



FUNCIONALIZAÇÃO ÁCIDA DE CARVÃO ATIVADO COMERCIAL IMPREGNADO COM ALICINA PARA INIBIÇÃO DE *E. COLI*

Marcela Martins Barbosa¹, Ian Bach Kauche², Débora Federici dos Santos³, Benício Alves de Abreu Filho⁴, Wardleison Martins Moreira⁵, Maria Angélica Simões Dornellas de Barros⁶

¹Mestranda em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá, Paraná. Bolsista Capes. pg405568@uem.br

²Acadêmico de Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá, Paraná. Bolsista CNPq. ra133073@uem.br

³Pós-Doutoranda em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. Bolsista CNPq. deborafederici37@gmail.com

⁴Doutor, Docente. Departamento da Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá, Paraná. baafilho@uem.br

⁵Doutor, Docente. Departamento de Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá, Paraná. wmmoreira@uem.br

⁶Doutora, Docente. Departamento de Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá, Paraná. masdbarros@uem.br

RESUMO

A adsorção é um fenômeno de superfície amplamente empregado em processos como purificação de água, controle da poluição atmosférica, recuperação de metais e catálise. Sua relevância está associada à elevada eficiência e ao potencial de gerar tecnologias mais econômicas e ambientalmente sustentáveis em comparação a métodos convencionais. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de inativação da bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) em água por meio do processo adsorptivo utilizando carvão ativado comercial funcionalizado com ácido fosfórico e impregnado com alicina, composto bioativo extraído do alho (*Allium sativum*). A metodologia consistiu na síntese do carvão funcionalizado com ácido fosfórico e impregnado com alicina e na realização de ensaios de adsorção, nos quais o adsorvente foi adicionado às amostras de águas contaminadas com a *E. coli*. Após o tempo de contato determinado, foram realizadas as análises microbiológicas para verificar a eficiência da inativação bacteriana. Deste modo, este estudo propõe integrar propriedades adsorventes e biocidas em um único material, explorando o potencial do carvão ativado como suporte para agentes antimicrobianos de origem natural. Essa abordagem, visa contribuir para o desenvolvimento de tecnologias mais eficazes, ambientalmente sustentáveis e de baixo custo para o tratamento de águas especialmente em casos de elevada carga microbiológica e potencial risco à saúde pública. Os resultados obtidos fornecerão subsídios para futuras aplicações do material em sistemas de purificação, combinando elevada eficiência microbiológica, viabilidade ambiental e potencial de implementação em escala real.

PALAVRAS-CHAVE: adsorção; compostos bioativos; contaminantes; *Escherichia coli*; tratamento de água.

1 INTRODUÇÃO

A poluição de corpos hídricos é uma preocupação crescente devido ao aumento da presença de poluentes que representam riscos significativos tanto para os ecossistemas quanto para a saúde humana (Kumar et al., 2022). Entre esses poluentes, destacam-se não apenas os contaminantes químicos, como pesticidas, metais pesados e fármacos, mas também microrganismos patogênicos capazes de causar surtos de doenças de veiculação hídrica, como a bactéria *E. coli* (Saxena; Kaushik; Krishna Mohan, 2015). A bactéria *Escherichia coli* merece atenção especial, pois, embora muitas cepas sejam inofensivas e integrantes da microbiota intestinal humana e animal, determinadas variantes patogênicas podem provocar graves infecções gastrointestinais e até complicações sistêmicas. A presença dessa bactéria em corpos d'água é frequentemente utilizada como indicador de contaminação fecal, refletindo a possível ocorrência de outros patógenos de origem entérica. Assim, sua detecção não apenas sinaliza riscos imediatos à saúde pública, mas também evidencia falhas no tratamento e



na proteção de recursos hídricos, demandando soluções eficazes para a remoção ou inativação desses microrganismos (Mwabi; Mamba; Momba, 2012).

Diante desse cenário, torna-se fundamental o desenvolvimento de materiais inovadores capazes de atuar na remoção ou inativação de tais poluentes de forma eficiente e sustentável. Materiais biocidas naturais, como o extrato de alho (*Allium sativum*), apresentam potencial relevante, visto que suas propriedades antimicrobianas são amplamente documentadas, inclusive para aplicações em saúde humana (Batiha et al., 2020). Para garantir a estabilidade e prolongar a atividade biocida desses compostos, uma alternativa viável é sua impregnação em suportes sólidos. Nesse contexto, o carvão ativado surge como um material promissor, devido à sua elevada área superficial e capacidade de adsorção, além de proporcionar maior estabilidade a compostos bioativos instáveis, como a alicina (Alvarino et al., 2023).

Como parâmetro microbiológico, a *Escherichia coli* é amplamente utilizada como indicador de contaminação fecal e qualidade de ambientes aquáticos, sendo frequentemente adotada em estudos de tratamento de águas (Almeida et al., 2024).

Diante deste contexto, este trabalho tem como objetivo desenvolver um adsorvente sustentável, obtido a partir de carvão ativado impregnado com alicina, e avaliar sua eficiência na remoção e/ou inativação de *E. coli* em amostras de água. A proposta busca integrar, em um único material, propriedades adsorventes e biocidas, explorando o potencial da alicina como agente antimicrobiano. Essa abordagem visa não apenas maximizar a eficiência do processo, mas também evitar a geração de subprodutos tóxicos, contribuindo para o desenvolvimento de soluções inovadoras, seguras e ambientalmente sustentáveis para o tratamento de águas contaminadas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

O adsorvente selecionado para este estudo foi o carvão ativado comercial Norit, cuja escolha se justificou pela ampla disponibilidade e facilidade de obtenção e características físico-químicas já conhecidas que favorecem sua aplicação em estudos experimentais de adsorção. O extrato contendo alicina foi preparado por extração aquosa a partir de dentes de alhos triturados, visando preservar a integridade do composto bioativo. A funcionalização do carvão ativado foi conduzida utilizando ácido fosfórico, com o intuito de modificar sua superfície e potencializar a interação com a alicina. A avaliação da atividade anti-bactericida do material funcionalizado e impregnado foi realizada empregando-se *Escherichia coli* como microrganismo modelo, a fim de investigar sua eficiência na inativação bacteriana em meio aquoso.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Funcionalização ácida do carvão ativado

O carvão ativado comercial Norit® foi inicialmente lavado com água destilada por meio de aquecimento sob agitação magnética a 100 °C por 15 min, seguido de filtração e secagem em estufa a 105 °C por 24 h, resultando em um pH inicial de 6,45. A funcionalização ácida foi realizada conforme a metodologia de Beltrame (2018), consistindo na mistura de 50 g de carvão com 118 mL de H₃PO₄ (1:2 m/v), sob agitação por 5 h. A amostra foi então filtrada, seca em estufa (105 °C, 96 h) e submetida à ativação térmica em reator de aço inoxidável sob fluxo de N₂ (150 mL/min), a 500 °C por 1 h, com



taxa de aquecimento de 10 °C/min. Após resfriamento sob atmosfera de N₂, o material foi lavado com água destilada, filtrado e novamente seco a 105 °C por 24 h, obtendo-se pH final de 2,96.

2.2.2 Preparação e quantificação do extrato de alho

Bulbos de alho previamente descascados foram higienizados em solução de hipoclorito de sódio por 30 minutos, seguidos de lavados com água destilada para remoção de resíduos. Posteriormente, o material foi triturado e submetido à extração aquosa na proporção de 1 g de alho para 3 mL de água destilada, mantido a 5 °C por 24 h (Irkin; Korukluoglu, 2007). O extrato obtido foi filtrado e armazenado congelado até o momento da impregnação do material adsorvente.

A concentração de alicina foi determinada indiretamente por meio da atividade enzimática da reação alicina-aliinase, que gera uma molécula de alicina e duas de ácido pirúvico (Pundir; Malik; Chaudhary, 2019). Para quantificação, 1 mL do extrato foi misturado com 1 mL de solução de 2,4-dinitrofenilidrazina em HCl (2 N, 0,0125%) e 1 mL de água destilada, seguido de agitação em vórtex. As amostras foram incubadas em banho-maria a 37 °C por 10 min e, em seguida, foi adicionado 5 mL de NaOH (0,6 N) sob agitação. Após repouso de 5 min, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 420 nm para determinação da concentração de ácido pirúvico, utilizado como indicador indireto da concentração de alicina.

2.2.3 Determinação da proporção carvão/alicina

A proporção ideal entre carvão ativado e extrato de alho foi determinada por meio da avaliação de diferentes massas de carvão (com e sem funcionalização ácida), adicionadas a 50 mL de extrato de alho. As misturas foram mantidas sob agitação constante de 150 rpm à temperatura ambiente (25 °C) por 24 h. Após este período, as amostras foram filtradas e a concentração residual de alicina no filtrado foi determinada. Os valores de adsorção (q) e porcentagem de remoção foram calculados conforme as Equações 1 e 2, respectivamente.

$$q = \frac{(C_i - C_f) \cdot V}{m} \quad (\text{Eq. 1})$$

Na Equação 1, q representa a capacidade de adsorção do material adsorvente, C_i é a concentração inicial de alicina no extrato, C_f é a concentração final de alicina no filtrado após o processo de adsorção pelo carvão ativado, V é o volume da solução e m é a massa de adsorvente utilizada.

$$\% \text{ remoção} = \frac{(C_i - C_f) \cdot 100\%}{C_i} \quad (\text{Eq. 2})$$

Na Equação 2, C_i é a concentração inicial de alicina no extrato, C_f é a concentração final de alicina no filtrado após a adsorção pelo carvão ativado.

2.2.4 Impregnação do extrato de alho no carvão

Com base na proporção previamente determinada, 50 mg de carvão ativado tanto funcionalizado quanto não funcionalizado, foram adicionados a 50 mL de extrato de alho e mantidos sob agitação (150 rpm) por 24 h à temperatura ambiente (25 °C). Após o período de contato, as amostras foram filtradas e os sólidos retidos foram secos em dessecador por 48 h (Miron et al., 2004).



2.2.5 Teste de dessorção da alicina

A dessorção da alicina foi avaliada a fim de verificar a estabilidade da impregnação. Amostras de 50 mg de carvão impregnado foram adicionadas a 50 mL de água destilada, mantidas sob agitação (150 rpm) por 24 h a 25 °C e, posteriormente, filtradas. A concentração de alicina liberada foi determinada conforme descrito anteriormente.

2.2.6 Análise bactericida

Escherichia coli foi cultivada em meio de cultura líquido Mueller-Hilton a 35°C por 24 horas para garantir o crescimento logarítmico da população bacteriana. Uma unidade formadora de colônia (UFC) isolada na placa de Petri foi transferida para um tubo contendo solução salina estéril, e posteriormente, diluída usando uma curva de calibração de turbidez previamente estabelecida com base na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFM/mL), afim de padronizar a concentração bacteriana para os ensaios subsequentes.

Para avaliar a ação inibitória da bactéria a em meio líquido, 200 mg de CAN ou CANF impregnado com extrato de alho foram adicionados a soluções aquosas previamente inoculadas com *E. coli* na concentração de 1×10^6 UFC/mL. As amostras foram mantidas sob agitação a 150 rpm e temperatura ambiente (25 °C) por 24 horas, condições que favorecem o contato efetivo entre o material adsorvente e as células bacterianas.

Após o período de contato, amostras das soluções foram submetidas a diluições seriadas em solução salina estéril, semeadas em placas de ágar Mueller-Hilton e incubadas a 35 °C por 24 h para quantificação da população bacteriana residual por contagem de unidades formadoras de colônia. Os resultados foram comparados a controles positivo (inoculado sem adsorvente) e negativo (meio estéril), permitindo a avaliação da eficiência da inativação da bactéria por meio dos materiais sintetizados (Parashar et al., 2022).

2.2.7 Caracterização dos materiais

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada em um FEI QUANTA 250, com um spot de 3,0 e 25 kV. As amostras foram previamente secas a 105 °C, colocadas sobre uma fita de carbono em suporte metálico e cobertas com uma fina camada de ouro, para se tornarem condutivas e melhorar a resolução da imagem.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

A análise de MEV foi realizada para a caracterização morfológica dos materiais. As micrografias obtidas do carvão ativado Norit (CAN), do carvão ativado Norit funcionalizado com ácido fosfórico (CANF), do carvão ativado Norit (CAN) impregnado com alicina (CAN+alícina), carvão ativado Norit funcionalizado com ácido fosfórico (CANF) impregnado com alicina (CANF+alícina) são mostradas nas Figuras 1(A), 1(B), 1(C) e 1(D), respectivamente.

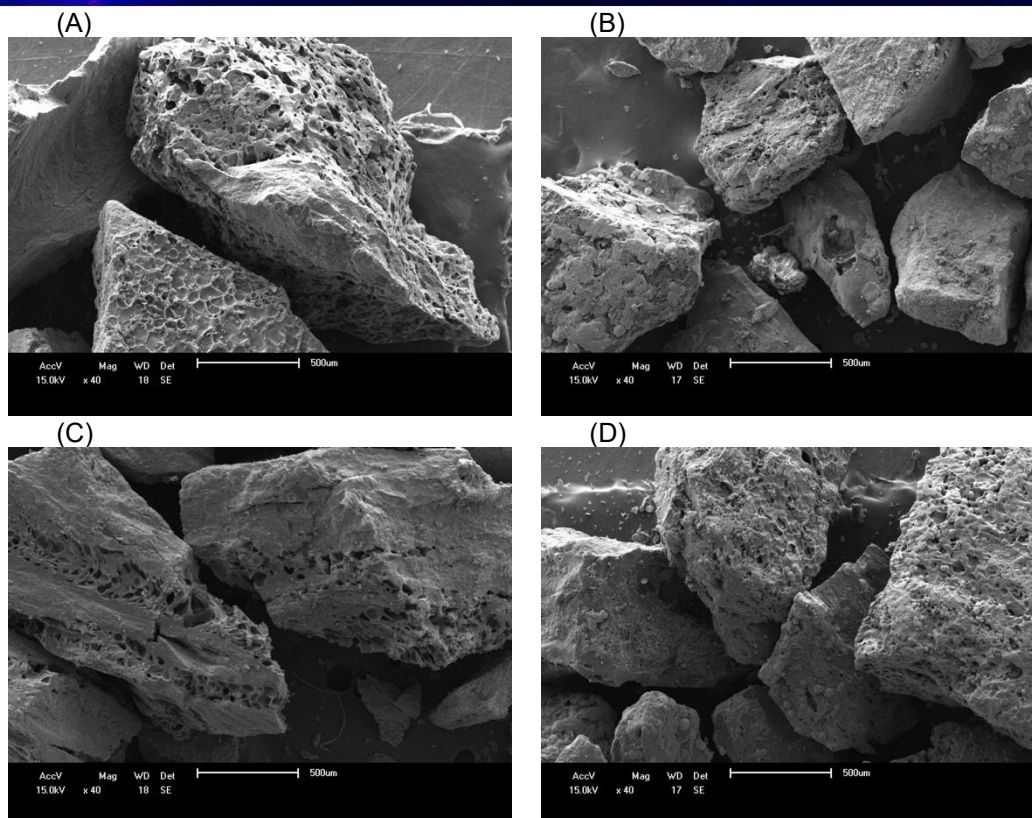


Figura 1: imagens da MEV do CAN com magnitude de 40x (a); CANF com magnitude de 40x (b); CAN + alicina com magnitude de 40x (c) e CANF + alicina com magnitude de 40x (d)

Fonte: Dados da pesquisa

O carvão ativado Norit é amplamente reconhecido por sua elevada porosidade e extensa área superficial, características que favorecem sua eficácia na adsorção de contaminantes. Após a ativação química com ácido fosfórico, foi possível observar um aumento expressivo na porosidade superficial do material, resultado da formação de novos poros e da expansão dos poros preexistentes. As micrografias apresentadas nas Figuras 1(A) e 1(B) evidenciam que tanto o carvão ativado Norit quanto o mesmo material funcionalizado com ácido fosfórico exibem estruturas porosas bem definidas e morfologia similar.

Em contrapartida, as Figuras 1(C) e 1(D) indicam que a impregnação com extrato de alho causou obstrução parcial dos poros superficiais dos materiais. Tal preenchimento sugere que a alicina foi eficientemente incorporada à matriz carbonácea. A obstrução observada nas micrografias explica a diminuição da porosidade após a impregnação, evidenciando que o extrato se distribuiu tanto na superfície interna quanto na externa do carvão ativado, conferindo-lhe propriedades biocidas adicionais.

3.2 ESTUDO DA IMPREGNAÇÃO DA ALICINA NO CAN E CANF

A capacidade de adsorção e taxa de remoção de alicina calculadas por meio das Equações (1) e (2), respectivamente, para os materiais CAN e CANF, foram utilizadas para a elaboração de gráficos que permitem determinar a massa ótima correlacionando esses parâmetros.

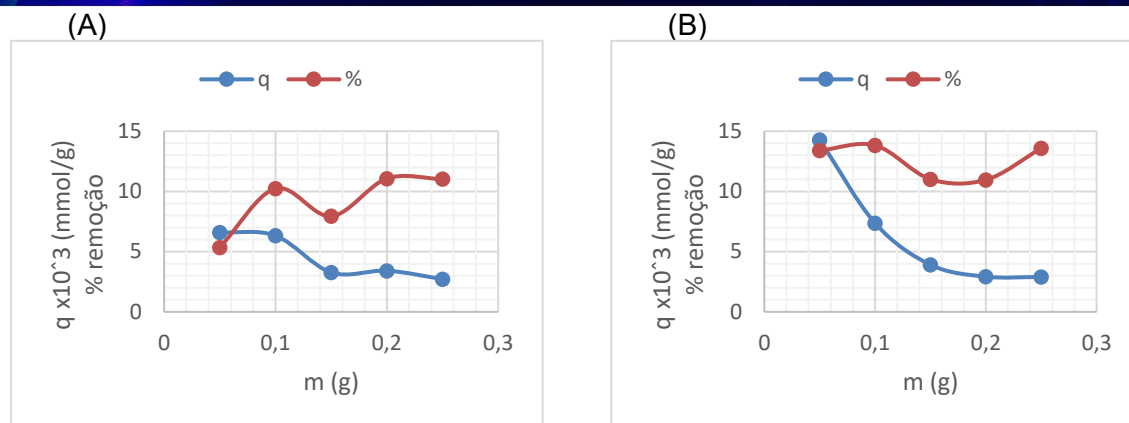


Figura 2: Capacidade de adsorção e taxa de remoção em função da massa de carvão CAN (A) e CANF (B)

Fonte: Dados da pesquisa

O ponto de intersecção das curvas de capacidade de adsorção e percentual de remoção da alicina pelos carvões, conforme apresentado nos gráficos da Figura 2, indicam a massa ótima para o volume selecionado de 50 mL de extrato de alho. Essa massa corresponde a 55 mg para o CAN e 60 mg para o CANF. Considerando que esses valores são próximos da massa inicial adotada nos testes preliminares (50 mg), estabeleceu-se a padronização de 50 mg para ambos os carvões, a fim de serem utilizados em todos os experimentos subsequentes, mantendo uma proporção massa/volume de 1:1.

3.3 ANÁLISE DA ADSORÇÃO E DESSORÇÃO DA ALICINA IMPREGNADA EM CAN E CANF EM ÁGUA DESTILADA

Os testes de adsorção e dessorção da alicina utilizando os materiais CAN e CANF tiveram seus resultados apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Essas análises permitiram avaliar tanto a capacidade dos adsorventes em reter a alicina quanto a estabilidade da substância impregnada, fornecendo dados essenciais para a compreensão do desempenho e da eficácia dos materiais em aplicações de inativação de bactéria.

Tabela 1 – Teste de dessorção de alicina para CAN e CANF

Material	Concentração média de alicina no filtrado (mmol/L)	Concentração média de alicina no carvão (mmol/g)
Extrato	0,0951	-
CAN	0,0567	0,0384
CANF	0,0766	0,0185

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 2 – Teste de dessorção de alicina para CAN e CANF

Material	Concentração média de alicina no filtrado (mmol/L)	% alicina dessorvida
CAN	0,000447	1,165
CANF	0,00273	7,121

Fonte: Dados da pesquisa



As baixas quantidades de alicina liberadas por dessorção a partir do CAN e do CANF, associadas às concentrações significativamente maiores retidas nos adsorventes em comparação ao filtrado após 24 horas, indicam uma impregnação estável e eficiente da substância na matriz carbonácea. Dessa forma, a inibição da *Escherichia coli* ocorre predominantemente por meio do contato direto com a superfície dos materiais, e não pela liberação da alicina no meio líquido. Esse mecanismo de ação baseado na interação superficial reforça o potencial dos carvões ativados como suportes sólidos biocidas estáveis, o que é especialmente vantajoso em processos de tratamento de água, onde a minimização da liberação contínua do agente ativo favorece o reaproveitamento dos materiais e o controle preciso da atividade antimicrobiana.

3.4 ANÁLISE BACTERICIDA

3.4.1 Ensaio com CAN+alicina e CANF+alicina com massa fixa em meio aquoso

Os ensaios de inibição microbiológica foram conduzidos com 200 mg de CAN e CANF impregnados com extrato de alho, em meio aquoso contendo caldo Mueller-Hinton (MHB) e *Escherichia coli*. Foram incluídos dois controles: (i) meio + material, para confirmar a ausência de contaminação (Figura 3A), e (ii) meio + bactéria, para verificar o crescimento adequado do microrganismo (Figura 3B). A massa de 200 mg foi adotada como referência para avaliar a capacidade dos materiais em promover a inativação bacteriana.

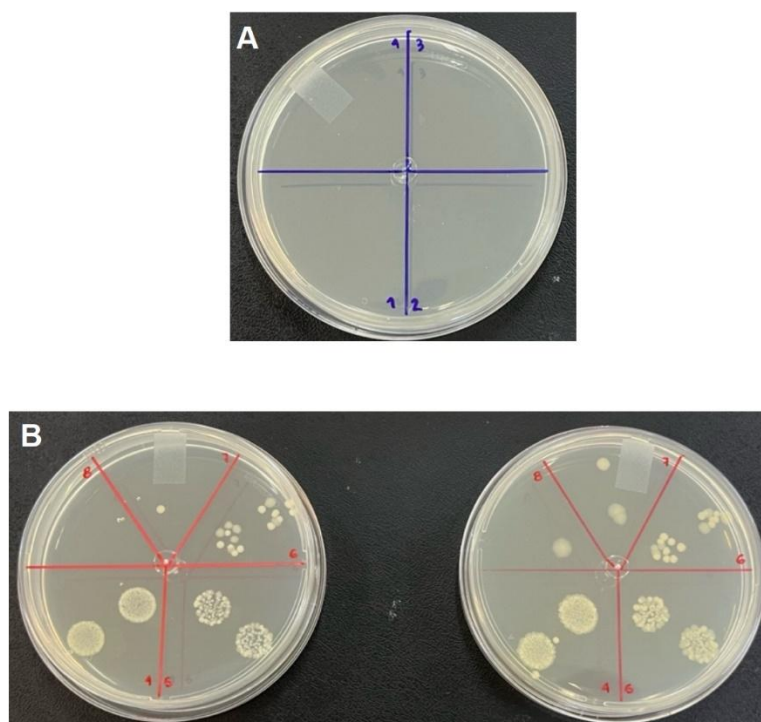


Figura 3: Controle negativo (A) e Controle Positivo (B).

Fonte: Dados da pesquisa

Os resultados indicaram que o CAN+alicina não foi capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano, conforme demonstrado na Figura 4A. Por outro lado, o



CANF+alicina apresentou eficiência total (100%) na inativação da *Escherichia coli*, conforme evidenciado na Figura 4B.

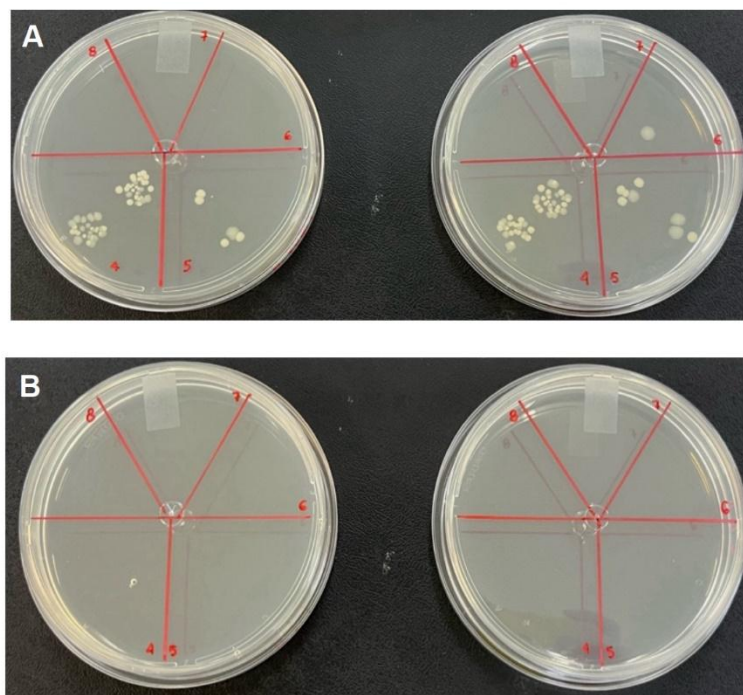


Figura 4: 200 mg de CAN+alicina (A) e 200 mg de CANF+alicina (B).

Fonte: Dados da pesquisa

Essa discrepância no desempenho, apesar da menor quantidade de alicina adsorvida no CANF em comparação ao CAN, conforme observado previamente (Item 3.3), pode ser atribuída a fatores estruturais e químicos decorrentes do processo de funcionalização ácida. A modificação com ácido fosfórico promove o aumento da acidez superficial do material, além de favorecer o desenvolvimento de uma porosidade mais acessível e uniformemente distribuída. Tais características resultam em uma maior área de contato entre a superfície impregnada com alicina e as células bacterianas presentes na solução (BURCHACKA et al., 2021). Adicionalmente, os grupos funcionais introduzidos durante a ativação ácida podem contribuir para a estabilização e exposição da alicina em regiões mais reativas da matriz carbônica, potencializando seu efeito biocida por meio de interações de contato direto com a bactéria. Dessa forma, mesmo com menor carga total do composto bioativo, o CANF demonstra maior eficácia na inativação microbiana devido à sua estrutura superficial otimizada (BURCHACKA et al., 2021).

Portanto, os resultados indicam que a eficiência antimicrobiana do material não está necessariamente correlacionada à quantidade absoluta de alicina impregnada, mas sim à forma como essa é distribuída, estabilizada e exposta na matriz do adsorvente. Esses achados ressaltam a importância da engenharia de superfície na otimização de materiais adsorventes com propriedades biocidas, destacando a funcionalização química como estratégia eficaz para aprimorar a atividade antimicrobiana de carvões ativado impregnados com compostos naturais.



4 CONCLUSÃO

As análises realizadas neste estudo evidenciam o potencial de um material com propriedades antibacterianas, cuja utilização é ambientalmente sustentável por se basear em compostos naturais. O carvão ativado comercial Norit, funcionalizado com ácido fosfórico e impregnado com alicina, demonstrou elevada eficiência na inibição do crescimento de *Escherichia coli* em meio aquoso. Esses resultados indicam que o material desenvolvido possui grande potencial para aplicação no tratamento de águas contaminadas, ambientes que apresentam elevada carga microbiológica e constituem desafios significativos para as estações de tratamento convencionais. A funcionalização química, aliada à impregnação com agentes bioativos naturais, representa uma estratégia promissora para o aprimoramento dos processos de descontaminação, contribuindo para a redução do impacto ambiental e para a promoção da saúde pública.

AGRADECIMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 (Processo 88887.965554/2024-00)

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, Maria Eduarda Borges de et al. Avaliação da *Escherichia coli* como bioindicador ideal. **Scientific Journal of Environmental Sciences and Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 50–54, 2024. Disponível em: <https://www.journals.ufrpe.br/index.php/geama/article/download/6299/482485357/482518696>. Acesso em: 01 mai. 2025.

ALVARINO, Lauro Adeilson da Silva et al. Antibacterial potential of activated carbon impregnated with garlic extract. **Processes**, v. 11, n. 10, 1 out. 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2227-9717/11/10/2948>. Acesso em: 10 abr. 2024.

BATIHA, Gaber El Saber et al. Chemical constituents and pharmacological activities of garlic (*Allium sativum* L.): a review. **Nutrients**, Basel: MDPI, 1 mar. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32213941/>. Acesso em: 28 abr. 2025.

IRKIN, Reyhan; KORUKLUOGLU, Mihriban. Control of *Aspergillus niger* with garlic, onion and leek extracts. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 384–387, 2007. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/27797638_Control_of_AspERGILLUS_niger_with_garlic_onion_and_leek_extracts. Acesso em: 28 abr. 2025.

KUMAR, Rohitashw et al. A review on emerging water contaminants and the application of sustainable removal technologies. **Case Studies in Chemical and Environmental Engineering**, v. 6, 1 Dez. 2022. Disponível em:



<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S266601642200041X>. Acesso em: 30 abr. 2025.

MIRON, T. et al. [3H] Allicin: preparation and applications. **Analytical Biochemistry**, v. 331, n. 2, p. 364–369, 15 ago. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15265743/>. Acesso em: 28 abr. 2025.

MWABI, Jocelyne K.; MAMBA, Bhekie B.; MOMBA, Maggy N. B. Removal of *Escherichia coli* and fecal coliforms from surface water and groundwater by household water treatment devices/systems: a sustainable solution for improving water quality in rural communities of the Southern African Development Community region. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 9, n. 1, p. 139–170, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22470284/>. Acesso em 10 ago. 2025.

PARASHAR, Vivek et al. Utility of constructed wetlands for treatment of hospital effluent and antibiotic-resistant bacteria in resource limited settings: a case study in Ujjain, India. **Water Environment Research**, v. 94, n. 9, 1 set. 2022. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9544608/>. Acesso em: 28 abr. 2025.

SAXENA, Tanushree; KAUSHIK, Pallavi; KRISHNA MOHAN, Medicherla. Prevalence of *E. coli* O157:H7 in water sources: an overview on associated diseases, outbreaks and detection methods. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 82, n. 3, p. 249–264, 1 Jul. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26050932/>. Acesso em: 10 ago. 2025.

SMITH, John et al. Placeholder Text: A Study. **The Journal of Citation Styles**, v. 3, 15 Jul. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0026265X18316801?via%3Dihub>. Acesso em: 30 abr. 2025.