

Análise patentométrica e bibliométrica de microrganismos-chave para produção de ácidos carboxílicos de relevância estratégica

Sérgio Saraiva Nazareno dos Anjos¹, Victória Cristina Cardoso da Paixão Hass Gonçalves², Melissa Braga³, Mônica Caraméz Triches Damaso⁴

Resumo

Os ácidos carboxílicos são compostos químicos de importância estratégica e com diversas aplicações industriais, incluindo seu uso como intermediários ou blocos construtores (*building blocks*) para obtenção de outros produtos. O avanço da bioeconomia amplia possibilidade de obtenção e uso desses ácidos a partir de recursos biológicos. Com isso, torna-se um contraponto às fontes fósseis e abrem leques de oportunidades para o crescimento do mercado de produtos de base biológica. Estudos de prospecção tecnológica têm o papel de gerar dados estratégicos para fomentar sistemas de inovação e garantir a competitividade de instituições de Ciência e Tecnologia. Estudos elaborados pela Agência Internacional de Energia (IEA), pelo Laboratório de Energias Renováveis (NREL) do Departamento de Energia Americano, e pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) apontam a bioeconomia como estratégia para crescimento nas próximas décadas. Dentre as ferramentas utilizadas para prospecção tecnológica, encontram-se as análises bibliométricas e patentométricas. Neste trabalho, estas ferramentas foram utilizadas com o objetivo de desenvolver um estudo exploratório e quantitativo por meio de documentos científicos e patentários recuperados nas bases de dados *Web of Science* e *Derwent Innovation Index*, respectivamente, relacionados com microrganismos usados na obtenção de quatro ácidos orgânicos de relevância estratégica: ácido 3-hidroxiisovalérico, ácido itacônico, ácido fumárico e ácido málico. O estudo tem como propósito identificar oportunidades de desenvolvimento tecnológico com microrganismos pertencentes à Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados à Agroenergia e Biorrefinarias – CMMAABio. Os resultados obtidos indicam microrganismos de espécies presentes na CMMAABio, que podem ser avaliados em futuros projetos de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (P,D&I) da Embrapa Agroenergia para obtenção desses ácidos.

Palavras-chave: prospecção tecnológica, ácido 3-HP, ácido fumárico, ácido itacônico, ácido málico.

¹ Farmacêutico e administrador, mestre em Administração, analista da Embrapa Agroenergia, sergio.saraiva@embrapa.br

² Graduanda em Biotecnologia, Universidade de Brasília, vivi_hass@hotmail.com

³ Química, mestre em Físico-Química, analista da Embrapa Agroenergia, melissa.braga@embrapa.br

⁴ Engenheira Química, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, monica.damaso@embrapa.br

Introdução

Com o avanço da bioeconomia, economia baseada no uso de recursos biológicos em detrimento às fontes fósseis, abre-se um leque de oportunidades para o crescimento do mercado de produtos de base biológica, dentre eles os ácidos carboxílicos. Estes ácidos são compostos químicos muito importantes comercialmente, e são obtidos por meio de processos químicos, bioquímicos ou híbridos, podendo ser aplicados diretamente em diferentes setores industriais, além de serem utilizados como blocos construtores (*building blocks*) para obtenção de outros produtos.

Relatórios para o desenvolvimento da bioeconomia elaborados por instituições de renome como o Grupo de Especialistas da União Europeia, a Agência Internacional de Energia (IEA), e o Laboratório de Energias Renováveis (NREL) do Departamento de Energia Americano apontam uma série de ácidos de relevância estratégica capazes de serem obtidos a partir da biomassa lignocelulósica, dentre eles os ácidos 3-hidroxiopropiônico, itacônico, fumárico e málico (Werpy; Peterson, 2004; Newton et al., 2017; De Jong et al., 2020).

O ácido 3-hidroxiopropiônico (3-HP; $C_3H_6O_3$) é um alfa hidroxíácido, ainda em fase de desenvolvimento industrial, sobre o qual recai uma grande expectativa como intermediário do ácido acrílico, um monômero de polímeros de grande consumo pela sociedade. Além disso, também pode ser intermediário de polímeros biodegradáveis - os poli-hidroxicanoatos - e de 1,3-propanodiol (Wang et al., 2016).

O ácido itacônico ($C_5H_6O_4$) e o ácido fumárico ($C_4H_4O_4$) são produtos das vias metabólicas dos microrganismos, especificamente do ciclo de Krebs, e são intermediários da porção oxidativa do ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Ambos os ácidos estavam entre os 12 principais *building blocks* derivados de biomassa com aplicações que se estendem desde química fina até farmacêutica (Jimenez-Quero et al., 2017).

O ácido fumárico tem propriedades acidulantes, preservativas e flavorizantes para aplicação em indústria alimentícia. Também é usado como monômero para produção de polímeros e agente de colagem ácido em indústrias de papel e celulose (Araji et al., 2017). Já o ácido itacônico tem importância industrial pelo seu potencial de substituir o ácido acrílico e metacrílico em razão da semelhança estrutural das três estruturas (Robert; Friebel, 2016).

O ácido málico ($C_4H_6O_5$) também é um intermediário no ciclo de Krebs e foi classificado como uma das principais moléculas-alvo de processos bioquímicos, sendo alvo de diversas pesquisas para otimizar condições de produção (Trichez et al., 2018). Sendo enantiomericamente puro, o ácido L-málico é desejável para aplicações nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de polímeros. Embora a bioconversão de fumarato a malato seja um processo industrial estabelecido, não há um processo comercial estabelecido para a produção de ácido L-málico a partir de substrato sacaríneo, o que tornaria o método biotecnológico de produção do ácido málico economicamente mais viável (Hronská; Micháliková; Rosenberg, 2017).

Diante da relevância estratégica desses ácidos, o presente trabalho teve como objetivo identificar os microrganismos mais citados em documentos científicos e de patentes para produção de ácido 3-hidroxiopropiônico, ácido itacônico, ácido fumárico e ácido málico. Em posse dessas informações, oportunidades poderão ser criadas para os microrganismos da Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados à Agroenergia

e Biorrefinarias – CMMAABio, visando o desenvolvimento de novas tecnologias de produção destes ácidos em futuros projetos de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação.

Material e Métodos

As buscas foram realizadas em documentos científicos e patentários, recuperados nas bases de dados *Web of Science* (WoS) e *Derwent Innovation Index* (DII), respectivamente, empregando os termos listados na Tabela 1 no campo “tópico”. Aos termos das buscas foram associados operadores booleanos e caracteres curingas para aumentar a quantidade de documentos recuperados. À busca de documentos patentários, agregou-se também a Classificação Internacional de Patente (CIP) C12P, associadas a processos bioquímicos, para captar todos os documentos referenciados. O intervalo temporal escolhido foi entre de janeiro de 2008 a janeiro de 2020.

Os gêneros e/ou as espécies dos microrganismos foram identificados por mineração de palavras de resumos desses documentos, empregando o sistema Vantage Point®.

Tabela 1. Estratégia de busca para prospecção de microrganismos produtores dos ácidos orgânicos de interesse.

| Nome comum do ácido orgânico | Estratégia de busca (termos associados) | | |
|------------------------------|---|--|-------------------|
| | Sinônimos dos ácidos orgânicos | Microrganismos e processos envolvidos | Busca de patentes |
| 3-HP | “3-Hydroxypropanoic acid” or “3-hydroxypropanoate” or “3-HPA” or “3-Hydroxypropionic acid” or 3-HP | | |
| Fumárico | “fumaric acid” or fumarate or “trans-Butenedioic acid” | AND | |
| Itacônico | “itaconic acid” or itaconate or “2-Methylenesuccinic acid” or “Methylenebutanedioic acid” or “Methylenesuccinic Acid” or “Propylenedicarboxylic acid” or “2-methylidenebutanedioic acid” or “2-Propene-1,2-dicarboxylic acid” | enzym* OR ferment* or yeast* or fung* or bacteri* or microorganism\$ | AND C12P* |
| Málico | “malic acid” or malate or “2-hydroxysuccinic acid” or “2-hydroxybutanedioic acid” | | |

Resultados e Discussão

A Tabela 2 apresenta as quantidades de documentos recuperados por meio das estratégias de buscas apresentadas na seção anterior, incluindo as razões de patente/artigo, em ordem crescente.

A razão numérica entre quantidades de documentos patentários e científicos recuperadas em uma busca suscita o estágio de maturidade de tecnologias existentes no mercado-alvo. Tal relação decorre do aspecto tecnológico de uma patente e a relação de

uma publicação a atividades científicas (Quintella et al., 2011). Partindo dessa premissa, a predominância de documentos patentários em relação aos científicos denotam alta maturidade de tecnologias bioquímicas associadas aos quatro ácidos orgânicos em análise, principalmente para o ácido itacônico.

Tabela 2. Quantidade de documentos recuperados e proporção patente/artigo.

| Ácido | Documentos Patentários | Documentos científicos | Razão patente/artigo |
|-----------|------------------------|------------------------|----------------------|
| 3-HP | 302 | 271 | 1,11 |
| Málico | 4732 | 3299 | 1,43 |
| Fumárico | 2371 | 1609 | 1,47 |
| Itacônico | 624 | 322 | 1,93 |

Nas próximas tabelas, as bactérias e os fungos (leveduriformes e filamentosos) produtores dos ácidos de interesse estarão grifados em amarelo e em azul, respectivamente.

A Tabela 3 apresenta os microrganismos associados à produção de ácido 3-HP e o respectivo número de ocorrência nos documentos científicos e patentários. A busca bibliométrica recuperou 4 microrganismos, enquanto a patentométrica 54, dos quais somente os 14 mais citados estão apresentados. Verificou-se que todos os microrganismos recuperados na pesquisa bibliométrica estão presentes também nos documentos de patente, mesmo que somente em termos de gênero.

Tabela 3. Microrganismos prospectados em documentos patentários e bibliográficos sobre produção de ácido 3-HP.

| Documentos Científicos | | Documentos Patentários | |
|------------------------|---------------------------------|------------------------|----------------------------|
| Número de ocorrências | Microrganismo | Número de ocorrências | Microrganismo |
| 29 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 95 | <i>Escherichia coli</i> |
| 21 | <i>Escherichia coli</i> | 94 | <i>Escherichia sp.</i> |
| 13 | <i>Lactobacillus reuteri</i> | 62 | <i>Saccharomyces sp.</i> |
| 12 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 43 | <i>Pseudomonas sp.</i> |
| | | 39 | <i>Bacillus sp.</i> |
| | | 37 | <i>Klebsiella sp.</i> |
| | | 37 | <i>S. cerevisiae</i> |
| | | 35 | <i>Candida sp.</i> |
| | | 35 | <i>Clostridium sp.</i> |
| | | 33 | <i>Pichia sp.</i> |
| | | 30 | <i>Corynebacterium sp.</i> |
| | | 25 | <i>Kluyveromyces sp.</i> |
| | | 21 | <i>Salmonella sp.</i> |
| | | 20 | <i>Lactobacillus sp.</i> |

Percebe-se que *Escherichia coli* é um dos microrganismos mais usados na produção de ácido 3-HP, com quantidade importante de citações em trabalhos científicos e em documentos de patente. Essa bactéria é utilizada como uma biofábrica celular para expressão heteróloga deste ácido, assim como de vários outros bioprodutos.

A Tabela 4 apresenta os microrganismos associados à obtenção de ácido málico citados na literatura científica e patentária. A busca bibliométrica recuperou 28 microrganismos, enquanto a patentométrica, 22. Serão apresentados os dez mais citados em ambos os tipos de documentos recuperados.

Para o ácido málico, existe uma grande diversidade de microrganismos produtores dentre bactérias, leveduras e fungos filamentosos tanto na pesquisa bibliométrica quanto patentométrica, embora os gêneros *Escherichia* e *Aspergillus* tenham quantidades significativas de documentos relatados. A bactéria *Oenococcus oeni*, mais citada da pesquisa bibliométrica, é o microrganismo responsável pela conversão de ácido málico em ácido láctico no processo de fermentação maloláctica, tornando o vinho menos ácido e mais palatável (Fahimi; Brandam; Taillandier, 2014).

Tabela 4. Microrganismos prospectados em documentos patentários e bibliográficos sobre produção de ácido málico.

| Documentos Científicos | | Documentos Patentários | |
|------------------------|----------------------------------|------------------------|----------------------------|
| Número de ocorrências | Microrganismo | Número de ocorrências | Microrganismo |
| 66 | <i>Oenococcus oeni</i> | 36 | <i>Escherichia coli</i> |
| 62 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 29 | <i>Bacillus</i> sp. |
| 43 | <i>Escherichia coli</i> | 29 | <i>Escherichia</i> sp. |
| 33 | <i>Aureobasidium pullulans</i> | 27 | <i>Saccharomyces</i> sp. |
| 27 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | 24 | <i>Lactobacillus</i> sp. |
| 22 | <i>Schizosaccharomyces pombe</i> | 19 | <i>Aspergillus</i> sp. |
| 19 | <i>Rhodobacter sphaeroides</i> | 11 | <i>Aspergillus niger</i> |
| 16 | <i>Yarrowia lipolytica</i> | 11 | <i>Clostridium</i> sp. |
| 15 | <i>Bacillus subtilis</i> | 11 | <i>Corynebacterium</i> sp. |
| 10 | <i>Aspergillus oryzae</i> | 11 | <i>Pichia</i> sp. |

A Tabela 5 apresenta os microrganismos e o número de documentos relacionados com a obtenção de ácido fumárico citados na literatura científica e patentária. A busca bibliométrica recuperou 10 microrganismos, enquanto a patentométrica 75, embora somente os 21 mais recorrentes estejam apresentados na tabela.

Da mesma forma que o ácido 3-HP, *Escherichia coli* recombinante também é um dos microrganismos mais usados na obtenção de ácido fumárico, com cenário similar em documentos científicos e patentários. No entanto, os outros microrganismos mais citados em cada tipo de documento diferem de forma considerável, o que leva a crer que há cenários distintos, com maior ou menor maturidade tecnológica, embora todos os microrganismos prospectados na pesquisa bibliométrica também tenham sido identificados na pesquisa patentométrica (dados parcialmente mostrados), ao menos em relação ao gênero, exceto *Desulfovibrio* sp.

Tabela 5. Microrganismos prospectados em documentos patentários e bibliográficos sobre produção de ácido fumárico.

| Documentos Científicos | | Documentos Patentários | |
|------------------------|---------------------------------|------------------------|--------------------------------|
| Número de ocorrências | Microrganismo | Número de ocorrências | Microrganismo |
| 44 | <i>Rhizopus oryzae</i> | 200 | <i>Escherichia coli</i> |
| 32 | <i>Escherichia coli</i> | 89 | <i>Lactobacillus</i> sp. |
| 19 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 88 | <i>Pichia</i> sp. |
| 13 | <i>Geobacter sulfurreducens</i> | 80 | <i>Aspergillus</i> sp. |
| 11 | <i>Geobacter</i> sp. | 78 | <i>Clostridium</i> sp. |
| 10 | <i>Shewanella</i> sp. | 75 | <i>Pseudomonas</i> sp. |
| 8 | <i>Rhizopus arrhizus</i> | 74 | <i>Corynebacterium</i> sp. |
| 7 | <i>Aspergillus oryzae</i> | 73 | <i>Kluyveromyces</i> sp. |
| 6 | <i>Desulfovibrio</i> sp. | 66 | <i>Lactococcus</i> sp. |
| 5 | <i>Yarrowia lipolytica</i> | 56 | <i>Candida</i> sp. |
| | | 55 | <i>Rhizopus</i> sp. |
| | | 55 | <i>Y. lipolytica</i> |
| | | 45 | <i>Rhodococcus</i> sp. |
| | | 36 | <i>Debaryomyces</i> sp. |
| | | 34 | <i>Schizosaccharomyces</i> sp. |
| | | 29 | <i>Cupriavidus</i> sp. |
| | | 27 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| | | 26 | <i>Klebsiella</i> sp. |
| | | 26 | <i>Salmonella</i> sp. |
| | | 25 | <i>Enterobacter</i> sp. |
| | | 25 | <i>Zymomonas</i> sp. |

A Tabela 6 apresenta os microrganismos associados à produção de ácido itacônico citados na literatura científica e patentária. A busca bibliométrica recuperou 5 microrganismos, enquanto a patentométrica, 45, porém somente os 17 mais representativos estão mostrados.

Diferentemente dos resultados relatados para os ácidos 3-HP e fumárico em que predominava a ocorrência de bactérias, principalmente em relação a patentes, para o ácido itacônico predominam no aspecto científico e tecnológico fungos do gênero *Aspergillus* sp., significativamente pela espécie *A. terreus*. Este resultado é corroborado por Nemestóthy et al. (2020), que afirmam que *A. terreus* é uma linhagem eficiente para produção de ácido itacônico por sistemas de fermentação submersa.

Tabela 6. Microrganismos prospectados em documentos patentários e bibliográficos sobre produção de ácido itacônico.

| Documentos Científicos | | Documentos Patentários | |
|------------------------|----------------------------|------------------------|---------------------------------|
| Número de ocorrências | Microrganismo | Número de ocorrências | Microrganismo |
| 53 | <i>Aspergillus terreus</i> | 64 | <i>Aspergillus</i> sp. |
| 13 | <i>Ustilago maydis</i> | 60 | <i>Saccharomyces</i> sp. |
| 10 | <i>Escherichia coli</i> | 46 | <i>Bacillus</i> sp. |
| 9 | <i>Aspergillus niger</i> | 45 | <i>Escherichia</i> sp. |
| 5 | <i>Yarrowia lipolytica</i> | 45 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| | | 42 | <i>Candida</i> sp. |
| | | 39 | <i>Pichia</i> sp. |
| | | 36 | <i>E. coli</i> |
| | | 35 | <i>Trichoderma</i> sp. |
| | | 31 | <i>Yarrowia</i> sp. |
| | | 26 | <i>Kluyveromyces</i> sp. |
| | | 25 | <i>Corynebacterium</i> sp. |
| | | 24 | <i>Clostridium</i> sp. |
| | | 24 | <i>Fusarium</i> sp. |
| | | 21 | <i>Lactobacillus</i> sp. |
| | | 21 | <i>Schizosaccharomyces</i> sp. |
| | | 20 | <i>Pseudomonas</i> sp. |

Conclusões

A aplicação das ferramentas de prospecção tecnológica permitiu a identificação de diversos microrganismos envolvidos na produção bioquímica de ácidos 3-HP, fumárico, itacônico e málico. Há predomínio de bactérias para a produção de ácidos 3-HP e fumárico, de fungos para a produção de ácido itacônico e equilíbrio entre bactérias e fungos para ácido málico. Essa diversidade cria oportunidades de bioprospecção e agregação de valor à Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados à Agroenergia e Biorrefinarias – CMMAABio, que podem ser avaliados em futuros projetos de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação da Embrapa.

Agradecimentos

FAPDF e Embrapa pelo apoio financeiro e CNPq pela bolsa PIBIC.

Referências

ARAJI, N.; MADJINZA, D. D.; CHATEL, G.; MOORES, A.; JÉRÔME, F.; VIGIER, K. D. O. Synthesis of maleic and fumaric acids from furfural in the presence of betaine hydrochloride and hydrogen peroxide. **Green Chemistry**, London, v. 19, n. 1, p. 98-101, 2017. Disponível em <https://doi.org/10.1039/C6GC02620F>. Acesso em 19 set. 2020.

- DE JONG, E.; STICHNOTHE, H.; BELL, G.; JØRGENSEN, H. **Bio-Based Chemicals: a 2020 Update**. Paris: IEA Bioenergy, 2020. Disponível em: <http://task42.ieabioenergy.com/wp-content/uploads/2020/02/Bio-based-chemicals-a-2020-update-final-200213.pdf>. Acesso em 29 set. 2020.
- FAHIMI, N.; BRANDAM, C.; TAILLANDIER, P. A mathematical model of the link between growth and L-malic acid consumption for five strains of *Oenococcus oeni*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 30, n. 12, p. 3163-3172, 2014. Disponível em <https://dx.doi.org/10.1007/s11274-014-1743-8>. Acesso em 18 set. 2020.
- HRONSKÁ, H.; MICHÁLIKOVÁ, S.; ROSENBERG, M. Microbial production of specialty C4 dicarboxylic acids from maleic anhydride. **Journal of Food and Nutrition Research**, Newark, v. 56, n. 3, p. 219-231, 2017. Disponível em <https://www.researchgate.net/publication/320346177>. Acesso em 19 set. 2020.
- JIMENEZ-QUERO, A.; POLLET, E.; ZHAO, M.; MARCHIONI, E.; AVEROUS, L.; PHALIP, V. Fungal Fermentation of Lignocellulosic Biomass for Itaconic and Fumaric Acid Production. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 27, n. 1., p. 1-8, 2017. Disponível em <https://doi.org/10.4014/jmb.1607.07057>. Acesso em 18 set. 2020.
- NEMESTÓTHY, N.; KOMÁROMY, P.; BAKONYI, P.; TÓTH, A. L.; TÓTH, G.; GUBICZA, L.; BÉLAFI-BAKÓ, K. Carbohydrate to Itaconic Acid Conversion by *Aspergillus terreus* and the Evaluation of Process Monitoring Based on the Measurement of CO₂. **Waste and Biomass Valorization**, New York, v. 11, p. 1069–1075, 2020. Disponível em <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00729-3>. Acesso em 18 set. 2020.
- NEWTON, A.; LESCAI, F.; CARREZ, D.; CARUS, M.; GRIFFON, M.; JILKOVA, J.; JUHÁSZ, A.; LANGE, L.; MAVSAR, R.; PURSULA, T.; ORTEGA, C.V. **Expert Grupo Report: review of the EU Bioeconomy Strategy and its action plan**. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2017. Disponível em https://ec.europa.eu/research/bioeconomy/pdf/publications/bioeconomy_expert_group_report.pdf. Acesso em 19 set. 2020.
- QUINTELLA, C. M.; CERQUEIRA, G. S.; MIYAZAKI, S. F.; HATIMONDI, S. A.; MUSSE, A. P. S. **CAPTURE DE CO₂: Panorama (Overview) - Mapeamento Tecnológico da Captura de CO₂ baseado em patentes e artigos**. 1. ed. Salvador: Editora da UFBA, 2011. v. 1.
- ROBERT, T.; FRIEBEL, S. Itaconic acid – a versatile building block for renewable polyesters with enhanced functionality. **Green Chemistry**, London, v. 18, n. 10, p. 2922–2934, 2016. Disponível em <https://doi.org/10.1039/C6GC00605A>. Acesso em 19 set. 2020.
- TRICHEZ, D.; AURIOL, C.; BAYLAC, A.; IRAGUE, R.; DRESSAIRE, C.; CARNICER-HERAS, M.; HEUX, S.; FRANÇOIS, J. M.; WALTHER, T. Engineering of *Escherichia coli* for Krebs cycle-dependent production of malic acid. **Microbial Cell Factories**, New York, v. 17, artigo nº 113, 2018. Disponível em <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0959-y>. Acesso em 18 set. 2020.
- WANG, Y.; SUN, T.; GAO, X.; SHI, M.; WU, L.; CHEN, L.; ZHANG, W. Biosynthesis of platform chemical 3-hydroxypropionic acid (3-HP) directly from CO₂ in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Metabolic Engineering**, Amsterdam, v. 34, p. 60-70, 2016. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.10.008>. Acesso em 18 set. 2020.
- WERPY, T.; PETERSON, G. **Top Value Added Chemicals From Biomass Volume I: Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas**. Oak Ridge: PNNL and NREL, 2004. Disponível em: <https://www.nrel.gov/docs/fy04osti/35523.pdf>. Acesso em 29 set. 2020.