



Interferência de ulvana no desenvolvimento e melanização de apressórios de *Colletotrichum gloeosporioides*

Amanda E. Gonçalves & Marciel J. Stadnik

Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Catarina, 88034-001, Florianópolis, SC, Brasil

Autor para correspondência: Marciel J. Stadnik, e-mail: stadnik@cca.ufsc.br

RESUMO

O polissacarídeo algal ulvana induz resistência em macieira à mancha foliar de *Glomerella*. Porém, modificações no processo pré-infeccioso de *Colletotrichum gloeosporioides* vêm sendo relatadas em plantas previamente tratadas com ulvana. Assim, este trabalho objetivou verificar se o polissacarídeo interfere diretamente no desenvolvimento de estruturas pré-infectivas. Para tanto, depositou-se gotas de 10 µL de suspensão de 2×10^5 conídios.mL⁻¹ em segmentos de papel celofane, assentados sobre lâminas de vidro. A suspensão conidial foi preparada com solução aquosa contendo ou não ulvana (10 mg.mL⁻¹). As amostras foram incubadas a 25°C e 100% de umidade relativa. A cada duas horas, 100 conídios por gota foram examinados microscopicamente (200x), por um período de 16h. As taxas de germinação de conídios, formação e melanização de apressórios foram quantificadas. A germinação dos conídios não foi afetada. Ulvana estimulou o alongamento do tubo germinativo, mas retardou a diferenciação do primeiro apressório (sésil). O polissacarídeo acelerou a formação do segundo apressório, mas inibiu a sua melanização.

Palavras-chave: *Ulva fasciata*, apressório, germinação, macieira, melanina, polissacarídeo.

ABSTRACT

Interference of ulvan on apressoria development and melanization of *Colletotrichum gloeosporioides*

The algal polysaccharide ulvan induces resistance in apple to *Glomerella* leaf spot. However, changes in the pre-infectious process of *Colletotrichum gloeosporioides* have been reported in apple plants previously treated with ulvan. Thus, this study aimed to verify if the polysaccharide interferes directly in the development of pre-infective structures. For this, 10 µL drops of spore suspension (2×10^5 conidia.mL⁻¹) were distributed on cellophane paper segments settled on glass slides. The conidial suspension was prepared with aqueous solution with (10 mg.mL⁻¹) or without ulvan. Samples were incubated at 25°C and 100% relative humidity. At every two hours of incubation and over a period of 16 hours, 100 conidia per drop were microscopically (200x) examined. The rates of conidia germination, apressoria formation and melanization were quantified. Germination of conidia was not affected. Ulvan stimulated the elongation of the germ tube but retarded the differentiation of the first apressorium (sessile). The polysaccharide accelerated the formation of second apressorium, but inhibited its melanization.

Key words: *Ulva fasciata*, apple tree, apressorium, germination, melanin, polysaccharide.

A Mancha Foliar da *Glomerella* (MFG), causada por *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. 1884 é considerada a principal doença de verão da cultura da macieira. Em condições ótimas de temperatura (24°C) e alta umidade relativa (UR), o fungo pode reduzir drasticamente o potencial produtivo das plantas no ano subsequente (Katsurayama & Boneti, 2009).

Tem-se buscado métodos alternativos de controle de doenças de plantas, como a aplicação de produtos que induzem a resistência a fitopatógenos. Ulvana é um polissacarídeo proveniente das paredes celulares da macroalga verde *Ulva* spp. Delile 1813 (Paulert et al., 2009) que possui este potencial (Cluzet et al., 2004; Jaulneau et al., 2010). Pelo tratamento preventivo com ulvana, tem-se relatado reduções na severidade da MFG de até 65% (Araújo et al., 2008). O controle da MFG vem sendo associado a uma maior atividade de peroxidases, mas não de glucanases, em macieiras tratadas preventivamente com

ulvana e inoculadas com *C. gloeosporioides* (Araújo & Stadnik, 2013).

Geralmente, indutores de resistência não apresentam ação antimicrobiana direta sobre patógenos e, portanto, não costumam afetar a germinação e formação de apressórios (Guzzo et al., 2001). Apessórios são essenciais ao processo infectivo de *Colletotrichum*, pois permitem ao fungo aderir-se e penetrar diretamente a cutícula e a parede das células epidermais do hospedeiro (Wharton & Uribeondo, 2004). O acúmulo de melanina também se relaciona a este processo, pois fungos fitopatogênicos que formam apressórios hialinos têm sua penetração impossibilitada (Jacobson, 2000).

Recentemente, Araújo (2010) observou redução no número de apressórios sobre folhas de macieiras tratadas com ulvana, em 24, 48 e 72 horas após sua inoculação com *C. gloeosporioides*. Deste modo, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito direto desse polissacarídeo sobre

formação e o desenvolvimento de estruturas pré-infectivas de *C. gloeosporioides*.

Foi utilizado nos ensaios o isolado MANE 147 de *C. gloeosporioides* (Araújo & Stadnik, 2013), proveniente de Urubici-SC. Mantiveram-se as culturas sob as mesmas condições e os conídios foram coletados conforme a metodologia descrita por Araújo & Stadnik (2011). A concentração de conídios foi ajustada para 2×10^5 conídios. mL⁻¹.

Para a extração da ulvana, adotou-se a metodologia adaptada de Paulert et al. (2009). O segundo precipitado, utilizado em todos os experimentos, foi coletado em papel filtro (25µm) por filtração a vácuo, após 96h de permanência da solução de etanol a -20°C. O material foi seco a 45°C, até atingir peso constante, quando foi triturado em moinho analítico, separado em peneira metálica de 0,042 mm e armazenado a -20°C.

A formação de apressórios foi observada sobre papel celofane, conforme metodologia modificada de Shisler et al. (1991) e Fudal et al. (2007). Para tanto, assentaram-se segmentos de papel celofane incolor (RMV-Realce®) de 76x26 mm, sobre lâminas de microscopia. Sobre a superfície do celofane, depositou-se uma gota de 10 µL de suspensão conidial (2×10^5 conídios.mL⁻¹), com ou sem ulvana (10 mg.mL⁻¹). O conjunto contendo a lâmina e o papel celofane foi incubado a 25°C, 100% de UR e fotoperíodo de 12h.

O crescimento fúngico foi paralisado pela adição de 10 µL Azul de Amann (ácido láctico, fenol cristalino, água destilada na proporção de 1:1:1 (v/p/v) e azul de algodão-0,2%). A geminação conidial, a formação de estruturas pré-infectivas e a melanização de apressórios foi monitorada em intervalos de duas horas, até 16h de incubação. Avaliações posteriores não foram realizadas devido ao intenso crescimento do tubo germinativo.

Para determinar a germinação conidial, avaliou-se microscopicamente (200x) 100 conídios por gota depositada sobre o celofane. Conídios germinados foram considerados aqueles que apresentavam apressório séssil ou um tubo germinativo maior que a largura do próprio conídio.

Os conídios germinados foram classificados em nove categorias, de acordo com o número e a característica das estruturas emitidas: A) Conídio germinado sem apressório (Ap); B) Conídio com somente um Ap séssil; C) Conídio com somente um Ap pedicelado; D) Conídio com um Ap séssil + um ou mais tubos germinativos (TGs); E) Conídio com um Ap pedicelado + um ou mais TGs; F) Um Ap séssil + um Ap pedicelado; G) Dois Aps sésseis; H) Dois Aps pedicelados; I) Conídio com três Aps. Definiu-se como apressório pedicelado aquele formado na extremidade de um tubo germinativo longo, ou seja, maior que 10 µm (Araújo, 2010). Os apressórios sésseis, portanto, foram os que se formavam na extremidade de tubos germinativos menores que 10 µm.

Avaliou-se microscopicamente a presença de melanina nos apressórios dos conídios germinados, a cada duas horas (6-16h), conforme a metodologia de Oh et al.

(1998). Estas estruturas foram classificadas em apressórios melanizados (maturados) e apressórios hialinos (imaturados), dependendo da absorção do Azul de Amann.

Cada repetição consistiu na contagem de 100 conídios por gota. O experimento foi disposto em delineamento completamente casualizado, com três repetições por tratamento. Os dados foram submetidos ao teste t ($P < 0,05$), utilizando-se o programa computacional STATISTICA 6.0. O ensaio foi repetido independentemente cinco vezes, obtendo-se resultados semelhantes. Neste trabalho são apresentados os resultados de um desses experimentos.

A germinação dos conídios iniciou com duas horas de incubação e atingiu 100% às 10h e 8h, na testemunha e ulvana, respectivamente. Ulvana não diferiu estatisticamente da testemunha, exceto às 8h, quando apresentou transientemente cerca de 5% a mais de conídios germinados.

Quanto à classificação dos conídios, a maioria pertenceu às categorias de A a F (Figura 1). As categorias G, H não foram encontradas e a categoria I teve frequência menor que 0,06%.

O número de conídios germinados sem apressório foi maior no tratamento com ulvana até as 10h. A máxima porcentagem de conídios germinados classificados na categoria A (sem apressórios) foi observada às 4h e 8h, com 27% e 70%, na testemunha e ulvana, respectivamente (Figura 1A).

A formação do apressório séssil na testemunha iniciou com 4h, atingindo no máximo 80%, às 8h. Em ulvana atingiu no máximo 25%, às 6h (Figura 1B). Apressórios pedicelados foram menos frequentes que os sésseis. A porcentagem de conídios classificados na categoria C (um apressório pedicelado) foi até 90% maior no tratamento com ulvana, entre 8 e 10h de incubação. A partir de 10h, ambos os tratamentos apresentaram comportamento semelhante (Figura 1C).

O segundo tubo germinativo iniciou seu crescimento a partir das 8h de incubação para o tratamento com ulvana e 10h para a testemunha. Após 12h, a testemunha superou o tratamento com ulvana para esta categoria (Figura 1D).

A partir de 8h e 10h de incubação, o número de conídios germinados com um apressório pedicelado e um ou mais tubos germinativos aumentou no tratamento com ulvana e testemunha, respectivamente (Figura 1E).

As frequências de conídios germinados com um apressório séssil e outro pedicelado aumentaram nos dois tratamentos até 12h, porém na ulvana foi até 74% maior (Figura 1F).

Os primeiros apressórios melanizados foram observados com 8 e 10h de incubação, representando aproximadamente 35 e 25% do total de apressórios formados durante este período, na testemunha e em ulvana, respectivamente. A porcentagem de conídios com somente um apressório melanizado aumentou gradativamente no decorrer das horas e o tratamento com ulvana (Figura 2B) exibiu valores até 74% inferiores à testemunha (Figura 2A). Às 14 e 16h,

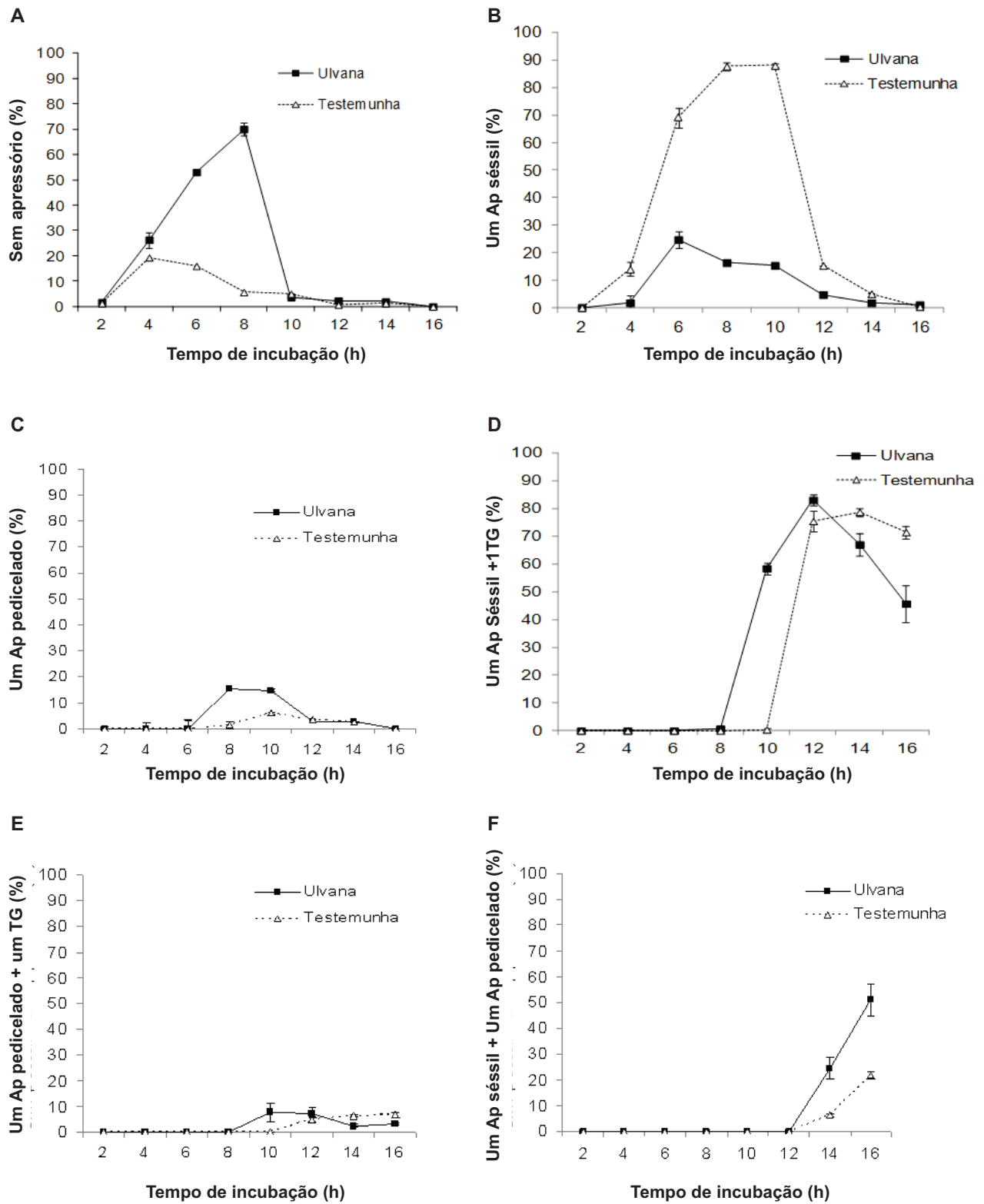


FIGURA 1 - Porcentagem de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* germinados em água ou ulvana, de acordo com as estruturas emitidas no decorrer das horas de incubação a 25°C.

■ 1 Ap hialino +1 Ap melanizado □ 2 Aps hialinos ■ 1 Ap melanizado □ 1 Ap hialino

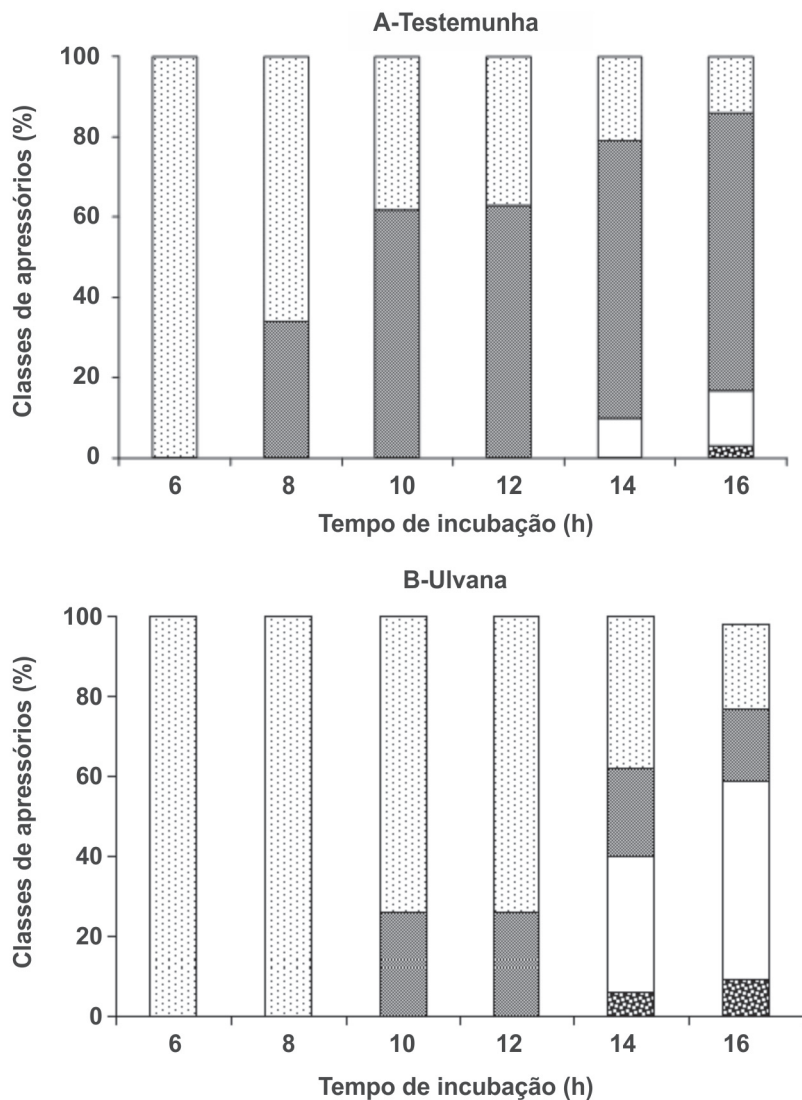


FIGURA 2 - A. Distribuição de classes de apressórios melanizados de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* germinados em água ou B. ulvana ao longo das horas de incubação.

aproximadamente 70% dos apressórios eram melanizados na testemunha, enquanto na ulvana 20%.

Conídios com dois apressórios foram observados apenas a partir das 12h de incubação, sendo na maioria hialinos (Figura 3). Dentre estes, a proporção de conídios contendo dois apressórios hialinos no tratamento ulvana foi aproximadamente quatro vezes maior que na testemunha. A proporção de conídios com dois apressórios, sendo um deles melanizado, foi duas vezes maior no tratamento ulvana, às 16h. Nenhum conídio com dois apressórios melanizados foi observado até este momento.

O entendimento minucioso do processo de infecção por *C. gloeosporioides* é um dos passos para compreender os mecanismos de ação de compostos que controlam a MFG. Neste trabalho, foram encontradas evidências de que ulvana pode afetar diretamente a formação e o desenvolvimento de estruturas pré-infectivas de *Colletotrichum*.

O uso de membranas de celofane foi adequado para monitorar o desenvolvimento de estruturas pré-infectivas. Sua aplicação vem obtendo sucesso no estudo de apressórios de fungos, tais como *Magnaporthe grisea* (Kamakura et al., 1999; Clargeot et al., 2001; Fudal et al., 2007) e mesmo *C. gloeosporioides*/*Glomerella cingulata* da maçã (Shane & Sutton, 1981). Assim como para Shane & Sutton (1981), a germinação de conídios atingiu 100% com 10h de incubação, sobre celofane, mostrando que os conídios desse fungo germinam com facilidade sobre superfícies inertes. Nestas condições, o polissacarídeo não afetou a capacidade germinativa de *C. gloeosporioides*. Sobre superfície foliar de feijoeiro, Borsato et al. (2010) também não encontraram efeito da ulvana sobre a germinação de uredósporos (maior que 50%). Por outro lado, Paulert et al. (2009) relataram um acréscimo de 31% na taxa de germinação de *C. lindemuthianum* em lâminas escavadas,

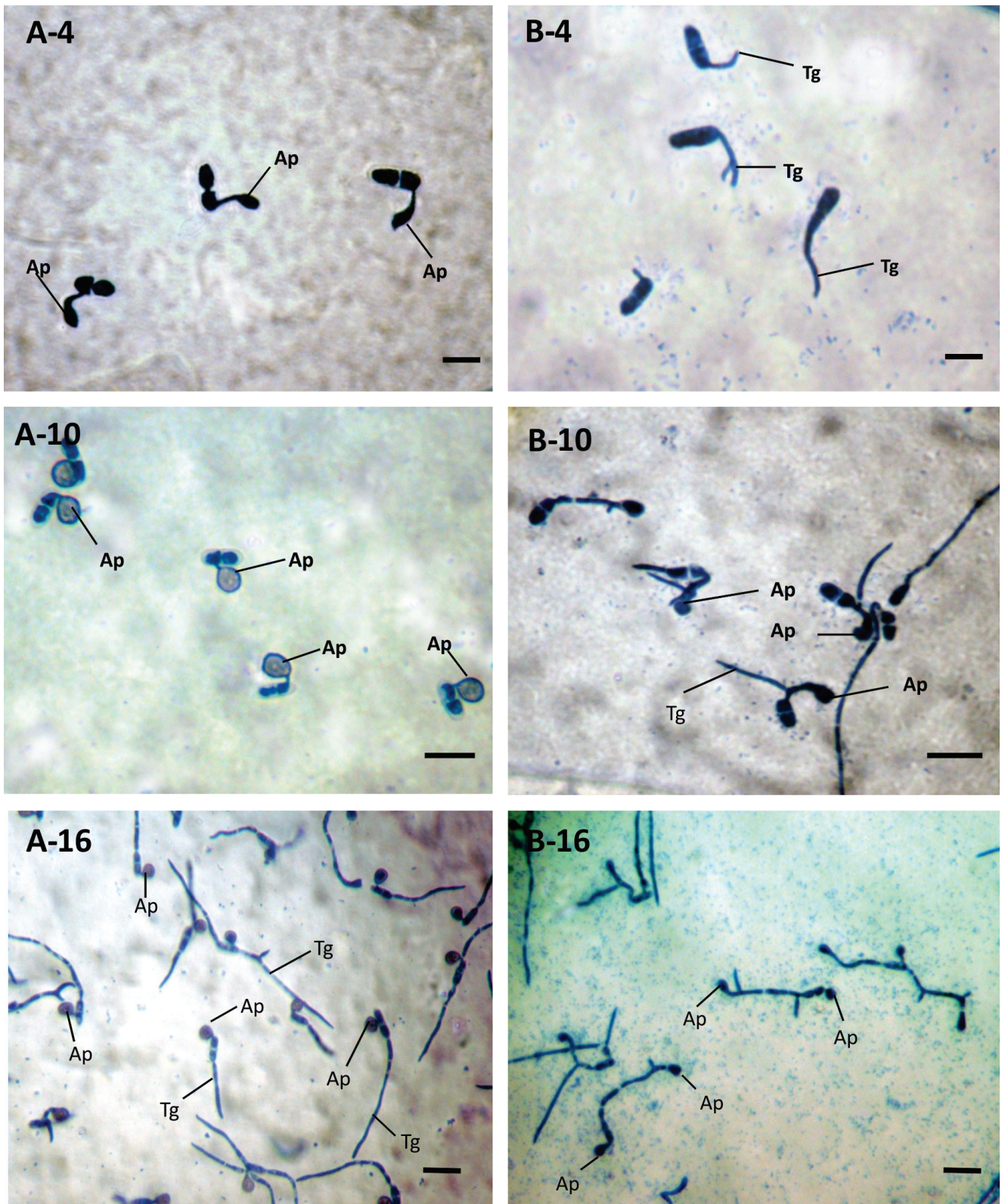


FIGURA 3 - A. Processo de formação de tubo germinativo (Tg) e apressório (Ap) em membrana de celofane, após 4, 10 e 16 horas de incubação, por conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* germinados em água ou **B.** ulvana. Barra = 10 µm.

com a adição de ulvana. Vários fatores, como a presença de inibidores endógenos, matriz extracelular, presença de nutrientes, a idade e o estado nutricional do fungo (Shisler et al., 1991; Pereira et al., 1999) afetam a germinação de *Colletotrichum*. Shisler et al. (1991) relatam que conídios com menor capacidade de germinar o fazem mais eficientemente sobre superfície de folhas, onde existe uma maior disponibilidade de nutrientes que sobre celofane.

Logo nas primeiras horas de incubação em celofane, os conídios foram estimulados à formação de apressórios, na sua maioria sésseis. Isto vai ao encontro das características descritas para esta espécie de *Colletotrichum* (Oh et al., 1998; Shisler et al., 1991).

O processo de emissão do tubo germinativo é energeticamente dispendioso, exaurindo rapidamente as reservas nutritivas dos conídios (Ferreira et al., 2006). Assim, na ausência de nutrientes, o fungo é rapidamente estimulado a formar apressórios numa tentativa de obtê-los de seu hospedeiro. A ulvana pode fornecer monossacarídeos (Paulert et al., 2009) que estimulam o crescimento do tubo germinativo. Isso explicaria a alta porcentagem de conídios germinados sem apressório, por volta das 8h de incubação. A diferenciação do tubo germinativo em apressório é estimulada pela ausência de nutrientes exógenos (Dean, 1997; Shisler et al., 1991, Pereira et al. 2009). Provavelmente por isso, a ulvana estimulou o crescimento do tubo germinativo e atrasou sua diferenciação em apressório. Também, Araújo (2010) observou um aumento de conídios germinados e menor formação de apressórios de *C. gloeosporioides* em folhas de macieira tratadas com o polissacarídeo.

A porcentagem de conídios germinados com dois apressórios foi cerca de duas vezes maior para os conídios tratados com ulvana, às 16h, indicando que o polissacarídeo pode estimular a formação do segundo apressório.

Este monitoramento talvez ajude a explicar as contradições presentes na literatura, onde nutrientes ora são relatados como inibidores da diferenciação do apressório (Shisler et al., 1991) e outras vezes, como estimuladores (Bonaldo & Pascholati, 2007; Slade et al., 1986). Assim, num momento inicial, a presença de nutrientes atrasou a formação do apressório. Posteriormente, quando esse suprimento de nutrientes tornou-se mais escasso, a diferenciação dos tubos em segundo apressório foi facilitada pela melhor condição nutricional do fungo.

Apressórios recém-formados são hialinos e, posteriormente, tornam-se melanizados, devido à maturação destas células especializadas de infecção (Nesher et al., 2008). Como a ulvana estimulou a formação do segundo apressório e retardou a melanização tanto deste, quanto do primeiro, isso explicaria sua interferência na distribuição de classes de apressórios ao longo do tempo (Figura 1) e no aumento paralelo de conídios germinados com dois apressórios.

A formação mais acelerada do segundo apressório foi associada ao atraso na melanização do primeiro apressório. O tubo germinativo iniciou a diferenciação em segundo apressório quando geralmente o primeiro ainda estava imaturo

(hialino). Este atraso ou inibição da melanização do apressório pode ter sido devido a fatores nutricionais, estimulando o crescimento ativo do tubo germinativo e/ou inibição da síntese de melanina. Há compostos, como a carpropamida (Kurahashi et al., 1998), que podem inibir a síntese de melanina (Jacobson, 2000) sem afetar a germinação de conídios e o número de apressórios formados (Thieron et al., 1998). Contudo, de encontro a estes autores, a inibição da melanização observada foi somente parcial. Isso indica que o mais provável seja que a ulvana somente cause um atraso na melanização, devido às questões nutricionais.

Na tentativa de infectar o hospedeiro, *C. gloeosporioides* emite um único tubo germinativo, e caso não tenha sucesso na penetração, pode tentar formar um segundo tubo. Estudos em tecidos vegetais têm demonstrado que este segundo tubo germinativo geralmente falha na penetração, pois está nutricionalmente debilitado (O'Connell et al., 2000). Assim, é possível que o atraso na melanização do primeiro apressório reduza a sua capacidade de penetração (Kubo et al., 1991) e, conseqüentemente, estimule a formação do segundo apressório. Contudo, mais estudos são necessários para esclarecer se estas modificações contribuem para controle da MFG.

AGRADECIMENTOS

Marciel J. Stadnik agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela bolsa de produtividade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araújo L, Stadnik MJ (2013) Cultivar-specific and ulvan-induced resistance of apple plants to *Glomerella* leaf spot are associated to an enhanced activity of peroxidases. *Acta Scientiarum* (no prelo).
- Araújo L, Stadnik MJ (2011) Processo infeccioso e atividade de enzimas em plântulas de macieira de genótipo resistente ou suscetível à mancha foliar de *Glomerella* causada por *Colletotrichum gloeosporioides*. *Tropical Plant Pathology* 36:241-248.
- Araújo L (2010) Mecanismos de resistência inata e induzida por ulvana à infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., agente causal da Mancha Foliar de *Glomerella* em macieira (*Malus domestica* Borkh.). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis SC, Brasil.
- Araújo L, Stadnik MJ, Borsato LC, Valdebenito-Sanhueza RM (2008) Fosfito de potássio e ulvana no controle da mancha foliar da gala em macieira. *Tropical Plant Pathology* 33:148-152.
- Bonaldo SM, Pascholati SF (2007) Efeito de frações parcialmente purificadas de *Saccharomyces cerevisiae* na germinação de conídios e formação de apressórios por *Colletotrichum sublineolum* e *Colletotrichum lagenarium*. *Summa Phytopathologica* 33:233-238.
- Borsato LC, Di Piero RM, Stadnik MJ (2010) Mecanismos de defesa eliciados por ulvana contra *Uromyces appendiculatus* em três cultivares de feijoeiro. *Tropical Plant Pathology* 35:318-322.
- Clargeot P, Gourgues M, Cots J, Laurans F, Latorse M, Pépin R, Tharreau D, Nottoghem J, Lebrun M (2001) PLS1, a gene

- encoding a tetraspanin-like protein, is required for penetration of rice leaf by the fungal pathogen *Magnaporthe grisea*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 98: 6963- 6968.
- Cluzet S, Torregrosa C, Jacquet C, Lafite C, Fournier J, Mercier L, Salamagne S, Briand X, Esquerré-Tugayé MT, Dumas B (2004) Gene expression profiling and protection of *Medicago truncatula* against a fungal infection in response to an elicitor from green algae *Ulva* spp. Plant, Cell and Environment 27:917-928.
- Dean RA (1997) Signal pathways and appressorium morphogenesis. Annual Review of Phytopathology 35:211-234.
- Ferreira EM, Alfenas AC, Maffia LA, Mafia RG (2006) Eficiência de fungicidas sistêmicos para o controle de *Cylindrocladium candelabrum* em eucalipto. Fitopatologia Brasileira 31:469-475.
- Fudal I, Collemare J, Böhnert HU, Melayah D, Lebrun M (2007) Expression of *Magnaporthe grisea* avirulence Gene *ACE1* is connected to the initiation of appressorium-mediated penetration. Eukaryotic Cell 6:546-554.
- Guzzo SD (2001) Ação protetora do Acibenzolar-S-Methyl em plantas de cafeeiro contra ferrugem. Arquivos do Instituto Biológico 68:89-94.
- Jacobson ES (2000) Pathogenic roles of fungal melanin. Clinical Microbiology Review 13:708-717.
- Jaulneau V, Lafitte C, Jacquet C, Fournier S, Salamagne S, Briand X, Esquerré-Tugayé MT, Dumas B (2010) Ulvan, a sulfated polysaccharide from green algae, activates plant immunity through the jasmonic acid signaling pathway. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2010:1-11.
- Katsurayama Y, Boneti JIS (2009) Manejo das doenças de verão da macieira no sul do Brasil In: Stadnik MJ (Ed.) Manejo Integrado de Doenças da Macieira. Florianópolis SC. Editora CCA-UFSC. pp. 45-64.
- Kamakura T, Xiao J, Choi W, Kochi T, Yamaguchi S, Teraoka T, Yamaguchi I (1999) cDNA subtractive cloning of genes expressed during early stage of appressorium formation by *Magnaporthe grisea*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 63:1407-1413.
- Kubo Y, Nakamura H, Kobayashi K, Okuno T, Furasawa I (1991) Cloning of melanin biosynthetic gene essential for appressorial penetration of *Colletotrichum lagenarium*. Molecular Plant-Microbe Interactions 4:440-445.
- Kurahashi Y, Araki Y, Kimbara T, Pontzen R, Yamaguchi I (1998) Intermediated accumulation and inhibition sites of Carpropamid in the melanin biosynthesis pathway of *Pyricularia oryzae*. Journal of Pesticide Science 23:22-28
- Nesher I, Barhoom S, Sharon A (2008) Cell cycle and cell death are not necessary for appressorium formation and plant infection in the fungal plant pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. BMC Biology 6:1-11.
- O'Connell RJ, Perfect SE, Hughes HB, Caraziniga R, Bailey JA (2000) Dissecting the cell biology of *Colletotrichum* infection processes. In: Prusky D, Freeman S, Dickman MB (Eds.) *Colletotrichum: Host Specificity, Pathology and Host-Pathogen Interaction*. St. Paul EUA. APS Press. pp. 57-77.
- Oh B, Kim KD, Kim YS (1998) A microscopic characterization of the infection of green and red pepper fruits by an isolate of *Colletotrichum gloeosporioides*. Journal of Phytopathology 146:301-303.
- Paulert R, Talamini V, Cassolato JEF, Duarte MER, Noseda MD, Junior AS, Stadnik MJ (2009) Effects of sulfated polysaccharide and alcoholic extracts from green seaweed *Ulva fasciata* on anthracnose severity and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Journal of Plant Diseases and Protection 116:263-270.
- Pereira IS, Abreu MS, Alves E, Ferreira JB (2009) Estudos histopatológicos da interação *Colletotrichum gloeosporioides*-cafeeiro. Bragantia 68:117-123.
- Shane WW, Sutton TB (1981) Germination, appressorium formation, and infection of immature and mature apple fruit by *Glomerella cingulata*. Phytopathology 71:454-457.
- Shisler DA, Jackson MA, Bothast, RJ (1991) Influence of nutrition during conidiation of *Colletotrichum truncatum* on conidial germination and efficacy in inciting disease in *Sesbania exaltata*. Phytopathology 81: 458-461.
- Slade SJ, Swinburne RT, Archer AS (1986) The role of a bacterial siderophore and of iron in the germination and appressorium formation by conidia of *Colletotrichum acutatum*. Journal of General Microbiology 132:21-26.
- Thieron M, Pontzen R, Kurahashi Y (1998) Carpropamid: A rice fungicide with two modes of action. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer 51:257-278.
- Wharton PS, Uribeondo JD (2004) The biology of *Colletotrichum acutatum*. Anales del Jardín Botánico de Madrid 61:3-22.

TPP 435 - Recebido 27 Outubro 2011 - Aceito 3 Setembro 2012
 Editor de Seção: Silvaldo Felipe da Silveira