

MÉTODOS DE ARMAZENAMENTO DE TECIDOS FOLIARES DE *Eucalyptus cloeziana* F. Muell PARA A EXTRAÇÃO DO DNA

Ivete Frederico Maluleque, Adelson Lemes da Silva Júnior, Gabriel de Resende Baroni, Pedro Henrique Del Grossi; Dulcinéia de Carvalho, Gilvano Ebling Brondani

Universidade Federal de Lavras (UFLA), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal (PPGEF), Trevo Rotatório Professor Edmir Sá Santos, s/n, Bairro Universidade, Lavras, Minas Gerais, CEP 37203-202, Caixa Postal 3037 – ivete.maluleque@estudante.ufla.br; adelson.lemes@ufla.br; gabrielbaroni92@gmail.com, pedro.grossi@estudante.ufla.br; dulce@ufla.br; gilvano.brondani@ufla.br

Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar dois métodos de armazenamento de tecidos foliares de *Eucalyptus cloeziana* para a extração de DNA de boa qualidade para análises moleculares. Foi seguido o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990) modificado para a extração de DNA. Dois métodos de armazenamento de tecidos foliares foram testados, sendo o armazenamento em sílica gel (TFS) e armazenamento no freezer a -20°C (TFC). A quantificação, avaliação da pureza e integridade do DNA foram realizadas pelo NanoDrop® e pela electroforese em gel a 0,8%. O TFS permitiu a obtenção de um DNA genômico íntegro, puro, e com melhor concentração para a espécie. Os valores médios obtidos para a concentração de DNA para TFS situaram-se entre $427,68 \text{ ng. } \mu\text{L}^{-1}$ e $562,20 \text{ ng. } \mu\text{L}^{-1}$, enquanto que para o TFC variaram entre $24,60 \text{ ng. } \mu\text{L}^{-1}$ e $53,30 \text{ ng. } \mu\text{L}^{-1}$. A qualidade do DNA do TFS, na razão A_{260}/A_{280} esteve entre 2,06 nm e 2,01 nm e para TFC entre 1,61 e 1,41. O TFS apresentou um DNA íntegro em relação ao TFC. Assim conclui-se que o armazenamento dos tecidos foliares de *Eucalyptus cloeziana* em sílica gel permite a obtenção de DNA com melhor qualidade, quantidade e integridade.

Palavras-chave: preservação de amostras. PCR. electroforese. quantificação de DNA.

Área do Conhecimento: Ciências agrárias-Engenharia florestal.

Introdução

O *Eucalyptus cloeziana* F. Muell (Gympie mesmate, Myrtaceae) é uma espécie de múltiplos usos, com excelentes características tecnológicas da madeira, com destaque para a indústria de móveis, construção civil, moirões de cerca, postes de eletricidade e de óleo essencial a partir das folhas (Huang et al., 2025, Lv et al., 2020). É uma espécie arbórea endêmica de Queensland-Australia, que ocorre na faixa de latitude entre $15^{\circ}45'$ e $26^{\circ}41'S$ e longitude entre $144^{\circ}44'$ e $152^{\circ}52'E$. Essa espécie é adaptada a regiões tropicais e subtropicais, incluindo várias regiões do território brasileiro, devido à sua rusticidade e rápido crescimento (Lin et al., 2024; Reis et al., 2017).

Em decorrência da importância econômica do *Eucalyptus cloeziana*, faz-se necessária a aplicação de estudos moleculares que permitam compreender melhor as características genéticas da espécie. Pesquisas em diversidade genética são valiosas para se compreender a distribuição das variações genéticas e elucidar a evolução das espécies e estratégias mais adequadas de conservação e melhoramento (Lu et al., 2025).

Dessa forma, a extração de ácido desoxirribonucleico (DNA) puro é um pré-requisito para qualquer análise molecular, existindo metodologias disponíveis para o seu isolamento (Martins; Barbosa, 2020), as quais irão interferir na eficiência das demais análises subsequentes como a reação de polimerase em cadeia (PCR), a seleção de iniciadores (*primers*) e amplificação de DNA (Bomfim et al., 2020; Rocha et al., 2017).

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

Entretanto, pode ocorrer a degradação do DNA mesmo antes da sua extração, se as amostras não forem corretamente manuseadas ou preservadas, o que justifica o armazenamento adequado dos tecidos foliares (Mark et al., 2024). A rápida desidratação de folhas em sílica gel para posterior extração de DNA oferece inúmeras vantagens devido a sua simplicidade, facilidade de transporte e armazenamento para o laboratório, facilidade no rompimento da parede celular dos tecidos foliares, possibilidade de obtenção de um DNA de qualidade satisfatória e a sua preservação à longo prazo (Feres et al., 2005). Deste modo, o objetivo deste estudo foi avaliar dois métodos de armazenamento de tecidos foliares de *Eucalyptus cloeziana* para a extração de DNA de boa qualidade para análises moleculares.

Metodologia

Em uma fazenda particular do Município de Luminárias-Minas Gerais, situada nas coordenadas geográficas 21°27'7286" S 44°58'7801" W, foram coletadas folhas jovens de brotações de cepas de duas matrizes (M4 e M8) de um plantio de origem seminal de *Eucalyptus cloeziana*, estabelecido em 2007, conforme se ilustra na figura 1.

Figura 1. Matrizes 4 e 8 com brotações de cepas de *Eucalyptus cloeziana* usadas para coleta de folhas.



Fonte: Autores (2025).

Após a coleta das folhas, estas foram conservadas em papel alumínio, devidamente identificadas (M4 e M8), acondicionadas em caixa de isopor, e posteriormente transportadas para o Laboratório de Conservação Genética de Espécies Florestais da Universidade Federal de Lavras. No laboratório, dois tratamentos de armazenamento foram testados: (1) tecidos foliares armazenados em sílica gel (TFS); e (2) tecidos foliares congelados em freezer a -20°C (TFC). Aos dez dias após o armazenamento, procedeu-se a extração do DNA genômico utilizando o método CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) proposto por Doyle e Doyle (1990) com algumas adaptações. Utilizou-se tampão de extração Tris hidroclorato (Tris-HCL, pH 8,0) com 100 mM.L⁻¹, 1,4 mol. L⁻¹ de cloreto de sódio, 2% de CTAB, 1% de polivinilpirrolidona (PVP), 0,2% (v/v) de β-mercaptoetanol e 20 mM.L⁻¹ de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Em triplicatas, as amostras de tecidos foliares por tratamento foram maceradas utilizando macerador automático TissueLyser LT®, para o tratamento TFC e maceração manual utilizando areia autoclavada para o tratamento TFS, até a obtenção de um pó fino. Transferiu-se aproximadamente 300 mg do pó do tecido vegetal macerado para os tubos eppendorf de 2,0 mL devidamente identificados. Em cada tubo foi adicionado 700 µL de tampão de extração (2%, v/v), onde seguidamente foi feita a homogeneização das amostras com auxílio do agitador do tipo vortex. As amostras foram posteriormente incubadas em banho seco por 30 minutos a uma temperatura de 65°C, homogeneizadas manualmente a cada dez minutos. Em seguida, foram realizadas duas lavagens, pelos seguintes procedimentos: foi adicionado em cada tubo eppendorf 650 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (CIA, 24:1) e homogeneizadas manualmente até formar uma emulsão, seguida de uma centrifugação a 10.000 rpm por 12 minutos. Transferiu-se a fase aquosa (sobrenadante) para um novo tubo eppendorf de 2 mL. Ainda na capela adicionou-se 200 µL de tampão de extração e 650 µL de CIA em cada tubo e suavemente agitados manualmente. Após a finalização da segunda lavagem, transferiu-se a fase aquosa (sobrenadante) para um novo tubo eppendorf de 1.5 mL. Precipitou-se o DNA adicionando 230 µL de Acetato de Amônio e um volume aproximado de ~600µL de isopropanol

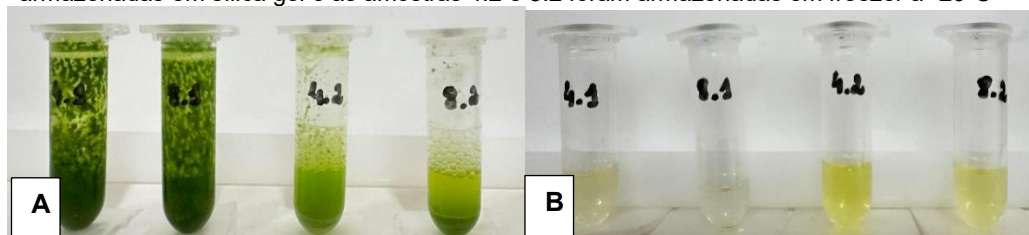
A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

gelado e, em seguida, homogeneizado manualmente. Centrifugou-se a 10.000 rpm por 12 minutos e depois descartou-se o sobrenadante, lavou-se a superfície do precipitado usando 250 μL de etanol, em três etapas, tendo sido utilizado etanol 70% nas duas primeiras etapas e etanol 100% na última etapa. Foi retirado o etanol e as amostras permaneceram na desidratação à temperatura ambiente, com fácil visualização do pellet. Ressuspendeu-se as amostras adicionando 40 μL de água ultrapura com 40 μg . mL^{-1} de RNase em cada tubo e deixou-se em banho seco a 37°C por 30 minutos, homogeneizando manualmente a cada dez minutos. Após a finalização da extração do DNA, e para análises comparativas dos dois tratamentos, foi avaliada a sua integridade pela técnica de eletroforese em gel de agarose a 0.8% corado com GelRed. A quantificação e qualidade do DNA foram avaliadas no espectrofotômetro NanoDrop® U.V.-vis 2000 (Thermo Scientific Wilmington, DE, USA) utilizando 1 μL de cada amostra, cujos parâmetros para a pureza foram a absorbância na razão $A_{260}/A_{280} = 1,8-2,0$ e $A_{260}/A_{230} \geq 2,0$, respectivamente.

Resultados

Observou-se que os métodos de armazenamento das folhas interferiram na integridade, na qualidade e na concentração do DNA genômico extraído nas duas matrizes de *Eucalyptus cloeziana*. Na Figura 2 pode-se observar a diferença na coloração das amostras provenientes de tecidos foliares armazenados em sílica gel (TFS) e no freezer a -20°C (TFC), após a primeira centrifugação (A) e última centrifugação (B) com a finalidade de obtenção de DNA. As amostras 4.1 e 8.1 proveem de amostras TFS enquanto que as 4.2 e 8.2 proveem de amostras TFC. As amostras TFS apresentaram inicialmente uma coloração verde mais escura e no final, um sobrenadante mais claro, quase incolor. Por outro lado, as amostras TFC apresentaram uma coloração verde mais clara após a primeira centrifugação e no final, o sobrenadante apresentou-se com uma tonalidade mais amarelada quando comparadas com as amostras TFS.

Figura 2. Coloração dos tecidos vegetais macerados de duas matrizes de *Eucalyptus cloeziana* (M4 e M8) após a primeira centrifugação (A) e sobrenadante após 2ª centrifugação (B), onde as amostras 4.1 e 8.1 foram armazenadas em sílica gel e as amostras 4.2 e 8.2 foram armazenadas em freezer a -20°C



Fonte: Autores (2025).

Na Tabela 1 são apresentados os resultados das avaliações realizadas no espectrofotômetro NanoDrop®, referentes a quantidade e qualidade do DNA. As amostras TFS apresentaram concentrações de DNA com valores situados entre 427,68 e 562,20 $\text{ng. } \mu\text{L}^{-1}$, enquanto que as amostras TFC, obtiveram concentrações que variaram entre 24,60 $\text{ng. } \mu\text{L}^{-1}$ e 53,50 $\text{ng. } \mu\text{L}^{-1}$, para as M4 e M8, respectivamente.

Tabela 1. Quantificação e análise de pureza de amostras de ácido desoxirribonucleico (DNA) a partir de 300 mg de tecidos foliares de duas matrizes de *Eucalyptus cloeziana* armazenadas em sílica gel e no freezer a -20°C

Matriz	Armazenamento	Concentração média de DNA ($\text{ng. } \mu\text{L}^{-1}$)	Qualidade média de DNA (nm)	
			Relação A_{260}/A_{280}	Relação A_{260}/A_{230}
M4	Sílica gel	427,68	2,06	2,19
M8	Sílica gel	562,20	2,01	2,09
M4	Freezer a -20°C	24,60	1,61	0,52

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

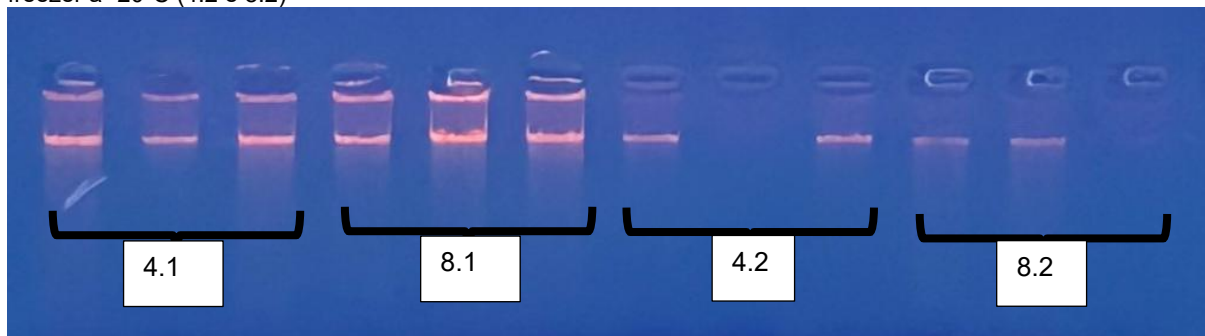
M8	Freezer a -20°C	53,30	1,41	0,42
----	-----------------	-------	------	------

Fonte: elaborado pelos próprios autores.

A média da absorbância A_{260}/A_{280} das amostras TFS para as M4 e M8 foi de 2,06 nm e 2,01 nm, respectivamente, enquanto que para as TFC situou-se entre 1,61 nm e 1,41 nm. Em relação à absorbância A_{260}/A_{230} os valores situaram-se entre 2,09 nm e 2,19 nm para TFS e 0,42 nm e 0,52 nm para TFC, respectivamente (Tabela 1).

Os resultados da análise eletroforética visualizadas em gel de agarose a 0,8%, (Figura 3), revelam uma integridade de DNA para as amostras de tecidos foliares de *E. cloeziana* armazenadas em TFS com uma visualização nítida (amostras 4.1 e 8.1), enquanto que as amostras TFC apresentaram-se com sinais de degradação, pois são menos nítidas e com algumas falhas (amostras 4.2 e 8.2).

Figura 3. Resultado da avaliação da integridade do DNA em electroforese em gel de agarose 0.8%, para amostras provenientes de tecidos foliares de *Eucalyptus cloeziana* armazenados em sílica gel (4.1 e 8.1) e em freezer a -20°C (4.2 e 8.2)



Fonte: elaborado pelos próprios autores

Discussão

Os resultados apresentados na Tabela 1, obtidos de 300 mg de tecidos foliares de *E. cloeziana* demonstram que o armazenamento TFS apresentou maiores concentrações de DNA quando comparadas com as amostras do armazenamento TFC, com os maiores valores de 562,20 ng. μL^{-1} e de 53,30 ng. μL^{-1} , para TFS e TFC, respectivamente. Portanto o TFS apresentou-se com DNA suficiente para análises moleculares subsequentes.

Estes resultados contrastam com os obtidos por Martins e Barbosa (2020), onde amostras de *Geissospermum urceolatum*, apesar de terem apresentado rápida desidratação após exposição em sílica gel por 24 horas, tiveram sinais de oxidação e degradação de DNA, com concentrações variando entre 50, 100 e 200 ng. μL^{-1} . Entretanto, Vega-Vela, Sánchez (2011) observaram uma concentração média de DNA de 21,73 ng. μL^{-1} em 16 espécies de plantas medicinais e aromáticas usando 150 mg de tecidos foliares frescos, significando que os obtidos no presente estudo se encontram dentro dos padrões aceitáveis.

Hepp et al. (2020) ao extraírem DNA genômico usando CTAB adaptado de Doyle e Doyle (1990) em *Eugenia uniflora* L., reportaram uma concentração média de DNA de 315,94 ng. μL^{-1} e um índice de pureza das amostras de 1,90. Portanto, os valores de concentração de DNA podem ser influenciados pelas características inerentes à espécie e pelo método de armazenamento das amostras. Esse fato é corroborado por Costa e Moura (2001), onde foi constatada que a quantificação de DNA após a extração é uma etapa fundamental para a eficiência da reação de polimerase em cadeia (PCR) pois, concentrações de DNA inadequadas implicarão falhas nas etapas subsequentes, podendo estas variar em função do genoma e protocolo de extração utilizado. De acordo com Barbosa (1998), a pureza do DNA refere-se à ausência de contaminantes que possam interferir em análises moleculares, sendo avaliada pela razão A_{260}/A_{280} e razão A_{260}/A_{230} . A faixa ideal para o DNA puro varia entre 1,8 e 2,0 (A_{260}/A_{280}) que indicam ausência de proteínas ou fenóis e entre 2,0 e 2,2 para ausência de contaminantes orgânicos, sais, detergentes, entre outros contaminantes. Os mesmos autores afirmaram que quando os valores da absorbância A_{260}/A_{230} forem inferiores ao esperado (1.8-2.2), estas sinalizam a presença de possível contaminação por carboidratos, fenóis, guanidina ou glicogênio. No

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

presente estudo foi avaliada a pureza das amostras pelo método de leitura das absorvâncias (A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230}) no espectrofotômetro NanoDrop®. A absorvância A_{260}/A_{230} para as amostras TFS, tanto para a M4 quanto para a M8, apresentaram valores dentro de padrões aceitáveis, situando-se entre 2,19 nm e 2,09 nm para M4 e M8, respectivamente. Resultados semelhantes aos encontrados neste estudo foram relatados por Bomfim et al. (2020) em folhas de plantas adultas de *Elaeis guineensis* com absorvância A_{260}/A_{280} variando de 1,22 e 2,07, com ligeira contaminação atribuída ao acondicionamento inadequado durante a coleta e transporte. Do mesmo modo, Vieira et al., (2015) ao trabalharem com *Neoraputia alba* utilizando o protocolo de extração de Doyle e Doyle (1990) encontraram valores de absorvância (A_{260}/A_{280}) variando entre 1,76 e 1,88, também considerados aceitáveis, após testes de diferentes métodos de armazenamento de tecidos foliares. As amostras TFC apresentaram valores fora dos padrões ideais da absorvância A_{260}/A_{230} , denotando alguma contaminação, cujos valores oscilaram entre 0,52 nm e 0,42 nm para M4 e M8, respectivamente. Bomfim et al. (2020) obtiveram valores da absorvância A_{260}/A_{230} na faixa entre 0,88 e 2,09 com a maioria em torno de 1,7, indicando ausência de contaminação por polissacarídeo e fenol. Outrossim, Furtado-Filho et al. (2021) ao compararem métodos de isolamento de DNA em ipê-amarelo (*Handroanthus serratifolius*) usando o protocolo de extração desenvolvido por Doyle e Doyle (1990), obtiveram uma concentração de DNA de 740,7 ng. μL^{-1} enquanto que para a estimativa de pureza, se obteve valores da razão A_{260}/A_{280} A_{260}/A_{230} de 1,85 e 1,55, respectivamente, sendo consideradas puras. Zanetti et al. (2019), ao testarem diferentes protocolos para extração de DNA genômico em pau-de-balsa (*Ochroma pyramidale*) a partir de 150 mg de tecidos foliares armazenados em sacos plásticos contendo sílica em freezer a -20°C , observaram uma média da razão A_{260}/A_{280} , acima de 1,9, revelando ausência de contaminação por proteínas. Krishnan et al. (2024) ao utilizarem o protocolo CTAB em três espécies arbóreas (*Prosopis cineraria*, *Conocarpus erectus* e *Phoenix dactylifera*) obtiveram um DNA de alta qualidade (1,75-1,85) e uma concentração acima de 2. Ainda no mesmo estudo foi de $291 \pm 21,2$ e $279 \pm 29,7$, respectivamente. A razão A_{260}/A_{280} do DNA das amostras secas oscilou entre 1,69 a 1,75, enquanto que a razão A_{260}/A_{230} situou-se entre 1,70 e 1,79. A Figura 3 apresenta a análise eletroforética do DNA, evidenciando resultados satisfatórios da integridade do DNA para as amostras TFS (4.1 e 8.1) por serem nítidas e não apresentarem nenhum arraste, enquanto que as demais que correspondem a TFC não são nítidas (4.2 e 8.2) indicando degradação do DNA da espécie.

Os resultados alcançados no presente estudo são úteis para um planejamento adequado do armazenamento dos tecidos foliares de *Eucalyptus cloeziana* com a finalidade de extração de DNA em quantidade e qualidade desejáveis.

Conclusão

Com base nos resultados encontrados no presente trabalho conclui-se que as amostras de tecidos foliares de *Eucalyptus cloeziana* armazenadas em sílica gel apresentaram DNA genômico com melhor concentração ($427,68 \text{ ng. } \mu\text{L}^{-1}$ e $562,20 \text{ ng. } \mu\text{L}^{-1}$), melhor integridade e melhor pureza com a razão A_{260}/A_{280} entre 2,01 e 2,06 razões A_{260}/A_{230} com valores entre 2,09 e 2,19, respectivamente.

Referências

- BARBOSA, M. M. Quantificação e controle da qualidade do DNA genômico. In: **MILACH, S. ed. Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre, p.99-106, 1998.
- BOMFIM, João Pedro de Andrade *et al.* Otimização da extração e amplificação de DNA de dendezeiro: folhas em diferentes fases de desenvolvimento. **Ciência Florestal**, v. 30, n. 3, p. 916–926, 2020.
- COSTA, Maria Rosa; MOURA, Elisa Ferreira. **Manual de Extração de DNA**. Documentos 89 ed. Amazônia Oriental: Embrapa, 2001.
- DOYLE, Jeff J. ; DOYLE, June L. Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. **Focus Rockville**, v. 12, n. 1, p. 12–15, 1990.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

FERES, Fabiola *et al.* Avaliação de métodos de preservação de amostras de plantas de Savanas Neotropicais para a obtenção de DNA de alta qualidade para estudos moleculares. **Revista Brasil. Bot.**, v. 28, n. 2, p. 277–283, jun. 2005.

FURTADO-FILHO, Júlio César *et al.* Comparação de métodos de isolamento do DNA em *Handroanthus serratifolius*. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 35765–35779, 7 abr. 2021.

HEPP, Diego *et al.* Análises de extrações de DNA: ponto de partida para aplicações biotecnológicas na área da biologia molecular. **Revista de Educação, Ciência e Tecnologia do IFRS**, v. 7. Ed Esp Biotec, n. 3, p. 69–87, 2020.

HUANG, Ying *et al.* Exploring the Relationship Between Growth Strain and Growth Traits in *Eucalyptus cloeziana* at Different Age Stages. **Sustainability**, v. 17, n. 5, p. 1–18, 4 mar. 2025.

KRISHNAN, Saranya *et al.* Cationic and anionic detergent buffers in sequence yield high-quality genomic DNA from diverse plant species. **Analytical Biochemistry**, v. 684, p. 115372–115382, 1 jan. 2024.

LIN, Zihao *et al.* Improving Propagation Efficiency of *Eucalyptus cloeziana* ‘Chuanlinzhen 7523’ by Optimizing Explants and Proliferation Medium. **Forests**, v. 15, n. 12, 1 dez. 2024.

LU, Hui *et al.* Genetic diversity, core collection construction and genotype–environment associations of *Eucalyptus cloeziana* germplasm based on EST-SSR markers. **European Journal of Forest Research**, p. 1–19, 19 abr. 2025.

LV, Jiabin *et al.* Genetic diversity analysis of a breeding population of *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. (*Myrtaceae*) and extraction of a core germplasm collection using microsatellite markers. **Industrial Crops and Products**, v. 145, p. 112157, 1 mar. 2020.

MARK, Deogratius *et al.* Assessing the effect of sample storage time on viral detection using a rapid and cost-effective CTAB-based extraction method. **Plant Methods**, v. 20, n. 1, p. 64, 8 maio 2024.

MARTINS, Suzana da Silva de Oliveira; BARBOSA, Andreza Miná. Metodologia de coleta e extração de DNA da Acariquara-Branca (*Geissospermum urceolatum* a.h. Gentry, 1984), no município de Manacapuru, km 60 – comunidade Nova Esperança. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 9, p. 69130–69141, 2020.

REIS, Cristiane Aparecida Floriane; *et al.* *Eucalyptus cloeziana*: estado da arte de pesquisas no Brasil. **Documentos 304-Embrapa Florestas**, n. June, p. 1–43, 2017.

ROCHA, Vinicius Delgado da; *et al.* Efeito da idade da folha na qualidade do DNA extraído de *Piper aduncum* L. **Rev. Ciênc. Agroamb.** v. 15, n. 2, p. 219–222, 2017.

VEGA-VELA, Nelson Enrique; SÁNCHEZ, María Isabel Chacón. Isolation of high-quality DNA in 16 aromatic and medicinal Colombian species using silica-based extraction columns. **Agroonomía Colombiana**, v. 29, n. 3, p. 349–357, 2011.

VIEIRA, Alessandra Abreu Rodrigues *et al.* Estudo comparativo de métodos de armazenamento de tecidos foliares para extração de DNA de *Neoraputia alba* (Nees e Mart.) Emmerich. *In*: 22 out. 2015.

ZANETTI, Géssica Tais *et al.* Protocolo para extração de DNA genômico de *Ochroma pyramidale*. **Journal of Agronomic Sciences**, v. 8, n. 1, p. 73–84, 2019.

Agradecimentos

*A Ciência do **NANO** e seu impacto transformador no **MACRO***

O presente trabalho foi realizado com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) – convênio 5.02/2022; Redes Estruturantes, de Pesquisa Científica ou de Desenvolvimento Tecnológico (FAPEMIG) – RED-00225-23; CAPES e CNPq (302505/2022-9).