

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA  
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**GENES FUNCIONAIS DO CICLO BIOGEOQUÍMICO DO METANO NA TURFEIRA  
DA CAMPINA DO ENCANTADO**

ALUNO: Gabriel Valverde Firmino

ORIENTADORA: Profa. Dra. Tsai Siu Mui

Projeto de pesquisa para Trabalho de Conclusão de Curso  
Disciplina: LCB0455 – Tese de Conclusão de Curso I  
Curso: Ciências Biológicas

**PIRACICABA - SP  
MAIO DE 2023**

## 1. Introdução

As turfeiras são ecossistemas alagados que ocupam 2.84% da superfície terrestre e são constituídas pela turfa, um tipo de solo que consiste em importantes reservas de carbono (CLYMO et al., 1998; XU et al., 2018). Essas reservas ocorrem devido ao acúmulo de detritos vegetais, cuja decomposição é desacelerada graças à alta saturação de água e às baixas concentrações de oxigênio (ERWIN, 2009). Tais condições ambientais específicas promovem o desenvolvimento de microrganismos associados ao ciclo biogeoquímico do metano ( $\text{CH}_4$ ), como as arqueias metanogênicas, que são responsáveis pela produção desse gás no solo e bactérias metanotróficas, que são responsáveis pelo consumo de  $\text{CH}_4$  (KAMAL & VARMA, 2008).

A compreensão a respeito dos microrganismos envolvidos no ciclo do  $\text{CH}_4$  é de extrema importância, visto que este gás é o segundo mais importante do efeito estufa e apresenta um potencial de aquecimento até 25 vezes maior do que o gás carbônico (LELIEVELD et al, 1998).

Para acessar e avaliar a abundância destes microrganismos, em especial procariotos como bactérias e arqueias, ferramentas moleculares consistem em uma estratégia bastante eficaz, tendo em vista a dificuldade de se cultivar de maneira representativa os microrganismos do solo em condições laboratoriais (ROSLAN et al., 2017). Genes conhecidos como marcadores moleculares podem ser utilizados para avaliar a presença desses organismos no solo e são importantes para inferências das funções associadas à ciclagem do  $\text{CH}_4$ : o gene *mcrA*, codificador de uma subunidade da enzima metil coenzima M redutase (MCR), presente em arqueias metanogênicas (LUTON et al., 2002); e o gene *pmoA*, codificador de um polipeptídeo da enzima metano monooxigenase particulada (pMMO) para bactérias metanotróficas (MCDONALD & MURRELL, 1997). Estes genes são altamente específicos para microrganismos relacionados ao ciclo do  $\text{CH}_4$  e, portanto, são importantes marcadores da presença destes organismos no ambiente (ALVARADO et al.). Adicionalmente, o gene 16S rRNA também pode ser utilizado como marcador taxonômico para procariotos em geral, contribuindo para a avaliação da abundância e composição desses grupos no ambiente (KIRK et al., 2004).

No entanto, cada tipo de solo apresenta características singulares que podem dificultar os estudos moleculares, incluindo, por exemplo, o acesso ao DNA total do solo de acordo com metodologias padrão. Como demonstrado por Venturini et al. (2020), solos tropicais com alta quantidade de argila e matéria orgânica são mais desafiadores para a extração de DNA, o que requer adaptações pontuais nos protocolos padrão para a melhoria da quantidade e da qualidade do DNA extraído. Para a turfa, o alto nível de matéria orgânica, a acidez e a grande quantidade de argila, podem resultar em amostras de DNA contaminadas (ROSLAN et al., 2017), apresentando baixa quantidade e qualidade do material genético, o que demonstra uma necessidade por adaptações metodológicas para o processo de extração do DNA total de turfa. Isto permite uma análise mais confiável e representativa com relação às análises moleculares subsequentes, como, por exemplo, a abundância

das cópias dos genes dos microrganismos de interesse no campo.

Uma vez extraído o DNA total das amostras de solo, a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) consiste numa ferramenta altamente sensível, eficaz e rápida para se avaliar a abundância de cópias de genes pré-determinados nas amostras ambientais (NOVAIS & PIRES ALVES, 2004).

Estudos mostram que as mudanças climáticas provocam alterações de temperatura, composição da vegetação e profundidade dos lençóis freáticos, levando a alterações no equilíbrio de consumo de carbono pelos microrganismos presentes na turfa e a um aumento do nível de emissões de gases do efeito estufa para a atmosfera (LIMPENS et al., 2008; ERWIN, 2009; HAREENDA et al., 2018; ANTALA et al., 2022). No entanto, os trabalhos citados abordam aspectos ecológicos de turfeiras de climas temperados ou turfeiras tropicais de território estrangeiro, e poucos estudos na literatura têm foco nas turfas tropicais brasileiras e, ainda mais, sobre a microbiota.

Portanto, apesar de serem ecossistemas com alta importância para o ciclo do carbono e diretamente afetados pelas mudanças climáticas, os microrganismos presentes no solo das turfeiras ainda são pouco conhecidos, especialmente em áreas tropicais da região de Mata Atlântica, como a Turfeira da Campina do Encantado. Portanto, são necessários estudos para um melhor conhecimento das comunidades microbianas da turfa, e com essa perspectiva, as ferramentas moleculares, incluindo a técnica de qPCR, permitem inferências a respeito da abundância das comunidades microbianas dos domínios *Archaea* e *Bacteria*, assim como das que estão associadas ao ciclo do CH<sub>4</sub> nestes locais.

## **2. Hipótese do estudo**

Este projeto propõe a hipótese de que a variação das fitofisionomias associadas à turfa influencia a abundância dos genes *mcrA* e *pmoA*, que estão associados ao ciclo biogeoquímico do metano. Além disso, espera-se que a profundidade seja um fator determinante nesse processo, de modo que a presença de metanogênicos seja favorecida em maiores profundidades.

## **3. Objetivos**

### **3.1 Objetivos gerais**

O presente trabalho tem por objetivo geral avaliar as comunidades microbianas associadas ao ciclo biogeoquímico do metano, através da quantificação absoluta de genes marcadores, por PCR quantitativo em tempo real, a partir de amostras de DNA total obtidas de turfeiras do Parque Estadual Campina do Encantado.

### **3.2 Objetivos específicos**

- a) Comparar a qualidade e a concentração do DNA total extraído de amostras ambientais de turfa

utilizando protocolo padrão e protocolo otimizado em laboratório, além de quantificar, por PCR quantitativo em tempo real, a abundância dos genes 16S rRNA de Archaea e Bacteria para ambos os protocolos.

b) Quantificar, por PCR quantitativo em tempo real, os genes *mcrA*, *pmoA*, 16S rRNA de *Archaea* e 16S rRNA de *Bacteria* de amostras de DNA total de turfas sob diferentes fitofisionomias e profundidades, obtidas no campo.

#### 4. Material e métodos

A metodologia descrita abaixo foi separada de acordo com o propósito de cada um dos estudos do projeto. Primeiramente, buscou-se otimizar um protocolo de extração de DNA que atendesse às características intrínsecas dos solos das turfeiras tropicais brasileiras, de modo a se obter amostras de DNA de qualidade e em concentrações adequadas para as análises moleculares posteriores. Em segundo estudo descrito neste presente projeto, buscou-se avaliar a abundância, por qPCR, de arqueias e bactérias presentes em diferentes fitofisionomias e profundidades das turfas, com foco na microbiota associada ao ciclo biogeoquímico do metano.

##### 4.1 Área de estudo

A área de estudo consistiu em três turfeiras localizadas no Parque Estadual da Campina do Encantado (PECE), no município de Pariquera-Açu, São Paulo, Brasil (24° 40' S, 47° 48' W). O parque possui uma área de 3.258 ha e turfeiras com diferentes fitofisionomias (São Paulo, 1998).



Figura 1. Fitofisionomia de uma das áreas de estudo do Parque Estadual da Campina do Encantado, no município de Pariquera Açu – Estado de São Paulo.

## **4.2 Coleta e processamento das amostras de solo**

A coleta das amostras de turfa foi realizada em cada uma das três áreas de turfa com distintas fitofisionomias, nas profundidades de 0-10 cm, 20-30 cm, 90-100 cm, 180-190 cm e 290-300 cm, com o uso de vibrotestemunhador e trado russo. Após a coleta, o material foi transportado refrigerado ao laboratório e armazenado a -80 °C.

## **4.3 Extração de DNA total das amostras e comparação entre protocolos**

### **4.3.1 Otimização do protocolo de extração de DNA total da turfa**

Para esta primeira etapa de otimização e avaliação de protocolos de extração de DNA total, foram extraídas amostras de solo de turfa em triplicata de duas áreas e duas profundidades (20-30 cm e 180-190 cm), totalizando 12 amostras. O DNA total dessas amostras foi extraído com o PowerLyzer PowerSoil DNA Isolation Kit (QIAGEN, Hilden, North Rhine Westphalia, Germany), inicialmente de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Posteriormente, as mesmas amostras foram submetidas a um protocolo com adaptações específicas para os passos da extração:

- Redução da quantidade de solução Bead para 500 µl e acréscimo de 300 µl de fenol clorofórmio na mesma etapa.
- Soluções C2 e C3 adicionadas conjuntamente para um volume de sobrenadante de 600 µl.
- Amostras foram incubadas em gelo por 5 minutos após a adição das soluções C2 e C3.
- Adição de 700 µl de solução C4 e 600 µl de etanol 100% na mesma etapa.
- Tempo de centrifugação das “Mb Spin Columns” de 2 minutos a 16.000 x g.
- Adição de 50 µl da solução C6.

Ao final da extração, as amostras de DNA total também foram submetidas à uma etapa de purificação utilizando o OneStep PCR Inhibitor Removal Kit (ZYMO RESEARCH, Murphy Ave, Irvine, Califórnia). Para esta etapa, adicionou-se ao Zymo-Spin™ III-HRC Column 600 µl da solução Prep-Solution, sendo posteriormente centrifugados a 8000 x g por 3 minutos. Após, 50 µl do DNA foi adicionado ao tubo Zymo-Spin™ III-HRC Column e centrifugado a 16000 x g por 3 minutos.

Esta etapa mostrou-se necessária para a obtenção de DNA de qualidade e em concentrações adequadas para as análises moleculares posteriores.

### **4.3.2 Análise da qualidade e da concentração do DNA total extraído**

A qualidade e a concentração do DNA total extraído foi analisada, para todas as amostras, em

espectrofotômetro Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, EUA), com ajuste de densidade ótica a 230 nm, 260 nm e 280 nm, e em eletroforese com gel de agarose 1%, marcado com GelRed (Biotium, Fremont, CA, USA). Adicionalmente, a concentração também foi avaliada em QuBit (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, EUA).

#### **4.3.3 Amostras de campo**

Para as amostras de campo, foram utilizadas amostras de solo em triplicata para as três áreas com fitofisionomias distintas em três profundidades (0-10 cm, 90-100 cm e 290-300 cm), totalizando 27 amostras. O DNA total dessas amostras foi extraído com o PowerLyzer PowerSoil DNA Isolation Kit (QIAGEN, Hilden, North Rhine Westphalia, Germany), aplicando o protocolo de extração otimizado e apresentado anteriormente (tópico 4.3.1), com as adaptações necessárias para extração do DNA de turfa. As amostras de DNA obtidas foram armazenadas a -20 °C.

#### **4.4 Análise da qualidade e da concentração do DNA total extraído**

A qualidade e a concentração do DNA total extraído foi analisada em espectrofotômetro e em eletroforese com gel de agarose, conforme o tópico 4.3.2.

#### **4.5 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)**

A técnica de PCR quantitativo em tempo real será utilizada para quantificar os genes 16S rRNA, de Archaea e Bacteria, e os genes associados ao ciclo do metano, *mcrA* e *pmoA*, a partir das amostras de DNA total do solo de turfa. Para a etapa de otimização do protocolo, o gene 16S rRNA de bactéria e o 16S rRNA de arqueia serão quantificados, enquanto que, para o estudo de campo, além dos genes 16S rRNA para arqueia e bactéria, os genes associados ao ciclo do metano também serão avaliados.

Para cada gene, será construída uma curva padrão contendo de 10 a 10<sup>10</sup> cópias do gene de interesse, que será obtido previamente pela técnica de PCR convencional a partir de amostras ambientais em termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, EUA). A técnica de qPCR será realizada em triplicata para cada amostra no equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems), com um volume final de 10 µl, contendo 5 µl do SYBR Green ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, EUA), 1 µL de cada primer (5 pmol/µl), 0,2 µl de BSA (20 mg/ml) (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, EUA), 1,8 µL de água, 1 µl de DNA (10 ng/µl).

**Tabela 1.** Sequências e referências dos primers dos genes 16S rRNA, de *Archaea* e *Bacteria*, *mcrA* e *pmoA*.

Gene	Primer	Sequência (5' - 3')	Referência
16S rRNA <i>Archaea</i>	519F	CAGCCGCCGCGGTAA	KLINDWORTH et al. (2013)
	915R	GCCATGCACCWCCTCT	STAHL; AMANN (1991)
16S rRNA <i>Archaea</i>	926f	AAACTCAAAGAATTGACGG	BACHETTI DE GREGORIS et al. (2011)
	1062r	CTCACRRCACGAGCTGAC	
<i>mcrA</i>	Mlas-F	GGYGGTGTMGDDTTCACMCARTA	ANGEL; CLAUS; CONRAD (2012)
	mcrA-R	CGTTCATBGCCTAGTTVGGRTAGTT	STEIMBERG; REGAN (2008)
<i>pmoA</i>	A189F	GGNGACTGGGACTTCTGG	HOLMES et al. (1999)
	MB661r	CCGGMGCAACGTCYTAAAC	COSTELLO; LIDSTROM (1999)

#### 4.6 Análise dos resultados

Para a comparação entre protocolos de extração de DNA, os valores de quantidade e qualidade do DNA total do solo serão analisados como já descrito anteriormente (tópico 4.3.2). As diferenças estatísticas entre as concentrações e qualidade de DNA, de acordo com cada protocolo, assim como os resultados de qPCR serão analisadas. As amostras de campo terão seus resultados de qPCR analisados estatisticamente para a verificação de diferenças significativas de abundância de cópias dos genes analisados entre as fitofisnomias e entre as diferentes profundidades da turfa.

#### 5. Plano de trabalho e cronograma

**Tabela 2.** Cronograma das atividades de desenvolvimento do projeto.

Atividade/Mês	1º e 2º mês	3º e 4º mês	5º e 6º mês
Levantamento bibliográfico	✓	X	X
Extração e quantificação de DNA para otimização de protocolo	✓		
qPCR para as amostras do protocolo otimizado	•	X	
Extração e quantificação de DNA total das amostras de campo	✓		
qPCR para as amostras de campo	X	X	
Análise de dados		X	X
Análises estatísticas		X	X

Participação em evento científico			X
Escrita científica	•	X	X

✓ - Etapa concluída; • - etapa em andamento; X - etapa a ser realizada.

## 6. Referências bibliográficas

ALVARADO, A., MONTAÑEZ-HERNÁNDEZ, L. E., PALACIO-MOLINA, S. L., OROPEZA-NAVARRO, R., LUÉVANOS-ESCAREÑO, M. P., & BALAGURUSAMY, N. Microbial trophic interactions and mcrA gene expression in monitoring of anaerobic digesters. *Frontiers in Microbiology*, 5, 2014.

ANGEL, R.; CLAUS, P.; CONRAD, R. Methanogenic archaea are globally ubiquitous in aerated soils and become active under wet anoxic conditions. *The ISME Journal*, London, v. 6, p. 847-862, 2012.

ANTALA, M., JUSZCZAK, R., VAN DER TOL, C., RASTOGI, A. Impact of climate change-induced alterations in peatland vegetation phenology and composition on carbon balance. *Sci. Total Environ.* 827, 154294, 2022.

BACCHETTI DE GREGORIS, T. et al. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. *Journal of Microbiological Methods*, Amsterdam, v. 86, n.3, p. 351-356, 2011.

CLYMO, R. S., TURUNEN, J., & TOLONEN, K. Carbon Accumulation in Peatland. *Oikos*, 81(2), 368, 1998. doi:10.2307/3547057

COSTELLO, A. M.; LIDSTROM, M. E. Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 65, n. 11, p. 5066-5074, 1999.

ERWIN, K. L. Wetlands and global climate change: the role of wetland restoration in a changing world. *Wetlands Ecology and Management*, 17(1), 71–84, 2008. doi:10.1007/s11273-008-9119-1

HARENDA, K.; LAMENTOWICZ, M.; SAMSON, M.; CHOJNICKI, B. The Role of Peatlands and Their Carbon Storage Function in the Context of Climate Change, *GeoPlanet: Earth and Planetary Sciences*, 2018. 10.1007/978-3-319-71788-3\_12.

HOLMES, A. J. et al. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 132, p. 203-208, 1995.

KAMAL, S., & VARMA, A. Peatland Microbiology. *Microbiology of Extreme Soils*, 177–203, 2008. doi:10.1007/978-3-540-74231-9\_9

KIRK, J. L.; BEAUDETTEA, L. A.; HARTB, M.; MOUTOGLISC, P.; KLIRONOMOSB, J. N.; LEEA, H.; TREVORSA, J. T. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, Amsterdam, v. 58, n. 2, p. 169-188, 2004.

KLINDWORTH, A. et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, London, v.41, n.1, p. e1, 2013. doi: 10.1093/nar/gks808.

LELIEVELD, J., CRUTZEN, P.J.; DENTENER, F.J. Changing concentration, lifetime and climate forcing of atmospheric methane. *Tellus B*, 50: 128-150, 1998.

LEONEL, C., MATTOSO, A. (2008). Plano de manejo parque estadual da Campina do Encantado. *Núcleo de Planos de Manejo-Fundação Florestal*, São Paulo.

LIMPENS, J., BERENDSE, F., BLODAU, C., CANADELL, J. G., FREEMAN, C., HOLDEN, J., ... SCHAEPMAN STRUB, G. Peatlands and the carbon cycle: from local processes to global implications – a synthesis. *Biogeosciences*, 5(5), 1475–1491, 2008.

LUTON, P. E. et al. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology, Reading*, v. 148, p. 3521-3530, 2002.

MCDONALD, I. R., & MURRELL, J. C. The particulate methane monooxygenase gene *pmoA* and its use as a functional gene probe for methanotrophs. *FEMS Microbiology Letters*, 156(2), 205–210, 1997.

MIGUEZ, C. B. et al. Detection and isolation of methanotrophic bacteria possessing soluble methane monooxygenase (sMMO) genes using the polymerase chain reaction (PCR). *Microbial Ecology*, New York, v. 33, p. 21–31, 1997.

NOVAIS, C.M., PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. *Rev. Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, ed. 33, 2004.

ROSLAN, M.A., MOHAMAD, M.A., OMAR, S.M. High-quality DNA from peat soil for metagenomic studies: a minireview on DNA extraction methods. *Science Heritage Journal*, 1(2): 1-6, 2017.

SÃO PAULO. Planos de Manejo de Unidades de Conservação. Parque Estadual do Pariquera Abaixo - *Plano de Gestão Ambiental ¼ fase 1*. Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 87p, 1998.

STAHL, D. A.; AMANN, R. Development and application of nucleic acid probes. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Eds.). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Chichester: John Wiley & Sons, 1991.

STEIMBERG, L.M.; REGAN, J.M. *mcrA*-Targeted Real-Time Quantitative PCR Method To Examine Methanogen Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n. 13, p. 4435–4442, 2009.

VENTURINI, A. M., NAKAMURA, F. M., GONTIJO, J. B., DA FRANÇA, A. G., YOSHIURA, C. A., MANDRO, J. A., & TSAI, S. M. Robust DNA protocols for tropical soils. *Heliyon*, 6(5), e03830, 2020. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e03830

XU, J., MORRIS, P. J., LIU, J., & HOLDEN, J. PEATMAP: Refining estimates of global peatland distribution based on a meta-analysis. *CATENA*, 160, 134–140, 2018. doi:10.1016/j.catena.2017.09.010

Gabriel V. Firmino.

---

ALUNO: Gabriel Valverde Firmino E-mail:

[gabriel-valverde@usp.br](mailto:gabriel-valverde@usp.br)



---

ORIENTADORA: Profa. Dra. Tsai Siu Mui

E-mail: [tsai@cena.usp.br](mailto:tsai@cena.usp.br)

**TERMO DE RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL E DEMAIS  
PESQUISADORES ENVOLVIDOS NO PROJETO DE PESQUISA**

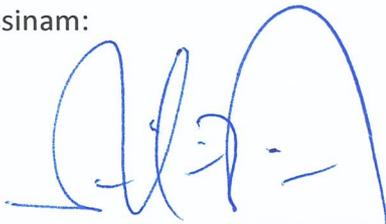
À Comissão de Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, Coc CB  
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ESALQ-USP

Com relação ao projeto de título "GENES FUNCIONAIS DO CICLO BIOGEOQUÍMICO DO METANO NA TURFEIRA DA CAMPINA DO ENCANTADO", desenvolvido para cumprimento das atividades da Disciplina LCB0525, sob supervisão de Prof. Dra. Tsai Siu Mui e com execução parcial ou total sob responsabilidade de Gabriel Valverde Firmino, declaramos que:

1. Estamos cientes do conteúdo e assumimos o compromisso de cumprir os termos das Leis e Decretos complementares (Lei No 6.894 de dezembro de 1980, Lei N. 7.803 de 18 de julho de 1989, Lei No 9.985 de 18 de julho de 2000, Lei No 9.974 de 6 de junho de 2000, Decreto No 99.556 de 1 de Outubro de 1990, Decreto No 4.340 de 22 de agosto de 2002, Instrução Normativa N 154 de 01 de março de 2007, Decreto N 4.074 de 4 de janeiro de 2002, Instrução Normativa N 169/2008, ABNT-NBR10004 2004, Resolução ANVISA RDC 306 - 07 de dezembro de 2004, Resolução No 358, de 29 de abril de 2005) acrescida dos dispositivos e alterações, bem como os demais decretos e instruções normativas posteriores relativos aos assuntos ambientais pertinentes. Também cientes, que apresentaremos todas as declarações e documentos exigidos pela Comissão de Ética Ambiental na Pesquisa CEAP-ESALQ se solicitados;
2. Todos os procedimentos, organismos, insumos, equipamentos e quaisquer outros itens que serão utilizados direta ou indiretamente nesta pesquisa serão adquiridos e empregados segundo a legislação/normas dos órgãos competentes;
3. O projeto prevê recursos financeiros, se necessários, para o gerenciamento dos resíduos oriundos da pesquisa;
4. Todo impacto ambiental decorrente da má condução do projeto é de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos no projeto;
5. Estamos cientes das normas estabelecidas pelo Programa de Gerenciamento de Resíduos Químicos da ESALQ (PGRQ-ESALQ) e comprometemo-nos com o seu cumprimento na sede da instituição responsável pela condução do projeto, colaborando para sua adequada realização;
6. Comprometemo-nos a providenciar, quando exigido em função da natureza do projeto de pesquisa, todos os documentos/autorizações exigidos por órgãos públicos ou privados.

Piracicaba, 31 de Março de 2023

Assinam:



Tsai Siu Mui  
Docente Orientadora



Gabriel Valverde Firmino  
Aluno