

Resistencia antimicrobiana de *Salmonella* Typhi identificadas en el Estado de Pará, Brasil

Resistência antimicrobiana de *Salmonella* Typhi identificadas no Estado do Pará, Brasil

Antimicrobial resistance of *Salmonella* Typhi isolated in the State of Pará, Brazil

Cintya de Oliveira Souza

Seção de Bacteriologia e Micologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

Francisco Lúzio de Paula Ramos

Seção de Bacteriologia e Micologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

Chiara de Melo Mota

Clínica de Hemodiálise, CCI Nefro, Belém, Pará, Brasil
Central de Esterilização do Pará, Belém, Pará, Brasil

Leiliane Vulcão Souza dos Santos

Centro de Ensino Superior do Pará, Belém, Pará, Brasil

Maria Luiza Lopes

Seção de Bacteriologia e Micologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

RESUMEN

La resistencia antimicrobiana es un tema ampliamente estudiado en todos los géneros bacterianos, sobre todo entre agentes responsables por enfermedades epidémicas como la fiebre tifoidea. La incidencia de brotes contribuye al aumento abusivo de la administración errónea de antimicrobianos colaborando al surgimiento de muestras bacterianas resistentes. Por lo tanto, el presente estudio evaluó la resistencia de 44 muestras de *Salmonella* Typhi a los principales antimicrobianos utilizados en el tratamiento de la fiebre tifoidea. De las 44 muestras aisladas en el período de 2003 a 2005, diez (22,7%) fueron resistentes a por lo menos un antimicrobiano. Entre las diez muestras de *Salmonella* Typhi resistentes, se observó que nueve presentaron mono resistencia a la nitrofurantoína o a la tetraciclina. Apenas un caso de resistencia concomitante a dos drogas (cloranfenicol y nitrofurantoína) fue observado el año de 2005. La Región Norte, por ser considerada área endémica para fiebre tifoidea y haber presentado resistencia creciente en relación a los tres años en estudio, debe permanecer con el monitoreo de la resistencia de *Salmonella* Typhi a los antimicrobianos, principalmente al cloranfenicol, para garantizar que el mismo, continúe siendo el medicamento de elección para el tratamiento de la fiebre tifoidea en la Región, además de poseer bajo costo y buena aceptación del paciente al tratamiento.

Palabras clave: Fiebre Tifoidea; *Salmonella* Typhi; Pruebas de Sensibilidad Microbiana; Cloranfenicol.

INTRODUCCIÓN

La fiebre tifoidea es una enfermedad infecciosa potencialmente grave causada por la bacteria *Salmonella enterica* serovar Typhi^{3,15}. Se caracteriza por la fiebre prolongada, cefalea, mialgia, artralgia, anorexia, malestar general, alteraciones del tránsito intestinal (diarrea o constipación) y hepato y/o esplenomegalia. Si no se trata, la enfermedad puede evolucionar por semanas o hasta meses, resultando en complicaciones como perforación intestinal, hemorragia y confusión mental

progresiva, pudiendo llevar a óbito^{3,5}. La transmisión sucede principalmente por la ingesta de agua y alimentos contaminados con heces u orines de enfermos o portadores. La enfermedad es de distribución mundial, y como su forma de transmisión es la ruta fecal-oral, su incidencia es más frecuente en los países en desarrollo, en donde las condiciones de saneamiento básico y de educación sanitaria y ambiental son precarias o inexistentes^{3,11}.

El cloranfenicol está considerado como el medicamento de elección para el tratamiento de la fiebre tifoidea. Sin embargo, diversas publicaciones han informado acerca de la resistencia de muestras de *Salmonella* Typhi a altas concentraciones de cloranfenicol en diversos países de Asia y África, en proporciones elevadas, como en India (20%) y en Nigeria (25%). Otros antimicrobianos utilizados son: ampicilina, trimetropim sulfametoxazol, amoxicilina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, ofloxacina, ceftriaxona²².

Correspondencia / Correspondência / Correspondence:

Cintya de Oliveira Souza

Tv. Mauriti Vila Carmem, casa 01. Bairro: Pedreira

66080-650 Belém-Pará-Brasil

Tel.: 55 (91) 3214-2116 / 3214-2113 / 3254-5238 / 8145-3921

E-mail: cintyaoliveira@iec.pa.gov.br

En Brasil, los años de 2001 a 2006 se registraron 3.749 casos de fiebre tifoidea con 30 óbitos, siendo los mayores números registrados en las regiones Norte y Nordeste, con destaque para los estados do Acre (741 casos / 3 óbitos), Bahia (671 casos / 3 óbitos), Pará (665 casos / 3 óbitos), Maranhão (592 casos / 1 óbito) y Amazonas (333 casos / 3 óbitos). En 2008, el Brasil confirmó por criterios laboratoriales y clínico-epidemiológicos 239 casos de fiebre tifoidea y cuatro muertes a consecuencia de la enfermedad. Pará fue el segundo Estado con el mayor número de casos (42) precedido apenas por el Estado de Maranhão, que registró 75 casos⁴.

En Pará, brotes de fiebre tifoidea han sido registrados frecuentemente, sobre todo en el interior del Estado, como en los municipios de Óbidos, en 1997²¹, de Moju, en 1999¹⁶, y de Anajás, en 2001¹⁷, los que acometieron elevado número de personas, ocasionando trastornos a la salud pública de esos municipios.

La incidencia de esos brotes contribuye al aumento abusivo de la administración errónea de antimicrobianos, colaborando con el surgimiento de muestras bacterianas resistentes. El presente trabajo propone la determinación del perfil de resistencia a los antimicrobianos más utilizados en el tratamiento de la fiebre tifoidea, con el objetivo de acompañar, durante la serie histórica propuesta, el comportamiento de la resistencia de las muestras de *Salmonella Typhi* aisladas en Pará.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRAS

Se evaluaron 44 muestras de *Salmonella Typhi* aisladas de muestras clínicas de pacientes sintomáticos, siendo 25 provenientes de hemocultivos y 19 de coprocultivos. Las muestras fueron aisladas e identificadas en la Sección de Bacteriología y Micología del Instituto Evandro Chagas, por métodos convencionales de cultivo, identificación bioquímica y serológica segundo recomendaciones de Ewing⁹ y Kauffmann¹⁴, durante el período de 2003 a 2005.

TEST DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

La sensibilidad a los agentes antimicrobianos fue evaluada por el método de disco difusión, de acuerdo con Bauer et al² y las recomendaciones de *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*⁶.

Fueron analizados 11 antimicrobianos: amoxicilina y ácido clavulánico/AMC (20/10 g); ampicilina/AMP (10 g); cloranfenicol/C (30 g); ceftazidima/CAZ (30 g); ciprofloxacina/CIP (5 g); gentamicina/CN (10 g); cefotaxima/CTX (30 g); nitrofurantoína/F (300 g); ácido nalidíxico/NA (30 g); sulfametoxazol + trimetropim/ SXT (23,75 /1,25 g) y tetraciclina/T (30 g). Cepas estándar de *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) se utilizaron como control de calidad de los discos antimicrobianos.

RESULTADOS

Los resultados del presente estudio evidenciaron que, de las 44 muestras de *Salmonella Typhi*, 22,7% (10/44) fueron resistentes a por lo menos un antimicrobiano. Durante la serie histórica, se observó que, el año de 2003, de las cuatro muestras aisladas, ninguna presentó resistencia antimicrobiana. En 2004, seis de las 30 (20%) muestras fueron resistentes a los antimicrobianos analizados. El mayor número de muestras resistentes fue observado en 2005: cuatro de las 10 muestras evaluadas (40%).

Entre las 44 muestras de *Salmonella Typhi* evaluadas, se observa, en la tabla 1, que todas las muestras presentaron sensibilidad a los antimicrobianos ampicilina, amoxicilina + ácido clavulánico, ceftazidima, gentamicina y sulfametoxazol + trimetropim. El mayor porcentual de resistencia ocurrió con relación al antimicrobiano nitrofurantoína (15,9%), seguido por los antimicrobianos cloranfenicol, ácido nalidíxico y tetraciclina con un porcentaje de 2,28%, cada. Fue observada resistencia intermedia a los antimicrobianos ciprofloxacina (4,45%), ceftriaxona, nitrofurantoína y tetraciclina (2,28%).

Tabla 1 – Frecuencia absoluta y relativa de la susceptibilidad de *Salmonella Typhi* a los antimicrobianos

Antimicrobianos	Sensibles		Intermedios		Resistentes	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Ampicilina/AMP	44	100	–	–	–	–
Amoxicilina + Ác. Clavulánico/ AMC	44	100	–	–	–	–
Cloranfenicol/C	43	97,72	–	–	1	2,28
Ceftazidima/CAZ	44	100	–	–	–	–
Ciprofloxacina/CIP	42	95,45	2	4,45	–	–
Gentamicina/CN	44	100	–	–	–	–
Cefotaxima/CTX	43	97,72	1	2,28	–	–
Nitrofurantoína/F	36	81,8	1	2,28	7	15,90
Ácido nalidíxico/NA	43	97,45	–	–	1	2,28
Sulfametoxazol + Trimetropim/SXT	44	100	–	–	–	–
Tetraciclina/TE	42	95,44	1	2,28	1	2,28

Nº: Número absoluto; Señal convencional utilizado: – Dato numérico igual a cero no resultante de redondeo.

Entre las diez muestras de *Salmonella Typhi* resistentes, apenas tres estándares de resistencia fueron observados. Nueve fueron de monorresistencia a la nitrofurantoina o a la tetraciclina. Apenas una muestra, aislada en 2005, fue resistente a dos drogas (cloranfenicol y nitrofurantoina).

DISCUSIÓN

La resistencia bacteriana es un asunto ampliamente estudiado, principalmente, cuando la enfermedad causada por el agente bacteriano tiene alto potencial de letalidad o endemidad. En el caso de la fiebre tifoidea, muchos estudios fueron conducidos en otros países; no obstante, en Brasil hay pocos relatos sobre resistencia antimicrobiana de *Salmonella Typhi*¹⁹. La mayoría de los estudios se dirige a los otros serovares de *Salmonella* asociadas con gastroenteritis humana y aislados de fuente ambiental, alimentaria y animal^{23,18,20}.

El consumo indiscriminado de antimicrobianos se torna uno de los principales factores determinantes de esta resistencia, principalmente en locales en donde la ocurrencia del agente/enfermedad es frecuente. El aumento del porcentual de resistencia en los tres años de este estudio (2003 a 2005) refuerza esta declaración, pues el Estado de Pará, así como otros Estados de la región Norte, es área endémica y registró, de 1997 a 2004, 4 brotes de fiebre tifoidea^{21,16,17}. La observación de esta resistencia suscita mayor rigor en el monitoreo de la resistencia antimicrobiana, pues esta acción es necesaria e fundamental para fines de vigilancia y control de la enfermedad.

Sin embargo, el panorama de resistencia observado en el presente estudio no compromete las opciones terapéuticas de primera y segunda elección instituidas para fiebre tifoidea, una vez que los resultados señalaron resistencia de 2,28% (1/44) para el cloranfenicol (primera elección), resistencia intermedia de 4,45% (2/44) para ciprofloxacina y sensibilidad de 100% para ampicilina, amoxicilina y trimetropim sulfametoxazol (segunda elección). Aun a despecho de los raros efectos colaterales, como la aplasia medular, el cloranfenicol todavía es la droga de elección para el tratamiento de la fiebre tifoidea debido a su bajo costo y respuesta terapéutica satisfactoria^{1,3}. Terapéutica esta, reforzada por los resultados de sensibilidades a los antimicrobianos encontrados en este estudio y en otros que demuestran que, aun después de 35 años, el estándar de sensibilidad de la *Salmonella Typhi* al cloranfenicol y a la ampicilina no sufrió cambios significativos^{7,8,12}.

Los resultados presentados por el monitoreo de la resistencia a los antimicrobianos realizado por la Organización Mundial de la Salud en 2005²⁰ evidencian que la resistencia a la nitrofurantoina es elevada, principalmente, entre *Salmonella Enteritidis*. A pesar de ocurrir con menos frecuencia, porcentuales de resistencia también son observados para otros serovares de *Salmonella*, incluso *Salmonella Typhi*. La nitrofurantoina es un antimicrobiano utilizado para el tratamiento de infecciones del tracto genitourinario²⁴ y, además de esta utilización, es ampliamente difundida en la medicina

veterinaria para tratamiento y profilaxis de infecciones en diversas especies animales destinadas al consumo humano (aves, porcinos, peces)¹³. Esa práctica llevaría a una presión en la selección de cepas resistentes de *Salmonella* presentes en los animales que, más tarde, serían transmitidas al hombre, pues la salmonelosis es considerada una enfermedad zoonótica. Eso, sin embargo, no estaría involucrado con muestras de *Salmonella Typhi* que es exclusivamente humana; aunque estudios detallados de la transferencia de resistencia antimicrobiana deben ser incentivados para elucidar este tema.

Otro caso de resistencia de *Salmonella Typhi* al cloranfenicol, en la Región Norte, ha sido relatado por Alecrim et al¹ en el Municipio de Coari, Estado de Amazonas. El paciente, luego de tratamiento de 16 días con cloranfenicol, presentó nuevamente los síntomas clínicos de la enfermedad y, después de nuevos exámenes, se confirmó la persistencia de la infección y el resultado de resistencia al cloranfenicol, por medio de antibiograma. A través de este caso, el autor relata que la resistencia a la droga debe ser considerada en todos los casos en que haya recaída de la enfermedad, excluyéndose otras causas comunes de recaída, como la mala calidad de la droga, la administración incorrecta, tiempo inadecuado de tratamiento y/o condición subyacente que no permita la eliminación bacteriana, como los casos de litiasis biliar.

La resistencia progresiva de la *Salmonella Typhi* a los antimicrobianos de primera elección terapéutica, principalmente al cloranfenicol, ha sido descrita en diversos lugares del mundo, tales como: México, India, Vietnam, Tailandia, Corea y Perú. En estos países también han sido descritos aislados esporádicos de *Salmonella Typhi* y *Salmonella Paratyphi* resistentes a la ceftriaxona y al ácido nalidíxico, y con baja susceptibilidad a las fluoroquinolonas (ciprofloxacina)²².

La resistencia intermedia a los antimicrobianos ciprofloxacina y cefotaxima (4,45% y 2,28%, respectivamente), debe ser observada, ya que porcentuales de resistencia intermedia sirven como señales de alerta para un mejor vigilancia con relación al surgimiento de cepas resistentes, una vez que se trata de una fluoroquinolona utilizada en el tratamiento de la fiebre tifoidea y de una cefalosporina de tercera generación¹⁰.

Uno de los factores más prominentes que causan esta resistencia, es el uso indiscriminado de antimicrobianos de forma empírica y la automedicación sin una investigación para el diagnóstico adecuado de laboratorio, sea por falta de estructura y condiciones, sea por desinformación /negligencia por parte de los profesionales de salud.

CONCLUSIÓN

Los resultados del presente estudio permiten concluir que, mientras en otros países la resistencia de la *Salmonella Typhi* a los antimicrobianos se viene mostrando cada vez mayor, en Brasil ese fenómeno debe ser mejor investigado para garantizar el diagnóstico de la realidad en nuestro medio, pues pocos son los trabajos publicados

que retratam a resistência de *Salmonella Typhi* a los antimicrobianos.

La Región Norte, por ser considerada área endémica para fiebre tifoidea y haber presentado aumento de la resistencia en relación a los tres años de estudio, debe

permanecer monitoreada con referencia a la resistencia de *Salmonella Typhi* a los antimicrobianos, principalmente al cloranfenicol, para asegurar que continúe siendo el medicamento de elección para el tratamiento de la fiebre tifoidea en la región, además de poseer bajo costo y buena aceptabilidad al tratamiento por parte del paciente.



Resistência antimicrobiana de *Salmonella Typhi* identificadas no Estado do Pará, Brasil

RESUMO

A resistência antimicrobiana é um assunto amplamente estudado em todos os gêneros bacterianos, sobretudo entre agentes responsáveis por doenças epidêmicas como a febre tifoide. A incidência de surtos contribui para o aumento abusivo da administração errônea de antimicrobianos colaborando para o surgimento de amostras bacterianas resistentes. Portanto, o presente estudo avaliou a resistência de 44 amostras de *Salmonella Typhi* aos principais antimicrobianos utilizados no tratamento da febre tifoide. Das 44 amostras isoladas no período de 2003 a 2005, dez (22,7%) foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano. Dentre as dez amostras de *Salmonella Typhi* resistentes, observou-se que nove apresentaram monoresistência à nitrofurantoína ou à tetraciclina. Apenas um caso de resistência concomitante a duas drogas (cloranfenicol e nitrofurantoína) foi observado no ano de 2005. A Região Norte, por ser considerada área endêmica para febre tifoide e ter apresentado resistência crescente em relação aos três anos em estudo, deve permanecer com o monitoramento da resistência de *Salmonella Typhi* aos antimicrobianos, principalmente ao cloranfenicol, para garantir que o mesmo continue sendo o medicamento de escolha para o tratamento da febre tifoide na Região, além de possuir baixo custo e boa aceitabilidade do paciente ao tratamento.

Palavras-chave: Febre tifoide; *Salmonella Typhi*; Testes de Sensibilidade Microbiana; Cloranfenicol.

Antimicrobial resistance of *Salmonella Typhi* isolated in the State of Pará, Brazil

ABSTRACT

Antimicrobial resistance has been widely studied in every bacterial genus, especially among those agents responsible for epidemic diseases, such as typhoid fever. Outbreaks have led to increased usage and erroneous administration of antimicrobial drugs, contributing to the emergence of resistant bacterial strains. Therefore, this study evaluated the resistance of 44 strains of *Salmonella Typhi* to the main antibiotics used in the treatment of typhoid fever. Of the 44 strains isolated from 2003 to 2005, ten (2.7%) were resistant to at least one microbial drug. Among the ten resistant *Salmonella Typhi* strains, nine showed monoresistance to nitrofurantoin or tetracycline. Only one case of concomitant resistance to two drugs (chloramphenicol and nitrofurantoin) was observed, in 2005. The Northern Region of Brazil is considered an endemic area for typhoid fever and has shown growing drug resistance in the three years studied. Thus, we must continue to monitor the resistance of *Salmonella Typhi* to antimicrobial drugs, especially chloramphenicol, to ensure that it remains the drug of choice for the treatment of typhoid fever in the Region, as it is inexpensive and the disease responds well to it.

Keywords: Typhoid Fever; *Salmonella Typhi*; Microbial Sensitivity Tests; Chloramphenicol.



REFERENCIAS

- 1 Alecrim WD, Loureiro ACSP, Moraes RS, Monte RL, Lacerda MVG. Febre tifóide: Recaída por resistência antimicrobiana. Relato de caso. Rev Soc Bras Med Trop. 2002 nov-dez;35(6):661-3.
- 2 Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol. 1966 Apr;45(4):493-6.
- 3 Ministério da Saúde (BR). Guia de Vigilância Epidemiológica. 5. ed. Brasília; 2002. p. 333-45.
- 4 Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde [Internet]. 2009 mar [citado 2009 mar 19]. Disponível em: <http://www.saude.gov.br>.
- 5 Chanh NQ, Everesti P, Khoa TT, House D, Murch S, Parry C, et al. A clinical microbiological and pathological study of intestinal perforation associated with typhoid fever. Clin Infect Dis. 2004 Jul;39(1):61-7.
- 6 Clinical and Laboratory Standards Institute (USA). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2005;25 Suppl 1.
- 7 Costa GA, Hofer E. Resistência ao cloranfenicol de amostras de *Salmonella typhi* isoladas em alguns Estados do Brasil. Hospital. 1971 fev;79(2):229-42.
- 8 Cunha MAS, Suassuna IR, Suassuna I. Sensibilidade de *Salmonella typhi* a antimicrobianos em emprego clínico. Rev Assoc Med Bras. 1981;27(9):267-8.

- 9 Ewing WH. Edwards and Ewing's identification of *Enterobacteriaceae*. 4th ed. New York: Elsevier Science Publishing; 1986. 536 p.
- 10 Fernandes AT, Ribeiro Filho N. Infecção hospitalar. In: Fernandes AT, Fernandes MAV, Ribeiro Filho N, editores. Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde. São Paulo: Atheneu; 2000. p. 163-214.
- 11 Fica AC, Alexandre MS, Prat SM, Fernandez AR, Fernandez JO, Heitmann IG. Câmbios epidemiológicos de las salmonelosis en Chile: desde *Salmonella typhi* a *Salmonella enteritidis*. Rev Chil Inf. 2001;18(2):85-93.
- 12 Hofer E, Vicente MMA, Colnago EJ. Atividade "in vitro" da ampicilina e hetacilina sobre amostras de *Salmonella typhi*. Rev Soc Bras Med Trop. 1973 mar-abr;8(2):99-105.
- 13 Jones LM, Booth NH, McDonald LE. Farmacologia e Terapêutica em Veterinária. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1983. p. 696-8.
- 14 Kauffmann F. *Enterobacteriaceae*. 2nd ed. Copenhagen: Munksgaard; 1954. 382 p.
- 15 Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2001. p. 177-250.
- 16 Loureiro ECB, Sá LLC, Ramos FLP, Souza CO, Carreira AGA, Lima KVB, et al. Detecção de *Salmonella Typhi* por PCR em ambientes aquáticos durante surto de febre tifóide ocorrido em Anajás, Pa, 2001 [resumos]. In: 21º Congresso Brasileiro de Microbiologia; 2001 out 21-25; Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira de Microbiologia; 2001. p. 51.
- 17 Loureiro ECB, Sá LLC, Ramos FLP, Vicente ACP. Detecção de *Salmonella Typhi* por PCR em ambientes aquáticos durante surto de febre tifóide ocorrido em Moju, Pa, 1999 [Tese]. In: 36º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 2000 fev 20-25; São Luiz: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 2000. p. 188.
- 18 Mayrhofer S, Paulsen P, Smulders FJ, Hilbert F. Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry. Int J Food Microbiol. 2004 Dec;97(1):23-9.
- 19 Oliveira SD, Flores FS, Santos LR, Brandell A. Antimicrobial resistance in *Salmonella enteritidis* strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. Int J Food Microbiol. 2005 Jan;97(3):297-305.
- 20 Organización Panamericana de la Salud. Informe Anual de la Red de Monitoreo/Vigilância de la Resistencia a los Antibióticos. Rev Patol Trop. 2005 jul-dec;34 Supl 2:1-85.
- 21 Ramos FLP, Oliveira JRS, Silva JCL. Epidemia de febre tifóide na localidade Cipoal, município de Óbidos, Estado do Pará – Análise preliminar. Rev Soc Bras Med Trop. 1998;31 Supl 1: 77.
- 22 Rowe B, Ward LR, Threlfall EJ. Multidrug-resistant *Salmonella typhi*: a worldwide epidemic. Clin Infect Dis. 1997 Jan;24 Suppl 1:S106-9.
- 23 Schimidt V, Cardoso MRI. Sobrevivência e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Salmonella* spp isolados de um sistema de tratamento de dejetos de suínos. Cienc Rural. 2003 set-out;33(5):881-8.
- 24 Tavares LC, Chisté JJ, Santos MGB, Penna TCV. Synthesis and biological activity of nifuroxazide and analogs II. Boll Chim Farm. 1997 Mar;136(3):244-9.

Recibido en / Recebido em / Received: 30/7/2009
 Aceito en / Aceito em / Accepted: 16/4/2010

