

Avaliação do efeito prebiótico da farinha da banana verde (*Musa paradisiaca* L.) no crescimento populacional de lactobacilos presentes no trato gastrointestinal de *Rattus norvegicus*

ISSN
1809-9475

Evaluation of the effect prebiótico flour of green banana (*Musa paradisiaca* L.) in population growth of lactobacilli present in the gastrointestinal tract of *Rattus norvegicus*

Artigo
Original

Original
Paper

Jéssica Soares Oliveira¹
Carlos Alberto Sanches Pereira²

Recebido em
11/2012

Aprovado em
04/2013

Palavras-chave:

Banana verde
Prebiótico
Lactobacilos

Resumo

A população busca cada vez mais alimentos funcionais. Esses alimentos contendo prebióticos servem para enriquecer a dieta com substâncias capazes de favorecer a microbiota intestinal. Assim, a banana verde foi usada para a suplementação na alimentação de *Rattus norvegicus*, no qual também foi feito a pesagem da ração diariamente e dos animais semanalmente para a análise de conversão alimentar e ganho de peso. Foram utilizados 30 animais, divididos em 3 grupos de 10 indivíduos, sendo que, no primeiro grupo (controle), foi administrado apenas água e ração, o segundo grupo foi suplementado diariamente com um preparado da farinha da casca da banana verde e o terceiro grupo também foi suplementado com um preparado da farinha da polpa da banana verde. Estes foram avaliados durante 6 semanas, quando de 7 em 7 dias foi feita a coleta das fezes frescas e analisada a quantidade de lactobacilos, buscando assim, avaliar sua capacidade prebiótica. Após o término do experimento, não se observou resultados significativos nos animais tratados com farinha da casca e da polpa da banana verde quando comparado ao controle, também não foi evidenciado alterações no aumento da conversão alimentar e mudanças no ganho de peso.

Abstract

*The population search increasingly functional food. These foods contain prebiotics that serve to enrich the diet with substances which are capable of encouraging the intestinal microbiota. So, the green banana was used for supplementation in feed from *Rattus norvegicus*, in what was also made the daily ration weighing and the weekly weighing of animals for analysis of feed conversion and weight gain. A total of 30 animals divided in 3 groups of 10 subjects, and in the first group (control) was given only water and ration, the second group was supplemented daily with a preparation of flour of green banana peel and the third group was supplemented daily with a preparation of flour of green banana pulp. These were evaluated during 6 weeks, and into 7 in 7 days was made fresh faeces collection and analyzed the amount of Lactobacilli, seeking to assess its capacity prebiotic. After the end of the experiment, significant results were not observed in animals treated with flour of Green banana peel and pulp when compared to the control, was not observed changes in increasing feed conversion or changes in weight gain.*

Key words:

Green Banana
Prebiotics
Lactobacilli

¹ Discente do curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Volta Redonda – UNIFOA

² Doutor, Docente do Centro Universitário de Volta Redonda - UNIFOA

1. Introdução

A busca por alimentos funcionais e por uma vida saudável tem aumentado nos últimos anos. Estes alimentos, conhecidos como prebióticos, servem para enriquecer a dieta com substâncias capazes de prevenir o envelhecimento precoce, ajudar no funcionamento do intestino e reduzir a absorção de gorduras pelo organismo. É comum encontrar, em estabelecimentos, produtos como rações, farinhas industrializadas e suplementos vitamínicos com micro-organismos, por exemplo, os lactobacilos que são importantes para o bom funcionamento do sistema digestório e imunológico, trazendo assim, benefícios para a microbiota entérica (FERREIRA, 2012).

A banana é uma fruta rica em amido Resistente (AR), que consiste em uma fração do amido que não permite fornecer glicose para o organismo e resiste a uma digestão enzimática no intestino delgado, podendo ser fermentado no cólon pela microbiota bacteriana e produzir principalmente gás e ácidos graxos de cadeia curta. Devido a estas características, os efeitos de AR são comparáveis aos de fibra dietética, encontrada nos prebióticos (CHAMP; FAISANT, 1996).

Entre as funções dos alimentos prebióticos, podem ser citadas algumas relacionadas a uma atuação direta como: aumento do tempo de esvaziamento do estômago; modulação do trânsito do trato gastrointestinal; diminuição de colesterol via adsorção de ácidos biliares e por meio de atuação indireta, modulando a fermentação microbiana pelo estímulo de bactérias bífidas responsáveis por aumento de ácidos graxos de cadeia curta, diminuição de pH e diminuição na absorção da amônia (BORTOLOZO; QUADROS, 2007).

O crescimento de algumas bactérias benéficas para o organismo, como os lactobacilos e as bifidobactérias, pode ser estimulado através da ingestão de prebióticos. Os micro-organismos pertencentes ao gênero *Lactobacillus* são caracterizados como gram-positivos, não formadores de esporos, de estrutura bacilar e cocobacilar, desprovidos de flagelos, catalase negativos e aerotolerantes ou anaeróbios (GOMES; MALCATA, 1999; HOLT *et al.*, 2000). São capazes de fermentar carboidratos produzindo ácido lático, caracterizando-se

como homo ou heterofermentadores (HOLT *et al.*, 2000).

As espécies de *Lactobacillus* são mais efetivas do que muitas outras bactérias para sobreviver à passagem através do trato intestinal para efetivamente colonizar o trato digestivo e balancear a microbiota intestinal. O *Lactobacillus* provou resistir ao ácido gástrico e bile, adere à mucosa do intestino, coloniza o trato gastrointestinal e “luta” contra patógenos potenciais, tais como: *E. coli*, *Streptococcus*, *Clostridium* e *Salmonella*, entre outros (MARTINEZ, 2007).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito prebiótico da farinha de banana verde (*Musa paradisiaca* L) no aumento da população de lactobacilos no trato gastrointestinal de *Rattus norvegicus*.

2. Material e Métodos

2.1. Produção da farinha da polpa e da casca de banana verde

Os frutos ainda inteiros foram lavados com água e sabão, separados e selecionados. Com os frutos já selecionados, os mesmos foram colocados em água a 85°C por 10 minutos, o que facilitou a separação da casca e polpa. Após esse processo, foi feita a separação da casca e da polpa e estes foram picados em cortes longitudinais e colocados em bandeja de aço inox, em , foram desidratados em estufa de circulação de ar a 55°C, por 72 horas. Os pedaços de banana foram então triturados em pedaços menores, batidos em liquidificador industrial e, em seguida, moídos em moinho de facas e passado por peneira de 30 “mesh” (1,8 mm) (BORGES *et al.*, 2009).

As farinhas prontas foram armazenadas em potes em temperatura ambiente e no momento da suplementação dos ratos, foram preparadas misturas das respectivas farinhas com água, numa concentração de 10% (SOUZA *et al.*, 2009).

2.2. Delineamento experimental

Este experimento teve a duração de 60 dias, quando foram utilizados trinta animais da espécie *Rattus norvegicus* machos, com quatro semanas de idade. Os animais foram

mantidos individualmente em gaiolas plásticas com serragem, a temperatura ambiente, recebendo água e ração balanceadas diariamente.

Os animais foram divididos em três grupos (A, B e C), com dez indivíduos em cada grupo, sendo que todos os grupos receberam ração e água e foram tratados da seguinte forma:

- Grupo A: Somente ração e água, diariamente (controle negativo).
- Grupo B: Animais que receberam ração, água e 1 mL, diariamente, do preparado da farinha da casca da banana verde.
- Grupo C: Animais que receberam ração, água e 1 mL, diariamente, do preparado da farinha da polpa da banana verde.

As preparações foram administradas oralmente aos animais com auxílio de pipetas descartáveis.

2.3. Métodos analíticos

Os animais foram alimentados individualmente, diariamente com 30 g de ração. A cada 24 horas, foi pesada a ração residual no comedouro, e por diferença foi determinado o consumo diário de ração de cada animal. Os animais também foram pesados diariamente para se determinar o ganho de peso e, por conseguinte, calcular a taxa de conversão alimentar (PEREIRA, 2007).

Para a coleta das fezes, foi realizada massagem abdominal nos animais, esta os estimulou a defecar, permitindo assim a coleta de fezes frescas para a contagem de lactobacilos.

A análise para caracterizar o gênero dos *Lactobacillus* e para determinar a sua população, foi realizada uma vez por semana, utilizando fezes frescas.

Conforme Pereira (2007), para determinação da população de lactobacilos nas fezes, foi utilizado 1,56 g de fezes frescas e as mesmas foram colocadas em tubos de ensaio (20 mL) esterilizado, juntamente com 14,6 mL de tampão fosfato, em que os mesmos foram homogeneizados e a partir destes, realizadas diluições decimais. Assim, 1 mL das amostras diluídas, foram colocadas em placas de Petri esterilizadas, sendo imediatamente adicionado o meio seletivo MRS – De Man, Rogosa e Sharpe e homogeneizado para posteriormente serem mantidas a 37°C por 48 horas. Após esse período, as colônias foram contadas, permitindo assim a expressão do resultado em log UFC/g de fezes.

Após o crescimento, as colônias características foram submetidas à coloração de Gram e ao teste da catalase para a distinção e caracterização, sendo gram-positivo e catalase negativo todas que foram identificadas.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animal (CEUA) do Centro Universitário de Volta Redonda, Volta Redonda, protocolo 109327/2012.

3. Resultados e Discussão

Ao término de seis semanas de experimento, não foram observadas diferenças significativas entre os animais tratados com a farinha da casca e com a farinha da polpa da banana verde e o controle (ANOVA $p > 0,05$). Os valores obtidos para a contagem das colônias de lactobacilos, proveniente das fezes dos ratos nos três tratamentos, foram de certa forma semelhantes e decrescentes até a quinta semana do estudo (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores de lactobacilos em Log₁₀ UFC/g nas fezes dos animais.

COLETA	SEMANAS					
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a
CONTROLE	13,38	12,84	11,11	10,63	8,76	10,04
CASCA	13,65	12,89	11,27	10,58	8,78	10,11
POLPA	14,22	10,27	11,74	10,81	9,22	10,15

Os resultados positivos sobre o desempenho animal com adição de compostos de ação prebiótica às dietas nem sempre são evidenciados. Farnworth *et al.* (1992) e Orban *et al.* (1997) observaram que a adição de farinha de alcachofra de Jerusalém, frutooligossacarídeos ou sacarose caramelada não surtiram efeito sobre o desempenho de suínos. Essa ausência de efeitos pode estar relacionada com o tipo de ingredientes que compõe a dieta, com a adaptação da microbiota ao composto adicionado ou com o nível de estresse do animal.

Segundo resultados obtidos por Farnworth *et al.* (1992), Gabert *et al.* (1994) e Orban *et al.* (1997) em experimento com leitões, e os obtidos por Fairchild *et al.* (1999) em experimentos com perus, demonstram que nem sempre a ingestão de compostos com potencial ação prebiótica causa mudanças na microbiota e no pH do TGI. Esse fato pode estar relacionado às diferenças de composição da microbiota entre as espécies animais, às diferenças na estrutura química e propriedades físico-químicas ou à variação na percentagem de compostos prebióticos presentes ou adicionados à dieta.

A maior percentagem das dietas animais é composta por ingredientes derivados de grãos de cereais (ex. milho, trigo, cevada, etc) e oleaginosas (ex. grãos de soja, farelo de soja, etc), os quais apresentam níveis variados de polisacarídeos não amiláceos (PNAs) e ONDs na sua composição química. Considerando que ambos os grupos são formados por compostos indigestíveis, mas potencialmente fermentáveis pela microbiota intestinal, supõe-se que a falta de resposta em relação à adição de um determinado prebiótico pode estar vinculada a um efeito "diluidor" dos PNAs e ONDs derivados dos próprios ingredientes. Muitas vezes, os níveis destes compostos nos grãos e nos seus subprodutos (trigo, milho, farelo de trigo, farelo de aveia, farelo de soja) são bem superiores aos adicionados na dieta como prebióticos (0,05 a 3%) (SILVA; NÖRNBERG, 2003).

Macfarlane e Cummings (1999) observaram que a adição de prebióticos às dietas varia de 0,1 a 5% o que, provavelmente, também influencia no tipo de resposta obtida. Eventuais subdoses podem causar efeito limitado ou nulo sobre a microbiota. Já uma superdoses pode provocar um desequilíbrio sobre as populações microbianas.

O nível de estresse do animal também pode influenciar sobre a resposta biológica obtida pela adição de prebióticos à dieta. Se os animais estejam em condições não estressantes, supõe-se que a microbiota esteja em condição de equilíbrio, ou seja, com ou sem o fornecimento de prebióticos as respostas obtidas serão muito semelhantes (MATHEW *et al.*, 1993; MOSENTHIN; BAUER, 2000).

Outro fator a ser considerado é que os compostos mais usados atualmente como prebióticos não são tão seletivos, isto é, eles não são fermentados somente por bifidobactérias e/ou lactobacillus, mas também por populações potencialmente patogênicas (MITSUOKA, 1992; MOSENTHIN; BAUER, 2000), o que diminui o seu efeito benéfico.

Um estudo similar Amaro (2012) verificou resultado significativo para essas bactérias, empregando o mesmo procedimento, porém analisando o crescimento de bifidobactérias.

O efeito benéfico de prebióticos tem sido proposto como frutooligossacarídeo (FOS) e inulina está associado a sua seletividade pelas bifidobactérias, o que as permite ser mais bem sucedida na competição por substratos, estimulando a capacidade das bifidobactérias de mudar o ambiente do cólon através da inibição de bactérias prejudiciais, através da formação de bacteriocinas, da competição de sucesso para substratos e locais de adesão sobre o epitélio do intestino (KAUR; GUPTA, 2002). Evidenciando assim o provável efeito bifidogênico destes substratos que estão contidos na polpa da banana.

Outras explicações para as distintas respostas obtidas na utilização de compostos de potencial ação prebiótica, podem estar relacionadas com as condições do lúmen e/ou das paredes intestinais do hospedeiro, bem como, com a presença de bactérias degradadoras dos compostos testados como prebióticos nos diferentes compartimentos do TGI (MOSENTHIN; BAUER, 2000; VAN LAERE, 2000).

Outros estudos utilizando prebióticos na suplementação de animais demonstraram resultados positivos, porém, em sua maioria com animais de grande produção para consumo (como galinhas e porcos), e todos sendo comparados com aditivos de crescimento, como é o caso dos antibióticos (SANCHES *et al.*, 2006; JUNQUEIRA *et al.*, 2009).

3.1. Consumo de ração e ganho de peso

A tabela 2 apresenta os resultados do consumo de ração, ganho de peso e da conversão alimentar dos animais tratados e do grupo controle.

Tabela 2 - Médias (\pm D. P.) de consumo total de ração, ganho de peso e conversão alimentar ao final do experimento.

Grupos experimentais	Consumo total de ração (g)	Ganho de peso corporal (g)	Conversão alimentar (g/g)
A (Controle)	931 \pm 3,19	112 \pm 8,18	8,31
B (Casa)	948 \pm 4,05	115 \pm 6,97	8,24
C (Polpa)	973 \pm 2,93	119 \pm 8,18	8,18

Foram analisadas as médias semanais do consumo de ração dos ratos de cada grupo, onde foi evidenciado que em média os ratos do grupo C apresentaram maior consumo de ração do que os demais grupos, porém, essas diferenças não foram significativas, segundo os testes de ANOVA e BONFERRONI sendo $p > 0,05$. Paz *et al.* (2010) realizaram estudo com demonstrou resultado similar para frangos de corte, onde foi utilizado prebiótico, porém, associado a ácidos fumárico e propiônico na alimentação dos frangos, não ocorrendo uma melhora significativa no consumo de ração comparado ao grupo controle.

Os ratos dos três grupos demonstraram aumento de peso similar durante o experimento e o ganho de peso semanal também foi similar entre os três grupos.

Silva *et al.* (1997), utilizando ratos jovens e adultos, demonstraram que os ratos jovens tem crescimento maior que os adultos. Assim, a diminuição no ganho de peso pode estar relacionada com o desenvolvimento natural do animal, pois no início do trabalho eles tinham apenas quatro semanas de vida, o que lhes permitiu maior ganho de peso nas primeiras semanas.

A partir dos dados do ganho de peso e do consumo de ração, foram realizados os cálculos para conversão alimentar utilizando a Fórmula [Conversão Alimentar = Consumo de Ração Total / Ganho de Peso Total] (MONTEIRO, 2005). A conversão alimentar foi aumentando gradativamente, conforme o crescimento dos ratos.

O consumo de ração durante o experimento teve pouca diferença relacionada com a sequência do trabalho, porém, conforme os ratos foram crescendo, o ganho de peso foi diminuindo, fator este que influenciou na taxa de conversão alimentar.

Budiño *et al.* (2006) em um estudo realizado com leitões desmamados, quando foi utilizado FOS em uma de suas dietas, mostrou resultados semelhantes, não constatando resultados positivos tanto no ganho de peso quanto na conversão alimentar. Enquanto que em outro estudo, realizado com leitões Houdijk *et al.* (1999), administraram ração contendo FOS (7,5 e 15g/kg), em que observou-se redução temporária no consumo e no ganho diário de peso. Contudo, o crescimento médio de todo o período experimental não foi afetado.

Gebbink *et al.* (1999) observaram que leitões recém desmamados suplementados com FOS apresentaram ganho de peso 9% superior ao grupo controle, quando tratados em “creches” com baixo desafio sanitário. E quando tratados em “creches” com elevado desafio sanitário, os leitões que receberam FOS tiveram eficiência alimentar 14% superior ao tratamento com antibiótico e ao controle.

4. Conclusão

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que a farinha da casca e da polpa da banana verde não estimulou o aumento da população de lactobacilos no intestino, não promoveu aumento na conversão alimentar e não alterou o ganho de peso dos ratos estudados.

5. Referências Bibliográficas

- Amaro, T. **Avaliação do efeito bifidogênico da banana verde (*Musa paradisiaca*) sobre o trato gastrointestinal de *Rattus norvegicus*.** 2012. 60 f. Graduação em Ciências Biológicas. Centro Universitário de Volta Redonda, Volta Redonda, RJ.
- BORGES, *et al.* Caracterização de farinha de banana verde. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 333-339, 2009.
- BORTOLOZO, E. Q.; QUADROS, M. E. R. Aplicação de inulina e sucralose em iogurte. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 1, p. 37-47. 2007.
- BUDIÑO, F. E. L. *et al.* Efeito da adição de probiótico e/ou prebiótico em dietas de leitões desmamados sobre o desempenho, incidência de diarreia e contagem de coliformes totais. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, p. 59-67, 2006.
- CHAMP, M.; FAISANT, N. Resistant starch: Analytical and physiological aspects. **Boletim SBCTA**, v. 30, p. 37-43, 1996.
- FAIRCHILD, A. S. *et al.* Effect of hen age, Bio-Mos and Flavomycin on susceptibility of turkey poults to oral *Escherichia coli* challenge In: ALLTECH.S ANNUAL SYMPOSIUM, 15., 1999, Nottingham. **Proceedings**. Nottingham: Alltech. p. 185. 201. 1999.
- FARNWORTH, E. R. *et al.* Feeding Jerusalem artichoke flour rich in fructooligosaccharides to weanling pigs. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 72, n. 12, p. 977-980, 1992.
- FERREIRA, A. **Alimento funcional reduz colesterol, atua no intestino e no envelhecimento.** Disponível em: <<http://www.bancodesaude.com.br/user/4155/blog/arquivo/201201>> Acesso: 04/05/2012.
- GABERT, V.M. *et al.* The effect of oligosaccharides and lactitol on the ileal digestibilities of amino acids, monosaccharides and bacterial populations and metabolites in the small intestine of weanling pigs. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 75, n. 1, p. 99-107, 1994.
- GEBBINK, G. A. R. *et al.* **Effects of addition of fructooligosaccharide (FOS) and sugar beet pulp to weanling pig diets on performance, microflora and intestinal health.** Disponível em: <<http://www.ansc.purdue.edu/swine/swineday/sday99/psd09-1999.html>> Acesso em: 24/06/12.
- GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. And *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 139-157, 1999.
- HOLT, JOHN G. *et al.* **Bergey's manual of determinative bacteriology.** 9. ed. Philadelphia: Lippencott Williams & Wilkins, 2000.
- HOUDIJK, J. G. M. *et al.* Apparent ileal and total-tract nutrient digestion by pigs as affected by dietary nondigestible oligosaccharides. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 1, p. 148-158, 1999.
- JUNQUEIRA, *et al.* Uso de aditivos em rações para suínos nas fases de creche, crescimento e Terminação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 12, p. 2394-2400, 2009.
- KAUR, N.; GUPTA, A. K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. **Journal of Biosciences**, v. 27, p. 703-714, 2002.
- MACFARLANE, G. T.; CUMMINGS, J. H. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? **BMJ**, v. 18, p. 999-1003, 1999.
- MARTINEZ, V. C. ***Lactobacillus casei*.** Disponível em: <<http://pat.feldman.com.br/2007/01/26/curiosidades-sobre-os-lactobacillus/>> Acesso: 26/07/12.
- MATHEW, A. G. *et al.* Effect of galactan on selected microbial populations and pH and volatile fatty acids in the ileum of the weanling pig. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 6, p. 1503-1509, 1993.
- MITSUOKA, T. Intestinal flora and aging. **Nutrition Reviews**, v. 50, n. 12, p. 438-446, 1992.

MONTEIRO, F. **Diferentes proporções de fibras insolúvel e solúvel de grãos de aveia sobre a resposta biológica de ratos.** 2005, 54 f. Tese de Mestrado (Mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

MOSENTHIN, R.; BAUER, E. The potential use of prebiotics in pig nutrition. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RECENT ADVANCES IN ANIMAL NUTRITION, 2000, Seoul. **Proceedings...** Seoul : Seoul National University, 2000. p. 515-528.

ORBAN, J. I. *et al.* Growth performance and intestinal microbial populations of growing pigs fed diets containing thermal oligosaccharide caramel. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 1, p. 170-175, 1997.

PAZ, A. S. *et al.* Aditivos promotores de crescimento na alimentação de frangos de corte. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 11, n. 2, p. 395-402, 2010.

PEREIRA, C. A. S. **Avaliação do efeito de microrganismos probióticos sobre *Eimeria* spp. em *Rattus norvegicus*.** 2007, 76 f. Tese de Doutorado (Doutor em Biotecnologia Industrial). Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, SP.

SANCHES, A. L. *et al.* Utilização de probiótico, prebiótico e simbiótico em rações de leitões ao desmame. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 4, p. 774-777, 2006.

SILVA, L. P.; NÖRNBERG, J. L. Prebióticos na nutrição de não-ruminantes. **Ciência Rural**, v.33, n.4, p. 55-65, 2003.

SILVA, R. M. V. G., SANTOS, M. G. L., BOTELHO, C. Influência do tabagismo no ganho ponderal, crescimento corporal, consumo alimentar e hídrico de ratos. **Jornal de Pneumologia**, v. 23, n. 3, p. 124-130, 1997.

SOUZA, *et al.* **Farinha mista de banana verde e de castanha-do-brasil.** Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF, 2009.

VAN LAERE, K. M. J. **Degradation of structurally different non-digestible oligosaccharides by intestinal bacteria: glycosylhydrolases of *Bifidobacterium adolescentis*.** Wageningen University dissertation no 2801, 2000. Disponível em: <<http://www.bib.wau.nl/wda/abstracts/ab2801.html>>

Endereço para Correspondência:

Jéssica Soares Oliveira
jessica.bio9@hotmail.com