

CONTROLE *IN VITRO* DE LARVAS INFECTANTES DE CIATOSTOMÍNEOS (NEMATODA: CYATHOSTOMINAE) DE EQUINOS UTILIZANDO OS FUNGOS PREDADORES *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Arthrobotrys robusta*

FABIO RIBEIRO BRAGA,¹ JACKSON VICTOR DE AARÚJO,¹ ROGÉRIO OLIVA CARVALHO,¹ JULIANA MILANI ARAUJO,¹ ANDRÉ RICARDO E SILVA¹ E ARTUR KANADANI CAMPOS¹

1. Universidade Federal de Viçosa
fabioribeirobraga@hotmail.com

RESUMO

A capacidade predatória de três isolados de fungos predadores de nematoides *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium thaumasium* (NF34) e *Arthrobotrys robusta* (I31) sobre larvas infectantes de ciatostomíneos foi avaliada em condições laboratoriais em ensaio experimental em meio ágar-água 2% (AA 2%). Os isolados AC001,

NF34 e I31 apresentaram redução significativa ($p < 0,01$) de 97,5%, 72,5% e 85%, respectivamente, na média de larvas infectantes de ciatostomíneos recuperadas do meio AA2% ao final de sete dias. Os resultados deste ensaio evidenciam que esses isolados poderão ser utilizados no controle biológico de ciatostomíneos de equinos.

PALAVRAS-CHAVES: *Arthrobotrys robusta*, ciatostomíneos, equinos, *Duddingtonia flagrans*, fungos nematófagos, *Monacrosporium thaumasium*.

ABSTRACT

IN VITRO CONTROL OF INFECTIVE CYATHOSTOMES LARVAE (NEMATODE: CYATHOSTOMINAE) FROM EQUINES USING PREDACIOUS FUNGUS *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Arthrobotrys robusta*

The predatory capacity of three isolates of the nematodes predacious fungi *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium thaumasium* and *Arthrobotrys robusta* on infective larvae of cyathostomes was evaluated in laboratorial conditions in medium water-agar 2% (WA 2%). The isolates AC001, NF34 and I31 had presented significant

reduction ($p < 0.01$) de 97.5%, 72.5% e 85% respectively in the average of infective larvae of ciathostomes recovered of the medium WA2% in the end of five days. The results of this assay evidence that these isolates could be used in the biological control of ciathostomes of equines.

KEY WORDS: *Arthrobotrys robusta*, Cyathostominae, equine, *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, Nematophagous fungi.

INTRODUÇÃO

Criações de animais com fins produtivos apresentam drásticas perdas associadas principal-

mente ao parasitismo por helmintos gastrintestinais. Os vários prejuízos ocasionados por essas infecções estão relacionados, sobretudo, com a queda na produção, retardo no crescimento do

animal, custos com tratamento médico veterinário, com os recursos terapêuticos a serem empregados e em algumas situações com os prejuízos advindos com a morte desses animais (ARAÚJO et al., 2004a; ARAÚJO, 2006a).

No Brasil, grande parte da criação ainda é feita em regime de pasto, o que leva a constantes infecções por parasitos presentes nas pastagens (ANUALPEC, 2003). Segundo dados do IBGE (2002), o rebanho equino corresponde a 36 milhões de animais, número que coloca o Brasil como o terceiro maior criador mundial. Nematoides estrogilídeos são comuns em equinos, representando um grupo de grande importância no Brasil, já que grande parte do rebanho encontra-se infectado. A subfamília Cyathostominae é a mais prevalente, com registros de animais parasitados com mais de um milhão e duzentas mil espécimes de ciatostomíneos que causam prejuízo à saúde animal (CASTRO et al., 2003; ANJOS & RODRIGUES, 2006).

Dados de campo sugerem que os equinos adquirem resistência aos pequenos estrogilídeos com a idade, verificados através da redução da carga parasitária e da contagem de ovos nas fezes, porém esta resposta é lenta e inconsistente na maioria dos animais e não tem relação com a intensidade do contato parasitário anterior (ASSIS & ARAÚJO, 2003; ANJOS & RODRIGUES, 2006).

O controle dos vermes em equinos geralmente é feito utilizando-se anti-helmínticos, os quais não têm sido totalmente eficazes no controle desses nematoides, em virtude de sua ação restrita aos parasitos adultos. Além disso, o aparecimento de resistência aos benzimidazóis, a baixa possibilidade da formulação de um novo composto químico de maior eficiência e a ecotoxicidade de alguns compostos despertaram o interesse no desenvolvimento de novas práticas de controle das nematodioses gastrintestinais que interfiram na infestação de pastagens e que possam contribuir para um menor uso de anti-helmínticos (MOTA et al., 2003; MATTHEWS et al., 2004).

Dessa forma, a aplicação do controle biológico das nematodioses dos animais domésticos tornou-se uma alternativa viável e tem apresentado

resultados promissores em condições laboratoriais e a campo (LARSEN, 2000; GRAMINHA et al., 2005).

Os fungos nematófagos constituem uma opção ao controle dos nematoides gastrintestinais de animais domésticos. Sua ação está concentrada no ambiente fecal e direcionada ao combate das larvas de vida livre dos parasitos (CASTRO et al., 2003; ARAÚJO et al., 2004a; ARAÚJO et al., 2004b). As espécies de fungos predadores variam em sua capacidade de capturar os nematoides. Trata-se dos organismos mais estudados e que apresentam maior potencial de serem comercializados, principalmente pelo seu maior isolamento e facilidade de cultivo em laboratório. As espécies *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Arthrobotrys robusta* são identificadas como nematófagas e têm sido estudadas quanto ao seu potencial como agentes controladores biológicos de nematoides gastrintestinais de animais domésticos (MOTA et al., 2003; ARAÚJO et al., 2006b; DIAS et al., 2007).

O presente estudo tem como objetivo avaliar a capacidade predatória *in vitro* dos fungos *D. flagrans* (isolado AC001), *Monacrosporium thaumasium* (NF34) e *Arthrobotrys robusta* sobre larvas infectantes de ciatostomíneos.

MATERIAL E MÉTODOS

Organismos

Panegrellus (nematoides de vida livre) foram mantidos em placas de Petri com meio de aveia em flocos, umedecida e amassada. Esses nematoides foram extraídos do meio de cultura através da imersão de pequenas quantidades de aveia em água destilada à temperatura ambiente no aparelho de Baermann e coletados em tubos de hemólise após seis horas de decantação.

Fungos

Foram utilizados três isolados de fungos nematófagos, *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium thaumasium* (NF34) e *Arthrobotrys robusta* (I31). Esses isolados são oriundos de solo

do Brasil, na localidade de Viçosa na Zona da Mata de Minas Gerais, latitude 20°45'20" S, longitude 42°52'40" W, a 649m do nível do mar. Eles foram obtidos pelo método do espalhamento do solo de Duddington (1955), modificado por SANTOS et al. (1991). Os fungos foram mantidos em tubos de ensaio a 4° C contendo corn-meal-ágar 2% (CMA 2%) e no escuro durante dez dias.

Obtenção dos conídios

Discos de cultura de 4 mm de diâmetro foram extraídos dos isolados fúngicos mantidos em tubos de ensaio contendo CMA 2% e transferidos para placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro contendo 20mL de batata-dextrose-ágar 2%, e mantidos a 25° C no escuro durante dez dias. Após o crescimento dos isolados, transferiram-se novos discos de cultura de 4 mm de diâmetro para placas de Petri de 9,0 cm diâmetro contendo 20 mL de ágar-água 2 % (AA 2%), onde foram acrescentados de 1ml de água destilada contendo 1.000 larvas de *Panagrellus* sp., diariamente durante um período de 21 dias para indução de formação de conídios fúngicos, ocasião em que se observou o completo desenvolvimento fúngico, de Baermann, com água a 42°C.

A média de L₃ de ciatostomíneos e 5 mL de água destilada foram adicionados a cada placa de Petri, sendo que os conídios e os fragmentos miceliais foram removidos segundo a técnica descrita por ARAÚJO et al. (1993).

Obtenção das larvas infectantes de ciatostomíneos

Fezes frescas foram coletadas diretamente da ampola retal de dezesseis equinos (*Equus caballus*) mestiços com idade entre 3-8 anos, naturalmente infectados. Esses animais eram provenientes da Equideocultura da Universidade Federal de Viçosa, localizada no Município de Viçosa, Estado de Minas Gerais. Após isso, realizou-se a contagem de ovos por grama de fezes (OPG) de acordo com GORDON & WIRTHLOCK (1939), com a finalidade de encontrar animais positivos. Posteriormente procedeu-se

à realização das coproculturas e ao final de sete dias obtiveram-se larvas de terceiro estágio (L₃), que foram identificadas e quantificadas segundo os critérios descritos por BEVILAQUA et al. (1993) em microscópio óptico, objetiva de 10x. A leitura do Baermann demonstrou que 100% das larvas visualizadas eram de ciatostomíneos. As L₃ de ciatostomíneos recuperadas foram contadas em seis alíquotas de 10µl sob microscópio óptico em objetiva de 10x. A média das L₃ foi calculada extrapolando-se a média de larvas observadas por microscópio óptico em objetiva de 10x, contando-se o número de L₃ não predadas em cada um. No sétimo dia, foram recuperadas as L₃ não predadas do conteúdo das placas de Petri através do aparelho recuperadas presentes para o volume final.

Ensaio experimental

Formaram-se quatro grupos em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro contendo 20mL de AA2%, três grupos tratados e grupo-controle, sendo feitas cinco repetições para cada grupo. As placas de Petri foram previamente marcadas em campos de 4 mm de diâmetro. Nos grupos tratados, em cada placa de Petri havia 1.000 L₃ de ciatostomíneos e 1.000 conídios dos isolados fúngicos AC001, NF34 e I31 em AA2%, e o grupo-controle (sem isolados fúngicos) continha apenas 1.000 L₃ nas placas com AA2%.

Durante cinco dias, a cada 24 horas, dez campos aleatórios de 4 mm de diâmetro em cada placa dos grupos tratados e controle foram observados em microscopia. Os dados foram interpretados estatisticamente pela análise de variância em níveis de significância de 1% e 5% de probabilidade. A eficiência de predação de L₃ em relação ao controle foi avaliada pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade. Posteriormente, calculou-se o percentual de redução da média de L₃ de acordo com MENDOZA-DE-GIVES et al. (1999) utilizando-se a seguinte equação:

$$\% \text{ redução} = \frac{(\text{média de } L_3 \text{ recuperadas do controle} - \text{médias de } L_3 \text{ recuperadas do tratamento})}{\text{Média de } L_3 \text{ recuperadas do controle}} \times 100$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os fungos nematófagos *D. flagrans* (isolado AC001), *M. thaumasium* (isolado NF34) e *A. robusta* (isolado I31) têm ação comprovada sobre nematoides gastrintestinais de ruminantes e são candidatos promissores a serem empregados no controle biológico desses organismos (ARAÚJO et al., 2004a). Entretanto, poucos são os trabalhos envolvendo fungos nematófagos e nematoides gastrintestinais de equinos (BIRD & HERD, 1995; SANTOS et al., 2001; RÉDUA et al., 2002; WAGHORN et al., 2003).

Todos os isolados fúngicos testados foram capazes de predação das larvas de ciatostomíneos ao longo do ensaio *in vitro* realizado (Tabela 1). Visualizou-se essa predação nas placas de Petri dos grupos tratados já na primeira leitura dos campos realizada no período de um dia após a interação

das larvas com os isolados fúngicos. Contudo, não se observou a presença dos fungos e, tampouco, armadilhas formadas prendendo as larvas presentes na placas de Petri do grupo-controle.

A comprovação de tal predação foi observada com a redução das médias de L_3 recuperadas de ciatostomíneos ao final do ensaio *in vitro* no quinto dia (Figura 1). A média de larvas infectantes de L_3 não predadas de ciatostomíneos por campo de 4 mm de diâmetro durante o experimento está representada na Tabela 1. Do primeiro ao quarto dia o isolado AC001 apresentou menores médias de L_3 não predadas em relação aos isolados NF34 e I31, e no quinto dia a menor média foi demonstrada pelo isolado I31. Apenas no segundo e no quarto dias foi observada diferença ($p < 0,01$) na ação do isolado I31 sobre as L_3 não predadas em relação aos isolados AC001 e NF34, sem, contudo, apresentar diferença nesses dias em relação ao grupo-controle.

TABELA 1. Média diária e desvio-padrão de larvas infectantes (L_3) não predadas de ciatostomíneos por campo de 4 mm de diâmetro em meio agar-água 2% durante o período de cinco dias nos tratamentos com os isolados fúngicos de *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium thaumasium* (NF34) e *Arthrobotrys robusta* (I31) no controle sem fungo

Tempo (Dias)	Tratamentos (Média de L_3 não predadas)			
	Controle	AC001	NF34	I31
1	6,0b ± 6,1	1,0a ± 1,3	1,4a ± 2,4	2,4a ± 2,1
2	3,0b ± 4,0	0,5a ± 0,8	1,2 a ± 1,2	1,6ab ± 2,0
3	3,0b ± 4,5	0,3a ± 0,7	0,8a ± 1,3	0,7a ± 1,0
4	3,0b ± 3,7	0,4a ± 0,6	1,0a ± 0,9	2,2ab ± 2,4
5	3,6b ± 3,3	0,9a ± 1,0	1,1a ± 1,0	0,6a ± 0,8

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas linhas não diferem estatisticamente ($p > 0,01$).

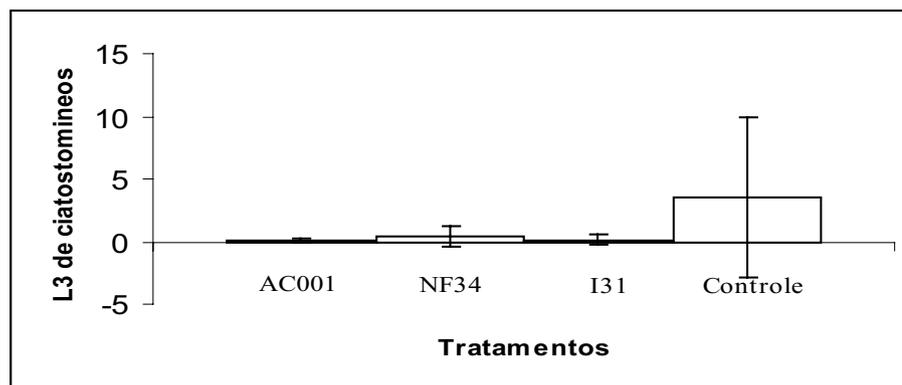


FIGURA 1. Média de larvas infectantes (L_3) de ciatostomíneos não predadas recuperadas em meio agar-água 2% pelo método de Baermann no quinto dia dos tratamentos após interação dos isolados fúngicos *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium thaumasium* (NF34), *Arthrobotrys robusta* (I31) e do controle sem fungos. Barra representa o desvio-padrão.

Ao final de cinco dias, o isolado AC001 demonstrou melhor desempenho em relação aos demais isolados utilizados e o grupo-controle, observando-se uma redução significativa de 97,5% no número médio das L₃ recuperadas (Figura 1). O isolado NF34 apresentou média na redução do número das L₃ recuperadas de 72,5% e o isolado I31 apresentou média de redução de 85% nas L₃ recuperadas. Não foi observada diferença (p>0,01) na ação dos isolados fúngicos utilizados sobre o número de larvas recuperadas. No entanto, houve diferença (p<0,01) no número de L₃ recuperadas dos isolados fúngicos em relação ao grupo-controle.

D. flagrans, *M. thaumasium* e *A. robusta* têm uma taxa ótima de crescimento em temperaturas entre 20° e 30°C. Na presença de nematoides esses fungos conseguem produzir armadilhas em curto intervalo de tempo (MOTA et al., 2002; FONTENOT et al., 2003). CASTRO et al. (2003) registraram percentuais de redução de L3 de ciatostomíneos na faixa de temperatura de 28° para os fungos *M. thaumasium* e *A. robusta*, com valores de 93,68% e 86%, respectivamente. Durante o presente trabalho, a temperatura foi mantida constante na faixa de 28°C e notou-se uma redução eficaz do número de L₃ de ciatostomíneos pela presença de *D. flagrans* (97,5%), *M. thaumasium* (72,5%) e *A. robusta* (85%).

ASSIS & ARAÚJO (2003), trabalhando com as espécies de *M. sinense* e *M. appendiculatum*, notaram que ao final dos quinze dias houve uma redução do número médio de larvas infectantes de ciatostomíneos recuperadas das placas e das coproculturas em torno de 70%, quando comparado ao grupo-controle (p< 0,05). No presente trabalho a taxa de predação de *M. thaumasium* foi superior.

MOTA et al. (2002), em avaliação da ação de *M. thaumasium* e *A. robusta* sobre L₃ infectantes de bovinos, registraram taxas de predação em torno de 92,5% e 85,0%, respectivamente. No presente trabalho, a ação predatória sobre L₃ de equinos registrada para *M. thaumasium* e *A. robusta* foi bem semelhante.

Os fungos utilizados neste trabalho apresentaram-se como potenciais controladores biológicos de nematoides gastrintestinais de equinos.

CONCLUSÃO

Os dados obtidos demonstraram que *D. flagrans* (AC001), *M. thaumasium* (NF34) e *A. robusta* (I31) foram eficazes no controle *in vitro* de larvas infectantes de ciatostomíneos de equinos.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pela concessão das bolsas.

REFERÊNCIAS

- ANJOS, D. H. S.; RODRIGUES, M. L. A. Diversity of the infra communities of strongyloid nematodes in the ventral colon of *Equus caballus* from Rio de Janeiro state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 136, n. 3-4, p. 251-257, 2006.
- ANUALPEC. **Anuário estatístico da produção animal**. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2003. 380 p.
- ARAÚJO, J. V. **Diagnostico das helmintoses**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2006. p. 9-46 (Caderno Didático, 113).
- ARAÚJO, J. V.; FREITAS, B. W.; VIEIRA, T. C.; CAMPOS, A. K. Avaliação do fungo predador de nematóides *Duddingtonia flagrans* sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus* e *Strongyloides papillosus* de caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n. 2, p. 76-79, 2006a.
- ARAÚJO, J. V.; GUIMARÃES, M. P.; CAMPOS, A. K.; SÁ, N. C. de; SARTI, P.; ASSIS, R. C. L. Control of bovine gastrointestinal nematode parasites using pellets of the nematode trapping fungus *Monacrosporium thaumasium*. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p.457-463, 2004b.
- ARAÚJO, J. V.; MOTA, M. A.; CAMPOS, A.K. Controle biológico de helmintos parasitos de animais por fungos nematófagos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, suplemento 1, p. 165-170, 2004a.
- ARAÚJO, J. V.; SANTOS, M. A.; FERRAZ, S.; MAIA, A. S. Antagonistic effect of predacious *Arthrobotrys fungi* on infective *Haemonchus placei* larvae. **Journal of Helminthology**, v. 67, n. 3, p. 136-138, 1993.
- ASSIS, R. C. L.; ARAÚJO J. V. Avaliação da viabilidade de duas espécies de fungos predadores do gênero *Monacrosporium* sobre ciatostomíneos após a passagem pelo trato

- gastrointestinal de eqüinos em formulação de alginato de sódio. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, n. 3, p. 109-113, 2003.
- BEVILAQUA, C. M. L.; RODRIGUES, M. L.; COCORDET, D. Identification of infective larvae of some common Eqüinos strongylids of horses. **Revue of Médecine Veterinaire**, v. 144, n.12, p. 989-995, 1993.
- BIRD, J.; HERD, R.P. *In vitro* assessment of two species nematophagous fungi (*Arthrobotrys oligospora* and *Arthrobotrys flagrans*) to control the development of infective cyathostome larvae from naturally infected horses. **Veterinary Parasitology**, v. 56, n. 1-3, p. 181-187, 1995.
- CASTRO, A. A.; OLIVEIRA, C. R. C.; ANJOS, D. H. S.; ORNELLAS, E. I.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ARAÚJO, J. V.; SAMPAIO, I. B. M.; RODRIGUES, M. L. A. Potencial dos fungos nematófagos *Arthrobotrys* sp. e *Monacrosporium thaumasium* para o controle de larvas de ciatostomíneos de eqüinos (Nematoda: Cyathostominae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, n. 2, p. 49-53, 2003.
- DIAS, A. S.; ARAÚJO, J. V.; CAMPOS, A. K.; BRAGA, F. R.; FONSECA, T. A. Application of a formulation of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in the control of cattle gastrointestinal nematodioses. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 9, p. 10.1007, 2007.
- DUDDINGTON, C. L. Notes on the technique of handling predaceous fungi. **Transactions of British Mycology Society**, v. 38, n. 2, p. 97-103, 1955.
- FONTENOT, M. E.; MILLER, J. E.; PEÑA, M. T.; LARSEN, M.; GILLESPIE, A. Efficiency of feeding *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to grazing ewes on reducing availability of parasitic nematode larvae on pasture. **Veterinary Parasitology**, v. 118, n. 3-4, p. 203- 213, 2003.
- GORDON, H. M.; WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific Industrial Research**, v. 12, p. 50-52, 1939.
- GRAMINHA, E. B.; COSTA, A. J.; OLIVEIRA, G. P.; MONTEIRO, A. C.; PALMEIRA, S. B. S. Biological control of sheep parasite nematodes by nematode-trapping fungi: *in vitro* activity and after passage through the gastrointestinal tract. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 5, 2005.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Anuário Estatístico**. Rio de Janeiro: IBGE, 2002.
- LARSEN, M. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi. **Parasitology**, v.120, n. 1, p. 121-131, 2000.
- MATTHEWS, J. B.; HODGKINSON, J. E.; DOWDALL, S. M. J.; PROUDMAN, C. J. Recent developments in research into the Cyathostominae and *Anoplocephala perfoliata*. **Veterinary Research**, v. 35, n. 4, p. 371-381, 2004.
- MENDOZA-DE-GUIVES, P.; DAVIES, K. G.; CLARCK, S. J.; BEHNKE, J. M. Predatory behaviour of trapping fungi against *srf* mutants of *Caenorhabditis elegans* and different plant and animal parasitic nematodes. **Parasitology**, v. 119, n. 1, p. 95-104, 1999.
- MOTA, M. A.; CAMPOS, A. K.; ARAÚJO, J. V. Evaluation of the predatory capacity of the fungi *Arthrobotrys robusta* and *Monacrosporium thaumasium* submitted to different preservation methods against gastrointestinal parasitic nematodes of bovines. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.11, n.1, p.13-17, 2002.
- MOTA, M. A.; CAMPOS, A. K.; ARAÚJO, J. V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 3, p. 93-100, 2003.
- RÉDUA, C. R. O.; SICILIANO, S.; MUJICA, F.; ARAUJO, J. V.; RODRIGUES, M. L. A. Avaliação da passagem do fungo nematófago *Monacrosporium thaumasium* pelo trato gastrointestinal de eqüinos. **Ciência Animal**, v. 12, n. 2, p. 133-136, 2002.
- SANTOS, C. P.; PADILHA, T.; RODRIGUES, M. L. A. Atividade predatória de *Arthrobotrys oligospora* e *Duddingtonia flagrans* nos estádios larvares pré-parasíticos de cyathostominae sob diferentes temperaturas constantes. **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 839-842, 2001.
- SANTOS, M.; FERRAZ, S.; MUCHOVEJ, J. Detection and ecology of nematophagous fungi from Brazil soils. **Nematologia Brasileira**, v. 15, n. 2, p.121-134, 1991.
- WAGHORN, T.S.; LEATHWICK, D.M.; CHEN, L.-Y.; SKIPP, R.A. Efficacy of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against three species of gastro-intestinal nematodes in laboratory faecal cultures from sheep and goats. **Veterinary Parasitology**, v. 118, n. 3-4, p. 227-234, 2003.

Protocolado em: 12 dez. 2007. Aceito em: 23 mar. 2009.