

Nota Científica

Superparasitismo de *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) y comportamiento de defensa de dos hospederos

Superparasitism by *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) and defense behaviors of two hosts

MARCUS ALVARENGA SOARES¹, CAROLINA TORRES GUTIERREZ^{2*}, JOSÉ COLAZANUNCI³,
ALINE RODRIGUES PORTO PEDROSA⁴ y ALEXANDRE SIMÕES LORENZON⁵

Resumen: Varias familias de parasitoides son capaces de discriminar entre los hospederos parasitados y no-parasitados. Sin embargo, algunos casos de superparasitismo pueden ocurrir en especies de Eulophidae. El objetivo del presente estudio fue investigar si hembras de *Palmistichus elaeisis* (Eulophidae) superparasitan pupas de *Thyriniteina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae) y de *Hylesia* sp. (Lepidoptera: Saturniidae) en laboratorio, describiendo mecanismos de defensa de dichos hospederos. El experimento se realizó en el insectario de la Universidade Federal de Viçosa, Brazil. Se utilizaron cajas de Petri como cámaras de oviposición, conteniendo dos pupas de *T. arnobia*, una de ellas parasitada por *P. elaeisis* y otra sin parasitar. De igual forma se mantuvieron cajas de Petri con dos pupas de *Hylesia* sp. Para los dos tratamientos, se liberaron diez hembras de *P. elaeisis* en la parte central de cada caja de Petri, el cuál constó una repetición. Se usó un total de ocho repeticiones por cada tratamiento. Se observó la preferencia de oviposición de *P. elaeisis* sobre las pupas hospederas durante seis horas y se analizaron mediante la prueba de chi-cuadrado (X^2) ($P \leq 0,01$). Observando el comportamiento de defensa de los hospederos, las pupas de *T. arnobia* presentaron movimientos giratorios, lo que indujo el superparasitismo en las pupas de menor movilidad. Los individuos de *Hylesia* sp. no presentaron comportamiento de defensa, y en este caso la discriminación llegó a una preferencia clara para las pupas no parasitadas.

Palabras clave: Defoliadores. Discriminación. *Eucalyptus*. Parasitoides. Pupas.

Abstract: Several families of parasitoids are capable of discriminating among parasitized and unparasitized hosts. However, some cases of superparasitism have been recorded in species of Eulophidae. The objective of this study was to investigate whether females of *Palmistichus elaeisis* (Eulophidae) superparasitize pupae of *Thyriniteina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae) and *Hylesia* sp. (Lepidoptera: Saturniidae) in the laboratory and to describe the defense mechanisms of those hosts. The experiment was done in the insectary of the Universidade Federal de Viçosa, Brazil. Petri dishes were used as oviposition chambers and contained two *T. arnobia* pupae, one of them parasitized by *P. elaeisis* and the other not. The pupae were placed on each side of the dish. Petri dishes were likewise set up with two pupae of *Hylesia* sp. For both treatments, ten females of *P. elaeisis* were released in the center of the dish, which represented a replicate. A total of eight replicates were used for each treatment. The oviposition preference of *P. elaeisis* on host pupae was observed for six hours and analyzed using the chi-square test (X^2) ($P \leq 0.01$). In observing the defense behavior of the hosts, *T. arnobia* pupae showed spinning movements which in turn induced superparasitism in less mobile pupae. Individuals of *Hylesia* sp. did not show any defense behavior and in this case the discrimination led to a clear choice for the unparasitized pupae.

Key words: Defoliators. Discrimination. *Eucalyptus*. Parasitoids. Pupae.

Introducción

Las especies de eucalipto han sido utilizadas en Brasil, en grandes áreas de reforestación, que incrementan la vulnerabilidad de las plantas a insectos plaga (Soares *et al.* 2007). *Thyriniteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) ha sido muy estudiada, considerándose la principal oruga defoliadora de eucalipto en el Brasil (Oliveira *et al.* 2005). Por otro lado, especies del género *Hylesia* también han sido registradas en cultivos de eucalipto, con un alto número de individuos voraces (Draudt 1929). El parasitoide *Palmistichus*

elaieisis Delvare y LaSalle, 1993 (Hymenoptera: Eulophidae) se destaca por ser enemigo natural de diversos lepidópteros plaga de especies forestales (Bittencourt y Berti Filho 1999), pudiendo parasitar pupas de *T. arnobia* y de especies del género *Hylesia*.

La mayoría de parasitoides son capaces de reconocer los hospederos parasitados por ellos mismos o por coespecíficos, una habilidad llamada “discriminación de hospedero” (van Alphen y Visser 1990; Nufio y Papaj 2001). Sin embargo, algunos parasitoides pueden ovipositar en hospederos previamen-

¹ Estudiante de Doctorado, Curso de Entomología. Agrónomo, M. Sc. Universidade Federal de Viçosa, UFV. Avenida Peter Henry Rolfs, s/n Campus Universitario 36570-000, Viçosa - MG, Brasil. marcusasoares@yahoo.com.br.

² Autor para correspondencia: Investigadora Línea Entomología Médica, Bióloga, M. Sc. Programa Estudio y Control de Enfermedades Tropicales - PECET. Universidad de Antioquia. Carrera 53 No. 61-30. Torre 2. Laboratorio 632. Sede de Investigación Universitaria, Medellín, Colombia. carolina.torres@siu.udea.edu.co.

³ Profesor titular, Curso de Entomología. Ing. Forestal, Ph. D. Universidade Federal de Viçosa, UFV. Avenida Peter Henry Rolfs, s/n Campus Universitario 36570-000, Viçosa - MG, Brasil. zanuncio@ufv.br.

⁴ Estudiante de Biología, Universidade Federal de Viçosa, UFV. Avenida Peter Henry Rolfs, s/n Campus Universitario 36570-000, Viçosa - MG, Brasil. aline_pedrosa@hotmail.com.

⁵ Estudiante de Ingeniería Forestal, Universidade Federal de Viçosa, UFV. Avenida Peter Henry Rolfs, s/n Campus Universitario 36570-000, Viçosa - MG, Brasil. alelorenzon@yahoo.com.br.

te parasitados, comportamiento llamado “superparasitismo” (Khafagi y Hegazi 2008). El superparasitismo fue tratado inicialmente como un error de algunos parasitoides, debido a que, aparentemente, el gasto de tiempo y huevos en un hospedero, donde la progenie tiene poca posibilidad de supervivencia, no sería una ventaja adaptativa. Por otra parte, un nuevo ataque recibido por el hospedero podría causarle grave daño y llevarlo a la muerte (Godfray 1994). No obstante, algunos registros han abordado el superparasitismo como una estrategia adaptativa de los parasitoides que, en algunas situaciones, puede ser benéfica (van Alphen y Visser 1990). Este fenómeno ha sido observado cuando los hospederos son escasos y cuando la prole de un segundo parasitoide no es fuertemente afectada ante la competencia por recursos, con la prole del primer parasitoide (van Alphen y Visser 1990).

Algunas especies de lepidópteros poseen mecanismos morfológicos o comportamentales capaces de conferirles protección contra la localización y ataque por parasitoides (Potting *et al.* 1999). Sin embargo, muchos parasitoides modifican el comportamiento o reducen los movimientos de sus hospederos (Infante *et al.* 1994; Grosman *et al.* 2008) y esto podría facilitar la ocurrencia de superparasitismo. En este estudio se investigó si hembras de *P. elaeisis* superparasitan pupas hospederas de *Thyrintina arnobia* e *Hylesia* sp. en laboratorio, además de describir los posibles mecanismos de defensa de pupas previamente parasitadas y sin parasitar, contra dichos enemigos naturales.

Materiales y Métodos

El experimento se realizó en el laboratorio de Control Biológico de Insectos, del Departamento de Biología animal de la Universidad Federal de Viçosa (UFV), en Minas Gerais, Brasil. Las especies de lepidópteros utilizadas en el experimento fueron criadas entre el período de agosto a octubre del 2007. El experimento fue realizado en el mes de octubre de 2007. Los adultos de *T. arnobia*, se obtuvieron de colecciones de campo en cultivos de eucalipto, en el estado de Minas Gerais. Estos adultos se mantuvieron en un cuarto climatizado bajo las siguientes condiciones: temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$, foto-período 12 horas y humedad relativa $70 \pm 10\%$. Los individuos de *T. arnobia* se separaron por parejas, colocándose en recipientes plásticos (500 ml) con tapa de abertura central cubierta por tela de malla fina. Al interior de los recipientes, se depositaron tiras de papel, adheridas a las tapas, para que en ellas se efectuara la oviposición. Los huevos de *T. arnobia* se colocaron en mangas entomológicas (0,70 x 0,40 m) de malla fina, envolviendo ramas de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. (Myrtaceae), en el área experimental del Insectario de la UFV. Cuando las orugas alcanzaron la fase de pupa, se retiraron de las mangas entomológicas, se colocaron en recipientes plásticos y se transfirieron para el laboratorio de Control Biológico de Insectos.

Los huevos de *Hylesia* sp. se colectaron en cultivos de eucalipto en el estado de Minas Gerais. Debido a la acción urticante de sus individuos, éstos fueron criados en recipientes plásticos (500 ml) en laboratorio, con temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, foto-período de 12 horas y humedad relativa de $70 \pm 10\%$. Después de la emergencia de las larvas, se suministraron diariamente hojas de *E. cloeziana*, sujetadas por tubos plásticos (2,5 ml - de anestésico odontológico) con agua destilada en su interior.

Ocho pupas de *T. arnobia* y ocho pupas de *Hylesia* sp., con menos de 24 horas de edad, se individualizaron en tubos

de vidrio (14 x 2,2 cm) y se expusieron al parasitismo por seis hembras de *P. elaeisis*, con 72 horas de emergencia y sin experiencia previa de oviposición. Las hembras estuvieron en contacto con los hospederos por 24 horas, a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, foto-período de 12 horas y humedad relativa de $70 \pm 10\%$, en incubadora. Al final de este período, las hembras de *P. elaeisis* se retiraron de los tubos y se sacrificaron (Pereira *et al.*, 2008). Una misma cantidad de pupas, de ambas especies, se mantuvo en recipientes plásticos, dentro de la incubadora, sin contacto con parasitoides.

Superparasitismo en pupas de *Thyrintina arnobia* e *Hylesia* sp. Las hembras de *P. elaeisis* se sometieron a dos tratamientos, en donde recibieron dos pupas de lepidópteros, una previamente parasitada (T1) y otra sin parasitar (T2). Se realizaron dos bioensayos, utilizando pupas de *T. arnobia* en el primero e *Hylesia* sp. en el segundo.

Para los bioensayos, se establecieron unidades experimentales o cámaras de oviposición, que consistieron en cajas de Petri (9,0 x 1,5 cm), conteniendo una pupa hospedera parasitada y una pupa sin parasitar, en sus lados opuestos. Las condiciones de dichas unidades experimentales se estandarizaron, estableciéndose la ubicación de las pupas dentro de las cajas de Petri y evitando que factores ambientales, como la luminosidad, interfirieran en la elección de los parasitoides (Jones *et al.* 2005). Posteriormente, en el centro de cada unidad experimental, se colocaron diez hembras de *P. elaeisis* con 72 horas de emergidas, fecundadas y alimentadas con miel. La variable analizada fue la preferencia de oviposición de hembras de *P. elaeisis* por pupas hospederas parasitadas y sin parasitar. El período de observación fue de seis horas, y en dicho tiempo, se contó el número de parasitoides ovipositando en cada pupa hospedera, en intervalos de ocho minutos. Para cada uno de los bioensayos, con *T. arnobia* y con *Hylesia* sp., se establecieron ocho unidades experimentales, cada una representando una repetición.

Se utilizó un diseño experimental aleatorio, incluyendo en el análisis solo las hembras que ovipositaron, y excluyendo aquellas que no ovipositaron en ninguno de los hospederos durante el período evaluado. La oviposición se determinó al observar la inserción del aparato ovipositor de la hembra de *P. elaeisis* en la superficie de la pupa hospedera y su permanencia en dicha posición por más de un minuto. El número máximo de parasitoides que ovipositó en cada pupa fue sumado, para el cálculo de la frecuencia de oviposición en las diferentes categorías de hospederos. Esta frecuencia se analizó por la prueba de Chi cuadrado (X^2) ($P \leq 0,01$) (Pearson 1904).

Comportamiento de defensa de pupas de *Thyrintina arnobia* e *Hylesia* sp. El comportamiento de defensa de las pupas de *T. arnobia* e *Hylesia* sp. previamente parasitadas y sin parasitar se observó cuando estos hospederos fueron expuestos a las hembras de *P. elaeisis* en las cámaras de oviposición por seis horas consecutivas.

Resultados y Discusión

Superparasitismo en pupas de *Thyrintina arnobia* e *Hylesia* sp. De las 160 hembras de *P. elaeisis* utilizadas en el experimento, 101 se utilizaron para el cálculo de la frecuencia de oviposición en las pupas hospederas. Las hembras de *P. elaeisis* que recibieron pupas de *T. arnobia* no presentaron preferencia de oviposición ($X^2 = 0,022$, $P \leq 0,01$, $n = 45$) (Fig.

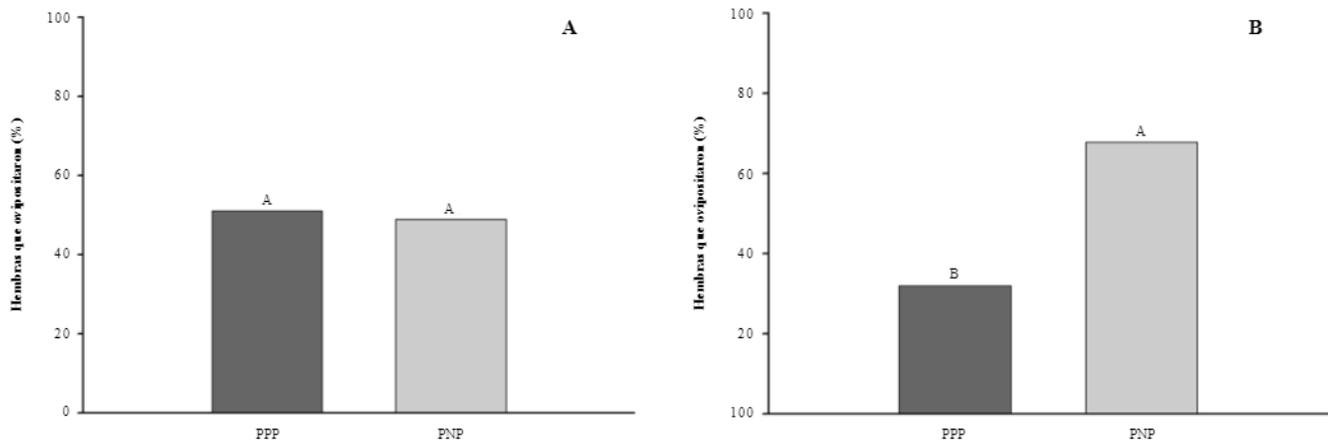


Figura 1. Porcentaje de hembras de *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) que ovipositaron en pupas hospedadoras. **A.** pupas de *Thyrinteina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae). **B.** pupas de *Hylesia sp.* (Lepidoptera: Saturniidae); PPP- pupas previamente parasitadas; PNP- pupas no parasitadas. Las barras seguidas por una misma letra no difieren entre sí por la prueba de Chi cuadrado ($P < 0,01$).

1A). Las hembras de *P. elaeisis* que recibieron pupas de *Hylesia sp.* mostraron preferencia por ovipositar sobre pupas no parasitadas ($X^2 = 7,14$, $P \leq 0,01$, $n = 56$) (Fig. 1B).

La ausencia de discriminación de pupas de *T. arnobia*, observada en el parasitoide, indica superparasitismo en dichos hospederos. En ciertas situaciones, el superparasitismo puede representar una estrategia adaptativa, y un ejemplo de esto es el caso de hembras de parasitoides que atacan hospederos recientemente parasitados, con defensas inmunológicas debilitadas, momento en el cual sus larvas podrán tener mayor probabilidad de supervivencia (Khafagi y Hegazi 2008). Así mismo, cuando la probabilidad de encontrar hospederos no parasitados en ambientes silvestres es baja, el superparasitismo permitiría que hembras de parasitoides dejaran descendientes, a pesar de la ausencia de hospederos adecuados (Godfray 1994). De esta forma, evitar el superparasitismo en algunas situaciones, puede no ser beneficioso para un parasitoide (van Alphen y Visser 1990). Esto explicaría las frecuentes observaciones de superparasitismo en especies de la familia Eulophidae documentadas en la literatura, con registros hechos en laboratorio o campo, para *Pediobius foveolatus* (Crawford) (Shepard y Gale 1977), *Hyssopus pallidus* (Askew, 1964) (Zaviezo y Mills 1999), *Melittobia australica* (Girault, 1912) (Abe et al. 2005) y *Phymastichus coffea* (LaSalle) (Hymenoptera: Eulophidae) (Castillo et al. 2004; Jaramillo et al. 2006).

Comportamiento de defensa de pupas de *Thyrinteina arnobia* e *Hylesia sp.*

Las pupas de *T. arnobia* no parasitadas, una vez expuestas a las hembras de *P. elaeisis*, presentaron fuertes movimientos giratorios. En este caso, las pupas giraban 360° sobre su propio eje, y se movían al interior de las cámaras de oviposición (Fig. 2A). Este comportamiento protegió a las pupas del parasitismo, debido a que expulsaban a las hembras de *P. elaeisis* de la región comprendida por los segmentos abdominales. En estas pupas, solo los parasitoides que intentaron ovipositar en la región de la cabeza obtuvieron éxito, por no entrar en contacto con la caja de Petri durante el movimiento giratorio de la pupa. Las pupas de *T. arnobia* previamente parasitadas, presentaron tan solo algunos movimientos suaves de los segmentos abdominales (Fig. 2B) o no presentaron ningún movimiento.

Las pupas de *Hylesia sp.*, no parasitadas, una vez expuestas a hembras de *P. elaeisis* presentaron movimientos suaves en los segmentos abdominales o se contraían generando un pequeño movimiento al interior de la cámara de oviposición (Fig. 2C). Las pupas parasitadas de este género presentaron movimientos leves de los segmentos abdominales (Fig. 2B), o no registraron movimientos. La elección de *P. elaeisis* por pupas de *T. arnobia*, previamente parasitadas, puede ser influenciada por la presencia de mecanismos de defensa en las pupas hospedadoras no parasitadas. Las pupas de algunas especies de lepidópteros, incorporaron algunos sistemas de defensa, incluyendo una cutícula dura, movimientos giratorios (Cole 1959) y fuertes contracciones de la región abdominal

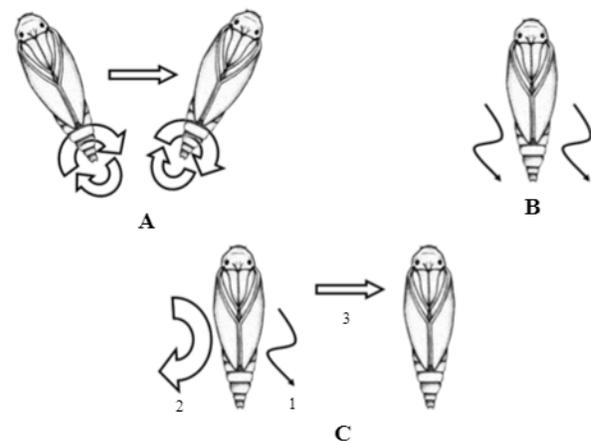


Figura 2. Esquema de movimientos de defensa observados en pupas de *Thyrinteina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae) e *Hylesia sp.* (Lepidoptera: Saturniidae). **A.** Movimientos giratorios, exclusivos de pupas de *T. arnobia* no parasitadas: las pupas giran 360° en torno de su propio eje y se mueven activamente al interior de la cámara de oviposición. **B.** Suaves movimientos de los segmentos abdominales, movimiento presentado por ambas especies. **C.** Movimiento exclusivo de pupas de *Hylesia sp.*, no parasitadas, compuesto por tres etapas: 1. Suaves movimientos de los segmentos abdominales, 2. Contracción de la pupa, 3. Leve movimiento de la pupa al interior de la cámara de oviposición.

(Gross 1993). De forma semejante, el movimiento giratorio desarrollado por las pupas de *T. arnobia* no parasitadas, evitó el ataque de muchos parasitoides. Por otro lado, las pupas de *T. arnobia* parasitadas no presentaron movimiento giratorio, mostrando que sus reflejos estaban reducidos (Infante *et al.* 1994). La ausencia de movimiento probablemente favorece el superparasitismo del hospedero, dado que representa una presa fácil para el ataque de enemigos naturales. Las pupas de *Hylesia* sp. presentaron menor capacidad de movimiento al compararlas con las pupas de *T. arnobia* y en este caso, tan solo la discriminación de hospederos influyó en la elección de las hembras de *P. elaeisis*, explicando así la fuerte preferencia de estos parasitoides por las pupas no parasitadas. Los resultados del presente estudio señalan los mecanismos de defensa de pupas no parasitadas, como uno de los factores que influyen en el superparasitismo de *T. arnobia* y sugieren la capacidad de las hembras de *P. elaeisis* de discriminar pupas hospederas de *Hylesia* sp.

Agradecimientos

A Elizabeth C. Pedroso por las ilustraciones. Al Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (CNPq) (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)), por las becas y auxilios económicos concedidos.

Literatura citada

- ABE, J.; KAMIMURA, Y.; SHIMADA, M. 2005. Individual sex ratios and offspring emergence patterns in a parasitoid wasp, *Melittobia australica* (Eulophidae), with superparasitism and lethal combat among sons. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 57: 366-373.
- BITTENCOURT M. A. L.; BERTI FILHO, E. 1999. Preferência de *Palmistichus elaeisis* por pupas de diferentes lepidópteros praga. *Scientia Agricola* 56: 1281-1283.
- CASTILLO, A.; INFANTE, F.; VERA-GRAZIANO, J.; TRUJILLO, J. 2004. Hostdiscrimination by *Phymastichus coffea*, a parasitoid of the coffee berry borer. *BioControl* 49: 655-663.
- COLE, L. R. 1959. On the defenses of lepidopterous pupae in relation to the oviposition behavior of certain Ichneumonidae. *Journal of the Lepidopterists Society* 13: 1-10.
- DRAUDT, M. 1929. Familie Saturniidae, pp. 713-827. En: Seitz, A. (Ed.). *Die Gross-Schmetterlinge der Erde*. 6. Die Amerikanischen Spinner und Schwärmer. Stuttgart, Alfred Kernen, 508 p.
- GODFRAY, H. C. J. 1994. Parasitoids, behavioral and evolutionary ecology. Princeton: Princeton University Press, 473 p.
- GROSMAN, A. H.; JANSSEN, A.; DE BRITO, E. F.; CORDEIRO, E. G.; COLARES, F.; FONSECA, J. O.; LIMA, E.; PALLINE, A.; SABELIS, M. W. 2008. Parasitoid increases survival of its pupae by inducing hosts to fight predators. *PLoS ONE* 3: e2276.
- GROSS, P. 1993. Insect behavioral and morphological defenses against parasitoids. *Annual Review of Entomology* 38: 251-273.
- INFANTE, F.; MURPHY, S. T.; BARRERA, J. F.; GÓMEZ, J. W.; DAMON, A. 1994. Cría de *Phymastichus coffea* parasitoid de la broca del café y algunas notas sobre su historia de vida. *Southwestern Entomologist* 19: 313-315.
- JARAMILLO, J.; BORGEMEISTER, C.; SETAMOU, M. 2006. Field superparasitism by *Phymastichus coffea*, a parasitoid of adult coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 119: 231-237.
- JONES, G. A.; SIEVING, K. E.; AVERY, M. L.; MEAGHER, R. L. 2005. Parasitized and non-parasitized prey selectivity by an insectivorous bird. *Crop Protection* 24: 185-189.
- KHAFAGI, W. E.; HEGAZI, E. M. 2008. Does superparasitism improve host suitability for parasitoid development? A case study in the *Microplitis rufiventris* - *Spodoptera littoralis* system. *BioControl* 53: 427-438.
- NUFIO, C. R.; PAPA, D. R. 2001. Host marking behavior in phytophagous insects and parasitoids. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 99: 273-293.
- OLIVEIRA, H. N.; ZANUNCIO, J. C.; PEDRUZZI, E. P.; ESPINDULA, M. C. 2005. Rearing of *Thyrintina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae) on guava and eucalyptus in laboratory. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48: 801-806.
- PEARSON, K. 1904. On the theory of contingency tables and its relation to association and normal correlation. *Draper's Co. Res.*, pp. 443-475. En: *Mem. Biometric Ser. 1*. Reprinted (1948) in *Karl Pearson's Early Papers*, Cambridge University Press.
- PEREIRA, F. F.; ZANUNCIO, T. V.; ZANUNCIO, J. C.; PRATISSOLI, D.; TAVARES, M. T. 2008. Species of Lepidoptera defoliators of *Eucalyptus* as new host for the parasitoid *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 51: 259-262.
- POTTING, R. P. J.; VERMEULEN, N. E.; COLONG, D. E. 1999. Active defense of herbivorous hosts against parasitism: Adult parasitoid mortality risk involved in attacking a concealed stem boring host. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 91: 143-148.
- SHEPARD, M.; GALE, G. T. 1977. Superparasitism of *Epilachna varivestis* [Col.: Coccinellidae] by *Pediobius foveolatus* [Hym.: Eulophidae]: influence of temperature and parasitoid-host ratio. *Entomophaga* 22: 315-321.
- SOARES, M. A.; LEITE, G. L. D.; ZANUNCIO, J. C.; ROCHA, S. L.; DE SÁ, V. G. M.; SERRÃO, J. E. 2007. Flight capacity, parasitism and emergence of five *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) species from forest areas in Brazil. *Phytoparasitica* 35: 314-318.
- VAN ALPHEN, J. J. M.; VISSER, M. E. 1990. Superparasitism as an adaptive strategy for insect parasitoids. *Annual Review of Entomology* 35: 59-79.
- ZAVIEZO, T.; MILLS, N. 1999. Aspects of the biology of *Hyssopus pallidus* (Hymenoptera: Eulophidae), a parasitoid of the codling moth (Lepidoptera: Olethreutidae). *Environmental Entomology* 28: 748-754.

Recibido: 26-abr-2008 • Aceptado: 12-feb-2009