

CRIOPRESERVAÇÃO DO GÊNERO *Pleurotus* A -20 °C E A -70 °C

Talita Rafaela D'Agostini Mantovani¹
 Leila Karin Macarini²
 Shirley Aparecida Fachin Glowacki²
 Michelle Naaime Haurani²
 Fabiola Costa Takakua²
 Erica Clarissa D'Agostini³
 Henrique Susumu Tanaka⁴
 Juliana Silveira do Valle⁵
 Luzia Doretto Paccola-Meirelles⁶
 Giani Andrea Linde⁷
 Nelson Barros Colauto⁸

MANTOVANI¹, T. R. A; MACARINI², L. K; GLOWACKI², S. A. F; HAURANI², M. N; TAKAKUA², F. C; AGOSTINI³, E. C. D; TANAKLA⁴, H. S; VALLE⁵, J. S; MEIRELLES⁶, L. D. P; LINDE⁷, G. A; COLAUTO⁸, N. B. Criopreservação do Gênero *Pleurotus* a -20 °C e a -70 °C. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. Unipar*, Umuarama, v. 11, n. 2, p. 107-112, jul./dez. 2008.

RESUMO: O desenvolvimento de técnicas de criopreservação utilizando temperaturas comerciais (-20 °C) na conservação de Basidiomicetos é uma vantagem técnica e econômica para a produção de biomassa e/ou biocompostos, porém geralmente associada a problemas de danos celulares. O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de substratos para o crescimento do fungo associado a agentes crioprotetores na criopreservação a -20 °C e a -70 °C do gênero *Pleurotus*. O fungo, crescido em ágar-batata-dextrose ou em grãos de aveia, foi criopreservado a -20 °C e a -70 °C na presença dos crioprotetores glicerol, dimetilsulfóxido, glicose, sacarose, extrato de malte e polietilenoglicol. Foram discutidas as vantagens do substrato em associação com o crioprotetor, nas diversas temperaturas de crioproteção. Concluiu-se que o substrato utilizado para o crescimento do micélio influencia na viabilidade de recuperação do fungo criopreservado, em ambas as temperaturas, sendo que grãos de aveia promovem melhor recuperação do fungo e melhor vigor micelial. Os resultados sugerem uma simplificação técnica e redução de custos de manutenção de linhagens de Basidiomicetos.

PALAVRAS – CHAVE: Criopreservação. *Pleurotus*. Substrato. Grão. -20 °C, -70 °C.

CRIOPRESERVATION OF GENUS *PLEUROTUS* AT -20 °C AND -70 °C

ABSTRACT: The development of cryopreservation techniques using commercial temperatures (-20 °C) to preserve Basidiomycetes is an economical advantage for biomass and/or biocompound production; however, it is usually associated to cellular damages. The objective of this work was to evaluate the use of substrates for the fungus growth associated to cryoprotectants for the cryopreservation of Genus *Pleurotus* at -20°C and -70°C. The fungus, grown in either potato dextrose agar or oat grains, was cryopreserved at -20 °C or -70 °C with glycerol, dimethyl sulfoxide, glucose, sucrose, malt extract and polyethyleneglycol. The advantages of the substrate associated with the cryoprotectant at different cryopreservation temperatures were discussed. It was concluded that the substrate used for the mycelial growth positively influences the viability of the recovery of the cryopreserved fungus on both temperatures – oat grains promote better recovery and mycelial vigor. Those results suggest technical simplification and reduction of maintenance costs of culture collections of Basidiomycetes.

KEYWORDS: Cryopreservation. *Pleurotus*. Substrate. Grain. -20 °C. -70 °C

CRIOPRESERVACIÓN DEL GÉNERO *Pleurotus* A -20 °C Y -70 °C

RESUMEN: El desarrollo de técnicas de criopreservación utilizando temperaturas comerciales (-20°C) en la conservación de Basidiomicetos es una ventaja técnica y económica para la producción de biomasa y/o biocompuestos, pero generalmente está asociada a problemas de daños celulares. El objetivo de esta investigación fue evaluar el uso de substratos para el crecimiento del hongo, asociado a agentes crioprotectores en la criopreservación a -20°C y a -70°C del género *Pleurotus*. El hongo, crecido en agar-patata-dextrosa o en granos de avena, fue criopreservado a -20°C y a -70°C en la presencia de los crioprotectores glicerol, dimetilsulfóxido, glucosa, sacarosa, extracto de malte y polietilenoglicol. Fueron discutidas las ventajas del substrato en asociación con el crioprotector, en las diversas temperaturas de crioprotección. Se concluyó que el substrato

¹Bióloga, aluna do Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agricultura – UNIPAR

²Farmacêutica

³Acadêmica do curso de Farmácia – UNIPAR

⁴Biólogo, aluno do Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agricultura – UNIPAR

⁵Docente do curso de Farmácia – UNIPAR

⁶Docente do curso de Ciências Biológicas – UEL

⁷Docente do curso de Farmácia – UNIPAR

⁸Docente do Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agricultura – UNIPAR

utilizado para el crecimiento del micelio influencia en la viabilidad de recuperación del hongo criopreservado, en ambas las temperaturas, siendo que granos de avena promueven mejor recuperación del hongo y mejor vigor del micelio. Los resultados sugieren una simplificación técnica y reducción de costos de manutención de leñajes de Basidiomicetos.

PALABRAS CLAVE: Criopreservación. Pleurotas. Substrato. Grano. -20°C, -70°C.

Introdução

Fungos do gênero *Pleurotus* são Basidiomicetos de interesse comercial, devido a seu sabor refinado (SHARMA; MADAN, 1993) e capacidade de produzir biocompostos antitumorais (WASSER; WEIS, 1999) e hipocolesterolêmicos (HOSSAIN et al., 2003). O cultivo deste fungo vem crescendo, devido principalmente à menor complexidade das técnicas de cultivo, quando comparado com fungos do gênero *Agaricus* (SILVA et al., 2007).

Para o cultivo de cogumelos é necessária a manutenção adequada do inóculo, de forma a preservar suas características biológicas. A repicagem micelial tem sido a técnica mais utilizada na preservação e manutenção desta espécie, porém isto implica contaminações acidentais e degenerações genéticas, com perda das características desejáveis de produção ou da linhagem. Uma forma de superar estes obstáculos é a utilização de técnicas de criopreservação para a manutenção de linhagens.

A criopreservação é uma opção utilizada para a manutenção de coleções de fungos em bancos de germoplasma. As temperaturas utilizadas nestes processos são de -70 °C a -196 °C, o que exige equipamentos caros, e limitam seu uso para fins comerciais e de pesquisa. Assim, o uso de temperaturas mais elevadas e técnicas simples seriam adequados para viabilizar a manutenção de linhagens fúngicas. A criopreservação a -20 °C tem sido pouco explorada e pode trazer um novo enfoque para a manutenção de linhagens. Esta técnica utiliza equipamentos mais baratos e de fácil aquisição, o que torna o processo de criopreservação acessível. Entretanto, esta temperatura ocasiona danos celulares que inviabilizam a recuperação da viabilidade do fungo após congelamento. Para diminuir os efeitos deletérios da criopreservação a -20 °C em Basidiomicetos, são sugeridos agentes crioprotetores (HUBÁLEK, 2003). O uso desses agentes evita a formação de cristais de gelo durante o congelamento, reduzindo danos celulares e aumentando as chances de posterior recuperação do micélio (MATA; PEREZ-MÉRLO, 2003). Contudo, o substrato de crescimento do fungo é um fator que afeta também a capacidade de recuperação do fungo à criopreservação, podendo atuar como crioprotetor (MATA; SALMONES, 2005). A associação de substrato de cultivo e agente crioprotetor poderia viabilizar a criopreservação a 20 °C. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar substratos associados a agentes crioprotetores na criopreservação a -20 °C e a -70 °C do gênero *Pleurotus*, visando desenvolver técnicas de criopreservação mais simples, eficientes e com equipamentos de menor custo.

Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Paranaense - Unipar Campus I de Umuarama, com o fungo do gênero

Pleurotus 8-6, proveniente da micoteca do laboratório. Para o crescimento do inóculo utilizou-se meio de cultura ágar-batata-dextrose (ABD) Merck® (39 g/L) autoclavado a 121 °C por 20 min. O crescimento do fungo foi realizado a 25 °C ± 1 °C, sem iluminação, por 15 dias. Selecionou-se, como inóculo, micélio uniforme e sem setoramento da extremidade do crescimento radial.

Inibição do crescimento micelial

Para a determinação da inibição do crescimento do micélio (ICM) foram adicionadas diferentes concentrações de cada agente crioprotetor em meio ABD, conforme Tabela 1. Todos os crioprotetores foram esterilizados a 121 °C por 20 min, com exceção do dimetilsulfóxido (DMSO) que foi esterilizado por filtração (filtro com poro de 0,22 µm). Em cada meio de cultura foi inoculado um cilindro de 5 mm de diâmetro contendo o micélio do fungo e mantido a 25 °C ± 1 °C, na ausência de luz, por 6 dias. O diâmetro micelial do fungo foi medido em mm e a média foi calculada por quatro medidas de diâmetro. A maior concentração do agente crioprotetor, com índice de ICM inferior a 25%, foi escolhida para a etapa de criopreservação.

Meio de cultivo para a criopreservação do fungo

O micélio foi crescido em meio ABD ou grãos de aveia (*Avena strigosa* Schreb cv. IAPAR 61). Grãos de aveia (GA) com casca (200 g) foram imersos em excesso de água ultra pura e cozidos a 90 °C por 45 min. O excesso de água foi removido e os grãos foram acondicionados em erlenmeyers e autoclavados a 121 °C por 20 min. Em seguida os erlenmeyers receberam cinco cilindros de inóculo de forma asséptica e foram mantidos a 25 °C ± 1 °C no escuro, até completa colonização do fungo.

Criopreservação

Para o experimento de criopreservação foram utilizadas ampolas plásticas, conforme descrito por Challen e Elliot (1986). As ampolas, com uma das extremidades termoseladas e as soluções aquosas dos crioprotetores, foram autoclavadas a 121 °C por 20 minutos, em frascos separados, sendo que a solução de DMSO foi filtrada para esterilização (filtro de 0,22 µm). Cada ampola recebeu 800 µL de solução crioprotetora e em seguida foram adicionados cinco cilindros de ABD ou GA contendo micélio crescido. As ampolas foram fechadas por termoselagem e congeladas a -20 °C ou a -70 °C, a partir da temperatura do ambiente (cerca de 23 °C). Foram realizadas três repetições para cada tratamento. Todas as etapas foram feitas em câmara de fluxo laminar.

Recuperação do fungo criopreservado

Após 30 dias de congelamento, as ampolas foram

descongeladas por submersão em água a 30 °C por 15 min (HERRERA et al., 1998). Em seguida as ampolas foram lavadas com álcool 70% e álcool 96%. Uma das extremidades do tubo foi cortada e a solução crioprotetora foi separada dos cilindros e GA. Os cilindros de ABD e os GA foram transferidos para meio de cultivo ABD e mantidos a 25 °C \pm 1 °C por, no máximo, 30 dias.

Considerou-se recuperado o fungo que apresentou média de recuperação de crescimento maior ou igual a 75% e coeficiente de variação menor que 15%. A média de crescimento das repetições e o coeficiente de variação foram calculados para cada tratamento.

Resultados e Discussão

Na Tabela 1 são apresentados os ICM do fungo na presença de diferentes concentrações de agentes crioprotetores em meio ABD. Pode-se observar que o aumento da

concentração do crioprotetor no meio de cultivo causou inibição do crescimento do micélio, sendo necessário utilizar menores quantidades das relatadas na literatura, durante a criopreservação. Segundo Hubálek (2003) as concentrações utilizadas para a crioproteção de microrganismos em geral são para GO entre 2% e 55% (média de 10%), DMSO entre 1% e 32% (média de 10%), GI entre 1% e 18% (média de 4%), SA entre 1% e 68% (média de 10%), EM entre 0,5 e 20% (média de 2,5%) e PEG entre 5 a 45% (média de 10%). Como cada microrganismo apresenta características únicas, mesmo quando da mesma espécie, optou-se por utilizar a menor quantidade de crioprotetor e que apresentasse o menor distúrbio no crescimento do micélio. Desta forma, selecionou-se a concentração do crioprotetor para GO, DMSO, GI, SA, EM e PEG de 5,0%, 1,0%, 4,0%, 10,0%, 5,5% e 6,0%, respectivamente, para as etapas de criopreservação.

Tabela 1. Diâmetro médio do crescimento micelial do gênero *Pleurotus* em meio de cultivo ágar-batata-dextrose (ABD) com diferentes concentrações de agentes crioprotetores.

Crioprotetor	Código	(%)	Crescimento micelial (mm)	Inibição do crescimento do micélio (%)
Glicerol	GO	5,0	37,7	0
		10,0	12,5	67
		30,0	0,0	100
Dimetilsulfóxido	DMSO	1,0	62,6	0
		2,5	20,2	68
		5,0	0,0	100
Glicose	GI	2,0	75,5	0
		4,0	60,4	20
		10,0	23,4	69
Sacarose	SA	5,0	72,3	0
		10,0	58,9	18
		30,0	0,0	100
Extrato de malte	EM	4,0	67,1	0
		5,5	51,8	23
		13,0	19,3	71
Polietilenoglicol	PEG	3,0	64,4	0
		6,0	53,5	17
		10,0	19,1	70

Nas Tabelas 2 e 3 são apresentados os resultados de recuperação do crescimento micelial do fungo após criopreservação a -20 °C e a -70 °C, respectivamente. Os resultados de recuperação do crescimento micelial após criopreservação a -20 °C e a -70 °C em ABD foram piores que em GA, para todos os agentes crioprotetores, com exceção do crioprotetor GO (5%) a -20 °C e a -70 °C e do DMSO e SA a -70 °C. A maior eficiência esperada na criopreservação a -70 °C está relacionada à maior velocidade de congelamento, que causa menores danos à célula devido à menor desidratação e rompimento das membranas (DUMONT et al., 2004; FELLOWS, 2006), este fato não ficou tão evidente em ABD, sendo que para GA foi indiferente (Tabela 2 e 3). Comparando a ação dos crioprotetores, pôde-se verificar que independente do substrato e da temperatura de criopreservação o GO (5%) foi o mais adequado para preservar o fungo (Tabela 2 e 3). De forma geral os crioprotetores GO e DMSO foram os que apresentaram os melhores resultados nas diversas condições. Têm a capacidade de penetrar a parede celular e membrana plasmática, que além de ligar em água externa à célula, aumentam a elasticidade da membrana, o que permite a acomodação molecular durante a expansão de volume no congelamento (DUMONT et al., 2004; NIEMANN, 1991). Já os crioprotetores GI e SA são compostos de carboidratos com alta capacidade de ligar água, que penetram na parede celular mas não penetram na membrana plasmática (ZHANG et al., 1996; SANTOS, 2001). Desta forma, crioprotetores com capacidade de alterar a elasticidade da membrana plasmática, como o GO, são mais adequados para preservação do Basidiomicetos. Homolka et al. (2003) obtiveram 100% de recuperação de quatro espécies do gênero *Agaricus* com o GO (10%) em nitrogênio líquido. Recuperação total também foi observada por Herrera et al. (1998) para os gêneros *Pleurotus* e *Lentinula* quando utilizado o GO como crioprotetor.

Tabela 2. Porcentagem de recuperação e coeficiente de variação do gênero *Pleurotus* crescido em ágar-batata-dextrose ou grão de aveia e criopreservado por 30 dias a -20 °C

Crioprotetor	ABD	CV (%)	GA	CV (%)
GO (5%)	100	0	100	0
DMSO (1%)	13	174	100	0
GI (4%)	0	0	100	0
SA (10%)	52	87	100	0
EM (5,5%)	0	0	100	0
PEG (6%)	0	0	100	0

ABD: ágar-batata-dextrose; CV: coeficiente de variação; GA: grão de aveia.

Tabela 3. Porcentagem de recuperação e coeficiente de variação do gênero *Pleurotus* crescido em ágar-batata-dextrose ou grão de aveia e criopreservado por 30 dias a -70 °C.

Crioprotetor	ABD	CV (%)	GA	CV (%)
GO (5%)	100	0	100	0
DMSO (1%)	100	0	100	0
GI (4%)	33	69	100	0
SA (10%)	93	12	100	0
EM (5,5%)	75	28	100	0
PEG (6%)	33	173	100	0

ABD: ágar-batata-dextrose; CV: coeficiente de variação; GA: grão de aveia.

O uso de temperatura mais elevada para a manutenção de linhagens fúngicas, como a de -20 °C, considerada temperatura comercial de congelamento, não é usual, segundo Putzke e Putzke (1998), por ocasionar danos celulares, resultando em baixa taxa de sobrevivência do fungo. No entanto, nossos resultados demonstraram que o uso de GA na conservação do fungo a -20 °C permitiu alta taxa de sobrevivência do fungo, à semelhança do que ocorreu na criopreservação a -70 °C (Tabela 2 e 3). O crescimento do fungo em GA, seguido da criopreservação em ambas as temperaturas apresentou 100% de recuperação para todos os crioprotetores testados (Tabelas 2 e 3). Isto sugere que o efeito crioprotetor do substrato GA pode estar relacionado à presença de alta concentração de amido na aveia. O amido possui alta capacidade de ligar água do substrato durante a gelatinização (BELITZ, 1997; FENNEMA, 1993), o que reduz o tamanho dos cristais de gelo, aproximando as temperaturas de congelamento intra e extracelular, reduzindo a desidratação celular (DUMONT et al., 2004; FELLOWS, 2006). A criopreservação de linhagens de *Lentinula* em grãos de sorgo (*Sorghum vulgare*), com glicerol a 10% como crioprotetor, já foi relatado por Mata e Salmones (2005) em nitrogênio líquido, no entanto não foram encontrados relatos em temperatura comercial de -20 °C para Basidiomicetos. Este aspecto permitiria reduzir o custo de equipamentos e a manutenção de coleções de cultura de Basidiomicetos.

Aparentemente, os crioprotetores que penetram a parede celular e a membrana plasmática, como o GO e DMSO são mais versáteis (Tabela 2 e 3), porém, o substrato parece influenciar de forma que o tipo de crioprotetor e a temperatura de criopreservação sejam indiferentes (Tabela 2 e 3). Isto sugere que o crioprotetor não seja necessário para criopreservar em diversas temperaturas, principalmente a -20 °C.

O GA, além do efeito positivo na recuperação do crescimento micelial, permitiu a manutenção do vigor de crescimento do fungo, com crioprotetor GO (5%), tanto na criopreservação a -20 °C como a -70 °C (Figura 1B e 1D), sugerindo que houve a preservação das estruturas celulares, mesmo a -20 °C. Situação similar foi verificada para o ABD, entretanto, o tempo de recuperação do fungo foi muito mais lento, principalmente quando a criopreservação ocorreu a -20 °C (Figura 1A) comparado a -70 °C (Figura 1C). A maior densidade micelial evidencia uma melhor ação crioprotetora em GA, em ambas as temperaturas, e também em ABD a

-70 °C, com o crioprotetor GO (5%), sugerindo que há um número maior de células sobrevivendo neste processo de congelamento. O GA possui ainda um conjunto de capilares adequados à penetração das hifas e que pode ter promovido uma melhor penetração das hifas e maior proteção durante a criopreservação, independentemente do agente crioprotetor. Outro fator que pode ter influenciado este melhor crescimento do fungo é o fornecimento de nutrientes termo-resistentes, como proteínas, minerais e vitaminas comuns em grãos (BELITZ, 1997; FENNEMA, 1993).

Estes resultados permitem uma nova abordagem para os processos de manutenção de linhagens, viabilizando a criopreservação comercial do gênero *Pleurotus*. Outros estudos devem ser ainda desenvolvidos para a determinação de condições de criopreservação comercial para outros Basidiomicetos de interesse comercial, sendo que estes resultados são promissores para estimular a produção de cogumelos comestíveis no Brasil.

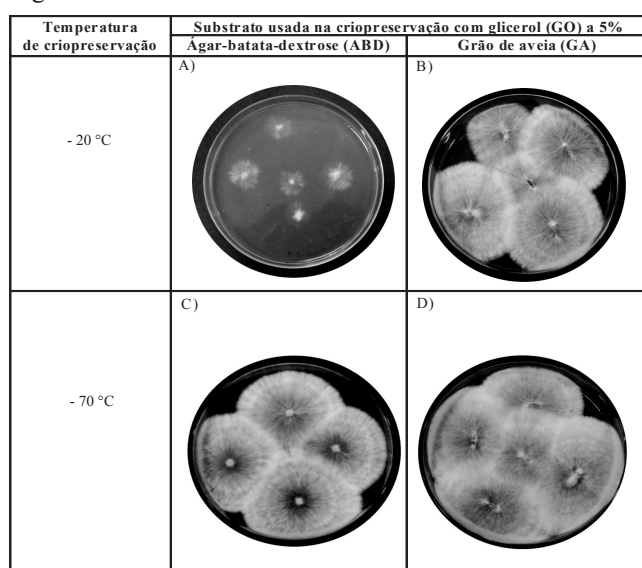


Figura 1. Vigor do micélio crescido a 25 °C, por 14 dias, em meio ágar-batata-dextrose (ABD), após criopreservação, por um mês, a temperatura de -20 °C e -70 °C, do fungo do gênero *Pleurotus*, em (A) e (C), meio de cultivo ABD, e (B) e (D), grão de aveia (GA), todos com o crioprotetor glicerol a 5%.

Conclusões

O substrato de crescimento do micélio influencia diretamente na sobrevivência do fungo criopreservado a -20 °C e a -70 °C, sendo que grãos de aveia são mais eficientes que ágar-batata-dextrose na criopreservação do fungo.

O uso de grãos de aveia associados a um crioprotetor viabiliza criopreservação do fungo do gênero *Pleurotus*, em temperaturas comerciais de -20 °C, em curto prazo, mantendo o vigor de crescimento do fungo.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Paranaense e Fundação Araucária pelo apoio financeiro e pela bolsa de estudos concedida.

Referências

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Química de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1997. 1087 p.

CHALLEN, M.; ELLIOTT, T. J. Polypropylene straw ampoules for the storage of microorganisms in liquid nitrogen. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 5, p. 11-23, 1986.

DUMONT, F.; MARECHAL, P. A.; GERVAIS, P. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 1, p. 268-272, 2004.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e práticas**. Porto Alegre: Artmed, 2006. 602 p.

FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1993. 1051 p.

HERRERA, I. L.; MATA, G.; HERNÁNDEZ, R. G. Evaluation of the viability of *Pleurotus* spp. Strains after liquid nitrogen cryopreservation. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 29, n. 3, 1998.

HOMOLKA, L.; LISÁ, L.; NERUD, F. Viability of basidiomycete strains after cryopreservation of two different protocols. **Folia Microbiologica**, New York, v. 48, p. 219-226, 2003.

HOSSAIN, S. et al. Dietary mushroom (*Pleurotus ostreatus*) ameliorates atherogenic lipid in hypercholesterolaemic rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, New York, v. 30, p. 470, 2003.

HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, New York, v. 46, p. 205-229, 2003.

MATA, G.; PÉREZ-MERLO, R. Spawn viability in edible mushrooms after freezing in liquid nitrogen without a cryoprotectant. **Cryobiology**, New York, v. 47, p. 14-20, 2003.

MATA, G.; SALMONES, D. Preservation of shiitake spawn stocks by cryogenic storage. In: **Shiitake cultivation**. Korea: Mushroom, 2005. p. 42-45.

NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 35, p. 109-124, 1991.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos**. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 1998, 606 p.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal –

a alternativa para conservação a longo prazo. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 20, p. 60-65, 2001.

SHARMA, S.; MADAN, M. Microbial protein from leguminous and non-leguminous substrates. **Acta Biotechnologica**, Berlim, v. 13, p. 131-139, 1993.

SILVA, E. G. et al. Análise química de corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* cultivado em diferentes concentrações de nitrogênio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 72-76, 2007.

ZHANG, Y. H.; ZHONG, J. J.; YU, J. T. Enhancement of ginseng saponin production in suspension cultures of *Panax notoginseng*: manipulation of sucrose. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 51, p. 49-56, 1996.

WASSER, S. P.; WEIS, A. L. Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, New York, v. 1, p. 31-62, 1999.

Recebido em: 30/06/2008

Aceito em: 10/03/2009