

Microscopia de fluorescência e varredura em protoplastos de *Citrus sinensis*

MELLO-FARIAS, Paulo Celso de;* SARTORETTO, Laudete Maria;** CHAVES, Ana Lúcia Soares***

Resumo

A tecnologia de isolamento de protoplastos é uma importante ferramenta para estudos da bioquímica e fisiologia da membrana plasmática e regeneração da parede celular. Protoplastos de laranja “Caipira” (*Citrus sinensis* L. Osbeck) foram enzimaticamente isolados a partir de células em suspensão e posteriormente cultivados em meio líquido. Este trabalho teve por objetivo avaliar a viabilidade de protoplastos de laranja “Caipira” recém isolados por meio do corante Diacetato de Fluoresceína (FDA), em que se observou 95% de protoplastos fluorescendo. Por intermédio da técnica de microscopia eletrônica de varredura, observou-se protoplastos recém isolados da variedade laranja “Caipira”. Utilizou-se o corante Calcofluor White (CFW) para visualizar a parede celular regenerada em protoplastos com oito dias de cultivo da mesma variedade citada, em que se observou a presença de parede celular por meio de um anel azulado de intensa fluorescência. Palavras-chave: Protoplastos. Cultura de células. Microscopia de fluorescência e varredura. Citrus.

Fluorescence and scanning electron microscopy of citrus sinensis protoplasts*Abstract*

The technology of protoplasts isolation is an important tool for studies of plasmatic membrane biochemistry and physiology and cell wall regeneration. Protoplasts of “Caipira” sweet orange (Citrus sinensis L. Osbeck) were enzymatically isolated from cells in suspension and subsequently cultured in liquid medium. This study aimed to evaluate the viability of protoplasts of “Caipira” sweet orange freshly isolated by the Fluorescein Diacetate (FDA) stain, which showed 95% of fluorescing protoplasts. Through the technique of scanning electron microscopy, it was observed protoplasts of “Caipira” sweet orange freshly isolated. It was used Calcofluor White (CFW) fluorescent stain to visualize the cell wall regenerated protoplasts after 8 days following culture of the above-mentioned variety, wherein was observed the cell wall through a bright blue ring intense fluorescence.

Keywords: Protoplasts. Cell culture. Fluorescence and scanning electron microscopy. Citrus.

* Pós-doutor em Transformação Genética de Plantas pela Universidade de Ohio (EUA); Doutor em Biotecnologia Vegetal pela Universidade de São Paulo; Engenheiro Agrônomo e pesquisador da Universidade Federal de Pelotas; atua como Engenheiro agrônomo e pesquisador da Universidade Federal do Rio Grande, nas áreas de Biotecnologia, Genética Vegetal, Produção de Mudanças e Paisagismo; mellofarias@yahoo.com.br

** Pós-doutora em Biotecnologia Vegetal pela Universidade de Santa Maria; Doutora em Biologia Molecular pela Universidade de Brasília; Engenheira Agrônoma pela Universidade Federal de Pelotas; atua como professora da Universidade do Oeste de Santa Catarina, na área de Engenharia Florestal; sartoretolau@yahoo.com.br

*** Pós-doutora em Bioquímica e Genômica pela Universidade Federal Fluminense e Universidade Federal de Pelotas; Doutora em Biologia Molecular e Celular Vegetal pela École Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, França; Engenheira Agrônoma pela Universidade Federal de Pelotas; atua como professora da Universidade Federal de Pelotas, na área de Bioquímica, Genômica e Biologia Molecular; alschaves@yahoo.com.br

1 INTRODUÇÃO

Como os protoplastos são desprovidos de parede celular, eles são muito úteis para o estudo do papel da membrana plasmática no processo de fusão de protoplastos, biossíntese de celulose e regeneração da parede celular com a deposição de microfibras de celulose (PHANSIRI et al., 1992).

O laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – Universidade de São Paulo (CENA/USP) vem trabalhando há mais de 10 anos em experimentos de isolamento, cultura e fusão de protoplastos, visando ao aperfeiçoamento de *Citrus*. Trabalhos de fusão de protoplastos têm sido de grande importância para o melhoramento de variedades de *Citrus*, em razão das características da biologia reprodutiva desse gênero e seus parentais, como esterilidade de pólen e óvulo, longa fase juvenil, incompatibilidade sexual, poliembrionia nuclear e alta heterozigose (VARDI; SPIEGEL-ROY; GALUN, 1974; VARDI, 1981; VARDI; SPIEGEL-ROY, 1982; LING; NITO; IWAMASA, 1989; VARDI; GALUN, 1989; GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990b; MELLO-FARIAS, 2005) que dificultam a obtenção de resultados promissores em programas de aprimoramento convencional. O sucesso no isolamento de protoplastos depende basicamente das condições do tecido e da combinação de enzimas utilizadas (GLEDDIE, 1995; MELLO-FARIAS, 2005).

Com o objetivo de avaliar o protocolo de isolamento e cultura de protoplastos utilizado por Grosser e Gmitter Junior. (1990b), para variedades cítricas brasileiras, foram feitos testes de viabilidade de protoplastos recém isolados por meio de Diacetato de Fluoresceína (FDA) e protoplastos cultivados por oito dias por meio de Calcoflúor White (CFW).

O avanço da cultura de tecidos de plantas tem propiciado muitas técnicas para conservação, propagação e aperfeiçoamento genético de plantas terrestres comercialmente importantes (KARTHA, 1985; POLLARD; WALKER, 1990). Nesse contexto, os protoplastos são um material experimental com grande potencial para múltiplas manipulações *in vitro* (PASZKOWSKI et al., 1992; PUIITE, 1992; MELLO-FARIAS, 2005), e para o entendimento dos processos celulares e moleculares, incluindo aqueles envolvidos na tolerância ao estresse ambiental (POTRYKUS; SHILLITO, 1988; PUIITE, 1992; MELLO-FARIAS, 2005). O conhecimento dos mecanismos ecofisiológicos envolvidos na resistência ao estresse pode auxiliar na formulação de estratégias do manejo de plantas.

Protoplastos isolados têm sido utilizados com sucesso para o estudo do mecanismo de transporte de íons na membrana plasmática de *Zostera muelleri* (GARRIL; TYERMAN; FINDLAY, 1994). Teoricamente, não há razões para que algumas técnicas não sejam estendidas para outras espécies.

O presente estudo foi realizado com a finalidade de fornecer um protocolo aprimorado, para produzir protoplastos viáveis de laranja “Caipira” (*Citrus sinensis* L. Osbeck), com regeneração da parede celular, para posteriores estudos fisiológicos e bioquímicos, e para o desenvolvimento de um sistema de regeneração mais eficiente para citros.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL BOTÂNICO

Foram utilizados protoplastos recém isolados a partir de cultura de células em suspensão, da variedade laranja “Caipira” (*Citrus sinensis* L. Osbeck). As culturas de células em suspensão foram obtidas a partir de calos nucleares e mantidas sob agitação de 100 rpm, no escuro e sob temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$. O subcultivo em meio líquido foi realizado a cada 14 dias, onde se recolheu em torno de 1 g de células em suspensão e se cultivou em novo meio líquido EME. Os protoplastos foram observados durante o isolamento, cultivo e experimentos de fluorescência por meio do microscópio invertido Zeiss, modelo Axiovert 200.

2.2 ISOLAMENTO DE PROTOPLASTOS

Foi realizado por meio da utilização de solução enzimática, constituída por Manitol (0,7 M), CaCl_2 (24,5 mM), NaH_2PO_4 (0,92 mM), M.E.S. (6,15 mM), 1% Celulase Onozuka R.S. (Yakult), 1% Macerase (Yakult Honsha) e 0,2% Pectoliase Y-23 (Seishin), pH 5,6. O isolamento foi realizado utilizando-se 2 mL de solução enzimática por 500 mg de células em suspensão, diluindo-se em 2 mL de meio de cultura BH3 0,7 M (MOURÃO-FILHO, 1995). Esse procedimento ocorreu por agitação a 40 rpm, durante 16 horas no escuro a $27 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.3 PURIFICAÇÃO DE PROTOPLASTOS

Após o isolamento, passou-se a solução contendo os protoplastos por uma membrana de nylon de $50 \mu\text{m}$ com o objetivo de remover células não digeridas e restos de parede celular. A solução filtrada foi colocada em tubo e centrifugada a 100 g por 5 min. Removeu-se o sobrenadante com pipeta de Pasteur. Ressuspendeu-se cuidadosamente o “pellet” em 5 mL de solução CPW com 25% de sacarose (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990a). Sobre a solução de sacarose com protoplastos adicionou-se vagarosamente 2 mL de solução de CPW com 13% de manitol. Centrifugou-se por 6 min a 100 g, sem freio. Após a centrifugação formou-se uma banda entre as duas soluções contendo protoplastos purificados. Cuidadosamente, removeram-se os protoplastos da interface sacarose-manitol com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e colocou-se em tubo de centrífuga, com aproximadamente 2 mL de meio de cultura BH3 0,7 M. Centrifugou-se por 5 min a 100 g. Após, retirou-se o sobrenadante e colocou-se meio de cultura BH3 de forma a obter uma solução com alta densidade de protoplastos (5×10^6).

2.4 TESTE DE VIABILIDADE DE PROTOPLASTOS POR MEIO DE DIACETATO DE FLUORESCEÍNA (FDA)

A solução estoque de FDA foi preparada de acordo com Evans e Bravo (1983); Power et al. (1989); Carneiro e Conroi (1990), em que se adicionou 5 mg de FDA por mL de acetona. Colocou-se uma gota da solução estoque em 10 mL de meio de cultura CPW com 13% de manitol. Misturaram-se volumes iguais de solução de FDA com uma suspensão densa de protoplastos em meio de cultura. Após 5 min, examinou-se o material em microscópio invertido sob luz ultravioleta.

2.5 CULTIVO E REGENERAÇÃO DE PROTOPLASTOS

Protoplastos purificados foram cultivados na densidade de 2×10^5 protoplastos.mL⁻¹ em meio de cultura EME 0,7 M em ausência de luz, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990a). Aos 30 dias de cultivo, iniciou-se a redução da pressão osmótica, adicionando-se 10 a 12 gotas do meio de cultura 1:1:1 (v:v:v), 1 parte de BH3 0,6 M, 1 parte de EME 0,6 M e 1 parte de EME 0,146 M, transferindo-se a cultura para baixa iluminação. Em subcultivos posteriores (a cada 20 a 30 dias), quando a cultura de protoplastos já estava mais vigorosa, formando microcalos, adicionaram-se às microcolônias o meio de cultura 1:2 (v:v), o qual é composto por 1 parte do meio de cultura BH3 0,6 M e 2 partes de EME 0,146 M. Aos 90 dias de cultivo, foi avaliado o número de microcalos com 1-2 mm de diâmetro, transferindo-os para placa de Petri (100 x 15 mm), contendo o meio de cultura semissólido EME suplementado com 25 g.L⁻¹ de sacarose, a qual foi dividida em 8 campos, para facilitar a contagem das colônias. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com três repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de isolamento.

2.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

De acordo com Fowke (1995), é importante que os protoplastos sejam mantidos sempre cobertos com líquido em todas as etapas do procedimento. A estrutura celular é destruída se ocorrer desidratação. Foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura da marca Zeiss, modelo DSM 940A.

2.6.1 Fixação

Fixaram-se pequenas amostras de aproximadamente 1 mm³ em 3% de glutaraldeído dissolvido em tampão cacodilato de sódio 0,05 M com pH 7,2 por uma hora à temperatura ambiente.

Protoplastos vegetais em suspensão foram fixados por intermédio de centrifugação a 100 g em

meio de cultura com potencial osmótico apropriado em solução de glutaraldeído 3%. O glutaraldeído foi diluído em meio de cultura e sua concentração final foi de 1%. Trocou-se o fixador por glutaraldeído 3% no mesmo tampão por duas horas à temperatura ambiente. Trocou-se o fixador por tampão 0,05 M colocando-se em gelo. Repetiu-se esse procedimento por três vezes no período de 1 a 12 horas, a 0 °C. Fixou-se posteriormente em 1% de “OsO₄” no mesmo tampão à temperatura ambiente durante o período da noite, a 0 °C. Enxaguou-se duas vezes com água destilada por mais de 30 min a 0 °C. Os protoplastos fixados foram aderidos a uma lamínula de vidro que se encaixa no aparelho Secador de Ponto Crítico. As lamínulas foram preparadas pingando-se 1 gota de poly-L-lysine (1 mg/ml), enxaguadas em água destilada e secadas à temperatura ambiente. Colocou-se 1 gota de suspensão de protoplastos na lamínula, esperou-se 5 a 10 min, removeu-se o excesso de suspensão e mergulharam-se as lamínulas em água destilada.

2.6.2 Desidratação e Secagem

Transferiram-se as amostras gradualmente para álcool absoluto com aumentos de 10%, a cada 15 min e deixou-se por 2 horas a 0 °C com duas trocas. Transferiu-se o material para pequenos recipientes porosos à temperatura ambiente. Secou-se no aparelho Secador de Ponto Crítico, de acordo com Fowke (1995).

2.6.3 Montagem do Material para Microscopia Eletrônica

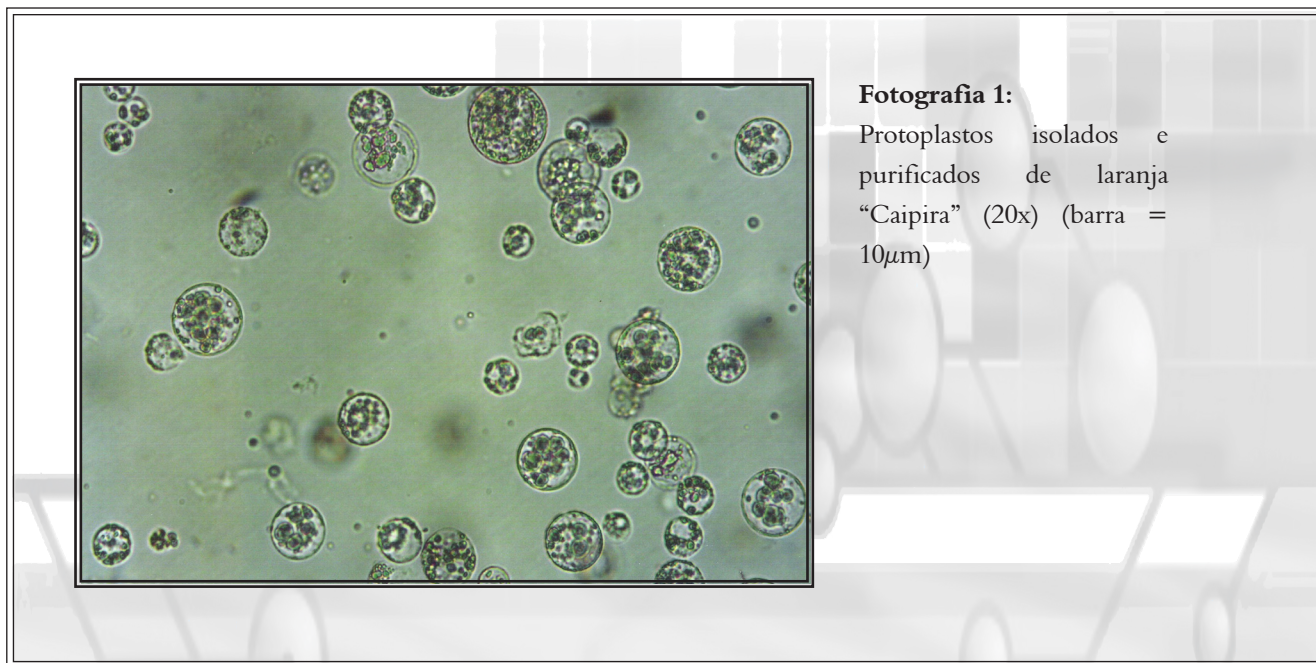
Colocaram-se as lamínulas em pequenos suportes de alumínio usando fita adesiva de dupla face. Cobriu-se o material com ouro por meio do aparelho Metalizador e examinaram-se as amostras no microscópio eletrônico de varredura.

2.7 TESTE PARA VISUALIZAÇÃO DA PAREDE CELULAR POR MEIO DE CALCOFLÚOR WHITE (CFW)

A solução estoque foi preparada segundo Power et al. (1989), pela adição de 0,1% (p/v) de CFW em 0,4 M de sorbitol. Adicionou-se uma gota da solução estoque a uma gota de protoplastos em meio de cultura. Esperou-se 1 min e observou-se em microscópio invertido sob luz ultravioleta.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o período de 16 horas de incubação, uma grande quantidade de protoplastos foi obtida a partir de células em suspensão da variedade laranja “Caipira” (*Citrus sinensis* L. Osbeck), quando, então, foram purificados. Foi constatada uma alta eficiência no isolamento de protoplastos, 95% de células viáveis, como pode ser observado na Fotografia 1.

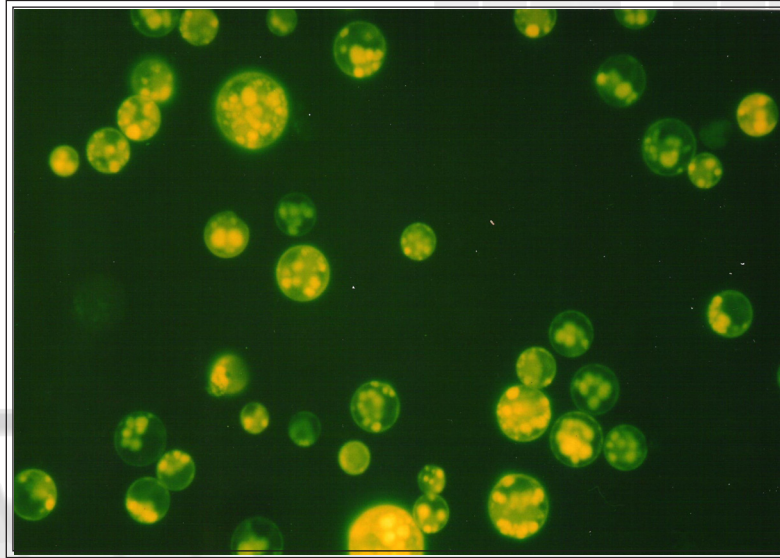


Um dos testes mais frequentemente utilizados para se estimar a viabilidade de protoplastos é com o uso de Diacetato de Fluoresceína (FDA), de acordo com Bengochea e Dodds (1987).

Sendo este um composto não fluorescente (POWER et al., 1989), ele passa livremente através da membrana plasmática, porém, somente em protoplastos vivos as moléculas são liberadas pela ação de esterases (AMANO et al., 2003). Normalmente, sob observação em microscópio de fluorescência, as células viáveis com intensa fluorescência são contadas em relação ao número total de células, dessa forma é determinada a taxa de células viáveis.

A clivagem resulta na liberação da fluorescência que é retida somente em protoplastos com a membrana intacta. Por estarem metabolicamente ativos, portanto viáveis, os protoplastos são visualizados com luz ultravioleta pela fluorescência de coloração verde acumulada na membrana (POWER et al., 1989).

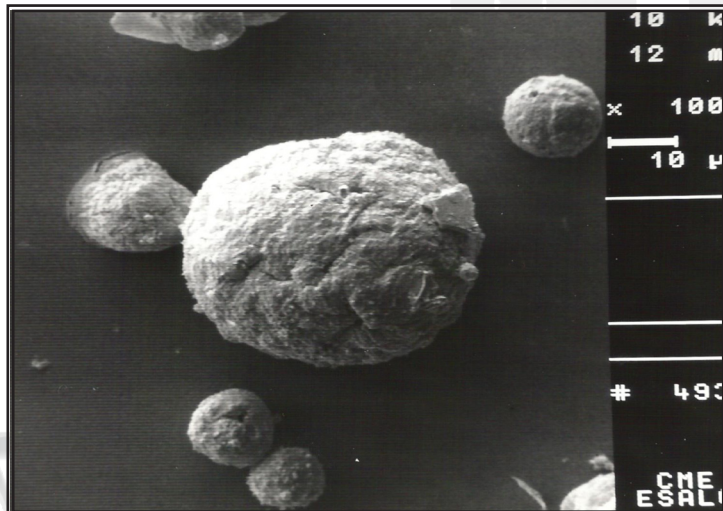
Com o objetivo de avaliar a viabilidade dos protoplastos isolados, utilizou-se a técnica do corante FDA e verificou-se uma alta porcentagem de protoplastos viáveis, como pode ser visto na Fotografia 2, que mostra aproximadamente 95% dos protoplastos fluorescentes.



Fotografia 2:

Protoplastos de laranja
“Caipira” após tratamento com
FDA, sob luz ultravioleta (20x)
(barra = 10 μ m)

Por meio da utilização de microscopia eletrônica de varredura, foram observados os protoplastos recém isolados da variedade laranja “Caipira”, conforme Fotografia 3. Protoplastos recém isolados apresentam uma superfície aparentemente regular, com apenas poucas e pequenas projeções. Na referida Fotografia, observa-se a ausência de parede celular e tampouco se detecta algum material fibrilar. Phansiri et al. (1992) também observaram resultados semelhantes em microscopia eletrônica de varredura realizada em protoplastos de soja.

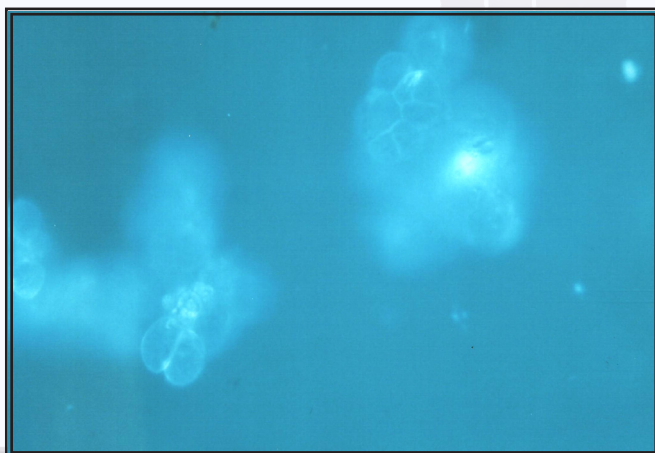


Fotografia 3:

Protoplastos recém isolados de
laranja “Caipira”, observados em
microscópio eletrônico de varre-
dura (100x) (barra = 10 μ m)

Os protoplastos começam a regenerar nova parede celular dentro de poucas horas após o isolamento, entretanto, leva vários dias para completar a biossíntese da parede. Esses eventos iniciais ocorrem na superfície do plasmalema e podem ser observados microscopicamente pelo uso de Calcofluor White (CFW). Esse corante branco liga-se à parede do material e torna-se de coloração azul fluorescente sob luz ultravioleta (POWER et al., 1989; DODDS; ROBERTS, 1995, PHANSIRI et al., 1992). O CFW liga-se aos glicosídeos por meio de β -ligações em paredes celulares recentemente sintetizadas (EVANS; BRAVO, 1983).

No presente trabalho, observou-se alta eficiência do corante Calcofluor White na visualização da regeneração da parede celular de protoplastos isolados da variedade laranja “Caipira” (*Citrus sinensis* L. Osbeck) e cultivados por oito dias (Fotografia 4), como também foi observado por Nagata e Takebe (1970), trabalhando com protoplastos de mesófilo de tabaco.



Fotografia 4:

Células de laranja “Caipira” tratadas com o corante Calcofluor White, sob luz ultravioleta, oito dias após a remoção da parede celular (10x) (barra = 10 μ m)

A Fotografia 4 ilustra também um agrupamento de células em processo de divisão celular, formando pequenas colônias celulares.

4 CONCLUSÃO

A solução enzimática constituída por Manitol (0,7 M), CaCl₂ (24,5 mM), NaH₂PO₄ (0,92 mM), M.E.S. (6,15 mM), Celulase (Onozuka R.S. 1%), Macerase (1%) e Pectoliase Y-23 (0,2%), foi eficiente na digestão da parede celular dos protoplastos de citros.

Por meio de Diacetato de Fluoresceína (FDA) verificou-se que 95% dos protoplastos obtidos eram viáveis.

O protocolo utilizado na preparação dos protoplastos de citros para serem observados no microscópio eletrônico de varredura foi eficiente para se observar as células desprovidas de parede celular.

Além disso, observou-se que a técnica de regeneração da parede celular utilizada foi eficiente e por meio do corante Calcofluor White (CFW) constatou-se a regeneração da parede celular após oito dias do isolamento de protoplastos.

REFERÊNCIAS

AMANO, Toyoki et al. A versatile assay for the accurate, time-resolved determination of cellular viability. **Analytical Biochemistry**, v. 314, n. 1, p. 1-7, 2003.

BENGOCHEA, Teresa; DODDS, John. **Plant Protoplasts – A Biotechnological Tool for Plant Improvement**. Cambridge University Press. 1986.

CARNEIRO, Vera Tavares de Campos; CONROI, Thierry. Protoplastos de Células Vegetais. In: TORRES, Antônio Carlos; CALDAS, Linda Styer. **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília, DF: Embrapa/CNPQ, 1990.

DODDS, John; ROBERTS, Lorin. **Experiments in Plant Tissue Culture**. 3. ed. Cambridge University Press, 1995.

EVANS, David; BRAVO, Janis. Protoplast Isolation and Culture. In: EVANS, David et al. **Handbook of Plant Cell Culture, 1**. Techniques for Propagation and Breeding, 1983.

FOWKE, Larry. Transmission and Scanning Electron Microscopy for Plant Protoplasts. In: GAMBORG, Oluf; PHILLIPS, Gregory. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture – Fundamental Methods**. Berlin Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, 1995.

GARRIL, Ashley; TYERMAN, Stephen; FINDLAY, Geoff. Ion channels in the plasma membrane of protoplasts from the halophytic angiosperm *Zostera muelleri*. **Journal of Membrane Biology**, v. 42, p. 381-393, 1994.

GLEDDIE, Stephen. Protoplast Isolation and Culture. In: GAMBORG, Oluf; PHILLIPS, Gregory. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture – Fundamental Methods**. Berlin Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, 1995.

GROSSER, Jude; GMITTER JUNIOR, Fred. Somatic hybridization of *Citrus* with wild relatives for germplasm enhancement and cultivar development. **HortScience**, Alexandria, v. 25, n. 2, p. 147-151, 1990a.

_____. Protoplast fusion and *Citrus* improvement. **Plant Breeding Reviews**, v. 8, n. 1, p. 339-374, 1990b.

KARTHA, Kuty. Meristem culture and germplasm preservation. In: KARTHA, Kuty. **Cryopreservation of Plant Cells and Organs**. Boca Raton, CRC Press, 1985.

LING, Jing-Tian; NITO, Nobumasa; IWAMASA, Masao. Plant regeneration from protoplasts of Calamondin (*Citrus madurensis* Lour.). **Scientia Horticulturae**, v. 39, n. 1, p. 325-333, 1989.

MELLO-FARIAS, Paulo Celso de. Biotecnologia no Melhoramento Genético de Citros. In: MELLO-FARIAS, Paulo Celso de et al. **Educação, Ambiente e Tecnologia: Tópicos Relevantes**. Porto Alegre, Evangraf, 2005.

MOURÃO-FILHO, Francisco de Assis Alves. **Protoplast fusion of citrus for rootstock and scion improvement with emphasis on wide hybridization**. 152f. Tese (Ph.D)–University of Florida, Gainesville, 1995.

NAGATA, Toshiyuki; TAKEBE, Itaru. Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts. **Planta**, v. 92, n. 1, p. 301-308, 1970.

PASZKOWSKI, Jerzy et al. Protoplasts as tools for plant genome modification. **Physiology Plantarum**, v. 85, n. 1, p. 335-356, 1992.

PHANSIRI, Salak et al. Studies on cell wall regeneration and cell division in soybean protoplasts using fluorescence and scanning electron microscopy. **Japan Journal of Crop Science**, v. 61, n. 3, p. 487-493, 1992.

POLLARD, Jeffrey; WALKER, Joshua. **Plant Cell and Tissue Culture**. Clifton, Human Press, 1990.

POTRYKUS, Ingo; SHILLITO, Raymond. Protoplasts: isolation, culture, plant regeneration. In: WEISSBACH, Arthur; WEISSBACH, Herbert. **Methods for Plant Molecular Biology**. San Diego, Academic Press, 1988.

POWER, John Brian et al. **Laboratory Manual – Plant Tissue Culture**. University of Nottingham, UK. 1989.

PUITE, Klaas. Progress in plant protoplast research. **Physiology Plantarum**, v. 85, n. 1, p. 403-410, 1992.

VARDI, Assaf; GALUN, Esra. Isolation and Culture of Citrus protoplasts. Biotechnology in Agriculture and Forestry. In: BAJAJ, Yamil. **Plant protoplasts and Genetic Engineering**. Berlin Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, 1989.

VARDI, Assaf. Protoplasts derived from different Citrus species and cultivars. **Proceedings of International Society of Citriculture**, v. 1, n. 1, p. 149-52, 1981.

VARDI, Assaf; SPIEGEL-ROY, Pinchas; GALUN, Esra. Citrus cell culture: isolation of protoplasts, plating densities. Effect of mutagens and regeneration embryos. **Plant Science Letters**, v. 4, n. 1, p. 231-236, 1974.

VARDI, Assaf; SPIEGEL-ROY, Pinchas. Plant regeneration from Citrus protoplasts: Variability in methodological requirements among cultivars and species. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 62, n. 1, p. 171-176, 1982.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e o auxílio dos pesquisadores Beatriz Madalena Januzzi Mendes, Adriana Pinheiro Martinelli, Fernanda Januzzi Mendes da Glória e Francisco de Assis Alves Mourão Filho durante a realização deste trabalho no CENA e ESALQ/USP.

Recebido em 26 de novembro de 2010

Aceito em 13 de março de 2011

