



ARTIGO | ARTICLE

Desempenho produtivo de tilápias alimentadas com suplemento alimentar à base de algas

Growth performance of Nile tilapia fed on a diet supplemented with algae products

Fabiana Garcia¹
Eduardo Gianini Abimorad¹
Sérgio Henrique Canelo Schalch¹
Eduardo Makoto Onaka²
Fernando Stopato da Fonseca²

RESUMO

Com este ensaio, objetivou-se avaliar o desempenho zootécnico e o comportamento alimentar de tilápias *Oreochromis niloticus* alimentadas com diferentes níveis de suplemento à base de algas. Foram desenvolvidos dois ensaios: um com *Oreochromis niloticus* jovens (M=17,34, DP=1,04g) estocadas na densidade de 35 peixes por caixa para o teste de desempenho e outro com tilápias (M=130,25, DP=29,87g) acondicionados na densidade de 14 peixes por caixa para a análise do comportamento alimentar. Os testes foram conduzidos em caixas com 400L de água, em sistema com recirculação e fluxo constante. Os peixes foram alimentados com as dietas-teste durante 25 dias. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com três repetições, sendo testados quatro níveis do suplemento (0, 0,25, 0,5 e 1% do produto na ração). Os parâmetros de desempenho foram avaliados com 25 dias de alimentação e a saciedade aparente no décimo dia. Houve correlação linear positiva ($p<0,01$) entre o nível de suplemento administrado e o consumo de ração pelos peixes. Os peixes que receberam 0,5 e 1% do suplemento alimentar apresentaram maiores valores de comprimento padrão ($p<0,01$) e observou-se correlação positiva ($p<0,05$) entre o ganho de peso e o nível do suplemento na dieta. Conclui-se que para juvenis de tilápia do

¹ Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Pólo Regional Noroeste Paulista. Rod. Péricles Belini, km 121 (sentido Nhandeara), Caixa Postal 61, 15500-970, Votuporanga, SP, Brasil. Correspondência para/Correspondence to: F. GARCIA. E-mail: <fgarcia@apta.sp.gov.br>.

² Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Instituto de Pesca, Centro do Pescado Continental. São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Apoio: Schering Plough Corporation.

Nilo, a suplementação melhora o consumo de ração e o ganho de peso (relação dose-resposta linear). Entretanto, por não haver melhora na conversão alimentar dos peixes nutridos com o suplemento, futuros estudos devem ser realizados para avaliar o efeito do suplemento no aproveitamento dos nutrientes da dieta.

Palavras-chave: Algas. Crescimento. Ergosan. *Oreochromis niloticus*. Suplemento alimentar. Tilápia.

ABSTRACT

*The aim of this study was to evaluate the growth performance and feeding behavior of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed on diets with different algae supplement levels. Two experiments were carried out with juvenile tilapia: 35 juvenile tilapias ($M=17.34$, $SD=1.04g$) per tank were used in the growth performance experiment and 14 ($M=130.25$, $SD=29.87g$) in the feeding behavior trial. The trials were conducted in 400L tanks, in a water recirculation system and controlled environment. A completely randomized design was used for both experiments, in which four supplement levels (0, 0.25, 0.5 and 1% of supplement/kg) were tested. Growth performance parameters were evaluated after 25 days, while the voluntary feed intake ones in the tenth day. There was a positive linear correlation ($p<0.01$) between the dietary supplement level and voluntary feed intake. Fish which received 0.5 and 1% of feeding supplement showed greater standard lengths ($p<0.01$) and there was a positive linear correlation ($p<0.05$) between weight gain and the level of supplement in the diet. Thus, for Nile tilapia juveniles, this supplement improves feed intake and weight gain in a linear dose-response relationship. However, there was no improvement in feed conversion, indicating the need for further study concerning the use of dietary nutrients in fish fed a supplementary diet.*

Key words: Algae. Growth. Ergosan. *Oreochromis niloticus*. Feed Supplement. Tilapia.

INTRODUÇÃO

Na criação de tilápias *Oreochromis niloticus*, principalmente nos sistemas intensivos de produção, houve um avanço tecnológico muito grande em relação ao melhoramento genético, biologia, reprodução, nutrição, prevenção de doenças e manejo (El-Sayed, 1999). Atualmente, no Brasil, os principais gargalos na produção de tilápias em tanques-rede são o controle sanitário, evitando as elevadas taxas de mortalidade, e a nutrição adequada, já que os gastos com alimentação chegam a atingir 70% do custo total de produção (Anualpec, 2001). Dentro deste panorama, qualquer técnica que melhore as taxas de sobrevivência e crescimento a um custo acessível é vantajosa, visto que a margem de lucro é muito pequena. Desta forma, o intuito de obter

melhoras na eficiência alimentar e na produtividade com uso de aditivos em ração para peixes tem sido crescente nos últimos anos (Galindo-Villegas & Hosokawa, 2004).

O interesse pelos polissacarídeos não amiláceos cresce rapidamente. A maioria dessas fibras é resistente à hidrólise pelas enzimas digestivas de humanos (Southgate, 1977; Salyers et al., 1978; Anderson et al., 1991) e podem ser consideradas como fibras alimentares. Os efeitos fisiológicos foram investigados (Anderson et al., 1991; Tordottir et al., 1991): em particular, sua degradação fermentativa pela microbiota intestinal (Gibson et al., 1990).

As algas contêm, em geral, 37,3% de fibra em sua composição, sendo 84,8% consideradas solúveis e as insolúveis, o restante, são compostas essencialmente por celulose (Fleury & Lahaye, 2006).

A alta concentração de fibras solúveis, a documentada habilidade de produzir elevada quantidade de ácidos graxos de cadeia curta a partir das fibras solúveis e a alta concentração de ácidos graxos ω -3 fazem das algas uma fonte interessante de alimento funcional a ser explorada (Azaza et al., 2007).

O Ergosan® é um complemento alimentar composto por algas marinhas secas e extratos vegetais de *Laminaria digitata* e *Ascophyllum nodosum*. Os ingredientes ativos deste complemento, incluindo alginas e polissacarídeos, são conhecidos por melhorar os sistemas de defesa natural do peixe. O Ergosan, portanto, é um produto completamente natural, aceito como um ingrediente alimentar.

Estudos revelam propriedades antioxidantes da *L. digitata*. Com relação à *A. nodosum*, sua composição inclui aminoácidos, carboidratos e diversos elementos nutritivos (N, P, K, Ca, Mn, Zn, S, B, Mo, Cu, etc.), além de sintetizarem muitas vitaminas: A, B2, B3, B12, C, D, E e K (Norrie, 2001).

Diversos trabalhos relatam a eficácia do Ergosan no sistema imune dos peixes e nas respostas de defesa frente a infecções bacterianas (Peddie et al., 2002; Castro et al., 2004; Bagni et al., 2005; Bricknell & Dalmo, 2005), no entanto são escassos os estudos deste produto como um promotor de crescimento ou prebiótico para peixes. Assim, o objetivo deste ensaio foi avaliar o efeito da suplementação com produto comercial à base de algas em dietas para tilápias *Oreochromis niloticus* no desempenho zootécnico e na saciedade aparente.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram desenvolvidos dois ensaios (desempenho produtivo e saciedade aparente), ambos em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), sendo testados, em cada um, quatro níveis de suplemento à base de algas (Aquavac Ergosan® - Schering Plough Corporation) (0; 0,25; 0,5 e 1% do produto na ração) com três repetições, totalizando 12 unidades experimentais (caixas de água).

Para o ensaio de desempenho produtivo foram utilizadas 420 tilápias *O. niloticus* jovens, com

peso inicial de 17,34, Desvio-Padrão - DP=1,04g, distribuídas aleatoriamente em 12 caixas com 400L de água cada, na densidade de 35 peixes/caixa. Em seguida, foi conduzido o ensaio de comportamento alimentar, utilizando-se 168 tilápias (130,25, DP=29,87g), distribuídas aleatoriamente em 12 caixas com 400L de água, na densidade de 14 peixes/caixa.

Em ambos os ensaios, o sistema usado foi de recirculação da água, com fluxo constante e temperatura controlada em 28°C. Os peixes foram aclimatados por sete dias. Após a aclimação, foram alimentados com as dietas-teste durante o período experimental. O suplemento foi incorporado aos ingredientes moídos, de acordo com cada tratamento, e depois a mistura foi peletizada a frio. A composição da dieta está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição da ração base utilizada no ensaio e análise bromatológica. Votuporanga (PR), 2008.

Ingredientes	%
Farinha de peixe (50%PB)	14,41
Levedura (cana de açúcar)	4,00
Farelo de soja	20,12
Glúten de milho (60%PB)	9,52
Milho	22,30
Farelo de trigo	22,30
Óleo peixe	1,70
Óleo de soja	2,40
Suplemento mineral e vitaminas*	1,00
Sal (NaCl)	0,15
BHT	0,15
Calcário	0,63
Fosfato bicálcico	1,98
L-lisina 78	1,09
DL-metionina 98	0,14
Caulin	0,15
<i>Composição</i>	
Matéria seca	92,95
Proteína bruta	32,50
Proteína digestível	29,20
Extrato etéreo	7,05
Matéria mineral	8,90
Energia digestível	3,00

*Vitaminas: A=2200,00UI, D₃=1600,00UI, E=17,00UI, K=2,50mg, B₁=2,50mg, B₂=4,00mg, B₆=2,00mg, B₁₂=30,00mcg, e C=100,00mg; Ácido Fólico=1,00mg; Ácido pantotênico=15,00mg; Biotina=0,10mg; Niacina=50,00mg; Colina=4,50g; Cobalto=0,03mg; Cobre=7,50mg; Ferro=50,00mg; Iodo=2,00mg; Manganês=50,00mg; Selênio=0,07mg; Zinco=80,00mg; Antioxidante=125,00 gramas.

Os parâmetros de desempenho foram avaliados com 25 dias de alimentação. Com base na biometria individual de todos os peixes, calculou-se, para cada unidade experimental: ganho de peso, comprimento final total e padrão, conversão alimentar e Taxa de Crescimento Específico - TCE (%) = $100 \times (\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) / n^\circ \text{ de dias}$.

Aos 10 dias do segundo ensaio, avaliou-se a saciedade aparente, definida durante a primeira alimentação do dia, como o ponto no qual um único pelete permanece no fundo da caixa durante um minuto (Richie et al., 2004). Neste ponto o consumo de cada unidade experimental (caixa) foi registrado.

Os dados foram submetidos à Análise de Variância ANOVA ao nível de probabilidade de 5%. Aplicou-se o teste de Tukey para comparação das médias do comprimento padrão e os parâmetros de ganho de peso e saciedade aparente foram submetidos à regressão por apresentarem resposta linear.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de desempenho zootécnico demonstram efeito significativo da adição do suplemento no comprimento padrão, no ganho de peso e na saciedade aparente (Tabela 2).

Com relação à saciedade aparente, verificou-se correlação linear positiva ($p < 0,01$) entre o nível

de suplemento administrado e o consumo de ração pelos peixes (Figura 1). Na dieta de ratos e porcos, Kimura et al. (1996) verificaram que a administração de alginato induziu a redução na taxa de elevação da glicose pós-prandial do plasma quando comparada à administração de outra dieta de composição similar contendo fibras de aveia e soja. O mesmo efeito foi observado por Vaugelade et al. (2000) testando a

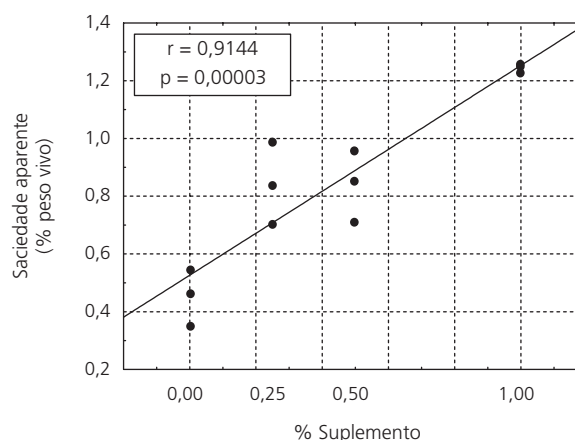


Figura 1. Análise de regressão do consumo da dieta (% do peso vivo) por refeição, saciedade aparente de *Oreochromis niloticus* alimentados com dietas contendo 0, 0,25, 0,5 e 1% de suplemento à base de algas. Votuporanga (PR), 2008.

Nota: (Equação da reta: Saciedade Aparente = $0,52643682 + 0,72664773 x$). Cada ponto representa uma unidade experimental ($n=3$).

Tabela 2. Análise de variância e apresentação das médias dos parâmetros de desempenho e saciedade aparente de *Oreochromis niloticus* alimentadas com dietas contendo 0, 0,25, 0,5 e 1% de suplemento à base de algas na ração. Votuporanga (PR), 2008.

Suplemento (%)	CP (cm)		CT (cm)		CA		TCE (%)		GP (g/peixe)		SA (%PV)	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
0	8,77	0,66 ^a	10,58	0,89	2,34	0,18	1,88	0,19	18,90	1,13	0,45	0,09
0,25	8,70	0,3 ^a	10,7	0,47	2,48	0,29	1,94	0,10	20,13	0,69	0,84	0,14
0,5	9,62	0,28 ^b	11,50	0,49	2,93	0,30	1,99	0,11	21,23	2,20	0,84	0,12
1	9,77	0,76 ^b	11,40	0,90	2,36	0,46	2,05	0,29	22,50	3,60	1,24	0,02
Valor de F	6,28 ^{**}		1,57 ^{ns}		2,18 ^{ns}		0,43 ^{ns}		23,29 ^{ns}		7,15 ^{ns}	

CP: comprimento padrão; CT: comprimento total; CA: conversão alimentar; TCE: taxa de crescimento específico; GP: ganho de peso; SA: saciedade aparente por refeição; PV: peso vivo.

Valores são médias (M) ($n=3$); DP: desvio padrão:

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ns: não significativo

Letras iguais nas linhas: não há diferença estatística entre as médias. Todas as variáveis apresentam F Levene para homogeneidade de variância $> 0,05$ e χ^2 para normalidade (Shapiro Wilks) $> 0,05$.

administração de polissacarídeo não amiláceo de alga para cães. Um dos mecanismos de saciedade da fome está relacionado ao nível de glicose no plasma (Rutter *et al.*, 2002): ressalta-se a hipótese de que o aumento no consumo de ração pelos peixes do grupo que recebeu os maiores níveis de suplemento esteja relacionado a uma possível redução nos níveis pós-prandiais de glicose do plasma, retardando a sensação de saciedade. Outra hipótese mais simples é de que o produto melhore a palatabilidade e/ou atratividade da ração.

Para os parâmetros de desempenho produtivo, os peixes que receberam 0,5 e 1% do suplemento alimentar apresentaram maiores valores de comprimento padrão ($p < 0,01$) (Tabela 2). O ganho de peso apresentou correlação positiva ($p < 0,05$) ao nível do suplemento na dieta (Figura 2).

A melhora nos parâmetros de desempenho produtivo (comprimento padrão e ganho de peso) nos peixes alimentados com o suplemento à base de algas pode ser explicada pelos efeitos benéficos do alginato, e demais polissacarídeos não amiláceos contidos nas algas, à saúde intestinal e à absorção de nutrientes. Estes compostos atuam na manu-

tenção da integridade das vilosidades intestinais e no aumento de sua superfície, colaborando para uma melhor absorção de nutrientes e consequente melhora no desempenho dos animais. Yone *et al.* (1986) confirmam que as algas melhoram a absorção e a assimilação da proteína da dieta. Nakagawa *et al.* (1997) relatam que a suplementação com a alga *Ascophyllum* aumentou a proteína do músculo de seabream, *Pagrus major* e discutem que as algas fazem parte da dieta de peixes onívoros na natureza, sugerindo que estas podem ser aditivos essenciais na regulação das condições fisiológicas dos peixes.

O Ergosan é um complemento alimentar composto por algas marinhas secas e extratos vegetais de *Laminaria digitata* e *Ascophyllum nodosum*, cujas fibras solúveis, laminaranas, fucanas (Kloareg & Quatrane, 1988) e alginatos (Gacasa, 1992), no processo de fermentação, resultam em alta produção do Ácido Graxo de Cadeia Curta (AGCC) (Cherbut *et al.*, 1991). A primeira consequência dessa produção é a acidificação do cólon, o que pode evitar a proliferação excessiva de bactérias indesejadas: os AGCC são absorvidos pelas células do cólon e utilizados como um "combustível" por elas (Hussein, 2003). A alimentação dos enterócitos e colonócitos pelos AGCC conduz a uma hipertrofia da mucosa intestinal, aumento de seu peso e superfície, o que otimiza a digestibilidade dos nutrientes, já que é maior também a superfície de absorção.

Fleury & Lahaye (2006) analisaram *in vitro* a solubilidade das fibras da alga marinha marrom *Laminaria digitata*, presente no suplemento alimentar testado. O total de fibras contida na alga foi de 37,3%, sendo 84,8% consideradas solúveis. Da porção de fibra solúvel, 49,3% foi obtida por digestão em pH 2,0 (simulando a digestão gástrica) e 50,7% em pH 7,5 (digestão intestinal). Fucanas e laminaranas foram essencialmente solúveis em pH 2,0 e alginato em pH 7,5, demonstrando que o alginato persiste à digestão estomacal e chega íntegro ao intestino. Estudo *in vivo* demonstrou os efeitos do consumo de alginato durante duas semanas nas bactérias fecais de humanos: os níveis de bifido-

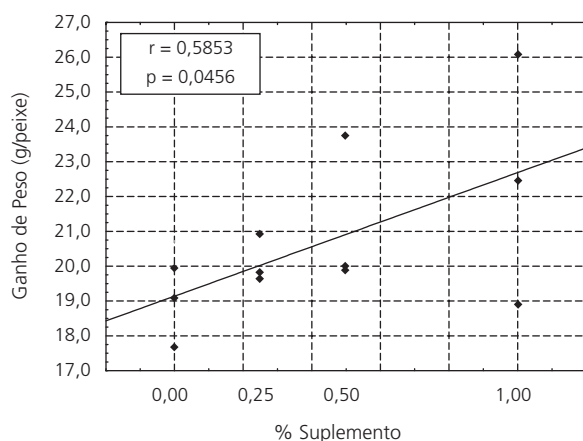


Figura 2. Análise de regressão do ganho de peso/peixe (g) de *Oreochromis niloticus* alimentados com dietas contendo 0, 0,25, 0,5 e 1% de suplemento à base de algas. Votuporanga (PR), 2008.

Nota: (Equação da reta: Ganho de Peso = 19,1402 + 3,549 x). Cada ponto representa uma unidade experimental (n=3).

bactérias aumentaram nas fezes, enquanto o número de algumas bactérias patogênicas diminuiu. Os níveis fecais de sulfido, amônia e toxinas feólicas derivadas do metabolismo de bactérias também foram significativamente reduzidos, enquanto os níveis de produção dos AGCC foram significativamente aumentados (Terada *et al.*, 1995).

Especificamente neste experimento, o fato de não ter havido melhora na conversão alimentar dos peixes alimentados com o suplemento pode indicar que a melhora no ganho de peso não tenha relação com o melhor aproveitamento dos nutrientes da dieta, mas seja consequência do aumento do consumo. Desta forma, conclui-se que, para juvenis de tilápia do Nilo, nas condições em que foram realizados os experimentos, a suplementação com produto comercial à base de algas melhorou o consumo de ração e o ganho de peso dos peixes em uma relação dose-resposta linear.

REFERÊNCIAS

- Anderson, D.M.W.; Brydon, W.G., Eastwood, M.A. & Sedgwick, D.M. (1991). Dietary effects of sodium alginate in humans. *Food Additives and Contaminants*, 8(3): 237-48.
- Anuário da Pecuária Brasileira. (2001). São Paulo: FNP Consultoria & Comércio. p.209-322.
- Azaza, M.S.; Mensi, F.; Ksouri, J.; Dhraief, M.N.; Brini, B.; Abdelmouleh, A. & Kra, M.M. (2007). Growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed with diets containing graded levels of green algae ulva meal (*Ulva rigida*) reared in geothermal waters of Southern Tunisia. *Journal of Applied Ichthyology*, 24(2):202-7.
- Bagni, M.; Romano, N.; Finoi, M.G.; Abelli, L.; Scapigliati, G.; Tiscar, P.G.; Sarti, M. & Marino, G. (2005). Short- and long-term effects of a dietary yeast beta-glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Shellfish Immunology*, 18(4):311-21.
- Bricknell, I. & Dalmo, R.A. (2005). The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish and Shellfish immunology*, 19(5):457-72.
- Castro, R.; Zarra, I. & Lamas, J. (2004). Water-soluble seaweed extracts modulate the respiratory burst activity of turbot phagocytes. *Aquaculture*, 229(1-4):67-78.
- Cherbut, C.; Salvador, V. & Barry, J.L. (1991). Dietary fibers effects on intestinal transit in man: involvement of their physico-chemical and fermentative properties. *Food Hydrocolloids*, 71(1):675-85.
- El-Sayed, A.F.M. (1999). Alternative dietary protein source for farmed tilapia, *Oreochromis spp.* *Aquaculture*, 179(1):149-68.
- Fleury, N. & Lahaye, M. (2006). Chemical and physico-chemical characterization of fibres from *Laminaria digitata* (kombu breton): a physiological approach. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 55(3):389-400.
- Gacasa, P. (1992). Enzymic degradation of alginates. *International Journal of Biochemistry*, 24(4):545-52.
- Galindo-Villegas, J. & Hosokawa, H. (2004). Immunostimulants: towards temporary prevention of disease in marine fish. In: Cruz Suárez, L.E.; Ricque Marie, D.; Nieto López, M.G.; Villarreal, D.; Scholz, U. & Gonzáles, M. *Avances en Nutrición Acuicola 7º Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. Hermosillo, Sonora, México.
- Gibson, G.R.; Macfarlane, S. & Cummings, J.H. (1990). The fermentability of polysaccharides by mixed human faecal bacteria in relation to their suitability as bulk-forming laxatives. *Letters in Applied Microbiology*, 11(5):251-4.
- Hussein, S.H. (2003). *Functional fiber: role in companion animal health. Proceedings of the Symposium Production Trade Show - Pet Food Forum*, Chicago (IL). p.125-31.
- Kimura, Y.; Watanabe, K. & Okuda, H. (1996). Effects of soluble sodium alginate on cholesterol excretion and glucose tolerance in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 54(1):47-54.
- Kloareg, B. & Quatrane, R.S. (1988). Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanograph and Marine Biology: an Annual Review*, 26(1):259-315.
- Nakagawa, H.; Umino, T. & Tasaka, Y. (1997). Usefulness of *Ascophyllum* meal as a feed additive for red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture*, 151(1-4):275-81.
- Norrie, J. (2001). Aplicaciones practicas de productos de algas marinas en la agricultura. *Revista Terralia*, 23(15): 26-41.
- Peddie, S.; Zou, J. & Secombes, C.J. (2002). Immunostimulation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intraperitoneal administration of Ergosan. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 86(1-2):101-13.
- Richie, M.; Haley, D.I.; Oetker, M.; Garbrecht, S. & Garling, D.L. (2004). Effect of feeding frequency on gastric evacuation and the return of appetite in tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*, 234(1-4):657-73.
- Rutter, G.A.; Ainscow, E.K.; Mirshamsi, S.; Tang, T. & Ashford, M.L.J. (2002). Dynamic imaging of free cytosolic

ATP concentration during fuel sensing by rat hypothalamic neurons: evidence for ATP-independent control of ATP-sensitive K⁺ channels. *The Journal of Physiology*, 544(2):429-45.

Salyers, A.A.; Palmer, J.K. & Wilkins, T.D. (1978). Degradation of polysaccharides by intestinal bacterial enzymes. *American Journal of Clinical Nutrition*, 31(Suppl):s128-s30.

Southgate, D.A.T. (1977). The definition and analysis of dietary fibre. *Nutrition Review*, 35(1):31-7.

Terada, A.; Hara, H. & Mitsuoka, T. (1995). Effect of dietary alginate on the faecal microbiota and faecal metabolic activity in humans. *Microbial Ecology Health and Disease*, 8(6):259-66.

Torsdottir, I.; Alpsten, M. & Holm, G. (1991). A small dose of soluble alginate-fiber affects postprandial glycemia

and gastric emptying in humans with diabetes. *Journal of Nutrition*, 121(6):795-99.

Vaugelade, P.; Hoebler, C.; Bernard, F.; Guillon, F.; Lahaye, M.; Duee, P.H. & Darcy-Vrillon, B. (2000). Non-starch polysaccharides extracted from seaweed can modulate intestinal absorption of glucose and insulin response in the pig. *Reproduction Nutrition Development*, 40(1): 33-47.

Yone, Y.; Furuichi, M. & Urano, K. (1986). Effects of wakame *Undaria pinnatifida* and *Ascophyllum nodosum* on absorption of dietary nutrients, and blood sugar and plasma free amino-N levels of red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 52(10):1817-9.

Recebido em: 5/11/2008

Versão final reapresentada em: 5/2/2009

Aprovado em: 19/5/2009

