

**Determinação de resíduos do antibiótico cloxacilina em leite de vacas com elevada contagem de células somáticas**  
**Determination of cloxacillin antibiotic residues in cow milk with high somatic cells counts**

Marcio Manhães Folly<sup>1</sup>; Patrícia Mansur Uébe<sup>1</sup>; Gina Nunes Teixeira<sup>1</sup>; Sheyla Sant' Anna Lessa<sup>1</sup>; Lanamar de Almeida Carlos<sup>2</sup>; Meire Lelis Leal Martins<sup>2</sup>

**Resumo**

A presença de resíduos do antibiótico cloxacilina em 200 amostras de leite provenientes de uma fazenda no município de Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil, foi investigada utilizando os métodos de inibição microbiana (Delvotest), imuno-enzimático (Snap-Test) e a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O antibiótico cloxacilina foi administrado em um dos quartos mamários de 10 vacas mestiças. Os quartos foram selecionados de acordo com o alto grau de células somáticas no leite correspondente, ou seja, acima ou igual a  $3,0 \times 10^6$  células/mL. O período de persistência do resíduo do antibiótico foi avaliado 24h, 48h, 72h e 96h após a última aplicação do antibiótico. Paralelamente, foram realizadas a avaliação da contagem de células somáticas (CCS), a identificação e o perfil antimicrobiano dos microrganismos causadores da mastite subclínica antes e após o tratamento com o antibiótico cloxacilina. Os valores de CCS aumentaram nos quartos tratados 24h após a administração intramamária. No intervalo de tempo de 24h e 48h após a última aplicação, os 10 animais (100%) eliminaram resíduos de cloxacilina no leite. Já no intervalo de tempo de 72h, quatro animais (40%) eliminaram resíduos através do leite. Em dois animais tratados, houve passagem de resíduos de cloxacilina do quarto tratado para o não-tratado 24 h após o último tratamento. De acordo com os resultados encontrados, concluiu-se que o leite de vacas tratadas com o antibiótico cloxacilina pode conter resíduos deste antibiótico até 72h após o fim do tratamento. Além disso, pode haver passagem deste antibiótico de um quarto tratado para um outro não tratado.

Palavras-chave: leite, cloxacilina, células somáticas, HPLC, mastite.

<sup>1</sup> Laboratório de Sanidade Animal, Universidade Estadual do Norte Fluminense - CCTA, Av. Alberto Lamego, 2000 CEP 28013-600 Campos dos Goytacazes – RJ. Email: [follyma@uenf.br](mailto:follyma@uenf.br).

<sup>2</sup> Laboratório de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual do Norte Fluminense – CCTA.

### **Abstract**

The presence of the Cloxacillin antibiotic in 200 bovine milk samples from a farm in Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil, was investigated utilizing the methods of microbial inhibition (Delvotest), immune enzymatic (Snap Test) and High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). The cloxacillin antibiotic was administrated in one of the quarters mammary of the 10 animals that were chosen according to the amount of the somatic cells in the milk ( $>3.0 \times 10^6$  cells/mL). The evaluation of the residues was performed before the treatment and after a period of 24, 48, 72 and 96 hours. At the same time were carried out the count of the Somatic Cells (SCC), California Mastitis Test (CMT), identification of the microorganisms and the sensibility to the antibiotics. The SCC values in the treated quarter increased after 24 h of the intrammary application. At time interval of 24 h and 48h after the application, ten animals (100%) eliminated cloxacillin residues in milk. In addition, after 72h, four animals (40%) eliminated residues in milk. In two animals was observed a cloxacillin transport from the treated quarter to the untreated quarter after 24 h of the last treatment. According to the results found, it was concluded that the milk from cows treated with cloxacillin can contain residues of this antibiotic until 72h after the last treatment. In addition there is a possibility to detect antibiotic residues in the untreated quarter during the treatment of mastitis in cows.

Key Words: milk, Somatic cells, Cloxacillin, antibiotic residues, HPLC, mastitis

### **Resumen**

La presencia de residuos del antibiótico Cloxacilina en 200 muestras de leche procedientes de una propiedad en la ciudad de Campos dos Goytacazes, RJ – Brasil, fue investigada usando los métodos de inhibición microbiana (DELVOTEST), inmunoenzimático (SNAP-TEST) y la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). El antibiótico Cloxacilina fue aplicado en uno de los cuartos mamarios de 10 vacas mestizas. Los cuartos fueron elegidos de acuerdo con el grado de células somáticas, o sea, mayor o igual a  $3,0 \times 10^6$  células/ml. El período de persistencia de residuos del antibiótico fue evaluado 24h, 48h, 72h y 96h después de la

última aplicación del antibiótico. Al mismo tiempo, fue evaluado el número de células somáticas (CCS), la identificación y el perfil antimicrobiano de los microorganismos que causan las mastitis subclínica antes y después del tratamiento con el antibiótico cloxacilina. Los valores de la CCS aumentaron en los cuartos con tratamiento 24 hs después de la aplicación intramamaria. En el intervalo de tiempo de 24h y 48h después de la última aplicación, los 10 animales (100%) eliminaron residuos de cloxacilina en la leche. Ya en el intervalo de tiempo de 72h, cuatro animales (40%) eliminaron residuos a través de la leche. En dos animales medicados, hubo pasaje de residuos de Cloxacilina del cuarto con tratamiento para el que no tubo tratamiento 24h después del último tratamiento. De acuerdo con los resultados encontrados, se concluye que la leche de vacas medicadas con el antibiótico cloxacilina puede contener residuos deste antibiótico hasta 72h después del final del tratamiento. Además, puede haver pasaje deste antibiótico de un cuarto medicado para otro no medicado.

Palabras clave: leche, cloxacilina, células somáticas, mastiti, HPLC

## **Introdução**

A presença de resíduos de antibiótico no leite pode ser conseqüência do tratamento de infecções no úbere, da incorporação do antibiótico à alimentação animal como suplemento dietético ou ainda pela adulteração do leite com o objetivo de prolongar a sua vida útil<sup>1,2</sup>. Os riscos à saúde do consumidor devido à presença de resíduos de antibióticos no leite estão relacionados principalmente com o desencadeamento de fenômenos alérgicos em indivíduos sensíveis, com os efeitos tóxicos e carcinogênicos, com alterações no

equilíbrio da flora intestinal e com a seleção de bactérias resistentes no trato digestivo dos consumidores<sup>3,4</sup>. O leite contaminado por resíduos de antibiótico pode criar, ainda, problemas críticos para a indústria de laticínios, interferindo, principalmente, nos processos de fermentação, onde se utilizam culturas acidoláticas para a produção de queijos, iogurtes e manteigas<sup>5</sup>.

Em relação à permanência no leite dos antibióticos administrados, foi demonstrado que varia com o

produto e depende de vários fatores como a dose, via de administração, excipiente utilizado, solubilidade, entre outros<sup>2</sup>.

A cloxacilina é um antibiótico do grupo dos  $\beta$ -lactâmicos muito utilizado no tratamento de mamites bovinas devido ao espectro antimicrobiano, tanto para as bactérias Gram positivas como para as negativas. Vários testes são utilizados para detectar a ocorrência deste antibiótico no leite, como os imuno-enzimáticos, os microbiológicos e os cromatográficos<sup>6,7</sup>. Os testes microbiológicos podem detectar até 10ppb e, devido ao seu baixo custo, são os mais utilizados. Todavia, estes testes podem dar resultados falsos positivos, necessitando de testes adicionais confirmatórios, usando técnicas analíticas alternativas como as de cromatografia líquida de alta eficiência<sup>8</sup>.

Neste trabalho foi investigada a presença de resíduos do antibiótico cloxacilina no leite, após o tratamento de um quarto

mamário de vacas com mastites subclínicas. Os métodos utilizados foram os de inibição microbiana, imuno-enzimático e cromatográfico (HPLC).

### **Material e métodos**

Foram utilizadas 10 vacas mestiças, com diferentes faixas etárias, provenientes de uma propriedade do município de Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil. Os animais apresentaram um quadro de mastite subclínica em um quarto mamário, detectado através do método “California mastitis Test” (CMT) e confirmado pela contagem de células somáticas acima de  $3,0 \times 10^6$  células/mL.

Depois de diagnosticada a mastite subclínica, os animais receberam, cada um, três doses do antibiótico cloxacilina, formulação intramamária, durante três dias. As aplicações foram feitas após a ordenha da manhã e a dose aplicada foi de 10 mL, por via intramamária, em um dos quartos contendo uma taxa de células somáticas superior a  $3,0 \times 10^6$  células/mL. Amostras de leite (200

mL de cada quarto) foram coletadas dos quartos mamários destes animais antes do tratamento com o antibiótico cloxacilina e nos intervalos de tempo de 24h, 48h, 72h e 96h após o término do tratamento.

As amostras foram avaliadas quanto à persistência de resíduos do antibiótico cloxacilina após o fim do tratamento e quanto à passagem do antibiótico aplicado de um quarto para os outros. A contagem de células somáticas, tanto no leite proveniente de quartos tratados, quanto dos não tratados foi realizada. Além disso, a análise microbiológica do leite antes e após o tratamento também foi efetuada.

A detecção do antibiótico aplicado foi realizada utilizando os testes de inibição microbiana Delvotest P (Gist Brocades, King of Prússia) e imuno-enzimático (BL Snap Test, Idexx Laboratories, EEUU). Os procedimentos adotados foram aqueles preconizados pelos fabricantes.

A quantificação de cloxacilina foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em cromatógrafo da marca SHIMADZU, equipado com uma bomba modelo 10AT e detector ultra-violeta Diode Array SPD-M10A. As condições cromatográficas foram as seguintes: coluna C18 – BIO RAD (ID 4,6 mm x 150mm), loop de 100 µL, comprimento de onda 210nm, fluxo de 1mL.Min<sup>-1</sup>, fase móvel fosfato monobásico de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0,0080 mol/L em ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 0,020 mol/L na bomba A (62%) e acetonitrila 0,020 mol/L na bomba B (38%), de acordo com adaptações da metodologia utilizada por Moats & Harik-Khan, (1995)<sup>9</sup>.

O preparo das amostras para CLAE foi realizado colocando 10 mL da amostra de leite em erlernmeyer de 125 mL e, em seguida, adicionando 2 mL de solução de cloreto de tetrametil amônio (C<sub>4</sub>H<sub>12</sub>NCl) 0,2 mol/L. Posteriormente, 38 mL de acetonitrila foram gradualmente adicionados ao conteúdo do erlernmeyer sob agitação, e esta solução foi deixada em repouso. Após 10 minutos, o sobrenadante foi

filtrado utilizando lã de vidro, colocado sobre o fundo de um funil, e em seguida, 40 mL do filtrado foi pipetado e evaporado sob vácuo a 40-50°C até que o volume final fosse de 2 a 3 mL. O volume foi elevado para 5 mL com água milli-Q e, em seguida, a solução foi filtrada utilizando um filtro Minisart RC 0,45 µm, da marca Sartorius.

A contagem de células somáticas (CCS) foi realizada pelo aparelho Somacount 150 – Contador Eletrônico de Células por Fluorescência – Bentley Instruments, E.E.U.U.

Para o isolamento e identificação bacteriana das amostras de leite, 5mL foram coletados e encaminhados ao laboratório. As amostras foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 h. Em seguida, foram repicadas em meios de cultura específicos – ágar Sangue, Chapman, MacConkey e Saboraud –, sendo colocadas em estufa a 37°C, por 24 a 48h, para observação de crescimento bacteriano. Nas placas onde

ocorreram crescimento, foi realizada a coloração de Gram para verificar os aspectos tintoriais e morfológicos das bactérias. Foram realizadas as provas bioquímicas específicas para cada grupo de bactérias – Gram positivas ou Gram negativas.

### **Resultados e discussão**

Na Tabela 1 estão apresentados os valores da CCS nos quartos de animais tratados com cloxacilina em função do período de administração. De acordo com os resultados encontrados, houve grande variabilidade na CCS dos quartos tratados até 96h após a última aplicação do antibiótico cloxacilina.

Antes do tratamento, cinco quartos de animais (1,2,8,9 e 10) apresentaram CCS acima de  $3,0 \times 10^6$  células/mL. Com exceção do quarto 9, todos os outros mantiveram elevada contagem de células somáticas até 72h após o fim do tratamento. Os quartos dos animais 3, 4, 5, 6 e 7 apresentaram valores de CCS menor que  $3,0 \times 10^6$  células/mL antes do tratamento com

o antibiótico. Após 96h do fim do tratamento, os quartos 3 e 6 apresentaram valores de CCS superiores a  $3,0 \times 10^6$  células/mL, enquanto os valores dos quartos 4, 5 e 7 decresceram consideravelmente após 96 horas do tratamento.

Finalmente, apesar do quarto do animal 10 apresentar valores para CCS maiores que  $3,0 \times 10^6$  células/mL antes do tratamento, e diminuir consideravelmente após 96h, tal resultado não pode ser considerado como ausência de mastite subclínica. Estes resultados podem ser, provavelmente, devido à irritação do veículo do produto à glândula mamária produzindo, assim, um trauma local e levando a uma reação inflamatória, podendo aumentar as células somáticas no leite. Todavia Brito *et al.* (1998)<sup>10</sup> citam que uma das principais causas do aumento de CCS no leite é a infecção mamária.

Neste estudo, foi isolada a bactéria *Staphylococcus sp* dos quartos dos animais antes do

tratamento com o antibiótico. Os quartos 1, 2, 8 e 10 foram classificados como *Staphylococcus coagulase (+)* e os quartos 3, 4, 5, 6, 7 e 9 como *Staphylococcus coagulase (-)*. Apesar dos altos valores de CCS acima de  $3,0 \times 10^6$  céls/mL observados em três quartos de animais após o fim do tratamento, não houve crescimento bacteriano. A ocorrência da mastite subclínica provocada por cepas de *Staphylococcus coagulase (+)* e por cepas de *Staphylococcus coagulase (-)* foi detectada em animais da região onde este estudo foi realizado.

O período de persistência da cloxacilina no leite foi avaliado por meio de três métodos diferentes (Quadro 1). De acordo com os resultados encontrados, 100% das vacas eliminaram resíduos de antibiótico no leite após 24h e 48h do tratamento. Após 72h da administração da cloxacilina, 40% das vacas ainda continuaram a eliminar resíduos deste antibiótico no leite. De acordo com Costa (1996)<sup>11</sup>, a cloxacilina pode ser detectada no leite de quartos

infectados e normais até 48 a 64 horas após o tratamento.

O tempo recomendado para descarte do leite diante da utilização de um produto contendo cloxacilina é de 48 horas. Desta maneira, as infusões intramamárias com cloxacilina podem exceder o período de carência recomendado.

No presente estudo, apesar da recomendação dos fabricantes de descartar o leite até 48 horas após o último tratamento intramamário com cloxacilina, ressalta-se o fato de o resíduo ter persistido por 72 horas em 40% das amostras de leite, avaliadas pelo Delvotest, Snap-test e CLAE.

A passagem do antibiótico do quarto tratado para o não-tratado foi observada em dois animais. No animal 1, o quarto tratado foi o anterior direito, no qual foi detectado resíduo de cloxacilina até 48h após a sua aplicação. Entretanto, houve passagem do antibiótico para o quarto posterior direito após 24h do término da sua

aplicação. Além disso, no animal 6, também foi verificada a passagem do quarto tratado anterior direito para o não-tratado posterior direito após 24h do término da aplicação da cloxacilina. Pérez *et al.* (1997)<sup>12</sup> relataram que a cloxacilina não se apresenta em forma dissociada no leite normal, sem mastite, devido ao pH ser em torno de 6,8. Este fato faz com que a droga não atravesse a membrana celular, levando a uma absorção lenta, o que ocasiona concentrações baixas no sangue e no tecido mamário. Todavia, neste estudo, foi observado que quartos não tratados também podem apresentar resíduos de cloxacilina, sugerindo uma passagem via corrente sangüínea ou tecidual.

No Brasil, o uso de substâncias na conservação do leite é proibido pelo artigo 514, parágrafo único (RIISPOA, 1962)<sup>13</sup>, e também é regularizada pela Norma 51 de 2001<sup>14</sup> do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Os resíduos de cloxacilina no leite das vacas tratadas com este antibiótico foram avaliados através

da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. De acordo com os resultados encontrados (Quadro 2) as vacas 03, 04, 06 e 08 (40%) eliminaram resíduos de cloxacilina no leite até 72h após a administração da droga, concordando com os outros testes utilizados. Os ácidos fracos, como sulfonamidas, penicilinas e cefalosporinas, tendem a alcançar baixos níveis na glândula mamária quando administrados sistemicamente, e quando administrados por via intramamária tendem a se difundir rapidamente para a circulação sanguínea. No entanto, quando ocorre o desenvolvimento da mastite, o pH do quarto tende a ficar mais próximo daquele do sangue, o que reduz a difusão da droga para dentro da glândula mamária. Esse fato poderia explicar o resultado obtido no presente trabalho, em que foram verificadas maiores concentrações de resíduos de cloxacilina no leite proveniente dos animais 02, 03, 04 e 08, cujos quartos antes do tratamento, apresentavam valores elevados de CCS.

## **Conclusões**

O tempo de carência recomendado deve ser após 72h do fim do tratamento utilizando cloxacilina, por via intramamária, para evitar a presença de resíduo de cloxacilina no leite. É possível haver passagem de antibióticos de um quarto tratado para o outro não tratado, persistindo até 24h após o fim do tratamento. Pode ocorrer aumento de células somáticas após o tratamento com o antibiótico, sem crescimento bacteriano.

**Tabela 1:** Resultados da Contagem de Células Somáticas (CCS) nos quartos de 10 vacas em lactação tratadas com cloxacilina.

Quarto	T0 (CCS <sup>a</sup> )	24h(CCS <sup>a</sup> )	48(CCS <sup>a</sup> )	72h(CCS <sup>a</sup> )	96h(CC S <sup>a</sup> )
01	9.999	9.999	9.999	9.383	9.999
02	4.952	6.059	7.025	8.446	1.733
03	1.572	5.489	9.799	6.769	5.659
04	2.709	927	184	153	225
05	2.507	2.187	283	497	616
06	511	9.999	7.344	8.851	5.968
07	2.725	9.999	2.646	590	488
08	3.034	4.353	3.175	5.159	2.020
09	6.514	903	1.026	461	404
10	9.999	9.999	9.037	3.914	2.192

<sup>a</sup>( x 1.000 células/mL)

**QUADRO 1:** Período de eliminação de resíduos de cloxacilina em 10 quartos de vacas em lactação com mastite subclínica, após a aplicação intramamária.

Intervalo de tempo <sup>1</sup>	24h	48h	72h	96h
	N %	N %	N %	N %
DELVOTES T	10 (100)	10 (100)	04 (40)	0 (0)
SNAP TEST	10 (100)	10 (100)	04 (40)	0 (0)
CLAE	10 (100)	10 (100)	04 (40)	0 (0)

<sup>1</sup> = avaliação após a última aplicação de cloxacilina

N = número de animais tratados que apresentam resíduos

% = porcentagem de animais tratados que apresentam resíduos

**Quadro 2:** Resíduos de cloxacilina ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) nos quartos de 10 vacas leiteiras quantificados pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) até 96h após o fim do tratamento.

<b>ANIMAIS</b>	<b>T0</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>	<b>96h</b>
<b>Vaca 01</b>	0	5.1205	4.2092	0	0
<b>Vaca 02</b>	0	7.4262	4.0409	0	0
<b>Vaca 03</b>	0	7.3117	4.8223	4.4676	0
<b>Vaca 04</b>	0	11.7946	4.2278	4.2247	0
<b>Vaca 05</b>	0	5.2732	4.1073	0	0
<b>Vaca 06</b>	0	5.2489	4.5327	4.3275	0
<b>Vaca 07</b>	0	5.7432	4.2374	0	0
<b>Vaca 08</b>	0	7.3112	5.6973	4.4398	0
<b>Vaca 09</b>	0	5.8432	4.6359	0	0
<b>Vaca 10</b>	0	4.8739	4.3576	0	0
<b>Total</b>	0	65.9457	44.8684	17.6680	0
<b>Média</b>	0	6.5946	4.4868	1.7668	0

### Referências bibliográficas

1. CULLOR, J.S. Antibiotics residues tests for mammary gland secretions: procedure for mastitis control. **The Veterinary Clinics of North America: Food and Animal Practice**, v.93, p.609-20, 1993.
2. NASCIMENTO, G.G.F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M.S.P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. **Ver Nut**, v. 14, p. 24-35, 2001.
3. YAMANI, M.I.; AL-KURD, M.A.; HADDADIN, M.S.Y.; ROBINSON, R.K. A simple test for the detection of antibiotics and other chemical residues in ex-farma milk. **Food Control**, v.10, p. 35-39. 1999.
4. CACCIATORE, G.; PETZ, M.; RACHID, S.; HAKENBECK, R.; BERGWERFF, A.A. Development of an optical biosensor assay for detection of  $\beta$ -lactan antibiotics in milk using the penicillin-binding protein 2X. **Anal. Chim. Acta**, v.520, p.105-115, 2004.
5. STRASSER, A.; DIETRICH, R.; USLEBER, E.; MARTLBAUER, E. Immunochemical rapid test for multiresidue analysis of antimicrobial drugs in milk using monoclonal antibodies and hapten-glucose oxidase conjugates. **Anal Chim Acta**, v.495, p.11-19, 2003.

6. AURELI, P.; FERRINI, A.M.; MANNONI, V. Presumptive identification of sulphonamide and antibiotic residues in milk by microbial inhibitor tests. **Food Control**, v.7, p.165-168,1996.
7. BECKER, M.; ZITTLAU, E.; PETZ, M. Residue analysis of 15 penicillins and cephalosporins in bovine muscle, kidney and milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Anal. Chim. Acta**, v. 520, p.19-32, 2004.
8. CULLOR, J.S.; VAN EENENNAAM, A.L.; GARDNER, I.; PERANI, L.; DELLINGER, J.; SMITH, W.L.; THOMPSON, T.; PAYNE, M.A.; JENSEN, L.; GUTERBOCK, W.M. Performance of various testes used to screen antibiotic residues in milk sample from individuals animals. **Journal of AOAC International**, v. 77, n. 4, p.862-870, 1994.
9. MOATS, W.A.; HARIK-KHAN, R. Liquid chromatographic determination of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk: a multiresidue approach. **Journal of AOAC International**, v. 78, p.49-54, 1995.
10. BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F. O efeito da mastite no leite. In: BRITO, J.R.F.; DIAS, J.C. **A qualidade do leite**, Juiz de Fora: EMBRAPA, 1998. p.83-90.
11. COSTA, E. O. Resíduos de antibióticos no leite: um risco à saúde do consumidor. **Higiene Alimentar**, v.10, n 44, p. 15-17, 1996.
12. PÉREZ, B.; PRATS, C.; CASTELLS, E.; ARBOIX, M. Determination of Cloxacillin in milk and blood of dairy cows by High-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v.698, p. 155-160, 1997.
13. BRASIL. RIISPOA: Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Ministério da Agricultura – Decreto no.30.691, de 29-3-52, alterado pelo Decreto no. 1.255 de 25-6-62, art 510 § 8.º p.89, 1962.
14. BRASIL, Instrução Normativa nº. 51, de 18 de setembro de 2001. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, Seção 1, n.183, p.13-22, 2001.

Recebido em: Junho de 2008

Aceito em: Junho de 2008

Publicado em: Abril / Maio / Junho de 2008