

Atividade antifúngica de tinturas de produtos naturais sobre *Candida spp*

Antifungal activity of tinctures from natural products on Candida spp

Yuri Wanderley Cavalcanti¹

Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida²

Wilton Wilney Nascimento Padilha³

1 - Aluno de Graduação em Odontologia – Universidade Federal da Paraíba. Bolsista de Iniciação Científica

(PIBIC/CNPq/UFPB), João Pessoa, Brasil.

2 - Aluna do Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Odontologia Preventiva Infantil) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.

3 - Professor Doutor Titular de Clínica Integrada – Departamento de Clínica e Odontologia Social, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.

Correspondência:

Yuri Wanderley Cavalcanti

Av. Des. Hilton Souto Maior, 6701. Qd.

765, Lt. 117. Portal do Sol.

CEP: 58046-600. João Pessoa – Paraíba, Brasil.

Tel: (83) 8855-0405

E-mail: yuri.wanderley@yahoo.com.br

RESUMO

Avaliar a atividade antifúngica de tinturas de *Rosmarinus officinalis* (Alecrim), *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão), *Allium sativum* (Alho), *Arctium major* (Bardana) e *Zingiber officinale* (Gengibre) sobre cepas de *Candida albicans* (ATCC 289065) – M1, *C. albicans* (ATCC 40277) – M2, *C. tropicalis* (ATCC 13803) – M3 e *C. krusei* (ATCC40147) – M4. A atividade antifúngica das tinturas foi verificada pela técnica de difusão em Ágar. Discos de papel estéreis (diâmetro de 6mm), foram embebidos previamente com 50µL das soluções testadas e do controle, em formulação pura. Realizou-se a semeadura das suspensões fúngicas ($1,5 \times 10^6$ microrganismos/mL) em placas de Agar Sabouraud-Dextrose, sobre as quais foram distribuídos seis discos, cada um deles embebido com uma solução testada diferente. Os testes foram realizados em triplicata e comparados ao controle positivo (Nistatina, suspensão comercial - 1:100.000UI). Os halos de inibição do crescimento fúngico, em milímetros, foram mensurados e analisados descritivamente. Para M1, M3 e M4, as tinturas analisadas não provocaram inibição do crescimento fúngico; enquanto os diâmetros médios dos halos de inibição do crescimento provocados pela Nistatina foram, respectivamente: 10,7; 13,3; e 10,3. Sobre M2, os diâmetros médios dos halos de inibição do crescimento para Alecrim, Barbatimão, Alho, Bardana, Gengibre e Nistatina foram, respectivamente: 21,7; 17,8; 0; 19,2; 13,8; 0. As tinturas de *R. officinalis*, *S. adstringens*, *A. major* e *Z. officinale* inibiram apenas uma cepa e apresentaram comportamento diferenciado da Nistatina. A tintura de *A. sativum* não apresentou atividade antifúngica sobre as cepas testadas.

PALAVRAS-CHAVE: Produtos naturais, Candidíase Bucal, Produtos com Ação Antimicrobiana

ABSTRACT

To evaluate the antifungal activity of tinctures from *Rosmarinus officinalis* (Rosemary), *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão), *Allium sativum* (Garlic), *Arctium major* (Burdock) and *Zingiber officinale* (Ginger) on strains of *Candida albicans* (ATCC 289065) – M1, *C. albicans* (ATCC 40277) – M2, *C. tropicalis* (ATCC 13803) – M3 and *C. krusei* (ATCC40147) – M4. The antifungal activity of essential oils was determined by agar diffusion technique. Discs of sterile paper (6mm of diameter), were previously soaked with 50µL of tested solutions and control in pure formulation. The sowing of fungal suspension (1.5×10^6 organisms/mL) was performed in Sabouraud Dextrose Agar Petri plates, which were distributed on six disks, each one soaked with a different tested solution. The tests were performed in triplicate and compared to positive control (Nystatin, commercial suspension - 100,000 UI/mL). The inhibition areas of fungal growth in millimeters, were measured and analyzed descriptively. For M1, M3 and M4, the analyzed tinctures caused no inhibition of fungal growth; while the average diameters of inhibition zones of growth caused by Nystatin were, respectively: 10.7, 13.3, and 10.3. On M2, the average diameters of inhibition zones of growth to Rosemary, Barbatimão, Garlic, Burdock, Ginger and Nystatin were, respectively: 21.7, 17.8, 0, 19.2, 13.8, 0. The tinctures from *R. officinalis*, *S. adstringens*, *A. major* and *Z. officinale* inhibit only one strain and showed different behavior of Nystatin. The *A. sativum* tincture did not show antifungal activity on analyzed strains.

KEYWORDS: Natural Products; Oral Candidiasis; Products with Antimicrobial Action

INTRODUÇÃO

A candidose oral é a infecção fúngica mais comum, descrita como uma alteração

oportunistas, frequentemente envolvida com a alteração da microbiota bucal, doenças sistêmicas e redução da imunidade do

hospedeiro^{1,2}.

Entre as espécies envolvidas com o desenvolvimento da candidose oral, a *Candida albicans* é a mais prevalente e de maior patogenicidade^{1,3}. *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* também fazem parte do curso da doença e, junto a *C. albicans*, chegam a representar mais de 80% dos isolados clínicos^{1,3,4}.

Diante da utilização de alguns medicamentos antifúngicos sintéticos, as espécies de *Candida* têm se mostrado resistentes^{5,6}. Desta forma, a busca de produtos naturais que apresentem uma ação antifúngica eficiente frente a microrganismos resistentes se mostra uma alternativa necessária para o controle da candidose oral^{5,7-11}.

A triagem (*screening*) da atividade antimicrobiana de produtos naturais tem como objetivo investigar, em parte, a validade do conhecimento popular sobre o uso dessas substâncias nos cuidados em saúde¹². Investigações etnobotânicas identificaram o uso popular de *Rosmarinus officinalis*, *Stryphnodendron adstringens*, *Allium sativum*, *Arctium major* e *Zingiber officinale*^{13,14}, o que justifica a realização do presente estudo.

Produtos naturais a base de *Rosmarinus officinalis* (Alecrim), *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão), *Allium sativum* (Alho), *Arctium major* (Bardana) e *Zingiber officinale* (Gengibre) já tiveram atividade antimicrobiana avaliada por outros estudos e mostram-se efetivos no controle biológico de microrganismos orais¹⁵⁻²⁰.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antifúngica *in vitro* das tinturas de *R. officinalis*, *S. adstringens*, *A. sativum*, *A. major* e *Z. officinale* sobre cepas de *Candida albicans* (ATCC 289065), *C. albicans* (ATCC 40277), *C. tropicalis* (ATCC 13803) e *C. krusei* (ATCC40147).

MÉTODOS

Realizou-se um estudo de abordagem indutiva, com procedimento comparativo estatístico e técnica de documentação direta em laboratório²¹.

Para avaliação antifúngica *in vitro* foram utilizadas as tinturas de *Rosmarinus officinalis* (Alecrim), *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão), *Allium sativum* (Alho), *Arctium major* (Bardana) e *Zingiber officinale* (Gengibre). Esses produtos foram obtidos da Farmácia Homeopática HOMEOVITAE Ltda (João Pessoa, PB -

Brasil), a qual cedeu Laudo Técnico com especificações, conforme apresentado no Quadro 01.

Produto Natural	Lote	Densidade (g/mL, 20°C)	Concentração	Teor Alcoólico
<i>Rosmarinus officinalis</i> (Alecrim)	029044	0,892	20%	68°GL
<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Barbatimão)	ALL373664	0,908	20%	62°GL
<i>Allium sativum</i> (Alho)	L521438	0,943	20%	45°GL
<i>Arctium major</i> (Bardana)	L492043	0,912	20%	59°GL
<i>Zingiber officinale</i> (Gengibre)	HV031209	0,891	20%	62,3°GL

Quadro 01 – Especificações técnicas das tinturas de produtos naturais utilizadas no estudo, segundo laudos técnicos expedidos pela Farmácia Homeopática HOMEOVITAE Ltda (João Pessoa, PB – Brasil).

As cepas de referência utilizadas no estudo foram *Candida albicans* (ATCC 289065), *C. albicans* (ATCC 40277), *C. tropicalis* (ATCC 13803) e *C. krusei* (ATCC40147). Os microrganismos foram obtidos do Laboratório de Materiais de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro - RJ, Brasil). As cepas foram reativadas em Caldo Sabouraud-Dextrose, a 37°C e estocadas em Ágar Sabouraud-Dextrose 4% no Laboratório de Microbiologia Oral – Núcleo de Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba. Para condução do estudo, suspensões fúngicas dos microrganismos foram preparadas em solução salina, sob a concentração $1,5 \times 10^6$ microrganismos/mL, comparável ao tubo 10^6 da Escala de MacFarland.

A atividade antifúngica das tinturas foi verificada pela técnica de difusão em Ágar (disco-difusão). Discos de papel estéreis (diâmetro de 6mm), foram embebidos previamente com 50µL das soluções testadas e do controle, em formulação pura. Realizou-se a semeadura das suspensões fúngicas ($1,5 \times 10^6$ microrganismos/mL) em placas de Agar Sabouraud-Dextrose, sobre as quais foram distribuídos seis discos, cada um deles embebido com uma solução

testada diferente. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica, a 37°C, por 48h. Os testes foram realizados em triplicata e comparados ao controle positivo (Nistatina, suspensão comercial - 100.000UI/mL).

Os halos de inibição do crescimento fúngico foram mensurados em milímetros, com auxílio de um paquímetro. Os dados foram tabulados do Programa Microsoft Office Excel 2007® e analisados descritivamente.

RESULTADOS

As médias dos halos de inibição do crescimento provocado pelos produtos testados, sobre as cepas de *Candida* são visualizados na Tabela 01.

Tabela 1. Valores das médias dos halos de inibição de crescimento (em mm) provocados sobre os produtos testados, sobre as cepas avaliadas de *Candida*.

Microrganismos	Tintura de Alecrim	Tintura de Barbati-mão	Tintura de Alho	Tintura de Bardana	Tintura de Gengibre	Nistatina (1:100.000 UI) - Controle Positivo
<i>Candida albicans</i> (ATCC-289065)	0	0	0	0	0	10,7
<i>Candida albicans</i> (ATCC-40277)	21,7	17,8	0	19,2	13,8	0
<i>Candida tropicalis</i> (ATCC-13803)	0	0	0	0	0	13,3
<i>Candida krusei</i> (ATCC-40147)	0	0	0	0	0	10,3

DISCUSSÃO

A técnica de difusão em Agar por disco-difusão é a estratégia mais comumente utilizada para *screening* da atividade antimicrobiana *in vitro* de produtos naturais^{5,12,22}. Destaca-se também a necessidade de padronização das técnicas empregadas, de modo a viabilizar a sua reprodutibilidade e a comparação com outros estudos²². Dessa forma, baseando-se na metodologia descrita e na comparação com o controle positivo, os resultados deste estudo são válidos e podem ser comparados a outros relatos da literatura.

Atividade antimicrobiana de extratos de *R. officinalis*, *S. adstringens*, *A. sativum*, *A. major* e *Z. officinale* foi investigada por Costa et al.¹⁵, Silva et al.¹⁶, Santos et al.¹⁷,

Lemar et al.¹⁸, Lubian et al.¹⁹ e Aguiar et al.²⁰). Entretanto, não foram identificados estudos com tais produtos na formulação de tintura, meio mais viável e de baixo custo para produção, os quais devem ter sua atividade antimicrobiana pesquisada.

Fonseca e Librandi²³ avaliaram as características físico-químicas e fitoquímicas de tinturas de *S. adstringens*, o que representou os únicos resultados de pesquisa sobre a utilização de um dos produtos avaliados na formulação de tintura. Assim, verifica-se a necessidade de pesquisas sobre a atividade antimicrobiana de tinturas de *R. officinalis*, *S. adstringens*, *A. sativum*, *A. major* e *Z. officinale*.

Destaca-se que as tinturas de *R. officinalis*, *S. adstringens*, *A. major* e *Z. officinale* apresentaram atividade antifúngica apenas sobre *C. albicans* (ATCC 40277). Diferentemente, a Nistatina não foi capaz de inibir o crescimento dessa mesma cepa. Segundo Crocco et al.⁴ (2004), espécies de *Candida* tem se mostrado resistentes a antifúngicos sintéticos, a exemplo da Nistatina. Lubian et al.¹⁹ destacam também a variabilidade genética das diferentes linhagens de *Candida spp*, o que justifica o comportamento diferenciado das amostras deste trabalho. Diante dos resultados obtidos, enfatiza-se o comportamento singular da amostra de *C. albicans* (ATCC 40277) e sugere-se que as tinturas avaliadas possuem desempenho antimicrobiano diferente do controle positivo.

A inibição do crescimento de *Candida spp* pelo extrato *R. officinalis* foi verificado por Costa et al.¹⁵. Lima et al.⁷ e Packer e Luz²² verificaram a atividade antifúngica de *R. officinalis* sob a formulação de óleos essenciais. Estudos sobre a avaliação antimicrobiana de extratos de *R. officinalis* também relataram a eficácia sobre bactérias presentes na microbiota oral^{16,24}. Neste estudo, a tintura de *R. officinalis* só foi capaz de inibir o crescimento de *C. albicans* (ATCC 40277).

Segundo Costa et al.¹⁵, o extrato de *R. officinalis* provocou a inibição do crescimento de amostras clínicas de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, sob as concentrações de 20,1mg/mL, 17,2 mg/mL e 10,2mg/mL, respectivamente. No presente estudo, a tintura de *R. officinalis*, sob a concentração de 20%, não inibiu as cepas-padrão *Candida albicans* (ATCC 289065), *C. tropicalis* (ATCC 13803) e *C. krusei*

(ATCC40147), inativadas pelo controle positivo (Nistatina, suspensão comercial – 100.000UI/mL).

Para a tintura de *S. adstringens*, sob a concentração de 20%, verificou-se a formação de halos médios de inibição de 17,8mm sobre *C. albicans* (ATCC 40277). Ao comparar os resultados obtidos por Lubian et al.¹⁹, para extratos aquosos e alcoólicos de *S. adstringens* na concentração de 10% sobre *Candida albicans* (ATCC 18804), o presente estudo obteve maiores zonas de inibição do crescimento.

Destaca-se que, semelhante a este trabalho, Santos et al.¹⁹ identificaram ausência de atividade antimicrobiana para algumas amostras de extratos aquosos. Assim, deve-se considerar a efetividade de *S. adstringens*, sob diferentes concentrações e veículos, sobre amostras clínicas e laboratoriais de *Candida*.

Diferentemente de outros estudos^{18,25-27}, a tintura de *Allium sativum*, sob a concentração de 20%, não foi capaz de inibir o crescimento de *Candida spp*. Diante da literatura consultada, apenas Packer e Luz²² relataram a ausência de atividade antimicrobiana, quando da avaliação de óleo essencial de *A. sativum*.

Nos estudos de Lemar, Turner e Lloyd²⁵ e Lemar et al.¹⁸, as concentrações dos extratos alcoólicos de *Allium sativum* capazes inibir o crescimento fúngico foram iguais a 4%. Para Yamada e Azuma²⁶ e Ghannoum²⁷, foi determinada a concentração inibitória mínima dos extratos sobre espécies de *Candida*, partindo-se da concentração inicial de 10% e 5%, respectivamente. Entretanto, para este estudo, mesmo na concentração estimada de 20% do princípio ativo, a tintura de *Allium sativum* não apresentou atividade antifúngica.

Segundo Lubian et al.¹⁹, o extrato aquoso de *A. major*, sob a concentração de 12mg/mL, foi ineficaz diante de duas linhagens-padrão de *C. albicans* e uma de *C. tropicalis*. Este trabalho identificou a atividade antimicrobiana da tintura de *A. major* apenas sobre uma cepa testada (*C. albicans* - ATCC 40277). Como descrito anteriormente, o comportamento diferenciado de cepas de um mesmo gênero ou espécie pode ser justificado pela variabilidade genética das diferentes linhagens. Assim, o potencial antimicrobiano das tinturas avaliadas não deve ser descartado.

A atividade antifúngica de produtos naturais a base de *Z. officinale* foi relatada apenas em um trabalho. Aguiar et al.²⁰ determinaram a concentração inibitória mínima e a concentração fungicida mínima do extrato glicólico de *Z. officinale* sobre 24 amostras clínicas de *C. albicans* e uma amostra-padrão (*C. albicans* - ATCC18804), sendo identificadas as concentrações de 12,5% e 6,25%, respectivamente. No presente estudo, foi identificada ação antifúngica da tintura de *Z. officinale* na concentração de 20%, o que sugere a realização de ensaios para verificar a atividade fungistática e fungicida desse produto.

Diante do exposto, considerando-se as limitações do estudo *in vitro*, sendo o mesmo de base experimental, observa-se o potencial antifúngico dos produtos avaliados nas devidas concentrações. Desta forma, se faz necessário a aplicação de outros testes de atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo*, em concentrações diferenciadas, para que a utilização clínica dos produtos possam ser validadas e realizadas de forma segura e eficaz.

CONCLUSÕES

As tinturas de *R. officinalis*, *S. adstringens*, *A. major* e *Z. officinale* inibiram apenas uma cepa e apresentaram comportamento diferenciado da Nistatina. A tintura de *A. sativum* não apresentou atividade antifúngica sobre as cepas testadas.

REFERÊNCIAS

1. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. Postgrad Med J. 2002; 78(2):455-9.
2. Corrêa EM, Andrade ED. Tratamento odontológico em pacientes HIV/AIDS. Rev Odonto Ciênc 2006; 20(49):281-9.
3. Nikawa H, Nishimura H, Hamada T, Yamashiro H, Samaranayake LP. Effects of modified pellicles on *Candida* biofilm formation on acrylic surfaces. Mycoses. 1999; 42(1-2):37-40.
4. Crocco E, Mimica LMJ, Muramatu LH, Garcia C, Souza VM, Ruiz LRB et al. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica *in vitro*: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. An Bras Dermatol 2004; 79(6):689-97.
5. Khan R, Islam B, Akram M, Shakil S, Ahmad AA, Ali SM et al. Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MRD) strains of bacteria and fungus of clinical origin. Mol Cells 2009; 14(2): 586-97.
6. Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD, Filler SG, Pappas PG, Dismukes WE et al. Practice Guidelines for the treatment of candidiasis. J Infect Dis 2000; 30(4): 662-78.

7. Lima IO, Oliveira RAG, Lima EO, Farias NMP, Souza EL. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. Rev Bras Farmacogn 2006; 16(2): 197-201.
8. Pozzatti P, Loreto ES, Lopes PGM, Athayde ML, Santurio JM, Alves SH. Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils. Mycoses 2009; 53(1): 12-5.
9. Castro RD, Lima EO. Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Candida spp.* Rev Odontol UNESP 2010; 39(3): 179-184.
10. Braga LC, Leite AA, Xavier KG, Takahashi JA, Bemquerer MP, Chartone-Souza E et al. Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*. Can J Microbiol 2005; 51(7):541-7.
11. Gould SWJ, Fielder MD, Kelly AF, Naughton DP. Anti-microbial activities of pomegranate rind extracts: enhancement by cupric sulphate against clinical isolates of *S. aureus*, MRSA and PVL positive CA-MSSA. BMC Complement Altern Med 2009; 9(1): 23-8.
12. Mothana RAA, Abdo SAA, Hasson S, Althawab FMN, Alaghbari SAZ, Lindequist U. Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activities and Phytochemical Screening of Some Yemeni Medicinal Plants. Evid Based Complement Altern Med 2010; 7(3): 323-30.
13. Fenner R, Betti AH, Mentz LA, Rates SMK. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. Rev Bras Ciênc Farm 2006; 42(3): 369-93.
14. Silva MD, Dreveck S, Zeni ALB. Estudo etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pela população rural no entorno do Parque Nacional da Serra do Itajaí – Indaial. Health Environ J 2009; 10(2): 54-64.
15. Costa ACBP, Pereira CA, Freire F, Junqueira JC, Jorge AOC. Atividade Antifúngica dos extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* Linn. e *Syzygium cumini* Linn. sobre cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. Rev Odontol UNESP 2009; 38(2): 111-6.
16. Silva MSA, Silva MAR, Higino JS, Pereira MSV, Carvalho AAT. Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. Rev Bras Farmacogn 2008; 18(2): 236-40.
17. Santos VD, Gomes RT, Oliveira RR, Cortés ME, Brandão MGL. Susceptibility of oral pathogenic microorganisms to aqueous and ethanolic extracts of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão). Int J Dent 2009; 8(1): 1-5.
18. Lemar KM, Passa O, Aon MA, Cortassa S, Müller CT, Plummer S et al. Allyl alcohol and garlic (*Allium sativum*) extract produce oxidative stress in *Candida albicans*. Microbiology 2005; 151(10): 3257-65
19. Lubian CT, Teixeira JM, Lund RG, Nascente PS, Del Pino FAB. Atividade antifúngica do extrato aquoso de *Arctium minus* (Hill) Bernh. (Asteraceae) sobre espécies orais de *Candida*. Rev Bras Plantas Med 2010; 12(2): 157-62.
20. Aguiar APS, Caires LP, Maekawa LE, Valera MC, Koga-Ito CY. Avaliação in vitro da ação do Extrato Glicólico de Gengibre sobre *Candida albicans*. Rev Odontol Univ Cid Sao Paulo 2009; 21(2): 144-9.
21. Lakatos EM, Marconi MA. Fundamentos da Metodologia Científica. 3. ed. São Paulo: Atlas, 2009. 273p.
22. Packer JF, Luz MMS. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. Rev Bras Farmacogn 2007; 17(1): 102-7.
23. Fonseca P, Librandi APL. Avaliação das características físico-químicas e fitoquímicas de diferentes tinturas de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*). Rev Bras Ciênc Farm 2008; 44(2): 271-7.
24. Cordeiro CHG, Sacramento LVS, Corrêa MA, Pizzolitto AC, Bauab TM. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. Rev Bras Ciênc Farm 2006; 42(3): 395-404.
25. Lemar KM, Turner MP, Lloyd D. Garlic (*Allium sativum*) as an anti-*Candida* agent: a comparison of the efficacy of fresh garlic and freeze-dried extracts. J Appl Microbiol 2002; 93(2): 398-405 (2001)
26. Yamada Y, Azuma K. Evaluation of the In Vitro Antifungal Activity of Allicin. Antimicrob Agents Chemother 1977; 11(4):743-9.
27. Ghanoum MA. Studies on the Anticandidal Mode of Action of *Allium sativum* (Garlic). J Gen Microbiol 1988; 134(10): 2917-24.

Recebido em 05/11/2010

Revisado em 01/12/2010

Aceito em 13/12/2010