

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTI-GENOTÓXICOS DE *Phyllanthus niruri* (EUPHORBIACEAE) EM LEUCÓCITOS HUMANOS EXPOSTOS A AGENTE AGRESSOR

ASSESSMENT OF ANTIGENOTOXIC EFFECTS OF *Phyllanthus niruri* (EUPHORBIACEAE) IN HUMAN LEUKOCYTE EXPOSED TO AGENT AGGRESSOR

**Maria Fernanda de Moura Leão¹, Camila Martins Güzé¹, Jonathaline Apollo Duarte¹,
Elizandra Gomes Schmitt¹, Luciane Dias Quintana¹, Léa Augusta de Bairros Zambrano¹,
Mariana Balhego Rocha¹, Luísa Zuravski¹, Luís Flávio Souza de Oliveira¹, Michel Mansur Machado¹.**

RESUMO

Em muitos lugares ao redor do mundo as plantas medicinais ou parte delas são usadas de forma paliativa ou curativa para o tratamento de diversas enfermidades, devido a dificuldade ao acesso a tratamentos convencionais. Nesse contexto, preparações a base de *Phyllanthus niruri*, que é popularmente conhecida como “Quebra-Pedra” ou “Erva-Pombinha” tem sido muito usadas no tratamento de diversas enfermidades como hipertensão, diabetes, cálculos renais, entre outros. O presente estudo visou avaliar a capacidade anti-genotóxica do extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri*, através da análise fitoquímica e dosagem de compostos, avaliação de parâmetros genotoxicológicos e oxidativos. Os resultados mostram que o *Phyllanthus niruri* possui uma grande quantidade de compostos antioxidantes, tendo estes ação na proteção em nível de DNA, onde o extrato mostrou-se capaz de aumentar a viabilidade celular e de parâmetro oxidativos, mostrando ser capaz de diminuir a peroxidação lipídica.

Descritores: *Phyllanthus niruri*; Cultura Celular; Leucócitos; Genotoxicidade

ABSTRACT

In many places around the world medicinal plants or parts of them are used for palliative or curative method for the treatment of various diseases due to difficult access to conventional treatments. In this context, based preparations *Phyllanthus niruri*, which is popularly known as “Break-Stone” or “Yerba Pombinha” has been widely used in the treatment of various diseases such as hypertension, diabetes, kidney stones, among others. This study aimed to evaluate the antigenotoxic ability of hydroalcoholic *Phyllanthus niruri* extract by phytochemical analysis and dosage of compounds, evaluation genotoxicologic and oxidative parameters. The results show that *Phyllanthus niruri* has a large amount of antioxidant compounds having such action on DNA level protection, where the extract proved to be able to increase cell viability and oxidative parameter showing be able to decrease lipid peroxidation.

Descriptors: *Phyllanthus niruri*; Cell Culture; Leukocytes; Genotoxicity.

¹ Graduada(o) em Farmácia pela Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Uruguaiana, RS, Brasil.

Introdução

Em muitos países, principalmente os em desenvolvimento, onde a maioria da população não possui acesso a tratamentos convencionais a medicina tradicional baseada em crenças, experiências culturais e no conhecimento etnofarmacológico é adotada como uma das principais formas de tratamento, prevenção e cura para muitas doenças, estima-se que 80% da população ao redor do mundo não tenha acesso a tratamentos convencionais. Os tratamentos alternativos em sua maioria derivam de produtos naturais a base de plantas na sua forma natural ou porções da planta¹. Apesar de todas as novas descobertas médicas, as plantas medicinais ainda fazem parte do tratamento de milhões de pessoas ao redor do mundo. Aproximadamente 30% dos agentes com potencial terapêutico avaliado, derivam de produtos naturais².

Diversas plantas são utilizadas como tratamento ou adjuvantes de tratamento em diversas doenças, entre elas o *Phyllanthus niruri*. Conhecida popularmente como “Quebra-Pedra”, o *Phyllanthus niruri* pertence a família Euphorbiaceae, da qual fazem parte mais de 600 espécies. É uma planta rasteira encontrada em várias partes do mundo, inclusive países de clima tropical e subtropical como o Brasil, é conhecido pela sua capacidade de crescer entre as pedras, rachaduras, paredes e muros e por crescer em diferentes estações do ano. Possui muitos constituintes como, por exemplo, ácido gálico, rutina, ácido caféico, saponinas e polifenóis, o que favorece uma possível capacidade antioxidante^{3,4}. Esses constituintes são os responsáveis pela atividade antioxidante, antiinflamatória, antiespasmódica, antiviral, antihipertensiva, diurética e hiperglicêmica, a planta também é um auxiliar na eliminação e contra a formação de cálculos renais^{4,5}.

Sabe-se atualmente, que muitos efeitos deletérios tem origem nos radicais livres que são moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados na sua estrutura favorecendo assim a sua reação com membranas celulares, proteínas, material genético e demais componentes do organismo humano. São produtos gerados a partir do nosso metabolismo, principalmente em condições de estresse e exposição a compostos com potenciais tóxicos. Entre os radicais livres, os mais encontrados são as espécies reativas de oxigênio (EROs), que em excesso podem desencadear uma série de desordens como doenças neurodegenerativas, diabetes mellitus, além de câncer^{6,7}.

Por definição, uma substância antioxidante é aquela capaz de diminuir ou inibir a oxidação, mesmo presente em baixas concentrações em relação a seu substrato. Desta forma, estes compostos protegem os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam à oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares. Assim, os antioxidantes podem, teoricamente, prolongar a fase de iniciação ou então inibir a fase de propagação, mas não podem prevenir completamente a oxidação^{8,9}.

Levando em conta os riscos das reações entre os radicais livres e o material genético, este estudo foi realizado para demonstrar os efeitos anti-genotóxicos do extrato de Quebra-Pedra em cultura de leucócitos humanos frente aos efeitos deletérios do peróxido de hidrogênio.

Metodologia

Reagentes, material vegetal e equipamentos utilizados:

O material vegetal foi adquirido no comércio local, na forma de cápsulas de folhas secas na cidade de Uruguaiana, estado do Rio Grande do Sul, Brasil (latitude -29°45'17"; longitude -57°05'18"). Todos os reagentes foram de grau analítico. Metanol, ácido acético, ácido gálico, caféico e clorogênico, foram comprados a Merck (Darmstadt, Germany). Quercetina, Rutina e Campferol foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foi realizada em Sistema HPLC-DAD Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipado com bombas Shimadzu LC-20AT conectadas a um desgaseificador DGU 20A5 com um integrador CBM 20A e um detector de arranjo de diodos SPD-M20A. O software utilizado foi o LC solution 1.22 SP1.

Preparação do extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus niruri* (PnE):

O extrato contido nas cápsulas foi macerado em etanol 70%, sendo 100ml de solvente para cada 20g% de planta, em temperatura ambiente por uma semana com agitação diária. Este processo foi repetido por outras duas semanas a fim de se promover um maior esgotamento dos princípios ativos do material vegetal. Depois da extração, o extrato bruto foi filtrado e evaporado em evaporador rotatório. Foi obtido um extrato seco que foi usado nos testes.

Análise fitoquímica e quantificação de compostos:

O PnE foi analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC/CLAE) utilizando técnicas já descritas pelo nosso grupo de pesquisa^{10,11}. De forma breve, As análises cromatográficas em fase reversa foram realizadas em condições de eluição por gradiente, utilizando coluna C18 (4,6mm x 150mm), empacotadas com partículas de 5µm de diâmetro. A fase móvel foi água contendo 2% de ácido acético (A) e metanol (B). A composição do gradiente foi 5% de B até 2 min e aumentando para obter 25%, 40%, 50%, 60%, 70% e 100% B em 10, 20, 30, 40, 50 e 80 min, respectivamente. A presença de seis compostos antioxidantes foi investigada. Foram eles: Ácido gálico, Caféico, Clorogênico, Quercetina, Rutina e Campferol. O fluxo de fase móvel foi de 0,7ml/min, o volume de injeção foi de 40 µl e o comprimento de onda analisado foi de 254 nm para o ácido gálico, 327 nm para os ácidos caféicos e clorogênicos, e 365 nm para quercetina, rutina e campferol. As amostras e a fase móvel foram filtradas em filtro de membranas 0,45 µm (Millipore) e desgaseificadas antes do uso em banho de ultrassom. Soluções estoque dos padrões de referência foram preparados em fase móvel de HPLC na concentração de 0,020 – 0,200 mg/ml para quercetina, rutina e campferol e de 0,050 – 0,250 mg/ml para ácidos gálico, caféico e clorogênico. Os picos cromatográficos foram confirmados pela comparação com os tempos de retenção de padrões e pelo espectro DAD das amostras (200 to 500 nm). As curvas de calibração foram, para o ácido gálico: $Y = 13260x + 1276,4$ ($R^2=0,9998$); Ácido Clorogênico: $Y = 12158x + 1174,9$ ($R^2=0,9996$); Ácido Caféico: $Y = 14034x + 1527,5$ ($R^2= 0,9995$); Rutina: $Y = 13721x + 1068,4$ ($R^2 = 0,9997$); Quercetina: $Y = 13794x + 1392,1$ ($R^2 =0,9999$) e Campferol: $Y = 12647x + 1178,3$ ($R^2 =0,9995$). Todas as operações cromatográficas foram realizadas em temperatura ambiente e em triplicata.

Preparação da cultura de leucócitos humanos para uso nos testes:

As culturas foram preparadas em triplicata usando métodos descritos em trabalho prévio¹². A cultura continha 10 mL de RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de estreptomicina/penicilina e 1mL de sangue coletado de venopunção de doador voluntário e imediatamente introduzidas na cultura contendo suplementação. Depois de preparadas as culturas foram divididas em três grupos para o experimento: Grupo 1: foi o controle negativo (NC) que recebeu somente Tampão PBS 7,4 (100 µL/mL); Grupo 2: foi o controle positivo (PC) que recebeu somente peróxido de hidrogênio (100 µM) e o Grupo 3: recebeu o extrato seco de *Phyllanthus niruri* (100 µg/mL) e 100 µg/mL de peróxido de hidrogênio. Os grupos 1, 2 e 3 foram incubados por 72 horas afim de induzir o crescimento celular e para a posterior avaliação dos níveis de proteção do extrato de *Phyllanthus niruri*. A escolha da concentração de *Phyllanthus niruri* seguiu os relatos de Satya e colaboradores¹³. Nessa revisão, está descrita uma atividade anti-cancerígena na concentração de 100µg/mL.

Avaliação dos parâmetros genotoxicológicos:

Foi utilizada a cultura preparada anteriormente. A proliferação e viabilidade foram avaliadas através do método de Azul de Tripam¹⁴ que avalia a integridade da membrana. O teste de micronúcleo segue a técnica descrita por Schmid¹⁵ e o teste Cometa foi realizado de acordo com o relatado por Singh⁷.

Avaliação dos parâmetros oxidativos:

Foi utilizada a cultura preparada anteriormente. A peroxidação lipídica foi realizada através da quantificação da medida da formação de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)¹⁶.

Análise estatística dos resultados:

As análises foram avaliadas por ANOVA seguido de *post hoc* de Tukey. Resultados com $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Resultados e Discussão

A análise realizada do PnE por CLAE demonstrou a presença de polifenóis e flavonoides incluindo ácido gálico com tempo de retenção (T_R) de 11,09 min (pico 1), ácido clorogênico $T_R = 18,75$ min (pico 2), ácido caféico com $T_R = 27,83$ min (pico 3), Rutina com $T_R = 44,05$ min (pico 4), Quercetina com $T_R = 59,32$ min (pico 5) e Campferol com $T_R = 67,48$ min (pico 6). Estes resultados são mostrados na Figura 1 e na Tabela 1.

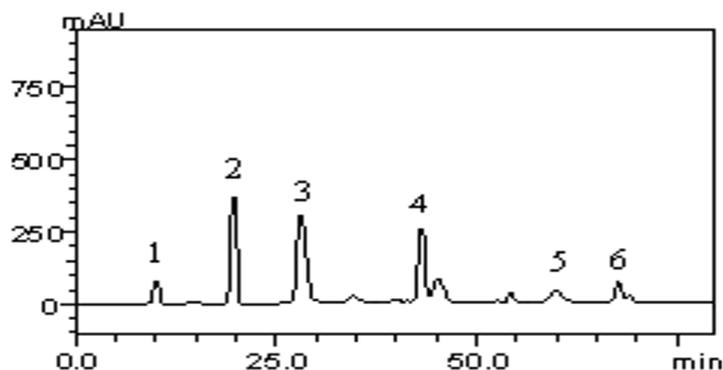


Figura 1 - Fingerprint do extrato de *Phyllanthus niruri* L. (PnE). A análise por CLAE mostra o tempo de retenção para o ácido gálico (1), ácido clorogênico (2), ácido caféico (3), rutina (4), quercetina (5) e Campferol (6), nas condições relatadas na seção Materiais e Métodos.

A presença de polifenóis em plantas de uso medicinal confere o efeito antioxidante, o que é fundamental na prevenção do estresse oxidativo e de doenças oriundas dele, além disso, devido a essa grande quantidade de compostos o *Phyllanthus niruri* tem sido utilizada no tratamento da hipertensão, diabetes, cirrose, entre outros^{4,17,18}.

Tabela 1 - Perfil fitoquímico preliminar com ênfase em compostos antioxidantes

Compostos Analisados	Concentração no extrato em $\mu\text{g/g}$ de Planta
Ácido Clorogênico	$414,20 \pm 1,15$
Quercetina	$734,71 \pm 54,91$
Camferol	$853,21 \pm 75,46$
Ácido Gálico	$1480,61 \pm 124,56$
Rutina	$15053,16 \pm 957,41$
Ácido Cafeico	$16617,57 \pm 1214,1$

Os resultados são apresentados na forma de Média \pm Desvio Padrão. Todas as análises foram realizadas em triplicada.

Na Figura 2, os dados referentes a proliferação celular mostraram que os leucócitos quando em contato com o PnE apresentaram um pequeno aumento da proliferação (PC $149,5 \pm 3,07$ e PnE $151,4 \pm 1,64$ % de aumento celular), sendo a diferença entre os controles foi de 42,28%. Na análise da viabilidade celular, houve uma significativa diferença entre a cultura tratada com o PnE ($99,00 \pm 1,00$ % de células viáveis) e a tratada apenas com o peróxido de hidrogênio (PC) ($76,67 \pm 4,16$). Quanto ao índice mitótico houve uma ampla diferença entre o PC e a cultura tratada com o PnE, $2,67 \pm 0,58\%$ e $6,0 \pm 1,00\%$, respectivamente, criando um aumento na taxa de mitose de 125,56% entre as duas amostras. Em estudos anteriores, foi demonstrado que os extratos aquoso ou etanólico de Quebra-Pedra não afetam a proliferação¹⁷. Já Prasad e colaboradores¹⁹ demonstraram que altas concentrações de ácido caféico (30, 40 e 50 μg) inibem *in vitro* a proliferação de células HT-1080, os testes também sugerem que estas altas concentrações de ácido caféico apresentam uma capacidade pró-oxidante, o que pode contribuir para que não ocorra o aumento celular, fato

este que poderia estar interferindo na proliferação celular realizada nesse estudo, já que o extrato em teste apresenta uma elevada concentração de ácido caféico. Gong e colaboradores²⁰ demonstraram que a rutina em concentrações de 50 e 100 μ M é capaz de aumentar a viabilidade de células endoteliais da veia umbilical de humanos em até 34,3%, os resultados obtidos no estudo sugerem que esse aumento na viabilidade deve-se ao fato de a rutina inibir a indução de EROS causada pelo peróxido de hidrogênio (tabela 1).

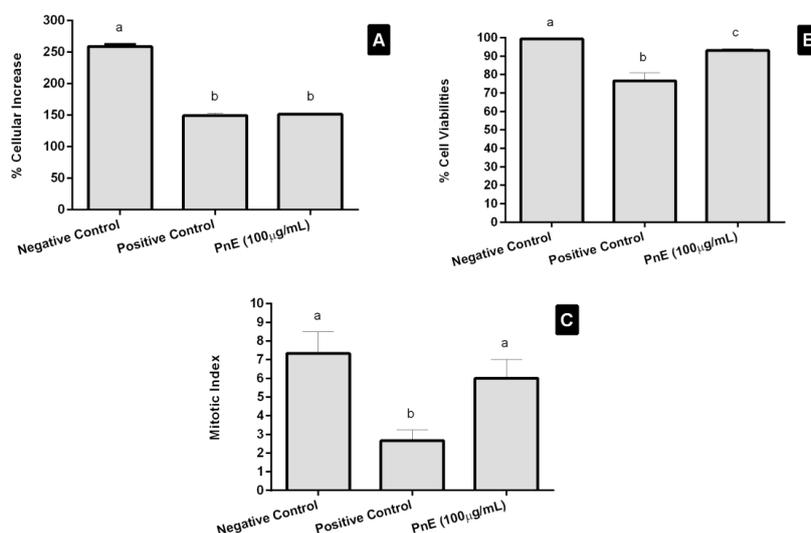


Figura 2 - Efeitos do PnE sobre culturas de leucócitos humanos expostos ao peróxido de hidrogênio. Os resultados para Aumento celular (A), Viabilidade celular (B) e Índice mitótico (C) são mostrados na figura. Os dados são expressos pela média \pm desvio padrão e para isso foi realizado a triplicata de cada teste. Em cada gráfico as letras diferentes representam uma diferença estatística significativa para $p < 0,05$.

Os testes para peroxidação lipídica demonstram que houve diferenças entre os três tratamentos: NC $0,81 \pm 0,24$ (nMol de MDA / mL de Eritrócito), PC $1,32 \pm 0,02$ e a cultura tratada com o PnE $0,48 \pm 0,03$. A diferença percentual entre o PC e o PnE foi de 63,25%. Estudos anteriores mostram que a administração do PnE diminui a peroxidação lipídica em ratos expostos ao DMBA – 7,12 dimetilbenz(a) antraceno²¹, bem como o extrato etanólico de *Phyllanthus niruri* pode diminuir a injúria hepática em ratos expostos a tioacetamida¹⁷. Para o teste cometa, a diferença percentual entre o PC e a cultura tratada com o PnE foi de 73,14% ($80,67 \pm 9,07$ e $21,67 \pm 1,53$, respectivamente). Para a frequência de micronúcleos os dados mostram que houve uma diminuição na formação destes quando a cultura foi tratada com o PnE ($5,0 \pm 1,0\%$) em relação ao PC ($9,68 \pm 0,58\%$), sendo o percentual de diferença 48,28%. Os dados para Instabilidade Cromossômica mostraram que o PnE foi eficaz ($7,33 \pm 1,53\%$) quando comparado ao PC ($23,00 \pm 2,00\%$), essa diferença obteve um percentual de 68,12%. Thakur e colaboradores²² demonstraram em um estudo prévio que tanto o extrato aquoso quanto o extrato etanólico de *Phyllanthus niruri*, nas concentrações de 100mg/Kg e 200mg/Kg foram capazes de reduzir a instabilidade cromossômica, como a quebra do DNA e de cromátides para testes realizado com ratos.

Estudos realizados por^{3,4} demonstram que a capacidade de diminuir a peroxidação lipídica, a frequência de micronúcleos e o dano ao DNA avaliado pelo teste cometa se deve aos constituintes presentes na planta e da sua capacidade de agir como agente antioxidante.

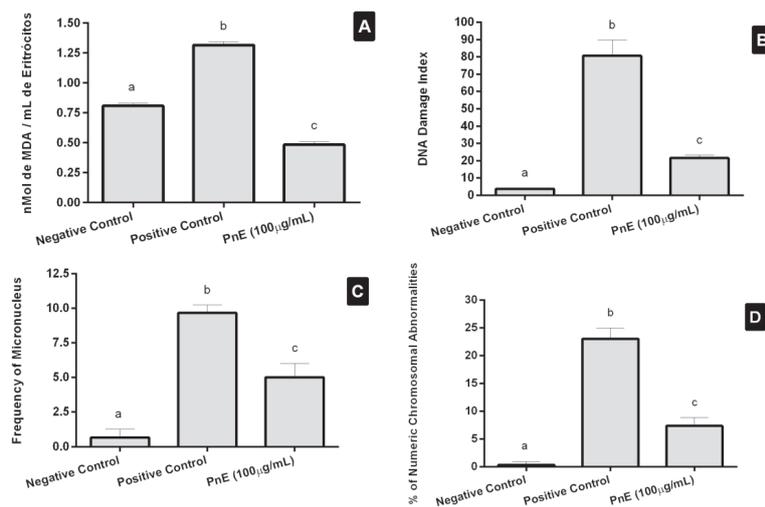


Figura 3 - Efeitos do EQP sobre culturas de leucócitos humanos expostos ao peróxido de hidrogênio. São mostrados na figura os resultados para os marcadores oxidativos. Em “A” temos a peroxidação lipídica, em “B” o Dano de DNA, em “C” a frequência de micronúcleos e em “D” as Anormalidades Cromossômicas. Os dados são expressos pela média±desvio padrão e para isso foi realizado a triplicata de cada teste. Em cada gráfico as letras diferentes representam uma diferença estatística significativa para $p < 0,05$.

Considerações Finais

Os resultados apresentados pelo trabalho mostram que o PnE foi eficaz na proteção celular, em nível de DNA e de parâmetros oxidativos, o que corrobora com estudos realizados anteriormente, tornando a planta um potencial adjuvante no tratamento de diversas doenças que tem origem no estresse oxidativo. Isto se deve a quantidade de constituintes químicos presentes na sua composição tornando-a um potente antioxidante.

Referências

1. Cordelia O. Evaluation of chemical constituents of *Phyllanthus Niruri*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2012;6(3):125-8.
2. Calixto JB. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. *Journal of ethnopharmacology*. 2005;100(1):131-4.
3. Calixto JB, Santos AR, Filho VC, Yunes RA. A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. *Medicinal research reviews*. 1998;18(4):225-58.
4. Bagalkotkar G, Sagineedu SR, Saad MS, Stanslas J. Phytochemicals from *Phyllanthus niruri* Linn. and their pharmacological properties: a review. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 2006;58(12):1559-70.
5. Campos AH, Schor N. *Phyllanthus niruri* inhibits calcium oxalate endocytosis by renal tubular cells: its role in urolithiasis. *Nephron*. 1999;81(4):393-7.
6. Pala FS, Gürkan H. The role of free radicals in ethiopathogenesis of diseases. *Advances in Molecular Biology*. 2008;2(1).
7. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*. 1988;175(1):184-91.
8. Barreiros A, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química nova*. 2006;29(1):113.
9. Gutteridge J, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000;899(1):136-47.
10. Boligon AA, Pereira RP, Feltrin AC, Machado MM, Janovik V, Rocha JBT, et al. Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. *Bioresource technology*. 2009;100(24):6592-8.

11. Machado MM, Montagner GFFdS, Boligon A, Athayde ML, Rocha MIUMd, Lera JPB, et al. Determination of polyphenol contents and antioxidant capacity of no-alcoholic red grape products (*Vitis labrusca*) from conventional and organic crops. *Química Nova*. 2011;34(5):798-803.
12. dos Santos Montagner GFF, Sagrillo M, Machado MM, Almeida RC, Mostardeiro CP, Duarte MMMF, et al. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. *Toxicology in Vitro*. 2010;24(5):1410-6.
13. Narendra K, Swathi J, Sowjanya K, Satya A. *Phyllanthus niruri*: a review on its ethno botanical, phytochemical and pharmacological profile. *Journal of Pharmacy Research*. 2012;5(9):4681-91.
14. Burow ME, Weldon CB, Tang Y, Navar GL, Krajewski S, Reed JC, et al. Differences in susceptibility to tumor necrosis factor α -induced apoptosis among MCF-7 breast cancer cell variants. *Cancer research*. 1998;58(21):4940-6.
15. Schmid W. The micronucleus test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*. 1975;31(1):9-15.
16. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*. 1979;95(2):351-8.
17. Amin ZA, Abdulla MA, Ali HM, Alshawsh MA, Qadir SW. Assessment of in vitro antioxidant, antibacterial and immune activation potentials of aqueous and ethanol extracts of *Phyllanthus niruri*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2012;92(9):1874-7.
18. Okoli C, Ibiam A, Ezike A, Akah P, Okoye T. Evaluation of antidiabetic potentials of *Phyllanthus niruri* in alloxan diabetic rats. *African Journal of Biotechnology*. 2010;9(2).
19. Prasad NR, Karthikeyan A, Karthikeyan S, Reddy BV. Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. *Molecular and cellular biochemistry*. 2011;349(1-2):11-9.
20. Gong G, Qin Y, Huang W, Zhou S, Yang X, Li D. Rutin inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis through regulating reactive oxygen species mediated mitochondrial dysfunction pathway in human umbilical vein endothelial cells. *European journal of pharmacology*. 2010;628(1):27-35.
21. Sharma P, Parmar J, Verma P, Sharma P, Goyal P. Protective Effect of *Phyllanthus niruri* on DMBA/Croton Oil Mediated Carcinogenic Response and Oxidative Damage in Accordance to Histopathological Studies in Skin of Mice. *Journal of Natural Sciences Research*. 2011;1:16-28.
22. Thakur I, Devi PU, Bigoniya P. Protection against radiation clastogenicity in mouse bone marrow by *Phyllanthus niruri*. 2011.

Michel Mansur Machado

Endereço para correspondência – Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA)

Caixa Postal 118, CEP: 97.500-970, Uruguaiana, RS, Brasil.

E-mail: michelmachado@unipampa.edu.br

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7651341120825287>

Maria Fernanda de Moura Leão – mafe.leao@yahoo.com.br

Camila Martins Güez – camila_mguez@hotmail.com

Jonathaline Apollo Duarte – jonathalineapollo@yahoo.com.br

Elizandra Gomes Schmitt – danda_schmitt2@hotmail.com

Luciane Dias Quintana – lucianequintana@hotmail.com

Léa Augusta de Bairros Zambrano – bize_zambrano@hotmail.com

Mariana Balhego Rocha – marianabalhego@hotmail.com

Luísa Zuravski – luisazuravski@gmail.com

Luís Flávio Souza de Oliveira – tcheluisoliveira@gmail.com

Enviado em 28 de julho de 2016.

Aceito em 03 de outubro de 2016.