

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE *HELIANTHUS TUBEROSUS* L. E *SMALLANTHUS SONCHIFOLIUS* EM CAMA DE FRANGOS

Carolina Toshie Kamimura¹

Nair Massumi Itaya²

Terezinha Knöbl³

Gessé Gomes⁴

Antônio Carlos Pedroso⁵

Márcia Cristina Menão⁶

Resumo

A avicultura brasileira tem um papel importante no cenário internacional por produzir proteína animal de altíssima qualidade a um custo acessível. O aumento da produção nas últimas décadas tem influenciado positivamente nos aspectos sociais e econômicos do agronegócio. Entretanto, os aspectos ambientais têm se tornado motivo de preocupação na cadeia produtiva principalmente com a alta produção anual de toneladas de cama de frango com potencial de disseminação de micro-organismos a outras aves e seres humanos, além de impactos ambientais. Desta forma é necessário haver algum tipo de tratamento da mesma para minimizar possíveis contaminações de agentes patogênicos. Algumas plantas têm potencial para serem utilizadas para este fim como o *Helianthus tuberosus* L. e *Smallanthus sonchifolius* que sintetizam substâncias com comprovadas propriedades antimicrobianas e de fácil preparação de seus extratos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação de extratos brutos dessas plantas em amostras de cama de frangos comerciais quanto à redução do número de bactérias aeróbias e anaeróbias. Realizou-se o tratamento de três amostras de cama de frango com extratos de ambas as plantas com 50 mg de massa seca/grama de cama. Através de análises microbiológicas comparou-se o número de bactérias anaeróbias e aeróbias nas amostras tratadas e nos controles após três e 24 horas. Os resultados demonstraram redução na carga bacteriana aeróbia e anaeróbia nas camas testadas. Novas concentrações de

¹ Mestranda do curso de pós-graduação. Faculdades Metropolitanas Unidas (FMU). São Paulo, SP, Brasil.

² Bióloga

³ Docente do curso de Medicina Veterinária. Universidade de São Paulo (USP). São Paulo, SP, Brasil.

⁴ Técnico em laboratório. Faculdades Metropolitanas Unidas (FMU). São Paulo, SP, Brasil.

⁵ Docente do curso de Medicina Veterinária. Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS). Campus Realeza, PR, Brasil.

⁶ Docente do curso de Medicina Veterinária e Mestrado em Saúde Ambiental. Faculdades Metropolitanas Unidas (FMU). São Paulo, SP, Brasil. **E-mail:** marcia.menao@fmu.br

extratos e outros períodos de ação devem ser testados para avaliar a possível potencialização da ação das substâncias.

Palavras-chave: ação bactericida; cama de frango; *Helianthus tuberosus* L.; *Smallanthus sonchifolius*.

EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE CRUDE EXTRACTS OF *HELIANTHUS TUBEROSUS* L. AND *SMALLANTHUS SONCHIFOLIUS* IN POULTRY LITTER

Abstract

Brazilian poultry has an important role in the international scenario, producing high quality animal protein at an affordable cost. The production increase in recent decades has positively influenced agribusiness in its social and economic aspects. However, environmental issues have become a concern in the production chain, mainly due to the annual production of tons of poultry litter, which can potentially disseminate microorganisms to other birds and humans, amongst other environmental impacts. In this context, poultry litter must undergo processing in order to minimize possible environmental contamination by pathogens. Some plant extract products with proven antimicrobial properties, such as *Helianthus tuberosus* L. and *Smallanthus sonchifolius* can be potentially used for this purpose. The objective of this work was to evaluate if the crude plant extracts of these plants could reduce the number of aerobic and anaerobic bacteria in commercial poultry litter samples. Three poultry litter samples were treated with the crude extracts from both plants in the proportion of 50mg of dry mass per gram of poultry litter. The number of aerobic and anaerobic bacteria in experimental and control samples were compared using microbiological analysis after three and 24 hour treatments. The results demonstrated a reduction in the aerobic and anaerobic bacterial load in the experimental poultry litter samples. Different crude extract concentrations and treatment times should be tested to evaluate the potentiation action of such extracts.

Key words: bactericidal action; chicken bed; *Helianthus tuberosus* L.; *Smallanthus sonchifolius*.

1. INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira representa atualmente 1,5% do PIB, gerando 3,5 milhões de empregos diretos e indiretos. A produção de frangos está presente em todas as regiões do país, com destaque para as regiões sul e sudeste. Cerca de 90% das aves abatidas são produzidas no sistema de integração vertical, onde a empresa detém o controle de todos os elos da cadeia, ou seja, produção, abate, processamento e distribuição. Isso gera renda e a fixação do homem do campo em sua terra, viabilizando a pequena propriedade (Apba 2017).

Segundo François (2013) todo o desenvolvimento alcançado ocorreu graças às novas técnicas, ao melhoramento genético das linhagens de aves, ao desenvolvimento de rações balanceadas e de melhor qualidade e à legislação direcionada à sanidade, entretanto várias doenças continuam a ocorrer.

Em uma produção avícola intensiva a cama tem como função evitar o contato direto da ave com o piso, auxiliar a absorção de água, a incorporação de fezes, urina e penas, agir como um isolante térmico e evitar calos e lesões nas patas e no peito das aves, sendo constituída normalmente de maravalha de pinus (raspas de madeira) (Daí Prá Roll 2012).

Com o aumento da produção de aves de corte ocorreu proporcionalmente o aumento da quantidade da cama gerada (Santos et al. 2000). Por muito tempo, o uso desta como alimento para bovinos foi uma forma de dar um destino útil, sem contaminar o meio ambiente. Entretanto em 2001, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, através da Instrução Normativa nº 15 de 17 de julho (Brasil 2001) proibiu a sua utilização para a alimentação de ruminantes. Dessa forma houve a necessidade de buscar alternativas para minimizar os impactos ambientais para o seu descarte e também reduzir contaminações para seu uso em outros lotes de aves.

A compostagem é um dos métodos utilizados como tratamento da cama, porém para o processo se completar e ser considerado seguro, há a necessidade de 28 a 42 dias, o que torna o tratamento inviável para ser realizado durante o vazio sanitário das aves, cujo período é muito inferior a este prazo (Kelleher et al. 2002).

Pesquisas indicam que algumas substâncias extraídas de plantas possuem potencial antimicrobiano, sem produzir riscos no seu uso no meio ambiente (Duarte 2006). *H. tuberosus* (Jerusalém artichoke) e *S. sonchifolius* (Yacon) sintetizam lactonases quiterpênicas, compostos com diversas atividades biológicas como, por exemplo, bactericida (Alvarenga et al. 2016). Estas substâncias extraídas podem ser promissoras para o tratamento das camas e consequentemente diminuir a contaminação em criações comerciais, com menor risco de transmissão de doenças e contaminação ambiental.

2. OBJETIVO

Avaliar a ação de extrato bruto de *H. tuberosus* e *S. sonchifolius* sobre bactérias aeróbias e anaeróbias em camas de frangos de criações comerciais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

H. tuberosus e *S. Sonchifolius* foram cultivados a partir de propagação vegetativa de rizóforos e tubérculos, respectivamente, na Chácara dos Ipês, no município de Guararema (SP) (Latitude: 23° 24' 45" Sul e Longitude: 46° 2' 28" Oeste) de setembro de 2016 a abril de 2017.

4. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS

Os extratos hidroalcoólicos foram preparados segundo metodologia descrita por Pinho et al. (2012) com modificações, no laboratório de Microbiologia do Complexo Educacional FMU.

Aos sete meses de cultivo, as folhas de ambas as espécies (*H. tuberosus* e *S. sonchifolius*) foram colhidas e expostas ao sol em recipiente fechado por tela, durante três dias para secagem. Em seguida foram trituradas em multiprocessador doméstico, adicionado etanol 50%, na proporção de 1:3 (p/v), e incubadas em banho maria por 30 minutos. A suspensão foi filtrada através de tecido de *voil* quádruplo.

Os extratos foram concentrados até a secura em estufa a 60°C (5 dias) e ressuspensos com água destilada na concentração de 200 mg de massa seca/mL (Figura 1).

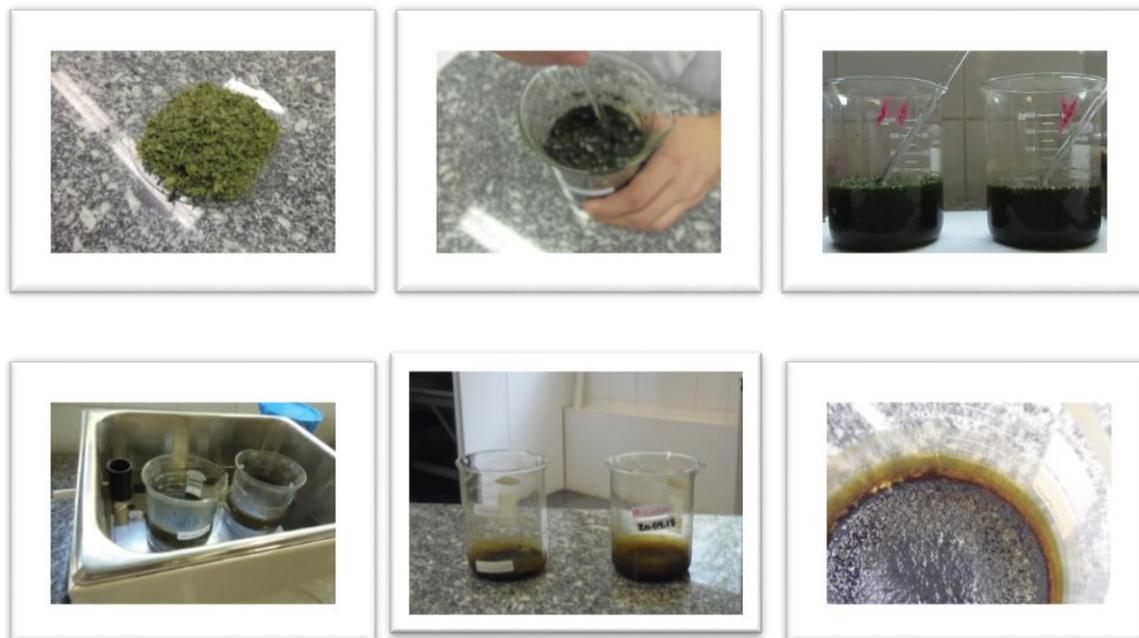


Figura 1. Preparo de extratos desidratados de *H. tuberosus* e *S. sonchifolius*

5. CEPAS BACTERIANAS

Para verificar a atividade antimicrobiana dos extratos extraídos de *H. tuberosus* e *S. sonchifolius* foram utilizadas duas bactérias sendo uma Gram negativa (*Escherichia coli* -ATCC 25922) e uma Gram positiva (*Staphylococcus aureus* - ATCC 29213). Essas cepas foram cultivadas em placas de Petri contendo ágar soja tripticaseína (TSA) e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.

6. AVALIAÇÃO DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO EM MEIO LÍQUIDO

Os extratos utilizados de *H. tuberosus* e *S. sonchifolius* foram esterilizados em autoclave à 121°C por 15 minutos.

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) utilizou-se o teste de microdiluição em triplicata com o caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (DIFCO®).

Foram utilizadas microplacas de 96 cavidades, fundo V, onde 100 µL dos extratos de *H. tuberosus* e *S. sonchifolius* foram adicionados nas seguintes concentrações: 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 mg de massa seca/mL (Figura 2).

Para a preparação dos inóculos bacterianos as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foram cultivadas em caldo BHI e incubadas a 37°C por 24 horas. A turbidez foi ajustada com solução salina estéril (0,9%) pela escala de MacFarland com padrão de 0,5 e confirmada em espectrofotômetro a 600 nm. Foram diluídas na ordem de 1:1000 em caldo BHI de modo a obter uma concentração final de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL.

Foram utilizados controles negativos (somente o meio BHI) e positivos (cepas bacterianas crescidas de BHI).

6,25	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
12,5	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
25	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
50	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
100	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
200	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Diluição	<i>Smallanthus sonchifolius</i>			<i>Helianthus tuberosus</i> Linn.			Controle positivo		Controle negativo			

Figura 2. Esquema do ensaio utilizado para determinação de concentração inibitória mínima (MIC).

Os resultados da concentração inibitória mínima (MIC) de *H. tuberosus* e *S. sonchifolius* em relação à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foram avaliados pela turvação do meio.

7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE *H. TUBEROSUS* E *S. SONCHIFOLIUS* EM CAMA DE FRANGO

Três amostras de camas de frango de diferentes granjas do Estado do Paraná com várias reutilizações de lotes de aves foram coletadas no mês de maio de 2017 (Quadro 1).

Quadro 1. Camas testadas e número de lotes de frangos nelas utilizados

Cama	Número de lotes de aves
1	15
2	2
3	8

Amostras de 25 g de cada cama foram pulverizadas com 6,25 mL das soluções dos dois extratos a 200 mg de massa seca/mL (*H. tuberosus* e *S. sonchifolius*) a fim de alcançar a concentração de 50 mg de massa por grama e acondicionadas em temperatura ambiente. Foi selecionada uma amostra de cada cama como controle negativo (sem adição dos extratos).

Todas as amostras foram avaliadas por contagem de aeróbios e anaeróbios totais em zero hora (antes das pulverizações), três e 24 horas após a pulverização.

As amostras (25g) foram diluídas em 225 mL de caldo BHI e tituladas até 10^{-10} sendo semeadas em triplicatas para contagem de aeróbios e anaeróbios em placas de Petri contendo TSA e incubadas a 37°C, sendo as placas para crescimento de anaeróbios foram colocadas em jarra de anaerobiose.

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O aumento da produção de carne de frango nas últimas décadas gerou a preocupação com o descarte de passivos ambientais como a cama de frango, que apresenta potencial de contaminação ambiental e de transmissão de doenças para animais e seres humanos (Abpa 2017, Daí Prá Roll 2012).

A reutilização desta por vários lotes não é recomendada, mas é uma realidade no Brasil, devido a razões como o impacto ambiental, o custo de aquisição do

novo material, a mão-de-obra para o correto manejo do substrato da cama, o custo para a retirada do substrato do galpão e também o tempo de vazio sanitário após sua retirada (Fiagá 2014, Silva et al. 2007, Paganini 2004).

Algumas técnicas e substâncias têm sido testadas para a inativação de micro-organismos contidos nas camas durante o vazio sanitário realizado entre os lotes de aves como a compostagem e o bissulfato de sódio, que apresentam limitações em seus usos (Oliveira et al. 2004, Carvalho Neto et al. 2007).

A vida média da ave desde a entrada do lote no aviário até a sua saída é de aproximadamente 42 dias. Os animais ficam sobre a cama onde eliminam excretas, modificando a composição e acrescentando micro-organismos novos a ela. A cada ciclo de nova utilização existe uma carga biológica maior o que poderá favorecer a perpetuação de patógenos entre os lotes, desta forma existe a recomendação de não reutilizar em caso de ocorrência de problemas sanitários (Silva et al. 2007).

O calor também é utilizado para minimizar a quantidade de micro-organismos da cama. A compostagem é um método que utiliza o calor produzido espontaneamente pelo metabolismo dos micro-organismos que estão na cama. Na compostagem completa ocorre a degradação dos resíduos na presença de oxigênio, isto é, ocorre uma degradação aeróbia do resíduo orgânico por um processo que necessita de 28 a 42 dias e ao final do período, a matéria orgânica estará estabilizada (Kelleher et al. 2002).

Na avicultura convencional esse método foi adaptado, pois o tempo de compostagem da cama foi reduzido para o período entre 4 a 17 dias, sendo realizada durante o período de vazio sanitário, Desta forma a matéria orgânica não fica estabilizada, mas promove a redução da quantidade de micro-organismos nos aviários (Macklin et al. 2006).

Outro ponto a ser considerado são os promotores de crescimento, utilizados desde a década de 1950 nas criações de aves, que são na maioria compostos por antibióticos e quimioterápicos. O uso indiscriminado desses medicamentos em doses não terapêuticas incorporadas nas dietas tem sido considerado como um dos maiores problemas no manejo destes animais, pois pode induzir resistência a inúmeros micro-organismos, inclusive patogênicos que

permanecerão nas camas de frangos podendo ser transferidos a animais e seres humanos (Silva 2000).

A carga microbiana inicial de todas as camas pesquisadas foi elevada, tanto para bactérias aeróbias como anaeróbias (Quadro 2), o que pode representar risco, pois estas são reutilizadas para outros lotes de aves que são colocados sobre este material com somente um dia de idade (Fiorentin 2005).

O *H. tuberosuse* e o *S. sonchifolius* possuem uma variedade de bioprodutos que têm ação sobre alguns micro-organismos (Milani et al. 2009, Moura al. 2012). A opção pelo extrato bruto das plantas foi baseada na ação sinérgica existente entre os compostos e não 2002). A utilização das folhas também é um método sustentável que permite a sobrevivência das plantas.

Ambos os extratos apresentaram inativação de *Staphylococcus aureus* (bactéria Gram positiva) a partir de 50 mg/mL no teste de concentração inibitória mínima (MIC), entretanto não houve inibição de crescimento de *Escherichia coli* (bactéria Gram negativa). Essa ação pode ter ocorrido devido à estrutura da parede celular das bactérias, pois as Gram positivas possuem parede mais rígida, com menor teor de lipídeos e são quimicamente menos complexas que as Gram negativas (Trabulsi e Alterthum 2015).

Em aerobiose a utilização de extratos de *H. tuberosus* e *S. sonchifolius* produziu uma melhor qualidade microbiológica das camas, pois diminuiu o número de bactérias nas três camas testadas na maioria dos períodos quando comparados aos controles. Em aerobiose as camas tratadas com *H. tuberosus* produziram diminuição em uma casa logarítmica na cama 1 e 2 e de duas casas na cama 3 após três e 24 horas de tratamento, quando comparadas aos controles. Também houve diminuição do número de bactérias nas camas tratadas com *S. sonchifolius*, sendo de uma casa logarítmica nas camas 1 e 2 e de duas casas logarítmicas na cama 3, quando comparadas aos controles (Quadro 2). Deve-se considerar que algumas bactérias anaeróbias podem permanecer na forma de esporos nas camas e não tendo ocorrido ação dos extratos nesta forma de apresentação das bactérias.

Quadro 2. Resultados de titulação de bactérias aeróbias e anaeróbias em camas de frango tratadas com extrato de *Helianthus tuberosus* L., *S. sonchifolius* e controles

		Aerobiose			Anaerobiose		
		Zero hora UFC	3 horas UFC	24 horas UFC	Zero hora UFC	3 horas UFC	24 horas UFC
Cama 1	Controle	$3,6 \times 10^{-7}$	$2,0 \times 10^{-6}$	$3,6 \times 10^{-6}$	$3,6 \times 10^{-7}$	$4,4 \times 10^{-6}$	$3,6 \times 10^{-7}$
	Ht	$3,6 \times 10^{-7}$	$2,8 \times 10^{-6}$	1×10^{-5}	$3,6 \times 10^{-7}$	$2,7 \times 10^{-6}$	$2,4 \times 10^{-6}$
	Ss	$3,6 \times 10^{-7}$	$2,1 \times 10^{-6}$	1×10^{-5}	$3,6 \times 10^{-7}$	$1,6 \times 10^{-6}$	$3,6 \times 10^{-6}$
Cama 2	Controle	$3,6 \times 10^{-7}$	$3,6 \times 10^{-7}$	1×10^{-6}	$3,6 \times 10^{-7}$	$3,6 \times 10^{-7}$	$3,6 \times 10^{-7}$
	Ht	$3,6 \times 10^{-7}$	$3,6 \times 10^{-6}$	$3,6 \times 10^{-6}$	$3,6 \times 10^{-7}$	$1,1 \times 10^{-6}$	$1,1 \times 10^{-6}$
	Ss	$3,6 \times 10^{-7}$	$3,6 \times 10^{-6}$	3×10^{-5}	$3,6 \times 10^{-7}$	$1,6 \times 10^{-5}$	4×10^{-6}
Cama 3	Controle	$3,6 \times 10^{-7}$					
	Ht	$3,6 \times 10^{-7}$	$3,6 \times 10^{-7}$	$2,4 \times 10^{-4}$	$3,6 \times 10^{-7}$	$1,1 \times 10^{-5}$	2×10^{-5}
	Ss	$3,6 \times 10^{-7}$	$2,2 \times 10^{-6}$	1×10^{-4}	$3,6 \times 10^{-7}$	$4,0 \times 10^{-5}$	6×10^{-4}

Ht - *Helianthus tuberosus*

Ss - *S. sonchifolius*

UFC – Unidade Formadora de Colônia

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os extratos de *H. tuberosus* e *S. sonchifolius* apresentaram ação antibacteriana sobre bactérias aeróbias e anaeróbias em algumas das camas de frangos de criações comerciais testadas em alguns períodos quando comparadas aos controles. Novos testes devem ser realizados com outras concentrações dos extratos e diferentes períodos de exposição para avaliar uma possível potencialização da ação antibacteriana sobre bactérias aeróbias e anaeróbias.

10. AGRADECIMENTO

Ao Prof.Dr. Flávio Aparecido Baldisseri Jr. pela contribuição na revisão do abstract.

REFERÊNCIAS

- Abpa– Associação Brasileira de Proteína Animal – Relatório Anual de 2016. [acesso em 2017 mai 21]. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2016..>
- Alvarenga EA, Itaya NM, Menão MC. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de plantas de *Smallanthus Sonchifolius* (Yacon) e *HelianthusTuberosus* L. (Jerusalém Artichoke). *Atas de Saúde Ambiental*. 2016;4:131-137.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 15 de 17/07/2001, Diário Oficial n-138, seção 1, de 18/07/2001.
- Carvalho Neto PM, Silva EM, Bassani IAO, Cunha Neto OC. Efeito da aplicação de bissulfato de sódio sobre cama de frangos na sobrevivência de *Escherichia coli* e coliformes. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 2007;59(1):65-69.
- Dai Prá MA, Roll FB. Cama de aviário: utilização, reutilização e destino. Ed. Manas - Porto Alegre, 2012.
- Duarte MCT. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. *Revista Multiciência* , 2006. 7(1):1-16.
- Fiagá DAM. Influência da contaminação da cama sobre parâmetros de microbiota e imunidade em frangos de corte [dissertação]. Curitiba. Universidade Federal do Paraná;2014.
- Fiorentin L. Reutilização da cama na criação de frangos de corte e as implicações de ordem bacteriológica na saúde humana e animal. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2005. Embrapa Suínos e Aves, 2005. 23 p.
- François EP. O Ambiente institucional na cadeia produtiva avícola do RS. Regulação e desenvolvimento de mercado baseado no status sanitário dos plantéis [dissertação]. Porto Alegre. Faculdade de Ciências Econômicas da UFRGS;2013.
- Kelleher BP, Leahy JJ, Henihan Am, O'Dwyer TF, Sutton D, Leahy MJ. Advances in poultry litter disposal technology-a review. *Bioresource Technology*. 2006;83(1):27-36.
- Maciel MAM, Pinto AC, Veiga JV, Grynberg N, Echevarria A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química nova*.2002;25(3):429-438
- Macklin KS. et al. Effects of in-house composting of litter on bacterial levels. *Journal of Applied Poultry Research*.2006;15(4):531-537.

Millani E, Konstantyner T, Taddei JAAC. Efeitos da utilização de prebióticos (oligossacarídeos) na saúde da criança. *Revista Paulista de Pediatria*. 2009;27:436-446.

Moura NA, Caetano BF, Sivieri K, Urbano LH, Cabello C, Rodrigues MA, Barisan LF. Protective effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) intake on experimental colon carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology*. 2012;50(8):2902-2910.

Oliveira MC, Ferreira HA, Canchenrini LC. Efeito de condicionadores químicos sobre a qualidade da cama de frango. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2004; 56(4):536-541.

Paganini FJ. Manejo da cama. In: *Produção de frangos de corte*. Mendes AA, Naas IA, Macari M. Campinas: Facta. 2004.

Pinho L, Souza PNS, Sobrinho EM, Almeida AC, Martins RE. Atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. *Ciência Rural*. 2012;42(2):326-331.

Santos EC, Cotta JTB, Muniz JA, Fonseca RA, Torres DM. Avaliação de alguns materiais usados como cama sobre o desempenho de frangos de corte. *Ciência e Agrotecnologia*. 2000;24(4):1024-1030.

Silva EN. Alimentos funcionais para aves: prebióticos e probióticos na alimentação avícola. Conferência de Ciência e Tecnologia Avícolas. Campinas - SP. Anais... Facta, v. 2, 2000, p.241- 251.

Silva VS et al. Efeito de tratamentos sobre a carga bacteriana de cama de aviário reutilizada em frangos de corte. Comunicado Técnico Embrapa. 2007. [acesso em 2017jul 18]. Disponível em: http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/publicacao_k1b20l0q.pdf

Trabulsi LR, Alterthum F. *Microbiologia*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu; 2015. 920p.

Recebido em: 30/10/2017

Aceito em: 15/05/2018