

ENSAIO TOXICOLÓGICO CLÍNICO FASE I COM O ANTIVIRAL TÓPICO CELODENINA NO TRATAMENTO DE HERPES LABIAL RECORRENTE

Mônica Lorena Dias Meirelles da Cunha¹
Maria do Socorro França Silva²
Marçal Queiroz Paulo³
Melissa Negro Dellacqua⁴
Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz⁵

RESUMO

Coutarea hexandra (Jacq) K. Shum, também conhecida como murta-do-mato, quina, quina-quina é popularmente utilizada como anagésico, anti-inflamatório e antiviral. A partir do extrato etanólico das cascas do seu caule, foi sintetizado o neoflavonóide 5,7-diacetoxi-4-arilcromano, denominado de celodenina e utilizado como princípio ativo de um creme dermatológico para tratamento do herpes labial. O objetivo deste trabalho foi realizar ensaio clínico fase I com esta nova formulação, via tópica, em voluntários sadios. A coleta de dados foi realizada após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley – HULW, sob o Protocolo nº 016/11. Realizou-se um ensaio clínico fase I, com 30 indivíduos sadios (15 homens e 15 mulheres), os quais aplicaram o creme na face uma vez ao dia, à noite, durante 4 semanas. Exames laboratoriais foram realizados antes e após o tratamento, com o objetivo de detectar possíveis alterações decorrentes da utilização do creme, e os sujeitos foram avaliados clinicamente durante o decorrer das quatro semanas do ensaio clínico, para investigar quaisquer efeitos adversos notificados pelos participantes. As análises hematológicas e bioquímicas não evidenciaram valores alterados, tanto para as variáveis hematológicas como para as bioquímicas entre os tempos e grupos. Foram relatadas algumas reações adversas como ressecamento nasal (7%), ardor (13%), eritema (7%) e formigamento (7%), mas o número de voluntários acometidos foi pequeno, além do que os mesmos foram referidos nas primeiras semanas do estudo, sendo bem tolerados sem necessidade de tratamento específico, desaparecendo espontaneamente. Estes resultados sugerem baixa toxicidade do produto, demonstrando sua segurança na dose e via de administração testadas, e servem de base para a realização de estudos futuros destinados à avaliação da eficácia terapêutica da celodenina no tratamento do herpes simples labial.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Ensaio clínico fase I. Herpes labial.

¹ Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, Brasil. Doutora do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Endereço: Rua Padre Ayres, 588, apto 1501, Residencial Quebec, Miramar, João Pessoa – PB. CEP: 58043-260. Telefone: (83)9444-7339. E-mail: mmonicalorenadias@gmail.com.

² Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa – PB, Brasil. Professora Adjunta I do Centro de Biotecnologia da UFPB.

³ Centro de Ciências Exatas e da Natureza – PB, Brasil. Professor associado III da UFPB.

⁴ Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina – PE, Brasil. Professora Adjunta I da Universidade Federal do Vale do São Francisco, Brasil

⁵ Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, Brasil. Professora Associada IV da UFPB.

INTRODUÇÃO

Antes da “era sintética”, no início do ano de 1900, aproximadamente 80% dos remédios de origem vegetal eram obtidos a partir de raízes, cascas e folhas.¹ O isolamento e identificação de substâncias ativas a partir de plantas medicinais levaram ao surgimento dos primeiros fármacos, e atualmente a maior parte daqueles empregados na produção de medicamentos deriva direta ou indiretamente de princípios ativos isolados a partir de plantas.²

O creme dermatológico utilizado no estudo foi denominado celodenina e contém na sua formulação o 5,7-diacetoxi-4-arilcromano, produto final de reações sintéticas cujo reagente de partida, originou-se do extrato etanólico das cascas do caule de *Coutarea hexandra* (Jacq) K. Shum. Estudos, *in vitro*, demonstraram potentes atividades anti-inflamatória, antiviral e antinoceptiva do referido composto, justificando sua indicação para o tratamento de afecções dermatológicas e inflamatórias, como o herpes labial recorrente.³

O vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) é o principal agente etiológico das lesões vesiculares na região orofacial, enquanto o vírus herpes simplex 2 (HSV-2) é a causa principal das lesões na região genital. Estes, podem se manifestar clinicamente, como primoinfecção ou como infecção recorrente, provocando o surgimento das lesões herpéticas características que são eritemato-vesiculosas e em poucos dias, transformam-se em pequenas úlceras, precedidas de sintomas prodômicos que incluem ardência, prurido, formigamento e dor.⁴⁻⁷

Embora a infecção pelo HSV tenha um curso rápido, muitas vezes provoca dor, sinais e sintomas inflamatórios interferindo com o prazer da vida e contribuindo para agravar problemas de insegurança e ansiedade, oriundos do abalo à autoestima ocasionado pelas lesões.⁸⁻¹¹ Uma das características únicas desta patologia é a capacidade de promover infecção latente e recorrente, o que predispõe o hospedeiro a episódios de reativação viral e promove o potencial aumento da transmissão da patologia.^{12,13}

Derivados de plantas têm sido utilizados no tratamento de diversas doenças de pele. O objetivo deste estudo foi avaliar a toxicologia clínica, fase I, do creme dermatológico cujo princípio ativo é a celodenina, identificando possíveis efeitos adversos ou colaterais, e a segurança do referido composto em voluntários saudáveis com seguimento clínico e exames laboratoriais antes e após o estudo respectivamente.

MATERIAL E MÉTODOS

O material botânico utilizado nos experimentos foi as cascas do caule de *Coutarea hexandra* (Jacq) K. Shum, coletado em 1998, no município de Santa Rita – Paraíba. Uma exsicata representativa foi depositada no Herbário Lauro Xavier com o número 4296-PB do Departamento de Ecologia e Sistemática do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

O creme dermatológico utilizado no estudo foi denominado celodenina cuja formulação encontra-se especificada abaixo, e foi especialmente preparado no Laboratório de Química de Produtos Naturais da UFPB.

Cada 10 gramas do creme dermatológico 4% contém:

5,7-diacetoxi-4-arilcromano	0,40g
Conservantes- parabenos	0,02g
Base cremosa (O/A).	qsp

O ensaio toxicológico clínico fase I, foi desenvolvido no período de janeiro a maio de 2012 envolvendo 30 indivíduos, e consiste em um estudo em pequenos grupos de pessoas voluntárias, em geral saudáveis, de um novo princípio ativo ou nova formulação, visando estabelecer uma evolução preliminar da segurança e do perfil farmacocinético e farmacodinâmico,¹⁴ seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos respaldando-se na legislação vigente contidas nas Resoluções nº 466/12 e nº 251/97 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) do Ministério da Saúde, após submissão e devida autorização do Comitê de Ética do Hospital Universitário Lauro Wanderley da UFPB, protocolo nº 016/11.^{15, 16}

Foram convidados 38 indivíduos, de ambos os sexos, na faixa etária de 18 a 65 anos, porém 8 abandonaram a pesquisa por motivos particulares, contabilizando 8 perdas. Destes, participaram do estudo 30 indivíduos considerados clinicamente saudáveis, após minuciosa anamnese e exame físico completo foram divididos em dois grupos, e, recrutados da comunidade universitária da UFPB e do quadro de funcionários do Hospital Universitário Lauro Wanderley, através de campanhas nas referidas instituições. Foram considerados critérios de exclusão: disfunção hepática, renal, diabetes, cardiopatias, gravidez, alcoolismo, tabagismo ou o uso de medicação anti-herpética durante a recorrência do estudo.

Os 30 participantes da pesquisa após assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram instruídos a comunicarem ao pesquisador qualquer sinal ou sintoma clínico que porventura apresentarem e avaliados laboratorialmente, antes e após o término do estudo, através de hemograma completo, glicemia, creatinina sérica, uréia, aspartato aminotransferase (AST), e alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina e colesterol total. Para as mulheres, foi solicitado β -HCG (gonadotrofina coriônica humana beta). Nos dias previstos na agenda de acompanhamento, os voluntários foram avaliados clinicamente e responderam um questionário com o objetivo de mapear possíveis reações adversas, sugestivas de toxicidade.

Os dois grupos (15 homens e 15 mulheres) foram tratados diariamente, no turno da noite, por via dermal, com aproximadamente 0,5 g do creme dermatológico celodenina 4%, por um período de 4 semanas e semanalmente cada voluntário foi avaliado pelo pesquisador.

Para a análise dos dados foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 6.0, utilizando o teste t-pareado sendo os resultados considerados significativos quando apresentaram um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos que finalizaram o estudo, 50% era do sexo feminino e 50% do sexo masculino, correspondendo a $n=15$ em cada grupo da amostra. Em relação à faixa etária a distribuição observada foi de 66,7% dos voluntários entre 20 e 40 anos, 26,7% entre 40 e 55 anos e 6,6% entre 50 e 65 anos. No tocante ao peso corpóreo, 13,3% ($n=4$) referiram peso entre 50 e 60 Kg, 53,3% ($n=20$) entre 60 e 70 Kg, 26,6% ($n=8$) entre 70 e 80 Kg e 6,6% ($n=2$) declararam-se acima de 80 Kg. Já, quando questionados em relação à altura, 77% dos participantes referiram estatura acima de 1,60 m. Quanto ao nível de escolaridade, a maioria 60% ($n=18$) possuía ensino médio e quanto à atividade profissional, encontramos muita diversidade, com predomínio da categoria estudante (28,5%).

Tabela 1 - Características e condições inerentes dos voluntários selecionados

Sexo	Feminino	15 (50%)
	Masculino	15 (50%)
Idade (anos)	Faixa etária:	
		20 – 40 anos (66,7%)
		40 – 55 anos (26,7%)
Peso corpóreo (Kg)		55 - 65 anos (6,6%)
	50 - 60	13,3%
	60 - 70	53,3%
	70 - 80	26,6%
Estatura (m)	Acima 80	6,6%
	Acima de 1,60 m	77%
	Abaixo de 1,60 m	23%

A Tabela 2 registra os resultados hematológicos dos voluntários antes e após o término do estudo. Para as referidas variáveis, não foram observadas alterações significantes em relação ao gênero e ao período do estudo, de acordo com o teste estatístico, em relação aos valores normais destes parâmetros obtidos inicialmente.

Tabela 2 - Valores das variáveis hematológicas por gênero, antes e após o término do estudo. Teste t-pareado.

Variantes Hematológicas (valores normais)	Homens		Mulheres	
	Antes	Após	Antes	Após
Hemácias (milhões/mL) H - (4,5 – 6,0) M - (3,9 – 5,3)	5,1 ± 0,3	5,0 ± 0,3	4,4 ± 0,5	4,5 ± 0,4
Hemoglobina (g/dL) H - (12,8 – 17,6) M - (12,0 – 15,6)	14,3 ± 0,9	14,6 ± 0,8	12,6 ± 1,2	12,9 ± 1,3
Leucócitos (mm ³) (4,0 – 11,0)	6953 ± 1259	7417 ± 1424	6877 ± 2592	6390 ± 2041
Neutrófilos (mm ³) (45 – 70 %)	50,4 ± 9,0	50,9 ± 7,3	55,7 ± 9,3	50,2 ± 13
Plaquetas (mil/mm ³) (150 - 450)	204227 ± 55559	197880 ± 43048	238240 ± 45293	231087 ± 48891

Os resultados dos parâmetros bioquímicos são apresentados na tabela 3 e para as referidas variáveis também não foram observadas alterações significantes em relação ao gênero e ao período do estudo.

Tabela 3 - Valores das variáveis bioquímicas por gênero, antes e após o término do estudo. (n=30). Teste t-pareado.

	Homens	Mulheres
--	--------	----------

Variantes Bioquímicas (valores normais)	Antes	Após	Antes	Após
Glicemia (mg/dL) (70 - 99)	91,2 ± 10,8	89,1 ± 9,0	86,8 ± 7,2	82,3 ± 6,7
Colesterol total (mg/dL) ≤ 200	193,5 ± 28,4	210,1 ± 37,4	178,2 ± 47,9	185,6 ± 30,1
TGO/AST (U/L) H - (10 - 39) M - (10 - 37)	25,0 ± 6,5	25,4 ± 7,6	18,3 ± 6,7	15,7 ± 3,8
TGP/ALT (U/L) H - (11 - 45) M - (10 - 37)	34,4 ± 13,4	37,5 ± 19,1	16,3 ± 4,5	17,2 ± 4,
Fosfatase alcalina (U/L) (27 - 100)	78,1 ± 38,4	78,4 ± 21,4	59,0 ± 16,5	64,2 ± 15,1
Ureia (mg/dL) H - (19 - 44) M - (14,9 - 40)	28,2 ± 6,2	29,2 ± 7,5	24,5 ± 7,4	24,7 ± 6,2
Creatinina (mg/dL) H (0,9 - 1,3);M (0,6-1,1)	0,88 ± 0,13	0,89 ± 0,11	0,67 ± 0,2	0,66 ± 0,1

Ressecamento nasal, ardor, eritema e formigamento no local da aplicação foram sintomas relatados, tanto em homens quanto mulheres, na primeira semana de uso tópico do creme celodenina 4% (tabela 4). Na observação feita na primeira semana de uso verificou-se que 7% das mulheres (1 caso) relatou ressecamento nasal. A presença de ardor foi reportada por 13% dos homens (2 casos) na primeira semana, bem como 7% deles queixaram-se de eritema e formigamento. Destaca-se que, ao longo do tratamento com o referido creme, foram observadas poucas alterações nos sujeitos avaliados na primeira semana do estudo, e exceto as reações descritas acima, nenhuma outra manifestação foi detectada ao longo do tratamento.

Tabela 4 - Percentual da ocorrência de reações adversas nos voluntários em relação ao tempo do estudo.

Reações adversas	Tempo (semanas)			
	Primeira	Segunda	Terceira	Quarta
Ressecamento nasal	7%	0%	0%	0%
Ardência	13%	0%	0%	0%
Hiperemia	7%	0%	0%	0%
Formigamento	7%	0%	0%	0%

O isolamento de substâncias a partir de plantas medicinais levou ao surgimento dos primeiros fármacos, como a cocaína, codeína, digitoxina, quinina e morfina.¹⁷⁻¹⁹ Assim como estes, muitas outras substâncias, responsáveis pelos mais diversos processos terapêuticos, foram encontradas e, posteriormente, sintetizadas, dando origem aos inúmeros medicamentos existentes na atualidade.²⁰ O isolamento e caracterização de compostos farmacologicamente ativos de plantas medicinais continua até os dias atuais.²¹ Neste contexto, o neoflavonoide celodenina, foi isolado, identificado e sintetizado a partir das cascas do caule de *Coutarea hexandra* (Jacq) K. Shum, e utilizado para a formulação do creme dermatológico alvo deste estudo.³

Para investigar a toxicidade clínica fase I em seres humanos, do creme celodenina 4%, os voluntários foram submetidos a avaliações hematológicas e bioquímicas. Naquelas, verificou-se que todos os resultados apresentaram-se dentro dos valores de referência, não caracterizando diferenças significativas entre os grupos estudados e nem no decorrer do tratamento, refletindo inexistência de toxicidade, pois o sistema hematopoiético é extremamente sensível a atividades de agentes tóxicos, principalmente aqueles com potencial mutagênico ou citotóxico, resultando em alterações qualitativas ou quantitativas que podem limitar a utilização de fármacos e medicamentos. As alterações hematológicas podem refletir também, a atividade imunológica.²²

A função hepática (AST e ALT) foi avaliada, já que diversas substâncias são extensamente biotransformadas no fígado, sendo, portanto, bons marcadores da mesma.²² A fosfatase alcalina, por sua vez, é predominantemente encontrada no trato biliar e, também é um marcador para a disfunção hepática.²³ Neste estudo, não foram evidenciados valores alterados para as referidas variáveis entre os tempos e os grupos não evidenciando hepatotoxicidade.

O colesterol é uma molécula de grande importância presente em todas as células animais e em alimentos de origem animal e sua alta incidência tem sido associada a doenças cardiovasculares.²² Em relação ao perfil lipídico, observou-se que os valores do colesterol total estavam dentro dos parâmetros normais, tanto em relação ao tempo, quanto aos grupos do estudo.

Os valores de ureia e creatinina, importantes sinalizadores da função renal, estavam dentro dos parâmetros normais sem ocorrência de diferença significativa entre os tempos e entre os grupos.²⁴ Valores dentro dos limites da normalidade também foram observados na monitorização dos níveis glicêmicos nos participantes do estudo. As voluntárias participantes apresentaram negatividade nos resultados do β -HCG.

Ao longo do tratamento com o creme celodenina 4%, observou-se ressecamento nasal, formigamento, eritema e ardor, mas o número de voluntários acometidos foi pequeno, e os sintomas relatados ocorreram na primeira semana do estudo e não necessitaram de tratamento específico, desaparecendo espontaneamente. Desta forma, nos moldes do estudo realizado, o referido creme apresentou reações adversas de natureza leve e reversível, sendo bem tolerado pelos voluntários, e não foram evidenciados sinais ou sintomas sistêmicos que impeçam o seu uso pela população na dose e via de administração utilizada.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos demonstram que o creme celodenina 4% foi bem tolerado pelos voluntários, não promovendo alterações clínicas, hematológicas, bioquímicas

e reações adversas significativas, confirmando assim sua segurança para a população. O presente estudo servirá de base a ensaios clínicos fase II, necessários para confirmação da segurança e eficácia do composto, em pacientes portadores do herpes labial recorrente.

TOXICITY TEST CLINICAL PHASE I WITH TOPIC ANTIVIRAL CELODENINA IN THE TREATMENT OF RECURRENT HERPES LABIAL

ABSTRACT

Coutarea hexandra (Jacq) K. Shum, also known as myrtle of the woods, edge, edge-corner is popularly used as an analgesic, anti-inflammatory and antiviral. From the ethanol extract of the bark of its stem, was synthesized neoflavonoide 5,7-diacetoxy-4-arilcromano, called celodenina and used as active principle of a dermatological cream for treatment of herpes labialis. The aim of this study was clinical phase I trial with this new formulation topically in healthy volunteers. Data collection was performed after approval by the Research Ethics Committee of the University Hospital Lauro Wanderley - HULW under Protocol 016/11. We conducted a clinical trial phase I, with 30 healthy individuals (15 men and 15 women), who applied the cream on the face once a day, at night, for 4 weeks. Laboratory tests were performed before and after treatment, in order to detect possible changes resulting from the use of cream, and the subjects were clinically evaluated during the course of the four weeks of the trial, to investigate any adverse effects reported by the participants. The hematological and biochemical analyzes showed no abnormal values for both haematological variables as for biochemical between time and groups. Have been reported some adverse reactions such as nasal dryness (7%), burning (13%), erythema (7%) and tingling (7%), but the number of affected volunteers was small, in addition to the same were referred to in the first weeks the study, and well tolerated without specific treatment, disappearing spontaneously. These results suggest low toxicity of the product, demonstrating its safety in the dose and route of administration tested, and form the basis for future studies aimed to assess therapeutic efficacy of celodenina in the treatment of labial herpes simplex.

Key-words: Medicinal plants. Trial phase I. Herpes labialis.

REFERÊNCIAS

1. McChesney JD, Venkataraman SK, Henri JT. Plants natural products: Back to the future or into extinction? *Phytochemistry*. 2007;68:2015-22.
2. Monteiro ARM. Produtos à base de plantas dispensados em ervanárias para o emagrecimento: efeitos terapêuticos, toxicologia e legislação (dissertação de mestrado em Medicina Legal). Porto: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto; 2008. 176p.
3. Paulo MQ, Carvalho ML. Síntese de neoflavonoide 4% com propriedade antiviral: *Boletim Técnico*. João Pessoa; 1993.
4. Azulay RD, Azulay DR, Azulay-Abulafia L. *Dermatologia*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

5. Gama CRB, Passos MDL, Varella R, Lasmar R et al. Avaliação clínica da *Uncaria tomentosa* no tratamento e controle de lesões decorrentes de infecção pelo vírus herpes simplex. *J Bras Doenças Sex Transm.* 2010;22(4):215-21.
6. Sampaio SAP, Rivitti EA. *Dermatologia.* 3. ed. São Paulo: Artes Médicas; 2007.
7. Wolff K, Freedberg IM, Eisen AZ. *Fitzpatrick – Tratado de Dermatologia.* 7. ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2011.
8. Fatahzadeh M, Schwartz RA. Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *Clin Exp Dermatol.* 2007;32(5):625-30.
9. Freeman ML, Sheridan BS, Bonneau RH, Hendricks RL. Psychological Stress Compromises CD8+ T Cell Control of Latent Herpes Simplex Virus Type 1 Infections. *J Immun.* 2007;179:322.
10. Lafferty WE, Coombs RW, Benedetti J et al. Recurrences after oral and genital herpes simplex virus infection. Influence of site of infection and viral type. *N Engl J Med.* 1987;316:1444.
11. Trindade AKF, Queiroga AS, Silva DSC, Campos SEM et al. Herpes simples labial: um desafio terapêutico. *Com Ciências Saúde.* 2007;18(4):307-14.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso.* 8. ed. Brasília, 2010.
13. Fatahzadeh M, Schwartz RA. Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *Clin Exp Dermatol.* 2007;32(5):625-30.
14. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. *Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos.* Brasília, 2006.
15. Brasil. Conselho Nacional de Saúde. Resolução 466/12. Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. Disponível em: <<http://www.conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012/Reso466.pdf>>. Acesso em: 30 ago. 2014.
16. Brasil. Conselho Nacional de Saúde. Resolução 251/97. Normas de Pesquisa com Novos Fármacos, Medicamentos, Vacinas e Testes Diagnósticos Envolvendo Seres Humanos. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/bioetica/res25197.htm>>. Acesso em: 30 ago. 2014.
17. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat Prod Rep.* 2000;17(3):215-34.

18. Butler MS. The role of natural product chemistry in drug discovery. *J Nat Products*. 2004;67(2):214-5.
19. Samuelsson G. *Drugs of Natural Origin: a Textbook Pharmacognosy*, 5. ed. Stockholm: Swedish Pharmaceutical Press; 2004.
20. Montanari C A, Cass QB, Jardim IC, Leitão A et al. De óleos e unguentos aos fármacos modernos. *Rev Ci Hoje*. 2008;42(249):38-43.
21. Balunas MJ, Kinghorn AD. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci*. 2005;78: 431-41.
22. Lima AO, Soares JB, Greco J. *Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kooogan, 2002.
23. Henry JB. *Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais*. 8. ed. Rio de Janeiro: Manole; 1999.
24. Berne RM, Levy MN. *Fisiologia*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.

Recebido em: 24.09.14 Aceito em: 27.12.14
