

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

IMPACTO DA AGITAÇÃO NO BIOPROCESSAMENTO CONSOLIDADO DO BAGAÇO DE CANA UTILIZANDO LEVEDURA RECOMBINANTE

Maria Clara Sertori¹, Márcio Daniel Nicodemos Ramos², Juliana Passamani Sandri², Teresa Cristina Zangirolami^{1,2}, Johan Thevelein³,
Thais Suzane Milessi^{1,2}

¹Universidade Federal de São Carlos/Departamento de Engenharia Química, Rodovia Washington Luís, km 235 - SP-310. São Carlos - São Paulo - Brasil CEP 13565-905,
msertori@estudante.ufscar.br, teresacz@ufscar.br, thais.milessi@ufscar.br.

²Universidade Federal de São Carlos/Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Rodovia Washington Luís, km 235 - SP-310. São Carlos - São Paulo - Brasil CEP 13565-905,
marcio_daniel_ramos@hotmail.com, juliana.sandri@hotmail.com.

³NovelYeast bv, Bio-Incubator BIO4, Gaston Geenslaan 3, Leuven-Heverlee, Bélgica
arne.claes@novelyeast.com, johan.thevelein@novelyeast.com.

Resumo

O Bioprocessamento Consolidado (BPC) é uma tecnologia emergente e promissora para a produção de bioetanol, onde a produção de enzimas hidrolíticas, a hidrólise da biomassa lignocelulósica e a fermentação ocorrem simultaneamente em um único reator. Porém, grande importância é dada à construção de novas leveduras recombinantes para BPC, enquanto estudos da Engenharia do BPC são escassos, de forma que pouco se sabe sobre o desempenho das linhagens desenvolvidas em condições industriais. Considerando que a presença de sólidos em suspensão pode influenciar negativamente o processo, o presente trabalho avaliou a influência da agitação na performance do BPC e na viabilidade das células de levedura recombinante na presença de sólidos suspensos. Para isso, foram realizados ensaios BPC agitados e estáticos (pH 5,5 e 35°C), utilizando bagaço de cana pré-tratado 1% (m/v) ácida ou hidrotermicamente. A agitação e os sólidos suspensos da biomassa no BPC não prejudicaram a viabilidade das leveduras, atingindo-se 70% de rendimento em 11h de processo, de forma que nas condições estudadas pode-se continuar operando com agitação do meio.

Palavras-chave: Bioprocessamento consolidado, Etanol 2G, Cana-de-açúcar, Levedura recombinante

Área do Conhecimento: (Engenharias – Engenharia Química)

Introdução

Nas últimas décadas, muitos esforços vêm sendo realizados buscando viabilizar o aproveitamento total e integrado dos materiais lignocelulósicos dentro do conceito de Biorrefinaria, para obtenção de etanol de segunda geração (2G) e outros bioprodutos de valor agregado (CHANDEL et al., 2021). No Brasil, o bioetanol é produzido principalmente a partir de cana-de-açúcar, possuindo como principal subproduto o bagaço de cana.

Para a produção de etanol 2G a partir de bagaço, a estrutura complexa da biomassa deve ser rompida a fim de tornar as frações celulósica e hemicelulósica mais acessíveis à ação das enzimas hidrolíticas, viabilizando a liberação dos açúcares e sua fermentação a etanol. Diante disso, uma etapa de pré-tratamento deve ser aplicada, a qual pode consistir em processos físicos, químicos, físico-químicos, biológicos ou uma combinação desses processos (AGUIAR et al., 2021). Dentre os pré-tratamentos disponíveis, o pré-tratamento ácido e hidrotérmico se destacam por serem respectivamente o mais estudado e considerado ambientalmente amigável (MENSAH et al. 2023). Após o pré-tratamento uma etapa de hidrólise enzimática é necessária para liberar os açúcares fermentescíveis. Os elevados custos associados aos coquetéis enzimáticos necessários nesta etapa é um dos principais gargalos que compromete a viabilidade econômica do processo industrial de produção de etanol 2G (PEREZ et al., 2023).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Neste sentido, o Bioprocessamento Consolidado (BPC) se destaca como uma tecnologia emergente, na qual a produção de enzimas, hidrólise da biomassa e fermentação dos açúcares liberados ocorrem simultaneamente em um único reator (PEREZ et al., 2023). O BPC se caracteriza pelo uso de microrganismos ou consórcio de microrganismos (fungos ou bactérias) selvagens ou recombinantes, que apresentem tanto a capacidade de secreção de enzimas hidrolíticas quanto de transformação dos açúcares liberados nos produtos de interesse, dispensando, desta forma, a necessidade dos preparados enzimáticos comerciais (OLGUIN-MACIEL et al., 2020).

O desenvolvimento de tecnologia BPC é fundamental, particularmente no contexto da Biorrefinaria da cana-de-açúcar, de forma que o bagaço seja efetivamente aproveitado para a obtenção não apenas de etanol, mas de outros compostos de maior valor agregado. Até o momento, grande importância tem sido dada à construção de leveduras recombinantes capazes de secretar enzimas hidrolíticas (CLAES et al., 2023; DAVISON et al., 2019), de forma que os estudos da Engenharia do BPC são escassos, ou seja, pouco se sabe sobre o desempenho das linhagens desenvolvidas para BPC em condições industriais (operação em alta carga de células, exposição das células a sólidos suspensos etc). Esses desafios precisam ser enfrentados para a inserção do BPC no cenário da indústria sucroenergética brasileira.

Neste sentido, a presença de uma fração sólida em suspensão no meio de cultivo, como ocorrerá na condução do BPC, pode ocasionar problemas difusionais no processo (SANDRI et al., 2023). Adicionalmente, existem relatos na literatura de que a presença de materiais sólidos em sistemas agitados pode reduzir a viabilidade das células devido à intensificação do cisalhamento (KOPPRAM e OLSSON, 2014; SANDRI et al., 2023; UNREAN et al., 2016). Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência da agitação do BPC na performance do processo e na viabilidade das células de levedura recombinante de alta eficiência na presença de sólidos suspensos.

Metodologia

Microrganismo e inóculo

Os experimentos foram realizados com a levedura geneticamente modificada *Saccharomyces cerevisiae* AC14, gentilmente cedida pelo grupo de pesquisa do Prof. Johan M. Thevelein (NovelYeast bv, Bélgica), a qual foi desenvolvida por Claes et al. (2020), sendo a primeira *S. cerevisiae* capaz de expressar e secretar simultaneamente sete enzimas lignocelulolíticas: endoglucanase, β -4 glicosidase, celobiohidrolase I e II, xilanase, β -xilosidase e acetilxilano esterase. Para o inóculo, inicialmente uma alçada da cultura estoque da cepa AC14 armazenada a -80 °C foi estriada em meio sólido YPÁgar contendo glicose (20 g/L), xilose (20 g/L), xilana de sabugo de milho (10 g/L), celobiose (10 g/L) e carboximetilcelulose (5 g/L), além de extrato de levedura (10 g/L), peptona (20 g/L) e ágar (15 g/L). A placa de Petri foi incubada a 30 °C por 48 h. Em seguida, uma colônia foi ressuspensa em 75 μ L de água destilada estéril e a suspensão foi espalhada com alça de Drigalski em meio YPÁgar contendo glicose (20 g/L), xilose (20 g/L) e ágar (15 g/L) e incubada por mais 24 h a 30 °C, para a formação de um "tapete" celular. O "tapete" celular de uma placa de Petri foi totalmente ressuspensa e inoculado em 300 mL de meio YPDX (20 g/L de glicose e 20 g/L de xilose) em um frasco Erlenmeyer aletado de 1 L, sendo deixado em incubadora rotatória (150 rpm) por 12 h a 30 °C. As células foram recuperadas por centrifugação (2500 rpm e 10 min) a 4 °C.

Pré-tratamentos do bagaço de cana

O bagaço de cana de açúcar foi gentilmente cedido pela Ipiranga Agroindustrial (Descalvado/SP). Inicialmente, o bagaço *in natura* passou por um processo de moagem, para facilitar a realização dos pré-tratamentos. Uma parte do bagaço foi destinada ao pré-tratamento hidrotérmico e outra, ao pré-tratamento ácido. O tratamento hidrotérmico foi realizado em reator de alta pressão Parr modelo 4848 com capacidade de 2L, munido de controle de agitação mecânica e aquecimento. Utilizou-se 195°C por 10 min e relação sólido:líquido de 1:10 (m/v) (MILESSI et al., 2021). Já o pré-tratamento ácido foi realizado com H₂SO₄ 1% em autoclave de acordo com Philippini (2012), a 121°C por 20 minutos e relação sólido:líquido de 1:10 (m/v). Após a realização de ambos os pré-tratamentos, o material obtido foi filtrado ainda quente e a fração sólida e o hidrolisado obtidos foram armazenados a 4°C.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Avaliação das condições do BPC

Para avaliar o impacto da fração sólida no processo, foram conduzidos os seguintes experimentos: cultivo estático com sólido em suspensão e cultivo com agitação magnética com sólido em suspensão, para as frações sólidas provenientes de ambos os pré-tratamentos ácido e hidrotérmico. Os experimentos tiveram como substrato o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado 1% (m/v) de sólido suplementados com extrato de levedura (10 g/L) e peptona (20 g/L).

Os cultivos foram realizados em mini-reatores de 13 mL equipados com saída de CO₂, conforme descritos por Mesquita et al. (2021). Os BPCs foram monitorados por meio da medida da liberação de massa de CO₂ na fermentação alcoólica, realizando a pesagem dos mini-reatores periodicamente. A partir desses dados foi possível acompanhar o andamento dos BPCs, interrompendo os experimentos quando ocorreu estabilização da massa dos mini-reatores, indicando o fim da fermentação. As condições de fermentação foram: pH 5,5, 35°C, 6 mL de volume total e densidade óptica (DO) inicial 100 (correspondente a 80 g/L de células). Ao final dos cultivos, o meio foi centrifugado (2500 rpm, 4 °C por 10 min) e o sobrenadante foi caracterizado quanto à atividade enzimática e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Em relação aos parâmetros fermentativos, foram calculados o rendimento e a produtividade (RAMOS et al., 2023).

Métodos analíticos

A viabilidade das leveduras foi avaliada por coloração com azul de metileno e contagem em câmara de Neubauer de acordo com metodologia de Sandri et al. (2023). Para a quantificação de açúcares e produtos, as amostras foram tratadas para remoção dos sólidos insolúveis, sendo congeladas por pelo menos 24 h, descongeladas e centrifugadas duas vezes (2500 rpm, 4 °C por 5 min) conforme Demeke et al. (2013). Em seguida, as amostras foram filtradas em filtro 0,22 µm e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em um cromatógrafo Waters e2695 dotado de detectores de índice de refração e UV-VIS ($\lambda = 210$ nm). Para quantificar etanol, glicose, xilose, celobiose, arabinose, glicerol, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural foi utilizada a coluna de exclusão iônica RezexTM ROA-Organic acid H+, com H₂SO₄ 5mM como fase móvel no fluxo de 0,6 mL/min e temperatura de operação 65 °C (BATISTA et al., 2019).

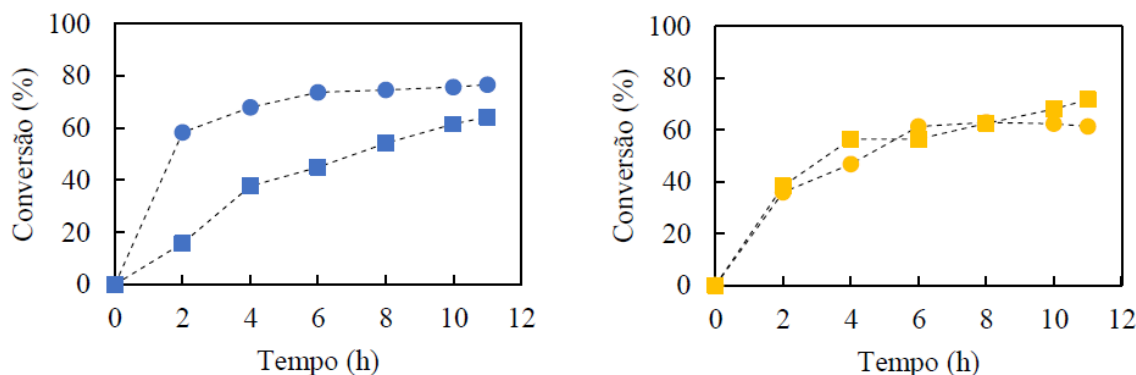
As atividades de celulasas totais, β -glucosidase, β -xilosidase e xilanases foram quantificadas no meio fermentado (sobrenadante após a remoção das células, denominado extrato enzimático) de acordo com metodologias detalhadas por Perez et al. (2023). A atividade enzimática das células totais foi baseada na liberação de glicose do papel de filtro Whatman n° 1 (15 mm diâmetro) a 50 °C e pH 5,0; β -glucosidase foi medida pela liberação de glicose a 50 °C e pH 5,5 a partir de celobiose 2%; a atividade da xilanase foi medida pela velocidade inicial da hidrólise de xilana de faia 1% a 50°C e pH 5,5; e a atividade da β -xilosidase foi medida pela liberação de 4-nitrofenol ($\epsilon = 1950$ mol/L/cm) durante a hidrólise de 4-nitrofenil β -D-xilopiranosídeo (p-NPX) a 50 °C e pH 5,5.

Resultados

O acompanhamento dos ensaios BPC realizados com bagaço de cana pré-tratado ácido e hidrotérmicamente pode ser observado na Figura 1. Em todas as condições as atividades enzimáticas medidas ficaram em torno de 0,3 UI/mL (3,75 UI/g_{cel}) para celulasas totais, 0,4 UI/mL (5 UI/g_{cel}) para β -glucosidase, 4 UI/mL (50 UI/g_{cel}) para xilanase e 0,2 UI/mL (2,5 UI/g_{cel}) para β -xilosidase. Os parâmetros fermentativos obtidos em cada condição estudada são apresentados na Tabela 1.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Figura 1 - Perfil de conversão dos ensaios de BPC do bagaço de cana-de-açúcar submetido ao pré-tratamento hidrotérmico (símbolo azul) e ácido (símbolo amarelo) utilizando a levedura AC14 (DO = 100, 35 °C, pH 5,5). BPC agitado (●), BPC estático (■). Conversão estimada a partir dos dados de massa CO₂ produzido.



Fonte: Elaborado pelos autores.

Tabela 1 – Etanol produzido e parâmetros do BPC com a AC14 em bagaço de cana pré-tratado ácido e hidrotérmicamente (DO₀ = 100, 35 °C, pH 5,5). Letras iguais indicam que os dados não são significativamente diferentes (teste de Tukey 95% de confiança).

Pré-tratamento	Condição	Etanol (g/L)	Q _P (g/L/h)	Y _{Relativo} (%)	Viabilidade (%)
Hidrotérmico	Estático	8,35±0,44 ^a	0,76±0,07 ^b	64,2±3,4 ^c	97,7 ± 3,2 ^d
	Agitado	8,67±0,36 ^a	0,79±0,03 ^b	66,6±2,8 ^c	100,0 ± 0,0 ^d
Ácido	Estático	10,30 ± 0,42 ^a	0,94±0,04 ^b	71,6±2,9 ^c	97,2 ± 4,0 ^d
	Agitado	8,81±0,14 ^a	0,80±0,07 ^b	61,3±1,0 ^c	95,2 ± 3,4 ^d

Y_{Relativo}: rendimento relativo de etanol comparado ao máximo teórico; Q_P: produtividade de etanol.

Fonte: Elaborado pelos autores.

Discussão

Todas as enzimas quantificadas foram produzidas pela levedura AC14, o que explica a alta eficiência de hidrólise da biomassa, chegando ao platô da curva de conversão em 10h de processo (Figura1). A atividade de celulase total quantificada AC14 é superior à observada por Yamada et al. (2011) (0,234 U/gdcw) usando uma cepa de *S. cerevisiae* contendo endoglucanase e celobiohidrolase II de *Trichoderma reesei* e β-glicosidase de *Aspergillus aculeatus*. Por outro lado, Davison et al. (2019) obteve 15 U/gcel de β-glicosidase, 3.870 U/gcel de endoglucanase e 7.320 U/gcel de celobiohidrolase I usando uma *S. cerevisiae* recombinante com β-glicosidase de *Saccharomycopsis fibuligera*, endoglucanase de *Trichoderma reesei* e celobiohidrolase de *Talaromyces emersonii*. Apesar de no presente estudo observar-se menores atividades enzimáticas, obteve-se maiores produtividades, uma vez que os autores obtiveram 4,05 g/L de etanol a partir de sabugo de milho pré-tratado após 168 h. Nesse sentido, o AC14 se destaca por atingir maior teor de etanol e maiores produtividades (Tabela 1) provavelmente devido à alta carga de células empregada.

Apesar da elevada produção de inibidores do metabolismo microbiano (hidroximetilfurfural e furfural) extensamente relatada para o pré-tratamento ácido (PANAKKAL et al. 2021), as performances do BCP nos meios compostos pelas frações sólidas resultantes de ambos os pré-tratamentos estudados foi semelhante. Como esperado, a homogeneização do meio pela agitação aumentou a velocidade de reação do processo (Figura 1), porém na Tabela 1 é possível se verificar que a agitação não influenciou

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

a produção final de etanol, nem a produtividade e o rendimento para a carga de sólidos utilizada (teste Tukey com 95% de confiança). A presença de sólidos nos estudos com agitação também não interferiu na viabilidade celular. Perez (2021) havia reportado perda de viabilidade utilizando um magneto maior e velocidade de agitação superior à utilizada no presente estudo. Desta forma, a preservação da viabilidade celular pode ser atribuída às condições de agitação mais brandas empregadas e à baixa carga de sólidos presente (1%) (SANDRI et al., 2023). Considerando que a agitação e os sólidos suspensos da biomassa não prejudicaram a viabilidade das leveduras nas condições estudadas, pode-se continuar operando com agitação do meio, de forma a favorecer a transferência de massa (AZHAR et al., 2017) e certificar-se que o meio esteja homogêneo durante todo o cultivo. Deve-se citar também que, em etapas futuras de escalonamento, com o aumento de volume e de carga de sólido, a agitação será de suma importância, então a incorporação desta condição de processo nos cultivos em escala laboratorial é uma estratégia importante.

Conclusão

Diante da importância da utilização integral dos co-produtos agrícolas para o desenvolvimento de Biorrefinarias, os resultados obtidos no presente trabalho evidenciam o potencial do BPC para a produção de bioetanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar como substrato para a produção de etanol 2G. A agitação e os sólidos suspensos da biomassa não prejudicaram a performance do BPC e a viabilidade das leveduras, nas condições estudadas. Assim, as informações aqui levantadas contribuem de forma importante para o desenvolvimento do BPC de bagaço de cana em escala industrial, além de contribuir de forma geral com o BPC de materiais lignocelulósicos reais.

Referências

- AGUIAR, A., Milessi, T.S., Mulinari, D.R., Lopes, M.S., da Costa, S.M., Candido, R.G., 2021. Sugarcane straw as a potential second generation feedstock for biorefinery and white biotechnology applications. *Biomass and Bioenergy* 144, 105896. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105896>
- AZHAR, Siti Hajar Mohd et al. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and biophysics reports**, v. 10, p. 52-61, 2017.
- BATISTA, G., Souza, R.B.A., Pratto, B., dos Santos-Rocha, M.S.R., Cruz, A.J.G., 2019. Effect of severity factor on the hydrothermal pretreatment of sugarcane straw. *Bioresource Technology* 275, 321–327. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.073>
- CHANDEL, A.K., Forte, M.B.S., Gonçalves, I.S., Milessi, T.S., Arruda, P.V., Carvalho, W., Mussatto, S.I., 2021. Brazilian biorefineries from second generation biomass: critical insights from industry and future perspectives. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 15, 1190– 1208. <https://doi.org/10.1002/bbb.2234>
- CLAES, A., Deparis, Q., Foulquié-Moreno, M.R., Thevelein, J.M., 2020. Simultaneous secretion of seven lignocellulolytic enzymes by an industrial second-generation yeast strain enables efficient ethanol production from multiple polymeric substrates. *Metabolic Engineering* 59, 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.02.004>
- DAVISON SA, Keller NT, van Zyl WH, den Haan R, 2019. Improved cellulase expression in diploid yeast strains enhanced consolidated bioprocessing of pretreated corn residues. *Enzym Microb Technol* 131:109382. <https://doi.org/10.1016/j.enzmi.ctec.2019.109382>
- DEMEKE, M. M.; DUMORTIER, F.; LI, Y.; BROECKX, T.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; THEVELEIN, J. M. Combining inhibitor tolerance and D-xylose fermentation in industrial *Saccharomyces cerevisiae* for efficient lignocellulose-based bioethanol production. *Biotechnology for Biofuels*, v. 6, n. 1, p. 120, dez. 2013. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-120>.
- KOPPRAM, R.; OLSSON, L. Combined substrate, enzyme and yeast feed in simultaneous saccharification and fermentation allow bioethanol production from pretreated spruce biomass at high

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

solids loadings. *Biotechnology for Biofuels*, v. 7, n. 1, p. 54, 2014. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-54>.

MENSAH, R.Q.; Yingkamhaeng, N.; Venkatachalam, P.; Show, P.-L.; Mussatto, S.I.; Sriariyanun, M.; Sukyai, P.; Para-kulsuksatid, P.; Rattanaporn, K. Application of Green Produced Xylooligosaccharides from Sugarcane Residues and Their Properties – Recent Progress towards Sustainability. *Bioresource Technology Reports* 2023, 23, 101537, <http://doi.org/10.1016/j.biteb.2023.101537>

MESQUITA, T. J. B.; SANDRI, J. P.; DE CAMPOS GIORDANO, R.; HORTA, A. C. L.; ZANGIROLAMI, T. C. A High-Throughput Approach for Modeling and Simulation of Homofermentative Microorganisms Applied to Ethanol Fermentation by *S. cerevisiae*. *Industrial Biotechnology*, v. 17, n. 1, p. 13–26, 1 fev. 2021. <https://doi.org/10.1089/ind.2020.0034>.

MILESSI, Thais S.; CORRADINI, F. A. S.; MARÇAL, J. V. M.; BALDEZ, T. O.; KOPP, W.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C. Xylooligosaccharides production chain in sugarcane biorefineries: From the selection of pretreatment conditions to the evaluation of nutritional properties. *Industrial Crops and Products*, v. 172, p. 114056, nov. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114056>.

OLGUIN-MACIEL, E.; SINGH, A.; CHABLE-VILLACIS, R.; TAPIA-TUSSELL, R.; RUIZ, H. A. Consolidated Bioprocessing, an Innovative Strategy towards Sustainability for Biofuels Production from Crop Residues: An Overview. *Agronomy*, v. 10, n. 11, p. 1834, 22 nov. 2020. <https://doi.org/10.3390/agronomy10111834>.

PANAKKAL, E.J., Sriariyanun, M., Ratanapoompinyo, J., Yasurin, P., Cheenkachorn, K., Rodiahwati, W., Tantayotai, P., 2021. Influence of Sulfuric Acid Pretreatment and Inhibitor of Sugarcane Bagasse on the Production of Fermentable Sugar and Ethanol. *j.asep*. <https://doi.org/10.14416/j.asep.2021.07.006>

PEREZ, C.L., Milessi, T.S., Sandri, J.P. et al. 2023, Evaluation of Consolidated Bioprocessing of Sugarcane Biomass by a Multiple Hydrolytic Enzyme Producer *Saccharomyces* Yeast. *Bioenerg. Res.* <https://doi.org/10.1007/s12155-023-10607-5>

PHILIPPINI, Rafael Rodríguez et al. Desafíos en la utilización de residuos lignocelulósicos para la obtención de productos biotecnológicos (Parte I: pre-tratamiento de biomasa). *Aprovechamiento biotecnológico de productos agropecuarios III*, p. 261.

SANDRI, J.P., Ordeñana, J., Milessi, T.S., Zangirolami, T.C., Mussatto, S.I., 2023. Solid feeding and co-culture strategies for an efficient enzymatic hydrolysis and ethanol production from sugarcane bagasse. *Environmental Technology & Innovation* 30, 103082. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103082>

UNREAN, P.; KHAJEERAM, S.; LAOTENG, K. Systematic optimization of fed-batch simultaneous saccharification and fermentation at high-solid loading based on enzymatic hydrolysis and dynamic metabolic modeling of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, n. 5, p. 2459–2470, mar. 2016. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7173-1>.

YAMADA R, Taniguchi N, Tanaka T et al., 2011. Direct ethanol production from cellulosic materials using a diploid strain of *Saccharomyces cerevisiae* with optimized cellulase expression. *Biotechnol Biofuels* 4:1–8. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-8>

Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPESP (Processo #2016/10636-8), CNPq (Processo 407716/2021-1) e CAPES (código de financiamento 001) pelo apoio financeiro.