAJIMA M. Comparison of virus concentration methods for the RT-qPCR-based recovery of murine hepatitis virus, a surrogate for SARS-CoV-2 from untreated wastewater. **Science of the Total Environment**, 739 (139960), 1-8. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.139960, 2020b.

AHMED, W.; ANGEL, N.; EDSON, J.; BIBBY, K.; BIVINS, A.; O'BRIEN, J. W.; CHOI, P. M.; KITAJIMA, M.; SIMPSON, S. L.; LI, J.; TSCHARKE, B.; VERHAGEN, R.; SMITH, W. J. M.; ZAUGG, J.; DIERENS, L.; HUGENHOLTZ, P.; THOMAS, K. V; MUELLER, J F.; **SCI. Total Environ.** 138764, 2020.

AHMED, W.; ANGEL, N.; EDSON, J.; 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**, v. 728, 2020.

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22th. Washington: Public Health Association, 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12209**: elaboração de Projetos Hidráulico-sanitários de Estações de Tratamento de Esgotos Sanitários. Rio de Janeiro, 2011.

BELEI, R. A.; GIMENIZ-PASCHOAL, S. R.; NASCIMENTO, E. N.; MATSUMOTO, P. H. V. R. O uso de entrevista, observação e vídeo gravação em pesquisa qualitativa. Cadernos de educação, FAE/PPGE/UFPEL, Pelotas, v. 30, p. 187-199, jan/jun. 2008.

BERNAMA.com. Esgoto pode ajudar a detectar casos assintomáticos Covid-19. Agência Nacional de Notícias da Malásia, 22 abr. 2020. Disponível em: <https://www.bernama.com/en/news.php?id=1834528>. Acesso em: 25 jan. 2021.

BOGLER, A., PACKMAN, A., FURMAN, A. *et al.* Rethinking wastewater risks and monitoring in light of the COVID-19 pandemic. **Nat Sustain** 3, 981–990. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41893-020-00605-2>. Acesso em: 29 jan.2020.

BRASIL. Ministério da saúde. Portaria nº 188/20. URL. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Portaria/Portaria-188-20-ms.htm. Acesso em: 30 jan. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Recomendações para prevenção do contágio da covid-19 (novo coronavírus) pela água e por esgoto doméstico. Sala Técnica de Saneamento . Cartilha.

Disponível em: Cartilha_Sala_de_Sanamento_COVID-19_versão_28_03_2020. Acesso em: 30 nov. 2021.

BRESSANI-RIBEIRO, T.; CHERNICHARO, C.A.L.; MOTA FILHO, C.R.; ARAÚJO, J.C.; LEAL, C.D.; LEROY, D.; MACHADO, E.; SPINOSA, F.; FERNANDES, L.; LEÃO, T. Estimando a carga viral de portadores do SARS-CoV-2 a partir do monitoramento do esgoto hospitalar. (no prelo)

BUCHAUER, K. A. A comparison of two simple titration procedures to determine volatile fatty acids in effluents to waste – water and sludge treatment processes. **Water S. A.** v. 1, n.24, p. 49 – 56, 1998.

BUSTIN AS, Nolan T. RT-qPCR Testing of SARS-CoV-2: A Primer. *Intl J Mol Sci.*2020; 21. CASANOVA, L., RUTALA, WA, WEBER, DJ & SOBSEY, MD. Survival of coronavirus substitutes in water. **Water Res.** 43, 1893–1898, 2009.

CENTERS FOR DISEASE AND PREVENTION. CDC 24/7. Uso da pesquisa apenas 2019-Novo Coronavírus (2019-nCoV) Primers e sondas RT-PCR em tempo real. Centro Nacional de Imunizações e Doenças Respiratórias (NCIRD), Divisão de Doenças Virais, Atlanta, GA, EUA, 6 jun. 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>. Acesso em: 10 dez. 2020.

CHEN, Y.; RANDALL, A.A.; McCUE, T. The efficiency of enhanced biological phosphorus removal from real wastewater affected by different ratios of acetic to propionic acid. **Water Research**, London, v. 38, n. 1, p. 27-36, 2004.

CHIN, AWH et al. Estabilidade do SARS-CoV-2 em diferentes ambientes condições. **Lancet Microbe** 1, e10 (2020).

CORMAN Victor M, Landt Olfert, Kaiser Marco, Molenkamp Richard, Meijer Adam, Chu Daniel KW, Bleicker Tobias, Brünink Sebastian, Schneider Julia, Schmidt Marie Luisa, Mulders Daphne GJC, Haagmans Bart L, van der Veer Bas, van den Brink Sharon, Wijsman Lisa, Goderski Gabriel, Romette Jean-Louis, Ellis Joanna, Zambon Maria, Peiris Malik, Goossens Herman, Reusken Chantal, Koopmans Marion PG, Drosten Christian. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. **Euro Surveill.** 2020;25(3):pii=2000045. Disponível em: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>. Acesso em: 10 dez. 2020.

D. WRAPP, N. WANG, K.S. CORBETT, J.A. GOLDSMITH, C.L. HSIEH, O. ABIONA. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation **Science** (New York, NY). DOI: 10.1126/science.abb2507. (2020).

DAUGHTON, C. G. Wastewater surveillance for population-wide COVID-19: The present and future. **Science of the Total Environment**, v. 736, 2020.

DECARO, N. & BUONAVOGLIA, C. Uma atualização sobre coronavírus caninos: vira evolução e patobiologia. **Veterinario. Microbiol.** 132, 221–234 (2008).

DING, S.; LIANG, T. J. Is SARS-CoV-2 Also an Enteric Pathogen With Potential Fecal–Oral Transmission? A COVID-19 Virological and Clinical Review. **Gastroenterology**, 2020.

DUAN, S.-M. et al. Estabilidade do coronavírus SARS em amostras humanas e ambiente e sua sensibilidade ao aquecimento e à radiação ultravioleta. **Biomed. Environ. Sci.** 16, 246–255 (2003).

EXTRAÇÃO automatizada de DNA/RNA de qualquer amostra. PROMEGA. Disponível em: <https://www.promega.com.br/products/lab-automation/automated-dna-rna-extraction-purification-maxwell/>. Acesso em: 15 jan. 2022.

FIOCRUZ divulga estudo sobre presença do novo coronavírus em esgotos sanitários. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 28 mar. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/fiocruz-divulga-estudo-sobre-presenca-do-novo-coronavirus-em-esgotos-sanitarios>. Acesso em: 10 jan. 2021.

FONGARO, G.; STOCO, P. H.; SOUZA, D. S. M.; et al. SARS-CoV-2 in human sewage in Santa Catarina, Brazil, nov. 2019. medRxiv, 2020.

GELLER, C., VARBANOV, M. & DUVAL, RE Human coronaviruses: insights into environmental resistance and its influence on the development of new antiseptic strategies. *Viruses* 4, 3044–3068 (2012).

GIL, A. C. Métodos e técnicas de pesquisa social. 5.ed. São Paulo: Atlas, 1999.

GRUPO da UFMG vai monitorar o novo coronavírus no esgoto em BH e Contagem. Universidade Federal de Minas Gerais, 27 abr. 2020. Disponível em: <https://ufmg.br/comunicacao/noticias/grupo-da-ufmg-executa-projeto-piloto-de-monitoramento-da-covid-19-no-esgoto>. Acesso em: 25 jan. 2021.

GUNDY, PM, GERBA, CP & PEPPER, IL Survival of coronaviruses in water and wastewater. **Food Env. Virol.** 1, 10–14 (2009).

GUPTA, S.; PARKER, J.; UNDERWOOD, J., DOLWANI, S. Persistent viral shedding of SARS-CoV-2 in faeces – a rapid review. **Colorectal Disease**, v. 22, n. 6, 2020.

HARAMOTO E., KITAJIMA M., KATAYAMA H., ITO T., OHGAKI S. Development of virus concentration method for detection of koi herpesvirus in water. *Journal of Fish Diseases* 32(3), 297-300. DOI: 10.1111/j.1365- 2761.2008.00977.x (2009).

HART, OE & HALDEN, RU Computational analysis of SARS-CoV-2 / Vigilância COVID-19 por epidemiologia baseada em águas residuais localmente e globalmente: viabilidade, economia, oportunidades e desafios. **Sci. Total Environ.** 730, 138875 (2020).

HELLER, L.; MOTA, C. R.; GRECO, D. B. COVID-19 faecal-oral transmission: Are we asking the right questions? **Science of the Total Environment**, v. 729, 2020.

HOLSHUE, M. L.; DEBOLT, C.; LINDQUIST, S.; LOFY, K. H.; WIESMAN, J.; BRUCE, H.; SPITTERS, C.; ERICSON, K.; WILKERSON, S.; TURAL, A.; DIAZ, G.; COHN, A.; FOX, L.; PATEL, A.; GERBER, S. I.; KIM, L.; TONG, S.; LU, X.; LINDSTROM, S.; PALLANSCH, M. A.; WELDON, W. C.; BIGGS, H. M.; UYEKI, T. M.; PILLAI, S. K.

FIRST. Case of 2019 Novel Coronavirus in the United States. *N. Engl. J. Med.*, 382 (10), 929–936. 2020.

HUANG, C.; WANG, Y.; LI, X.; REN, L.; ZHAO, J.; HU, Y.; ZHANG, L.; FAN, G.; XU, J.; GU, X. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, 395, 497–506. 2020.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Panorama: População; Ranking. Brasil, 2017.

INCT - ETES SUSTENTÁVEIS. Covid 19 e o saneamento no Brasil. Nota Técnica. Disponível em <https://etes-sustentaveis.org/>. Acesso em: 10 jan. 2021.

Instituto em Tecnologia em imunobiológicos – Bio- Manguinhos/FIOCRUZ. Manual: molec-sars-cov2-e-rp-rox-2x48r-25-06-2020-lotes-06ao030. Kit molecular SARS-CoV-2 (E/RP).

JOHN, DE & ROSE, JB Revisão dos fatores que afetam a sobrevivência microbiana em lençóis freáticos. *Environ. Sci. Technol.* 39, 7345–7356 (2005).

JORDÃO, E. P.; PESSÔA, C. A. Tratamento de esgotos domésticos. Rio de Janeiro: ABES, 2011.

KAMPF, G., TODT, D., PFAENDER, S. & STEINMANN, E. Persistence of coronavirus em superfícies inanimadas e sua inativação com biocidas agentes. *J. Hosp. Infectar.* 104, 246–251 (2020).

KITAJIMA, M. et al. SARS-CoV-2 em águas residuais: estado do conhecimento e necessidades de pesquisa. *Sci. Total Environ.* 739, 139076 (2020).

LAI, MYY, CHENG, PKC & LIM, WWL Survival of graves agudos síndrome respiratória coronavirus. *Clin. Infectar. Dis.* 41, 67–71 (2005).

LEE CY-P, LinRTP, Renia L, Ng LFP. Serological Approaches for COVID-19: Epidemiologic Perspective on Surveillance and Control. *Front. Immunol.* 2020;11. Doi:10.3389/fimmu.2020.00879.

LI Y, Yao L, Li J, Chen L, Song Y, Cai Z, et al. Stability issues of RT-PCR testing of SARS CoV-2 for hospitalized patients clinically diagnosed with COVID-19. *J Med Virol.* 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jmv.25786>. Acesso em: 03 jan.2021.

LODDER, W., DE RODA HUSMAN, AM, SARS-CoV-2 em águas residuais: potencial risco para a saúde, mas também fonte de dados. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 2020. Disponível em: [https://doi.org/10.1016 / S2468-1253 \(20\) 30087-X](https://doi.org/10.1016 / S2468-1253 (20) 30087-X). Acesso em: 15 dez 2020.

LU R., ZHAO X., LI J., NIU P., YANG B., WU H., WANG W., SONG H., HUANG B., ZHU N., BI Y. Genomic characterization and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet.*;395:565–574, (2020).

MALIK Y.S., SIRCAR S., BHAT S., SHARUN K., DHAMA K., DADAR M., TIWARI R., CHAICUMPA W. Emerging novel coronavirus (2019-nCoV) current scenario, evolutionary perspective based on genome analysis and recent developments. *Vet. Q.*; 40:68–76(2020).

MALLAPATY, S. How esgoto poderia revelar a escala real do surto de coronavírus. (2020) **Natureza**. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/d41586-020-00973-x>. Acesso em 20 dez. 2020.

MAO, K.; ZHANG, H.; YANG, H. Can a Paper-Based Device Trace COVID-19 Sources with Wastewater-Based Epidemiology? **Environ. Sci. Technol.** 54, 3733–3735. (2020) Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1021/acs.est.0c01174>. Acesso em: 10 jan.2021.

MEDEMA, G., HEIJNEN, L., ELSINGA, G., ITALIAANDER, R. & BROUWER, A. Presence de SARS-Coronavirus-2 em esgotos e correlação com COVID-19 relatado prevalência na fase inicial da epidemia na Holanda. **Environ. Sci. Technol. Lett.** 7, 511-516 (2020).

MELLO AZEVEDO S/A. Manual Técnico Dbox, Sistema Integrado de Tratamento de Esgotos Sanitários: Operação, manutenção, equipamentos, instrumentos e desenhos. Construtora Mello Azevedo S/A, Santarém, 2016.

MENEZES ME. Diagnóstico laboratorial do coronavirus do coronavirus (SARS-CoV-2) causadora da COVID-19. COVID-19, Informes Técnicos 10 de Março de 2020. Disponível em <https://www.sbac.org.br/blog/2020/03/30/diagnostico-laboratorial-do-coronaviru-sars-cov2-causador-da-covid-19/>. Acesso em: 25 set. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Coronavírus Brasil. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br> Acesso em: 13 de fev. 2021.

NADDEO, V. & LIU, H. Perspectivas editoriais: romance coronavírus 2019 (SARS-CoV-2): qual o seu destino no ciclo hidrológico urbano e como pode a água comunidade de pesquisa responde? **Environ. Sci. Water Res. Technol.** 6, 1213–1216. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/D0EW90015J>. Acesso em: 17 fev. 2021.

NEMUDRYI, A., Nemudraia, A., Wiegand, T., Surya, K., Buyukyoruk, M., Cicha, C., Vanderwoord, KK, Wilkinson, R., Wiedenheft, B., 2020. Detecção temporal e avaliação Filogenética de SARS-CoV-2 em águas Residuais Municipais. Relatório de Célula. Medicini.

OMS. Organização Mundial da saúde. Declaração sobre a Segunda Reunião do Comitê de Emergência do Regulamento Sanitário Internacional (2005) sobre o surto do novo coronavírus (2019-nCoV). 2020. Disponível em: [https://www.who.int/es/news/item/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/es/news/item/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-(2019-ncov)). Acesso em: 30 jan. 2021.

ORIVE, G.; LERTXUNDI, U.; BARCELO, D. Early SARS-CoV-2 outbreak detection by sewage-based epidemiology. **Science of the Total Environment**, v. 732, 2020.

ORTIZ, Prado E, Simbana-Rivera K, Gomez-Barreno L, Rubio-Neira M, Guaman LP, Kyriakidis NC, et al. Clinical, molecular, and epidemiological characterization of the SARS-

CoV-2 virus and the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), a comprehensive literature review. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 2020;98(1):115094. Doi:10.1016/j.diagmicrobio.2020.115094.

PECCIA, J. et al. Concentrações de RNA SARS-CoV-2 em municípios primários Lodo de esgoto como principal indicador da dinâmica de surto de COVID-19. Pré-impressão em medRxiv. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2020.05.19.20105999>. Acesso em: 25 fev. 2020.

PORTUGAL vai analisar águas residuais para detectar SARS-CoV-2. Edição Imprensa Jornal P, 20 abr. 2020. Disponível em: <https://www.publico.pt/2020/04/20/ciencia/noticia/portugal-vai-analisaraguas-residuais-detectar-sarscov2-1913017>. Acesso em: 20 nov. 2020.

proj_de_lei_211_2021_junior_tapajos_criacao_bairro_res_salvacao.pdf. Disponível em: <https://santarem.pa.leg.br>. Acesso em: 28 dez. 2021.

RANDALL, C.; BARNARD, J.; STENSEL, H. D.; DUFRESNE, L. Nutrient control design manual. United States Environmental Protection Agency- USEPA. Scientific, Technical, Research, Engineering and Modeling Support (STREAMS). Task Order 68. Cincinnati: EPA, 2010. 347 p.

RANDAZZO, W. ET AL. Títulos de ARN SARS-CoV-2 em águas residuais antecipados Ocorrência de COVID-19 em área de baixa prevalência. **Water Res.** 181,115942 (2020b).

RANDAZZO, W., TRUCHADO, P., CUEVAS-FERRANDO, E., SIMÓN, P., ALLENDE, A., SÁNCHEZ, G. SARS-CoV-2 RNA em águas residuais antecipou a ocorrência de COVID-19 em um baixa área de prevalência. **Water Res.** 526 (1), 135-140, (2020). Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115942>. Acesso em: 17 jan. 2021.

REFERÊNCIA para casos graves da Covid-19, Hospital Regional do Baixo Amazonas recebe visita do governador. Hospital Regional do Baixo Amazonas, Santarém, 26 jan. Disponível em: <https://hrba.org.br/2021/01/26/referencia-para-casos-graves-da-covid-19-hospital-regional-do-baixo-amazonas-recebe-visita-do-governador/>. Acesso em: 27 jan. 2021.

RIMOLDI, SG, STEFANI, F., GIGANTIELLO, A., POLESELLO, S., COMANDATORE, F., MILETO, D., MARESCA, M., LONGOBARDI, C., MANCON, A., ROMERI, F., PAGANI, C., MOJA, L., GISMONDO, MR, SALERNO, Presença e vitalidade do vírus SARS-CoV-2 em águas residuais e rios. medRxiv. (2020). Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2020.05.01.20086009>. Acesso em: 26 jun. 2021.

ROSA, G. LA; IACONELLI, M.; MANCINI, P.; et al. First detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy. **Science of the Total Environment**, v. 736, 2020.

ROSS, BÁRBARA Z.L. Escuma de reatores anaeróbicos tratando esgotos domésticos em escala real: produção, caracterização e proposição de parâmetros para seu gerenciamento. Curitiba, 144p., 2015.

SÁNCHEZ, G. Metropolitan Wastewater Analysis for COVID-19 Epidemiological Surveillance. SSRN **Electronic Journal**, 2020a.

SESPA. Secretária de Saúde Pública do Governo do Estado do Pará. Disponível em: <http://www.saude.pa.gov.br/>. Acesso em: 31 jan. 2021.

SESPA. Secretária de Saúde Pública do Governo do Estado do Pará. Vigilância Epidemiológica. Monitoramento COVID-19. Atualizado em 13/02/2021 às 18:00h. Disponível em: <https://www.covid-19.pa.gov.br/#/> . Acesso em 13 fev. 2021.

SNIS- Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento. Diagnóstico Temático Serviços de Água e Esgoto 2021. Brasília, Ministério do Desenvolvimento Regional - Secretaria Nacional de Saneamento, 2021. Visão Geral ano de referência 2020.

SNIS. Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgoto – 2018. Brasília: SNSA/MCIDADES, 2019. 226p. Disponível em <http://snis.gov.br/diagnostico-agua-e-esgotos/diagnostico-ae2017>. Acesso em: 10 jan. 2021.

SYMONDS, E. M., VERBYLA, M. E., LUKASIK, J. O., KAFLE, R. C., BREITBART, M., MIHELICIC, J. R. A case study of enteric virus removal and insights into the associated risk of water reuse for two wastewater treatment pond systems in Bolívia. *Water Res.* 65, 257-270, (2014).

TEIXEIRA, D.M., SPADA, P.K.P., MORAIS, L.L., FUMIAN, T.M., LIMA, I.C.G., OLIVEIRA, D., BANDEIRA, R., GURJAO, T.C., SOUSA, M., MASCARENHAS, J.D., GABBAY, Y.B. Norovirus genogroups I and II in environmental water samples from Belém city, Northern Brazil. *J. Water and Health* 15 (1): 163-174. (2017).

TESTE de águas residuais pode fornecer aviso antecipado do COVID-19. WaterCanada, 31 mar. 2020. Disponível em: <https://www.watercanada.net/wastewater-test-could-provide-early-warning-of-covid-19/>. Acesso em: 26 nov. 2020.

TROTTIER, J., Darques, R., Ait Mouheb, N., Partiot, E., Bakchache, W., Deffieu, MS, Gaudin, R., 2020. Detecção pós-bloqueio de RNA SARS-CoV-2 nas águas residuais de Montpellier, França. *One Health* 10, 100157. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2020.100157>. Acesso em: 26 nov.2020.

VIEIRA,DP. Técnicas de PCR:Aplicações e Padronizações de Reções. São Paulo:2011. Disponível em: <http://www.imt.usp.br/wp-content/uploads/proto/protocolos/aula1.pdf>. Acesso 25 set. 2020.

VIEIRA,DP. Técnicas de PCR:Aplicações e Padronizações de Reções. São Paulo:2011. Disponível em: <http://www.imt.usp.br/wp-content/uploads/proto/protocolos/aula3.pdf>. Acesso 25 set. 2020.

VON SPERLING, M. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias; 3ªed. Belo Horizonte: DESA/UFMG, v 1, 452p. 2005.

VON SPERLING, M.; ANDRADE NETO, C. O.; VOLSCHAN JUNIOR, I.; FLORÊNCIO, L. Impacto dos nutrientes do esgoto lançado em corpos d'água. In: MOTA, F. S. B.; VON

SPERLING, M. (Coord). Nutrientes de esgoto sanitário: utilização e remoção. Programa de Pesquisa em Saneamento Básico – PROSAB. Rio de Janeiro: ABES, 2009, pp. 26-51

WANG LS, WANG YR, YE DW, LIU QQ. A review of the 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) based on current evidence”. **Int J Antimicrob Agents.** (2020). DOI:10.1016/j.ijantimicag.2020.105948.

WANG, X.-W. et al. Estudo sobre a resistência respiratória aguda grave coronavírus associado à síndrome. **J. Virol. Methods** 126 , 171-177 (2005).

WANG, XW et al. Concentração e detecção de coronavírus SARS em esgoto do Hospital WÖLFEL, R. et al. Avaliação virológica de pacientes hospitalizados com COVID-2019. *Nature* 581, 465-469 (2020).

WU, Y., GUO, C., TANG, L., HONG, Z., ZHOU, J., DONG, X., YIN, H., XIAO, Q., TANG, Y., QU, X., KUANG, L., FANG, X., MISHRA, N., LU, J., SHAN, H., JIANG, G., HUANG, X. Pró-presença prolongada de RNA viral SARS-CoV-2 em amostras fecais. **Lancet Gastroenterol. Hepatol.** 5, 434 e 435. (2020b). Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(20\)30083-2](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(20)30083-2). Acesso em: 23 dez. 2020.

WURTZER, S., MARECHAL, V., MOUCHEL, J.-M., MOULIN, L. Quantitativo de curso de tempo detecção de SARS-CoV-2 em águas residuais parisienses correlaciona-se com COVID-19 confirmado casos. medRxiv. (2020). Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2020.04.12.20062679>. Acesso em: 16 set. 2021.

XIAO At, Tong YX, Gao C, Zhu L, Zhang S. Dynamic profile of RT-PCR findings from 301 COVID-19 patients in Wuhan, China: A descriptive study. *J Clin Virol.* 2020;127:104346. Doi: 10.1016/j.jcv.2020.104346.

Xiao Tang Shan e do 309º Hospital. *J. Virol. Methods* 128, 156–161 (2005).

XINHUA. Novel coronavirus may spread via digestive system: experts. Xinhua Net. Disponível em: http://www.xinhuanet.com/english/2020-02/02/c_138749620.htm. Acesso 17 jan. 2021.

YE, Y., ELLENBERG, R.M., GRAHAM K.E., WIGGINTON, K.R. Survivability, Partitioning, and Recovery of Enveloped Viruses in Untreated Municipal Wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 50, 5077-5085. (2016) doi: 10.1021/acs.est.6b00876

YEO, C.; KAUSHAL, S.; YEO, D.; **Lancet Gastroenterol. Hepatol.** 5, 335 (2020).

ZANETI, R. N.; GIRARDI, V.; SPILKI, F. R.; et al. QMRA of SARS-CoV-2 for workers in wastewater treatment plants. medRxiv, 2020.

ZANG, R. et al. Tmprss2 e Tmprss4 medeiam SARS-CoV-2 infecções de enterócitos intestinais humanos. **Sci. Immunol.** 5, eabc3582 (2020).

ZHANG, H. et al. O sistema digestivo é uma rota potencial de 2019-nCoV infecção: uma análise bioinformática baseada em transcriptomas unicelulares.

ZOPPAS, F. M.; BERNARDES, A. M.; MENEGUZZI, A. Parâmetros operacionais na remoção biológica de nitrogênio de águas por nitrificação e desnitrificação simultânea. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.21, n.1, p. 29-42, 2016.