

Comunicado 160

Técnico

ISSN 1808-9984
Dezembro, 2014
Petrolina, PE

on line

Fotos: Ana Valéria Vieira de Souza.



Protocolos de Assepsia para o Estabelecimento In Vitro de Espécies Medicinais Nativas da Caatinga

Ana Valéria Vieira de Souza¹
Micaele da Costa Santos²
Maziele Dias de Souza³
Larisse Romero Laranjeira⁴

Introdução

O estabelecimento de culturas in vitro depende da eficiência do processo de assepsia e da adaptação dos explantes ao meio de cultura. A primeira condição também está relacionada às condições ambientais de cultivo das plantas matrizes, bem como à ação dos agentes desinfestantes utilizados. Todavia, a obtenção de explantes axênicos é uma das etapas mais críticas no estabelecimento de um protocolo de micropropagação. Para isso, os explantes são expostos a diferentes agentes antimicrobianos em tempos variados com a finalidade de eliminar os micro-organismos. O crescimento de bactérias e fungos no meio nutritivo inviabiliza o estabelecimento da cultura in vitro e compromete a composição química do meio de cultura, tanto pelo consumo de nutrientes quanto pela liberação de compostos produzidos por esses micro-organismos. O hipoclorito de sódio e o etanol

são as substâncias de uso mais frequente no processo de desinfestação, além de antibióticos e detergentes que aumentam a eficácia da assepsia (MORAES et al., 2007).

A manutenção de plantas matrizes em casa de vegetação pode ser uma alternativa eficaz para a redução da contaminação do explante em condições de cultivo in vitro. Espécies medicinais nativas lenhosas ou herbáceas como *Anemopaegma arvense* (PEREIRA et al., 2003), *Mandevilla velutina* (BIONDO et al., 2007) e *Jacaranda decurrens* (PEREIRA et al., 2007) são exemplos de plantas tratadas em casa de vegetação com a aplicação de fungicida sistêmico em associação com dois ou três antibióticos de amplo espectro, procedimento eficiente na desinfestação de explantes.

O estabelecimento in vitro por meio de gemas apicais ou axilares retiradas de espécies arbóreas em condições de campo, na maioria das vezes

¹Engenheira-agrônoma, D.Sc. em Horticultura, pesquisadora da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, ana.souza@embrapa.br.

²Engenheira-agrônoma, M.Sc. em Biotecnologia em Recursos Naturais, micacostal@hotmail.com.

³Estudante de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco (UPE), bolsista Facepe/Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

⁴Engenheira-agrônoma, larisse_llaranjeira@hotmail.com.

é inviável porque apresentam elevada taxa de contaminação por micro-organismos saprofitos exógenos. Desse modo, o uso de sementes como explantes pode ser vantajoso para o início do cultivo in vitro, pois os embriões ficam alojados em ambiente estéril dentro da semente. Se a assepsia dos frutos e sementes for eficaz, a contaminação dos embriões poderá ser mínima para aquelas espécies, cujo estabelecimento in vitro é realizado por meio da cultura de embriões.

As técnicas de assepsia para sementes podem ser generalizadas para inúmeras espécies. Contudo, o mesmo não ocorre para explantes como gemas axilares ou apicais, principalmente quando retirados de plantas mantidas no campo. Um exemplo raro de sucesso foi descrito por Lemos e Blake (1996) para a espécie *Annona muricata*.

Além da presença de micro-organismos externos, outra questão relevante em estudos de micropropagação com espécies nativas é a ocorrência de micro-organismos endofíticos, que tem sido considerada um problema frequente e de difícil solução. Estes podem aparecer como uma contaminação tardia, entre 30 dias e até 1 ano após o início do cultivo in vitro (MORAES et al., 2007). A dificuldade na eliminação dos micro-organismos endofíticos se deve ao fato de a maior parte dos tratamentos de desinfecção ser superficial. Além da transferência semanal do explante para novo meio de cultura e do uso de antibióticos de amplo espectro, que já são práticas utilizadas (MORAES et al., 2007), procedimento como a esterilização química do meio de cultura pode ser uma alternativa viável a ser testada para espécies que apresentam esse tipo de contaminação.

Os trabalhos de micropropagação realizados com plantas nativas da Caatinga de potencial medicinal ainda são incipientes, quando comparado ao número de espécies que ocorrem neste bioma. Estudos foram realizados com aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) (ANDRADE et al., 2000), quixabeira (*Syderoxylon obtusifolium*) (BELTRÃO et al., 2008); mulungu (*Erythrina velutina*) (COSTA, 2009), angico-vermelho (*Parapiptadenia rigida*) (KIELSE, 2009), mororó (*Bauhinia cheilantha*) (GUTIERREZ et al., 2011) e umburana-de-cheiro (*Amburana cearensis*) (CAMPOS et al., 2013).

A compilação das informações sobre o procedimento a ser adotado para a assepsia dos explantes das espécies lenhosas umburana-de-cheiro, catingueira (*Poincianella pyramidalis* Tul.), baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.), aroeira, quixabeira e angico é relevante uma vez que pode contribuir para futuros trabalhos de micropropagação com outras espécies do Bioma Caatinga. A etapa do estabelecimento in vitro pode ser significativamente onerosa no que se refere ao tempo de exposição do explante ao agente desinfestante, até que seja completamente otimizado um protocolo de assepsia eficiente para determinada espécie.

Neste trabalho são apresentadas informações obtidas por meio de pesquisas realizadas na Embrapa Semiárido com umburana-de-cheiro, catingueira, baraúna, aroeira, quixabeira e angico; espécies nativas da Caatinga que apresentam potencial medicinal.

Condições gerais para o estabelecimento in vitro das espécies estudadas

- Todas as sementes devem ser beneficiadas antes do processo de assepsia.
- Após a assepsia, as sementes podem ser colocadas em recipientes como frascos de vidro, frascos de polietileno autoclaváveis ou tubos de ensaio, os quais devem ser tampados e vedados com parafilme.
- Os recipientes contendo as sementes devem ser levados para a sala de crescimento, onde a temperatura deve ser de 25 ± 3 °C, fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas escuro e radiação fotossintética ativa de $45\text{-}60\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecidos por lâmpadas do tipo fluorescente branca fria.

Umburana-de-cheiro (*Amburana cearensis* (Allemao) A.C. Smith)

Na bancada do laboratório, as sementes devem ser colocadas em uma peneira de aproximadamente 15 cm de diâmetro e lavadas em água corrente por 2 minutos. Em câmara de fluxo laminar, devem ser transferidas para álcool 70% (v/v) e agitadas durante 1 minuto para a quebra da tensão superficial com o objetivo de facilitar a ação do

agente desinfestante. Em seguida, as sementes devem ser imersas em solução de hipoclorito de sódio a 2% e agitadas manualmente por 15 minutos. Após a imersão em hipoclorito de sódio, as sementes devem ser lavadas três vezes em água destilada autoclavada. Cada lavagem deve ser realizada durante 5 minutos.

Na câmara de fluxo laminar, todo o procedimento de assepsia e lavagem das sementes deve ser realizado utilizando-se erlenmeyers de 250 mL e pode-se utilizar a quantidade de 30 sementes para 100 mL de solução.

Após este procedimento, considerando-se o rápido crescimento da parte aérea in vitro, as sementes podem ser colocadas em tubos de ensaio (25 mm x 150 mm) contendo 10 mL do meio de cultura MS/2 (MURASHIGE; SKOOG, 1962) + 15 g L⁻¹ de sacarose, pH 5,7-5,8, solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar e previamente autoclavado. Deve-se colocar uma semente por recipiente.

Esta metodologia viabiliza a obtenção de 98% de plantas estabelecidas in vitro sem contaminação (Figura 1).

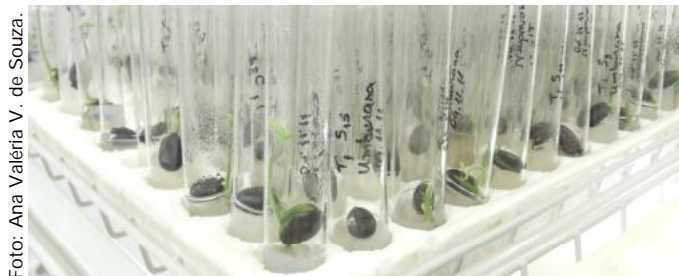


Foto: Ana Valéria V. de Souza.

Figura 1. Plantas de umburana-de-cheiro (*Amburana cearensis*) com 10 dias após o estabelecimento das sementes in vitro.

Catingueira (*Poincianella pyramidalis* Tul.)

Na bancada do laboratório, sementes de catingueira devem ser colocadas em uma peneira de aproximadamente 12 cm de diâmetro e lavadas durante 1 minuto em água corrente. Em câmara de fluxo laminar, devem ser transferidas para álcool 70% (v/v) sob agitação manual por 1 minuto e, posteriormente, colocadas em solução de hipoclorito de sódio a 2% e agitadas manualmente por 15 minutos. Em seguida, as sementes devem ser lavadas três vezes em água destilada autoclavada com o tempo de lavagem de 5 minutos.

Na câmara de fluxo laminar, todo o procedimento de assepsia e lavagem das sementes deve ser realizado utilizando-se erlenmeyers de 250 mL e pode-se utilizar a quantidade de 30 sementes para 100 mL de solução.

Após este procedimento, as sementes de catingueira podem ser colocadas diretamente em tubos de ensaio de (25 mm x 150 mm), contendo 10 mL do meio de cultura ou em frascos de vidro ou de polietileno autoclaváveis contendo 40 mL do meio de cultura MS/2 + 15 g L⁻¹ de sacarose, pH 5,7-5,8, solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar e previamente autoclavado. Nos frascos de vidro ou polietileno, pode-se colocar quatro sementes. Nos tubos de ensaio, deve-se colocar apenas uma semente por frasco. Pode-se também utilizar tubos de ensaio de (25 mm x 150 mm), contendo 10 mL do meio de cultura colocando-se quatro sementes por frasco. Tubos de ensaio de (25 mm x 150 mm), contendo 10 mL do meio de cultura também podem ser utilizados.

Durante o processo de germinação in vitro das sementes de catingueira, pode ocorrer a exudação de compostos fenólicos para o meio de cultura e acarretar na oxidação do explante. Neste caso, durante o preparo do meio de cultura a ser utilizado na fase do estabelecimento, deve-se adicionar 1 g L⁻¹ de carvão ativado ao mesmo.

Esta metodologia viabiliza a obtenção de 98% de plantas estabelecidas in vitro sem contaminação (Figura 2).



Foto: Larisse Romero Laranjeira.

Figura 2. Plantas de catingueira (*Poincianella pyramidalis* Tul.) aos 30 dias após estabelecimento das sementes in vitro em meio de cultura contendo carvão ativado.

Baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.)

Sementes de baraúna devem ser colocadas em béquer de 250 mL contendo 100 mL de água destilada e 10 mL de detergente neutro e agitadas durante 2 minutos a 80 rpm. Em seguida, devem ser transferidas para erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de hipoclorito de sódio a 2% e agitadas por 30 minutos a 80 rpm. Posteriormente, devem ser lavadas três vezes em erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de água destilada autoclavada e o tempo de cada lavagem deve ser de 3 minutos. Pode-se utilizar a quantidade de 30 sementes para 100 mL de solução.

Com o auxílio de uma tesoura de poda, previamente desinfestada com solução de hipoclorito de sódio a 2%, deve-se fazer um corte no pericarpo do lado oposto do eixo embrionário para quebrar a dormência tegumentar. Em seguida, as sementes devem ser semeadas em bandejas de isopor de 72 células contendo substrato comercial, as quais devem ser deixadas em casa de vegetação e irrigadas diariamente. Deve-se colocar uma semente por célula e a irrigação pode ser realizada por meio de microaspersores ou regadores manuais.

Para o estabelecimento in vitro desta espécie, devem ser utilizados segmentos nodais menos lignificados retirados diretamente das plantas germinadas e mantidas em casa de vegetação a partir de 60 dias de idade.

Antes da retirada dos explantes (segmentos nodais), as plantas matrizes devem ser pulverizadas durante 5 dias a cada 24 horas com solução de 2% de cercobim (PA) + 1 ampola de gentamicina (80 mg). Esta concentração deve ser utilizada para 100 mL da solução, que deve ser preparada no dia da pulverização. Com 100 mL de solução é possível pulverizar 20 plantas.

Após o período de pulverização, segmentos nodais com aproximadamente 1,0 cm e um par de meia folha, devem ser cortados da planta matriz com o auxílio de uma tesoura de poda previamente desinfestada com solução de hipoclorito de sódio a 2% e colocados em béquer contendo 100 mL de solução de água destilada autoclavada + 1% de polivinilpirrolidona (PVP) para o transporte até o laboratório. Pode-se colocar a quantidade de 20 segmentos nodais para cada 100 mL de solução.

No laboratório, em câmara de fluxo laminar, os segmentos nodais devem ser colocados em erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de solução de hipoclorito de sódio a 2% e agitados manualmente durante 15 minutos. Pode-se utilizar a quantidade de 20 segmentos nodais por 100 mL de solução.

Posteriormente, os explantes devem ser lavados por cinco vezes em 100 mL de água destilada autoclavada e cada lavagem deve ser realizada com o tempo de 10 minutos. Para esse procedimento, também deve-se utilizar erlenmeyer de 250 mL.

Após a lavagem, os segmentos nodais podem ser colocados em frascos de vidro, frascos de polietileno autoclaváveis, ou em tubos de ensaio de (25 mm x 150 mm). O meio de cultura a ser utilizado nesta etapa deve ser WPM + 30 g L⁻¹ de sacarose, suplementado com 0,5 mg L⁻¹ BAP + 0,4 mg L⁻¹ de AIA + 1 g L⁻¹ de carvão ativado, com pH 5,7-5,8, solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar e previamente autoclavado. Os frascos devem ser preenchidos com 40 mL e os tubos de ensaio com 10 mL deste meio, com pH 5,7-5,8, solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar e previamente autoclavado. Pode-se colocar quatro segmentos nodais por frasco ou somente um explante por tudo de ensaio. Os recipientes contendo os segmentos nodais devem ser deixados em sala de crescimento na ausência de luz, durante um período de 7 dias. Posteriormente, devem ser transferidos para as mesmas condições de fotoperíodo e radiação fotossintética mencionados anteriormente.

Esta metodologia viabiliza a obtenção de 80% de plantas estabelecidas in vitro sem contaminação (Figura 3).



Foto: Ana Valéria V. de Souza.

Figura 3. Brotações de baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.) aos 45 dias após estabelecimento in vitro dos segmentos nodais em meio de cultura contendo carvão ativado.

Aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão)

Na bancada do laboratório, sementes de aroeira devem ser colocadas em solução de 100 mL de água destilada autoclavada e 10 mL de detergente neutro e agitadas manualmente durante 1 minuto. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, devem ser colocadas em álcool 70% (v/v) e agitadas manualmente por 1 minuto. Posteriormente, devem ser colocadas diretamente em solução de hipoclorito de sódio a 2% e agitadas por 15 minutos.

Após a imersão em hipoclorito de sódio, as sementes devem ser lavadas três vezes em água destilada autoclavada, com o tempo de lavagem de 5 minutos.

Na câmara de fluxo laminar, todo o procedimento de assepsia e lavagem das sementes deve ser realizado utilizando-se erlenmeyers de 250 mL e pode-se utilizar a quantidade de 50 sementes para 100 mL de solução. Após este procedimento, as sementes podem ser colocadas em tubos de ensaio (25 mm x 150 mm) contendo 10 mL do meio de cultura MS/2 + 15 g L⁻¹ de sacarose, pH 5,7-5,8, solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar e previamente autoclavado. Pode-se colocar uma semente por recipiente. Frascos de vidro ou polietileno autoclaváveis contendo 40 mL do meio de cultura também podem ser utilizados.

Esta metodologia viabiliza a obtenção de 90% de plantas estabelecidas in vitro sem contaminação.

Quixabeira (*Sideroxylon obtusifolium* Roem et Schult.)

Na bancada do laboratório, as sementes de quixabeira devem ser colocadas em uma peneira de aproximadamente 15 cm de diâmetro e lavadas em água corrente por 2 minutos. Em câmara de fluxo laminar, devem ser colocadas em álcool 70% e agitadas manualmente durante 1 minuto. Em seguida, devem ser imersas durante 1 hora em agitação a 80 rpm em fungicida sistêmico N-[(triclorometil) tio]-4-ciclohexeno-1,2-dicarboximida a 5% do princípio ativo. Após a imersão em fungicida, as sementes devem ser colocadas diretamente em solução de hipoclorito de sódio a 2% em agitação por 20 minutos a 80 rpm.

Posteriormente, deve-se cortar o tegumento na extremidade oposta ao eixo embrionário para a quebra da dormência. Para este procedimento, deve-se utilizar tesoura de poda e pinça, completamente esterilizadas. Após o corte, as sementes devem ser lavadas três vezes em água destilada autoclavada, com o tempo de lavagem de 5 minutos.

Na câmara de fluxo laminar, todo o procedimento de assepsia e lavagem das sementes deve ser realizado utilizando-se erlenmeyers de 250 mL e pode-se utilizar 30 sementes para 100 mL de solução. Após

este procedimento, as sementes podem ser colocadas em frascos de vidro ou polietileno autoclaváveis ou em tubos de ensaio de (25 mm x 150 mm) (Figura 4).

Fotos: Ana Valéria V. de Souza.



Figura 4. a) Sementes de quixabeira (*Sideroxylon obtusifolium* Roem et Schult.) antes da assepsia; b) em álcool 70% v/v; c) em hipoclorito de sódio; d) procedimento de colocação das sementes em frascos de polietileno autoclaváveis contendo meio de cultura para a germinação das sementes in vitro.

O meio de cultura a ser utilizado nesta etapa deverá ser MS/2 + 15 g L⁻¹ de sacarose, pH 5,7-5,8, solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar e previamente autoclavado. Pode-se colocar uma semente por recipiente. Os frascos devem ser preenchidos com 40 mL e os tubos de ensaio com 10 mL deste meio. Pode-se colocar quatro sementes por frasco ou uma por tudo de ensaio.

Esta metodologia viabiliza a obtenção de 96% de plantas estabelecidas in vitro sem contaminação. Contudo, após um período de 20 a 30 dias, aproximadamente, pode-se observar bactérias endofíticas no meio de cultura (Figura 5).

Metodologias, como a esterilização química do meio de cultura podem ser testadas, a fim de eliminar essas bactérias.

Fotos: Ana Valéria V. de Souza.

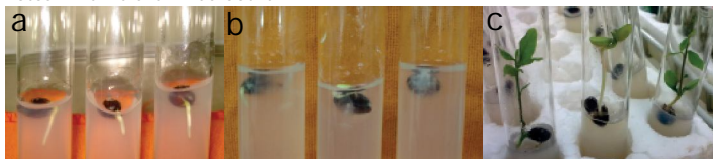


Figura 5. a) Sementes de quixabeira (*Sideroxylon obtusifolium* Roem et Schult.) germinadas in vitro; b) presença de bactérias endofíticas em sementes de quixabeira germinadas; c) plantas de quixabeira aos 30 dias após o estabelecimento das sementes in vitro.

Angico (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan)

As sementes de angico devem ser colocadas diretamente em álcool 70% em agitação manual durante 1 minuto. Posteriormente, devem ser imersas em solução de hipoclorito de sódio a 2% e agitadas manualmente por 15 minutos.

Em câmara de fluxo laminar, as sementes devem ser lavadas três vezes em água destilada autoclavada, sendo cada lavagem com o tempo de 3 minutos. Todo o procedimento de assepsia e lavagem das sementes em câmara de fluxo laminar deve ser realizado com a utilização de erlenmeyers de 250 mL e pode-se utilizar a quantidade de 30 sementes para 100 mL de solução.

Após este procedimento, considerando-se o rápido crescimento da parte aérea in vitro, as sementes podem ser colocadas em tubos de ensaio (25 mm x 150 mm) contendo 10 mL do meio de cultura MS/2 + 15 g L⁻¹ de sacarose, pH 5,7-5,8, solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar e previamente autoclavado. Deve-se colocar uma semente por recipiente.

Esta metodologia viabiliza a obtenção de 98% de plantas estabelecidas in vitro sem contaminação.

O meio de cultura deve ser suplementado com 1 g L⁻¹ de carvão ativado, considerando o processo de oxidação das sementes, pela exudação de compostos fenólicos no meio de cultura.

Referências

- ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, MG, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.
- BELTRÃO, A. E. S.; TOMAZ, A. C. de A.; BELTRÃO, F. A. S.; MARINHO, P. In vitro biomass production of *Sideroxylon obtusifolium* (Roem & Schult). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.18, p. 696-698, 2008. Suplemento.
- BIONDO, R.; SOUZA, A. V.; BERTONI, B. W.; SOARES, A. M.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. Micropropagation, seed propagation and germoplasm bank of *Mandevilla velutina* (Mart.) Wodson. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, n. 3, p. 263-268, 2007.
- CAMPOS, V. C.; LIMA-BRITO, A.; GUTIERREZ, I. E. M.; SANTANA, J. R. F.; SOUZA, A. V. V. Micropropagação de umburana de cheiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 43, n. 4, p. 639-644, 2013.
- COSTA, G. M. da. **Micropropagação de *Erythrina velutina* Willd. (mulungu)**. 2009. 92 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.
- GUTIÉRREZ, I. E. M.; NEPOMUCENO, C. F.; LEDO, C. A. S.; SANTANA, J. R. F. Micropropagation and acclimatization of *Bauhinia cheilantha* (an important medicinal plant) **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 10, n. 8, p. 1.353-1.358, 2011.
- KIELSE, P. Regeneração in vitro de *Parapiptadenia rigida*. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 39, n. 4, p.1.098-1.104, 2009.
- LEMO, E. E. P.; BLAKE, J. Micropropagation of juvenile and mature *Annona muricata* L. **Journal of Horticultural Science**, Bangalore, v. 71, n. 3, p. 395-403, 1996.
- MORAES, R. M.; CALDAS, L. S.; SILVEIRA, C. E. S.; SOUZA, A. V.; BERTONI, B. W.; PEREIRA, A. M. S. Micropropagação e Banco de Germoplasma "in vitro" para produção e conservação de plantas nativas do Cerrado. In: PEREIRA, A.M.S. (Org.). **Recursos genéticos e conservação de plantas medicinais do Cerrado**. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, 2007. v. 1, p. 185-214.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiology**, [Rockville], v. 15, p. 473-479, 1962.
- PEREIRA, A. M. S.; AMUI, S. F.; BERTONI, B. W.; MORARES, R. M.; FRANÇA, S. C. Micropropagation of *Anemopaegma arvense*: conservation of na endangered medicinal plant. **Planta Medica**, Antwerp, v. 69, p. 571-573, 2003.
- PEREIRA, A. M. S.; LOURENÇO, M. V.; MALOSSO, M. G.; BERTONI, B. W.; MING, L. C.; GUERREIRO, C. P. V.; PEREIRA, J. O.; FRANÇA, S. C. *Jacaranda decurrens* Cham. In: PEREIRA, A. M. S. (Org.). **Recursos Genéticos e conservação de plantas medicinais do Cerrado**. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, 2007. v. 1, p. 257-294.

Comunicado Técnico, 160

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Semiárido
Endereço: BR 428, km 152, Zona Rural, Cx. Postal 23, 56302-970 Petrolina, PE
Fone: (87) 3866-3600
Fax: (87) 3866-3815
E-mail: cpatsa.sac@embrapa.br

1ª edição (2014): Formato digital

Ministério da
 Agricultura, Pecuária
 e Abastecimento



Comitê de publicações

Presidente: Maria Auxiliadora Coelho de Lima.
Secretário-Executivo: Sidinei Anuniação Silva.
Membros: Ana Valéria Vieira de Souza, Aline Camarão Telles Biasoto, Ana Cecília Poloni Rybka, Anderson Ramos de Oliveira, Fernanda Muniz Bez Birolo, Flávio de França Souza, Gislene Feitosa Brito Gama, José Mauro da Cunha e Castro, Juliana Martins Ribeiro, Welson Lima Simões.

Expediente

Supervisão editorial: Sidinei Anuniação Silva.
Revisão de texto: Sidinei Anuniação Silva.
Tratamento das ilustrações: Nivaldo Torres dos Santos.
Editoração eletrônica: Nivaldo Torres dos Santos.