**EIXO TEMÁTICO: Biotecnologia, Inovação e Saúde**

**TRIAGEM FITOQUIMÍCA E SUA CORRELAÇÃO COM A SAZONALIDADE DAS ESPÉCIES *Pereskia aculeata e Justicia pectoralis* CULTIVADAS EM UMA HORTA MEDICINAL**

Gabriela SANTANA1, Ítala PONTES 1, Miciele SANTOS 2, Gabriela MUNIZ 3

1 Graduandos do curso de Farmácia,Cesmac; 2 Professora Orientadora;3 Professora Coorientadora do curso de Medicina e de Farmácia, Cesmac; 4Professora/Orientadora

E-mail: lelabelarmino@hotmail.com; pontes.itala23@hotmail.com; miciele23@hotmail.com; gabriela-muniz@hotmail.com

**RESUMO:**

Na contemporaneidade sabe-se que as plantas podem ter sua produção de metabólitos secundários modificada sazonalmente, acarretando em alterações em sua atividade biológica e composição química. Objetivou-se avaliar a correlação da composição fitoquímica com a sazonalidade e a secagem das espécies *Pereskia aculeata* e *Justicia pectoralis* cultivadas em uma horta medicinal. O presente estudo trata-se de uma pesquisa laboratorial de cunho experimental ‘’*in vitro’’* onde foram realizados testes de prospecção fitoquimíca nas partes da folha e do caule das duas espécies coletadas nas quatro estações do ano, utilizando amostras in natura e dessecada. Nos estados frescos e secos do chambá foi identificado em quase todas as estações do ano a presença de cumarinas, com exceção do caule seco no inverno. Houve também a presença de saponinas no caule e na folha fresca no inverno e na seca no outono. Somente na folha seca houve a presença de taninos no outono e inverno. No Ora-pro-nobis fresco, o único metabólito detectado foram as saponinas, presentes no caule analisadas na primavera e no verão e nas folhas do verão e outono. Em seu estado seco, o ora-pro-nobis apresentou positividade para saponinas, no caule e folha, na estação do outono e terpenos, apenas no caule e na estação do verão. Estudos dos aspectos metabólicos e sazonais são de grande importância para a produção de fitoterápicos, pois permite a obtenção de um produto final de qualidade, segurança e eficácia.

**Palavras-chave:** Metabólitos secundários. Sazonalidade. Prospecção fitoquímica.

**INTRODUÇÃO**

Os metabólitos secundários são provenientes da evolução biológica das espécies e passaram, então, a ter relevância em sua continuidade e adaptação. Como as plantas também necessitam de sistemas imunológicos, seus metabólitos secundários podem agir na defesa contra vírus e outros agentes infecciosos (OLIVEIRA et al., 2011; YUNES; CECHINEL FILHO, 2012). São compostos que desempenham atividade significativa para a manutenção do vegetal: produção de substâncias tóxicas para defesa contra predadores; atrativos voláteis para determinadas espécies; apresentarem coloração que atraia ou afaste outras espécies (DEWICK, 2002) e auxiliarem no processo de polinização ao produzir substâncias que atraem os agentes vivos (BRAZ FILHO, 2010). Também podem atuar na defesa contra bactérias, fungos e apresentar atividade antiparasitária e herbicida (VAISHNAV; DEMAIN, 2010).

O pressuposto levantado é de que as estações do ano e o método de secagem interferem na composição química dos metabólitos secundários das espécies *Pereskia aculeata* e *Justicia pectoralis* causando alterações em suas respectivas bioatividades, conforme a época em que o material é coletado e analisado, pois a quantidade e a natureza das substâncias ativas não são constantes durante todo o ano.

Mediante o contexto, tem-se a seguinte questão norteadora: qual a composição fitoquímica das espécies *Pereskia aculeata* e *Justicia pectoralis* correlacionada com a sazonalidade e o método de secagem? O estudo torna-se relevante para garantir a qualidade das plantas medicinais cultivadas em uma horta medicinal, pois as influências ambientais e o método de secagem na produção de metabólitos secundários são fundamentais para obtenção do efeito terapêutico desejado, visto que essas plantas poderão ser usadas para o preparo de medicamentos fitoterápicos nas ações voltadas a comunidade.

O estudo objetivou avaliar a correlação da composição fitoquímica com a sazonalidade e a secagem das espécies *Pereskia aculeata* e *Justicia pectoralis* cultivadas em uma horta medicinal.

**MATERIAIS E MÉTODO**

Trata-se de um estudo experimental com pesquisa laboratorial ‘’*in vitro’’,* realizado no laboratório farmacêutico de uma instituição de ensino de Alagoas. Foram coletadas, em cada uma das quatro (04) estações do ano (inverno, primavera, verão e outono), amostras de folha e caule das espécies *Pereskia aculeata e Justicia pectoralis* cultivadas em uma horta medicinal localizada no município de Marechal Deodoro, Alagoas, Nordeste brasileiro, para a análise da prospecção fitoquímica nas amostras in natura e dessecada. Foi testado também o método de secagem por meio de secador mecânico, para garantir a manutenção dos metabólitos secundários.

O método de secagem através do fluxo de ar quente sob controle de temperatura em um sistema fechado proporciona um produto de melhor estabilidade e qualidade (CORRÊA et al., 2007), pois promove uma redução de água no vegetal, fazendo com que a velocidade das reações químicas e o crescimento microbiano sejam diminuídos, possibilitando a conservação dos metabólitos secundários das plantas por maior tempo (MARTINAZZO et al., 2007). As amostras foram colocadas em estufa e secas por 3 dias a 45ºC como preconiza da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). Em seguida foi realizada a triagem fitoquímica e a comparação dos resultados da presença dos metabólitos secundários encontrados em relação às análises realizadas na planta in natura.

A prospecção fitoquímica foi realizada conforme descrição abaixo (COSTA, 2002; MATOS, 2009):

**Cumarinas**

 Foram realizados os testes de fluorescência e colorimetria utilizando extrato clorofórmico e, respectivamente, papel filtro e tubo de ensaio. Para o ensaio de fluorescência, foram desenhados dois círculos no papel filtro e inserido 10 gotas do extrato em cada um. Acrescentou-se a um dos círculos 5 gotas de hidróxido de sódio (NaOH). Em seguida, o papel filtro foi levado à cabine de luz U.V para observação da ocorrência de fluorescência. Para o ensaio de colorimetria, foi adicionado 5 mL do extrato no tubo de ensaio, acrescentado 1 mL de NaOH e observado a ocorrência de coloração.

**Triterpenos e Esteroides**

Foi realizado o teste de colorimetria utilizando extrato clorofórmico e tubos de ensaio. O extrato foi transferido para dois tubos de ensaio: no tubo 1, inseriu-se apenas o extrato para ser usado como controle e no tubo 2, acrescentou-se 2mL de anidrido acético. Cuidadosamente, pelas paredes do tubo de ensaio 2 foi adicionando 0,5 mL de ácido sulfúrico e observou-se a ocorrência de coloração para confirmação da presença de triterpeno e formação de um anel vermelho, indicativo da presença de esteroides.

**Flavonoides**

 Foram realizados os testes de colorimetria e fluorescência utilizando extrato hidroalcoólico 70% e, respectivamente, tubos de ensaio e papel filtro. Para o teste colorimétrico, foram utilizados dois (02) tubos de ensaios. No tubo 1 foi adicionado 5 mL do extrato e acrescentado 0,5 mL de NaOH. No tubo 2 foi adicionado 5mL do extrato e acrescentado a fita de Mg metálico + HCL concentrado (em capela) até mudança de cor. Para o teste de fluorescência foi utilizado um papel filtro, onde desenhou-se dois círculos e inseriu 4 gotas do extrato alcoólico em cada um. Acrescentou-se a um dos círculos, 2 gotas (0,1 mL) de AlCl3 a 5%. Na sequência, o papel de filtro foi levado à cabine de luz U.V para observação da ocorrência de fluorescência.

**Saponinas**

 Foi realizado o teste de formação de espuma utilizando extrato aquoso e tubo de ensaio. O extrato foi transferido para o tubo de ensaio e procedida agitação por 2 a 3 minutos, deixando em repouso por 5 minutos. A presença de espuma persistente e abundante indica a presença de saponinas. Para a confirmação da presença de saponinas foi adicionado 10 gotas de ácido clorídrico (HCL) diluído no tubo de ensaio contendo o extrato, deixou o tubo em repouso por alguns minutos, em seguida, neutralizou com 10 gotas NaOH e agitou novamente.

**Taninos**

 Foram realizados os testes de colorimétrico e de precipitação utilizando extrato aquoso e tubos de ensaio. O extrato foi transferido em quantidade suficiente para quatro (04) tubos de ensaio: no tubo 1, usado como controle, foi inserido apenas o extrato aquoso, no tubo 2, o extrato aquoso e 5 gotas de cloreto férrico a 2%, no tubo 3, o extrato aquoso e 5 gotas de solução de acetato de chumbo a 10% e no tubo 4, o extrato aquoso, 5 gotas de HCL e 10 gotas de solução aquosa de gelatina 2,5%. Em seguida foi observada a ocorrência de coloração e formação de precipitado.

 **Heterosídeos Antraquinônicos**

 Foi realizado o teste de colorimetria utilizando extrato metanólico e tubos de ensaio. O extrato foi transferido para dois tubos de ensaio: no tubo 1, inseriu-se apenas o extrato para ser usado como controle e no tubo 2, acrescentou-se algumas gotas de hidróxido de potássio 1 Molar (KOH 1M) e observou-se a ocorrência de coloração. Em seguida, foi acrescentado novamente algumas gotas de ácido clorídrico 1M e observado a volta da cor para a coloração inicial.

**Alcaloides**

Foi realizado o teste de precipitação utilizando extrato aquoso acidificado e vidros relógio. Transferiu-se o extrato para cinco (05) vidros relógios dispostos na bancada. No vidro 1, adicionou-se apenas o extrato para ser usado como controle, nos demais vidros foram adicionados, respectivamente, os reagentes Mayer, Drangendorff, Bertrand e Burchardat observado a formação de precipitado em ao menos três (03) dos quatro (04) vidros relógios, para a confirmação da presença de alcaloides.

**Resultados e discussãO**

***Justicia Pectoralis* Jacq.(Chambá)**

O chambá, em seu estado fresco, no caule e folha, e em todas as estações do ano, apresentou resultado positivo para cumarinas. Além disso, no inverno, também apresentou positividade para saponinas nas duas partes analisadas e flavonoides na folha, demonstrando a influência da época do ano na produção de metabólitos secundários. Em seu estado seco, o chambá apresentou resultado positivo para cumarinas, no caule e folha, em quase todas as estações do ano, exceto no caule analisado no inverno. Na folha analisada no inverno, observou-se positividade para flavonoides e taninos **(Figura 2)**. Também na folha pôde-se observar positividade para taninos e saponinas no outono. Nota-se que a presença de taninos foi identificada apenas na planta seca e no período de outono e inverno **(Quadro 1).**

No estudo realizado na *Justicia pectoralis* com relação ao método de secagem observou-se que não há relatos na literatura acerca da não ocorrência de cumarinas no caule em seu estado seco na estação do inverno e não houve influência nas partes frescas e secas na identificação de saponinas e flavonoides. Contudo, na identificação de taninos o método de secagem por meio da estufa favoreceu as partes secas da planta, isso pode ser possível devido ao menor conteúdo de água nas folhas após a secagem (RADUNZ et al., 2006), como foi observado quando comparado com a amostra fresca. De acordo com Silva e Casali (2000) com a redução da quantidade de água, aumenta-se, também, a quantidade de princípios ativos em relação à massa seca.

Os parâmetros que interferem no teor de metabólitos são caracterizados pelo período da colheita, a idade e o estágio de desenvolvimento da planta, essas intervenções podem afetar tanto os níveis de substâncias ativas como as proporções de distribuição de seus componentes (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A presença de saponinas e taninos no estado fresco e no estado seco, respectivamente, no inverno e outono podem estar associados a um estresse hídrico que pode aumentar diminuir ou não alterar a produção de metabólitos secundários (CARVALHO; CASALI, 1999), entretanto foi observado um aumento na quantidade desses compostos. Outra hipótese seria a alteração da intensidade luminosa durante as estações do ano que podem interferir na produção dos metabólitos secundários dos vegetais como uma estratégia de defesa da planta, isso explicaria o aumento de flavonoides no inverno, já que esses compostos fenólicos atuam como agentes defensores contra vários tipos de estresses causados por patógenos ou condições ambientais adversas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A presença de cumarinas são amplamente referidas na literatura, as quais são citadas como os mais prováveis constituintes bioativos da espécie *Justicia pectoralis* (VICENTE, 2008). A produção de cumarinas pela *Justicia pectoralis* está relacionada diretamente a vários fatores e condições específicas como características do solo, tipo e nível de radiação, poluição atmosféricas, ou mesmo ao ataque de pragas e a incidência de doenças. Desta forma, o local de cultivo, bem como as condições ambientais a que foram expostas exerce grande influência em suas características fitoquímicas (SIMÕES et al, 2003).

**Quadro 1-** Indicativo da presença dos metabólitos secundários presentes no caule e na folha da *Justicia pectoralis* Jacq.(Chambá) nas quatro estações do ano.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **Caule** | **Folha** |
|  | **Primavera** | **Verão** | **Outono** | **Inverno** | **Primavera** | **Verão** | **Outono** | **Inverno** |
| **Metabólitos****prospectados** | **F** | **S** | **F** | **S** | **F** | **S** | **F** | **S** | **F** | **S** | **F** | **S** | **F** | **S** | **F** | **S** |
| Alcaloides | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Cumarinas | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Flavonoides | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| Heterosídeos antraquinônicos | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Saponinas | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | + | - |
| Taninos | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + |
| Triterpenos e Esteroides | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Legenda: (F) Fresco; (S) Seco; (-) Negativo; (+) Positivo.

Fonte: Autores (2019).

**3.2 *Pereskia aculeata* Miller (Ora-pro-nobis)**

*Pereskia aculeata,* popularmente conhecida como *ora-pro-nobis* é uma planta rústica, de fácil adaptação ao ambiente, nativa de regiões tropicais, pertence à ordem *Caryophyllale e* família das cactáceas (PINTO; SCIO, 2014). Suas folhas são lisas, largas e de cor esverdeada, apresenta caule fino, com ramos sublenhosos ou lenhosos e com espinhos, podendo a planta chegar a 10 metros de altura (TOFANELLI; RESENDE, 2011).

O ora-pro-nobis é uma planta medicinal, usada no tratamento de algumas doenças como anemia, câncer e osteoporose, apresenta também atividades cicatrizantes (ALMEIDA; CORRÊA, 2012), que amenizam processos inflamatórios e queimaduras, promovendo regeneração da pele. Os produtos obtidos desta espécie são utilizados como fitocosméticos, antioxidantes, antianêmicos e anti-inflamatórios (SANTOS; SANTOS; MARISCO, 2018). Não há relatos de toxicidade em relação às folhas e as mesmas podem ser usadas como emolientes, já os frutos são usados como expectorante (SARTOR et al., 2010).

No vegetal ora-pro-nobis fresco, o único metabólito detectado foram as saponinas, presentes nos caules analisados na primavera e no verão e nas folhas do verão e outono. Em seu estado seco, o ora-pro-nobis apresentou positividade para saponinas, no caule e folha, na estação do outono e terpenos, apenas no caule e na estação do verão **(Quadro 2).**

No estudo realizado na *Pereskia aculeata* com relação ao método de secagem observou-se que a maior incidência de saponinas encontram-se na folha e no caule em seus estados frescos do que no estado seco, os resultados obtidos apresentaram divergência quanto ao esperado, visto que a secagem natural pode causar um processo de fotodecomposição, degradando alguns de seus componentes químicos e ocasionando alterações de odor, cor e sabor (MARTINS et al.**,** 2003). Foram identificados também terpenos apenas no caule seco, não havendo incidência desse metabólito na folha em suas partes frescas e secas, isso pode ser explicado devido à sensibilidade que algumas partes das plantas apresentam ao processo de secagem, o qual promove a degradação de seus metabólitos secundários (GÜMÜŞAY et al., 2015).

**Quadro 2-** Indicativo da presença dos metabólitos secundários presentes no caule e na folha da *Pereskia aculeata* Miller nas quatro estações do ano.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **Caule** | **Folha** |
|  | **Primavera** | **Verão** | **Outono** | **Inverno** | **Primavera** | **Verão** | **Outono** | **Inverno** |
| **Metabólitos****prospectados** | **F** | **S** | **F** | **S** | **F** | **S** | **F** | **S** | **F** | **S** | **F** | **S** | **F** | **S** | **F** | **S** |
| Alcaloides | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Cumarinas | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Flavonoides | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Heterosídeos antraquinônicos | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Saponinas | + | - | + | - | - | + | - | - | - | - | + | - | + | + | - | - |
| Taninos | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Triterpenos e Esteroides | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Legenda: (F) Fresco; (S) Seco; (-) Negativo; (+) Positivo.

Fonte: Autores (2019).

A presença de saponinas no caule no estado fresco na primavera e verão, e na folha fresca no verão e outono, além da presença de terpeno no caule seco durante a estação do verão indicam que a maior intensidade de radiação solar é um dos fatores que favorece maior produção desses compostos, isso pode ser explicado, principalmente pela proteção proporcionada por estes metabólitos contra a foto-destruição ao absorver e/ou dissipar a energia solar, dificultando assim a danificação dos tecidos mais internos pela radiação UV-B (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Possivelmente a presença de saponinas no outono pode ser explicada por essa estação apresentar menor incidência luminosa. Outros fatores também podem estar associados a variações como o clima, solo, adubação e fatores ontogênicos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Os terpenos, chamados também de terpenoides ou isoprenoides, presentes da *Pereskia aculeata* constituem a maior classe de produtos naturais existentes (CHANG et al., 2010). O crescente interesse na aplicação clínica dos terpenos é atribuído às suas propriedades biológicas, tais como o efeito: antitumoral, antimicrobiano, antifúngico, antiviral, anti-hiperglicêmico, analgésico, anti-inflamatório e antiparasitário (PADUCH et al., 2007).

 Saponinas encontradas na *Pereskia aculeata* são compostos bioativos que geralmente são produzidos por plantas para neutralizar agentes patogênicos e herbívoros. Além de seu papel na defesa da planta, as saponinas possuem grande interesse por serem componentes ativos de medicamentos e por suas propriedades farmacológicas valiosas (AUGUSTIN et al., 2011). Dentre as ações biológicas atribuídas às saponinas há relatos de propriedades imunoestimulantes, anticancerígenas, antimicrobianas, antifúngicas, anti-inflamatórias e antivirais (GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ; MAZZA, 2007). Consequentemente, muitas pesquisas têm sido realizadas para desvendar os modos de ação das saponinas, bem como na exploração de seu potencial para processos industriais (AUGUSTIN et al., 2011).

Elas são amplamente exploradas nos setores alimentício, farmacêutico e da agricultura, principalmente, como agentes de espuma e devido sua atividade superficial (GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ; MAZZA, 2007). Porém, de acordo com CeyhunSezgin e Artik (2010) elas apresentam aplicação limitada para alimentos por apresentarem gosto amargo.

**CONCLUSÃO**

A prospecção fitoquímica da *Justicia pectoralis* revelou diversos metabólitos secundários presentes como cumarinas, flavonoides, saponinas e taninos. Na *Pereskia acuelata* foram identificadas apenas saponinas e triterpenos. Através dos resultados obtidos pode-se concluir que a sazonalidade e o método de secagem foram fatores que contribuíram para a presença desses compostos nas respectivas espécies.

 A conversão de uma planta em um medicamento deve objetivar a preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a manutenção de sua ação biológica, assim como a segurança em sua utilização. Características como essas são importantes no que se refere à produção de fitoterápicos, principalmente em seus aspectos metabólicos e sazonais, essenciais para obtenção de um produto final com qualidade, tecnologia, segurança e eficácia.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AUGUSTIN, J. M et al. *Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins.* ***Phytochemistry***, Denmark, v. 72, p. 435-457, feb. 2011.

ALMEIDA, M. E. F.; CORRÊA, A. D. Utilização de cactáceas do gênero *Pereskia* na alimentação humana em um município de Minas Gerais. **Ciência Rural**, Minas Gerais, v. 42, n. 4, p. 751–756, abr.2012. Disponível: https://www.scielo.br/pdf/cr/v42n4/a11112cr5075.pdf. Acesso: 9 out.2020, 17:21:15.

BEZERRA, A. M. E. et al. Rendimento de biomassa, óleo essencial, teores de fósforo e potássio de chambá em resposta à adubação orgânica e mineral. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 32, n. 2, p. 124-129, dez. 2006. Disponível em: http://www.ccarevista.ufc.br/seer/index.php/ccarevista/article/view/187/181. Acesso em: 24 nov.2020, 16:11:17.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária**.** Métodos Gerais.In: \_\_\_\_\_\_. **Farmacopeia brasileira**. 5. ed. Brasília, DF: Anvisa, 2010. v. 1, cap. 5, p. 194-196. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/farmacopeia\_volume-1\_2010.pdf. Acesso: 11 nov. 2020, 17:34:25.

GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ, Ö.; MAZZA, G. *Saponins: Properties, applications and processing.* ***Critical Reviews in Food Science and Nutrition*,** Turquia, v. 47, p. 231-258, fev. 2007.Disponível em:https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408390600698197. Acesso: 28 nov.2020, 15:59:04.

GÜMÜŞAY, O. A.; BORAZAN, A. A.; ERCAL, N.; DEMIRKOL, O. *Drying effects on the antioxidante properties of tomatoes and ginger.* ***Food Chemistry****,* Turquia, v. 173, p. 156-162, oct. 2015. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25466007/. Acesso: 28 nov.2020, 15:58:12.

LAKE, B.G. *Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment.* ***Food Chem. Toxicol***, Noruega, v. 37, n. 4, p. 423-53, apr.1999. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10418958/. Acesso: 19 out.2020, 16:29:30.

LINO, C. S. et al. *Analgesic and antiinflammatory activities of Justicia pectoralis Jacq and its main constituents: coumarin and umbelliferone*. ***Phytotherapy Research***, Fortaleza, v. 11, p. 211–215, dec.1997. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/(SICI)1099-1573(199705)11:3%3C211::AID-PTR72%3E3.0.CO%3B2-W. Acesso: 24 nov.2020, 16:43:45.

MARTINAZZO, A. P. et al. Análise e descrição matemática da cinética de secagem de folhas de capim-limão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Paraíba, v.11, n. 3, p. 301-306, jan. 2007. Disponível em: https://www.scielo.br/pdf/rbeaa/v11n3/a09v11n3.Acesso: 19 out. 2020, 16:23:10.