

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DE MÉIS PRODUZIDOS NO PANTANAL

BERTOLDI, Fabiano Cleber\*; GONZAGA, Luciano Valdemiro\*\*; FETT, Roseane\*\*\*; dos REIS, Vanderlei Doniseti Acastio\*\*\*\*

### Resumo

O conhecimento que os antioxidantes desempenham na inibição dos radicais livres, resultantes do metabolismo celular, tem motivado o interesse pela análise destes compostos em diversos produtos alimentares. O objetivo foi quantificar os compostos fenólicos totais e sua correlação com a atividade antioxidante, visando a conhecer as propriedades antioxidantes de méis produzidos por *Apis mellifera* L. no Pantanal. Foram analisadas 25 amostras de méis multiflorais, coletadas no Pantanal do Mato Grosso do Sul, exclusivamente em duas fazendas experimentais (Nhumirim e Band'Alta) com características geográficas distintas. Os teores médios de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante dos méis da fazenda Nhumirim foram significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) aos encontrados na fazenda Band'Alta, com valores médios de 222,03 e 61,52 mg/100 g e atividade de 223,86 e 120,93  $\mu$ MTrolox/100 g, respectivamente. Parece existir alguma relação entre o teor em compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante revelada, dado que o valor médio da amostra, que é mais rica neste composto, possui também a que apresenta valor médio de maior atividade antioxidante. No entanto, os resultados demonstram que a atividade estudada não pode ser prevista considerando, apenas, o parâmetro respeitado.

Palavras-chave: *Apis mellifera*. Apicultura. Radicais livres.

\* Pesquisador; Doutor em Ciência dos Alimentos; Estação Experimental de Itajai, Epagri; fabianobertoldi@epagri.sc.gov.com.br

\*\* Laboratorista; Técnico em Saneamento; Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Santa Catarina; lvgonzaga@hotmail.com

\*\*\* Professora; Doutora em Química; Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Santa Catarina; rfett@cca.ufsc.br

\*\*\*\* Pesquisador; Mestre em Entomologia; Embrapa Pantanal; reis@cpap.embrapa.br

## ***Antioxidant properties of honey produced in the Pantanal***

### ***Abstract***

*The knowledge that antioxidants play in inhibiting the free radicals resulting from cellular metabolism, has stimulated interest in the analysis of these compounds in various food products. The aim of this study was to quantify the total phenolic compounds and its correlation with antioxidant activity, to determine the antioxidant properties of honey produced by *Apis mellifera* L. the Pantanal. Were examined twenty five samples of honey multiflora, collected in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, only two experimental farms (Nhumirim and Band'Alta) with different geographical characteristics. The average levels of total phenolics and antioxidant activity of honey farm Nhumirim were significantly higher ( $p < 0.05$ ) to those found in farm Band'Alta, with average values of 222.03 and 61.52 mg/100g and activity of 223,86 and 120,93  $\mu$ MTrolox, respectively. There seems to be some relation between the total phenolic content and antioxidant activity revealed, as the average value of the sample which is richer in this compound has also presents the average of the highest antioxidant activity. However, the results demonstrate that the activity studied can not be predicted in view, only the parameter considered.*

*Keywords: *Apis mellifera*., Apiculture. free radicals.*

## **1 INTRODUÇÃO**

O conhecimento que os antioxidantes desempenham na inibição dos radicais livres, resultantes do metabolismo celular, tem motivado o interesse pela análise destes compostos em diversos produtos alimentares. Os estudos realizados têm mostrado que os antioxidantes contribuem para a prevenção de doenças associadas ao envelhecimento, diminuindo o risco de doenças cardiovasculares e o aparecimento de câncer (GHELDOLF; ENGESETH, 2002; WANG, 2004). Dessa forma, um grande número de estudos se concentraram sobre os efeitos benéficos das fontes naturais de antioxidantes (JAYAPRAKASHA; JAGANMOHAN RAO, 2000).

O mel produzido por abelhas *Apis mellifera*, a partir do néctar de plantas ou secreções, não contém aditivos ou conservantes e sua composição química é altamente dependente da origem floral do néctar, do clima e das condições ambientais (ANKLAM, 1998; GHELDOLF; ENGESETH, 2002; AZEREDO et al., 2003).

Existem dezenas de variedades de méis de abelhas que podem ser diferenciadas pela flora, local, época de colheita, ou ainda, segundo as técnicas de preparação. O mel de origem floral pode proceder do néctar das flores de uma única espécie vegetal (méis monoflorais) ou de várias (méis poliflorais). Rigorosamente, não existe mel monofloral, contudo, uma pequena quantidade de néctar de outras plantas melíferas não influi marcadamente no sabor e na cor de um mel em que predomine o néctar de uma única espécie de flores (BASTOS et al., 2002).

Embora seja constituído principalmente por água ( $\approx 17\%$ ) e açúcares ( $\approx 80\%$ ), outras substâncias presentes em pequenas concentrações ( $\approx 3\%$ ) respondem por muitas de suas características como seu sabor, aroma e sua atividade antioxidante. Os componentes de mel responsáveis pelo seu

efeito antioxidante são flavonoides, ácidos fenólicos, ácido ascórbico, catalase, peroxidase, carotenoides e produtos da reação Maillard (Al-MAMARY et al., 2002; GHELDOF; ENGESETH, 2002; BASTOS et al., 2002; DE MARIA; MOREIRA, 2003; SCHRAMM, et al., 2003; ALJADI; KAMARUDDIN, 2004). A quantidade destes componentes se modifica de acordo com a origem floral e geográfica do mel. Além disso, o processamento, manipulação e armazenamento de mel podem influenciar na composição (GHELDOF; ENGESETH, 2002; WANG et al., 2004; TURKMEN et al., 2005).

O mel pode impedir reações de deterioração oxidativa em alimentos, como oxidação lipídica na carne (ANTONY et al., 2000; McKIBBEN; ENGESETH, 2002), escurecimento enzimático de frutas e produtos vegetais (OSZMIANSKI; LEE, 1990; CHEN et al., 2000, GHELDOF; ENGESETH, 2002) e inibição do crescimento de agentes patogênicos alimentares (MUNDO et al., 2004; TAORMINA et al., 2001).

Vários estudos têm demonstrado que a atividade antioxidante está fortemente correlacionada com o teor total de fenólicos (ALJADI; KAMARUDDIN, 2004; Al-MAMARY et al., 2002; BERETTA et al., 2005; BLASA et al., 2006; GHELDOF; ENGESETH, 2002; MEDA et al., 2005). Esses compostos se caracterizam por apresentarem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e/ou grupamentos hidroxila, conferindo propriedades antioxidantes tanto para os alimentos quanto para o organismo (BRAVO, 1998; KARAKAYAS, 2001; SOARES, 2002).

A grande diversidade química existente torna os compostos fenólicos difíceis de separar bem como quantificar individualmente (PRIOR; CAO, 2000). Vários métodos *in vitro* vêm sendo desenvolvidos para determinar o potencial antioxidante de extratos vegetais. O método descrito ABTS (ácido 2,2'-azino-bis, 3-etilbenzotiazolin 6-sulfônico) é baseado na capacidade dos antioxidantes de inibir o radical ABTS<sup>•+</sup> (SCHLESIER, 2002; PRIOR et al., 2005; PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2006).

O objetivo deste trabalho foi quantificar os compostos fenólicos totais e sua correlação com a atividade antioxidante, visando a conhecer algumas propriedades antioxidantes de méis produzidos por *Apis mellifera* L. no Pantanal.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 AMOSTRAS DE MEL

Foram utilizadas 25 amostras de méis multiflorais de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.), na região do Pantanal no Estado do Mato Grosso do Sul, exclusivamente nas fazendas: Nhumirim – Latitude: 18°59'17" e Longitude: 56°37'18" com um total de 17 amostras, e fazenda Band'Alta – Latitude: 19°08'33" e Longitude: 57°34'37" com um total de 8 amostras. Após coletadas, foram acondicionadas em caixas térmicas e enviadas ao laboratório, as quais foram mantidas ao abrigo da luz e sob refrigeração entre 4 e 8 °C até a realização das análises. Todas as amostras foram analisadas antes do processo de cristalização, evitando, assim, a necessidade de descristalização para manter a homogeneidade dos compostos.

## 2.2 DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS

O conteúdo total de fenólicos nas amostras de mel foi determinado espectrofotometricamente de acordo com o método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965), a partir de uma solução aquosa de mel com relação massa-volume de 5 g de amostra e qsp 50 mL água deionizada, sendo uma alíquota de 0,1 mL utilizada na reação com o reativo de Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio 20% m/v. A absorbância medida em espectrofotômetro a 765 nm e os resultados obtidos foram relacionados com a curva padrão confeccionada com ácido gálico e as respostas fornecidas em mg de ácido gálico por 100 g de mel.

## 2.3 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE – SEQUESTRO DE RADICAIS LIVRES DO ABTS<sup>•+</sup>

A atividade antioxidante foi determinada pelo método descrito por RE et al. (1999). O radical ABTS<sup>•+</sup> é formado pela reação de 2,45 mM de persulfato de potássio com 7,00 mM de 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico), armazenados ao abrigo da luz, à temperatura de 20 a 25 °C, por 16 horas. Uma vez formado, o radical ABTS<sup>•+</sup> foi diluído em etanol até se obter uma medida de absorbância da ordem de 0,700 ( $\pm$  0,02) a um comprimento de onda de 754 nm. Preparado o radical, uma solução aquosa da amostra foi preparada, pesando-se 5 g de amostra em q.s.p., 50 mL com água deionizada e uma alíquota de 0,1 mL adicionada ao radical. A absorbância do sistema foi medida em espectrofotômetro (754 nm) após 7 minutos da adição da amostra.

A capacidade antioxidante total da amostra foi calculada em relação à atividade do padrão Trolox em distintas concentrações, nas mesmas condições reacionais, e os resultados foram expressos em  $\mu$ M equivalente ao Trolox por 100 g de mel (RICE-EVANS et al., 1996).

## 2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Realizou-se a análise de variância (ANOVA) para identificar diferenças significativas dos resultados médios de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante entre os méis produzidos na fazenda Nhumirim e Band'Alta. O nível de significância considerado para a diferença entre as médias dos méis produzidos nas duas fazendas foi de 5% ( $p < 0,05$ ). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados relativos às propriedades antioxidantes das amostras de méis do Pantanal podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de amostras de méis de sub-regiões do Pantanal Sul

Amostras	Fenólicos totais mg/100g	Atividade antioxidante $\mu$ MTrolox/100g
Fazenda Band'Alta		
1	51,11	54,55
2	50,73	188,32
3	47,91	77,42
4	58,47	91,66
5	84,77	175,65
6	65,83	144,26
7	68,50	139,69
8	64,87	95,87
Valor Médio	61,52 <sup>a</sup> ± 12,18	120,93 <sup>a</sup> ± 48,13
Fazenda Nhumirim		
1	145,85	292,04
2	160,95	142,58
3	196,28	121,12
4	222,01	220,25
5	212,00	235,92
6	242,21	217,93
7	223,33	265,64
8	222,08	279,31
9	281,64	176,59
10	210,38	358,04
11	186,30	206,15
12	242,46	201,45
13	275,60	209,43
14	267,69	197,00
15	224,66	191,90
16	161,76	153,23
17	299,30	337,12
Valor Médio	222,03 <sup>b</sup> ± 43,77	223,86 <sup>b</sup> ± 65,02

Valores médios com sobrescritos diferentes em uma mesma coluna diferem estatisticamente entre si de acordo com ANOVA ( $p < 0,05$ ).

Fonte: os autores.

Os teores médios de compostos fenólicos totais dos méis da fazenda Nhumirim foram significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) aos encontrados na fazenda Band'Alta, com valores médios de 61,52 e 222,03 mg/100 g, respectivamente. Segundo Kucuk et al. (2007), a concentração e o tipo de substâncias fenólicas dependem da origem floral do mel e são os principais fatores responsáveis pela atividade biológica, incluindo a atividade antioxidante, antimicrobiana, antiviral e anticarcinogênica. O maior teor de compostos fenólicos encontrados nos méis da fazenda Nhumirim pode estar relacionado ao fato de que esta fazenda sofre inundações em determinadas épocas do ano, diferentemente da Fazenda Band'Alta, que fica localizada em uma região conhecida como parte alta (por não alagar mesmo nas maiores cheias do rio) do Pantanal.

Os compostos fenólicos são os principais grupos de metabólitos secundários produzidos pelas plantas, em resposta a estresses causados por fatores edafoclimáticos ou mesmo por agressores, como insetos, micro-organismos, entre outros (KEUTGEN; PAWELZIK, 2007). Dessa forma, o maior teor de fenólicos nos méis da fazenda Nhumirim pode estar associado à ocorrência destas inundações sazonais, causando possivelmente algum tipo de estresse na flora local provocando, assim, um aumento

na produção de compostos fenólicos pelas plantas desta região com a finalidade de aumentar suas defesas contra possíveis pragas, fungos, bactérias, entre outros, ocasionados durante e após as inundações. Além disso, diferenças na vegetação, solo e temperatura entre esta região e a da fazenda Band'Alta possibilitam a obtenção de tipos de méis diferentes. Segundo Rivero et al. (2001), altas temperaturas também podem fazer com que ocorra o acúmulo de compostos fenólicos, pois conforme relatado, a 25 °C o teor de fenólicos totais foi de 226,6 mg/100g, enquanto a 35 °C o teor aumentou para 552,0 mg/100g em amostras de tomate fresco. Considerando que a região da fazenda Band'Alta está localizada a uma maior altitude e com menor temperatura em relação à região da fazenda Nhumirim, pode-se sugerir que estes fatores também estejam relacionados ao menor teor de compostos fenólicos e, conseqüentemente, menor atividade antioxidante quando comparados com os méis produzidos na região da fazenda Nhumirim.

Cabe destacar que a principal atividade econômica desenvolvida em ambas as fazendas é a pecuária de corte, sendo utilizada para a alimentação dos bovinos, principalmente pastagens nativas na fazenda Nhumirim, em que há também uma Reserva Particular do Patrimônio Natural e a diversidade de plantas visitadas ao longo do ano pelas abelhas africanizadas é maior nessa propriedade, pois ela sofreu menor alteração antrópica.

Ao comparar os resultados com os determinados em estudos semelhantes, realizados com méis de outros países e de diferentes origens florais, em que se referem teores em polifenóis entre 84 e 100 mg ácido gálico/100 g de mel (MEDA et al., 2005), verificou-se que o intervalo de variação determinado neste trabalho é, sem dúvida, mais alargado para as amostras da Fazenda Nhumirim. Entretanto, ainda que escassas as pesquisas de determinação de compostos fenólicos em mel, pode-se observar que os valores das amostras obtidos são semelhantes quando comparados com outros resultados encontrados na literatura, com compostos fenólicos variando entre 1 e 100 mg/100 g em trabalho realizado por Sontag et al. (1989), valores de 56,32 a 246,21 mg/100 g em estudo executado por Al-Mamary et al. (2002) e 132 a 239 mg/100 g encontrado por Kucuk et al. (2007).

A atividade antioxidante das amostras de méis obtidos na fazenda Nhumirim (223,86  $\mu$ MTrolox/100 g) também apresentou valores significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) aos encontrados nos méis da fazenda Band'Alta (120,93  $\mu$ MTrolox/100 g).

Analisando os resultados, verificou-se que existe uma correlação entre o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante. O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) entre a atividade antioxidante e o conteúdo de fenólicos totais das amostras de méis foi determinado e mostrou uma correlação positiva, no entanto, baixa com  $R^2$  de 0,2533 para méis produzidos na fazenda Band'Alta e  $R^2$  de 0,0386 para méis produzidos da fazenda Nhumirim. Assim, os compostos fenólicos não devem ser os únicos contributos importantes para a atividade antioxidante destas amostras.

Assim, parece existir alguma relação entre o teor em compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante revelada, dado que o valor médio da amostra, que é mais rica neste composto, possui também a que apresenta valor médio de maior atividade antioxidante. No entanto, os resultados demonstram que a atividade estudada não pode ser prevista considerando apenas o parâmetro avaliado.

#### 4 CONCLUSÃO

De um modo geral, os méis do Pantanal que foram analisados apresentaram relevantes propriedades antioxidantes. Estas propriedades devem ser divulgadas de modo a promover o consumo do mel e a valorizar o produto dessa região.

Como observado, os méis do Pantanal apresentaram valores relevantes de compostos fenólicos e atividade antioxidante, mesmo com diferenças significativas entre as regiões analisadas. Estas diferenças devem ser melhor estudadas, indicando quais características de cada região que contribuem para a promoção destas propriedades antioxidantes. Dessa forma, pode-se potencializar o comércio de méis diferenciados da região pantaneira com elevado potencial antioxidante, garantindo uma maior rentabilidade aos produtores.

## REFERÊNCIAS

- ALJADI A. M.; KAMARUDDIN, M. Y. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. **Food Chemistry**, v. 85, p. 513-518, 2004.
- AL-MAMARY, M. et al. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. **Nutrition Research**, v. 22, p. 1041-1047, 2002.
- ANKLAM, A. Review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. **Food Chemistry**, v. 63, p. 549-562, 1998.
- ANTONY, S. M. et al. Effect of dry honey on oxidation in turkey breast meat. **Poultry Science**, v. 79, p. 1846-1850, 2000.
- AZEREDO, C. L. A. et al. Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. **Food Chemistry**, v. 80, p. 249-254, 2003.
- BASTOS, D. H. M. et al. Composição de voláteis e perfil de aroma e sabor de méis de eucalipto e laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, p. 122-129, 2002.
- BERETTA, G. et al. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, v. 533, p. 185-191, 2005.
- BLASA, M. et al. Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. **Food Chemistry**, v. 97, p. 217-222, 2006.
- BRAVO, L. Polyphenols, chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition**, v. 56, p. 317-333, 1998.
- CHEN, L. et al. Honeys from different floral sources as inhibitors of enzymatic browning in fruit and vegetable homogenates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 4997-5000, 2000.
- DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. Compostos voláteis em méis florais. **Química Nova**, v. 26, p. 990-996, 2003.
- GHELDOLF, N.; ENGESETH, N. J. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50 p. 3050-3055, 2002.

JAYAPRAKASHA, G. K.; JAGANMOHAN RAO, L. Phenolic constituents from lichen Parmotrema stippeum (Nyl.) Hale and their antioxidant activity. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 55, p. 1018-1022, 2000.

KARAKAYAS, E. L. Antioxidant activity of some foods containing phenolic compounds. **Journal of Food Science and Nutrition**, v. 52, p. 501-508, 2001.

KEUTGEN, A. J.; PAWELZIK, E. Modifications of Strawberry fruit antioxidant pools and fruit quality under NaCl stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 4066- 4072, 2007.

KUCUK, M. et al. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. **Food Chemistry**, v. 100, p. 526-534, 2007.

McKIBBEN, J.; ENGESETH, N. J. Honey as a protective agent against lipid oxidation in ground turkey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 592-595, 2002.

MEDA, A. et al. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, p. 571-577, 2005.

MUNDO, M. A. et al. Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, p. 1-8, 2004.

OSZMIANSKI, J.; LEE, C. Y. Inhibition of polyphenol oxidase activity and browning by honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 1892-1895, 1990.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, Y. F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, p. 791-800, 2006.

PRIOR R. L.; CAO, G. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables. Diet and health implications. **Horticulture Science**, v. 35, p. 588-592, 2000.

PRIOR, R. L. et al. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. **Journal Agricultural of Food Chemistry**, v. 53, p. 4290-4302, 2005.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biological Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

RICE-EVANS, C. A. et al. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

RIVERO, R. M. et al. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. **Plant Science**, v. 160, p. 315-321, 2001.

SCHLESIER, K. et al. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. **Free Radical Research**, v. 36, p. 177-187, 2002.

SCHRAMM, D. D. et al. Honey with high levels of antioxidants can provide protection to healthy human subjects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1732-1735, 2003.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, p. 71-81, 2002.

SONTAG, G. et al. Determination of phenolic compounds by HPLC with electrochemical detection. **Agriculture, Food Chemistry and the Consumer**, v. 2, p. 703-707, 1989.

TAORMINA, P. J. et al. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. **International Journal of Food Microbiology**, v. 69, p. 217-225, 2001.

TURKMEN, N.; et al. Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. **Food Chemistry**, v. 95, p. 653-657, 2005.

WANG, X. H. et al. Effect of processing and storage on antioxidant capacity of honey. **Journal of Food Science**, v. 69, p. 96-101, 2004.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem o suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – RHAE-INOVAÇÃO n. 555365/2005-0.

Recebido em 23 de agosto de 2012

Aceito em 30 de setembro de 2012

