

Caracterização Estrutural e da Capacidade de Absorção de Água em Filmes Finos de Quitosana Processados em Diversas Concentrações

Odílio B. G. Assis
Embrapa Instrumentação Agropecuária

Valmir L. da Silva
Instituto de Química de São Carlos, USP

Resumo: Filmes finos de quitosana (média massa molecular) foram produzidos a partir de soluções precursoras em diversas concentrações e caracterizados com respeito à estrutura e grau de absorção de água. Os filmes foram obtidos por adsorção sobre lâminas de vidro previamente funcionalizadas (técnica de automontagem). Análises por microscopia eletrônica de varredura e de força atômica revelaram espessuras fracamente relacionadas à concentração do polissacarídeo, com espessuras não superiores a 25-30 nm e caracterizados por estrutura de nano poros. A afinidade por água indica, por sua vez, forte dependência com um comportamento do tipo exponencial com a concentração de quitosana. Testes comparativos em solução tampão também foram realizados demonstrando comportamento diverso ao obtido com água.

Palavras-Chave: *Quitosana, filmes finos, hidrofiliçidade, polímero natural, automontagem.*

Water Sorption Capacity and Structural Characterization of Chitosan Thin-films Processed from Different Concentrations

Abstract: Chitosan thin-films (medium molar mass) were produced from different concentration precursor solution and characterized regarding structure and water absorption capability. Films were obtained from direct dipping of glass slides previously functionalized into acid medium gels (self-assembly technique). Analysis of scanning electron and atomic force microscopy data revealed a film thickness of less than 25-30 nm with low dependence upon polymer concentration. All films were featured as a nano porous structure. The water affinity, however, varies exponentially (2ls) with the chitosan content. Comparison tests in buffer solution were also carried out pointing to different behavior from that found for water.

Keywords: *Chitosan, thin-film, hydrophilicity, natural polymer, self-assembly.*

Introdução

Muito tem sido estudado e publicado sobre quitosana e seus usos na última década. Por se tratar de um polímero natural, biodegradável, extremamente abundante e atóxico, a quitosana tem sido proposta como um material potencialmente atraente para usos diversos, principalmente em engenharia, biotecnologia e medicina. As indicações mais comuns são seu emprego como meio complexante de íons metálicos^[1], para a formação de coberturas com ação antifúngica e bactericida^[2], como elemento básico para a confecção de matrizes de liberação controlada de drogas^[3] e fartamente divulgado, embora ainda que controverso^[4], como um agente ativo no emagrecimento humano por sua interação com gorduras e estruturas afins (*fatter trapper*)^[5], entre outras dezenas de possíveis aplicações sugeridas para esse material.

A quitosana é um polissacarídeo amino, derivado do processo de desacetilação da quitina, que constitui a maior fração dos exoesqueletos de insetos e crustáceos, sendo

assim assumido como o segundo composto orgânico mais abundante da natureza^[6], ficando atrás apenas da celulose. Enquanto a quitina é inerte e insolúvel, a quitosana é reativa e solúvel em ácidos fracos, podendo ser caracterizada como um polieletrólito catiônico, sendo geralmente purificada na forma neutra. Sua estrutura é formada pela repetição de unidades beta (1-4) 2-amino-2-deoxi-D-glucose (ou D-glucosamina) apresentando uma cadeia polimérica similar à da celulose (exceto pela substituição dos grupos hidroxila na posição 2 por grupos acetamido). A fórmula molecular genérica pode ser expressa como $(C_6H_{11}O_4N)_n$ e ilustrada conforme a Figura 1.

Devido a suas características físico-químicas que resultam em propriedades como fácil formação de géis, capacidade filmogênica e boas propriedades mecânicas. Filmes finos de quitosana têm sido já há algum tempo objeto de avaliações práticas, nos quais a ausência ou não de poros e suas dimensões tornam-se fundamentais para a definição de aplicações. Macro e microporos apresentam uma relação “tamanho-exclusão” apropriada ao emprego em montagens

Autor para correspondência: Odílio B. G. Assis, Embrapa Instrumentação Agropecuária, C. P. 741, 13560-970, São Carlos, SP. E-mail: odilio@cnpdia.embrapa.br

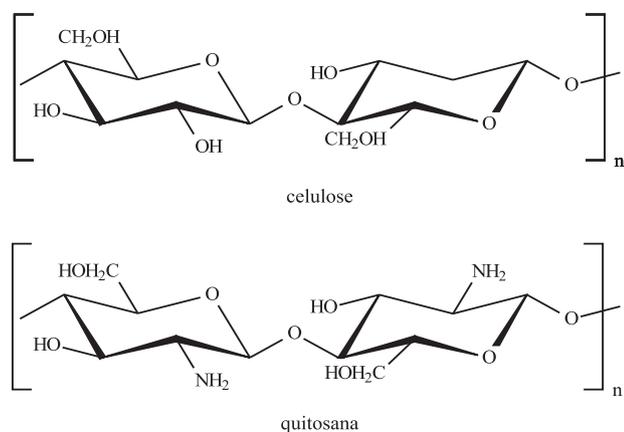


Figura 1. Representação esquemática da estrutura primária da celulose e da quitosana, sendo n o grau de polimerização.

de membranas filtrantes sob baixa pressão, adequadas a sistemas de purificação de água ou separação de resíduos^[7,8]. Estruturas nanoporosas podem, por sua vez, serem aplicadas em sistemas de controle de troca e permeação de gases, para liberação de drogas ou compostos moleculares e como coberturas comestíveis sobre alimentos processados e embalagens genéricas^[9,10]. Películas densas de quitosana também têm sido recentemente testadas como “pele” temporária e material apropriado para reestruturação de cartilagens ou em aplicações tópicas para regeneração e cicatrização de injúrias animais^[11,12]

Os filmes de quitosana têm sido normalmente obtidos de maneira bem simples e rudimentar: o polímero é dissolvido em meio apropriado e vertido sobre uma superfície plana. Após a evaporação do solvente o filme é removido por destacamento. A maioria dos filmes processados dessa forma são irregulares quanto a espessura e caracterizados por uma estrutura fibrosa bastante heterogênea^[6]. Uma alternativa viável para obtenção de filmes poliméricos com um maior controle estrutural é pela técnica de automontagem (self-assembly)^[13], que tem por base a adsorção resultante de interações eletrostáticas. A simples imersão de um substrato sólido carregado em uma solução rica de um material carregado contrariamente a este produzirá a adsorção inicial de uma monocamada sobre a superfície, caracterizando o processo de automontagem. Essa metodologia tem ainda a vantagem de não requerer equipamentos ou procedimentos sofisticados. Como a quitosana em meio ácido apresenta cargas positivas devido à protonação dos grupos amino (NH_3^+), um substrato com alta densidade de sítios negativos imerso nessa solução se comportará como um suporte adequado à atração e subsequente formação de um filme homogêneo. Filmes automontados de quitosana têm sido recentemente avaliados como superfícies ativas em membranas suportadas para interação com agrotóxicos em água^[7], como revestimento de eletrodos para desenvolvimento de sensores em meio aquoso^[14,15] e como superfície para testes de avaliação de biocompatibilidade *in vivo*^[16].

Uma vez formado o filme, contudo, uma característica limitante ao seu pleno emprego é a sua hidrofiliabilidade. Na

quitosana há a predominância dos grupos amino caracterizados por ligações covalentes (N-H), onde a eletronegatividade das ligações gera sítios de alta polaridade tornando assim favorável o rearranjo de moléculas e água em torno desses sítios. Essa característica estrutural, associada aos grupos acetamido, que também são polares e estão presentes na cadeia polimérica, caracterizam um material com alto grau de afinidade e retenção de água^[17].

Essa elevada taxa de absorção de água traz conseqüências indesejáveis como a redução da estabilidade estrutural do polímero. Ou seja, a presença constante de umidade na estrutura polissacarídeo provoca o intumescimento da matriz com conseqüente desagregação das fibras e destacamento do filme, além da aceleração da degradação por ataque de microorganismos^[18]. Uma série de trabalhos tem sido propostos para reduzir essa hidrofiliabilidade pelo uso de agentes entrecruzantes hidrofóbicos que adicionados à cadeia da quitosana diminuem sua afinidade por moléculas polares^[19,20]. Neste trabalho contudo, avaliamos a estrutura e perfil de absorção de água pela quitosana isolada, sem agentes entrecruzantes ou adições de qualquer espécie, que ainda nos parece, não é bem caracterizado.

Experimental

Materiais

A quitosana empregada foi adquirida da Fluka Biochemika (classificada como de média massa molecular) e purificada segundo procedimentos adotados, que consistem de uma diluição inicial em ácido acético diluído (1%) (mantida sob agitação por 24 h) seguido de filtração e neutralização em hidróxido de amônio até a ocorrência de precipitação e posterior lavagem. Detalhes experimentais podem ser encontrados em publicação prévia^[17]. O material resultante da purificação apresenta aspecto granular com partículas de formatos irregulares e coloração levemente amarelada.

Os géis foram obtidos por dissolução do polímero sob agitação moderada em meio aquoso de ácido clorídrico 0,5 M com ajuste inicial em pH igual a 3. Soluções com concentrações de quitosana de 3, 10, 15, 20 e 50 g/L foram preparadas. Períodos de até 12 horas de agitação foram necessários para obter uma total homogeneização. Para simplificar o processo todo o procedimento foi realizado a temperatura ambiente. Lâminas de vidro nas dimensões de 5mm x 10mm x 2mm, foram quimicamente funcionalizadas pelo método conhecido como ‘piranha’ anterior ao depósito. Neste tratamento seguiu-se a seqüência proposta por Kern^[21], que consiste na imersão das lâminas em solução de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ (7:3 v/v), seguido de limpeza no ultra-som por 1 h. Após este período o material é lavado exaustivamente com água ultrapura, imersos em solução de $\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}_2$ (5:1:1 v/v/v) e lavados novamente em água. Esse tratamento promove uma limpeza ácida elevando a exposição dos grupos silanóis da superfície vítrea e por conseguinte a densidade de sítios negativos.

Os filmes foram obtidos por imersão direta das lâminas nas soluções de quitosana por 3 minutos, lavados em água

destilada e deixados secar espontaneamente. Três lâminas foram separadamente mergulhadas em cada concentração para garantir repetitividade das medidas.

Caracterização dos filmes

O aspecto genérico dos depósitos foi observado sob microscopia eletrônica de varredura (MEV) em sistema LEO Electron Microscopy Ltd (Cambridge). A caracterização topográfica dos filmes foi conduzida por microscopia de força atômica (AFM) em modo não-contato, em sistema TopoMetrix Discover. Áreas aleatórias de 500nm x 500nm foram varridas e imagens e perfis analisados por programas TOPOSPM e SPIP 2.1 (Scanning Probe Image Processor). A espessura do filme foi obtida diretamente no microscópio de força atômica, tomando as médias das alturas de degraus estabelecidos entre regiões com e sem filme sobre uma mesma lâmina examinada.

Para os filmes em cada concentração, o montante de água absorvida foi determinado em concordância com procedimento normatizado, ASTM Standard Method C97-96. Conforme a norma, amostras (lâmina + vidro) após secagem espontânea foram colocadas em mufla e aquecidas em temperatura próxima a 40 °C até que o peso se mantivesse estável, o que ocorre instantaneamente em função das dimensões da amostra. Após resfriamento, foram então posicionadas em um suporte metálico e individualmente imersas em água destilada (pH 5,6) a temperatura ambiente, contida em um frasco posicionado sobre o prato de uma balança analítica. Após a estabilidade da medida de massa do conjunto, a amostra é retirada, o excesso de água escorrido naturalmente e pesada separadamente. A razão de absorção de água é estimada por cálculo simples:

$$\text{Ganho de massa (absorção) \%} = [(B - A)/A] \times 100$$

Sendo: A = o peso da amostra seca

B = o peso da amostra após imersão.

Seguindo sugestão de Angelova et al.^[22], medidas de ganho de massa também foram avaliadas em solução tampão fosfato (pH 7,2), para efeito comparativo. As medidas em tampão permitem avaliar qualitativamente possíveis diferenças decorrentes da atração polar entre o filme e o meio.

Resultados e Discussão

De forma qualitativa e macroscópica, os filmes de quitosana resultantes do processo de automontagem, após secagem total, são bastante estáveis, com poucas falhas aparentes e ausentes de macroporos, independentes da concentração precursora. Os principais defeitos observados devem-se a processos de deposição ou adsorção diferenciada, provavelmente em função de impurezas presentes no substrato ou na solução. A retenção de água sobre a lâmina durante o processo de deposição também pode conduzir a uma secagem irregular, gerando “bolhas” e em alguns casos, destacamentos espontâneos em posições localizadas, que podem levar à ruptura do filme ou a corrugação da superfície. De uma

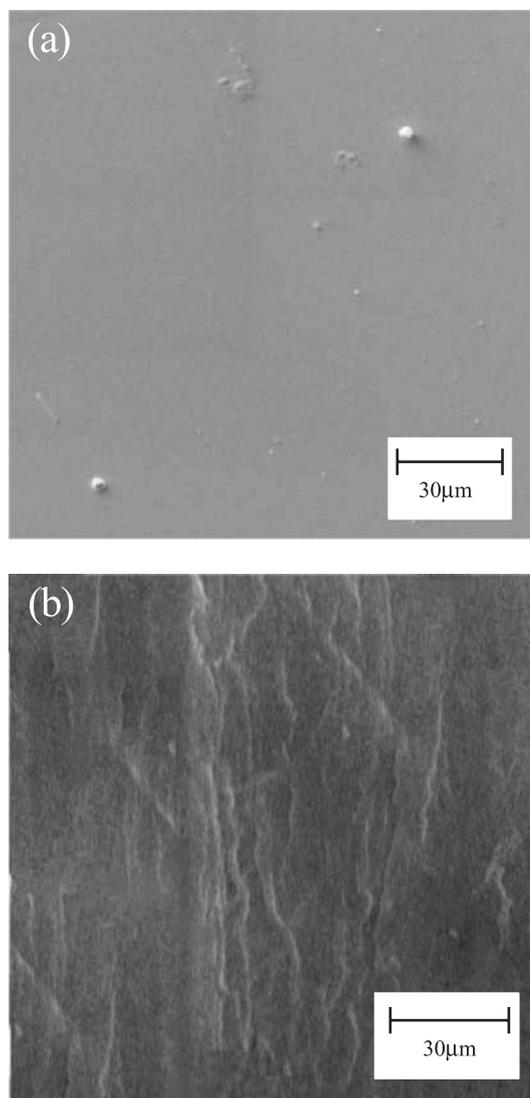


Figura 2. Superfície dos filmes formados sobre lâmina de vidro (10 g/L). Em (a) aspecto de filme automontado, superfície regular com poucos defeitos; em (b) filme de mesma concentração obtido por escoamento e secagem espontânea (casting) sobre superfície plana.

forma geral os filmes obtidos por automontagem são homogêneos e diferem dos filmes obtidos por simples escoamento por serem extremamente finos e apresentarem superfície menos irregular, como pode ser comparado nas imagens da Figura 2 obtidas por microscopia eletrônica.

Com o uso de microscopia de força atômica constata-se contudo que mesmo as regiões mais homogêneas dos filmes automontados não são tão regulares quanto aparentam. Uma característica comum em todas as concentrações em escala nanométrica é uma topografia irregular e nanoporosa. A superfície encontrada é formada por núcleos parcialmente circulares distribuídos ao longo do filme configurando uma estrutura do tipo “montanhas e vales”. Esses núcleos são provavelmente aglomerados de cadeias poliméricas resultantes da interação em meio aquoso e da subsequente deposição conjunta sobre o substrato sólido, embora, análises têm sugerido a possibilidade da ocorrência de mecanismos de

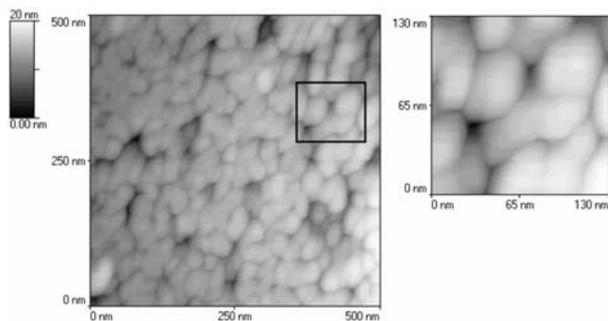


Figura 3. Imagem típica, obtida por AFM da estrutura de filme de quitosana sobre lâmina de vidro. A região ampliada detalha aspectos da estrutura porosa e dos núcleos (da ordem de 30 nm de diâmetro) estabelecidos na formação do filme (20g/L).

nucleação e coalescimento de monocamadas ilhadas, que resultariam em estrutura final similar^[23]. Esses núcleos tornam-se ligeiramente maiores e mais adensados com o aumento da concentração de quitosana no gel, o que pode indicar uma menor dissolução do polímero em solução. Esse resultado é de certa forma esperado considerando que ao final da homogeneização o pH resultante, com o aumento da concentração, tende a valores mais altos. Nessas condições, a cadeia polimérica da quitosana assume uma conformação mais enovelada favorecendo a formação agregados em solução. Essa configuração no processo de automontagem tende a uma deposição conjunta sobre o substrato e facilita uma acomodação maior de polímero^[13]. Modelos de adsorção de polímeros lineares a partir de meio aquoso sobre superfícies sólidas são fartamente encontrados na literatura, com boas revisões nos trabalhos de Myers^[24] e de Karim & Kumar^[25].

A Figura 3 apresenta uma imagem de AFM típica, de um filme de quitosana, a 20 g/L, na qual a estrutura citada é melhor observada.

A deposição molecular, individual ou por aglomerados, que gera esta formação de ilhas isoladas, confere ao filme uma estrutura porosa. A porosidade em filmes de quitosana é fundamental para definir aplicações práticas. No caso de filmes por automontagem a porosidade pode ser melhor caracterizada através da análise de seções transversais, gera-

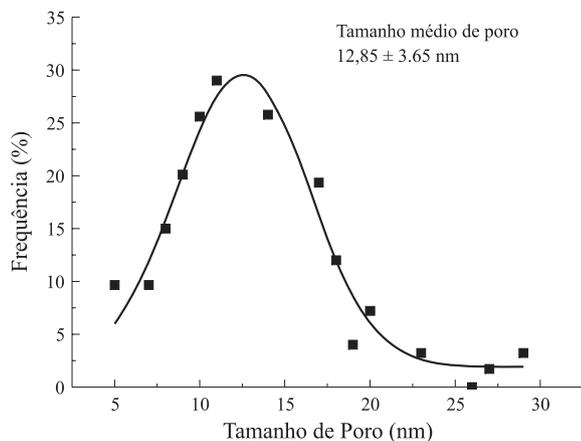


Figura 4. Distribuição de poros no filme com 20 g/L, obtida através de análise de seções transversais por AFM.

das pela microscopia de força atômica. Em medidas quantitativas, conduzida estatisticamente em 40 linhas de perfil seção transversal, encontramos tamanhos de poros de aproximadamente 12 nm. Os poros nos filmes seguem uma distribuição próxima a uma gaussiana ou tendendo ao tipo log-normal e com poucas flutuações em função da concentração. A Figura 4 ilustra a distribuição encontrada para o filme formado a partir da solução com concentração de 20 g/L, representativa para todas as concentrações avaliadas.

Na Figura 5, temos a flutuação da rugosidade média quadrática, do tamanho de poros e dos valores de espessura dos filmes medidos em função da concentração. Esses valores também foram obtidos por AFM. Vemos que as espessuras dos depósitos se estabilizam em torno de 25-30 nm, para concentrações superiores a 20g/L. Ou seja, os filmes depositados não seguem uma relação linear com a concentração em solução, o que era esperado, considerando a formação de monocamada, ou seja, uma vez que são ocupados os sítios de cargas sobre a superfície vítrea a deposição subsequente de moléculas a partir da solução é consideravelmente reduzida. Assim, de um modo geral, todos os filmes são extremamente finos.

A rugosidade, contudo, apresenta um comportamento distinto. Esta segue uma relação de crescimento proporcional, relativamente linear com o aumento da concentração de polímero em solução. A rugosidade crescente pode ser função dos aglomerados e/ou dos mecanismos que atuam na formação do filme, como brevemente discutido. Vale a pena lembrar que uma superfície com maior rugosidade apresenta conseqüentemente uma maior área de interação, o que contribui para elevar o grau de absorção em meio aquoso. E como já comentado, há pouca relação entre concentração do polímero e variações nos tamanhos de poros medidos nos filmes formados.

Com respeito aos valores medidos de absorção de água, segundo a norma empregada, o resultante ganho de massa em função da concentração de quitosana apresenta um comportamento do tipo exponencial, representado na Figura 6.

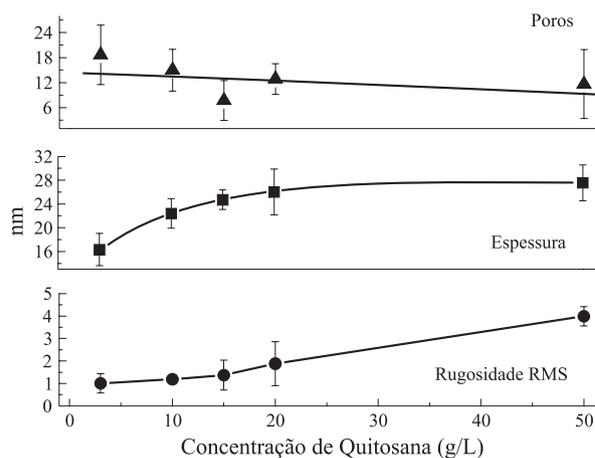


Figura 5. Rugosidade média, espessura e tamanho de poros resultantes nos filmes de quitosana em função da concentração de polissacarídeo na solução precursora.

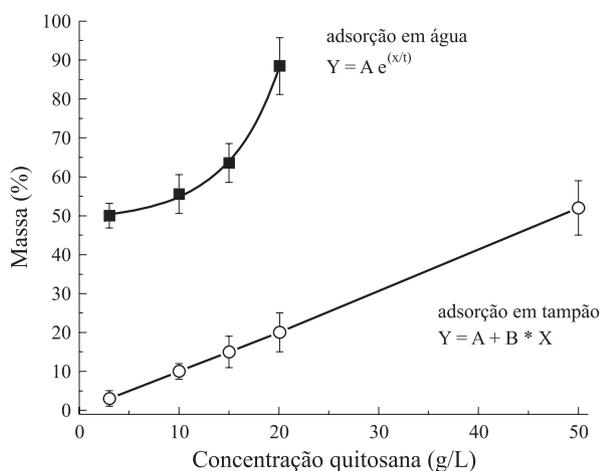


Figura 6. Porcentagem de massa adquirida por absorção, em função da concentração de quitosana na solução filmogênica.

Para medidas comparativas em solução tampão esse comportamento é perfeitamente linear e com ganhos consideravelmente inferiores aos medidos para a água. As distintas razões de absorção podem ser entendidas como resultado das diferentes interações iônicas que ocorrem na presença destas soluções. A água destilada (em pH 5,6) e o tampão (em pH 7,2) diferem nas condições de equilíbrio iônico. A água é extremamente polar, com constante dielétrica de 78,54 a temperatura ambiente. Já soluções de tampão fosfato, embora dependam de sua molaridade, apresentam constantes dielétricas inferiores a 60^[26,27] caracterizando moléculas menos polarizadas. Ou seja, a menor aquisição de massa em meio tampão confirma a forte afinidade do polímero por estruturas polares.

As características da absorção de água encontradas nos filmes de quitosana são perfis similares aos apresentados por Lieberman et al.^[28], para filmes baseados em colágenos.

Polissacarídeos são materiais naturalmente hidrofílicos. A hidrofílicidade da quitosana, em particular, se dá como função de seus grupos desacetilados que naturalmente associados aos grupos hidroxilas e amino caracterizam esta forte afinidade por moléculas polares. Como visto, esses grupos têm uma grande influência sobre o montante de água retida, considerando que o aumento da concentração de quitosana no filme interfere significativamente na quantidade absorvida. Mesmo para a solução tampão a tendência de aumento da concentração com acréscimos no ganho de massa é observada.

Outro aspecto que contribui para uma maior retenção de água é a estrutura porosa que constitui os filmes analisados. Os poros facilitam a permeação e subsequente retenção de água na matriz polimérica. Para os filmes com concentração superior a 20 g/L, a integridade dos filmes torna-se bastante instável na condição saturada. A instabilidade nessas condições pode ser entendida como conseqüência do intumescimento no filme, que gera um “inchaço” na matriz afastando entre si os núcleos depositados, reduzindo por conseguinte as interações intermoleculares. São observadas nessas condições regiões de fácil destacamento do filme sobre a superfície vítrea por simples pressão manual.

De uma forma geral, contudo, vemos que a formação dos filmes é relativamente independente do teor de quitosana, o que permite certa flexibilidade de escolha e operação. O ideal seria, para uma melhor caracterização, avaliar várias quitosanas comerciais, comparando os dados de retenção de água nas diversas marcas disponíveis.

Conclusões

As concentrações empregadas para o processamento de filmes de quitosana por automontagem sobre lâminas de vidro funcionalizadas, resultaram em estruturas similares e com pouca dependência com relação ao teor de polímero adicionado na solução precursora, salvo para o caso de absorção de água que é fortemente dependente da concentração. Os filmes são finos, com espessuras não superiores a 30 nm, caracterizados por núcleos ou aglomerados homogêneaemente dispersos, o que confere uma matriz nanoporosa. Foi confirmado o caráter hidrofílico da quitosana, onde independente da concentração a taxa de absorção de água é elevada.

Agradecimentos

Os autores são gratos à FAPESP e ao CNPq por auxílios financeiros recebidos.

Referências Bibliográficas

- Kamiński, W. & Modrzejewska, Z. - Sep. Sci. Technol., 32, p.2659 (1997).
- No, H. K.; Park, N. Y.; Lee, S. H. & Meyers, S. P. - Intern. J. of Food Microbiology, 74, p. 65 (2002).
- Atche, J.; Laranjeira, M. C. M.; Fávère, V. T.; Kimura, I. Y. & Pedrosa, R. C. - Polímeros: Ciên. e Tec., 10, p.116 (2000).
- Pittler, M.H.; Abbot, N.C.; Harkness, E.F. & Ernst E. - Eur. J. Clin. Nutr. 53, p. 379 (1999).
- Kanauchi, O.; Deuchi, K. & Imasato, Y. - Bosci Biotechnol. Biochem. 59, p.786 (1995).
- Rathke, T. D. & Hudson, S. M. - J.M.S. Rev. Macromol. Chem. Phys., C34, p. 375 (1994).
- Assis, O.B. G.; Vieira, D.C.; Vasques, R.A. & Campana-Filho, S.P. - “Formed-in-place chitosan-carboxymethylcellulose supported microfiltration membranes for water purification”. in: Proceedings of the 4th ISNAPOL (Natural Polymers and Composites IV), p. 341, S. Pedro – SP, May (2002).
- Wang, X. & Spencer, H.G. – J. of Appl. Polymer Scien. 67, p.513 (1998).
- Assis, O. B. G.; Alves, H. C. & Pessoa, J. D. C. - “Avaliação preliminar do uso de quitosana como revestimento protetor em maçãs cortadas”, in: Anais do Congresso

- Brasileiro de Fruticultura, 5f. CD-ROM., Belém, nov (2002).
10. Shahidi, F.; Arachchi, J.K.V. & Jeon, Y-J. - Trends in Food Scien. & Techn., 10, p.37 (1999).
11. Craveiro, A. A. & Craveiro, A. C. - Patente registrada no INPI 9805480-5 (19/11/98).
12. Nettles, D.L. - "Evaluation of Chitosan as a Cell Scaffolding Material for Cartilage Tissue Engineering". MSc Thesis, Mississippi State University, USA., 66p. (2001).
13. Paterno, L. G.; Mattoso, L. H. C. & Oliveira Jr., O. N. - Química Nova, 24, p.228 (2001).
14. Wu, L-Q.; Gadre, A. P.; Yi, H.; Kastantin, M. J.; Rubloff, G. W.; Bentley, W. E.; Payne, G. G. & Ghodssi, R. - Langmuir 18, p.8620 (2002).
15. Silva, V.L. - "Processamento e caracterização de filmes finos de quitosana para testes como meio interativo em sensores de íons metálicos em meio aquoso", Relatório final de estágio técnico. Embrapa Instrumentação Agropecuária, 18p. São Carlos, SP., (2003)
16. Benesch, J. & Tengvall P. - Biomaterials, 23, p.2561 (2002).
17. Signini, R. & Campana-Filho, S. P. - Polímeros: Ciên. e Tecn., 11, p.58 (2001).
18. Assis, O. B. G. & Albertini, L. L. - "Water Sorption of Chitosan films: Preliminary Study for Protective Coatings on Sliced Fruits", in: Proceedings of the 4th ISNAPOL (Natural Polymers and Composites IV). p. 390, S. Pedro - SP, May (2002).
19. Inoue, K.; Yoshizuka, K. & Ohto, K. - Analytica Chimica Acta, 388, p.209 (1999).
20. Goy, R. C.; Assis, O.B.G. & Camapana-Filho, S.P. - "Chitosan crosslinking by Glutaraldehyde and Epichlorohydrin and their interaction with CU^{2+} ions in aqueous medium", in: Proceedings of The VIII Latinamerican Symposium on Polymers (SLAP'2002), p. 602, Acapulco - México, nov (2002).
21. Kern, W. - Semiconductor International, vol. April. p.94 (1984).
22. Angelova, N. - J. of Bioactive and Compatible Polymers, 10, p.285 (1995).
23. Fender, J.H - Chem. Mater., 8, p.1616 (1996).
24. Mayers, D. - "Surfaces, Interfaces and Colloids", VCH Publishers Inc., NewYork, 432p. (1991)
25. Karim, A. & Kumar, S. - "Polymer Surfaces, Interfaces and Thin Films". World Scientific Pub. Co, Singapore, 250 p. (1999).
26. Raichardt, C. - "Solvent and solvent effects in organic chemistry", 2nd ed. VCH Publishers Inc., NewYork, 654p. (1988)
27. van de Wetering, P.; Zuidam, N. J.; van Steenberg, M. J.; van der Houwen, O. A. G. J.; Underberg, W. J. M. & Hennink, W. E. - Macromolecules, 31, p.8063 (1998)
28. Lieberman, E. R.; Gilbert, S. G. & Srinivasa, V. - Transac. of the New York Academy of Sci., 34, p.694 (1972).

Recebido: 28/03/03

Aprovado: 25/08/03