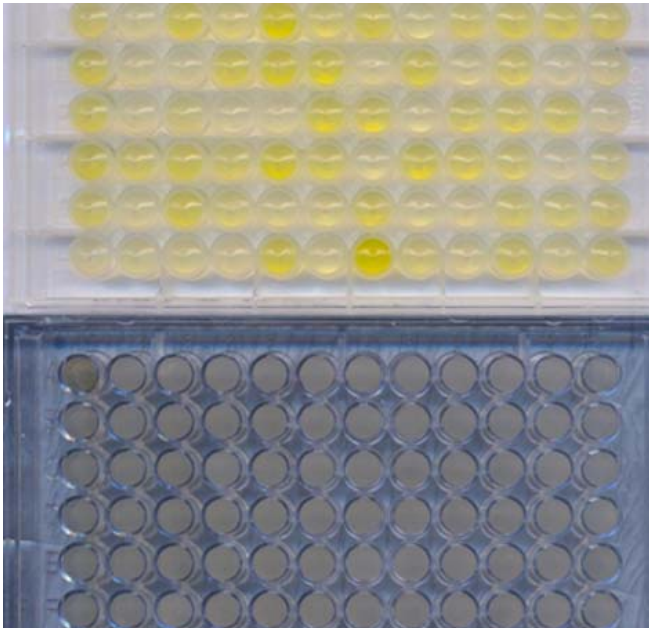


Foto: Stefan Schwab



## Ensaio de atividade de $\beta$ -galactosidase em *Gluconacetobacter diazotrophicus* para estudos de expressão gênica

Cristiane Alves Pessoa<sup>1</sup>  
José Ivo Baldani<sup>2</sup>  
Stefan Schwab<sup>3</sup>

O nitrogênio faz parte da constituição de aminoácidos, proteínas e atua em diversos processos bioquímicos dos vegetais, sendo essencial para o desenvolvimento dos mesmos (GOMES et al., 2005). Dentre as formas de aporte de N para diferentes ecossistemas, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) é considerada como o principal processo de adição de nitrogênio exógeno, contribuindo para melhorar a fertilidade de solos, reduzindo a dependência de adubação nitrogenada, sem causar prejuízo para as culturas, e diminuindo custos e danos ao meio ambiente (BODDEY et al., 1991). Diversas bactérias fixadoras de nitrogênio endofíticas ocorrem em associação com culturas de interesse agrônomo, tais como a cana-de-açúcar, e têm sido consideradas as principais responsáveis pelo aumento significativo de N nos tecidos da planta (BODDEY et al., 1991; URQUIAGA, CRUZ e BODDEY, 1992).

*Gluconacetobacter diazotrophicus* é uma bactéria fixadora de nitrogênio, isolada primeiramente de raízes e colmos de cana-de-açúcar cultivada no Brasil. É

considerada como bem adaptada à cana-de-açúcar, pois sobrevive em baixo pH e em altas concentrações de sacarose. Além disso, apresenta propriedades de interesse agrícola, como a capacidade de fixar nitrogênio em presença de nitrato (CAVALCANTE e DOBEREINER, 1988) e a produção de hormônios de crescimento vegetal, como o ácido indol 3-acético e as giberelinas (FUENTES, JIMINEZ e ABARCA, 1993). Trata-se de uma bactéria endofítica (BALDANI et al., 1997) e é provável que esse comportamento possa proporcionar-lhe várias vantagens como, por exemplo, menor competição com outros microrganismos da rizosfera e disponibilidade de oxigênio em concentrações adequadas para compatibilizar a FBN com a respiração celular (REIS, PERIN e REIS JUNIOR., 1999).

A sequência completa do genoma da estirpe PAL5 (ATCC 49037) de *G. diazotrophicus* foi publicada e depositada no banco de dados GenBank do Centro Estadunidense de Informação Biotecnológica (NCBI)

<sup>1</sup> Acadêmica do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, bolsista PIBIC-CNPq.

<sup>2</sup> Pesquisador da Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 7, CP 74.505, CEP 23851-970, Seropédica, RJ. E-mail: ibaldani@cnpab.embrapa.br.

<sup>3</sup> Pesquisador da Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 7, CP 74.505, CEP 23851-970, Seropédica, RJ. E-mail: sschwab@cnpab.embrapa.br.

(BERTALAN et al., 2009), possibilitando, assim, estudos de regulação gênica em nível enômico. A compreensão dos mecanismos moleculares de comunicação e interação planta-bactéria pode permitir que o processo de FBN seja explorado de forma mais eficiente na cultura.

Genes repórteres são genes úteis em engenharia genética por codificarem proteínas de simples detecção (MADIGAN, MARTINKO e PARKER, 2003). Podem ser fusionados a outros genes ou ao promotor de outros genes, permitindo o estudo da expressão. Existem várias opções de genes repórteres, sendo que *lacZ*, que codifica para a enzima  $\beta$ -galactosidase, é um dos mais utilizados em estudos de expressão (CASADABAN e COHEN, 1979; SCHWAB et al., 2007a) ou como marcador em estudos de inoculação (KATUPITIYA et al., 1995; GOPALASWAMY et al., 2000). A enzima  $\beta$ -galactosidase, codificada por *lacZ*, naturalmente catalisa a hidrólise de lactose em glicose e galactose. Orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG) é um substrato artificial cromogênico que pode ser utilizado para detecção de beta-galactosidase. Esse composto, normalmente incolor, em presença da  $\beta$ -galactosidase, é hidrolisado em galactose e orto-nitrofenol, composto que, por sua vez, apresenta coloração amarela, podendo ser usado para quantificar a atividade enzimática por meio de ensaio colorimétrico (MILLER, 1972).

Diversos trabalhos têm descrito o uso do gene repórter *lacZ* no estudo da regulação da expressão gênica, tanto em eucariotos (BRENT e PTASHNE, 1985; FUERST et al., 1986; TEERI et al., 1989) quanto em procariotos, incluindo bactérias fixadoras de nitrogênio que se associam com plantas (MULLIGAN e LONG, 1985; LIANG et al., 1991; SCHWAB et al., 2007a), por meio de ensaios de atividade de  $\beta$ -galactosidase. Para cada organismo, as condições de avaliação (cultivo) e de ensaio enzimático, propriamente dito, devem ser padronizadas. Este Comunicado Técnico mostra a repetitibilidade de ensaios de atividade de  $\beta$ -galactosidase, que foram padronizados com *G. diazotrophicus*, ilustrando sua utilidade em estudos de expressão gênica que envolve fusões com o gene repórter *lacZ*.

A padronização prévia do ensaio envolveu o estabelecimento de condições de cultivo ideais: tempo, meios de cultura, número de pré-inóculos e quantidade

de fonte de carbono. Para a obtenção dos resultados, noventa e seis clones de uma biblioteca de promotores de *G. diazotrophicus* estirpe PAL5 (SCHWAB, TEIXEIRA e BALDANI, 2008a) foram cultivados, primeiramente, em meio DYGS sólido (glicose 2,0 g/L, extrato de levedura 2,0 g/L, peptona 1,5 g/L,  $K_2HPO_4$  0,5 g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,5 g/L, ácido glutâmico 1,5 g/L, pH 6,0, ágar 15 g/L) (RODRIGUES NETO, MALAVOLTA JUNIOR e VICTOR, 1986), adicionado de tetraciclina 100 mg/mL em uma placa de Petri de 15 cm de diâmetro, sendo inoculados 2,5  $\mu$ L de suspensão celular bacteriana de cada clone da biblioteca a partir do estoque em glicerol 50%. Foi inoculada, também, a estirpe PAL5 com o vetor vazio (pPW452) como controle negativo. O sistema foi incubado por cinco dias, a 30°C. Após o crescimento, os clones foram reinoculados, em 1 mL de meio DYGS líquido, adicionado de tetraciclina 100  $\mu$ g/mL, em poços de placas de 96 poços profundos ("deep well",

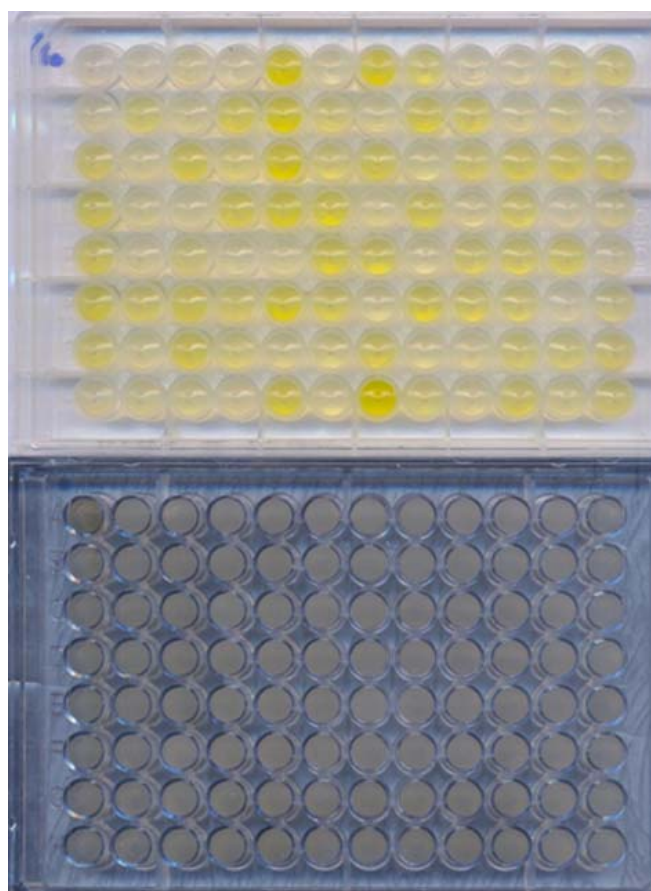


Foto: Stefan Schwab

**Fig. 1.** Aspecto de duas placas de 96 poços transparentes de fundo chato (tipo ELISA) contendo o sobrenadante dos sistemas de reação (em cima) e as culturas bacterianas (em baixo) de 96 clones; a partir destas são determinados os valores de  $A_{414}$  e  $A_{595}$  em espectrofotômetro de microplacas.

capacidade de 2,2 mL/poço), utilizando-se um replicador formato 96 poços. O controle negativo PAL5 (pPW452) foi inoculado em meio de cultura idêntico, porém, em frasco de 10 ml contendo 2 ml de meio. Os sistemas foram incubados a 30°C, a 200 rpm, por 3 dias. Após o crescimento, os clones foram reinoculados nas condições de avaliação da expressão gênica, em meio DYGS modificado (aqui denominado LZGD) líquido ( $K_2HPO_4$  0,5 g/L,  $MgSO_4$  0,5 g/L, ácido glutâmico 1,5 g/L, biotina 0,1 mg/L, piridoxal-HCl 0,2 mg/L, pH 6,0), adicionado de tetraciclina 10  $\mu$ g/ml e caldo de cana das variedades Chune ou SP701143 a 2,5%, em poços de novas placas "deep well", utilizando uma micropipeta multicanal. Os caldos das variedades de cana foram previamente obtidos e esterilizados conforme descrito anteriormente (SCHWAB, TEIXEIRA e BALDANI, 2008b). O inóculo dos clones consistiu na transferência de 2,5  $\mu$ l das culturas, bem homogeneizadas por micropipetagem, para uma das duas condições de avaliação. O controle negativo, PAL5 (pPW452), também foi inoculado em poços de uma placa "deep well" à parte; nesta placa também foram preparados os "brancos" (meios de cultura com os caldos estéreis) para controle da eventual contaminação durante o cultivo, e para posterior uso como branco dos sistemas de reação com a  $\beta$ -galactosidase (nas leituras de  $A_{414}$  e  $A_{595}$ , ver adiante). Os sistemas foram incubados por 3 dias, a 30°C, sob agitação a 200 rpm.

Os níveis de expressão do gene repórter *lacZ*, a partir do promotor de cada um dos 96 clones, nas duas condições de cultivo (presença de caldo de uma das duas variedades de cana-de-açúcar), foram avaliados por meio de ensaios de atividade de  $\beta$ -galactosidase. O ensaio foi feito de acordo com Miller (1972), mas com adaptações descritas por Griffith e Wolf (2002) e Schwab et al. (2007b) para o formato de placas de 96 poços. Foram transferidos 40  $\mu$ L de cultura, em quadruplicata, para poços de placa do tipo "deep well", contendo 360  $\mu$ L de mistura de Tampão Z (27  $\mu$ L de SDS 10% e 390  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol para 100 mL de Tampão Z, composto de  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$  60 mmol/L,  $Na_2H_2PO_4 \cdot H_2O$  40 mmol/L, KCl 10 mmol/L e  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1 mmol/L, pH 7,0). Em seguida, foram

adicionados 25  $\mu$ L de clorofórmio, agitando por vórtex, e, após uma centrifugação breve em centrífuga com rotor para microplacas, foram adicionados 80  $\mu$ L de solução de o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG) 4 mg/mL em Tampão Z, marcando-se o tempo. Conforme o desenvolvimento da coloração amarela, foram adicionados 200  $\mu$ L de solução  $Na_2CO_3$  1M, de modo a parar a reação catalisada pela enzima  $\beta$ -galactosidase. Após o término de todas as reações da placa, esta foi centrifugada por 5 minutos, a 3600 x g. Foram transferidos 200  $\mu$ L do sobrenadante para uma placa transparente de 96 poços de fundo chato (tipo ELISA) (Fig. 1) e, então, foi realizada a leitura de absorbância a 414 nm ( $A_{414}$ ) em espectrofotômetro de microplacas. A turbidez das culturas, que se correlaciona com concentração de células, é utilizada para determinação da atividade de  $\beta$ -galactosidase (MILLER, 1972), e foi medida por espectrofotometria a 595 nm ( $A_{595}$ ). Para tal, foram transferidos 200  $\mu$ L da cultura de cada clone para um poço de placa de 96 poços, transparente e de fundo chato (tipo ELISA) (Fig. 1), sendo a leitura realizada no mesmo espectrofotômetro de microplacas.

A atividade de  $\beta$ -galactosidase referente a cada clone foi calculada de acordo com a equação abaixo, adaptada de Miller et al. (1972), com os valores de absorbância final a 414 nm e do tempo de reação dos ensaios enzimáticos, considerando as quatro réplicas ( $A_{414(1)}$ ,  $A_{414(2)}$ ,  $A_{414(3)}$  e  $A_{414(4)}$  descontando da absorbância final a 414 nm do branco,  $A_{414(b)}$ , e  $t_{(1)}$ ,  $t_{(2)}$ ,  $t_{(3)}$ ,  $t_{(4)}$ , respectivamente), e com o valor da pseudo-absorbância (turbidez medida por dispersão da luz) a 595 nm ( $A_{595}$  descontando da absorbância do meio de cultura estéril  $A_{595(b)}$ ).

Os valores da atividade da  $\beta$ -galactosidase de cada clone foram traçados em gráfico, para comparar os valores de atividade enzimática dos clones nas duas condições de avaliação (Fig. 2).

A partir da análise da atividade de  $\beta$ -galactosidase dos clones, em presença dos caldos de cana das variedades Chune ou SP701143, foi possível perceber que os valores foram bastante semelhantes,

$$\text{Atividade } \beta\text{-galactosidase} = \frac{\frac{(A_{414(1)} - A_{414(b)})}{t_{(1)}} + \frac{(A_{414(2)} - A_{414(b)})}{t_{(2)}} + \frac{(A_{414(3)} - A_{414(b)})}{t_{(3)}} + \frac{(A_{414(4)} - A_{414(b)})}{t_{(4)}}}{4 \times (A_{595} - A_{595(b)})} \times 10^6 \text{ Unidades Arbitrárias (U.A.)}$$

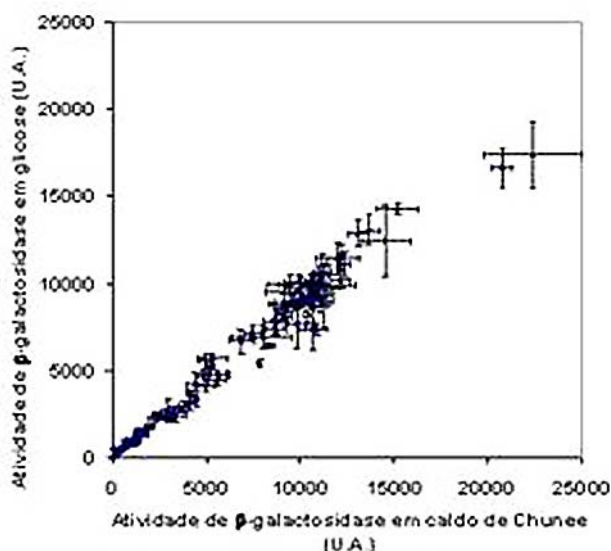


Fig. 2. Repetibilidade do ensaio de atividade de  $\beta$ -galactosidase em *G. diazotrophicus*. O experimento envolveu 96 clones aleatórios de uma biblioteca de promotores da bactéria após cultivo em duas condições bastante similares (presença de caldo de cana de duas variedades, Chune e SP701143).

em ambas as condições, sugerindo que o ensaio pode ser repetido e que, portanto, é válido.

Historicamente, Lederberg (1950) caracterizou a  $\beta$ -galactosidase de *E. coli* e apresentou o substrato cromogênico ONPG, iniciando a realização de ensaios de atividade da enzima. Mais tarde, com o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, ensaios de atividade de  $\beta$ -galactosidase passaram a ser utilizados para estudar a expressão gênica de recombinações (ou fusões) entre seu gene estrutural *lacZ* e genes diversos (MILLER et al., 1970; MILLER, 1972). Desde então, diversos trabalhos têm descrito o uso do gene repórter *lacZ* para estudar a regulação da expressão gênica em eucariotos (BRENT e PTASHNE, 1985; FUERST et al., 1986; TEERI et al., 1989) e procariotos, incluindo bactérias fixadoras de nitrogênio que se associam a plantas (MULLIGAN e LONG, 1985; LIANG, KAMINSKI e EMLMERICH, 1991; SCHWAB et al., 2007a), por meio de ensaios de atividade de  $\beta$ -galactosidase. Para cada organismo, as condições de avaliação (cultivo) e de ensaio enzimático propriamente dito são adaptadas, e o mesmo se deu para *G. diazotrophicus*. Os resultados mostrados neste Comunicado Técnico ilustram que o meio, as condições de cultivo e o ensaio de atividade de  $\beta$ -galactosidase estabelecidos para *G. diazotrophicus* são reprodutíveis,

e, portanto, válidos, sendo de grande valia para quantificar níveis de expressão gênica nessa importante bactéria constituinte do inoculante para cana-de-açúcar da Embrapa.

## Referências Bibliográficas

- BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 29, p. 911-922, 1997.
- BERTALAN, M.; ALBANO, R.; PÁDUA, V. ROUWS, L.; ROJAS, C.; HEMERLY, A.; TEIXEIRA, K.; SCHWAB, S.; ARAUJO, J.; OLIVEIRA, A.; FRANÇA, L.; MAGALHÃES, V.; ALQUÉRES, S.; CARDOSO, A.; ALMEIDA, W.; LOUREIRO, M. M.; NOGUEIRA, E.; CIDADE, D.; OLIVEIRA, D.; SIMÃO, T.; MACEDO, J.; VALADÃO, A.; DRESCHSEL, M.; FREITAS, F.; VIDAL, M.; GUEDES, H.; RODRIGUES, E.; MENESES, C.; BRIOSO, P.; POZZER, L.; FIGUEIREDO, D.; MONTANO, H.; JUNIOR, J.; SOUZA FILHO, G.; FLORES, V. M. Q.; FERREIRA, B.; BRANCO, A.; GONZALEZ, P.; GUILLOBEL, H.; LEMOS, M.; SEIBEL, L.; MACEDO, J.; ALVES-FERREIRA, M.; SACHETTO-MARTINS, G.; COELHO, A.; SANTOS, E.; AMARAL, G.; NEVES, A.; PACHECO, A. B.; CARVALHO, D.; LERY, L.; BISCH, P.; RÖSSLE, S. C.; ÜRMÉNYI, T.; PEREIRA, A. R.; SILVA, R.; RONDINELLI, E.; KRÜGER, W.; MARTINS, O.; BALDANI, J. I.; FERREIRA, P. C. G. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. **BMC Genomics**, London, v. 10, p. 450-466, 2009.
- BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; REIS, V.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. **Plant and Soil**, The Hague, v. 137, p. 111-117, 1991.
- BRENT, R.; PTASHNE, M. A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. **Cell**, Cambridge, v. 43, p. 729-736, 1985.
- CASADABAN, M. J.; COHEN, S. N. Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a *Mu-lac* bacteriophage: *in vivo* probe for transcriptional control sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 76, p. 4530-4533, 1979.



- CAVALCANTE, V. A.; DOBEREINER, J. A new acid tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, The Hague, v. 18, p. 23-31, 1988.
- FUENTES, R. L. E.; JIMINEZ, S. T.; ABARCA, O. I. R.; Caballero, J. *Acetobacter diazotrophicus* an indole acetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. **Plant and Soil**, The Hague, v. 154, p. 145-150, 1993.
- FUERST, T. R.; NILES, E. G.; STUDIER, F. W.; MOSS, B. Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 83, p. 8122-8126, 1986.
- GOMES, A. A.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; REGINA, S. Relação entre distribuição de nitrogênio e colonização por bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p. 1-12, 2005.
- GOPALASWAMY, G.; KANNAIYAN, S.; O'CALLAGHAN, K. J.; DAVEY, M. R.; COCKING, E. C. The xylem of rice (*Oriza sativa*) is colonized by *Azorhizobium caulinodans*. **Proceedings of the Royal Society B**, London, v. 267, p. 103-107, 2000.
- GRIFFITH, K. L.; WOLF JR, R. E. Measuring  $\beta$ -galactosidase activity in bacteria: cell growth, permeabilization, and enzyme assays in 96-well arrays. **Biochemistry and Biophysics Research Communication**, San Diego, v. 290, p. 397-402, 2002.
- KATUPITIYA, S.; NEW, P. B.; ELMERICH, C.; KENNEDY, I. R. Improved  $N_2$  fixation in 2,4-D treated wheat roots associated with *Azospirillum lipoferum*: studies of colonization using reporter genes. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, p. 441-452, 1995.
- LEDERBERG, J. The beta-D-galactosidase of *Escherichia coli*, strain K-12. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 60, p. 381-392, 1950.
- LIANG, Y. Y.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Identification of a *nifA*-like regulatory gene of *Azospirillum brasilense* Sp7 expressed under conditions of nitrogen fixation and in the presence of air and ammonia. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 5, p. 2735-2744, 1991.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms 10<sup>th</sup> edition**. Upper Saddle River: Prentice Hall, Inc., 2003.
- MILLER, J. H. **Experiments in molecular genetics**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972.
- MULLIGAN, J. T.; LONG, S. R. Induction of *Rhizobium meliloti* nodC expression by plant exudate requires nodD. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 82, p. 6609-6613, 1985.
- REIS, M. R.; PERIN, L.; REIS JÚNIOR, F. B. R. Uma nova estratégia para isolar *Gluconacetobacter diazotrophicus* de plantas de cana-de-açúcar. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, 1999. 5 p. (Embrapa Agrobiologia. Comunicado Técnico, 35).
- RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR., V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo *Xanthomonas campertis* pv. citri tipo B. **Summa Phytopathologia**, Botucatu, v. 12, p. 16, 1986.
- SCHWAB, S.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PERSUHN, D. C.; STEFFENS, M. B. R.; CHUBATSU, L. S.; PEDROSA, F. O.; RIGO, L. U. The *glnAntrBC* operon of *Herbaspirillum seropedicae* is transcribed by two oppositely regulated promoters upstream of *glnA*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 53, p. 100-105, 2007a.
- SCHWAB, S.; RAMOS, H. J.; SOUZA, E. M.; CHUBATSU, L. S.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; RIGO, L. U. Identification of  $NH_4^+$ -regulated genes of *Herbaspirillum seropedicae* by random insertional mutagenesis. **Archives of Microbiology**, New York, v. 187, p. 379-386, 2007b.
- SCHWAB, S.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, J. I. Construção de uma biblioteca de promotores de transcrição para estudos de expressão gênica da bactéria endofítica diazotrófica *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, 2008a. 15p. (Embrapa Agrobiologia. Circular Técnica, 24).
- SCHWAB, S.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, J. I. Preparo de caldo de cana-de-açúcar para utilização em meio de cultura de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, 2008b. 4p. (Embrapa Agrobiologia. Comunicado Técnico, 114).

TEERI, T. H.; LEHVASLAIHO, H.; FRANCK, M.; UOTILA, J.; HEINO, P.; PALVA, E. T.; MONTAGU, M. VAN; HERRERA-ESTRELLA, L. Gene fusions to *lacZ* reveal new expression patterns of chimeric genes in transgenic plants. **EMBO Journal**, Oxford, v. 8, p. 343-350, 1989.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen fixation to Sugarcane: Nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science**, Baltimore, v. 56, p. 105-114, 1992.

### Comunicado Técnico, 123

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Agrobiologia**  
**Endereço:** BR465, km7 - Caixa Postal 74505  
CEP 23851-970 - Seropédica/RJ, Brasil  
**Fone:** (21) 3441-1500  
**Fax:** (21) 2682-1230  
**Home page:** [www.cnpab.embrapa.br](http://www.cnpab.embrapa.br)  
**E-mail:** [sac@cnpab.embrapa.br](mailto:sac@cnpab.embrapa.br)  
**1ª edição**

1ª impressão (2009): 50 exemplares

Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento



### Comitê de Publicações

**Presidente:** Norma Gouvêa Rumjanek  
**Secretária-Executiva:** Carmelita do Espírito Santo  
**Membros:** Bruno José Rodrigues Alves, Ednaldo da Silva Araújo, Guilherme Montandon Chaer, José Ivo Baldani, Luis Henrique de Barros Soares.

### Expediente

**Revisão de texto:** Marcia Soares Vidal e Luis Henrique de Barros Soares  
**Normalização bibliográfica:** Carmelita do Espírito Santo  
**Tratamento das ilustrações:** Maria Christine Saraiva Barbosa  
**Editoração eletrônica:** Marta Maria Gonçalves Bahia