

## EFEITO DA IMERSÃO DE LARVAS E NINFAS INGURGITADAS DE *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787) (ACARI: IXODIDAE) EM ÁGUA DESTILADA\*

ADRIANA DA R. PAULA<sup>1</sup>; ELIANE M. PIRANDA<sup>1</sup>; JOÃO LUIZ H. FACCINI<sup>2</sup>; ERIK DAEMON<sup>3</sup>

**ABSTRACT:** - PAULA, A. R.; PIRANDA, E. M.; FACCINI, J.L.H.; DAEMON, E. [The effect of immersion in distilled water on the engorged larvae and nymphs of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae).] Efeito da imersão de larvas e ninfas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) em água destilada. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 14, n. 2, p. 65-69, 2005. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Seropédica, RJ 23890-000, Brazil. E-mail: faccini@ufrj.br

To evaluate the effect of the immersion of engorged larvae and nymphs of *Amblyomma cajennense*, these stages were immersed by 24, 48, 72 and 96 hours in test tubes containing distilled water. The period of premolt of the nymphs increased proportionally to the time of immersion ( $p < 0.05$ ). The ecdysis period, the longevity and the mortality (days) were similar in all of treatments ( $p > 0.05$ ). The percentage of ecdysis in nymphs was reduced after 72 hours of immersion of the larvae ( $p < 0.05$ ). None of the engorged nymphs survived 96 hours of immersion. The period of the adult premolt increased after 48 hours of immersion ( $p < 0.05$ ). The ecdysis period was similar in the treatments of 24 and 48 hours of immersion ( $p > 0.05$ ). The percentage of ecdysis decreased starting from 24 hours of immersion ( $p < 0.05$ ). There was not statistical difference ( $p < 0.05$ ) between the control group and the 24 hours group of immersion for the parameters longevity and mortality. These findings suggest that the engorged nymphs were more sensitive to the immersion that the engorged larvae.

**KEY WORDS:** *Amblyomma cajennense*, engorged larvae and nymphs, immersion, survival.

### RESUMO

Para avaliar o efeito da imersão de larvas e ninfas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense*, estes estágios foram imersos por 24, 48, 72 e 96 horas em tubos de ensaio contendo água destilada. O período de pré-ecdise das ninfas aumentou proporcionalmente ao tempo de imersão ( $p < 0,05$ ). O período de ecdise, a longevidade e a mortalidade foram semelhantes em todos os tratamentos ( $p > 0,05$ ). O percentual de ecdise ninfal foi reduzido após 72 horas de imersão das larvas ( $p < 0,05$ ). Nenhuma das ninfas ingurgitadas sobreviveu a 96 horas de imersão. O

período de pré-ecdise dos adultos aumentou após 48 horas de imersão ( $p < 0,05$ ). O período de ecdise foi semelhante nos tratamentos de 24 e 48 horas de imersão ( $p > 0,05$ ). O percentual de ecdise diminuiu a partir de 24 horas de imersão ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre o grupo controle e o grupo 24 horas de imersão para os parâmetros longevidade e mortalidade. As ninfas ingurgitadas foram mais sensíveis à imersão que as larvas ingurgitadas.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Amblyomma cajennense*, larvas e ninfas ingurgitadas, imersão, sobrevivência.

### INTRODUÇÃO

Dados sobre a biologia, ecologia e importância de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787), assim como a literatura pertinente ao tema abordado neste artigo, foram resumidos em um artigo recente, no qual os autores publicaram seus resultados sobre o efeito da imersão de larvas não alimentadas da espécie em tela, em água destilada (PAULA et al., 2004).

\* Financiado pelo CNPq e CAPES

<sup>1</sup> Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (CPGCV), Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

<sup>2</sup> Bolsista do CNPq. Departamento de Parasitologia Animal, IV, UFRRJ, Km 7 da BR 465, Seropédica, RJ, 23890-000. E-mail: faccini@ufrj.br (Autor para correspondência).

<sup>3</sup> Departamento de Zoologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

Este artigo dá seqüência ao estudo sobre o efeito da imersão em diferentes estágios da fase de vida livre de *A. cajennense*, apresentando os resultados obtidos sobre o efeito da imersão de larvas e ninfas ingurgitadas.

### MATERIALE MÉTODOS

O presente experimento foi realizado no Laboratório de Ixodologia localizado na Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz (EPPWON), do Departamento de Parasitologia Animal, do Instituto de Veterinária, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), situado em Seropédica - RJ, no período de novembro de 1999 a janeiro de 2002.

Fêmeas ingurgitadas de *A. cajennense* foram coletadas de eqüinos naturalmente infestados, mantidos no *campus* da UFRRJ (22°45'S, 43°41'W). Após a coleta, as mesmas foram transportadas para o laboratório, lavadas em água corrente, secas em papel absorvente, pesadas em balança analítica<sup>1</sup> e identificadas segundo Aragão e Fonseca (1961). As fêmeas foram fixadas dorsalmente em placas de Petri (100 x 15 mm) com auxílio de tiras de esparadrapo e mantidas em estufa incubadora para BOD a 27±1°C, UR<sup>3</sup> 80% e escotofase. Os ovos foram coletados entre o terceiro e o oitavo dias de postura, homogeneizados e fracionados em alíquotas de 50mg, visando a obtenção de larvas e ninfas ingurgitadas artificialmente em coelhos domésticos, segundo técnica publicada em Neitz et al. (1971).

As larvas e ninfas ingurgitadas foram lavadas em água corrente e secas em papel absorvente. Somente as larvas e ninfas ingurgitadas no dia modal de queda, isto é, no quarto e quinto dias, respectivamente, após a infestação artificial foram utilizadas. Foram formados cinco grupos experimentais de larvas e ninfas para imersão por 24, 48, 72 e 96 horas e um grupo controle que permaneceu seco. Cada grupo foi formado por 20 tubos de ensaio contendo 10 larvas ou ninfas ingurgitadas cada, totalizando 100 tubos e 1000 larvas ou ninfas. Um sexto grupo de larvas ou ninfas com a mesma característica dos cinco grupos anteriores foi mantido submerso por um período além das 96 horas. Após receberem as larvas ou ninfas ingurgitadas, os tubos foram vedados com tecido de organza e elástico de borracha e preenchidos com água destilada, até sua extremidade, com auxílio de uma seringa. O grupo controle permaneceu seco. Estes tubos foram, então, acondicionados em recipientes plásticos repletos com água destilada para evitar a entrada de ar, formação de bolhas ou evaporação da água durante o experimento. Todos os tubos foram mantidos em estufa incubadora para BOD a 27±1°C, UR ≥ 80% e escotofase. Decorridos os períodos citados, os tubos foram retirados da imersão e a água existente em seu interior foi aspirada com seringa agulhada para facilitar a operação. Após esta etapa, todos os tubos foram transferidos novamente para a estufa incubadora. As observações sobre o processo de muda foram

feitas a intervalos de 24 horas. A leitura do grupo controle teve início juntamente com a leitura do grupo 24 horas.

A partir da metodologia empregada foi possível a determinação, para cada grupo experimental, dos seguintes parâmetros:

1. Larvas ingurgitadas: período de pré-ecdise ninfal (compreendido entre o dia de queda da larva ingurgitada e a ecdise da primeira ninfa), período de ecdise ninfal (compreendido entre a ecdise da primeira e a da última ninfa), percentual de ecdise ninfal (quantidade de ninfas que realizou ecdise em relação à quantidade total de larvas ingurgitadas) e ritmo de ecdise ninfal.

2. Ninfas não-alimentadas provenientes das larvas ingurgitadas imersas: longevidade ninfal (compreendido entre a ecdise da primeira e a morte da última ninfa), o período de mortalidade ninfal e o ritmo de mortalidade ninfal acumulada.

3. Ninfas ingurgitadas: período de pré-ecdise de adulto (compreendido entre o dia de queda da ninfa ingurgitada e a ecdise do primeiro adulto), período de ecdise de adulto (compreendido entre a ecdise do primeiro e a do último adulto), percentual de ecdise de adulto (quantidade de adultos que realizou ecdise em relação à quantidade total de ninfas ingurgitadas) e ritmo de ecdise de adulto.

4. Adultos não-alimentados provenientes das ninfas ingurgitadas imersas: longevidade de adultos (compreendido entre a ecdise do primeiro e a morte do último adulto) e período de mortalidade de adultos.

Para analisar os dados foram empregados a Análise da Variância e teste de Tuckey-Kramer ao nível de significância de 5% para cada parâmetro. Valores expressos em percentuais foram transformados para arco-seno, previamente à aplicação dos testes. Já para a análise de parâmetros em que a diferença entre os desvios padrões foi considerada significativa pelo teste de Bartlett, optou-se pela aplicação do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ao nível de significância de 5%.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Larvas ingurgitadas

Os resultados obtidos com larvas ingurgitadas estão demonstrados na Tabela 1. Nesta tabela, o número de tubos inferior a 20, significa perda de material durante o experimento por questões operacionais. O período de pré-ecdise do grupo imerso por 24 horas diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) do grupo controle e, a partir deste período, aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) até as 96 horas de imersão. Já para *Rhipicephalus sanguineus*, Penna (1999) não observou alterações neste parâmetro que prejudicassem a emergência das ninfas. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para os demais parâmetros entre o grupo controle e os grupos imersos por 24 e 48 horas. Para os grupos imersos por 72 e 96 horas, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) somente no percentual de ecdise. As larvas ingurgitadas que morreram após 72 horas de imersão estavam escurecidas e ressecadas ou, às vezes, o processo de muda se iniciava, mas a ecdise não se completava, ficando a ninfa ainda presa à exúvia. Penna (1999)

<sup>4</sup> Bosch – SAE 200.

Tabela 1. Parâmetros da ecdise, longevidade e mortalidade de ninfas provenientes de larvas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* imersas em água destilada por diferentes períodos. Na seqüência vertical: média, desvio padrão, amplitude de variação e N.

Parâmetros	Período de imersão				
	Controle*	24 h	48 h	72 h	96 h
Pré-ecdise (dias)	9,60 <sup>a</sup>	10,45 <sup>b</sup>	11,00 <sup>c</sup>	12,35 <sup>d</sup>	13,84 <sup>e</sup>
	0,60	0,51	0,46	0,59	0,83
	8- 10	10- 11	10- 12	11 - 13	13 - 16
Ecdise (dias)	20	20	20	20	19
	2,50 <sup>a</sup>	1,90 <sup>a</sup>	2,25 <sup>a</sup>	3,25 <sup>a</sup>	2,47 <sup>a</sup>
	1,05	0,64	0,79	2,53	1,61
Ecdise (%)	1 - 4	1- 3	1- 4	1 - 10	1 - 6
	20	20	20	20	19
	94,00 <sup>a</sup>	97,50 <sup>a</sup>	93,50 <sup>a</sup>	66,50 <sup>b</sup>	50,50 <sup>b</sup>
Longevidade (dias)	11,88	4,44	7,45	27,58	32,52
	50 - 100	90 - 100	80- 100	10- 100	0-100
	20	20	20	20	20
Mortalidade (dias)	203,06 <sup>a</sup>	222,89 <sup>a</sup>	212,53 <sup>a</sup>	233,00 <sup>a</sup>	203,90 <sup>a</sup>
	60,30	19,99	25,91	33,97	38,75
	5 - 293	173 - 257	159 - 264	157- 290	156- 276
Mortalidade (dias)	17	18	19	15	10
	132,59 <sup>a</sup>	99,56 <sup>a</sup>	117,63 <sup>a</sup>	122,64 <sup>a</sup>	79,63 <sup>a</sup>
	64,18	24,55	38,77	62,06	44,42
Mortalidade (dias)	49 - 343	56 - 140	63- 192	35 - 238	42 - 147
	17	18	19	14	8

Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ( $p > 5\%$ ).

\* A leitura do grupo controle teve início juntamente com a leitura do grupo 24h.

não citou o percentual de ecdise de ninfas provenientes de larvas ingurgitadas de *R. sanguineus* imersas em água destilada, todavia comentou a respeito da mortalidade das larvas ingurgitadas, cujo percentual aumentou com relação direta ao tempo de imersão, principalmente após 48 horas, sendo estas, desta forma, afetadas pela imersão por períodos inferiores que as larvas ingurgitadas de *A. cajennense*. Os períodos máximos de imersão de larvas ingurgitadas de *R. appendiculatus* e de *A. variegatum*, foram de cinco e três dias, respectivamente, para que ocorresse uma ecdise de 50%, segundo Smith (1973), o que comprova uma maior resistência destas duas espécies à imersão, fato este atribuído a diferenças interespecíficas. Ainda a respeito da sobrevivência de larvas ingurgitadas imersas, Koch (1986) verificou que este parâmetro variou de 100 e 97% em um período de um e cinco dias de imersão, respectivamente para *A. americanum*, atingindo 28% após imersão por seis dias e 0% nas larvas ingurgitadas imersas por sete dias, demonstrando que, embora os experimentos tenham sido realizados com espécies diferentes, o comportamento das mesmas foi semelhante.

Os ritmos de ecdise e mortalidade estão expressos pelas Figuras 1 e 2, respectivamente. Aparentemente não houve alterações significativas entre os grupos, excetuando-se o ritmo de ecdise no grupo 72h em que a mesma se prolongou por 11 dias em alguns exemplares, evidenciando ser estes, provavelmente, parâmetros característicos da espécie, independente das condições às quais a mesma está submetida.

Tabela 2. Parâmetros da ecdise, longevidade e mortalidade de adultos provenientes de ninfas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* imersas em água destilada por diferentes períodos. Na seqüência vertical: média, desvio padrão, amplitude de variação e N.

Parâmetros	Período de imersão		
	Controle*	24 h	48 h
Pré-ecdise (dias)	14,20 <sup>a</sup>	15,35 <sup>a</sup>	19,46 <sup>b</sup>
	0,41	0,81	2,54
	14-15	14 -16	16 -24
Ecdise (dias)	20	20	11
	2,30 <sup>a</sup>	2,55 <sup>a</sup>	1,18 <sup>a</sup>
	0,73	1,05	0,41
Ecdise (%)	1- 4	1- 4	1- 2
	20	20	11
	78,00 <sup>a</sup>	56,50 <sup>b</sup>	6,50 <sup>c</sup>
Longevidade (dias)	13,61	19,81	6,71
	50-100	20 -100	0 -20
	20	20	20
Mortalidade (dias)	393,90 <sup>a</sup>	384,70	379,73 <sup>a</sup>
	49,07	47,95	63,76
	307- 469	313- 502	310 - 491
Mortalidade (dias)	20	20	11
	229,28 <sup>a</sup>	217,50 <sup>a</sup>	
	61,21	87,88	
Mortalidade (dias)	133 - 378	84 - 455	
	18	14	

Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ( $p > 5\%$ ).

\* A leitura do grupo controle teve início juntamente com a leitura do grupo 24h.

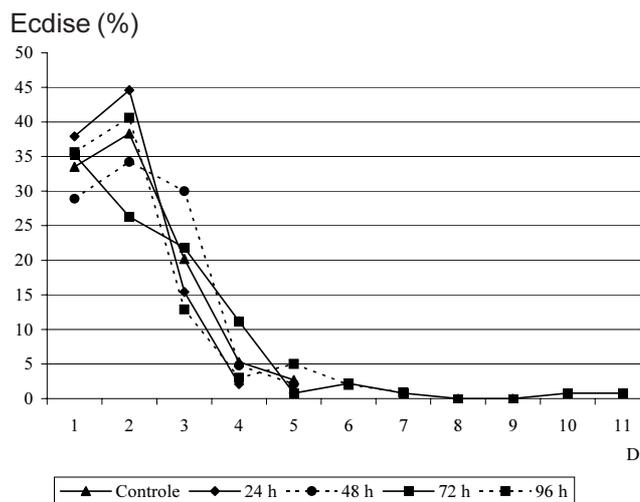


Figura 1. Ritmo de ecdise de ninfas provenientes de larvas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* submetidas à imersão em água destilada por diferentes períodos.

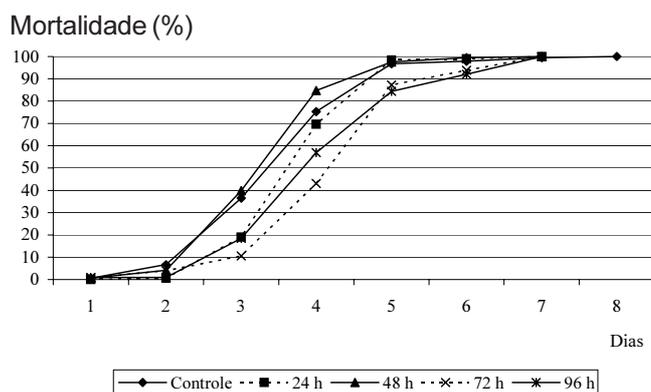


Figura 2. Ritmo de mortalidade acumulada de ninfas provenientes de larvas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* submetidas à imersão em água destilada por diferentes períodos.

Nenhuma das larvas ingurgitadas imersas além de 96h sofreu processo de muda, morrendo ainda sob imersão com traços de um líquido avermelhado semelhante a sangue escapando para a água após cerca de uma semana de imersão. Este fenômeno já foi descrito para estágios ingurgitados desta e de outras espécies de carrapatos (SMITH, 1973; DIPEOLU, 1984; DIPEOLU et al., 1991; PENNA, 1999; PAULA et al., 2000).

### Ninfas ingurgitadas

Nenhuma das ninfas ingurgitadas imersas por 96 horas mudou para o estágio adulto e no material imerso por 72 horas, somente em dois tubos de ensaio houve ecdise de um adulto em cada tubo. Estas ninfas ingurgitadas morreram ainda imersas, tornando-se escuras e túrgidas. A Tabela 2 contém apenas os dados relativos aos períodos de imersão por 24 e 48 horas em decorrência da mortalidade alta observada nos tratamentos de 72 e 96 horas. Em relação à mortalidade ninfal, estes

dados sugerem ser as ninfas mais sensíveis à imersão do que as larvas ingurgitadas. Resultados semelhantes foram obtidos por Smith (1973) para *R. appendiculatus* e *A. variegatum*. Segundo o autor, as ninfas ingurgitadas estavam mortas após três e quatro dias de imersão, respectivamente. Penna (1999) observou uma mortalidade progressiva e significativa das ninfas ingurgitadas de *R. sanguineus* a partir de 6 horas de imersão, o que demonstra que esta espécie, neste estágio, é mais sensível a tal condição adversa que *A. cajennense*. Koch (1986) também verificou a maior sensibilidade das ninfas ingurgitadas de *A. americanum* relatando um percentual de sobrevivência de 100% e 2%, quando as mesmas foram imersas por períodos entre um e sete dias, respectivamente.

O período de pré-ecdise foi significativamente mais longo ( $p < 0,05$ ) no tratamento de 48 horas quando comparado com os demais. Ecdise incompleta de adultos não foi observada como ocorreu com as ecdises de ninfas. Penna (1999) não observou alteração significativa para este parâmetro em relação às ninfas ingurgitadas de *R. sanguineus*.

O período de ecdise e a longevidade dos adultos não sofreram alteração significativa com a imersão. O período de ecdise também não se alterou em ninfas submersas de *R. sanguineus* (PENNA, 1999).

Já o percentual de ecdise foi significativamente reduzido

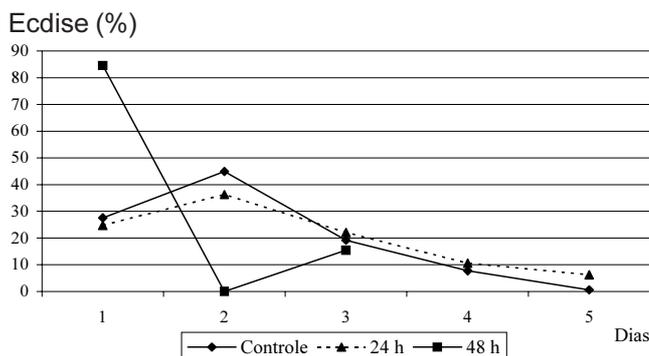


Figura 3. Ritmo de ecdise de adultos provenientes de ninfas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* submetidas à imersão em água destilada por diferentes períodos.

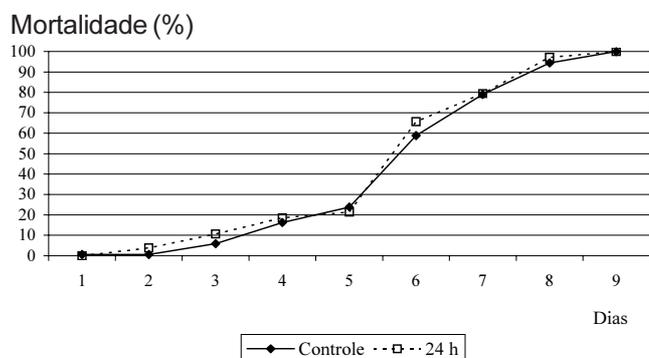


Figura 4. Ritmo de mortalidade acumulada de adultos provenientes de ninfas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* submetidas à imersão em água destilada por diferentes períodos.

( $p < 0,05$ ) a partir de 24 h de imersão, sendo extremamente baixo após períodos de imersão por 48 horas. Estes valores sugerem que as ninfas ingurgitadas são menos tolerantes a esta condição adversa que as larvas ingurgitadas, como já discutido anteriormente. Esta observação já havia sido feita para outras espécies de ixodídeos como *R. appendiculatus* e *A. variegatum* (SMITH, 1973) e *R. sanguineus* (PENNA, 1999).

A mortalidade dos adultos foi avaliada somente nas ninfas imersas por 24 horas. Isto se deveu a problemas operacionais durante o experimento, os quais interferiram na coleta de dados. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre o grupo controle e as ninfas imersas por 24 horas, tal como observado para ninfas provenientes de larvas ingurgitadas submetidas à imersão. Assim, pode-se supor que a imersão não interfere na sobrevivência e taxa de mortalidade do estágio subsequente.

O ritmo de ecdise após imersão nos diferentes períodos pode ser observado na Figura 3. O grupo 48 horas diferenciou-se dos demais, contrariamente ao observado no estágio anterior. O ritmo de mortalidade dos adultos provenientes de ninfas ingurgitadas apresentou o mesmo padrão nos dois grupos analisados (Figura 4), sendo semelhante ao observado no estágio anterior. Não houve ecdise de adultos provenientes de ninfas ingurgitadas imersas além das 96 horas, sendo que estas morreram ainda imersas deixando a água manchada com traços de um líquido avermelhado semelhante a sangue após cerca de uma semana de imersão. Tal fato já havia sido observado também para estágios ingurgitados de outras espécies de carrapato (SMITH, 1973; DIPEOLU, 1984; DIPEOLU et al., 1991; PENNA, 1999)

Os resultados obtidos por Paula et al. (2004) com larvas não alimentadas e os publicados neste artigo, permite-nos inferir que tanto as larvas como as ninfas ingurgitadas resistem menos à imersão do que as larvas não alimentadas. Considerando ainda que as ninfas ingurgitadas são mais sensíveis que as larvas ingurgitadas, é correto inferir que este estágio é o menos resistente a imersão, podendo-se esperar uma maior redução na população de carrapatos caso as chuvas atinjam, em maior quantidade, a fase de ninfa ingurgitada.

**Agradecimentos:** - A Profª. Maria P. A. L. de Crespi e o Sr. Pedro Timóteo, do Departamento de Produção Animal, Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela cessão dos coelhos utilizados nos experimentos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAGÃO, H.B.; FONSECA, P. Notas de Ixodologia. VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.59, n.2, p. 115-129, 1961.
- DIPEOLU, O.O. Studies on ticks of veterinary importance in Nigeria. XVI. The oviposition pattern of engorged *Boophilus* and *Hyalomma* species when subjected in the laboratory to artificially created factors. *Acarologia*, v. 25, n.3, p. 231-240, 1984.
- DIPEOLU, O. O.; AMOO, A. O.; AKINBOADE, O. A. Studies on ticks of veterinary importance in Nigeria: intrinsic factors influencing oviposition and egg-hatch of *Amblyomma variegatum* under natural conditions. *Folia Parasitologica*, v. 38, n. 1, p. 63-74, 1991.
- KOCH, H.G. Survival of the lone star tick (Acari: Ixodidae) under flooding conditions: a laboratory evaluation. *Journal of Economic Entomology*, v. 79, n. 6, p. 1555-1557, 1986.
- NEITZ, W. O.; BOUGHTON, F.; WALTERS, H. S. Laboratory investigations on the life-cycle of the karoo paralysis tick (*Ixodes rubicundus* Neumann, 1904). *Ondestepoort Journal of Veterinary Research*, v. 38, n. 3, p. 215-224, 1971.
- PAULA, A. R.; DAEMON, E.; CUNHA, D.W.; FACCINI, J. L. H. Efeito da imersão de fêmeas ingurgitadas e ovos de *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) e de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) em água destilada. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 22, n. 1, p. 30-36, 2000.
- PAULA, A.R.; PIRANDA, E.M.; FACCINI, J.L.H.; DAEMON, E. Efeito da imersão de larvas não alimentadas de *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) e de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) em água destilada. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 13, n.1, p. 13-17, 2004.
- PENNA, A. P. Efeito da imersão em água destilada sobre as fases de vida livre do ciclo evolutivo de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). 1999. 38 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1999.
- SMITH, M. W. The effect of immersion in water on the stages of the Ixodid ticks - *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann 1901 and *Amblyomma variegatum* Fabricius 1794. *Annals of the Tropical Medical Parasitology*, v. 67, n. 4, p. 483-492, 1973.

Recebido em 27 de janeiro de 2005.

Aceito para publicação em 15 de maio de 2005.