



ANÁLISE *IN SILICO* DE RAMNOLIPÍDEO E ÁCIDO DECANOICO: COMPARAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICOQUÍMICOS, TOXICOCINÉTICOS E TOXICOLÓGICOS

LUANA KZIOZEK; RAFAELLE RODRIGUES.

RESUMO

Os surfactantes microbianos, incluindo os glicolipídeos como os ramnolipídeos, apresentam uma ampla gama de aplicações ambientais e industriais devido às suas propriedades físico-químicas únicas. Este estudo, conduzido por meio de simulações computacionais (*in silico*), teve como objetivo comparar as características físico-químicas, toxicocinéticas e toxicológicas do ramnolipídeo e do ácido decanoico, utilizando ferramentas computacionais como SwissADME e ADMETLab 2.0. A metodologia baseou-se na análise das estruturas moleculares dos compostos e na avaliação de parâmetros como peso molecular, TPSA, logP e similaridade com fármacos, por meio de simulações preditivas. Os resultados indicaram que o ramnolipídeo, apesar de apresentar alta biodegradabilidade e eficácia em aplicações ambientais como a biorremediação, possui limitações significativas para uso farmacêutico devido ao seu elevado peso molecular, baixa biodisponibilidade oral e múltiplas violações às regras de Lipinski. Em contrapartida, o ácido decanoico demonstrou melhor absorção gastrointestinal, permeabilidade à barreira hematoencefálica e conformidade com as principais regras de similaridade farmacológica, o que reforça seu potencial para desenvolvimento de fármacos com propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas. Ambos os compostos apresentaram perfis de toxicidade aceitáveis, com o ramnolipídeo mostrando segurança para aplicações ambientais e o ácido decanoico revelando baixa toxicidade em contextos terapêuticos. Conclui-se que, enquanto o ramnolipídeo é mais adequado para aplicações ambientais, o ácido decanoico apresenta maior viabilidade para formulações farmacêuticas, destacando a importância das simulações *in silico* na previsão da aplicabilidade de compostos químicos em diferentes contextos.

Palavras-chave: Biodegradabilidade; Farmacocinética; Biorremediação.

1 INTRODUÇÃO

Os surfactantes microbianos são moléculas complexas que apresentam uma grande diversidade de estruturas químicas. Embora a produção de biosurfactantes ocorra entre diferentes grupos microbianos, o tipo de biosurfactante produzido costuma ser específico de um gênero, e em alguns casos, de uma espécie. Entre os diferentes tipos de surfactantes microbianos, os glicolipídeos são os mais estudados. Eles consistem em um grupamento de carboidrato, geralmente dissacarídeos, ligado a uma ou mais cadeias longas de ácidos graxos (Vandana; Singh, 2018).

Os biosurfactantes têm uma ampla gama de aplicações ambientais, sendo utilizados, por exemplo, na biorremediação de hidrocarbonetos (Banat, 1995), na remoção de substâncias orgânicas e na recuperação de solos contaminados por metais pesados, bem como na descontaminação de áreas afetadas por derramamentos de petróleo e óleos (O'Connor, 2002). Além disso, esses compostos encontram aplicações em diversas indústrias, como a alimentícia, cosmética, farmacêutica e química (Banat, Makkar, Cameotra, 2000; Georgious, Lin, Sharma,

1992).

A biodegradabilidade é um aspecto crítico para o uso de surfactantes em aplicações ambientais, como a biorremediação, uma vez que garante que esses compostos não causem poluição secundária ao meio ambiente. Estudos prévios demonstram que os ramnolipídeos, particularmente os produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, são prontamente biodegradáveis, com taxas de mineralização que variam entre 34% e 92%, dependendo da composição estrutural do estereoisômero (Hogan et al., 2019). A capacidade de degradar rapidamente em condições ambientais os coloca como excelentes candidatos para processos de biorremediação de hidrocarbonetos e metais pesados. No entanto, seu uso farmacêutico não é descrito e pode ser limitado pelo seu tamanho e alta polaridade, que afetam sua absorção e distribuição no organismo (National Center For Biotechnology Information, 2024a). Em contraste, o ácido decanoico, um ácido graxo saturado de cadeia média um possível produto metabólico, apresenta melhor absorção intestinal e propriedades terapêuticas significativas, como atividades anti-inflamatórias e antimicrobianas, tornando-o um composto promissor para aplicações farmacêuticas (National Center For Biotechnology Information, 2024b).

A análise *in silico* surge como uma ferramenta poderosa para avaliar parâmetros físico-químicos, toxicocinéticos e toxicológicos de compostos químicos, permitindo prever suas atividades biológicas e segurança antes de experimentos laboratoriais. Ao utilizar ferramentas como SwissADME e ADMETLab, é possível comparar as características de compostos como o ramnolipídeo e o ácido decanoico, fornecendo insights sobre sua viabilidade em aplicações ambientais e terapêuticas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A abordagem utilizada para a análise comparativa entre ramnolipídeo e ácido decanoico envolveu o uso de ferramentas de modelagem *in silico*, como SwissADME e ADMETLab 2.0. Essas plataformas foram selecionadas por sua capacidade de prever propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e toxicológicas de compostos químicos. O processo foi dividido em três etapas principais: seleção de compostos, coleta de dados moleculares, simulações e avaliações.

A seleção dos compostos foi feita com base em sua relevância no contexto ambiental e possíveis aplicações na área farmacêutica. O ramnolipídeo, representando os biosurfactantes, e o ácido decanoico, um produto de sua degradação metabólica, foram analisados individualmente.

A coleta de dados moleculares foi realizada por meio de representações SMILES e estas inseridas nas plataformas para análise. As propriedades avaliadas incluíram peso molecular, TPSA (Área de Superfície Polar Topológica), número de ligações rotacionáveis, logP, logS, e compatibilidade com regras de similaridade farmacológica (Lipinski, Veber, Ghose, entre outras).

As simulações e avaliações, utilizando as ferramentas SwissADME e ADMETLab 2.0, foram empregadas para prever aspectos farmacocinéticos, como absorção gastrointestinal, permeabilidade à barreira hematoencefálica, e interação com glicoproteínas. Além disso, potenciais riscos tóxicos foram avaliados por meio de alertas PAINS e Brenk, enquanto a biodegradabilidade foi estimada a partir de parâmetros relatados em estudos prévios. Os dados obtidos foram analisados para identificar correlações entre as características estruturais e o desempenho dos compostos em diferentes aplicações. As informações foram integradas para discutir a viabilidade do uso de cada composto em cenários ambientais e farmacêuticos.

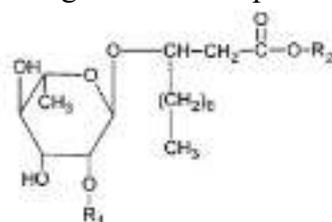
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gênero *Pseudomonas* é o grupo de microrganismos que produz como principal glicolípido o ramnolipídeo (Vandana, Singh, 2018). O ramnolipídeo é um glicolípido muito

estudado, tendo sido isolado de *Pseudomonas aeruginosa* e caracterizado pela primeira vez em 1949 por Jarvis e Johnson (1949 apud Maier, Soberón-Chaves, 2000). Ele é formado pela ligação de duas moléculas de ramnose, e pode ser encontrado em seis formas aniônicas diferentes (Bodour; Maier, 2002). A produção de ramnolipídeos de *P. aeruginosa* ocorre no final da fase logarítmica e durante a fase estacionária, principalmente quando os recursos de fácil metabolismo começam a se esgotar, utilizando o ramnolipídeo para maximizar o uso substratos disponíveis. Pode vir a utilizar uma ampla gama de fontes de carbono, desde glicose (Guerra-Santos, Käppli, Fiechter, 1984) até hidrocarbonetos poliaromáticos (Déziel et al., 1996).

Estudos indicam que os ramnolipídeos (RLs) produzidos por *P. aeruginosa* são misturas de mono e dirramnolipídeos (Rendell et al., 1990), com composição predominante de RL1 (Rha2-C10-C10), RL2 (Rha-C10-C10), RL3 (Rha2-C10) e RL4 (Rha-C10) (Figura 1). No entanto, metodologias analíticas mais avançadas, ao longo do século XX, permitiram a descoberta de cerca de 60 tipos diferentes de RLs, evidenciando a diversidade de compostos produzidos por esses microrganismos.

Figura1 - Estrutura química dos homólogos de ramnolipídeos mais comuns.



Tipo de ramnolipídeo	R ₁	R ₂	Abreviação
Rha ₂ C ₁₀ C ₁₀	L-α-ramnosil	ácido β-hidroxi-decanoico	RL1
RhaC ₁₀ C ₁₀	H	ácido β-hidroxi-decanoico	RL2
Rha ₂ C ₁₀	L-α-ramnosil	H	RL3
RhaC ₁₀	H	H	RL4

Fonte: HONNA, 2013.

As propriedades dos RLs variam conforme a composição: adição de L-ramnose aumenta a hidrofiliabilidade, enquanto cadeias de ácido graxo mais longas ou insaturadas aumentam a hidrofobicidade. Essas variações estruturais influenciam a em sua estabilidade e capacidade de solubilização de compostos orgânicos (Mata-Sandoval, Karns, Torrents, 1999). Os RLs podem reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 25-30 mN/m e a tensão interfacial óleo/água de 43 mN/m para menos de 1 mN/m em baixas concentrações micelares críticas (cmc) de 10 a 200 mg/L (Banat et al., 2000; Mata-Sandoval, Karns, Torrents, 1999).

De acordo com o National Center For Biotechnology Information (2024a) o RL é primariamente descrito como: ácido L-ramnosil-3-hidroxi-decanoil-3-hidroxi-decanoico, um glicolipídeo, um alfa-L-ramnosídeo do ácido 3-[(3-hidroxi-decanoil)oxi]decanoico. Sua fórmula molecular é C₂₆H₄₈O₉, uma molécula com uma estrutura anfipática, ou seja, tem uma região hidrofílica (que se dissolve em água) e uma região hidrofóbica (que se dissolve em óleo), ideal para processos de biorremediação. O SMILES canônico do ramnolipídeo é: CCCCCCCC(CC(=O)O)OC(=O)CC(CCCCCC)O[C@H]1[C@@H]([C@@H])([C@H]([C@@H](O1)C)O)O.

Seu SMILES canônico, é uma representação linear da estrutura molecular que permite a entrada e avaliação automatizada da molécula em softwares como o SwissADME (Daina, Michielin, Zoete, 2017) para análise *in silico* da molécula com o objetivo de avaliar suas propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e potencial de semelhança com fármacos.

Deste modo, o RL é apresentado com um peso molecular de 504,65 g/mol, número

elevado de 20 ligações rotacionáveis, que lhe confere alta flexibilidade, e área polar superficial topológica (TPSA) de 142.75 \AA^2 , confirmando uma alta polaridade (Daina, Michielin, Zoete, 2017; National Center For Biotechnology Information, 2024a).

Assim, de acordo com os resultados apresentados pelo SwissADME, a molécula violou múltiplas regras de similaridade com fármacos, incluindo as regras de Lipinski (peso molecular (MW) $> 500 \text{ g/mol}$), Ghose (peso molecular $> 480 \text{ g/mol}$, índice de refração > 130 , número de átomos > 70), Veber (número de ligações rotacionáveis > 10 , TPSA $> 140 \text{ \AA}^2$), Egan (TPSA $> 131.6 \text{ \AA}^2$) e Muegge (número de ligações rotacionáveis > 15), reforçando a hipótese de que este composto, embora útil em contextos industriais e ambientais, possui limitações para aplicações terapêuticas convencionais (Daina, Michielin, Zoete, 2017).

A capacidade de formar até 9 ligações de hidrogênio como aceitador e 4 como doador reflete o potencial do ramnolípido para interagir com moléculas polares, o que pode melhorar sua solubilidade em meios aquosos, apesar do seu peso molecular elevado. No entanto, o score de biodisponibilidade de 0,56 sugere que, embora essas interações sejam favoráveis, a molécula pode não ser facilmente absorvida pelo trato gastrointestinal, limitando seu uso como fármaco oral (Daina, Michielin, Zoete, 2017).

Embora o RL apresente uma estrutura complexa, os dados da análise *in silico* não indicaram alertas PAINS ou alertas Brenk, o que significa que ele não possui subestruturas que poderiam ser consideradas tóxicas ou reativas. Essa ausência de alertas é um ponto positivo para sua utilização segura em aplicações ambientais, onde a toxicidade é uma preocupação (Daina, Michielin, Zoete, 2017)

Os resultados da análise *in silico* indicam que o RL apresenta uma alta taxa de biodegradabilidade, o que está em consonância com estudos prévios que relatam a mineralização de até 92% do diastereoisômero (R,R) de RL (Hogan et al., 2019). Esta alta taxa de biodegradação é um ponto positivo para seu uso em biorremediação, onde a degradação rápida é desejável para evitar impactos ambientais adversos a longo prazo.

No entanto, vale ressaltar que nos estudos de Hogan et al. (2019) os testes de toxicidade realizados em embriões de zebrafish mostraram que o diastereoisômero (R,S) de RL apresentou efeitos adversos em concentrações elevadas (640 \mu M), com mortalidade observada em 56% a 66% dos indivíduos testados (Hogan et al., 2019).

Porém, a maioria dos estereoisômeros mostrou toxicidade apenas em concentrações muito superiores às encontradas no ambiente. Para microrganismos aquáticos, como *Aliivibrio fischeri*, valores de EC50 entre $39,6$ e $87,5 \text{ \mu M}$, classificando-os como ligeiramente tóxicos pela EPA. Este nível de toxicidade sugere que, quando usados em concentrações controladas, os RLs são relativamente seguros para ecossistemas aquáticos. Isso, combinado com a baixa citotoxicidade observada em células humanas de pulmão (IC50 entre $103,4$ e $191,1 \text{ \mu M}$), reforça o perfil de segurança desse biossurfactante para uso ambiental e possivelmente terapêutico.

Um dos produtos da biotransformação de ramnolípideos em ambientes contaminados pode ser ácidos graxos livres, resultantes da degradação da parte lipídica do ramnolípido. Um exemplo seria o ácido decanoico (ácido cáprico), cujo SMILES canônico é (National Center For Biotechnology Information, 2024b): CCCCCCCCC(=O)O.

A análise *in silico* da molécula ácido decanoico (AD) foi realizada utilizando a plataforma SwissADME (Daina, Michielin, Zoete, 2017), com o objetivo de avaliar suas propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e potencial de semelhança com fármacos.

O AD apresenta a fórmula molecular $C_{10}H_{20}O_2$ e um peso molecular de $172,28 \text{ g/mol}$, abaixo do limite de 500 g/mol , o que favorece sua permeabilidade celular. Com 8 ligações rotacionáveis, a molécula possui alta flexibilidade, o que pode influenciar sua interação com alvos biológicos. A TPSA é de $37,30 \text{ \AA}^2$, valor que sugere uma boa permeabilidade celular e absorção oral. Além disso, o Log P (consenso) de 3,00 indica uma moderada lipofilicidade,

fator importante para a penetração através de membranas celulares (Daina, Michielin, Zoete, 2017; National Center For Biotechnology Information, 2024b).

A molécula foi classificada como moderadamente solúvel em água, com um Log S (ESOL) de -2,96, indicando que pode ser adequada para formulações aquosas ou necessitar de veículos apropriados para melhorar sua solubilidade em água (Daina, Michielin, Zoete, 2017). O AD apresentou alta absorção gastrointestinal (GI absorption), indicando que, se administrada por via oral, tem grande probabilidade de ser eficientemente absorvida. Além disso, a é permeável à barreira hematoencefálica (BBB permeant), o que indica que pode atravessar essa barreira e, portanto, ter ação no sistema nervoso central, o que pode ampliar suas potenciais aplicações terapêuticas. Não apresenta-se como substrato da glicoproteína P (P-gp substrate), o que sugere que não seria expulso rapidamente das células por este mecanismo, favorecendo uma ação terapêutica prolongada. Esses fatores, somados à ausência de interações com enzimas do citocromo P450, reforçam seu perfil farmacocinético favorável (Daina, Michielin, Zoete, 2017).

O AD segue as principais regras de semelhança com fármacos, como a regra de Lipinski, sem violações, indicando bom potencial para desenvolvimento como fármaco. Também atende às regras de Ghose, Veber e Egan, que avaliam diferentes aspectos da biodisponibilidade. O score de biodisponibilidade foi calculado em 0,85, sugerindo uma alta probabilidade de a molécula ser bem absorvida no corpo humano (Daina, Michielin, Zoete, 2017).

A análise revelou que o AD não apresenta alertas de toxicidade (PAINS e Brenk), o que é um indicativo positivo para o desenvolvimento seguro. Sua acessibilidade sintética foi avaliada em 1,67, sugerindo que é relativamente fácil de sintetizar em laboratório (Daina, Michielin, Zoete, 2017).

Os resultados para o AD indicam uma melhor absorção oral em comparação ao RL, com alta permeabilidade intestinal e maior potencial de biodisponibilidade devido ao seu baixo peso molecular (172,26 g/mol) e TPSA reduzido. Além disso, sua rápida metabolização pelo fígado e excreção renal reforçam sua segurança para aplicações terapêuticas. Propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas adicionais tornam o AD um candidato promissor para uso em formulações farmacêuticas, particularmente em condições relacionadas à inflamação e controle de infecções microbianas.

Os parâmetros físico-químicos das duas moléculas mostram diferenças importantes que afetam sua aplicabilidade. O RL, com um LogP de 4.157 e um LogS de -4.025, apresenta maior lipofilicidade e menor solubilidade aquosa em comparação ao AD, que tem um LogP de 3.828 e LogS de -3.008. Esses valores sugerem que o RL é mais adequado para aplicações que exigem a solubilização de compostos hidrofóbicos, como na biorremediação, enquanto o AD, com sua maior solubilidade aquosa, pode ser mais adequado para formulações em meio aquoso (Xiong, 2021).

Em termos de absorção intestinal (HIA), o RL apresenta uma absorção gastrointestinal de 0.421, enquanto o AD tem uma absorção significativamente menor, de 0.005. Essa diferença pode sugerir que o RL possui melhor biodisponibilidade oral, dependendo da via de administração (Xiong, 2021).

Além disso, ao analisar a interação com a P-glicoproteína (P-gp), o RL é tanto um substrato quanto um inibidor dessa proteína (Pgp-sub = 0.990 e Pgp-inh = 0.887), o que indica que ele pode ser expelido rapidamente das células, mas também pode inibir o transporte de outros compostos através dessa via. Por outro lado, o AD não interage de maneira significativa com a P-gp (Pgp-sub = 0.001 e Pgp-inh = 0.043), sugerindo uma eliminação mais estável e menos dependente desse mecanismo (Xiong, 2021).

Os resultados das previsões de semelhança com fármacos também fornecem informações importantes. O RL violou a regra de Lipinski, sendo classificado como inadequado para desenvolvimento como fármaco, principalmente devido ao seu tamanho e lipofilicidade

elevados. No entanto, foi aceito pela regra de Pfizer. Já o AD foi aceito pelas regras de Lipinski e GSK, o que o torna um candidato mais apropriado para o desenvolvimento de medicamentos com potencial terapêutico (Xiong, 2021).

Essas previsões sugerem que o RL tem um perfil melhor para aplicações ambientais, como a biorremediação, enquanto o AD, com suas propriedades adequadas de absorção e ausência de interações com a P-gp, pode ter maior viabilidade para desenvolvimento em formulações farmacêuticas. Ambos os compostos demonstram potencial, mas suas características específicas devem guiar suas aplicações.

4 CONCLUSÃO

Com base nas análises *in silico* e experimentais, conclui-se que o RL, devido à sua alta biodegradabilidade e leve toxicidade, é mais adequado para aplicações ambientais, especialmente em biorremediação, pois sua baixa biodisponibilidade oral e elevado número de violações às regras de Lipinski limitam seu uso como fármaco. Em contrapartida, o AD, com melhor absorção oral e propriedades terapêuticas comprovadas, apresenta grande potencial para aplicações farmacêuticas, particularmente no tratamento de inflamações e como agente antimicrobiano.

REFERÊNCIAS

XIONG, G.; WU, Z.; YI, J.; FU, L.; YANG, Z.; HSIEH, C.; Yin, M.; Zeng, X.; Wu, C.; Lu, A.; Chen, X.; Hou, T.; CAO, D. ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. **Nucleic acids research**, v. 49, n. W1, p. W5-W14, 2021.

BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresource technology**, v. 51, n. 1, p. 1-12, 1995.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.

BODOUR, A. A.; MAIER, R. M. Biosurfactants: types, screening methods, and applications. **Encyclopedia of environmental microbiology**, 2003.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. 42717, 2017.

DÉZIEL, É.; PAQUETTE, G.; VILLEMUR, R.; LÉPINHO, F.; BISAILLON, J.-G. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 6, p. 1908-1912, 1996.

GEORGIOUS, G.; LIN, S.C.; SHARMA, M. Surface-Active Compounds from Microorganisms. **Nat Biotechnol**, v.10, p. 60-65, 1992.

GUERRA-SANTOS, L.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Applied and environmental microbiology**, v. 48, n. 2, p. 301-305, 1984.

HOGAN, D. E.; TIAN, F.; MALM, S. W.; OLIVARES, C.; PACHECO, R. P.; SIMONICH, M. T.; HUNJAN, A. S.; TANGUAY, R. L.; KLIMECKI, W. T.; POLT, R.; PEMBERTON, J. E.; MAIER, R. M. Biodegradability and toxicity of monorhamnolipid biosurfactant diastereomers. **Journal of Hazardous Materials**, v. 364, p. 600-607, 2019.

HONNA, C. Y. Obtenção e análise de mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* afetados na biossíntese de rhamnolipídeos. 2013. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/D.42.2013.tde-26062014-112650>. Acesso em: 04 out. 2024.

MAIER, R. M.; SOBERON-CHAVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 54, p. 625-633, 2000.

MATA-SANDOVAL, J. C.; KARNS, J.; TORRENTS, A. High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. **Journal of Chromatography A**, v. 864, n. 2, p. 211-220, 1999.

NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION). PubChem Compound Summary for CID 162246, Rphdhd. **PubChem**, 2024a. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rphdhd>. Acesso: 04 out. 2024.

NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION) . PubChem Compound Summary for CID 2969, Capric Acid. **PubChem**, 2024b. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Capric-Acid>. Acesso: 04 out. 2024.

O'CONNOR, L. Market forecast: microbial biosurfactants. **Industrial Bioprocessing**, v. 24, p. 10-11, 2002.

RENDELL, N. B.; TAYLOR, G. W.; SOMERVILLE, M.; TODD, H.; WILSON, R.; COLE, P. J. Characterisation of *Pseudomonas* rhamnolipids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1045, p. 189-193, 1990.

VANDANA, P.; SINGH, D. Review on biosurfactant production and its application. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, n. 8: p. 4228-4241, 2018.

ç