

# Parâmetros para transporte e armazenamento de amostras para detecção de SARS-CoV-2 por RT-PCR

## Parameters for transporting and storing samples for detection of SARS-CoV-2 by RT-PCR

Amanda Marchionatti<sup>1,2</sup>, Felipe Valle Fortes Rodrigues<sup>1,2,3</sup>, Ana Paula Klaus Damasceno<sup>1,2</sup>  
Fabio Jean Varella de Oliveira<sup>1,2</sup>, Ismael Plentz<sup>1,2</sup>, Gabriele Goulart Zanirati<sup>1,2,3</sup>  
Jaderson Costa Da Costa<sup>1</sup>, Daniel Rodrigo Marinowic<sup>1,4</sup>

### RESUMO

**Introdução:** A primeira pandemia do século, causada pelo SARS-CoV-2, se espalhou pelo mundo em um ritmo alarmante. O seu diagnóstico possui papel fundamental para assertivas condutas sanitárias e médicas. No Brasil, o transporte das amostras deve seguir as recomendações da Anvisa, sendo mantidas de 2 a 8 °C. Entretanto, é imprescindível identificar e estabelecer novos parâmetros de transporte e armazenamento viáveis para amostras enviadas para detecção de SARS-CoV-2. **Métodos:** Foi avaliada a resistência térmica da caixa de transporte, sem amostras e com a adição de 50 amostras, através do monitoramento da temperatura por 24 horas. Também foi avaliada a permanência de positividade em amostras de secreção de nasofaringe e orofaringe após a exposição a 30 °C e 37 °C, sendo reanalisadas no período de 8, 16 e 24 horas. **Resultados:** A caixa térmica de transporte permaneceu na faixa de 2 a 8 °C por aproximadamente 13 horas com e sem as amostras. Após a incubação em temperaturas elevadas, as amostras permaneceram positivas para SARS-CoV-2, e os ciclos térmicos de amplificação não apresentaram diferenças significativas entre elas. **Conclusão:** Neste estudo, foram estabelecidos parâmetros de transporte e armazenamento viáveis de médio prazo para amostras de secreção de nasofaringe e orofaringe para detecção de SARS-CoV-2. Aqui, demonstramos que a caixa térmica de transporte se mantém na temperatura indicada por 13 horas; entretanto, as amostras também podem ser armazenadas até 37 °C por 24 horas sem prejudicar a região-alvo do vírus a ser detectada.

UNITERMOS: Covid-19, Infecções por Coronavírus, Técnicas de Diagnóstico Molecular, Estabilidade de RNA

### ABSTRACT

**Introduction:** The first pandemic of the century, caused by SARS-CoV-2, has spread around the world at an alarming rate. Disease diagnosis is crucial for assertive health and medical conducts. In Brazil, samples transport must follow ANVISA's recommendations, being kept at 2 to 8 °C. However, it is indispensable to identify and establish new viable transport and storage parameters for samples sent for detection of SARS-CoV-2. **Methods:** The thermal resistance of the transport box was evaluated by monitoring the temperature for 24 hours, without samples and with 50 samples. The persistence of positivity in nasopharyngeal and oropharyngeal secretion samples after exposure to 30 °C and 37 °C was also evaluated at 8, 16 and 24 hours. **Results:** The transport cooler remained in 2 to 8 °C range for approximately 13 hours with and without the samples. After incubation at 30 °C and 37 °C, the samples remained positive for SARS-CoV-2 and the threshold cycle showed no significant differences. **Conclusions:** In this study, viable medium-term transport and storage parameters were established for nasopharyngeal and oropharyngeal secretion samples regarding SARS-CoV-2 detection. Here we demonstrate that the transport cooler remains ANVISA's recommended temperature for 13 hours. However, the samples can also be stored up to 37 °C for 24 hours without harming primers target region of the virus

KEYWORDS: Covid-19, Coronavirus Infections, Molecular Diagnostic Techniques, RNA Stability

<sup>1</sup> Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul (INSCER)

<sup>2</sup> Laboratório de Biologia Molecular e Imunologia (INSCER)

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

<sup>4</sup> Laboratório de Medicina de Precisão e Biotecnologia, (INSCER)

## INTRODUÇÃO

Os coronavírus (CoVs) foram descobertos na década de 1960 e pertencem à família *Coronaviridae*. Dentro da subfamília *Orthocoronavirinae*, está classificado o gênero *Betacoronavirus*, ao qual o novo coronavírus SARS-CoV-2 pertence (1). A primeira pandemia do século 21, declarada em 30 de janeiro de 2020 pela Organização Mundial de Saúde, causada pelo SARS-CoV-2, se espalhou a partir de dezembro de 2019 na cidade chinesa de Wuhan para o resto do mundo, em um ritmo crescente e alarmante. O Brasil teve os dois primeiros casos confirmados em fevereiro de 2020, ambos do sexo masculino, residentes na cidade de São Paulo após retorno da Itália (2).

Para corroborar com os efeitos das intervenções dos órgãos de saúde pública para o controle da disseminação do novo coronavírus na população, como, por exemplo, o distanciamento social, uso de máscaras e higienização das mãos, o preciso diagnóstico para SARS-CoV-2 possui papel fundamental para assertivas condutas sanitárias e médicas. Os testes moleculares, principalmente a Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), se consolidaram como estratégia para administrar medidas de distanciamento social, reabrir a economia local e controlar o aumento de doenças até que os protocolos de vacinação estabeleçam segurança a toda a população (3).

As Diretrizes da *Infectious Diseases Society of America* sobre o diagnóstico de Covid-19 destacam a etapa de transporte da amostra como crítica (4). As distâncias geográficas podem prejudicar as notificações e a vigilância da situação real do novo coronavírus, podendo causar grande prejuízo em virtude de infecções não documentadas, subnotificadas ou até mesmo falsos diagnósticos (5). No Brasil, o armazenamento e transporte de amostras biológicas devem seguir normativas RDC ANVISA 20/2014 (6), reforçadas pelo CDC (7), seguindo as regulamentações de transporte de material biológico humano para fins de diagnóstico clínico. As amostras de casos suspeitos para SARS-CoV-2 devem seguir as normas de envio para Substância Biológica UN 3373 de Categoria B. Para o novo coronavírus, exige-se que, logo após a coleta, os tubos com swabs de secreção de nasofaringe e orofaringe devem ser embalados individualmente, e o armazenamento deve ser feito na temperatura de 2 a 8°C pelo período máximo de 72 horas (6,8). No estado do Rio Grande do Sul, o Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) estabelece que, para o transporte e acondicionamento das amostras, seja utilizada uma caixa térmica com gelo reciclável, devidamente identificada como risco biológico e acompanhada das fichas de identificação fixadas por fora da caixa (9).

Diante dessas informações, é imprescindível verificar e estabelecer parâmetros de transporte e armazenamento viáveis para amostras enviadas para detecção de SARS-CoV-2.

## MÉTODOS

### Resistência térmica da caixa de transporte

Os testes foram realizados em caixa térmica da marca Coleman de 8,5 L, com medida interna de 275 x 220 x 289 mm. A princípio, foi avaliada a temperatura inicial da caixa de transporte. Após, foram adicionadas três barras de gelo artificiais (400 mL) previamente congeladas a -20°C por 6 horas e, imediatamente, foi iniciado monitoramento da curva de temperatura. Foram avaliadas duas distintas situações, a caixa térmica vazia e contendo volume de 50 frascos cônicos de 15 mL, contendo 2 mL de solução salina cada frasco, simulando assim 50 coletas para exame de PCR. A verificação de temperatura ocorreu a cada 5 minutos na primeira hora e aumentando o intervalo gradativamente durante um período de 24 horas. Para aferir a temperatura, utilizou-se o termômetro digital acoplado de fábrica à caixa térmica.

### Estabilidade das amostras enviadas para detecção de SARS-CoV-2

#### Seleção das amostras

Foram selecionadas 11 amostras de secreção de nasofaringe e orofaringe com resultado de PCR positivo para SARS-CoV-2. As amostras foram coletadas no Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul (INSCER), em frasco contendo 2 mL de cloreto de sódio 0,9%, e foram disponibilizadas para este estudo após aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS (CAAE: 30779820.0.0000.5336 / Parecer: 3.977.510)

#### Incubação das amostras em temperaturas elevadas

As amostras positivas para SARS-CoV-2 foram expostas a duas diferentes temperaturas (30°C e 37°C), utilizando estufas incubadoras de temperatura controlada. As amostras foram expostas às temperaturas elevadas pelos períodos de 8, 16 e 24 horas. Para cada período, foi realizada uma nova extração de RNA e uma nova amplificação através de RT-PCR.

#### Extração do RNA viral

Todos os RNAs foram extraídos utilizando sistema automatizado (*KingFisher Duo Prime, Thermo Fisher Scientific*) através do kit MagMAX<sup>™</sup> VIRAL/PATHOGEN II (*Life Technologies, Thermo Fisher Scientific*), conforme descrito pelo fabricante. O volume de amostra inicial do material coletado utilizado para cada uma das extrações foi de 200 µL. As extrações de RNA foram eluídas em um volume de 50 µL.

#### Avaliação e amplificação por RT-PCR

Para análise da expressão gênica, foi aplicada a técnica de

RT-PCR adotando o protocolo estabelecido pelo CDC (8). Foram utilizadas Master Mix AgPath-IDT (*Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific*) e as sondas complementares às regiões dos genes N1 e N2 do SARS-CoV-2, além do controle endógeno Ribonuclease P (RP) do kit 2019-nCoV da IDT (*Integrated DNA Technologies*). As amostras foram amplificadas em termociclador Step One PlusT (*Life Technologies, Thermo Fisher Scientific*), e as condições térmicas foram transcritase reversa (45°C – 10 min) e inativação/desnaturação inicial (95°C - 10 min), seguindo de 40 ciclos de amplificação (95°C – 15 s e 60°C – 45 s). A interpretação foi feita pela análise dos ciclos térmicos (CT) de amplificação. Os valores de CTs foram utilizados como parâmetros de possível degradação da amostra ao longo de todo experimento.

#### Análise estatística

As análises estatísticas foram conduzidas no GraphPad Prism 6.0 (*GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA*). Para a análise dos CTs no ensaio de RT-PCR, foi realizado teste t de Student. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## RESULTADOS

### Variação de temperatura na caixa térmica de transporte

A temperatura inicial da caixa térmica de transporte foi de 19,6°C e 19,7°C nos experimentos sem amostras e com a adição de 50 amostras, respectivamente. Na avaliação sem amostras, após a adição das barras de gelo, o tempo para que o ambiente interno da caixa alcançasse a menor temperatura (1,3°C) foi de 35 minutos, e a temperatura se manteve na faixa de 2 a 8°C (condições indicadas pelo CDC para transporte de amostras de SARS-CoV-2) por aproximadamente 12,9 horas (Figura 1A). Na avaliação com amostras, após 30 minutos a temperatura interna da caixa atingiu a temperatura mínima (1,1 °C). Então, foram adicionadas as 50 amostras (abertura

da caixa e adição dos tubos). A temperatura interna subiu para 9,8°C, mas, após 20 minutos, a caixa encontrava-se novamente com a temperatura interna dentro da faixa aceitável (2-8°C), permanecendo por 13 horas nessas condições (Figura 1B). Nossos resultados apontam que a resistência térmica da caixa de transporte se manteve muito semelhante entre os dois experimentos, mesmo com a abertura da caixa em que foram adicionadas as amostras, o tempo de ambientalização foi de 20 minutos para que a faixa sugerida de transporte e acondicionamento fosse atingida.

### Estabilidade das amostras expostas a temperaturas elevadas

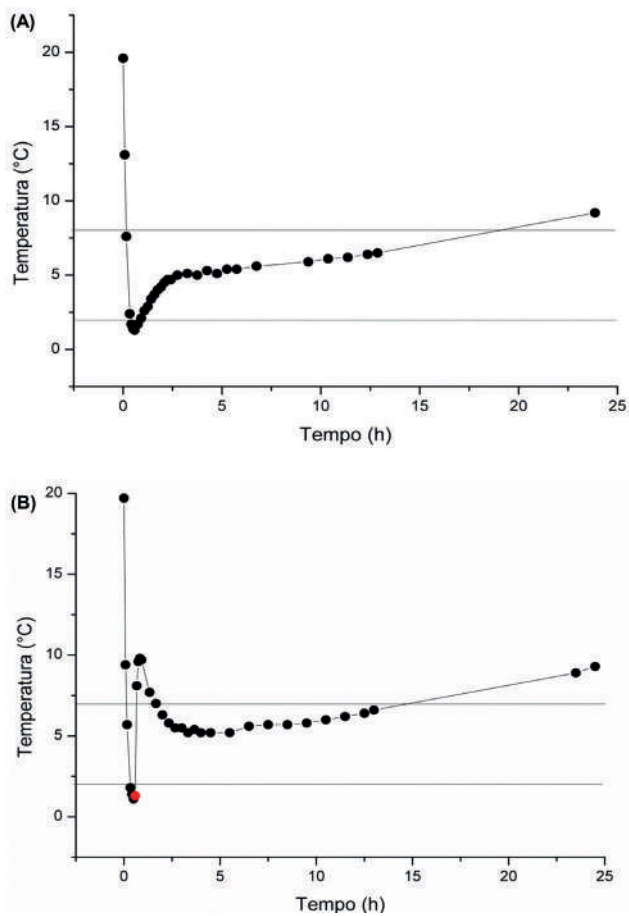
Quanto à detecção de SARS-CoV-2 após a exposição às temperaturas de 30°C e 37°C, as amostras permaneceram positivas após 8, 16 e 24 horas de incubação. Houve uma ínfima flutuação nos valores dos CTs em todas as amostras e tempos analisados. Os valores dos CTs das ampliações do ensaio de RT-PCR estão resumidos na Tabela 1. A análise dos CTs demonstrou que não há diferença estatística entre os valores das amostras positivas antes da incubação (tempo zero) e depois da incubação nos três tempos (8, 16 e 24 horas) para ambas as temperaturas de exposição (30°C e 37°C) (Figura 2A e 2B, respectivamente). Os resultados demonstram que não ocorreu a degradação das regiões analisadas e flanqueadas pelos primers e pelas sondas após a exposição a elevadas temperaturas.

## DISCUSSÃO

A disseminação global do SARS-CoV-2 resultou na pandemia Covid-19, causando um alto índice de óbitos generalizados. As demandas por teste de laboratórios aumentaram de maneira significativa, tornando os diagnósticos moleculares como um componente essencial para o controle da infecção causada pelo vírus. Neste contexto, investigamos diferentes condições de armazenamento de amostras de secreção nasofaringe e orofaringe enviadas

**Tabela 1.** Representação dos resultados da exposição das amostras a temperaturas elevadas.

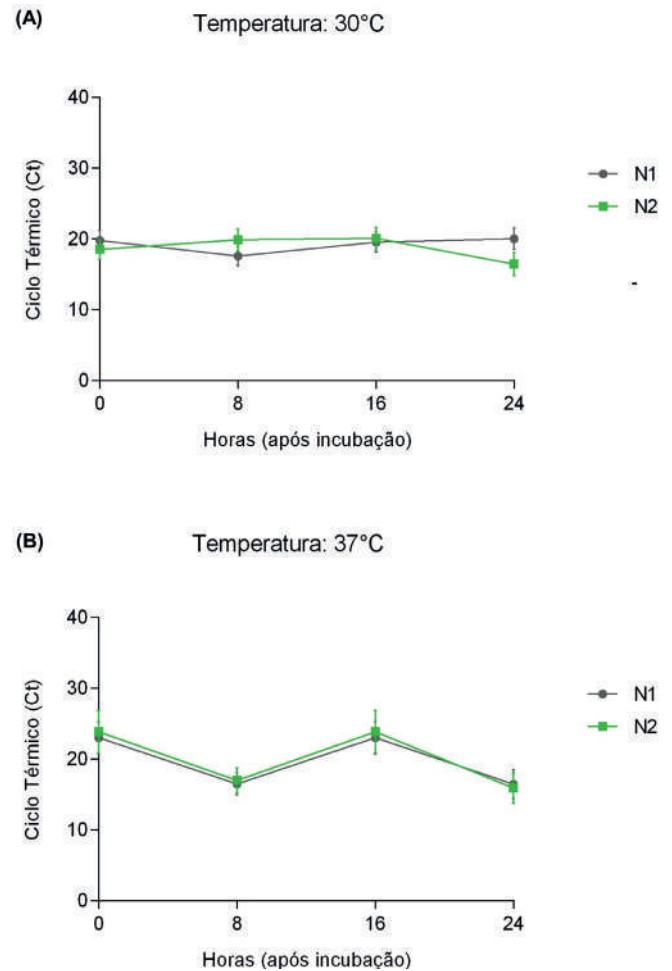
Sondas	0 h		8 h		16 h		24 h	
	N1	N2	N1	N2	N1	N2	N1	N2
30°C	16,22	14,75	13,50	16,20	15,65	16,47	16,93	12,70
	26,36	24,73	23,53	26,76	25,64	26,56	26,90	23,68
	17,96	17,72	18,21	20,68	20,10	21,59	20,94	17,89
	19,72	17,5	16,80	17,90	20,16	18,99	19,48	15,36
	19,88	19,11	17,60	19,87	19,16	19,93	19,20	15,68
	18,8	17,55	16,00	18,04	16,80	17,25	16,91	13,51
37°C	18,37	17,95	12,21	12,15	22,30	19,35	10,53	8,90
	22,33	22,90	19,33	18,20	23,70	23,30	18,65	17,14
	26,36	26,54	20,84	23,00	31,40	35,60	22,74	22,51
	20,89	21,93	14,44	15,73	19,11	20,20	15,92	15,25
	21,46	23,51	15,83	15,92	18,70	20,93	14,54	15,92



**Figura 1** - Resultados da curva de temperatura interna da caixa térmica - Representação dos resultados da curva de temperatura iniciando na temperatura inicial (ambiente) até a última medida após 24 horas. A linha pontilhada representa a faixa de 2 a 8°C. (A) Caixa térmica sem amostras (B) Caixa térmica com adição de 50 amostras. (●) Acondicionamento das amostras na caixa térmica.

para detecção de SARS-CoV-2, a fim de estabelecer os parâmetros ideais para o transporte e armazenamento das amostras laboratoriais a médio prazo, garantindo a qualidade e segurança do diagnóstico molecular.

Inicialmente, realizamos uma análise do transporte das amostras biológicas, avaliando a variação de temperatura nas caixas térmicas. Segundo a normativa do CDC, o transporte de amostras respiratórias deve ser feito de 2 a 8°C por até 72 horas após a coleta (7). Nossos dados demonstram que, em cerca de 30 minutos após a adição de três barras de gelo, a caixa térmica atinge a temperatura mínima e permanece na faixa de 2-8°C por aproximadamente 13 horas com 50 frascos de amostras em seu interior. As distâncias geográficas entre o ponto de coleta e o laboratório, a falta de equipamentos de refrigeração em ambientes economicamente afetados, além da escassez no fornecimento de insumos tornam a logística do transporte uma preocupação recorrente para a preservação das amostras enviadas para diagnóstico molecular (10-13). Entretanto, neste



**Figura 2** – Representação da variação de CT – (A) Após a incubação a 30°C (B) Após a incubação a 37°C.

estudo demonstramos que a caixa térmica de transporte de 8,5 litros mantém uma rede fria no seu interior por cerca de 13 horas com até 50 amostras em frascos cônicos de 15 mL, contendo 2 mL de solução salina 0,9% em cada frasco, podendo assim ser utilizada dentro deste período.

Também, analisamos a estabilidade do vírus em amostras de secreção de nasofaringe e orofaringe. Diversos trabalhos avaliando a estabilidade do SARS-CoV-2 em superfícies estão disponíveis na literatura (14-16), porém pouco se sabe sobre a integridade do seu RNA em amostras biológicas que foram expostas a altas temperaturas. Em nosso estudo, avaliamos a permanência de positividade para SARS-CoV-2 após incubação das amostras a 30°C e 37°C pelo período de 8, 16 e 24 horas. Todas as amostras permaneceram positivas após 24 horas, e os valores dos CTs não se alteraram entre as análises, demonstrando pouca degradação do RNA. Outro estudo também avaliou a estabilidade das amostras, mas em temperatura ambiente (18-26 °C) após 7 e 14 dias, observando apenas um aumento não significativo nos CT depois de 7 dias e um aumento um pouco maior após 14 dias, porém sem alte-

rar o resultado qualitativo (17). Um estudo mais recente avaliou a permanência de positividade após 10 e 50 dias de incubação em temperatura ambiente (18 e 23°C), verificando que houve um leve aumento dos CTs sem alterar o resultado após 10 dias, mas que, depois de 50 dias, a capacidade diagnóstica foi afetada (18). Neste contexto, podemos perceber que a integridade da região-alvo do vírus a ser detectada se mantém inteira, tornando segura a detecção após 24 horas em temperaturas elevadas. Os métodos de detecção molecular não necessitam do vírus completo para identificação, apenas a preservação do ácido nucleico é essencial (18,19).

Poucos estudos avaliando as amostras de SARS-CoV-2 expostas a temperaturas elevadas foram publicados. Ahmed e colaboradores (2020) avaliaram a prevalência do vírus a 37°C, porém, em águas residuais, verificando que a positividade se manteve por 5 dias (20). Entretanto, avaliar a estabilidade do SARS-CoV-2 em amostras biológicas é de grande importância, principalmente pela diferença sazonal do país, tornando-se esse o ponto forte do nosso trabalho. As condições de temperatura selecionadas para o estudo correspondem a um pior cenário de um dia de verão que laboratórios de diagnóstico e pesquisa podem enfrentar durante o transporte das amostras. Em conjunto, as evidências descritas anteriormente demonstram que podemos estender o tempo de transporte e armazenamento das amostras para atender a toda a população em diferentes localidades.

## CONCLUSÃO

Neste estudo, foram estabelecidos parâmetros de transporte e armazenamento viáveis de médio prazo para amostras de secreção de nasofaringe e orofaringe para detecção de SARS-CoV-2. Aqui, demonstramos que a caixa térmica de transporte se mantém em temperatura refrigerada por 13 horas. Contudo, caso haja necessidade, as amostras também podem ser armazenadas em temperaturas maiores por até 24 horas sem prejudicar a região-alvo do vírus a ser detectada. Esses resultados apontam que a detecção do SARS-CoV-2 por RT-PCR pode ser feita com segurança e eficácia após diferentes condições de armazenamento.

## CONFLITOS DE INTERESSE

O Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul é um centro de diagnóstico comercial privado. Quatro dos autores são funcionários do INSCER. Os autores declaram não haver conflito de interesses.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul que aprovou o financiamento deste trabalho, contribuindo com equipamentos, reagentes e profissionais.

## REFERÊNCIAS

1. Woo PCY, Huang Y, Lau SKP, Yuen KY. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses*. 2010;2(8):1804-20.
2. Velavan TP, Meyer CG. The Covid-19 epidemic. *Trop Med Int Heal*. 2020;25(3):278-80.
3. Grassly NC, Pons-Salort M, Parker EPK, White PJ, Ferguson NM, Ainslie K, et al. Comparison of molecular testing strategies for Covid-19 control: a mathematical modelling study. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(12):1381-9.
4. Hanson KE, Caliendo AM, Arias CA, Hayden MK, Englund JA, Lee MJ, et al. Guidelines on the Diagnosis of Covid-19: Molecular Diagnostic Testing. *Infectious Diseases Society of America* [Internet]. 2020 [cited 2021 Apr 18]; Available from: <https://www.idsociety.org/practice-guideline/Covid-19-guideline-diagnostics/>
5. Li R, Pei S, Chen B, Song Y, Zhang T, Yang W, et al. Substantial undocumented infection facilitates the rapid dissemination of novel coronavirus (SARS-CoV-2). *Science*. 2020;368(6490):489-93.
6. ANVISA. RDC Nº 20, DE 10 DE ABRIL DE 2014. Manual De Vigilância Sanitária Sobre O Transporte De Material Biológico Humano [Internet]. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2015. p. 1-47. Available from: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/sangue/transporte-de-material-biologico/manual-de-transporte-de-material-biologico-humano.pdf>
7. CDC. Interim Guidelines for Clinical Specimens for Covid-19 | CDC [Internet]. Centers for Diseases Control and Prevention. 2021 [cited 2021 Apr 18]. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/guidelines-clinical-specimens.html>
8. CDC. CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel. Centers Dis Control Prev [Internet]. 2020;CDC-006-00:1-80. Available from: <https://www.fda.gov/media/134922/download>
9. LACEN/RS. Orientações Para Coleta E Transporte De Secreção Respiratória. Secr da Saúde do Rio Gd do Sul [Internet]. 2020;1-6. Available from: <https://atencaoasica.saude.rs.gov.br/upload/arquivos/202002/04110353-2020-orientacoes-coleta-amostra-coronavirus-janeiro.pdf>
10. Basso D, Aita A, Navaglia F, Franchin E, Fioretto P, Moz S, et al. SARS-CoV-2 RNA identification in nasopharyngeal swabs: Issues in pre-analytics. *Clin Chem Lab Med*. 2020;58(9):1579-86.
11. Sharma A, Gupta P, Jha R. Covid-19: Impact on Health Supply Chain and Lessons to Be Learnt. *J Health Manag*. 2020;22(2):248-61.
12. Castro MC, Kim S, Barberia L, Ribeiro AF, Gurzenda S, Ribeiro KB, et al. Spatiotemporal pattern of Covid-19 spread in Brazil. *Science*. 2021;1-10.
13. Kuiper JWP, Baade T, Kremer M, Kranaster R, Irmisch L, Schuchmann M, et al. Detection of SARS-CoV-2 from raw patient samples by coupled high temperature reverse transcription and amplification. *PLoS One*. 2020;15(11):e0241740.
14. Harbourt DE, Haddow AD, Piper AE, Bloomfield H, Kearney BJ, Fetterer D, et al. Modeling the stability of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) on skin, currency, and clothing. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(11):e0008831.
15. van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, et al. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med*. 2020;382(16):1564-7.
16. Bueckert M, Gupta R, Gupta A, Garg M, Mazumder A. Infectivity of sars-cov-2 and other coronaviruses on dry surfaces: Potential for indirect transmission. *Materials (Basel)*. 2020;13(22):1-16.
17. Rogers AA, Baumann RE, Borillo GA, Kagan RM, Batterman HJ, Galdzicka MM, et al. Evaluation of transport media and specimen transport conditions for the detection of SARS-CoV-2 by use of real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol*. 2020;58(8):e00708-20.
18. Barra GB, Rita THS, Mesquita PG, Jácomo RH, Nery LFA. Overcoming supply shortage for SARS-CoV-2 detection by RT-qPCR. *Genes (Basel)*. 2021;12(1):90.
19. Druce J, Garcia K, Tran T, Papadakis G, Birch C. Evaluation of swabs, transport media, and specimen transport conditions for optimal detection of viruses by PCR. *J Clin Microbiol*. 2012;50(3):1064-5.
20. Ahmed W, Angel N, Edson J, Bibby K, Bivins A, O'Brien JW, et al. First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveil-

lance of Covid-19 in the community. Sci Total Environ. 2020 Aug 1;728:138764.

---

✉ Endereço para correspondência

**Daniel Rodrigo Marinowic**

Avenida Ipiranga,6690/Prédio 63

90610-000 – Porto Alegre/RS – Brasil

☎ (51) 3320-5985

✉ [daniel.marinowic@pucrs.br](mailto:daniel.marinowic@pucrs.br)

---

Recebido: 29/4/2021 – Aprovado: 31/5/2021