

Estudo Cinético da Redução da Massa Molar do Poli(3-Hidroxi-butarato-co-3-Hidroxi-valerato) (PHBHV)

Sérgio R. Montoro, Carlos Y. Shigue
Departamento de Engenharia de Materiais, USP

Marli L. T. de Sordi
Departamento de Engenharia Química, USP

Amilton M. dos Santos
Departamento de Engenharia de Materiais e Departamento de Engenharia Química, USP

Maria I. Ré
Laboratório de Tecnologia de Partículas, IPT

Resumo: Neste trabalho foi realizado um estudo cinético da redução da massa molar do poli(3-hidroxi-butarato-co-3-hidroxi-valerato) (PHBHV) em três diferentes metodologias: hidrólise ácida com ácido clorídrico, transesterificação com hexilenoglicol ou etilenoglicol e redução na presença do borohidreto de sódio (NaBH_4). Foram investigados os parâmetros de processo: tempo, temperatura, tipo e concentração de catalisadores. Os resultados de redução de massa molar foram analisados pelo modelo cinético de ordem n . A redução com NaBH_4 foi mais eficiente do ponto de vista cinético, tendo em vista os parâmetros: constante de reação k e energia de ativação (E_a), uma vez que os valores observados foram significativamente maiores em comparação com os calculados para os demais métodos.

Palavras-chave: Polihidroxialcanoatos, PHBHV, redução da massa molar, análise cinética.

Kinetic Study of the Molecular Weight Reduction of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) (PHBHV)

Abstract: In this work a kinetic study was carried out of the molecular weight reduction of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBHV) in three different methodologies: acid hydrolysis using hydrochloric acid, transesterification with ethylene glycol or hexylene glycol and reduction in the presence of sodium borohydride (NaBH_4). The following process parameters were investigated: time, temperature, type and concentration of catalysts. The results of molecular weight reduction were fitted with a n -order kinetic model. The kinetics analysis has shown that the NaBH_4 reduction was the most efficient in terms of reaction rate in comparison with the other methods.

Keywords: Polyhydroxyalkanoates, PHBHV, molecular weight reduction, kinetic analysis.

Introdução

Polímeros biodegradáveis e biocompatíveis têm atraído uma grande atenção no mundo inteiro, tanto no ponto de vista científico como tecnológico. Polihidroxialcanoatos (PHAs) são exemplos desses materiais, os quais são poliésteres de ácidos hidroxi-alcanóicos produzidos por uma grande variedade de microorganismos a partir de fontes de carbono renováveis, na forma de materiais de reserva. O seu acúmulo se dá no citoplasma da célula sob a forma de grânulos de 0,2-0,5 μm de diâmetro e sua função se assemelha ao glicogênio sintetizado e estocado pelos mamíferos^[1-3]. O poli(3-hidroxi-butarato) (PHB) e

seus copolímeros com hidroxivalerato (HV) estão entre os mais estudados PHAs. Eles são extremamente atrativos na preparação de sistemas biomédicos devido as suas adequadas propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade e termoprocessabilidade^[4,5]. Contudo, se os PHAs podem ser considerados polímeros com alto potencial para aplicações biomédicas, sua elevada cristalinidade restringe essas aplicações. O poli(3-hidroxi-butarato-co-3-hidroxi-valerato) (PHBHV) surgiu como uma nova geração de PHA, no qual a morfologia de superfície combinada com a menor cristalinidade, quando comparado com os homopolímeros de PHB, faz com que o processo de degradação seja mais rápido. Além disso, as propriedades físicas dos copolímeros

podem ser manipuladas variando a composição de HB e HV. Essas vantagens tornam os copolímeros de PHBHV mais adequados do que os homopolímeros de PHB para muitas aplicações^[6-9]. A estrutura do PHBHV é mostrada na Figura 1.

A massa molar é um fator de extrema importância, pois afeta diretamente a resistência mecânica do polímero, a capacidade de intumescimento, a capacidade de sofrer hidrólise e, conseqüentemente, a taxa de biodegradação, a qual está relacionada com a sua cristalinidade. Com isso, para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada utilizando-se os PHAs, há a necessidade de que o polímero tenha a massa molar reduzida. Um fator que evidencia a dependência da massa molar com a taxa de degradação do polímero biodegradável está relacionado com a direta proporcionalidade entre os valores da temperatura de transição vítrea (T_g), ou seja, quanto menor a massa molar, menor será o valor da T_g do polímero. Em adição, o aumento da taxa de degradação promoverá um acréscimo na velocidade de liberação do princípio ativo e, conseqüentemente, a matriz polimérica será mais facilmente absorvida pelo organismo^[10]. Além disso, PHAs de baixa massa molar podem ser usados como componentes para construir diversas arquiteturas, tais como, copolímeros em blocos^[11,12] e enxertados^[13,14].

Dependendo da escolha do outro componente do bloco, os copolímeros podem adquirir diversas propriedades, por exemplo, propriedades anfifílicas e biocompatíveis para aplicações na área biomédica^[15]. Oliveira et al.^[16] sintetizaram copolímeros em blocos via reação de acoplamento entre o PHBHV e PNIPAAm (poliisopropilamida). As características hidrofóbicas do PHBHV associadas às hidrofílicas e termossensíveis da PNIPAAm permitiram a preparação de nanopartículas, as quais foram avaliadas na incorporação e liberação de um modelo de droga (acetato de dexametasona).

No estudo para obtenção destes polímeros funcionalizados, diversas vias de modificações químicas têm sido estudadas e aplicadas, com o objetivo de se obter PHBHV com cadeias de massa molar reduzida e controlada, e ainda, com as suas terminações funcionalizadas (por exemplo, com grupos hidroxilas), de modo a torná-las reativas com uma determinada classe de compostos. Os polímeros obtidos a partir deste material podem ter composição e distribuição de comonômeros mais controlada em relação à transesterificação direta^[6]. Lauzier et al.^[17] estudaram a redução da massa molar do PHB via hidrólise ácida em meio

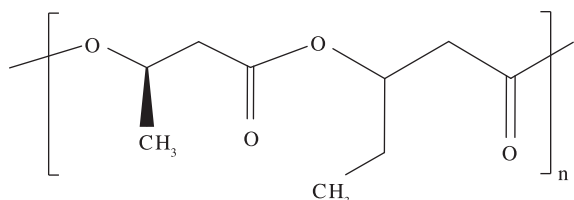


Figura 1. Estrutura do poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBHV).

aquoso^[16]. Yu & Marchessault^[18] realizaram a hidrólise ácida do PHB para promover a redução da massa molar bem como a funcionalização do biopolímero com a inserção de grupos funcionais terminais^[18]. Deng & Hao^[5] realizaram a redução da massa molar e funcionalização do PHB via reação de transesterificação com 1,6-hexanodiol catalisada pelo ácido *p*-toluenosulfônico (*p*-TS) em solução de 1,2-dicloroetano^[8]. Spitalsky et al.^[19] relataram os resultados dos estudos da degradação do PHB via alcóólise com etileno glicol e glicerol catalisada pelo ácido *p*-TS e avaliaram as variações das propriedades mecânicas dos polímeros obtidos^[19].

Até o nosso conhecimento, apenas um trabalho está descrito na literatura em relação a redução da massa molar do PHBHV. Baran et al.^[20] realizaram um estudo de redução da massa molar do PHBHV com borohidreto de sódio (NaBH_4), objetivando a utilização dos polímeros obtidos na preparação de nanocápsulas com propriedades adequadas para a encapsulação de drogas usadas na terapia do câncer.

Neste trabalho foram investigadas três diferentes metodologias de redução da massa molar do PHBHV, variando-se diferentes parâmetros de processo, tais como: tempo, temperatura, concentração e tipos de catalisadores. Foram avaliadas a hidrólise ácida utilizando-se ácido clorídrico (HCl) em meio aquoso, a transesterificação com etilenoglicol ou hexilenoglicol catalisada por ácido *p*-TS e a redução da massa molar em solução utilizando-se o NaBH_4 . Foi analisada a cinética de redução da massa molar através do cálculo do modelo de ordem *n* utilizando o modelo matemático proposto por Borchardt & Daniels^[21]. Este estudo foi realizado visando à obtenção de matrizes poliméricas com propriedades adequadas para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos.

Experimental

Materiais e métodos

Solventes e reagentes

O PHA utilizado neste trabalho foi o PHBHV, contendo 9,8% de HV (Lote 58), cedido pela empresa PHB Industrial S/A. O polímero utilizado apresentava massa molar ponderal média (M_w) de 273.204 Da, massa molar numérica média (M_n) de 192.028 Da, índice de polidispersão (IP) igual a 1,42, temperatura de fusão de 170 °C e grau de cristalinidade de 35%. O clorofórmio PA (pureza > 99%), álcool etílico PA (pureza ≥ 96%) e ácido clorídrico PA (37%) foram obtidos da Anidrol e o ácido *p*-TS foi fornecido pela empresa Tekno S/A. O etilenoglicol e hexilenoglicol foram fornecidos pela empresa Hexion Química. Todos os solventes e demais produtos químicos foram utilizados sem prévia purificação por apresentarem grau de pureza analítico.

Metodologia geral de redução da massa molar do PHBHV

A redução da massa molar do PHBHV foi realizada através de três metodologias: hidrólise ácida, transesterificação com alcoóis e redução com NaBH_4 . A metodologia utilizada nesses procedimentos já foi descrita no trabalho de Montoro^[10].

Redução da massa molar via hidrólise ácida

Para promover a redução da massa molar do biopolímero foi utilizada uma solução de ácido clorídrico na concentração de 3N em três diferentes temperaturas: 65, 90 e 95 °C. Em todas as reações o tempo foi de 12 horas.

Redução da massa molar via transesterificação com etilenoglicol/hexilenoglicol

A redução da massa molar do PHBHV foi efetuada a partir da reação de transesterificação com etilenoglicol/hexilenoglicol, catalisada com ácido *p*-TS. Foram realizadas duas reações com diferentes quantidades de etilenoglicol e hexilenoglicol (10 e 20 g) e diferentes quantidades de catalisador (3 e 6 g). As reações foram realizadas na temperatura de 60 °C com duração de 3 horas.

Redução da massa molar com borohidreto de sódio

Na redução da massa molar com NaBH_4 foram realizadas seis reações, nas temperaturas de 10, 25 e 50 °C e nas concentrações de 1 e 2% de NaBH_4 em relação a massa total de PHBHV. Nas três primeiras reações, a concentração de NaBH_4 utilizada foi de 1% e nas demais reações a concentração de NaBH_4 foi dobrada. Em todas as reações, o tempo de reação foi de 8 horas.

Determinação da massa molar por cromatografia de permeação em gel (GPC)

As massas molares médias e as distribuições das massas molares dos polímeros foram determinadas por GPC/SEC, em um equipamento Waters Breeze System, incluindo uma bomba isocrática, Waters 1515, injetor automático, Waters 717 Plus, e detector de índice de refração, Waters 2414. Foram utilizadas três colunas Styragel HR com faixa de exclusão de 500-30.000 (HR3), 5.000-600.000 (HR4), e 50.000-4.000.000 (HR5). As amostras de PHBHV foram diluídas na razão de 15 mg.mL⁻¹ de clorofórmio grau espectroscópico (J. T. Baker) e depois mantidas em repouso durante 20 horas para garantir a total dissolução do polímero. Posteriormente, as soluções foram filtradas com filtro de PTFE, com diâmetro de poro 0,45 µm (Millex LCR). O volume de injeção foi de 100 µL, sob fluxo constante de 1,0 mL/min do eluente na temperatura de 30 °C. Os padrões usados no método de calibração universal foram os de poliestireno (PS).

Procedimento analítico

A análise dos dados de redução da massa molar foi efetuada através do estudo cinético utilizando o modelo de ordem *n*, que é um modelo matemático que representa a taxa

de reação decrescente como função do grau de conversão isotérmico α ($0 \leq \alpha \leq 1$).

No modelo cinético de ordem *n*, a taxa de reação $d\alpha/dt$ obedece à seguinte relação matemática (Equação 1, 2):

$$\frac{d\alpha}{dt} = k \cdot (1 - \alpha)^n \quad (1)$$

$$k = k_0 e^{-E_a/RT} \quad (2)$$

no qual, k_0 é o fator pré-exponencial (min⁻¹), E_a a energia de ativação (J.mol⁻¹), R a constante dos gases (8,314 J.mol⁻¹.K) e T a temperatura absoluta (K).

A Equação (1) pode ser integrada analiticamente na Equação (3):

$$\alpha = 1 - [1 + (n-1)kt]^{1/1-n} \quad (3)$$

O grau de conversão isotérmico α está relacionado ao avanço da reação de redução de massa molar, de modo que a sua avaliação experimental fornecerá resultados inversos às massas molares, isto é, quanto maior o grau de conversão α , menor será a massa molar ponderal média M_p . Desta forma, a partir dos dados de massa molar ponderal média $M_p(t)$, pode-se determinar o grau de reação a partir da Equação (4):

$$\alpha = 1 - \frac{M_p(t)}{M_{p0}} \quad (4)$$

na qual, $M_{p0} = 273.204$ Da, é a massa molar ponderal inicial do PHBHV. Assim, do grau de conversão a partir dos resultados de GPC de (4), aplicada a regressão não linear (3), obtém-se os parâmetros cinéticos: constante de reação k e ordem de reação n .

Resultados e Discussão

Redução da massa molar via hidrólise ácida

Os resultados de redução da massa molar ponderal média relativa à massa molar inicial do PHBHV, $M_p(t)/M_{p0}$ nas temperaturas de 65, 90 e 95 °C do processo de hidrólise ácida, estão mostrados na Figura 2. Os gráficos da Figura 3 mostram as curvas de grau de conversão isotérmico, α em função do tempo. Observou-se que a 65 °C, a cinética de reação é significativamente mais lenta do que nas demais temperaturas.

No cálculo cinético obteve-se os valores do fator pré-exponencial, $k_0 = 1,1 \cdot 10^4$ min⁻¹ e de energia de ativação da reação de redução de massa molar por hidrólise ácida de 41,6 kJ.mol⁻¹.

Redução da massa molar via transesterificação com glicóis

Os resultados de redução da massa molar ponderal média relativa à massa molar inicial do PHBHV, $M_p(t)/M_{p0}$ para duas concentrações de etilenoglicol e hexilenoglicol a 60 °C,

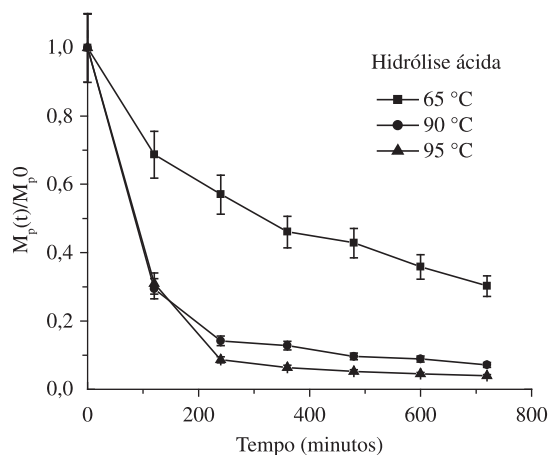


Figura 2. Efeito da temperatura na redução da massa molar do PHBHV pela hidrólise ácida com HCl 3N.

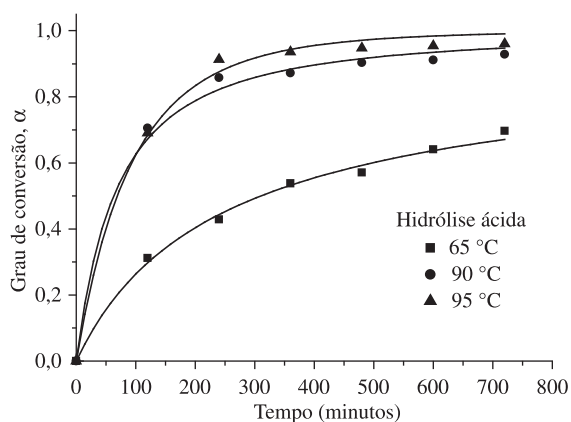


Figura 3. Efeito da temperatura na cinética de redução da massa molar do PHBHV pela hidrólise ácida com HCl 3N.

estão mostrados nas Figuras 4 e 5, respectivamente, as quais mostram as curvas do grau de conversão isotérmico, α em função do tempo, nas quais observou-se que o hexilenoglicol apresenta taxa de reação maior do que a observada para o etilenoglicol. Em relação à concentração de glicol, não foram observadas diferenças significativas nas curvas de conversão.

Redução da massa molar via reação com borohidreto de sódio

Os resultados de redução da massa molar ponderal média relativa à massa molar inicial do PHBHV, $M_p(t)/M_{p0}$ para a redução com 1% de NaBH_4 nas temperaturas de 10, 25 e 50 °C, estão mostrados na Figura 6. Na análise cinética mostrada nas curvas de grau de conversão isotérmico, α em função do tempo, mostradas na Figura 7, observou-se que a velocidade de reação para a redução com NaBH_4 é significativamente maior do que nas outras reações de redução apresentadas anteriormente. Calculando-se o fator pré-exponencial, $k_0 = 1,0 \cdot 10^{16} \text{ min}^{-1}$ e a energia de ativação, $E_a = 95,8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, pode-se comparar quantitativamente a maior velocidade de reação em relação aos valores obtidos na redução por hidrólise ácida.

Os resultados de redução da massa molar ponderal média relativa à massa molar inicial do PHBHV, $M_p(t)/M_{p0}$ para a

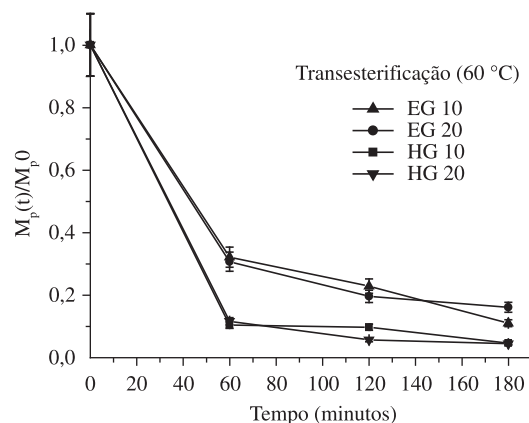


Figura 4. Redução da massa molar do PHBHV com o tempo de reação de transesterificação com etilenoglicol (EG) e hexilenoglicol (HG) em concentrações de 10 e 20 g a 60 °C.

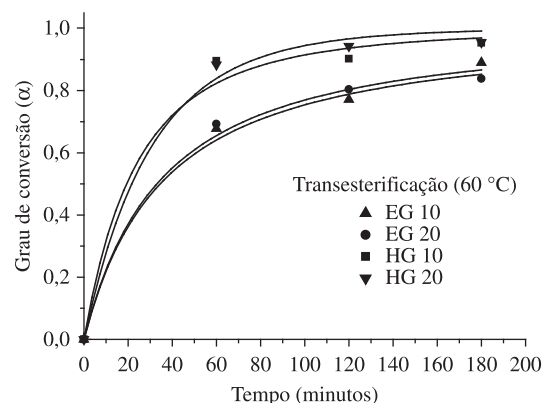


Figura 5. Grau de conversão da redução da massa molar do PHBHV por reação de transesterificação com etilenoglicol (EG) e hexilenoglicol (HG) em concentrações de 10 e 20 g a 60 °C.

redução com 2% de NaBH_4 nas diferentes temperaturas estão mostrados na Figura 8. Na análise cinética mostrada nas curvas de grau de conversão isotérmico, α em função do tempo, mostradas na Figura 9, observou-se o mesmo comportamento exibido para o NaBH_4 na concentração de 1%. O cálculo do fator pré-exponencial, $k_0 = 2,4 \cdot 10^{20} \text{ min}^{-1}$ e da energia de ativação, $E_a = 119,8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ mostram o efeito de aceleração da reação com o aumento da concentração do NaBH_4 .

A Tabela 1 apresenta o quadro síntese dos parâmetros cinéticos calculados pelo modelo cinético de ordem n . Todas as estimativas foram baseadas a partir dos valores obtidos nas análises de GPC, que por sua vez apresentaram um desvio experimental máximo de 10%. A partir da análise dos dados da Tabela pode-se concluir que as reações mais lentas de redução de massa molar, caso da hidrólise ácida e da transesterificação catalítica, apresentaram constantes de reação k menores e reações de menor ordem, como pode ser constatado pelos valores do expoente n . Por outro lado, as reações de redução com as duas concentrações de NaBH_4 apresentaram valores da constante de reação significativamente maiores. Em relação à ordem das reações com NaBH_4 , a mesma foi praticamente idêntica nas duas concentrações, enquanto para as demais metodologias estudadas os valores observados foram superiores.

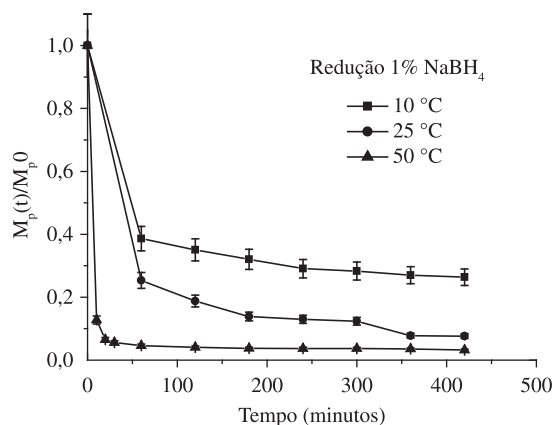


Figura 6. Redução da massa molar do PHBHV no decorrer das reações utilizando-se 1% de NaBH_4 nas temperaturas de 10, 25 e 50 °C.

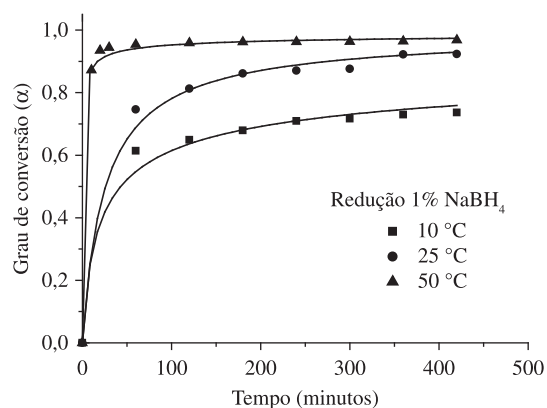


Figura 7. Grau de conversão da redução da massa molar do PHBHV utilizando-se 1% de NaBH_4 nas temperaturas de 10, 25 e 50 °C.

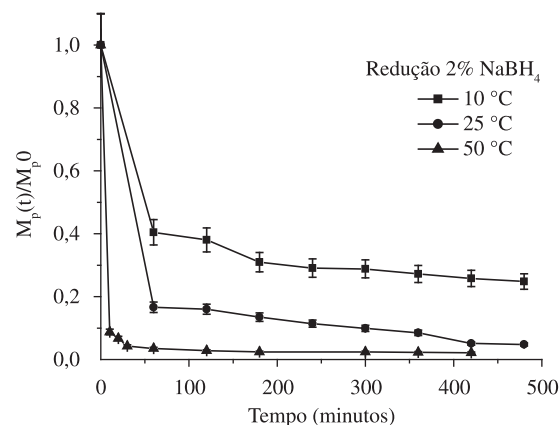


Figura 8. Redução da massa molar do PHBHV no decorrer das reações utilizando-se 2% de NaBH_4 nas temperaturas de 10, 25 e 50 °C.

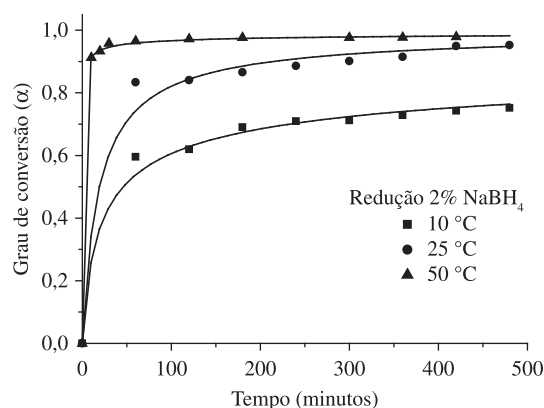


Figura 9. Grau de conversão da redução da massa molar do PHBHV utilizando-se 2% de NaBH_4 nas temperaturas de 10, 25 e 50 °C.

Tabela 1. Parâmetros cinéticos calculados pelo modelo de ordem n .

Método	Condições	k (min^{-1})	n	E_a ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)
Hidrólise ácida com HCl 3 N	65 °C	$3,85\cdot 10^{-3}$	2,45	41,6
	90 °C	$1,43\cdot 10^{-2}$	1,72	
	95 °C	$1,08\cdot 10^{-2}$	1,20	
Transesterificação a 60 °C com etilenoglicol e catalisador ácido <i>p</i> -toluenosulfônico	10 g/3 g	$2,77\cdot 10^{-2}$	1,88	-
	20 g/6 g	$2,82\cdot 10^{-2}$	1,81	
Transesterificação a 60 °C com hexilenoglicol e catalisador ácido <i>p</i> -toluenosulfônico	10 g/3 g	$4,13\cdot 10^{-2}$	1,39	-
	20 g/6 g	$3,31\cdot 10^{-2}$	1,09	
Redução com 1% NaBH_4	10 °C	$5,34\cdot 10^{-2}$	3,96	95,8
	25 °C	$4,08\cdot 10^{-2}$	2,14	
	50 °C	6,22	3,40	
Redução com 2% NaBH_4	10 °C	$4,98\cdot 10^{-2}$	3,96	119,8
	25 °C	$5,60\cdot 10^{-2}$	2,18	
	50 °C	20,13	3,51	

Desvio experimental máximo de 10%.

Os valores das E_a para as reações de transesterificação não foram calculados, uma vez que todas as transesterificações foram efetuadas na mesma temperatura (60 °C). Apesar disso, através da comparação entre os valores da constante de Arrhenius k de todas as reações de redução, foi possível concluir que as reações de transesterificação têm reatividade intermediária entre as reações de hidrólise ácida (menor

reatividade dentre todas) e as reações de redução com NaBH_4 (mais reativas dentre as reações estudadas).

Conclusão

Neste trabalho foram realizados estudos de redução da massa molar do copolímero de PHBHV empregando

três metodologias distintas: hidrólise ácida com HCl; transesterificação com etilenoglicol ou hexilenoglicol e redução com borohidreto de sódio, visando a utilização desses polímeros na preparação de sistemas de liberação controlada de fármacos.

Os três métodos promoveram de maneira eficiente a redução da massa molar com diferentes taxas de reação, a qual foi constatada através do estudo cinético empregando o modelo matemático de ordem n .

A reação de redução com o NaBH_4 foi a metodologia mais eficiente, tendo em vista o menor tempo de reação bem como a menor temperatura necessária para promover a diminuição da massa molar do PHBHV. A redução com 2% de NaBH_4 apresentou os valores do fator pré-exponencial, $k_0 = 2,4 \cdot 10^{20} \text{ min}^{-1}$ e de energia de ativação, $E_a = 119,8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$.

O modelo matemático de ordem n utilizado neste trabalho foi efetivo na determinação dos parâmetros cinéticos que caracterizaram quantitativamente a cinética de reação mais eficiente na redução da massa molar do PHBHV.

Agradecimentos

Os autores agradecem a PHB Industrial S.A. pela doação do material utilizado neste trabalho e pelas análises de GPC e ao CNPq e à FAPESP pelo auxílio financeiro.

Referências Bibliográficas

1. Ranjana, S. & Alok, R. - Rev. Macromol. Chem. Phys., **35**, p.327 (1995).
2. Sudesh, K.; Abe, H. & Doi, Y. - Prog. Polym. Sci., **25**, p.1503 (2000).
3. Chandra, R. & Rustgi, R. - Prog. Polym. Sci., **23**, p.1273 (1998).
4. Simioni, A. R.; Vaccari, C.; Re, M. I. & Tedesco, A. C. J. Mater Sci. **43**, p.580, (2008).
5. Deng, X. M. & Hao, J. Y. - Eur. Polym. J., **37**, p.211 (2001).
6. Sridewi, N.; Bhubalan, K. & Sudesh, K. - Polym. Degrad. Stab., **91**, p.2931 (2006).
7. Silva, L. F. & Gomez, J. G. C. - Quim. Nova, **30**, p.1732 (2007).
8. Pouton, C. W. & Akhtar, S. - Adv. Drug Deliv. Rev., **18**, p.133 (1996).
9. Kunze, Z.; Freier, T.; Kramer, S. & Schmitz, P. K. J. - Mat, Sci. Mat. Med., **13**, p.1051 (2002).
10. Montoro, S. R. - “*Redução da Massa Molar do Poli (3-Hidroxibutirato-co-3-Hidroxivalerato) (PHBHV) para sua Posterior Utilização no Desenvolvimento de Sistemas de Liberação Controlada*”, Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Brasil (2005).
11. Arslan, H.; Hazer, B. & Kowalczyk, M. - J. Appl. Polym. Sci., **85**, p.965 (2002).
12. Zhang, X.; Yang, H.; Liu, Q.; Zhenh, Y.; Xie, H.; Wang, Z. & Cheng, R. - J. Polymer Sci. Polymer Chem., **43**, p.4857 (2005).
13. Nguyen, S. & Marchessault, R. H. - Macromol. Biosci. **4**, p.262 (2004).
14. Lao, H.; Renard, E.; Linossier, I.; Langlois, V. & Vallée-Rehel, K. - Biomacromolecules, **8**, p.416 (2007).
15. Nguyen, S.; Yu, G. & Marchessault, R. H. - Biomacromolecules, **3**, p.219 (2002).
16. Oliveira, A. M.; Oliveira, P. C.; Santos, A. M.; Zanin, M. H. A. & Ré, M. I. - Braz. J. Phys., **39**, (2009).
17. Lauzier, C.; Revol, J. F.; Debzi, E. M. & Marchessault, R. H. - Polymer, **35**, p.4156 (1994).
18. Yu, G. & Marchessault, R. H. - Polymer, **41**, p.1087 (2000).
19. Spitalský, Z.; Lacík, I.; Lathová, E.; Janigová, I. & Chodák, I. - Polym. Degrad. Stab., **91**, p.856 (2006).
20. Baran, E. T.; Özer, N. & Hasirci, V. - J. Microencapsul., **19**, p.363 (2002).
21. Borchardt, H. J. & Daniels, F. - J. Am. Chem. Soc., **41**, p.79 (1957).

Enviado: 26/06/09

Reenviado: 08/10/09

Aceito: 28/10/09

DOI: 10.1590/S0104-14282010005000005