

Avaliação *In Vitro* da Atividade Antimicrobiana dos Componentes de um Enxaguatório Bucal contendo Malva

In vitro Antimicrobial Activity of the Components of a Mouthwash Containing *Malva sylvestris*

Maurício José Santos MOREIRA¹, Maria Beatriz Cardoso FERREIRA², Lina Naomi HASHIZUME³

¹Mestrando em Clínica Odontológica pelo Programa de Pós Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FO/UFRGS), Porto Alegre/RS, Brasil.

²Professora Associada Doutora do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre/RS, Brasil.

³Professora Associada Doutora do Departamento de Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre/RS, Brasil.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos componentes (tirotricina, quinosol e tintura de malva) de um enxaguatório bucal contendo malva (Malvatricin[®]) sobre *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* spp. e um pool de micro-organismos da cavidade bucal.

Método: Para a verificação do potencial antimicrobiano do enxaguatório bucal contendo malva (Malvatricin[®]) e de seus diferentes componentes, a metodologia utilizada foi a da difusão em ágar-cilindro em placas. Utilizaram-se dez placas com ágar Brain Heart Infusion para cada micro-organismo e foram testadas as seguintes soluções: Malvatricin[®], tirotricina, quinosol e tintura de malva. Como controle positivo foi utilizada uma solução de clorexidina 0,12%. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C em anaerobiose. Após 24 horas, mensuraram-se os diâmetros das zonas de inibição. Utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas, quando indicado, para comparar o efeito de cada substância sobre os micro-organismos testados. O nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados: Sobre *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* e um pool de micro-organismos da cavidade bucal, Malvatricin[®] apresentou valores de medianas 23,47; 8,61 e 11,23, respectivamente. O quinosol apresentou resultado semelhante ao de Malvatricin[®], mostrando-se efetivo para inibir o crescimento microbiano de todos os micro-organismos (27,17; 9,33; 12,53). A tirotricina (0; 5,66; 0) e a tintura de malva (0; 0; 4,29) apresentaram pouca ou nenhuma atividade antimicrobiana. A clorexidina apresentou as maiores zonas de inibição frente a todos os micro-organismos testados (30,06; 15,54; 20,89).

Conclusão: No modelo experimental proposto, o produto comercial Malvatricin[®] apresentou atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* spp. e sobre um pool de micro-organismos da cavidade bucal. Sugere-se que este efeito deve-se, principalmente, à ação da substância quinosol presente em sua composição.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the *in vitro* antimicrobial activity of the components (tyrothricin, hydroxyquinoline and *Malva sylvestris* tincture) of a mouthwash containing Malva sylvestris (Malvatricin[®]) against *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* spp. and a pool of oral microorganisms.

Method: In order to verify the antimicrobial potential of the Malva sylvestris-containing mouthwash (Malvatricin[®]) and its different components, was used the cylinder-agar diffusion plate methodology. Ten plates with Brain Heart Infusion agar were used for each microorganism and the following solutions were tested: Malvatricin[®], tyrothricin, hydroxyquinoline and Malva sylvestris tincture. The positive control was a 0.12% chlorhexidine solution. The plates were incubated for 24 hours at 37°C in anaerobiosis. After 24 hours, the diameters of bacterial growth inhibition zones were measured. The Kruskal-Wallis test and the multiple-comparisons test (when required) were used to compare the effect of each substance against the test microorganisms. The significance level was set at 5%.

Results: Malvatricin[®] presented medians of 23.47, 8.61 and 11.23, respectively, against *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* spp. and a pool of oral microorganisms. Hydroxyquinoline showed similar result to Malvatricin[®], being effective to inhibit the growth of all microorganisms (27.17, 9.33 and 12.53, respectively). Tyrothricin (0, 5.66, 0, respectively) and Malva sylvestris tincture (0, 0, 4.29, respectively) showed little or no antimicrobial activity. Chlorhexidine produced the largest inhibition zones against the tested microorganisms (30.06, 15.54, 20.89, respectively).

Conclusion: In the experimental model studied, the commercial product Malvatricin[®] showed antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* spp. and on a pool of microorganisms from the oral cavity. It is suggested that this effect is mainly related to the action of hydroxyquinoline present in its composition.

DESCRIPTORES

Antibacterianos; Antissépticos bucais; Fitoterapia; Malva; Tirotricina.

KEY-WORDS

Anti-bacterial agents; Mouthwashes; Phytotherapy; Malva; Tyrothricin.

INTRODUÇÃO

O biofilme dental é o principal fator etiológico da cárie e das doenças periodontais^{1,2}. Desta forma, o sucesso tanto da prevenção quanto da terapia destas doenças está diretamente relacionado ao controle do biofilme supragengival, realizado por meio de sua remoção mecânica durante a escovação dentária e o uso do fio dental. Entretanto, uma grande parcela dos indivíduos falha no controle mecânico do biofilme, visto a alta prevalência da gengivite em diferentes populações^{3,4}. Ainda que a prevalência da cárie dentária tenha diminuído nos últimos anos, esta continua sendo a maior responsável pela perda dentária na população brasileira⁵. Assim, o uso complementar de agentes químicos contidos em enxaguatórios bucais poderia ser uma forma de amenizar a deficiência mecânica, uma vez que requer um mínimo de adesão e habilidade do indivíduo para a sua utilização⁶.

A pesquisa por produtos de origem natural com ação farmacológica tem crescido nos últimos anos. Isto é decorrente da busca por medicamentos que tenham, além da atividade farmacológica, baixa toxicidade, biocompatibilidade e preço mais acessível. Diversos produtos de origem vegetal se mostram potencialmente interessantes no que se refere a sua atividade antimicrobiana⁷. Dentre estes, destaca-se a malva (*Malva sylvestris*). Muito utilizada pela medicina popular, à malva atribuem-se propriedades anti-inflamatórias, calmantes, expectorantes, emolientes e antimicrobianas. Além disso, pelo fato de dissolver mucosidades, também tem sido usada popularmente para tosses, enfermidades da garganta e do peito⁸. Paralelamente, outros autores relataram que a malva apresenta também mucilagem, taninos, óleos essenciais e flavonóides, substâncias estas que poderiam justificar eventual efeito antimicrobiano da malva⁹.

No mercado brasileiro é comercializado um enxaguatório bucal contendo malva (Malvatricin[®]) em sua formulação, dentre outros componentes. Este antisséptico tem como princípios ativos a tirotricina e o quinosol.

Embora a eficácia antimicrobiana de Malvatricin[®] já tenha sido relatada, tanto *in vitro*^{10,11}, quanto *in vivo*¹², os estudos não puderam distinguir a ação antibacteriana de cada componente específico da fórmula. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana do enxaguatório bucal Malvatricin[®] e de seus componentes (tirotricina, quinosol e tintura de malva) sobre *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* spp. e um pool de micro-organismos da cavidade bucal.

METODOLOGIA

Os micro-organismos utilizados neste estudo foram *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* spp. e um pool de micro-organismos da cavidade bucal. Os micro-

organismos eram provenientes de ensaios clínicos prévios realizados com saliva humana e se encontravam disponíveis no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O pool de micro-organismos era composto, na sua maioria, por bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, entre outras) e Gram-negativas (*Neisseria*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, entre outras).

Neste estudo foi avaliada uma solução antisséptica disponível comercialmente contendo malva em sua formulação (Malvatricin[®], Laboratório Daudt de Oliveira Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil), e os seus componentes isoladamente: tirotricina (Laboratório Sandoz, Cambé, PR, Brasil), quinosol (Laboratório Sigma Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) e tintura de malva (Farmácia Art & Pharma, Porto Alegre, RS, Brasil). Os componentes foram preparados em água destilada estéril e em concentrações idênticas às aquelas encontradas no produto comercial Malvatricin[®]. As concentrações utilizadas foram: tirotricina 0,1 mg/mL; quinosol 1 mg/mL; tintura de malva 0,005 mg/mL. Como controle positivo, foi utilizada uma solução de clorexidina 0,12% (PerioGard[®], Colgate-Palmolive, São Paulo, SP, Brasil).

Para a verificação do potencial antimicrobiano dos diferentes componentes do enxaguatório bucal contendo malva (Malvatricin[®]) a metodologia utilizada foi a da difusão em ágar-cilindro¹³.

A partir de uma cultura recente (24 horas), a concentração do inóculo foi padronizada em espectrofotômetro a 580 nm, comparando a sua turbidez com o padrão 0,5 da escala de Mc Farland. O resultado da absorbância ficou entre 0,08 e 0,10, o que equivale a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL¹⁴.

Foram preparadas dez placas de Petri com ágar Brain Heart Infusion (Himedia, Mumbai, Índia) para cada um dos micro-organismos a serem testados. O cálculo amostral baseou-se em dados de estudo semelhante¹⁵, considerando um erro alfa de 5% e um erro beta de 20%.

A partir dos diferentes inóculos padronizados, foram transferidos 100 µL destes para tubos de ensaio contendo 10 mL de ágar Brain Heart Infusion (BHI) fundido e resfriado. Depois de homogeneizado, o conteúdo do tubo de ensaio foi vertido na placa de Petri, técnica chamada *pour plate*. Com as duas camadas de meio uniformemente sobrepostas e já solidificadas, cinco cilindros metálicos, previamente lavados com água destilada e esterilizados foram dispostos sobre as placas de uma forma equidistante. Cada um dos cinco cilindros apresentava 10 mm de altura, 8 e 6 mm de diâmetros externo e interno, respectivamente,

No interior de cada cilindro, colocaram-se 40 µL de cada substância a ser testada: clorexidina, tirotricina, Malvatricin[®], quinosol e tintura de malva.

As placas foram mantidas por duas horas em temperatura ambiente para permitir a difusão dos agentes através do ágar. Após este período, retiraram-se os cilindros, e as placas de Petri foram incubadas a 37°C em anaerobiose¹³.

Após 24 horas, as placas foram retiradas da estufa bacteriológica e os diâmetros da zona de inibição mensurados por um único examinador, previamente treinado, com auxílio de um paquímetro digital (Digimes, São Paulo, SP, Brasil). Considerou-se a medida do diâmetro avaliado, em milímetros, como desfecho principal neste estudo.

Foi testada a normalidade da amostra por meio do teste de Shapiro-Wilk. Como foi observado que a distribuição dos dados diferia significativamente da distribuição normal ($p \leq 0,002$), a comparação entre os grupos foi feita por meio do teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis, quando indicado. O nível de significância foi de

5%. A análise estatística foi realizada com o auxílio do Software SPSS for Windows, versão 18.0 (Chicago, IL, EUA).

RESULTADOS

Os resultados obtidos expressos como medianas e percentis 25% e 75% dos diâmetros das zonas de inibição formadas após tratamento com as substâncias testadas (clorexidina, tirotricina, Malvatricin[®], quinosol e tintura de malva), estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1. Mediana e percentis 25% e 75% (mm) das zonas de inibição, para cada micro-organismo, de acordo com cada tratamento (n=10).

Micro-organismos	Tratamentos				
	Clorexidina	Tirotricina	Malvatricin [®]	Quinosol	Tintura de malva
<i>Streptococcus mutans</i>	30,06 ^a (29,32 / 30,60)	0,00 ^b (0,00 / 0,00)	23,47 ^{bc} (22,72 / 24,82)	27,17 ^{ac} (25,35 / 28,06)	0,00 ^b (0,00 / 0,00)
<i>Lactobacillus spp.</i>	15,54 ^a (14,51 / 15,98)	5,66 ^{bc} (5,445 / 6,22)	8,61 ^{ab} (7,46 / 9,14)	9,33 ^{ab} (8,23 / 9,65)	0,00 ^c (0,00 / 0,00)
Pool de micro-organismos	20,89 ^a (20,34 / 21,41)	0,00 ^c (0,00 / 2,43)	11,23 ^{bc} (11,06 / 11,56)	12,53 ^{ba} (11,85 / 14,55)	4,29 ^c (0,00 / 9,51)

Letras diferentes correspondem a diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos (teste de Kruskal-Wallis, $p \leq 0,05$, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis. Letras iguais correspondem à ausência de significância estatística (teste de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$).

DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o efeito antimicrobiano dos componentes de um enxaguatório bucal, contendo malva em sua formulação (Malvatricin[®]) sobre os principais micro-organismos associados à cárie dental (*Streptococcus mutans* e *Lactobacillus spp.*). Além disso, avaliou-se seu efeito sobre um pool de micro-organismos da cavidade bucal, pelo fato de este representar a microbiota salivar total do indivíduo.

A clorexidina demonstrou as maiores zonas de inibição frente a todos os micro-organismos testados. Este resultado concorda com outros estudos que avaliaram o efeito antimicrobiano de antissépticos¹⁶⁻¹⁸. A clorexidina é utilizada como controle positivo na maioria dos estudos sobre substâncias antimicrobianas bucais por ser considerada um agente químico substitutivo, e não apenas como coadjuvante ao controle mecânico do biofilme dental⁶.

No presente estudo, o quinosol demonstrou uma grande atividade antimicrobiana, semelhante, inclusive, à da clorexidina, sobre todos os micro-organismos testados. Têm sido atribuídas a esta substância ações antisséptica, antibacteriana, antifúngica e propriedades desodorantes¹⁹. Contudo, não foram encontrados na literatura estudos que relatem o efeito do quinosol sobre micro-organismos da cavidade bucal.

O produto comercial Malvatricin[®] apresentou

eficácia sobre todos os micro-organismos testados. Sobre *Streptococcus mutans* e pool de micro-organismos da cavidade bucal, Malvatricin[®] apresentou atividade antimicrobiana elevada, entretanto menor do que a observada com clorexidina. Já sobre *Lactobacillus spp.*, apresentou efeito semelhante ao da clorexidina. Dois estudos^{10,11} já haviam demonstrado a eficácia antibacteriana de Malvatricin[®]. Entretanto, cabe ressaltar que ambos os trabalhos não puderam distinguir a ação antibacteriana de cada componente específico na composição do produto comercial.

No presente estudo, a tirotricina foi capaz de inibir apenas o crescimento de *Lactobacillus spp.*, não apresentando efeito antimicrobiano frente ao *Streptococcus mutans* e ao pool de micro-organismos da cavidade bucal. Num estudo prévio, em que se avaliou a sensibilidade de *Lactobacillus* a diferentes antissépticos bucais²⁰, verificou-se que apenas 68,24% das cepas foram sensíveis a Malvatricin[®]. Isto se deve, provavelmente, à seletividade da tirotricina a bactérias gram-negativas, enquanto que os *Lactobacillus* são bactérias gram-positivas.

A tintura de malva, na concentração avaliada neste estudo, apresentou pouca ou nenhuma atividade antimicrobiana sobre os micro-organismos testados. A literatura se mostra controversa no que diz respeito ao efeito antimicrobiano da malva. Alguns estudos demonstraram que possui efeito antimicrobiano sobre *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Bacillus cereus*,

Staphylococcus aureus, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*^{21,22}. Outros autores²³, que avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana de substâncias naturais presentes nos dentífricos, encontraram em Malvatricin Anti-Placa® o maior efeito antibacteriano. Porém, atribuíram este resultado à presença de triclosan na formulação e não à ação da tintura de malva. Outro estudo *in vitro* também não demonstrou efeito antimicrobiano da tintura de malva, ao avaliá-la sobre *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*²⁴.

Os resultados do presente estudo sugerem que o produto comercial Malvatricin® apresenta atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* spp. e sobre um pool de micro-organismos da cavidade bucal, e este efeito provavelmente deva-se à ação da substância quinosol, presente em sua composição.

A técnica utilizada no presente estudo para verificação da atividade antimicrobiana dos componentes testados foi a da difusão em agar. Esta é uma técnica clássica e consagrada para avaliar *in vitro* o potencial antimicrobiano de agentes químicos^{15,17,23-25}. Entretanto a literatura relata que os microrganismos da cavidade bucal quando organizados em um biofilme, apresentam uma resistência maior aos antimicrobianos^{26,27}. Estudos estão sendo conduzidos testando estes mesmos componentes em modelos de biofilme dentário.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que o produto comercial Malvatricin® apresenta atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* spp. e sobre um pool de micro-organismos da cavidade bucal, e este efeito provavelmente deva-se à ação da substância quinosol, presente em sua composição.

REFERÊNCIAS

- Mariotti A. Doenças gengivais induzidas pela placa. In: Lindhe J, Lang NP, Karring T. Tratado de periodontia clínica e implantologia oral. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p.388-401.
- Marsh PD, Nyvad BA. Microbiota oral e biofilmes formados sobre os dentes. In: Fejerskov O, Kidd EAM. Cárie dentária. 1.ed. São Paulo: Santos, 2005. p.29-47.
- Chambrone L, Lima LAPA, Chambrone LA. Prevalência das doenças periodontais no Brasil: parte II:1993-2003. Odonto 2008; 16(31):69-6.
- Neves AM, Passos IA, Oliveira AFB. Estudo da prevalência e severidade de gengivite em população de baixo nível socioeconômico. Odontol Clín-Cient. 2010; 9(1):65-71.
- Brasil. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de Saúde Bucal. Primeiros resultados do Projeto S.B. Brasil são anunciados pelo Ministério da Saúde [serial on the Internet]. 2010 [cited 2011 Mar 15]. Available from: <http://www.sbbrazil2010.org>.
- Addy M, Moran J. Controle químico da placa supragengival. In: Lindhe J, Lang NP, Karring T. Tratado de periodontia clínica e implantologia oral. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p.706-736.
- Yanagida A, Kanda T, Tanabe M, Matsudaira F, Cordeiro JGO. Inhibitory effects of apple polyphenols and related compounds on cariogenic factors of *mutans streptococci*. J Agric Food Chem. 2000; 48(11):5666-71.
- Torres CRG, Kubo CH, Anido AA, Rodrigues JR. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na Odontologia. Rev Fac Odontol São José dos Campos. 2000; 3(2):43-52.
- Buffon MCM, Lima MLC, Galarda I, Cogo, L. Avaliação da eficácia dos extratos de *Malva sylvestris*, *Calêndula officinalis*, *Plantago major* e *Curcuma zedoarea* no controle do crescimento das bactérias da placa dentária. Estudo "in vitro". Rev Visão Acadêmica. 2000; 2(1):31-8.
- Monfrin R, Ribeiro MC. Avaliação in vitro de anti-sépticos bucais sobre a microbiota da saliva. Rev Assoc Paul Cir Dent. 2000; 54(5):400-7.
- Drumond MRS, Castro RD, Almeida RVD, Pereira MSV, Padilha WWN. Estudo comparativo in vitro da atividade antibacteriana de produtos fitoterápicos sobre bactérias cariogênicas. Pesq Bras Odontoped Clín Integ. 2004; 4(1):33-8.
- Weyne S. Avaliação clínica de dois enxaguatórios bucais: Malvatricin e Flogoral. Odontis. 2003; 3(8):3-4.
- Koo H, Gomes BPFA, Rosalen PL, Ambrosano GMB, Park YK, Cury JA. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. Arch Oral Biol. 2000; 45(2):141-8.
- United States Pharmacopeia Convention. The United States Pharmacopeia: the National Formulary. 22nd ed. Easton: USP, 1990. 2067p.
- Moreira ACA, Pereira MHQ, Porto MR, Rocha LAP da, Nascimento BC, Andrade PM. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de antissépticos bucais. Rev Ciênc Méd Biol. 2009; 8(2):153-61.
- Moreira ACA, Santos TAM, Carneiro MC, Porto MR. Atividade de um enxaguatório bucal com clorexidina a 0,12 por cento sobre a microbiota sacarolítica da saliva. Rev Ciênc Méd Biol. 2008; 7(3):260-72.
- Simões RCS, Merlini SP, Silva RPR, Bastos RS, Torres SA, Bastos JRM. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de enxaguatórios bucais. Rev bras odontol. 2011; 68(1):91-4.
- Silva FIP, Alves RA. A eficácia de três enxaguatórios bucais sobre a placa bacteriana: estudo comparativo. Rev ABO nac. 2000; 8(5):307-11.
- Sweetman S. Martindale: the complete drug reference. London: Pharmaceutical Press; Greenwood Village, Co.: Thomson Healthcare, [serial on the Internet]. 2010 [cited 2010 Sep 06]. Available from: <http://www.thomsonhc.com/home/dispatch>.
- Baccarelli JC, Ribeiro MC. Sensibilidade dos *Lactobacillus* a anti-sépticos bucais. Rev Ciênc Méd. 2000; 9(3):99-104.
- Souza GC, Haas APS, Poser GL von, Schapoval EES, Elisabetsky E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. J Ethnopharmacol. 2004; 90(1):135-43.
- Oliveira FQ, Gobira B, Guimarães C, Batista J, Barreto M, Souza M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. Rev Bras J Pharmacogn. 2007; 17(3):466-76.
- Ditterich RG, Romanelli MCMOV, Rastelli MC, Portero PP, Santos EB. Atividade antimicrobiana in vitro de substâncias naturais presentes nos dentífricos. Odontol Clín-Cient. 2007; 6(4):303-7.

24. Gebara ECE. Estudo in vitro da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*. Rev Odontol Univ São Paulo. 1996; 10(4):251-6.
25. Esmerino LA, Pereira AV, Adamowicz T, Borges DM, Talacimon EA, Schelesky ME. Método microbiológico para determinação da potência de antimicrobianos. UEPG Ci Biol Saúde. 2004; 10(1):53-60.
26. Marsh PD. Controlling the oral biofilm with antimicrobials. J Dent. 2010; 38(Suppl 1): S11-5.
27. Marsh PD. Contemporary perspective on plaque control. Br Dent J. 2012; 22(12):601-6.

Recebido/Received: 13/10/2011

Revisado/Reviewed: 03/08/2012

Aprovado/Approved: 31/10/2012

Correspondência:

Lina Naomi Hashizume
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Odontologia
Departamento de Odontologia Preventiva e Social.
Rua Ramiro Barcelos, 2492 - Bom Fim
Porto Alegre – Rio Grande do Sul - Brasil
CEP: 90.035-003
Tel.: (51) 33165348
E-mail: lhashizume@yahoo.com