

## Caracterização Molecular de Microrganismos do Ecossistema Agrícola do Cerrado

### III – *Acremonium strictum*

José Edson Fontes Figueiredo<sup>1</sup>  
Henrique Cestari De Paoli<sup>2</sup>  
Vinícios Tadeu da Silva Coelho<sup>2</sup>  
Nicésio F. J. de A. Pinto<sup>3</sup>  
Fernando Tavares Fernandes<sup>3</sup>  
Wellington Bressan<sup>3</sup>  
Claudia Teixeira Guimarães<sup>3</sup>  
Eliane Aparecida Gomes<sup>3</sup>

#### Palavras-chave

SDS-AGE, RAPD, rDNA, seqüenciamento, murcha do milho, *Acremonium strictum*

O fungo *Acremonium strictum* W. Gams (sin. *Cephalosporium acremonium* Auct. non Corda) é o agente causador da murcha do milho, que ocorre devido à necrose vascular. *A. strictum* produz morte prematura de plantas, que paralisam o desenvolvimento e começam a murchar a partir das folhas superiores. As plantas infectadas que conseguem ultrapassar o estágio de florescimento produzem espigas menores, com grãos enrugados e descoloridos. O fungo pode ser transmitido para a geração seguinte por meio de sementes infectadas e, por isso, assume papel importante na determinação da sanidade de sementes, afetando a sua produção e comercialização. Os prejuízos causados por *A. Strictum* à cultura do milho vêm aumentando nos últimos anos (Pinto e

colaboradores, 1997). Além disso, *A. strictum* infecta também o sorgo, cuja cultura encontra-se em expansão no Brasil. Os microrganismos apresentam ampla variedade fenotípica, causada por diversos fatores ambientais. Isso dificulta a distinção de espécies intimamente relacionadas, bem como a identificação de raças dentro de cada espécie. Os métodos tradicionais empregados para a identificação de doenças fúngicas consistem, principalmente, na análise da sintomatologia em plantas infectadas, avaliação de reações de cultivares em séries diferenciadoras, observações morfológicas ao microscópio, estudo de requerimentos nutricionais e as condições de cultivo in vitro. Fatores ambientais podem influenciar nos resultados desses experimentos, dificultando,

<sup>1</sup>Biólogo, Doutor, Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG, Brasil. [jeff@cnpms.embrapa.br](mailto:jeff@cnpms.embrapa.br)

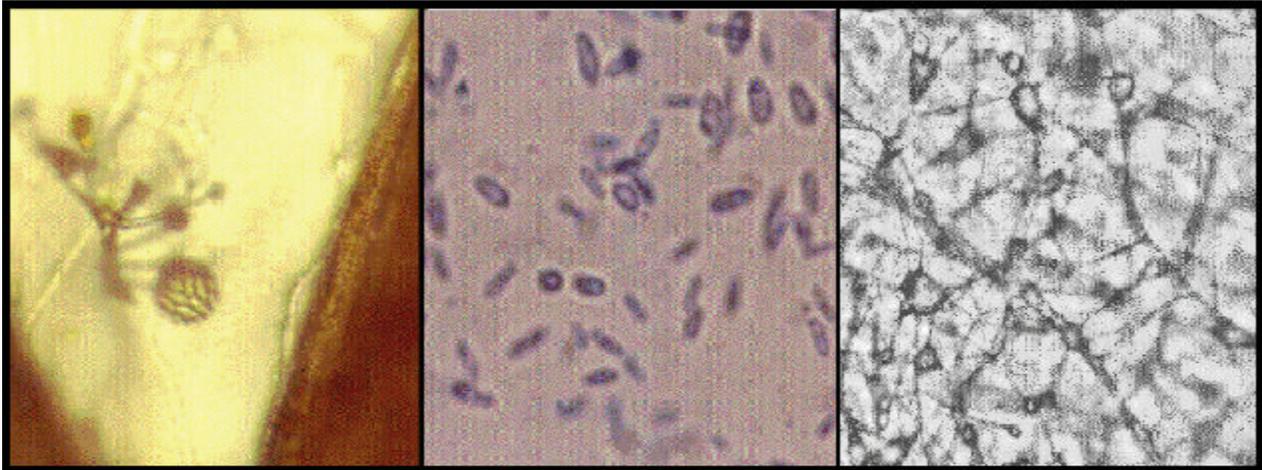
<sup>2</sup>Estudante do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix, Caixa Postal 46, CEP 30.160-012 Belo Horizonte, MG, Brasil

<sup>3</sup>Eng. Agr., Doutor, Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG, Brasil

<sup>4</sup>Bióloga, Doutora, Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG, Brasil.

muitas vezes, a interpretação dos dados. Nas últimas décadas, o desenvolvimento da biologia molecular gerou várias técnicas que permitem identificar diferenças genéticas entre espécies, populações e estirpes de microrganismos. Essas novas metodologias baseiam-se, principalmente, na análise direta dos produtos da expressão gênica (SDS-PAGE e western blot, por exemplo) e em estudos do DNA (RAPD-PCR, RFLP e seqüenciamento de DNA, entre outras) (Guimarães e Moreira, 1999, White, 1990; Welsh e McClelland, 1990; Williams, et al., 1990). As técnicas de análise de DNA não sofrem influência de fatores ambientais e, por isso, são particularmente poderosas para a identificação inequívoca de espécies, raças, estirpes e indivíduos. Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar diferentes técnicas de biologia molecular (SDS-PAGE, RAPD-PCR e seqüenciamento de rDNA) para a identificação de isolados de *Acremonium*

diferenças de coloração das massas miceliais eram devido a fatores ambientais, alterando produtos da expressão gênica, ou resultantes de contaminação da cultura inicial com outro isolado fúngico (diferença genética). Os isolados fúngicos foram identificados por características morfológicas da cultura em placas de Petri e por observações, ao microscópio óptico, da estrutura dos conídios em microcultivo em lâmina (Figura 1). O perfil eletroforético de proteína total foi obtido utilizando massa micelial dos quatro isolados crescidos em meio semi-sólido. A técnica de SDS-PAGE foi realizada de acordo com Laemmli (1970) e Jackman (1985), com algumas modificações. Massa micelial fresca foi lavada duas vezes em tampão TE (10 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA). Em seguida, 0,1gr de massa micelial foi pesada, macerada em nitrogênio líquido e transferida para tubos contendo 100 µl de tampão da

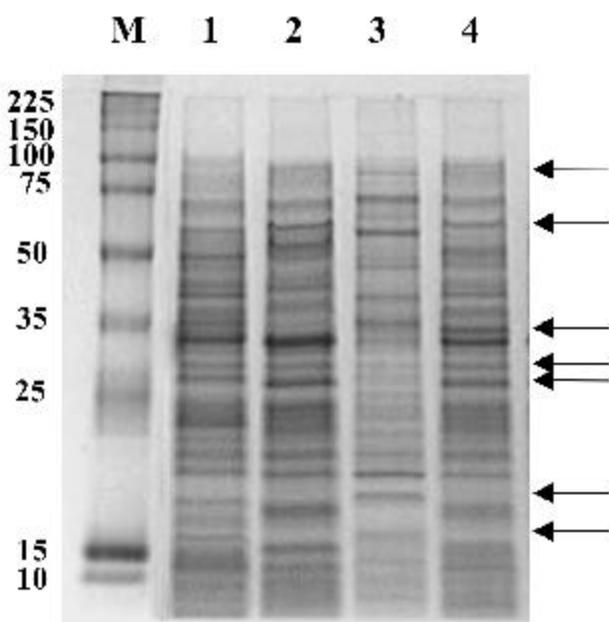


**Figura 1.** Aspectos morfológicos da cultura in vitro de *Acremonium strictum*. Os isolados foram crescidos pelo método de microcultivo em lâmina suspensa e as observações foram realizadas ao microscópio óptico (aumento de 100x).

*strictum*. Foram utilizados três isolados (121, 122 e 123). O isolado 121 produziu setores branco e rosa, quando cultivado em placas de petri. Esses setores foram repicados várias vezes, separadamente, até serem obtidas culturas isoladas, que produziram apenas massa micelial branca e massa micelial rosa. Os novos isolados foram denominados 121A e 121B, respectivamente. Esse procedimento foi realizado com o objetivo de verificar se as

amostra (62.5 mM Tris-HCl pH 8.0, 20% (v/v) glycerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol, 0,02% azul de bromofenol). A mistura foi aquecida por imersão em água fervente por dez minutos e imediatamente centrifugada a 3000 rpm durante cinco minutos. Aliquotas de 5 µl do sobrenadante foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 12%. A eletroforese foi realizada em tampão TBS (25 mM Tris-HCl pH 7,6; 140 mM NaCl) utilizando o sistema

Protean II minigel electrophoretic system (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON). Após a eletroforese, as proteínas foram visualizadas por coloração com coomassie blue (Laemmli, 1970), em transluminador de luz branca, e as imagens foram recolhidas com o sistema de fotodocumentação fotográfica Eagle Eye. Foi observado pequeno grau de polimorfismo protéico entre os quatro isolados. Contudo, foi possível identificar diferenças suficientes no perfil eletroforético para possibilitar a discriminação dos quatro isolados de *Acremonium strictum* (Figura 2).



**Figura 2.** Perfil eletroforético de proteína total (SDS-PAGE) de isolados de *Acremonium strictum*. Os números 1, 2, 3 e 4, indicam os isolados 121A, 121B, 122 e 123, respectivamente. **M** = marcador de peso molecular (os números à esquerda indicam o tamanho dos polipeptídeos em kDa). As flechas apontam algumas diferenças do perfil protéico entre os isolados.

### Análise de DNA dos isolados fúngicos

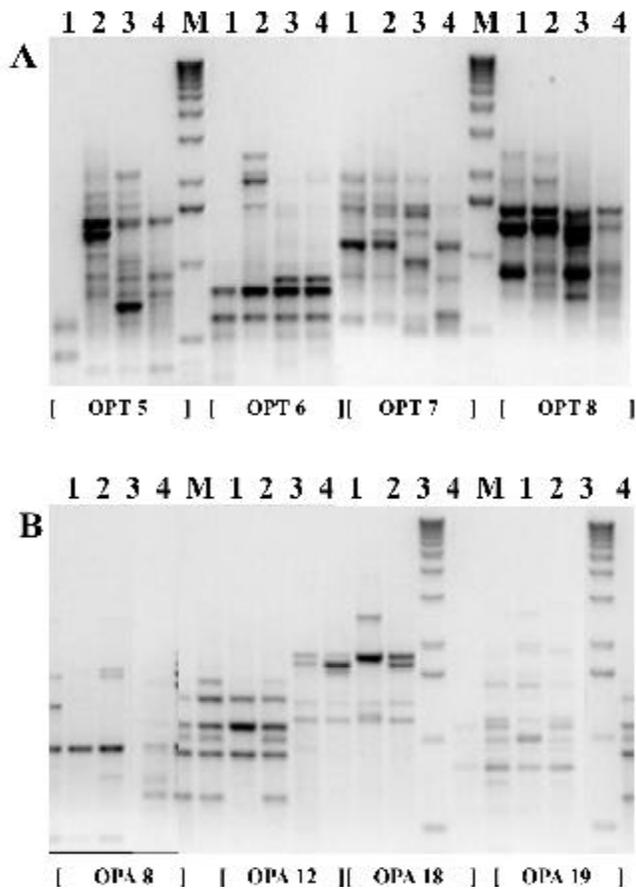
A extração do DNA dos fungos foi realizada com modificações do protocolo padrão empregado para extração de DNA de plantas. Foi utilizado 0,8g de massa micelial macerada em nitrogênio líquido, que, após ter sido transferida, para tubos de polipropileno contendo 5 ml de tampão de extração (0.2 M NaCl, 0.1 M Tris/HCl pH 8.0, 0,02 M EDTA, 1,0% SDS, 0.1% β-mercaptoetanol), foi vigorosamente agitada, até ser obtida a uniformidade da amostra. Procedeu-se à

incubação do macerado por 15 min, à temperatura ambiente, adicionando-se, em seguida, igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Novamente, a amostra foi incubada por 10 min à temperatura ambiente. Os restos celulares foram removidos por centrifugação a 8.000 rpm por 10 min. Aproximadamente 5 ml do sobrenadante foram transferidos para tubo de polipropileno contendo igual volume de etanol gelado. As amostras foram agitadas gentilmente por inversão durante cinco minutos, para facilitar a precipitação dos ácidos nucleicos. O precipitado de ácido nucleico foi coletado com o auxílio de pipetas de Pasteur, lavadas rapidamente em álcool 70% e ressuspensão em 0,5 ml TE (Tris-HCl/EDTA) contendo 40 µg/ml de RNase. A qualidade do DNA foi avaliada em géis de agarose 0,8% e quantificado em espectrofotômetro.

### RAPD-PCR

A reação de amplificação do DNA por RAPD-PCR dos isolados fúngicos foi realizada em volume final de 25 µl, contendo 40 µg de DNA, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 µM dNTP, 2,5 mM Tris, 4,0 mM primer<sup>2</sup> aleatório (10-mer primers OPERON), 2,5 U *Taq* DNA polimerase e água deionizada. A reação foi incubada no termociclador "PTC-100™ MJ Research. Inc.", estabelecendo o programa de 15 segundos a 94°C para desnaturação do DNA, 30 segundos a 35°C para anelamento do primer e 30 segundos a 72°C para extensão da fita de DNA, sendo repetido 40 vezes e com uma etapa final de 10 minutos a 72°C. A resolução dos fragmentos amplificados foi feita em géis de agarose 1,2% corado com 12µL de brometo de etídio 100µg/ml. A técnica de RAPD-PCR foi realizada com 16 iniciadores. Os produtos amplificados (253 bandas) foram bastante polimórficos (126 bandas), possibilitando diferenciar os quatro isolados de *A. strictum* (Figura 3) e estabelecer o grau de divergência genética entre eles (Figura 4). Os isolados 121A e 121B foram agrupados com 122 e 123, respectivamente. Esse resultado mostrou que as diferenças genéticas entre ambos os

isolados são maiores do que as diferenças entre eles e os isolados 122 e 123. Esse dado reforça a idéia de que a cultura inicial do isolado 121 apresentava contaminação e que as diferenças observadas na coloração da massa micelial (branca e rosa) não eram decorrentes de fatores ambientais influenciando a cultura ou devido à mutação gênica.



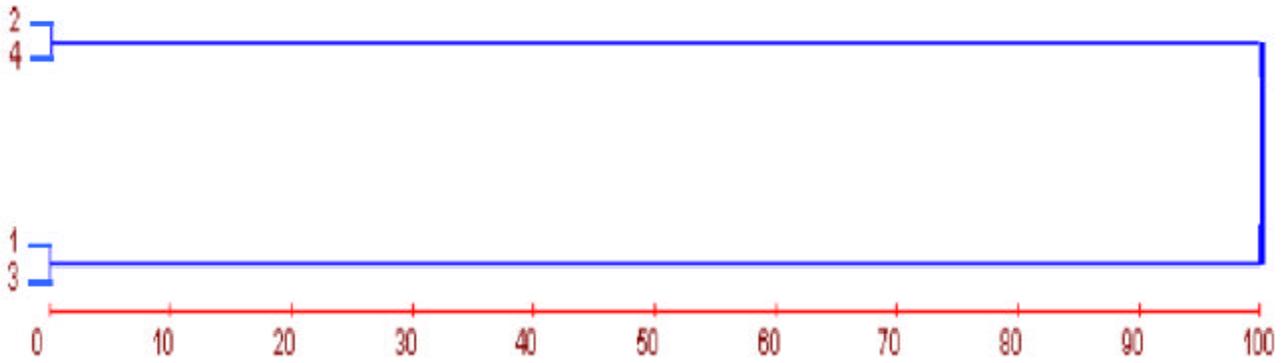
**Figura 3.** Padrão de amplificação de DNA total de *Acremonium strictum* por RAPD-PCR. Os números 1, 2, 3 e 4, indicam isolados 121A, 121B, 122 e 123 respectivamente. M = marcador de peso molecular 1Kb ladder (GIBICO BRL). Os nomes dos primers utilizados nas reações de PCR aparecem abaixo das figuras A e B.

### Análise de rDNA

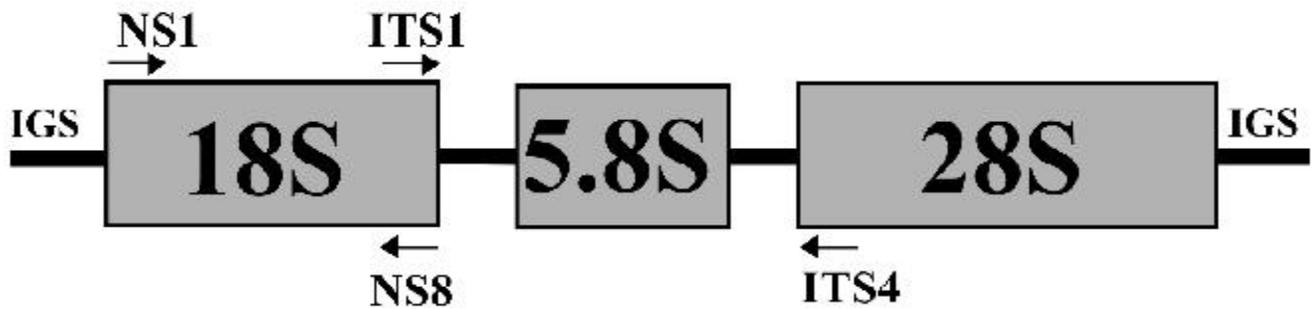
A análise do rDNA foi realizada pelo seqüenciamento da região ITS e do gene 18S, amplificados a partir de DNA total extraído dos isolados fúngicos. Nesse grupo de fungos, a região ITS é composta pela região espaçadora propriamente dita e pelo gene 5.8S rRNA (Bruns, et al., 1992; International

Mycology Institute, 1995) (Figura 5). Foram sintetizados quatro iniciadores para amplificação do rDNA: (ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG; ITS4: TCCTCCGCTTATT GATATGC; NS1: GTAGTCATATGCTTGTCTC e NS8: TCCGCAGGTTACCTACGGA). As reações de seqüenciamento foram realizadas com o kit de seqüenciamento ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin-Elmer). As reações foram realizadas em volume total de 20 µL contendo 180 ng de DNA, 8,0 µL de premix, 4,0 mM de um dos iniciadores (ITS1, ITS4, NS1 e NS8). A reação foi incubada no termociclador "PTC-100™ MJ Research. Inc.", estabelecendo o programa de 30 segundos a 96°C para desnaturação do DNA, 15 segundos a 50°C para anelamento dos primers e quatro minutos a 60°C para extensão da fita de DNA, sendo repetido 25 vezes. A precipitação do DNA foi feita com NaOAC 3M, 95% etanol e ressuspensão em tampão de seqüenciamento. Cada reação foi repetida pelo menos três vezes. As reações foram processadas no aparelho ABI PRISM 377 sequencer (Perkin-Elmer).

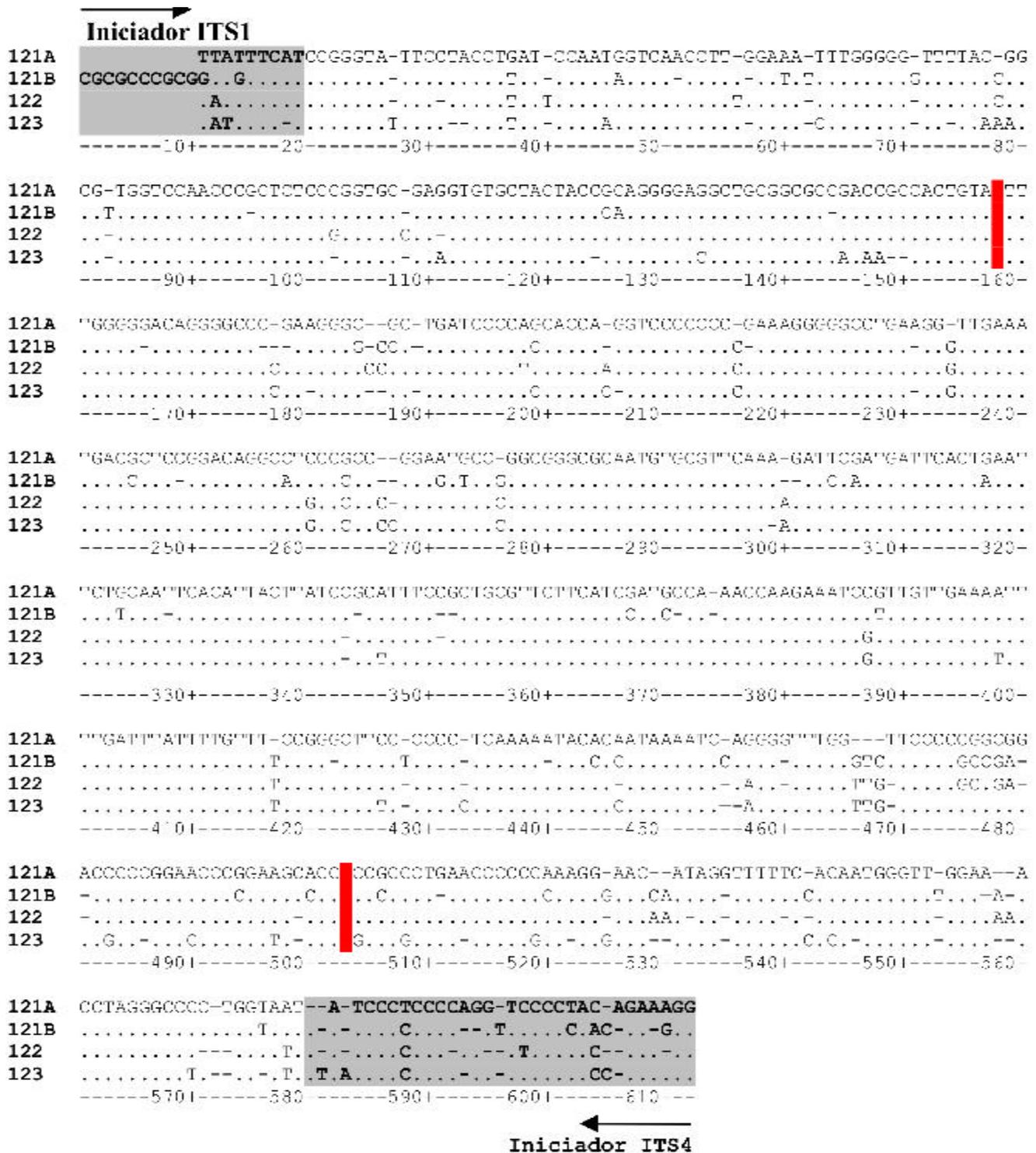
O alinhamento de seqüências de DNA da região ITS (Figura 6) e do gene ribossomal 18S (Figura 7) revelou diferenças que possibilitaram classificar os quatro isolados como raças diferentes de *Acremonium strictum*. A posição taxonômica dos quatro isolados, com base na seqüência do rDNA, foi feita por meio de comparação de seqüências de rDNA depositadas no GeneBank.



**Figura 4.** Dendrograma da distância genética entre quatro isolados de *Acremonium strictum*. Foram utilizados 16 primers aleatórios que produziram 125 bandas polimórficas. Os números 1, 2, 3 e 4 correspondem aos isolados 121A, 121B, 122 e 123, respectivamente.



**Figura 5.** Mapa da organização dos genes ribossomais (rDNA) em fungos. A posição dos iniciadores utilizados para amplificar e seqüenciar o rDNA de *Acremonium strictum* estão indicadas. O gene ribossomal 5.8S RNA nesse grupo de organismos está localizado na região ITS.



**Figura 6.** Alinhamento de seqüências de DNA da região ITS de quatro isolados de *Acremonium strictum*. Os pontos indicam nucleotídeos idênticos aos representados na primeira linha e os traços são "gaps", que foram introduzidos para possibilitar o melhor alinhamento das seqüências. A área sombreada indica a região espaçadora propriamente dita. Elas estão flanqueando a seqüência de DNA correspondente ao gene 5.8S RNA (área não marcada). A região de sobreposição do seqüenciamento com os primers ITS1 e ITS4 foi delimitada pelas barras verticais (vermelho).

```

121A CCGCGGGGTATAGACAT-CATGGGSAITTTAA-CTATATACAAATATACACCCA-AACTGGCGA-AI
121B C.C.G...AT.....C.....ATG.C... ..AG.....CC.G. ....GCA T..
122 C...GA..ATA.....C...AGATG.C...C.....AG.....C.A.T.....T..
123 TGCAG...T.....C...ATCTG...C.....AG.....CC.C.A.....C.A.T..
-----10+-----20+-----30+-----40+-----50+-----60+-----

121A CATTATATAAA-TTATCG-TTTATTTG-GATAGT-GCCTTACTACTTGGMIACCCCGTGGTAATT
121B .....G-.....CG.....A.----.....
122 .....GG.....AG.....A.----..C.....
123 .....GT...C.CG.....A..G--.....-CGTA.....
-----80|-----90|-----100|-----110|-----120|-----130|-----

121A AACTAATACATGCTAABAAACCCCGSACTTCGGGAACCGG-TGTATTTATTA-CATACAAAACCAAT
121B .C.....G.....-.....C.....
122 .G.....-.....-C.....
123 .G.....AG.....G.....GA.....
-----150+-----160+-----170+-----180+-----190+-----200+-----

121A TTCCGGGGGTTTCPTTGGTGAATTCATGATAAATATACCGAATCC-CAC-GGC-TTGGGGC-GGGGA-
121B .....C.....C.....G.....
122 ...A.....A.....G.....G.....
123 ....C.....-.....-.....C.....C.GCC--..G-
          220|    230|    240|    250|    260|    270|

121A CATTCAAATTTCTTCCCTATCAACTTTC GATGTTTGGGTAT TGGC AAACATGGTTGCAACCGG
121B .....C.....
122 .....C.....-G.....
123 .....C.....--..CG.....
-----290|-----300|-----310|-----320|-----330|-----340|-----

121A CCGGAGGGGTTAGGGC-CGACCCCGGSAAAA-GACCTGAGAAACGG-TACTACATCCAACGAACGG
121B .....C.....G-.....C.....C.....G.G.G
122 .....-.....GA.....-.....G..
123 .....G.....-.....G-.....-.....G..
-----360+-----370+-----380+-----390+-----400+-----410+-----

121A G-GCGGCAAAATTACCCAAATCCCGACTCGGGGAAG-TAGTGACAATAAATACTGATACAGGGCC-T
121B .C...C.....S..S.....T...G.....C.....C..
122 .C...C.....T.....C...C.....A....C..
123 AC...C-.....C.....G...-T.....A.....-
-----430+-----440+-----450+-----460+-----470+-----480+-----

121A GGGC-TTGTATTG-GRATGATACAAATTTAA-TCCCTAAGGAAACAATTG-GAGGGCAAT-
121B .....C-.....G.....C.A....C.G.-..G.TC...-...GCTCC
122 .....-...-...TG.....G.....C-.....C.C.CC...CG.....-TCC
123 .....C.....TG.....G.....C-.....-C.C.CC...-C.....-TCC
-----500|-----510|-----520|-----530|-----540|-----550|-----

121A GGTCACCAACCCCGG TAATTCAC TCCAATAAGTT
121B .....C..-...CG-.....-...GCC.
122 ...G...T.A...GC--...C..C..T.C.C.T...
123 .....--...CGG.....-...G.GC...
-----570+-----580+-----590+-----600+-----

```

Figura 7. Alinhamento de seqüências da região NS1 de rDNA 18S de *Acremonium strictum*. Os pontos representam igualdades e os traços são "gaps", que foram introduzidos para permitir o melhor alinhamento das seqüências.

```

121A GCGGGGACAGCGTATTTCAGTATATACCTCCCTCTAAATAAGCGGAGGTTTTGGAGAGCTTTCCCGGGCCCTTGGG
121B .....G.....G...T.....AA.----.T.....C...C...
122 ....CG...G...CG...T.....TTA.....A.....C...A...
123 .....G.G..GG..TA.....C.....GAA.----.T.....G...C...
-----10+-----20+-----30+-----40+-----50+-----60-----70+

121A TTGGGTATTGCCAAGCTCCCTAGGGCAA-TCCGGAGACCTCACTGAGCCATTCAATCCGGTACTACGACCC
121B -...A...C.....C.G.....C-.....T.....
122 ....TA.....C.A...A.GAC.....G.....
123 -...TAC..C.....T...G-.....C..-.....G.....
-----80|-----90|-----100|-----110|-----120|-----130-----140|

121A CCGGTCTTGTAC-AAAG-GGCACCGGACTTAATCAACCCCAAGCTGATGACTTGC-GCTTACTAAGGAGTT
121B .....-.....T..C.G.CGG...---...-.....C.....-.....
122 .....GC.GA..
123 .....A...G.....G...C.....GC.GA..
-----150+-----160+-----170+-----180+-----190+-----200-----210+

121A CCTCCGTTGAAGAGCAATAATTC CAATGCTCTATCCCCAG CAGGACGGGGG TAACAAAATTACCCCG
121B .....-.....-.....-.....G.....T.
122 .....G.....C-...T.....G.....-..
123 .....G.....G.....G.....G.....C.....C.....
-----220|-----230|-----240|-----250|-----260|-----270-----280|

121A GGCCTTTCCGGCAAGGAAGCTCCCTGACCCCGT--CA-GTGTACCGCGCGTG--CGGCCAGAACATCTAAG
121B .....-.....G.....CG--..C.....TG.....T.....
122 .....T.....G.....C.....C.....
123 .....-.....G...G...C.GT..G.....G.....-.....
-----290+-----300+-----310+-----320+-----330+-----340-----350+

121A GCG-ATCACACAGCTAGTTATTTC-TCAAAAGCTTCCCTCCGGCTTGAGCCCAAA-TCC-TC-TAAGAG-CC
121B ...C.....C..-.....C..-.....G..-.....G...-.....TG..
122 ..C-.....C..-C.....G..-.....GCA...C..C.....-...
123 ..C-.....C..-.....G..-.....G.G...C..-.....AG..
          360|      370|      380|      390|      400|      410      420|

121A AGCGCAC-TGCCGGAGCAATGCCGGG-TAA-TTAGC-TGG-TAAGGTCTCGTCCGTTATC-CAATTA--G
121B .....C.....T.....T...C..-T.....-...T.....-...T..-C...T.C.A.CAA.
122 ...C..T-.....C.....C..TT..-A..-T.....C.C...T..-C...T.C.A.CAA.
123 G.....-.....C..-...-T.....AG..-T.....T.....G.C.....-C
-----430+-----440+-----450+-----460+-----470+-----480-----490+

121A CCAAGCAGA --TCTCCCAACCCCTA-AAA---GGGGCATGC--CCACC-CCACAAAAACAGAAAGAG-
121B .----...CA-.....C.....CC..TAAA.GCCTCCCT.-CA.....-.....
122 .A1-----CAC.....C...CC-...-AAC..CCGGCCFCCA.-...TATCAG.G.G--...-
123 ..C.....TCACC.A.....-.....CACA.....-A-.....G.....CA
-----500+-----510+-----520+-----530+-----540+-----550-----560+

```

Figura 8. Alinhamento de seqüências da região NS8 de rDNA 18S de *Acremonium strictum*. Os pontos representam igualdades e os traços são "gaps", que foram introduzidos para permitir o melhor alinhamento das seqüências.



## Conclusões

As técnicas de biologia molecular empregadas nesse estudo foram efetivas para a identificação dos quatro isolados de *Acremonium strictum*. Os dados de SDS-PAGE possibilitaram a discriminação dos quatro isolados de *A. strictum*. Contudo, o baixo grau de polimorfismo protéico deverá limitar o seu emprego para analisar um conjunto maior de amostras. A técnica de RAPD-PCR revelou elevado grau de polimorfismo dos produtos amplificados do DNA e deverá ser útil para análises de variabilidade genética e identificação de grande número de isolados de *A. strictum*. O seqüenciamento do rDNA possibilitou, de forma inequívoca, a identificação dos quatro isolados de *Acremonium strictum*.

As técnicas de RAPD-PCR e de seqüenciamento de rDNA foram particularmente importantes para mostrar o caráter genético da variação inicialmente observada no isolado 121. As técnicas de análise de DNA empregadas neste estudo foram efetivas para a identificação dos quatro isolados fúngicos e serão úteis para a caracterização de raças de *A. strictum* existentes no Banco de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo.

## Referências Bibliográficas

BRUNS, T. D.; VILGALYS, R.; BARNES, S. M.; GONZALES, D.; HIBBETT, D. S.; LANE, D. J.; SIMON, L.; STICKEL, S.; SZARO, T. M.; WEISBURG, W. G.; SOGIN, M. L. Evolutionary relationships within the fungi: analysis of nuclear small subunit rRNA sequences. **Molecular Phylogenetic Evolution**, v.1, p. 231-241, 1992.

GUIMARÃES, C.T.; MOREIRA, M.A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 715-740.

INTERNATIONAL MYCOLOGY INSTITUTE. **Modern techniques in the identification of bacterial and filamentous fungi**. Eghan, 1995.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, p.680-684, 1970.

PINTO, N.F.J.A.; FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. Milho (*Zea mays*, L.): Controle de doenças. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIN, L (Ed.). **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa: UFV, 1997. v.2, p. 821-863.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, London, v.18, p.7213-7218, 1990.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.). **PCR Protocols**, a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELICK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, v.18, p.6531-6535, 1990.

### Comunicado Técnico, 69

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Milho e Sorgo**  
Caixa Postal 151 CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG  
Fone: 0xx31 3779 1000  
Fax: 0xx31 3779 1088  
E-mail: sac@cnpmis.embrapa.br

Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento

### Comitê de Publicações

**Presidente:** Ivan Cruz  
**Secretário-Executivo:** Frederico Ozanan Machado Durães  
**Membros:** Antônio Carlos de Oliveira, Arnaldo Ferreira da Silva, Carlos Roberto Casela, Fernando Tavares Fernandes e Paulo Afonso Viana

### Expediente

**Supervisor editorial:** José Heitor Vasconcellos  
**Revisão de texto:** Dilermando Lúcio de Oliveira  
**Editoração eletrônica:** Tânia Mara Assunção Barbosa

1ª edição  
1ª impressão (2003) Tiragem: 200