

DERIVADOS ACRIDÍNICOS COMO POTENCIAIS AGENTES QUIMIOTERÁPICOS COM AÇÃO ANTILEISHMANIA

Sonaly Lima Albino¹; Isabela Motta Felício²; Pablo Rayff da Silva³; Renaly Ivyna de Araújo Rêgo⁴;
Ricardo Olímpio de Moura⁵

- (1) *Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Estadual da Paraíba. E-mail: sonaly.albino@hotmail.com*
- (2) *Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Estadual da Paraíba. E-mail: isabelamfelicio@gmail.com*
- (3) *Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Estadual da Paraíba. E-mail: pablo-rayff@hotmail.com*
- (4) *Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Estadual da Paraíba. E-mail: renaly.ivyna@hotmail.com*
- (5) *Docente do departamento de Farmácia, Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas – Universidade Estadual da Paraíba. E-mail: ricardo.olimpiodemoura@gmail.com*

Resumo: As leishmanioses são doenças parasitárias causadas por diversas espécies do gênero *Leishmania*. O tratamento para essas consiste principalmente na quimioterapia, porém, essa opção é limitada devido a complicações quanto a via de administração, alto custo da droga, toxicidade e resistência. A partir dessa premissa, encontra-se a necessidade do planejamento de novos fármacos por intermédio da química medicinal. E, nesse contexto, encontram-se os compostos acridínicos. Esses são compostos heterocíclicos com amplo espectro de ação capazes de desempenhar atividade leishmanicida. Nesse sentido, esse trabalho objetivou a realização de uma revisão sistemática através da pesquisa de artigos com assuntos relacionados, por meio das bases de dados eletrônicos tais como Science Direct, Periódicos CAPES e SciELO, dando-se preferência a revistas e jornais da área de química medicinal e optando-se por publicações com os idiomas inglês, português e espanhol. Foram selecionados cinco estudos que apresentaram melhor encaixe no critério de inclusão do artigo. Os artigos “*New Thiophene-Acridine Compounds: Synthesis, Antileishmanial Activity, DNA Binding, Chemometric and Molecular Docking Studies*”, “*9-Anilinoacridines as potential antileishmanial agents*”, “*Synthesis and antileishmanial activity of 6-mono-substituted and 3, 6-di-substituted acridines obtained by acylation of proflavine.*”, “*Synthesis and antileishmanial activities of 4, 5-di-substituted acridines as compared to their 4-mono-substituted homologues.*” e “*Bis-acridines as lead antiparasitic agents: structure-activity analysis of a discrete compound library in vitro*” evidenciaram a relevância desse núcleo heterocíclico ao desenvolver estudos visando a atividade antileishmania, obtendo-se resultados satisfatórios e demonstrativos da potencialidade dos compostos acridínicos para quimioterapia em questão.

Palavras-chave: Leishmaniose, derivados acridínicos, atividade antileishmania, química medicinal.

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses compreendem um espectro de doenças parasitárias causadas por diversas espécies pertencentes ao reino Protozoa, subfilo Sarcomastigophora, classe Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomidae e gênero *Leishmania* (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Essas irão se expressar em três manifestações clínicas principais: Leishmaniose cutânea (*Leishmania major*, *L. tropica*, *L. amazonensis*) e leishmaniose mucocutânea (*L. braziliensis*), que são caracterizadas por apresentarem infecções limitadas à derme, e leishmaniose visceral (ex.: *L. infantum* e *L. donovani*), também designada como calazar, que se distingue por acometer as vísceras do hospedeiro (GOTO; LINDOSO, 2012; HUSSAIN et al., 2014; REITHINGER et al., 2007).

Tais afecções são prevalentes em aproximadamente 88 países, afetam cerca de 12 milhões de indivíduos e apresentam a mortalidade anual em torno de 20 a 30 mil. Segundo dados, 90% dos casos de leishmaniose visceral concentram-se em apenas quatro países: Índia, Sudão, Brasil e Bangladesh. Assim como essa manifestação clínica, 90% das leishmanioses cutânea e mucocutânea também se concentram em alguns países nos quais, em ambos os casos, o Brasil está incluso (HUSSAIN et al., 2014; WHO, 2013).

O tratamento para leishmaniose se baseia principalmente na quimioterapia. Há décadas os compostos de antimônio têm sido utilizados para diversos fins terapêuticos, sendo apenas em 1912 que Gaspar de Oliveira Vianna descreveu a droga antimonial trivalente (SbIII) para o tratamento da leishmaniose. Devido a toxicidade apresentada por esse fármaco, em 1937 surgiram as drogas antimoniais pentavalentes (SbV). Desde então, essas têm sido utilizadas como primeira linha de tratamento, sendo os seus representantes o antimoniato de *N*-metilglucamina e o estibogliconato de sódio (GONTIJO; CARVALHO, 2003; HUSSAIN et al., 2013; RATH et al., 2003).

Entretanto, apesar da modificação molecular realizada, esses fármacos ainda apresentaram vários efeitos adversos, incluindo cardio, nefro e hepatotoxicidade. Além disso, outra problemática que envolve esses fármacos é a crescente resistência medicamentosa. Em meio a essas dificuldades encontradas com os compostos antimoniais, encontram-se como opções o uso de anfotericina B na sua forma lipossômica, pentamidina, paromomicina e miltefosine (GONTIJO; CARVALHO, 2003; HUSSAIN et al., 2013; RATH et al., 2003; SERAFIM, 2016).

No entanto, os tratamentos atuais para leishmaniose ainda se apresentam insatisfatórios devido a limitações encontradas no que se diz respeito a via de administração das drogas, alto custo da droga e toxicidade (FUERTES et al., 2008). Além disso, a precariedade em relação ao tratamento devido ao baixo potencial de lucro mostra-se como um impedimento para impulsionar as companhias a inserirem recursos suficientes para pesquisa, desenvolvimento e produção nessa área (DIMITRI, 2012; GARCIA et al., 2011).

A partir dessa premissa, torna-se necessário o desenvolvimento de novos fármacos antileishmania mais potentes e eficazes. Dentre os processos para obtenção de novas entidades

químicas, encontram-se as de estratégias de planejamento de fármacos baseando-se na química medicinal (KROGH, 2001).

Dentre os compostos de interesse para terapêutica encontram-se os heterocíclicos, em particular os compostos nitrogenados, que constituem 95% dos compostos encontrados na terapêutica (BARREIRO; FRAGA, 2015). Nesse contexto, encontram-se os compostos acridínicos como potenciais entidades químicas de interesse para obtenção de novos fármacos.

A acridina e seus derivados caracterizam-se como estruturas tricíclicas planares com um átomo de nitrogênio em seu anel central com propriedades de aceptor/doador de elétrons, fator que possibilita a interação com ácidos nucleicos de DNA e RNA, desempenhando mecanismo de ação farmacológico como intercalador (CHEN et al., 2014). Tal propriedade os caracteriza como agentes quimioterápicos com amplo espectro de atividade, apresentando propriedades antibacteriana, antitumoral, antimalárico, antiprotozoário, antifúngico, antitripanossômica e leishmanicida (BONSE et al., 1999; GIRAULT et al., 2000; KAYA; YILDIRIR; ÇELIK, 2015; SÁNCHEZ et al., 2006).

Portanto, esse artigo visa uma revisão sistemática através do levantamento bibliográfico de estudos envolvendo o uso de moléculas acridínicas como promissores agentes antileishmania.

2 METODOLOGIA

O seguinte artigo trata-se de uma revisão sistemática na qual adotou-se a medida de pesquisa sobre artigos com temas relacionados. As bases de dados eletrônicas utilizadas foram o Portal de Periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES), Science Direct, Scientific Electronic Library Online (SciELO), Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS) e Google Acadêmico. Foi dada preferência a revistas e jornais da área de química medicinal, tais como *European Journal of Medicinal Chemistry*, *Bioorganic*, *Journal of Medicinal Chemistry*, *Bioorganic&Medicinal Chemistry*, *Chemical Biology and Drug Design*.

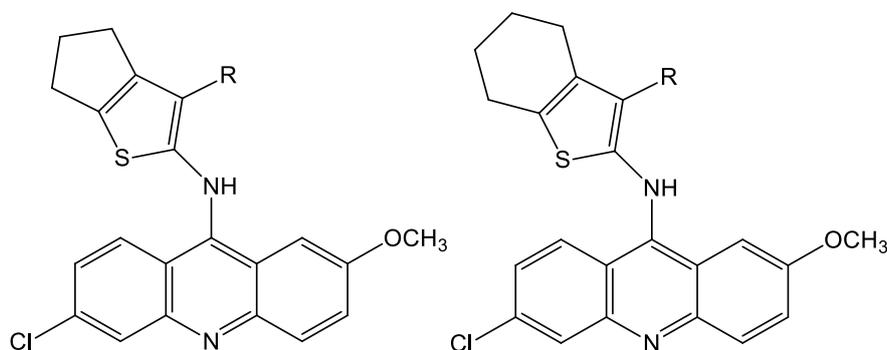
As pesquisas foram realizadas entre o período de 10 de março à 10 de abril de 2018, utilizando para busca as seguintes palavras chave: “*Leishmaniasis*”, “*Acridinic compounds*”, “*Antileishmania agents*”, “*Antipromastigote*”, “*Anti-amastigote*”, “*DNA intercalation*”, “*Citotoxicity*”.

Selecionaram-se os artigos que apresentaram melhor encaixe na linha de pesquisa, dando-se preferência aqueles nos idiomas inglês, português e espanhol.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Duas séries de novos derivados híbridos tiofênicos-acridínicos foram sintetizados e avaliados com atividade antileishmania por Serafim e colaboradores (2018) sobre cepas de *Leishmania amazonensis* em sua forma promastigota, bem como a atividade citotóxica em eritrócitos, seguido do esclarecimento do mecanismo de ação por meio de estudos de intercalação de DNA e estudo de *docking* molecular. Os resultados da atividade biológica mostraram uma boa atividade antileishmania dos compostos da série ACS, associado ao índice de hemólise $> 1000\mu\text{M}$, em especial os compostos ACS₀₁ e ACS₀₂ (Figura 1), cujo apresentaram resultados melhores do que os fármacos de controle positivo (antimonais tri e pentavalentes), com IC₅₀ de 9.60 ± 3.19 e $10.95\pm 3.96 \mu\text{M}$, respectivamente. Esses foram selecionados para avaliação da atividade em cepas resistentes de *L. amazonensis*, apresentando IC₅₀ de 14.83 ± 0.44 e $16.36\pm 1.72 \mu\text{M}$, comprovando a efetividade desses compostos sob cepas sensíveis e resistentes aos antimonais trivalentes.

Figura 1 – Derivados híbridos ACS₀₁ e ACS₀₂, respectivamente



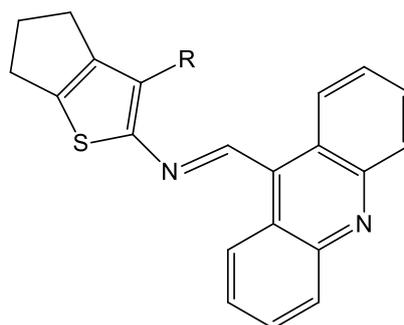
Fonte: Adaptado de Serafim et al. (2018).

Foi dada continuidade aos estudos com os dois derivados selecionados por meio da intercalação de DNA e de *docking* molecular sobre enzima piruvato quinase de *L. mexicana*. Os estudos comprovaram a intercalação de DNA como um mecanismo de ação desempenhado por essas moléculas ao resultar em $K_b = 10^4 \text{ M}^{-1}$. Além disso, o estudo de *docking* molecular evidenciou a interação da molécula com a enzima, principalmente entre os resíduos de aminoácido Asp 152 e o anel tiofênico, bem como uma correlação entre os valores de pIC₅₀ e a inibição da enzima em questão. Assim, tais resultados condizem com uma provável vantagem obtida através da hibridação molecular para se obter compostos mais potentes e seletivos, associado a expansão e

esclarecimento dos mecanismos de ação desempenhados. Para tal afirmação, seria necessário o fornecimento dos valores dos núcleos isolados frente ao alvo.

A série de compostos híbridos ACT, composta apenas pelo derivado ACT₀₁ (Figura 2), foi testada frente a cepa de *L. amazonensis*. Entretanto, essa apresentou uma perda de atividade ($IC_{50} > 500 \mu M$) e não foi utilizada para estudos posteriores.

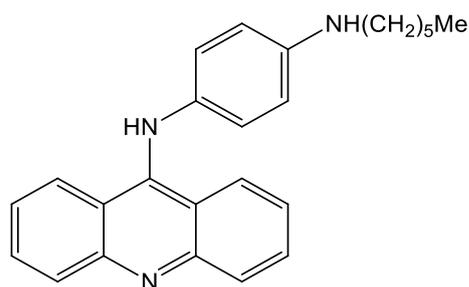
Figura 2 – Composto híbrido ACT₀₁



Fonte: Serafim et al. (2018).

Diversos compostos derivados das 9-anilinoacridinas são considerados clinicamente viáveis para o tratamento anticâncer e, por meio dessa premissa, Mauël e colaboradores (1993) realizaram o teste biológico da série 1'-substituídas-9-anilinoacridinas sobre cepas de *Leishmania major* em sua forma amastigota e promastigota, bem como testes de toxicidade em células Jurkat. Os resultados obtidos indicaram uma boa atividade antileishmania, onde os compostos, tais como os substituídos com 1'-NH-alquil, apresentaram uma inibição de crescimento superior a 80% sobre formas amastigotas em concentrações iguais ou inferiores a $1 \mu M$. Adicionalmente, observou-se que o composto 1'-hexilamino-9-anilinoacridina (Figura 3), apresentou baixa toxicidade ($IC_{50} = 17,0 \mu M$) em células Jurkat, enquanto que o mesmo desempenhou alta atividade inibitória apresentada sobre *L. major*. Tal fato sugere a existência de diferenças entre os alvos, tornando as moléculas viáveis para determinada terapêutica de acordo com os seus substituintes e sua seletividade.

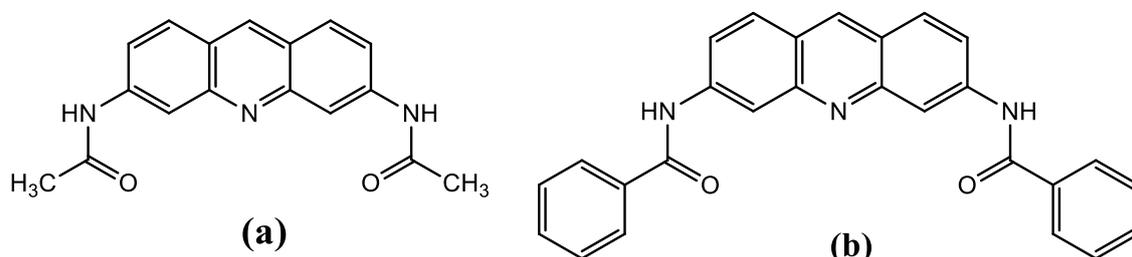
Figura 3 - 1'-hexilamino-9-anilinoacridina



Fonte: Mauël et al. (1993).

Duas novas séries de derivados diaminoacridínicos, inspiradas na proflavina e no N-(6-amino-3-acridinil), foram sintetizadas e avaliadas enquanto as suas atividades citotóxica e antileishmania por Di Giorgio e colaboradores (2007). Os compostos *N*-[6-(acetilamino)-3-acridinil]acetamida (Figura 4 a) e *N*-[6-(benzoamino)-3-acridinil]benzamida (Figura 4 b) apresentaram grande especificidade pelas células parasitárias de *Leishmania*, auxiliando no estabelecimento da relação estrutura-atividade (SAR), a qual concluiu que a presença dos seguintes grupos em acridinas 3,6-disubstituídas aumentam consideravelmente a especificidade da molécula para ação antileishmania, sugerindo que a simetria na conformação pode ser um fator interferente no metabolismo do parasito. Além disso, o estudo comprova que tais derivados acridínicos disubstituídos apresentam maior afinidade pelas espécies de leishmania em relação às células cancerígenas, que são mais atingidas por derivados diaminoacridínicos monosubstituídos. Assim, concluiu-se que a modificação molecular do composto modificou a seletividade do mesmo, aumentando sua ação antileishmania.

Figura 4 - Derivados diaminoacridínicos

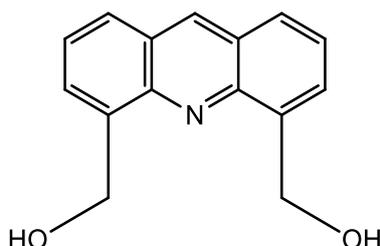


Fonte: Di Giorgio et al. (2007). (a) *N*-[6-(acetilamino)-3-acridinil]acetamida e (b) *N*-[6-(benzoamino)-3-acridinil]benzamida.

Pesquisas semelhantes foram realizadas por Carole e colaboradores (2005) por meio da avaliação *in vitro* da ação de derivados acridínicos mono e disubstituídos frente a células

parasitárias de *Leishmania* e células cancerígenas. As melhores ações leishmanicida em associação a uma baixa ação citotóxica foram desempenhadas pelos compostos 4,5-disubstituídos (Figura 5), enquanto que os compostos monosubstituídos na posição 4 apresentaram baixa atividade leishmanicida, fator que corrobora com as conclusões obtidas nos demais estudos.

Figura 5 -4,5-di(hidroximetil)acridina

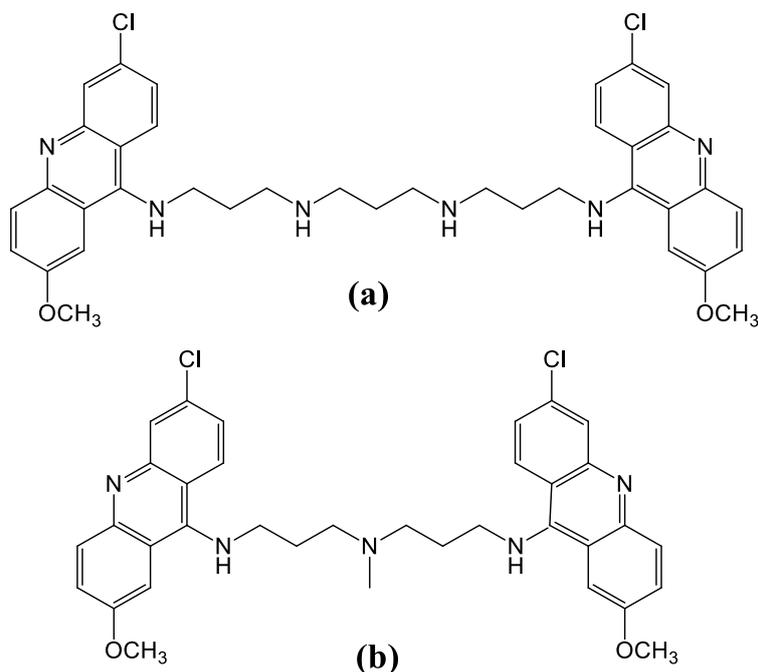


Fonte: Carole et al. (2005). Derivado B'52 da série acridínica, o qual desempenhou notável atividade antiparasitária contra formas amastigotas de *Leishmania* ($IC_{50} = 0,6 \mu M$), apresentando um índice de seletividade acima de 200%.

Caffrey e colaboradores (2007) realizaram a avaliação da atividade antiparasitária e citotóxica de derivados bis-acridina, no qual foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania donovani* e formas amastigotas de *Leishmania major* como parte do estudo. A fase dos estudos envolvendo a formas parasitárias de *L. donovani* consistiu na avaliação de 18 compostos dessa série em conjunto com os controles positivos, K11777 e anfotericina B. Os resultados mostraram altas porcentagens de morte dos parasitas numa concentração de $10 \mu M$, sendo esses próximos ao controle positivo, anfotericina B, cujo apresentou 100% de morte do parasita na mesma concentração. Porcentagens abaixo de 50% foram encontradas apenas para os compostos 1, 9, 11, 12, 13 e 18.

Os estudos envolvendo as cepas amastigotas de *L. major* resultaram num alto índice de toxicidade aos macrófagos, sendo o composto 5 ($EC_{50} = 3.00 \pm 0.30 \mu M$) (Figura 6 a) e 7 ($6.00 \pm 2.21 \mu M$) (Figura 6 b) os únicos a não apresentarem citotoxicidade em concentrações abaixo de $10 \mu M$.

Figura 6 – Derivados bis-acridínicos



Fonte: Adaptado de Caffrey et al. (2007). (a) Composto 5 e (b) Composto 7.

4 CONCLUSÃO

A precariedade no que se diz respeito ao desenvolvimento de novos fármacos para doenças negligenciadas é um grande limitante para obtenção de fármacos mais potentes e menos tóxicos para o tratamento da leishmaniose. Nesse sentido, esse trabalho objetivou um levantamento bibliográfico de artigos envolvendo a avaliação de derivados acridínicos, potentes agentes quimioterápicos, com atividade antileishmania. Os estudos em questão envolveram a avaliação desses compostos por meio de atividades *in vitro* antipromastigota e/ou anti-amastigota, bem como a mensuração da seletividade desses para as células parasitárias. Esses mostraram a potencialidade e seletividade dos derivados acridínicos a partir dos resultados dos estudos *in vitro* e estudos de relação estrutura-atividade, obtendo-se valores de IC₅₀ comparáveis ou superiores a fármacos de referência utilizados como controles positivos. Nesse sentido, os resultados obtidos por meio da pesquisa bibliográfica em questão evidenciaram a viabilidade dos derivados acridínicos como potenciais agentes antileishmania, sendo relevante o desenvolvimento de estudos mais extensos, tais como testes *in vivo*, para melhor esclarecimento da ação dessas moléculas.

REFERÊNCIAS

- BARREIRO, E. J. A.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 608 p. 2015.
- BONSE, S., SANTELLI-ROUVIER, C., BARBE, J., KRAUTH-SIEGEL, R.L. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase by acridines: kinetic studies and structure activity relationships. **J. MedChem.**, v. 42, p. 5448-5454, 1999.
- CAFFREY, C. R.; STEVERDING, D.; SWENERTON, R. K.; KELLY, B.; WALSH, D.; DEBNATH, A.; ZHOU, Y. M.; DOYLE, P. S.; FAFARMAN, A. T.; ZORN, J. A.; LAND, K. M.; BEAUCHENE, J.; SCHREIBER, K.; MOLL, H.; PONTE-SUCRE, A.; SCHIRMEISTER, T.; SARAVANAMUTHU, A.; FAIRLAMB, A. H.; COHEN, F. E.; MCKERROW, J. H.; WEISMAN, J. L.; MAY, B. C. H. Bis-acridines as lead antiparasitic agents: structure-activity analysis of a discrete compound library *in vitro*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 6, p. 2164-2172, 2007.
- CAROLE, D. G. et al. Synthesis and antileishmanial activities of 4, 5-di-substituted acridines as compared to their 4-mono-substituted homologues. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 13, n. 19, p. 5560-5568, 2005.
- CHEN, X.; ZHANG, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, J.; CHEN, J.; LI, M.; CAO, W.; CHEN, J. Synthesis and Characterization of Oxadisilole-Fused 9-Aminoacridines and 12-Aminobenzo[*b*]acridines. **European Journal of Organic Chemistry**, p. 4170-4178, 2014.
- DI GIORGIO, C. et al. Synthesis and antileishmanial activity of 6-mono-substituted and 3, 6-di-substituted acridines obtained by acylation of proflavine. **European journal of medicinal chemistry**, v. 42, n. 10, p. 1277-1284, 2007.
- DIMITRI, N. R&D Incentives for Neglected Diseases. **Plos One**, v. 7, n. 12, 2012.
- FUERTES, M. A.; PEREZ, J. M.; NGUEWA, P. A.; CASTILLA, J.; ALONSO, C. Anticancer compounds as leishmanicidal drugs: challenges in chemotherapy and future perspectives. **Current medicinal chemistry**, v. 15, n. 5, p. 433-439, 2008.
- GARCIA, L. P.; MAGALHÃES, L. C. G.; ÁUREA, A. P. et al. Epidemiologia das doenças negligenciadas no Brasil e gastos federais com medicamentos. **Texto para discussão**, Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, Brasília, 2011.
- GIRAULT, S.; GRELLIER, P.; BERECIBAR, A.; MAES, L.; MOURAY, E.; LEMIÈRE, P.; DEBREU, M. A.; DAVIOUD-CHARVET, E.; SERGHERAERT, C. Antimalarial, Antitrypanosomal, and Antileishmanial Activities and Cytotoxicity of Bis (9-amino-6-chloro-2-methoxyacridines): Influence of the Linker#. **Journal of medicinal chemistry**, v. 43, n. 14, p. 2646-2654, 2000.
- GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, v. 1, p. 71-80, 2003.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Infectious disease clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 293-307, 2012.

HUSSAIN, H.; AL-HARRASI, A.; AL-RAWAHI, A.; GREEN, I. R.; GIBBONS, S. Fruitful decade for antileishmanial compounds from 2002 to late 2011. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 20, p. 10369-10428, 2014.

KAYA, M.; YILDIRIR, Y.; ÇELIK, G. Synthesis, Characterization, and *In Vitro* Antimicrobial and Antifungal Activity of Novel Acridines. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 48, n. 11, p. 724-728, 2015.

KROGH, R. **Identificação Química e Estudos Farmacológicos dos Constituintes da Espécie *Ipomoea pes-capre* (Convolvulaceae)**. 2001. 173 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2001.

MAUËL, J.; DENNY, W.; GAMAGE, S.; RANSIJN, A.; WOJCIK, S.; FIGGITT, D.; RALPH, R. 9-Anilinoacridines as potential antileishmanial agents. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 37, n. 5, p. 991-996, 1993.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; DE JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C.; Tempone, A. G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química nova**, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 7, n. 9, p. 581–596, 2007.

SÁNCHEZ, I.; RECHES, R.; CAIGNARD, D. H.; RENARD, P.; PUJOL, M. D.. Synthesis and biological evaluation of modified acridines: The effect of N-and O-substituent in the nitrogenated ring on antitumor activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 3, p. 340-352, 2006.

SEFARIM, V. L. **Síntese e Avaliação Anti-Leishmania de Novos Derivados Híbridos Tiofênicos-Acridínicos**. 2016. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, 2016.

SERAFIM, V. L.; FÉLIX, M. B.; SILVA, D. K. F.; RODRIGUES, K. A. F.; ANDRADE, P. N.; DE ALMEIDA, S. M. V.; SANTOS, S. A. ; DE OLIVEIRA, J. F.; DE LIMA, M. C. A.; MENDONÇA-JUNIOR, F. J. B.; SCOTTI, M. T.; DE OLIVEIRA, M. R.; DE MOURA, R. O. New Thiophene-Acridine Compounds: Synthesis, Antileishmanial Activity, DNA Binding, Chemometric and Molecular Docking Studies. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 1, p. 1-15, 2018.

WHO. World Health Organization. 2013. *Leishmaniasis: Burden and distribution*. Disponível em: < <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> >. Acesso em: 02 de Mar. 2018.