

EFEITO ANTIMICROBIANO DE TINTURAS DE PRODUTOS NATURAIS SOBRE BACTÉRIAS DA CÁRIE DENTÁRIA

Antimicrobial effect of natural dyeing products upon decay-causing bacteria

Artigo Original

RESUMO

Objetivo: Avaliar as atividades bacteriostática e bactericida de tinturas de *Rosmarinus officinalis* (Alecrim), *Calendula officinalis* (Calêndula) e *Mikania glomerata* (Guaco) sobre bactérias da cárie dentária e compará-las às da clorexidina. **Métodos:** A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pela técnica da microdiluição, utilizando microplacas de 96 furos. Em cada poço foram inseridos 10 μ L do inóculo (10⁸ células/mL), 100 μ L de caldo BHI duplamente concentrado e 100 μ L das tinturas, em concentrações que variaram de 100 a 0,78mg/mL, para T1, T2 e T3. Como controle positivo foi utilizado a Clorexidina 0,12%. A leitura foi feita após 24 horas, pelo método visual. Os ensaios foram realizados em triplicata. A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi obtida pela semeadura da última concentração bacteriostática e da sua anterior, para cada produto, em meio Ágar Sangue. Foram consideradas CBM as placas que não apresentaram crescimento bacteriano. **Resultados:** Sobre *Streptococcus mutans*, verificou-se CIM de 6,25mg/mL, para T1, T2 e T3 e CBM de 12,5mg/mL para T1 e T2 e de 6,25mg/mL para T3. Sobre *Streptococcus oralis* todos os produtos apresentaram CIM e CBM de 0,78mg/mL. Para clorexidina, a CIM e CBM foram 0,04mg/mL, sobre *S. mutans* e *S. oralis*. **Conclusão:** As tinturas de Alecrim, Calêndula e Guaco apresentaram ação bactericida e bacteriostática em baixas concentrações, sobre *Streptococcus mutans* e *Streptococcus oralis*, entretanto a atividade antimicrobiana da Clorexidina foi superior a das tinturas.

Descritores: Placa Dentária; *Streptococcus mutans*; *Streptococcus oralis*; Produtos Biológicos.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the bacteriostatic and bactericidal activities of tinctures of *Rosmarinus officinalis* (Rosemary), *Calendula officinalis* (Marigold) and *Mikania glomerata* (Guaco) upon decay-causing bacteria and compare them to chlorhexidine's. **Methods:** The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined by microdilution technique, using 96-well microplates. In each well were inserted 10 μ L of inoculum (10⁸ cells/mL), 100 μ L of doubly concentrated BHI broth and 100 μ L of tinctures at concentrations that vary between 100 and 0.78 mg/mL for T1, T2 and T3. As positive control, Chlorhexidine 0.12% was used. Reading was performed after 24 hours, by visual method. The assays were realized in triplicate. Minimum Bactericidal Concentration (MBC) was obtained by seeding of last bacteriostatic and its preceding concentrations, for each product, on Blood Agar. The MBC was considered in the plates that did not present any bacterial growth. **Results:** Upon *Streptococcus mutans*, MIC was verified at 6.25mg/mL, for T1, T2, and T3 and MBC at 12.5mg/mL for T1 and T2, and at 6.25mg/mL for T3. Upon *Streptococcus oralis*, all products presented MIC and MBC at 0.78mg/mL. For Chlorhexidine, the MIC and MBC were 0,04mg/mL, upon *S. mutans* and *S. oralis*. **Conclusion:** The tinctures of Rosemary, Marigold and Guaco showed bactericidal and bacteriostatic activities at low concentrations, upon *Streptococcus mutans* e *Streptococcus oralis*. However, the antimicrobial activity of chlorhexidine was superior to the tinctures'.

Descriptors: Dental Plaque; *Streptococcus mutans*; *Streptococcus oralis*; Biological Agents.

Mayara Abreu Pinheiro⁽¹⁾
Deborah Brindeiro de Araújo Brito⁽¹⁾
Leopoldina Fátima Dantas de Almeida⁽¹⁾
Yuri Wanderley Cavalcanti⁽¹⁾
Wilton Wilney Nascimento Padilha⁽¹⁾

1) Universidade Federal da Paraíba - UFPB
- João Pessoa (PB) - Brasil

Recebido em: 31/10/2011
Revisado em: 30/01/2012
Aceito em: 19/02/2012

INTRODUÇÃO

A cárie dentária tem etiologia multifatorial, fundamentada em três fatores: hospedeiro, dieta e microrganismos; atuando sobre estes o tempo^(1,2). A formação do biofilme dentário ocorre por meio de processos complexos, que proporcionam a instalação de uma comunidade microbiana diversa, cooperativa, dinâmica, de alto potencial patogênico, podendo, muitas vezes, ser resistente a agentes antimicrobianos^(2,3).

O *Streptococcus mutans* é considerado o principal agente etiológico da cárie dentária em humanos. Fatores de virulência, tais como a composição de sua superfície celular (sorotipo) e a produção de bacteriocinas (mutacinas), têm sido investigados em relação ao seu potencial cariogênico⁽⁴⁾. A capacidade de adesão desse microrganismo está relacionada à patogenicidade, sendo objeto de estudos que visam prevenir a formação de lesões de cárie, seja por meio de métodos mecânicos, com a utilização da escova dental; ou métodos químicos, com a utilização de agentes antimicrobianos^(5,6).

O gluconato de clorexidina é um dos antimicrobianos de maior uso na odontologia, devido sua eficácia comprovada na remoção do biofilme dentário. A atividade deste agente *in vivo* resulta num efeito bactericida inicial, que é momentâneo devido à rápida limpeza oral, e um efeito bacteriostático prolongado, já que a clorexidina é adsorvida através de interações iônicas e liberada lentamente quando deslocada pelos íons cálcio existentes na saliva^(1,2). No entanto, esse agente químico possui limitações, como: pigmentação nos dentes, desequilíbrio da microbiota e alteração do paladar. Devido a esses fatores, a busca por outros agentes químicos, incluindo os de origem natural, vem se intensificando^(7,8).

Atualmente, nota-se um crescimento do interesse pelos produtos naturais, fruto da grande procura por terapias alternativas⁽⁹⁾. Em Odontologia, pesquisas com produtos naturais têm crescido nos últimos anos, devido à procura por novos produtos com maior atividade farmacológica, com menor toxicidade e com maior biocompatibilidade, além de valores mais acessíveis à população⁽¹⁰⁾. A partir dos resultados desse estudo, poderão ser realizadas novas pesquisas com elaboração de colutórios e cremes dentais, precedidos pelo teste de toxicidade.

A atividade antimicrobiana das tinturas de *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Calendula officinalis* (calêndula) e *Mikania glomerata* (guaco) foi previamente investigada por vários estudos⁽¹¹⁻¹⁵⁾. Porém, a atividade antimicrobiana desses produtos foi avaliada por diferentes técnicas, desconsiderando-se a padronização internacional e a avaliação sobre espécies de diferentes estágios evolutivos da cárie.

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a atividade bacteriostática e bactericida de tinturas de *Rosmarinus officinalis* (Alecrim), *Calendula officinalis* (Calêndula) e *Mikania glomerata* (Guaco) e compará-las à clorexidina, frente bactérias da cárie dentária.

MÉTODOS

Realizou-se um estudo de abordagem indutiva, com procedimento comparativo e técnica de documentação direta em laboratório⁽¹⁶⁾.

As tinturas hidroalcoólicas de Alecrim – *Rosmarinus officinalis* (T1), Calêndula – *Calendula officinalis* (T2) e Guaco – *Mikania glomerata* (T3) foram obtidas sob a concentração de 20% (200mg/mL), em farmácia de manipulação, na cidade de João Pessoa, Paraíba, Brasil.

Foram utilizadas as linhagens bacterianas padronizadas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e *Streptococcus oralis* (ATCC 10557) obtidas no Laboratório de Microrganismos de Referência da Fundação Oswaldo Cruz. As cepas de referência foram reativadas em meio Ágar Sangue (agar Muller Hinton – DIFCO®, Detroit, Michigan, EUA – adicionado de 5% de sangue de carneiro desfibrinado) e posteriormente estocadas no Laboratório de Microbiologia Oral – Núcleo de Medicina Tropical/Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba.

A determinação da concentração inibitória mínima das tinturas de *Rosmarinus officinalis* (Alecrim), *Calendula officinalis* (Calêndula) e *Mikania glomerata* (Guaco) sobre as linhagens bacterianas envolvidas foi realizada segundo a metodologia da diluição em caldo (microdiluição) proposta pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standard*⁽¹⁷⁾, com modificações⁽⁷⁾.

As linhagens foram cultivadas em caldo nutritivo Infuso de Coração e Cérebro (BHI – DIFCO®, Detroit, Michigan, EUA), sob a concentração de microrganismos igual a 10⁸ células/mL, equivalente à escala de MacFarland. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pela técnica da microdiluição, utilizando microplacas de 96 poços, inserindo-se por poço 100µL de caldo BHI (Brain Heart Infusion) duplamente concentrado, 100µL das tinturas em concentrações que variaram de 100 a 0,78mg/mL para T1, T2 e T3 e 10µL do inóculo (10⁸ UFC/mL). O controle positivo utilizado foi a solução de Gluconato de Clorexidina de 0,12% em sua formulação comercial (Periogard®). O meio de cultura, sem a adição de antimicrobianos e inóculo, constituiu o controle de esterilidade, enquanto o meio de cultura adicionado do inóculo bacteriano correspondeu ao controle de crescimento.

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C, de acordo com a estratégia de metabolização do

oxigênio pelos microrganismos envolvidos (microaerobiose para *Streptococcus mutans* e aerobiose para *Streptococcus oralis*), por um período de 24 horas. Os ensaios foram realizados em triplicata frente a cada linhagem bacteriana envolvida. A leitura para determinação da CIM das tinturas sobre as cepas avaliadas foi feita através do método visual. Levou-se em consideração a formação ou não de aglomerados de células precipitadas no fundo da cavidade da placa. Desta forma, foi considerada como CIM, a menor concentração dos produtos em teste capaz de produzir inibição visível sobre o crescimento das cepas utilizadas nos ensaios microbiológicos⁽¹⁷⁾.

A determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi realizada pela semeadura de alíquotas de 10µL em meio Ágar Sangue, da última concentração bacteriostática (CIM), e da concentração imediatamente anterior (2CIM). A leitura se fez após incubação das placas, a 37°C, por 24 horas. Foi considerada CBM a concentração em que não se observou crescimento bacteriano do subcultivo⁽¹⁸⁾.

Todos os testes foram realizados em triplicata. As unidades de comparação foram as diluições seriadas nas quais se observou CIM e/ou CBM. Os dados foram tabulados no programa Microsoft Office Excel 2007® e analisados descritivamente.

RESULTADOS

A metodologia empregada neste estudo foi validada pela ausência de crescimento bacteriano para o controle de esterilidade e controle positivo (Gluconato de Clorexidina 1,2mg/ml – Formulação comercial), bem como pela presença de crescimento bacteriano para o controle de crescimento.

O Quadro I apresenta CIM dos produtos testados, frente à *Streptococcus mutans* e *Streptococcus oralis*.

Os valores obtidos para a CBM dos produtos testados, frente à *Streptococcus mutans* e *Streptococcus oralis*, são expostos no Quadro II.

Quadro I - Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos produtos testados, frente à *S. mutans* e *S. oralis*. Valores expressos em mg/mL.

Microrganismos Produtos	<i>S. mutans</i> (ATCC 25175)	<i>S. oralis</i> (ATCC 10557)
Tintura de Alecrim	6,25	0,78
Tintura de Calêndula	6,25	0,78
Tintura de Guaco	6,25	0,78
Clorexidina	0,04	0,04

Quadro II - Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos produtos testados, frente à *S. mutans* e *S. oralis*. Valores expressos em mg/mL.

Microrganismos Produtos	<i>S. mutans</i> (ATCC 25175)	<i>S. oralis</i> (ATCC 10557)
Tintura de Alecrim	12,50	0,78
Tintura de Calêndula	12,50	0,78
Tintura de Guaco	6,25	0,78
Clorexidina	0,04	0,04

DISCUSSÃO

O método de referência para técnica de microdiluição e determinação da sensibilidade de bactérias de crescimento aeróbico à terapia antibacteriana (M7-A6)⁽¹⁷⁾, considera para a avaliação de agentes antimicrobianos sintéticos, a utilização do meio de cultura Caldo Mueller-Hinton.

A técnica de microdiluição para determinação da CIM é mais sensível que a técnica de disco-difusão⁽¹⁹⁾. Dessa forma, para minimizar a inconsistência dos resultados obtidos, foi empregada a técnica de microdiluição em caldo, com o objetivo de proporcionar maior contato entre os produtos testados e as células bacterianas. Associado a esses fatores, a incorporação do Controle Positivo, Controle de Esterilidade e Controle de Crescimento contribuem para redução de viés metodológico e comparação entre os produtos naturais testados^(18,19,20).

Os resultados de nosso estudo demonstram que as tinturas utilizadas apresentaram atividade antimicrobiana, entretanto inferior a da Clorexidina, corroborando com outros estudos^(14,21).

Frente o *Streptococcus mutans* a tintura de Guaco teve ação bactericida superior, pois a concentração bactericida mínima se manteve a mesma da bacteriostática, enquanto nas tinturas de Alecrim e Calêndula, foi necessário maior concentração para obter o efeito bactericida no teste de crescimento em placa.

A ação do extrato hidroalcoólico de *Rosmarinus officinalis* sobre *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) foi observada nas concentrações de 100% e de 50%, sendo identificados halo de inibição que variaram entre 13 e 18mm⁽¹⁴⁾. Foi comprovada a ação do extrato hidroalcoólico do *R. officinalis* sobre espécies de *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. sobrinus* (predominantes no biofilme supragengival), com atividade antimicrobiana do produto natural nas concentrações de 100% até a de 6,125%⁽²¹⁾. O presente estudo corrobora investigações^(14,21) quanto à ação antimicrobiana de extratos vegetais de *Rosmarinus*

officinalis. No entanto, os valores de CIM e CBM verificados neste estudo foram inferiores às concentrações descritas na literatura como inibitórias ao crescimento.

A ação antibacteriana do extrato de *Calendula officinalis* frente *Streptococcus mutans* foi verificada identificando-se halos médios de inibição iguais a 12,33mm⁽²²⁾. O nosso estudo identificou valores de CIM e CBM iguais ou menores que 6,25% (12,5mg/mL), demonstrando adequada atividade antibacteriana⁽²³⁾.

A técnica da microdiluição empregada é mais sensível na determinação da atividade antibacteriana das tinturas de produtos naturais⁽¹⁹⁾. Os valores de CIM e CBM frente ao *Streptococcus mutans* foram inferiores a 3,125% e 6,25%, respectivamente. Frente ao *Streptococcus oralis*, a CIM e CBM dos produtos testados foram iguais a 0,39% do produto natural. Assim, além de confirmar a atividade antibacteriana dos extratos vegetais, verificou-se ação inibitória em baixas concentrações, o que sugere adequado desempenho antimicrobiano⁽²³⁾.

Ao verificar a formação de halo de inibição de 14,5 mm, constatou-se a inibição do crescimento bacteriano do extrato fluido de *Mikania glomerata* contra *Streptococcus mutans*⁽²⁴⁾. O efeito antimicrobiano *in vitro* de *Mikania laevigata* e *Mikania glomerata* sobre estreptococos do grupo *mutans*, foi verificado a partir de diferentes frações das plantas⁽¹⁵⁾. A fração de hexano de *Mikania glomerata* foi a que apresentou melhor atividade, sendo encontradas CIM e CBM que variaram de 12,5mg/mL a 25mg/mL, e 25mg/mL a 400mg/mL, respectivamente, frente às diferentes cepas de *Streptococcus mutans* estudadas⁽¹⁵⁾. O presente estudo identificou atividade bacteriostática e bactericida do guaco (*Mikania glomerata*) em concentrações inferiores, sendo a CIM e CBM iguais a 6,25mg/mL e 0,78mg/mL frente às cepas padronizadas de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus oralis*. Dessa forma, os resultados desta investigação corroboram os achados de outros estudos encontrados na literatura⁽¹⁵⁾ e indicam atividade bacteriostática e bactericida em menores concentrações.

Conforme observado no presente estudo, as tinturas de produtos naturais demonstraram adequada atividade antibacteriana, sendo observada inibição do crescimento dos microrganismos em baixas concentrações. Essa condição indica potencial para aplicabilidade clínica na forma de colutórios, por exemplo. Verifica-se, portanto, a necessidade de aprofundar as investigações sobre a atividade antifúngica desses produtos, com o objetivo de justificar e validar o uso clínico de extratos de produtos naturais. Estudos subsequentes devem considerar a avaliação da atividade antibacteriana diante de cepas clínicas e outras linhagens padronizadas, empregando técnicas que considerem o isolamento de fitoconstituintes, a aderência celular, a

formação de biofilme *in vitro*, a influência da saliva humana e a toxicologia desses produtos.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, concluiu-se que as tinturas de Alecrim, Calêndula e Guaco apresentaram ação bactericida e bacteriostática em baixas concentrações, sobre *Streptococcus mutans* e *Streptococcus oralis*. Entretanto, a atividade antimicrobiana da Clorexidina foi superior a das tinturas.

A CIM e a inibição do crescimento na placa foram conseguidas até a última concentração dos produtos testados frente *Streptococcus oralis*. Frente *Streptococcus mutans*, a tintura de Guaco demonstrou melhor ação entre as tinturas, sugerindo potencial para uso em odontologia, o qual precisará ser confirmado em outros estudos.

REFERÊNCIAS

1. Fejerskov O, Kidd E. Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico. 1ª ed. São Paulo: Santos; 2005.
2. Souza FB, Gil JN. Doença cárie: nem infecciosa, nem transmissível. RGO. 2001; 49 (3):139-44.
3. Wolff MS, Larson C. The cariogenic dental biofilm: good, bad or just something to control? Braz Oral Res. 2009; 23Supl (1): 31-38.
4. Rodrigues MR, Maciel SM, Ferreira FBA, Piovezan A, Pieralisi FJS, Poli-Frederico RC. Análise do sorotipo e dos genes para mutacinas em *Streptococcus mutans* isolados de pré-escolares com diferentes experiências de cárie. Cienc Odontol Bras. 2008; 11(4):40-6.
5. Pereira JV, Pereira MSV, Higino JS, Sampaio FC, Alves PM, Araújo CRF. Estudo com o extrato da *Punica granatum* Linn. (Romã): efeito antimicrobiano *in vitro* e avaliação clínica de um dentifrício sobre microrganismos do biofilme dental. Rev Odonto Ciênc. 2005; 20(49):262-9.
6. Sawhney R, Berry V. Bacterial biofilm formation, pathogenicity, diagnostics and control: An overview. Indian J Med Sci. 2009; 63(7):313-21.
7. Freires IA, Alves LA, Jovito VC, Almeida LFD, Castro RD, Padilha WWN. Atividades antibacteriana e antiaderente *in vitro* de tinturas de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) e *Solidago microglossa* (Arnica) frente a bactérias formadoras do biofilme dentário. Odontol Clín Cient. 2010; 9(2):139-43.
8. Pérez, ALAL, Cardoso AMR, Cavalcanti YW, Almeida IFD, Padilha WWN. Atividade antifúngica

- de antissépticos bucais sobre *Candida* spp. Rev Bras Ciênc Saúde. 2011; 15(1):69-74.
9. Gonçalves AL, Alves Filho A, Menezes H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. Arq Inst Biol. 2005; 2(3):353-8.
 10. Castilho AR, Murata RM, Pardi V. Produtos naturais em odontologia. Rev Saúde. 2007; 1(1):11-29.
 11. Baratto L, Lang KL, Vanz DC, Reginatto FH, Oliveira JB, Falkenberg M. Investigação das atividades alelopáticas e antimicrobiana de *Mikania laevigata* (asteraceae) obtida de cultivos hidropônico e tradicional. Rev Bras Farmacogn. 2008; 18(4):577-82.
 12. Cavalcanti YW, Almeida LFD, Padilha WWN. Atividade antifúngica de tinturas de produtos naturais sobre *Candida* spp. Int J Dent. 2011; 10(1):15-29.
 13. Gazim ZC, Rezende CM, Nakamura CV, Dias Filho BP, Cortez DAG, et al. Identificação dos constituintes químicos da fração volátil da *Calendula officinalis* produzida no Paraná. Horti Bras. 2007; 25(1):118-21.
 14. Silva MAS, Silva MAR, Higino JS, Pereira MSV, Carvalho AAT. Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. Rev Bras Farmacogn. 2008; 18(2):236-40.
 15. Yatsuda R. Efeito antimicrobiano in vitro da *Mikania laevigata* e *Mikania glomerata* sobre estreptococos do grupo mutans [dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2004.
 16. Lakatos M, Marconi MA. Fundamentos da metodologia científica. 6ª ed. São Paulo: Atlas; 2009.
 17. National Committee for Clinical Laboratory Standard. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, approved Standard - M7-A6, 6th edition. Pennsylvania; 2003. v. 23.
 18. Cavalcanti YW, Almeida LFD, Padilha WWN. Atividade antifúngica de três óleos essenciais sobre cepas de *Candida*. ROBRAC. 2011; 20(52):77-82.
 19. Scorzoni L, Benaducci T, Almeida AMF, Silva DHS, Bolzani VS, Mendes-Giannini MJS. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida* spp and *Cryptococcus* sp. Rev Ciênc Farm Básica Apl. 2007; 28(1):25-34.
 20. Castro RD, Lima EO. Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Candida* spp. Rev Odontol UNESP. 2010; 39(3):179-84.
 21. Alves PM, Pereira JV, Higino JS, Pereira MSV, Queiroz LMG. Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de *Rosmarinus officinalis* linn. (alecrim) sobre microrganismos cariogênicos. Arq Odontol. 2008; 44(2):53-8.
 22. Buffon MCM, Lima MLC, Galarda I, Cogo L. Avaliação da eficácia dos extratos de *Malva sylvestris*, *Calêndula officinalis*, *Plantago major* e *Curcuma zedoaria* no controle do crescimento das bactérias da placa dentária. Estudo "in vitro". Rev Visao Adem. 2001; 2(1):31-8.
 23. Menezes TOA, Alves ACB A, Vieira JMS, Menezes SAF, Alves BP, Mendonça ICV. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. Rev Odontol UNESP. 2009; 38(3): 184-91.
 24. Souza DH, Tamamoto CH, Pinho JJRG, Alves MS, Araújo ALA, Sousa OV. Atividade antibacteriana frente ao *Streptococcus mutans* e estabilidade de produtos naturais contendo extrato de *Mikania glomerata* Sprengel. HU Rev. 2006; 32(1):11-4.

Endereço primeiro autor:

Mayara Abreu Pinheiro
Rua Jociara Telino, 85/402
Bairro: Bancários
CEP: 58053-100 - João Pessoa - PB - Brasil
E-mail: abreu_mayara@yahoo.com.br

Endereço para correspondência:

Wilton Wilney Nascimento Padilha
Departamento de Clínica e Odontologia Social
Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal da Paraíba - Campus I
Bairro: Cidade Universitária
CEP: 58051-900 - João Pessoa - PB - Brasil
E-mail: wiltonpadilha@yahoo.com.br