

Resíduo da extração de própolis como inibidor bacteriano *in vitro*

Propolis extraction residue like bacterial inhibitor "in vitro"

HEIMBACH, Natália da Silva¹; ÍTAVO, Camila Celeste Brandão Ferreira¹; LEAL, Cássia Rejane Brito¹; ÍTAVO, Luís Carlos Vinhas^{1*}; SILVA, Jonilson Araújo da¹; SILVA, Pâmila Carolini Gonçalves¹; REZENDE, Leticia Costa de¹; GOMES, Maria de Fátima Falcão¹

¹Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil..

*Endereço para correspondência: luis.itavo@ufms.br

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito dos resíduos da extração hidroalcoólica de própolis dos tipos verde e marrom sobre o desenvolvimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As própolis brutas foram adquiridas da apicultura “Companhia da Abelha”, instalada em Contagem, Minas Gerais. A própolis verde foi derivada de “alecrim-do-campo” (*Baccharis dracunculifolia*), e a própolis marrom foi derivada de “alecrim-do-campo” (*B. dracunculifolia*) e “assa-peixe” (*Vernonia polyanthes*). Foram usados cinco níveis de inclusão (0; 0,625; 0,125; 0,25; 0,5g) dos resíduos, além do controle para o inóculo (CI), e seis amostras bacterianas, sendo duas delas Gram-positivas e quatro Gram-negativas. O método utilizado foi o de contagem de unidades formadoras de colônias em placas de petri (pour plate). Entre as bactérias Gram-positivas, o maior efeito inibidor foi detectado para amostras de *Staphylococcus aureus*, e maior susceptibilidade foi para a *Escherichia coli* dentre as Gram-negativas. Houve efeito antimicrobiano do resíduo da extração da própolis verde sobre as bactérias *S. aureus* e *S. intermedius*. O resíduo da extração da própolis marrom apresentou maior inibição para *S. intermedius* somente nos tratamentos com 0,5 e 0,25g de resíduo. Não houve efeito do resíduo da extração de própolis verde ou marrom sobre o crescimento de bactérias gênero *Pseudomonas*. Os resíduos da extração hidroalcoólica de própolis verde e marrom atuaram como inibidores de crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus*,

Staphylococcus intermedius e *Escherichia coli*, e em menor grau para *Salmonella* e *Klebsiella*. O resíduo tem maior efeito inibidor em bactérias Gram-positivas.

Palavras-chave: efeito antimicrobiano, Gram-negativa, Gram-positiva

SUMMARY

This study aimed to evaluate the effect of residues extraction hydroalcoholic of propolis, green and brown, on the development of Gram-positive and Gram-negative bacteria. The crude propolis was obtained from “Companhia da Abelha” in Contagem, Minas Gerais. The green propolis derived from “alecrim-do-campo” (*Baccharis dracunculifolia*), and the brown propolis derived from “alecrim-do-campo” (*B. dracunculifolia*) and “assa-peixe” (*Vernonia polyanthes*). We used five levels of inclusion (0; 0.625; 0.125; 0.25; 0.5g) of the residue, and control for the inoculum (CI) and six bacterial strains, two of which are Gram-positive and four Gram-negative. The method used was to count colony-forming units in petri dishes (pour plate). Among the Gram-positive bacteria, the greatest inhibitory effect was detected for *Staphylococcus aureus* strains, and increased susceptibility was observed for *Escherichia coli* among Gram-negative bacteria. There was antimicrobial effect of the residue of the propolis extract on *S. aureus* and *S. intermedius*. The residue of brown propolis extract showed greater inhibition for *S. intermedius* only in 0.5 and 0.25g of residue inclusion levels. There was

no effect of residues extraction hydroalcoholic of propolis, green and brown on the growth of *Pseudomonas*. The residues of the extraction of propolis green and brown acted as inhibitors of growth of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* and *Escherichia coli*, and to a lesser extent *Salmonella* and *Klebsiella*. The residue has greater inhibitory effect on Gram-positive bacteria.

Keywords: antimicrobial effect, Gram-negative, Gram-positive

INTRODUÇÃO

A própolis é originada de substâncias gomosas, balsâmicas e resinosas, colhida pelas abelhas, de brotos, flores e exsudatos de plantas, nas quais as abelhas depositam secreções salivares, cera e pólen. A própolis tem sido amplamente utilizada devido às propriedades atribuídas ao produto, como atividade antioxidante (PARK et al., 1998), antifúngica (LONGHINI et al., 2007) e antimicrobiana (GONSALES et al., 2006), as quais estão relacionadas com a composição química, influenciada pela floração na qual as abelhas buscam o substrato para fazer a própolis. De acordo com Mirzoeva et al. (1997), a própolis exerce ação bacteriostática sobre bactérias Gram-positivas e algumas Gram-negativas, aparentemente pela modificação do *status* bioenergético da membrana bacteriana e inibição de sua motilidade, o que remete à atividade dos ionóforos. O extrato etanólico de própolis como aditivo na alimentação de animais tem melhorado a conversão e eficiência alimentar de cordeiros (ÍTAVO et al., 2011) e resultado em maior ganho de peso, menor mortalidade e melhor eficiência alimentar em pintinhos (SHALMANY & SHIVAZAD, 2006). Vargas et al. (2004), observaram que o extrato alcoólico de própolis a 50% apresentou atividade antibacteriana *in*

vitro inibindo o crescimento de 67,70% das amostras de bactérias em líquido ruminal.

A partir da própolis bruta, faz-se a extração etanólica. Após essa etapa, o extrato representa apenas 10% da própolis, sendo que a maior parte (90%) constitui-se como o resíduo, que muitas vezes é descartado no meio ambiente, sem ter uma forma de aplicação pesquisada. Nesse sentido, objetivou-se avaliar a ação inibitória *in vitro* dos resíduos da extração hidroalcoólica da própolis verde e marrom sobre o desenvolvimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, visando a utilização deste produto como aditivo na alimentação de ruminantes com o intuito de melhorar o desempenho e resposta animal.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido nas dependências da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, em Campo Grande-MS. As própolis brutas foram adquiridas da apicultura Companhia da Abelha, instalada em Contagem, Minas Gerais, sendo a própolis verde obtida de apiários com acesso a *Baccharis dracunculifolia* (alecrim-do-campo) e a própolis marrom com acesso a *Baccharis dracunculifolia* (alecrim-do-campo) e *Vernonia polyanthes* (assa-peixe).

Para obtenção do resíduo, realizou-se a extração da própolis. Utilizou-se 30g de própolis bruta triturada para cada 100 mL de solução hidro-alcoólica (70%), por período de 10 dias, com posterior filtragem em papel-filtro, obtendo-se a solução-estoque (STRADIOTTI JUNIOR et al., 2004). Com a retirada do extrato se obteve o resíduo, o qual foi seco em

estufa de circulação de ar forçada. Após a secagem, os resíduos foram triturados em moinho de facas tipo Wiley, em crivos de 2mm, e armazenados em sacos plásticos, em temperatura ambiente, para posterior utilização.

A atividade antimicrobiana foi avaliada com o uso de amostras bacterianas padronizadas: *Escherichia coli* derivada ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* derivada ATCC 14028 e *Klebsiella pneumoniae* derivada ATCC 13883. Também foram usadas amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* obtidas de processos infecciosos de animais, sendo estas previamente identificadas pelas suas características morfológicas e reações bioquímicas em meios específicos.

O inóculo foi preparado a partir da suspensão bacteriana em caldo infuso de cérebro e coração (caldo BHI), cuja turbidez foi ajustada, por comparação visual, ao tubo 0,5 da escala de Mac Farland (correspondente a $1,5 \times 10^8$ bactérias/mL).

Na etapa seguinte foram adicionados 10mL de caldo BHI em tubos de ensaio, acrescido do inóculo e dos tratamentos, cinco níveis (0; 0,0625; 0,125; 0,25; e 0,5g) de inclusão do resíduo da extração de própolis verde e marrom, além do controle para inóculo (CI) somente com caldo BHI e 0,5g de resíduo da extração de própolis, sendo incubados em estufa a 37°C por período de 24 horas, em condições de aerobiose. Posteriormente realizou-se a contagem bacteriana total (CBT) pela técnica de *pour plate* (TORTORA et al., 2005). A avaliação do efeito antimicrobiano foi realizada por meio da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), após 48 horas de incubação, em estufa a 37°C. Todas as análises foram realizadas em três repetições.

Os dados foram analisados por meio do

teste de Qui Quadrado utilizando o pacote estatístico SISVAR, e foi realizada comparação de médias a 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos em Unidade Formadora de Colônia (UFC) das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius*, que são Gram-positivas. Observa-se maior efeito antimicrobiano do resíduo da extração da própolis verde sobre as bactérias *S. aureus* e *S. intermedius*. Níveis hidroalcoólicos acima de 0,25g já apresentaram redução na contagem de UFC (Tabela 1), com valores abaixo de 300 UFC, considerado como limite para o crescimento bacteriano, antes do pleno crescimento (incontável).

Na Tabela 2, tem-se a porcentagem do total da Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), de bacterianas Gram-positivas, sob efeito da inoculação do resíduo da própolis verde e marrom. Os resultados da porcentagem do total de UFC, das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* sugere que o resíduo da própolis verde apresentou maior efeito antimicrobiano sobre *S. aureus* e sobre *S. intermedius*, sendo as porcentagens de aparecimento de UFC acima de >300, e placas com número de bactérias incontável, de 33,3 e 30,6% de UFC de *S. aureus*, respectivamente para o resíduo da extração da própolis verde e da própolis marrom, e 38,9 e 19,5% de UFC de *S. intermedius* respectivamente para própolis verde e marrom. Sendo assim, o extrato da própolis verde apresenta-se com poder antimicrobiano maior e mais forte, mesmo passando por todas as etapas de extração.

Tabela 1. Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius*), em função da dose de inclusão do resíduo da extração das própolis verde e marrom

Bactérias	Dose de inclusão do resíduo da extração da própolis (g)					
	CI	0,5	0,25	0,125	0,0625	0 (controle)
Própolis Verde						
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	8	263	> 300	> 300	incontável
<i>Staphylococcus intermedius</i>	0	52	283	incontável	90	incontável
Própolis Marrom						
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	> 300	> 300	incontável	incontável	incontável
<i>Staphylococcus intermedius</i>	0	146	217	> 300	incontável	incontável

CI = com 0,5g de resíduo, sem inóculo bacteriano.

Tabela 2. Porcentagem do total da Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), de bactérias Gram-positivas, sob efeito da inoculação do resíduo das própolis verde e marrom

Contagem de UFC	0-100	100-200	200-300	>300	Incontável	Total
<i>Staphylococcus aureus</i>						
Própolis Verde	16,7	0,0	16,7	33,3	0,0	66,7 ^a
Própolis Marrom	0,0	2,8	0,0	13,9	16,7	33,3 ^b
Total	16,7 ^B	2,8 ^C	16,7 ^B	47,2 ^A	16,7 ^B	100,0
<i>Staphylococcus intermedius</i>						
Própolis Verde	22,2	0,0	5,6	22,2	16,7	66,7 ^a
Própolis Marrom	2,8	5,6	5,6	13,9	5,6	33,3 ^b
Total	25,0 ^B	5,6 ^D	11,1 ^C	36,1 ^A	22,2 ^B	100,0

Médias por bactéria seguidas por letra minúscula na coluna diferem entre si pelo teste χ^2 (P<0,05).

Médias por bactéria seguidas por letra maiúscula na linha diferem entre si pelo teste χ^2 (P<0,05).

Visto que não há trabalhos utilizando resíduo do extrato de própolis, em comparação com estudos utilizando esta etapa anterior, os resultados apresentados por Langoni et al. (1996) mostraram a eficiência do efeito do extrato alcoólico de própolis, o qual inibiu 100% do crescimento das amostras de *Staphylococcus aureus* testadas. Desta maneira, pode-se observar com o presente estudo, que o efeito antimicrobiano da própolis permanece, mesmo que em menor quantidade, no resíduo após extração. Resultado que pode tornar este produto potencial como aditivo na alimentação de ruminantes.

Resultados inibitórios de bactérias *in vitro* de agentes de mastite bovina

(*Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp.) pelo extrato alcoólico de própolis, foram encontrados por Loguércio et al. (2006), sendo de 94,4% de inibição para *Staphylococcus* sp. e 85,2% de inibição para *Streptococcus* sp., desta forma foi possível verificar bom padrão de susceptibilidade daqueles microrganismos ao extrato de própolis. Tal fato também pode ser observado nas Tabelas 1 e 2, onde as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* mostraram-se susceptíveis ao resíduo da extração de própolis, sugerindo que o resíduo da extração ainda apresenta capacidade bactericida.

O resíduo da extração da própolis marrom apresentou maior inibição para

S. intermedius somente nos tratamentos com 0,5g e 0,25g de resíduo, enquanto que para as outras concentrações de resíduo a atividade antimicrobiana se equiparou nas duas bactérias Gram-positivas.

Na Tabela 3, está apresentada a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) das bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella* e *Klebsiella*,

Gram-negativas. O resíduo da extração da própolis verde teve maior efeito inibitório na bactéria *E. coli*, *Salmonella* e *Klebsiella*, ao passo que para *Pseudomonas* não foi observado efeito antimicrobiano do resíduo da extração de própolis verde e marrom, o que já era esperado visto que esta última bactéria é considerada muito resistente.

Tabela 3. Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), de bactérias Gram-negativas, sob efeito da inclusão do resíduo das própolis verde e marrom

Contagem de UFC	Níveis de inclusão do resíduo da extração da própolis (g)					
	CI	0,5	0,25	0,125	0,0625	0 (controle)
Própolis Verde						
<i>Escherichia coli</i>	0	6	131	162	> 300	incontável
<i>Pseudomonas</i>	0	incontável	incontável	incontável	incontável	incontável
<i>Salmonella</i>	0	4	67	> 300	70	incontável
<i>Klebsiella</i>	0	16	12	46	12	incontável
Própolis Marrom						
<i>Escherichia coli</i>	0	> 300	> 300	incontável	> 300	incontável
<i>Pseudomonas</i>	0	incontável	incontável	incontável	incontável	incontável
<i>Salmonella</i>	0	5	42	> 300	> 300	incontável
<i>Klebsiella</i>	0	5	25	61	9	incontável

CI = com 0,5g de resíduo, sem inóculo bacteriano.

Na Tabela 4, apresenta-se a porcentagem do total da Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), de bactérias Gram-negativas, sob efeito da inoculação do resíduo das própolis verde e marrom. Observa-se efeito antimicrobiano do resíduo da extração da própolis sobre as bactérias *Salmonella* e *Klebsiella*, as quais apresentaram a maior porcentagem de contagem de UFC no nível 0-100 UFC, com 58,3% para *Salmonella* e 100,0% para *Klebsiella*. Todavia, houve diferença quanto ao tipo de própolis, sendo o resíduo da extração da própolis verde mais eficaz contra o crescimento de *Salmonella*, enquanto que o resíduo da extração de própolis marrom foi mais eficiente contra o crescimento de *Klebsiella*.

Apesar da não existência de trabalhos utilizando resíduo da extração de própolis, comparando com o extrato, resultados semelhantes aos do presente estudo foram obtidos por Langoni et al. (1996), tendo grande eficácia antimicrobiana *in vitro* de extrato alcoólico de própolis, mostrando 91% de inibição das estirpes de *E. coli* testadas. Efeitos de inibição bacteriana pelo extrato da própolis também foram encontradas por Mazzuco et al. (1996), que obtiveram com a utilização de própolis em solução alcóolica, o controle de *Salmonella* em rações para aves com efeitos bactericidas nos sorotipos *Salmonella typhimurium* e *S. enteritidis*, que foram inoculados artificialmente na ração. Packer et al. (2007) também encontraram resultados

semelhantes, para inibição de *S. aureus* e *E. coli* pela própolis.

Observando o estudo o qual se apresenta, podemos concluir que a atividade antimicrobiana presente na própolis,

permanece no extrato, e posteriormente no resíduo da extração da própolis, que é o resultado positivo que se busca, para utilização do mesmo na alimentação de ruminantes.

Tabela 4. Porcentagem do total da Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), de bactérias Gram-negativas, sob efeito da inoculação do resíduo das própolis verde e marrom

Item	Contagem de UFC					Total
	0-100	100-200	200-300	>300	Incontável	
<i>Escherichia coli</i>						
Própolis Verde	16,7	27,8	5,6	16,7	0,0	66,7 ^a
Própolis Marrom	0,0	0,0	0,0	25,0	8,3	33,3 ^b
Total	16,7 ^C	27,8 ^B	5,6 ^E	41,7 ^A	8,3 ^D	100,0
<i>Pseudomonas</i>						
Própolis Verde	0,0	0,0	0,0	0,0	66,7	66,7 ^a
Própolis Marrom	0,0	0,0	0,0	0,0	33,3	33,3 ^b
Total	0,0 ^B	0,0 ^B	0,0 ^B	0,0 ^B	100,0 ^A	100,0
<i>Salmonella</i>						
Própolis Verde	19,4	0,0	0,0	13,9	0,0	33,3 ^b
Própolis Marrom	38,9	0,0	0,0	27,8	0,0	66,7 ^a
Total	58,3 ^A	0,0 ^C	0,0 ^C	41,7 ^B	0,0 ^C	100,0
<i>Klebsiella</i>						
Própolis Verde	66,7	0,0	0,0	0,0	0,0	66,7 ^a
Própolis Marrom	33,3	0,0	0,0	0,0	0,0	33,3 ^b
Total	100,0 ^A	0,0 ^B	0,0 ^B	0,0 ^B	0,0 ^B	100,0

Médias por bactéria seguidas por letra minúscula na coluna diferem entre si pelo teste χ^2 ($P < 0,05$). Médias por bactéria seguidas por letra maiúscula na linha diferem entre si pelo teste χ^2 ($P < 0,05$).

Não houve efeito do resíduo da extração de própolis verde ou marrom sobre o crescimento de bactérias gênero *Pseudomonas*.

Os efeitos da inoculação do resíduo da extração das própolis verde e marrom sugerem maior eficácia sobre as bactérias Gram-positivas (Tabelas 1 e 2) e menor eficiência ou mesmo ineficácia sobre as bactérias Gram-negativas (Tabelas 3 e 4).

Machado et al. (2008) verificaram que as concentrações de extrato de própolis demonstraram atividade antimicrobiana para *Staphylococcus coagulase positiva* (bactéria Gram-positiva), e que tal extrato

pode ser usado em medicamentos para tratar otite canina.

Os resíduos da extração hidroalcoólica de própolis verde e marrom atuaram como inibidores de crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Klebsiella*. Portanto, com este resultado positivo, conclui-se que o resíduo pode ser utilizado na alimentação de ruminantes como aditivo, devido à sua ação antimicrobiana, acarretando melhorias no desempenho dos animais. Ainda assim, outros estudos devem ser feitos para abordar tal efeito antimicrobiano do resíduo da extração

das própolis verde e marrom para outras bactérias importantes principalmente para a patogenia dos animais.

REFERÊNCIAS

GONSALES, G.Z.; ORSI, R.O.; FERNANDES JUNIOR, A.; RODRIGUES, P.; FURANI, S.R.C. Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.12, n.2, p.276-284, 2006.

ÍTAVO C.C.B.F.; MORAIS M.G.; COSTA C.; ÍTAVO L.C.V.; FRANCO G.L.; SILVA J.A.; REIS F.A. Addition of propolis or monensin in the diet: Behavior and productivity of lambs in feedlot. **Animal Feed Science and Technology**, v.165, p.161-166, 2011.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P.F.; FUNARI, S.R.C.; CHANDE, C.G.; NEVES, I.R. Efeito antimicrobiano “in vitro” da própolis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.48, p.227-229, 1996.

LOGUÉRCIO, A.P.; GROFF, A.N.M.; PEDROZZO, A.F.; WITT, N.M.; SILVA, M.S.; VARGAS, A.C. Atividade in vitro do extrato de própolis contra agentes bacterianos da mastite bovina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.2, p.347-349, 2006.

LONGHINI, R.; RAKSA, S.M.; OLIVEIRA, A.C.P.; SVIDZINSKI, T.I.E.; FRANCO, S.L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Farmacognóssia**, v.7, n.2, p.388-395, 2007.

MACHADO, G.; CARDOSO, R.L.; MABONI, F.; VARGAS, A.C. Atividade antimicrobiana do extrato de própolis frente a isolados de *Staphylococcus coagulase positiva* de otite canina. In: CONBRAVET - CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35., 2008, Gramado, RS. **Anais...** Gramado, RS, 2008.

MAZZUCO, H.; SILVA, R.D.M.; BERCHIERI, J.R.A.; OLIVEIRA, E. Utilização da própolis e álcool etílico no controle de *Salmonella* em rações avícolas. **Scientia Agricola**, v.53, n.1, p.1-7, 1996.

MIRZOEVA, O.K.; GRISHANIN, R.N.; CALDER, P.C. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiological Research**, v.152, p.239-246, 1997.

PACKER, J.F.; LUZ, M.M.S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognóssia**, v.17, n.1, p.102-107, 2007.

PARK, Y.K.; IKEGARI, M.; ABREU, J.A.S.; ALCICI, M.N.F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.3, p.313-318, 1998.

SHALMANY, S.K.; SHILVAZAD, M. The effect of diet propolis supplementation on Ross broiler chicks performance. **International Journal of Poultry Science**, v.5, n.1, p.84-88, 2006.

STRADIOTTI JUNIOR, D.;
QUEIROZ, A.C.; LANA, R.P.;
PACHECO, C.G.; EIFERT, E.C.;
NUNES, P.M.M. Ação da própolis
sobre a desaminação de aminoácidos e a
fermentação ruminal. **Revista
Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.4,
p.1086-1092, 2004.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE,
C.L. **Microbiologia**. 8.ed. São Paulo:
Artmed, 2005.

VARGAS, A.C.; LOGUERCIO, A.P.;
WITT, N.M.; COSTA, M.M.; SILVA,
M.S.; VIANA, L.R. Atividade
antimicrobiana “in vitro” de extrato
alcoólico de própolis. **Ciência Rural**,
v.34, n.1, p.159-163, 2004.

Data de recebimento: 07/04/2015

Data de aprovação: 10/03/2016