

CRESCIMENTO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS DE MILHO SUBMETIDOS AO ESTRESSE SALINO¹

Josabete Salgueiro Bezerra^{2*}; Lília Willadino³; Terezinha Rangel Camara⁴

²Pós - Graduanda do Depto. de Biologia - UFRPE.

³Depto. de Biologia, Lab. de Cultura de Tecidos Vegetais - UFRPE, R. Dom Manoel de Medeiros, s/n, CEP: 52171-950 - Recife, PE.

⁴Depto. de Química, Lab. de Cultura de Tecidos Vegetais - UFRPE.

*Autor correspondente <josabetecarvalho@terra.com.br>

RESUMO: A salinidade do solo é um problema muito importante em áreas irrigadas do semi-árido brasileiro, onde o milho é uma cultura de subsistência. Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito de concentrações de NaCl sobre calos embriogênicos, da cultivar Jatinã C3 Anão, uma importante cultivar de milho no Nordeste do Brasil. A indução dos calos foi feita a partir de embriões imaturos assepticamente retirados das sementes e inoculados em meio de cultura N6 suplementado com 2 mg L⁻¹ de 2,4-D. Os calos embriogênicos foram submetidos a diferentes concentrações de cloreto de sódio (0; 50; 100; 150 e 200 mmol L⁻¹ de NaCl), com três repetições durante 60 dias. Os calos submetidos a 100 mmol L⁻¹ de NaCl apresentaram aumento no conteúdo de prolina na ordem de 37% quando comparado com o nível de 50 mmol L⁻¹ de NaCl, sugerindo um efeito positivo da acumulação deste aminoácido em resposta ao estresse salino. Por outro lado, em elevadas concentrações salinas (150 e 200 mmol L⁻¹) observou-se decréscimo no crescimento dos calos, bem como redução nos teores de prolina, provavelmente em função de um aumento da fração não embriogênica dos calos.

Palavras-chave: *Zea mays*, salinidade, embriogênese somática, prolina

EMBRYOGENIC CALLUS GROWTH OF MAIZE SUBMITTED TO SALT STRESS

ABSTRACT: Soil salinity is a very important problem in irrigated areas of the Brazilian semi-arid area, where maize is a subsistence crop. To study the effect of NaCl concentrations in embryogenic calli of Jatinã C3 Anão, an important maize cultivar of the Northeast of Brazil, calli were induced using immature embryos aseptically removed from the seeds and grown on N6 medium supplemented with 2 mg L⁻¹ of 2,4-D. To study the effect of salinity *in vitro*, embryogenic calli were subjected to different concentrations of sodium chloride (0; 50; 100; 150 and 200 mmol L⁻¹ of NaCl), in three replicates, during 60 days. Calli subjected up to 100 mmol L⁻¹ NaCl showed proline concentration 37% higher than callus treated with 50 mmol L⁻¹ NaCl. This result suggests a positive effect of proline accumulation at salt stress conditions. However, at the highest concentration tested (150-200 mmol L⁻¹ NaCl) as lower growth and also a lower proline accumulation was observed, probably due to an increase of the non embryogenic fraction of calli.

Key words: *Zea mays*, salinity, somatic embryogenesis, proline

INTRODUÇÃO

A crescente salinização do solo e da água ameaça a agricultura de zonas áridas e semi-áridas, bem como de outras regiões do mundo (Epstein et al., 1980). Plantas cultivadas em ambientes com excesso de NaCl apresentam primeiramente uma inibição no crescimento, freqüentemente acompanhada pela presença de áreas necrosadas nas folhas. A pressão hidrostática celular diminui, pode ocorrer a queda das folhas e posteriormente a morte progressiva de toda a planta (Brawley & Mathes, 1990).

Nas zonas semi-áridas do Estado de Pernambuco a cultura do milho ocupa uma posição destacada em relação à área cultivada totalizando 212ha (Anuário Estatístico do Brasil, 1994).

Uma das respostas mais comuns a todos os organismos, submetidos ao estresse hídrico ou salino, é a produção e /ou acumulação de solutos compatíveis. Entre os solutos, cujo aumento da concentração é acentuado em condições de estresse, encontra-se freqüentemente a prolina. Este aminoácido está presente em altas concentrações nas células de plantas halófitas, e sua acumulação em muitas plantas não halófitas certamente está envolvida com situações de estresse (Yoshida et al., 1997). Heuer (1994) indicou que o acúmulo de prolina difere entre cultivares adaptados a certas condições ambientais, assim como em espécies tolerantes à seca ou à salinidade e que o aumento da prolina depende do tempo de duração do estresse e da concentração dos sais.

Segundo Smith & Drew (1990), a seleção *in vitro* é uma metodologia que possibilita a identificação de

¹Trabalho apresentado na 20ª Reunião Nordestina de Botânica, Natal, 1996.

plantas tolerantes a vários tipos de estresse, tais como: herbicidas, baixas temperaturas, alumínio, manganês, toxinas de patógenos e salinidade. Vários grupos, que se encontram trabalhando com a tolerância à salinidade, têm aplicado técnicas de cultivo *in vitro* para selecionar clones celulares capazes de crescer na presença de sal, e de regenerar plantas em condições seletivas (Croughan et al., 1981). Entre várias técnicas, o cultivo de calos pode ser utilizado para selecionar células capazes de crescer na presença de sais, como o NaCl, e, quando possível, regenerar plantas sob condições seletivas (Croughan et al., 1981; Raghava Ram & Nabors, 1985). Este tipo de técnica tem sido bastante utilizada para seleção de mutantes ou variantes para as mais diversas características. Por exemplo, pode-se citar a seleção de linhagens celulares com maior produção de análogos de aminoácidos (Hibberd et al., 1980) e tolerância à salinidade (Mattioni et al., 1997).

Devido a grande importância da cultura do milho, e do crescente problema da salinização dos solos nas áreas agricultáveis do semi-árido nordestino, este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos de diferentes níveis de salinidade no crescimento e no conteúdo de prolina de calos embriogênicos da cultivar Jatinã C3 anão.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal Rural de Pernambuco em Recife.

Para obtenção dos calos, utilizou-se embriões imaturos de milho da cultivar Jatinã C3 anão, coletados 14 dias após a polinização. As sementes foram esterilizadas em câmara de fluxo laminar, com hipoclorito de sódio a 25% durante 12 minutos em agitação, e em seguida lavadas três vezes com água deionizada estéril. Os embriões foram inoculados com o eixo embrionário em contato com o meio de cultura N6 (Chu et al., 1975) modificado (adição de 6 mmol L⁻¹ de prolina) e suplementado com 2 mg L⁻¹ de 2,4-D. O meio de cultura, com pH ajustado a 5,8, foi autoclavado a 120°C durante 20 minutos, para esterilização. Foram inoculados três embriões por frasco, contendo aproximadamente 40 mL de meio. Os calos formados foram transferidos para tubos de ensaio, ficando um calo por tubo. Após cinco subcultivos, foram selecionados os calos embriogênicos para a realização do experimento.

Para estudar o efeito da salinidade *in vitro*, os calos foram cultivados em meio de cultura N6 suplementado com 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, e acrescido de diferentes concentrações de cloreto de sódio (0; 50; 100; 150 e 200 mmol L⁻¹ de NaCl). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, utilizando-se cinco concentrações de cloreto de sódio, e cinco repetições por tratamento. O experimento foi mantido em sala com fotoperíodo de 16 horas (1.500 lux)

e temperatura de 26 ± 2°C. Foram realizados três subcultivos nestas condições, tendo cada subcultivo a duração de 20 dias. Ao final de cada subcultivo, foi determinado o crescimento dos calos e no final do terceiro subcultivo, os calos foram utilizados para determinação do conteúdo de prolina.

O crescimento dos calos foi avaliado através do peso da matéria fresca. Para obtenção do peso fresco inicial dos calos (PIC), pesou-se primeiramente o tubo de ensaio com o meio de cultura (PT), depois o tubo de ensaio com o meio de cultura e o calo (PTC) sendo a diferença entre ambos correspondente ao peso inicial do calo. Durante cada subcultivo, o resíduo (tecido necrosado e tecido em diferenciação) era separado do calo embriogênico, obtendo-se separadamente o peso do calo embriogênico (PCE) e o peso do resíduo do calo (PRC). O crescimento do calo embriogênico foi determinado pela diferença entre o peso final do calo embriogênico e o peso inicial do calo.

A determinação do teor de prolina foi realizada de acordo com a técnica proposta por Bates et al. (1973) com três repetições por tratamento. Amostras com 0,5g de material fresco foram homogeneizadas em ácido sulfosalicílico a 3%, e em seguida filtrada em papel de filtro Whatman nº2. Em tubo de ensaio contendo 2 mL do filtrado, foi adicionado 2 mL de ninhidrina ácida e 2 mL do ácido acético glacial, mantendo-se os tubos por uma hora a 100°C e transferindo-os, em seguida, para banho de gelo. A fração orgânica foi lida a 520 nm, e a concentração de prolina foi determinada usando-se uma curva de calibração preparada com prolina pura.

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente de forma isolada através da análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias realizadas pelo teste de Tukey a 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 100 dias de cultivo, 52% dos calos formados eram compactos, amarelados e com nodulações evidentes na superfície, sendo possível o isolamento de embriões somáticos, caracterizando o calo embriogênico (Figura 1). Michoux-Ferriere et al. (1992), trabalhando com *Hevea brasiliense*, afirmaram que nodulações presentes nos calos mostraram, através de posterior evolução, serem unidades embriogênicas, identificadas como pró-embriões globulares de origem multicelular. Os calos embriogênicos a nível celular são compostos, em sua maioria, por células meristemáticas com dimensões relativamente pequenas e com citoplasma denso (Tomes, 1985). Em milho, estes calos são classificados como calos compactos ou do tipo I, como relatado em nosso trabalho, e calos friáveis ou do tipo II (Green et al., 1983; Armstrong & Green, 1985). Estes mesmos autores comentam que o tipo de calo está relacionado com a idade do embrião, o genótipo e principalmente com a concentração de sacarose e prolina no meio.

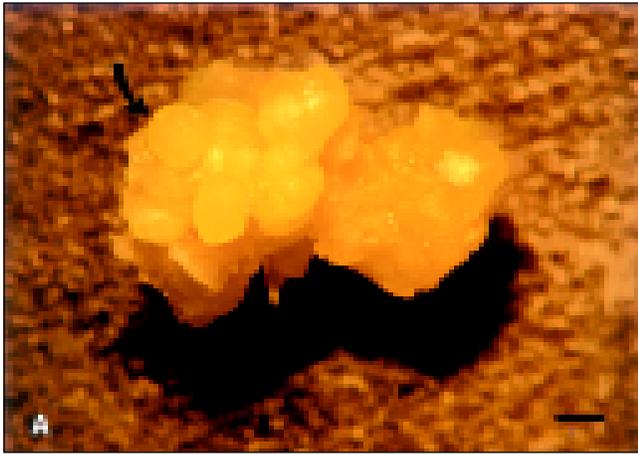


Figura 1 - A) Calo embriogênico da cultivar Jatinã C3 Anão, aos 100 dias de cultivo sem NaCl (Bar. 1,15 mm); B) Embriões somáticos do calo (Bar. 1,15 mm).

Os calos embriogênicos apresentaram uma redução no crescimento com o aumento da concentração de NaCl aos 40 e 60 dias de cultivo (Figura 2). A redução do crescimento de calos embriogênicos, em função do aumento dos níveis de NaCl, foi observado por diversos autores em culturas como o arroz (Reddy et al., 1986), trigo, batata, fumo (Nabors et al., 1975) e, especificamente, em milho, pode-se citar os trabalhos de Lupotto et al. (1989), Willadino et al. (1996) e Camara et al. (1998). Esta redução do crescimento se dá em função de desequilíbrios metabólicos, provocados pelo NaCl, a nível de fotossíntese, respiração, síntese proteica, entre outros processos (Greenway & Munns, 1980; Wyn & Gorham, 1983). Lupotto et al. (1989), trabalhando com calos embriogênicos do milho híbrido (W64A x A188), observaram que aos 20 dias de cultivo, os calos já mostravam uma rápida queda no crescimento relativo, registrando-se uma redução de 50% na presença de 150 mmol L⁻¹ de NaCl. Por outro lado, calos da cultivar Jatinã C3 anão nesta mesma concentração salina não apresentaram redução no crescimento quando comparados ao controle (Figura 2) o que sugere uma maior tolerância desta cultivar. Esse resultado confirma

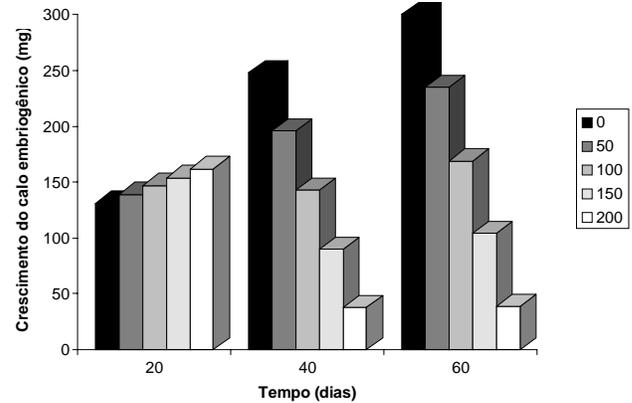


Figura 2 - Crescimento de calos embriogênico de Jatinã C3 Anão aos 20, 40 e 60 dias em cultivo com diferentes concentrações de NaCl (0 a 200 mmol L⁻¹). Médias ajustadas pela equação de regressão linear.

que a cultivar Jatinã C3 anão apresenta uma certa tolerância à salinidade, como relatado por Willadino et al. (1994) ao comparar 10 cultivares de milho em campo. Já Broetto et al. (1995), trabalhando com calos de feijão, observaram que logo após 13 dias de cultivo, houve um decréscimo de 47% no crescimento relativo para os calos com 33 e 67 mmol L⁻¹ de NaCl, evidenciando a sensibilidade desta cultura ao NaCl.

Com relação ao conteúdo de prolina, não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos. Observou-se que os calos apresentaram uma tendência ao acúmulo de prolina quando submetidos a 100 e 150 mmol L⁻¹ de NaCl, correspondendo respectivamente a 38,8 e 34,3 μmol mg⁻¹ de peso fresco. A 200 mmol L⁻¹ de NaCl os calos tenderam a uma redução de 24% no conteúdo de prolina quando comparados ao controle (TABELA 1). Resultados similares foram obtidos por Camara et al. (1998) para diferentes genótipos de milho. Os referidos autores observaram que o acúmulo de prolina só aconteceu a partir de 68 mmol L⁻¹ de NaCl e que, em elevados níveis de NaCl (205 mmol L⁻¹), o conteúdo de prolina foi reduzido quando comparado ao controle. Além disso, relataram que nos mais altos níveis de NaCl a diminuição do conteúdo de prolina foi acompanhado por um aumento no total de poliaminas, demonstrando que o acúmulo de outros solutos compatíveis depende da intensidade estresse imposto.

Vários autores (Torello & Rice, 1986; Broetto et al., 1995) argumentam que o acúmulo de prolina ocorre em função do aumento da hidrólise de proteínas em situações de estresse salino ou como resultado da conversão de açúcares na via do glutamato.

Viégas et al. (1999), estudando plantas jovens de cajú submetidas ao NaCl, também verificaram um aumento no conteúdo de prolina ao nível de 100 mmol L⁻¹ de NaCl, e justificaram que esse aumento está relacionado com o ajustamento osmótico, atuando como um mecanismo de proteção para a planta tolerar o baixo potencial osmótico. A prolina é acumulada como soluto

TABELA 1 - Crescimento e conteúdo de prolina em calos embriogênicos da cultivar Jatinã C3 Anão aos 60 dias de cultivo em meio N6 com diferentes concentrações de NaCl (0 a 200 mmol L⁻¹).

Variáveis	mmol L ⁻¹ de NaCl				
	0	50	100	150	200
Crescimento (mg)	300,5 a	235,0 ab	169,0 b	104,0 c	38,5 c
Crescimento (% do controle)	100,0	78,0	56,0	35,0	13,0
Conteúdo de prolina (mol mg ⁻¹ de peso fresco)	30,9 a	29,3 a	38,8 a	34,3 a	24,0 a
Acumulação de prolina (% do controle)	100,0	94,7	125,6	111,0	77,6

Médias seguidas por letras distintas diferem a 5%.

compatível no citoplasma para neutralizar os efeitos dos sais acumulados no vacúolo (Steward et al., 1974; LeRudulier et al., 1984). O acúmulo de prolina favorece também a hidratação do protoplasma além de funcionar como reserva, especialmente para a síntese de algumas enzimas específicas (Navari-Izzo et al., 1990; Lima et al., 1997).

Segundo a literatura (Romagopal, 1986; Broetto et al., 1995; Willadino et al., 1996), a variação de prolina encontrada quando os calos são submetidos a níveis de estresse salino entre 0 e 300 mmol L⁻¹ de NaCl é de 13 a 40 µmol mg⁻¹ de peso fresco sendo esta acumulação considerada como parte do processo de adaptação ao estresse (Djilianov et al., 1997; Mattioni et al., 1997). Atualmente, sabe-se que o acúmulo de prolina está relacionado com a tolerância ao estresse osmótico, e que é controlado por genes que codificam as enzimas da biossíntese da prolina (Kavi Kishor et al., 1995).

CONCLUSÃO

O meio N6 suplementado com 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, é adequado para a formação de calos embriogênicos a partir de embriões imaturos da cultivar Jatinã C3 Anão;

A redução do crescimento de calos embriogênicos, ocorre tanto em função do tempo de cultivo quanto do aumento dos níveis de NaCl;

O conteúdo de prolina dos calos tenderam a aumentar com o incremento da concentração de NaCl até o nível de 150 mmol L⁻¹, mas em condições de estresse severo observou-se uma tendência ao decréscimo no conteúdo deste aminoácido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL, v.54, p.1-105, 1994.
- ARMSTRONG, C.L.; GREEN, C.E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta*, v.164, p.207-214, 1985.
- BATES, L.S.; WALDREN, R.P.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, v.39, p.205-207, 1973.
- BRAWLEY, J.; MATHES, M.C. The influence of NaCl on the growth of english ivy (*Hedera helix*) cutting and callus tissue. *Environmental and Experimental Botany*, v.30, p.43-50, 1990.
- BROETTO, F.; LIMA, G.P.P.; BRASIL, O.G. Tolerância à salinidade em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). *Science Agriculture*, v.52, p.164-166, 1995.
- CAMARA, T.R.; WILLADINO, L.; TORNÉ, J.M.; RODRIGUES, P.; SANTOS, M.A. Efeito da putrescina e do estresse salino em calos de milho. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.10, p.153-156, 1998.
- CHU, C.C.; WANG, C.C.; SUN, C.S.; HSU, C.; YIN, K.C.; CHU, C.Y.; BI, F.Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice, through comparative experiments of the nitrogen sources. *Science Sinica*, v.16, p.659-668, 1975.
- CROUGHAN, T.P.; STAVAREK, S.J.; RAINS, D.W. In vitro development of salt resistant plants *Environmental and Experimental Botany*, v.21, p.317-324, 1981.
- DJILIANOV, D.; DRAGIISKA, R.; YORDANOVA, R.; DOLTCHINKOVA, V.; YORDANOV, Y.; ATASSANOV, A. Physiological changes in osmotically stressed detached leaves of alfafa genotypes selected *in vitro*. *Plant Science*, v.129, p.147-156, 1997.
- EPSTEIN, E.; NORLYN, J.D.; RUSH, D.W.; KINGSBURY, R.W.; KELLEY, D.B.; CUNNINGHAM, G.A. Saline culture of crops: a genetic approach. *Science*, v.210, p.399-404, 1980.
- GREEN, C.E.; ARMSTRONG, C.L.; ANDERSON, P.C. Somatic cell genetic system in corn. In: Green C.E. (ed.) *Advances in gene technology: Molecular genetics of plants and animals*. New York: Academic Press, 1983. P.147-157.
- GREENWAY, H.; MUNNS, R. Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Annual Review of Plant Physiology*, v.31, p.149-190, 1980.
- HEUER, B. Osmoregulatory role of proline in water-and salt-stressed plants. In: PESSARAKI, M. (Ed.) *Handbook of plant and crop stress*. New York: Marcel Dekker, 1994. p.363-383.
- HIBBERD, K.A.; WALTER, T.; GREEN, C.E.; GENGEBACH, B.G. Selection and characterization of feedback- insensitive tissue culture of maize. *Planta*, v.148, p.183-187, 1980.
- KAVI KISHOR, P.B.; HONG, Z.; MIAO, G-H.; HU, C-A.A.; VERMA, D.P.S. Overexpression of D1-Pyrroline-5-Carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology*, v.108, p.1387-1394, 1995.
- LERUDULIER, D.; STROM, A.M.; DANDEKAR, A.M.; SMITH, L.T.; VALENTINE, C.R. Molecular biology of osmoregulation. *Science*, v.224, p.1064-1968, 1984.
- LIMA, G.P.P.; ROSSI, C.; HAKVOORT, D.M.R. Atividade de peroxidase (EC1.11.1.7) e teor de prolina no embrião e cotilédones de feijoeiro *Phaseolus vulgaris* L. em condições de salinidade. *Science Agriculture*, v.54, p.217-220, 1997.
- LUPOTTO, E.; LUSARDI, M.C.; MONGODI, M. In vitro selection of maize (*Zea mays* L.): Salt tolerant soma clones and plants regeneration. *Journal of Genetics and Breeding*, v.43, p.215-222, 1989.
- MATTIONI, C.; LACERENZA, N.G.; TROCCOLI, N.; DE LEONARDIS, A.M.; DIFONZO, N. Water and salt stress-induced alterations in proline metabolism of *Triticum durum* seeding. *Physiologia Plantarum*, v.101, p.787-792, 1997.

- MICHOUX-FERRIERE, N.; GROUT, H.; CARRON, M.P. Origen and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae). **American Journal of Botany**, v.79, p.174-180, 1992.
- NABORS, M.W.; DANIELS, A.; NADOLNY, L.; BROWN, C. Sodium chloride tolerant lines of tobacco cells. **Plant Science Letters**, v.4, p.155-159, 1975.
- NAVARI-IZZO, F.; QUARTACCI, M.F.; IZZO, R. Water stress induced changes in protein and free aminoacids in field grown maize and sunflower. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.28, p.531-537, 1990.
- RAGHAVA RAM, N.V.; NABORS, M.W. Salinity Tolerance. In: CHEREMISINOFF, P.N.; OULETTE, R.P. (Ed.) **Biotechnology applications and research**. London: Technomic Put. Lanc, 1985. p.623-642.
- REDDY, P.J.; VAIDYANATH, K. In vitro characterization of salt stress effects and the selection of salt tolerant plants in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.71, p.757-760, 1986.
- ROMAGOPAL, S. Protein synthesis in a maize callus exposed to NaCl and mannitol. **Plant Cell Reports**, v.5, p.430-432, 1986.
- STEWART, C.R.; LEE, J.A. The rate of proline accumulation in halophytes. **Planta**, v.120, p.279-289, 1974.
- SMITH, M.K.; DREW, R.A. Current applications of tissue culture in plant propagation and improvement. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.17, p.267-289, 1990.
- TOMES, D.T. Cell culture, somatic embryogenesis and plant regeneration in maize, rice, sorghum and millets. In: BRIGHT, S.W.; JONES, M.G.K. (Ed.) **Advances in agricultural biotechnology, cereal tissue and cell culture**. Boston: Nijhoff/Junk, 1985. p.175-203.
- TORELLO, W.A.; RICE, L.A. Effects of NaCl stress on proline and cation accumulation in salt sensitive and tolerant turfgrasses. **Plant and Soil**, v.93, p.241-247, 1986.
- VIÉGAS, R.A.; SILVEIRA, J.A.G. Ammonia assimilation and proline accumulation in young cashew plants during long term exposure to NaCl-salinity. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, p.153-159, 1999.
- YOSHIBA, Y.; KYIOSUE, T.; NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants water stress. **Plant and Cell Physiology**, v.38, p.1095-1102, 1997.
- WILLADINO, L.; CAMARA, T.R.; TABOSA, S.N.; ANDRADE, A.G.; GOMES, R.V.; SOUZA, A.J. Avaliação de cultivares de milho em solo do semi-árido de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.29, p.1059-1065, 1994.
- WILLADINO, L.; CAMARA, T.; BOGET, N.; CLAPAROLS, I.; TORNE, J.M. Polyamine and free amino acid variations in NaCl treated embryogenic maize callus from sensitive and tolerant cultivars. **Journal of Plant Physiology**, v.149, p.179-185, 1996.
- WYN, J.R.G.; GORHAM, J. Aspects of salt and drought tolerance in higher plants. In: KOSUGE, T.; MEREIOITH, C.P.; HOLLAENDER, A. (Ed.) **Genetic engineering of plants: an agricultural perspective**. New York: Plenum Press, 1983. p.355-370.

Recebido em 13.03.00