

Foto: Yasmine Sayuri Kassuia

COMUNICADO  
TÉCNICO

421

Colombo, PR  
Dezembro, 2018



## Método de DPPH adaptado: uma ferramenta para analisar atividade antioxidante de polpa de frutos da erva-mate de forma rápida e reprodutível

Ana Claudia da Silveira  
Yasmine Sayuri Kassuia  
Rachel Cruz Domahovski  
Marcelo Lazzarotto

# Método de DPPH adaptado: uma ferramenta para analisar atividade antioxidante de polpa de frutos da erva-mate de forma rápida e reprodutível

**Ana Claudia da Silveira**, Farmacêutica, mestranda na UFPR, estagiária de pós-graduação na Embrapa Florestas, Colombo, PR; **Yasmine Sayuri Kassuia**, graduanda em Biotecnologia pela PUC-PR, estagiária de graduação na Embrapa Florestas, Colombo, PR; **Rachel Cruz Domahovski**, graduanda em Farmácia pela UFPR, estagiária de graduação na Embrapa Florestas, Colombo, PR; **Marcelo Lazzarotto**, Químico, doutor em Química, pesquisador da Embrapa Florestas, Colombo, PR.

## Introdução

Os antioxidantes são substâncias produzidas pelo próprio organismo para combater radicais livres. Eles também podem ser obtidos por meio da ingestão de produtos de origem sintética ou natural. Apresentam substituintes doadores de elétrons ou de hidrogênio em sua estrutura, capacidade de ressonância do radical formado ou capacidade quelante de metais. Entre os antioxidantes naturais pode-se citar os tocoferóis, vitamina C, carotenóides e compostos fenólicos (Sucupira, 2012).

Existem diversos métodos desenvolvidos para mensurar a capacidade antioxidante de substâncias presentes nas mais diferentes matrizes. Contudo, procuram-se metodologias simples, de baixo custo e com qualidade de resultados (Palanisamy et al., 2011). Dentre os métodos espectrofotométricos encontram-se

Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP), Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC), ABTS (2,2-AZINO BIS [3-ethylbenzo thiazoline 6 sulfonic acid]) e DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), sendo o último o mais utilizado, pois é adequado para análise de antioxidantes solúveis em meios orgânicos e amplamente aplicado à análise desta atividade em frutas (Sucupira, 2012).

O método de DPPH foi desenvolvido por Blois em 1958. O radical da molécula apresenta cor violeta escuro e, após reação com substância antioxidante, torna-se amarelo ou violeta claro. Consequentemente, a mistura apresenta diminuição da absorbância, que pode ser monitorada por um espectrofotômetro de UV/visível para determinar a capacidade antioxidante da substância testada. Este é um método considerado fácil, preciso, rápido, simples, econômico e apresenta boa estabilidade na ausência da luz (Kedare; Singh, 2011).

O DPPH pode ser solubilizado em metanol ou etanol, sendo mais desejáveis metodologias que utilizam solventes de baixa toxicidade (Oliveira, 2015).

O Trolox é uma substância derivada da vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), solúvel em água e etanol. Por conta do seu potencial antioxidante, ele é capaz de reagir com a molécula de DPPH (Forrest et al., 1994).

Os frutos de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Aquifoliaceae) (erva-mate) são drupas globosas de aproximadamente 6 mm a 8 mm, com coloração violácea a preta quando maduros. São compostos por quatro sementes envolvidas por uma polpa mucilagínosa (Mazuchowski, 1989). Esta polpa é considerada um resíduo do cultivo da espécie, enquanto suas folhas são produzidas e comercializadas em quantidade de aproximadamente 347 toneladas por ano (IBGE, 2018). Contudo, atividades promissoras para o extrato do fruto são conhecidas, dentre elas: molusquicida (Brito et al., 2018), alelopática (Miró et al., 1998), antimicrobiana (Fernandes et al., 2016), entre outras.

Escassos são os métodos descritos na literatura para a análise de antioxidante em extratos de frutos da erva-mate utilizando DPPH. Extratos etanólico acidificado, hidroalcoólico, propano comprimido e CO<sub>2</sub> supercrítico de frutos maduros foram testados em análises de DPPH, por 24 horas de reação, utilizando comprimento de onda de 517 nm para leitura em espectrofotômetro UV/Vis. Para as extrações com propano comprimido e CO<sub>2</sub> supercrítico,

metanol foi utilizado como solvente, enquanto para as demais utilizou-se etanol. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do radical DPPH (Fernandes et al., 2016, 2017). Schubert et al. (2007) testaram uma fração de acetato de etila do extrato de frutos imaturos utilizando etanol como solvente, tempo de reação de 30 minutos, curva de calibração de ácido ascórbico e comprimento de onda de 518 nm. Todos os estudos citados testaram diferentes diluições das amostras.

O objetivo deste trabalho foi adaptar a metodologia de análise de antioxidantes buscando a redução do tempo de reação para 15 minutos, utilizando DPPH e curva de calibração de Trolox em meio etanólico, para avaliação de extratos de frutos da erva-mate.

#### Reagentes necessários:

- DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil) (PM = 394,32).
- Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-etrametilchroman-2-ácido carboxílico) (PM = 250,29).
- Álcool etílico absoluto.

#### Equipamentos e vidrarias:

- Balança analítica.
- Liquidificador doméstico de 1.000 W.
- Tamis de 35 mesh.
- Balão volumétrico de 10 mL, 50 mL e 100 mL.
- Béquer de 50 mL.
- Pipeta volumétrica de 10 mL.
- Frascos de vidro âmbar.

- Tubos de ensaio com capacidade maior de 6 mL.
- Pipeta automática (P100, P1000, P5000).
- Cubetas de vidro (4 cm x 1 cm).
- Espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu 1800.

Para preparar a solução estoque de DPPH, pesou-se em balança analítica 24 mg do reagente. Esta quantidade foi dissolvida em álcool etílico absoluto. O volume foi completado para 100 mL em um balão volumétrico com o mesmo solvente, homogeneizado e transferido para um frasco de vidro âmbar, devidamente identificado. A solução foi armazenada sob refrigeração por até uma semana.

A solução de uso de DPPH foi preparada vertendo-se 10 mL da solução estoque em um balão volumétrico de 100 mL, com o auxílio de uma pipeta volumétrica. O volume foi completado com álcool etílico absoluto. A solução foi homogeneizada e transferida para um frasco de vidro âmbar, devidamente identificado. Ela deve ser preparada e usada apenas no dia da análise.

Para o preparo da solução padrão de Trolox 2 mM, em balança analítica, pesou-se 25 mg de Trolox, o qual foi dissolvido em álcool etílico absoluto. O volume foi completado para 50 mL em um balão volumétrico com o mesmo solvente, homogeneizado e transferido para um frasco de vidro âmbar devidamente identificado. Esta solução foi preparada e usada apenas no dia da análise.

A extração foi realizada utilizando frutos de erva-mate em estágio

semi-maduro (entre o fruto verde, de coloração verde, e o maduro de coloração roxa escura) apresentando coloração vermelha, conforme mostra a Figura 1. Estes foram secos em estufa a 40 °C, por 24 horas, e triturados utilizando liquidificador doméstico de 1.000 Watts. As sementes foram separadas por granulometria, ficando retidas na peneira tamis de 35 mesh. Para a preparação dos extratos foram usadas massas de 3,0 g ± 0,006 g de pó das polpas para 100 mL de água tipo 2. Os extratos foram preparados utilizando maceração a quente (40 °C) e agitação mecânica por 15 minutos, em chapa de aquecimento.



Foto: Décio Adams Júnior

**Figura 1.** Frutos semi-maduros de erva-mate.

Para determinar o tempo de reação ideal entre o DPPH e o extrato, foram realizadas leituras subsequentes utilizando espectrofotômetro de UV visível a 515 nm durante um período de 100 minutos. Ao final da leitura, os resultados foram inseridos em um gráfico, obtendo assim uma curva cinética.

A curva padrão do Trolox inicia-se com o preparo das diluições a partir da solução padrão de Trolox (2 mM). Foram preparadas soluções de concentrações de 50  $\mu\text{M}$  a 1.000  $\mu\text{M}$ , conforme mostra a Tabela 1.

**Tabela 1.** Preparo das soluções para a curva padrão.

Tubo	Solução-padrão de Trolox ( $\mu\text{L}$ )	Álcool etílico absoluto ( $\mu\text{L}$ )	Concentração ( $\mu\text{M}$ )
1	25	975	50
2	50	950	100
3	100	900	200
4	200	800	400
5	300	700	600
6	400	600	800
7	500	500	1.000

A determinação da curva padrão é realizada em ambiente escuro. Para isso, uma alíquota de 150  $\mu\text{L}$  de cada concentração foi transferida para tubos de ensaio e adicionada de 5,850 mL da solução de uso de DPPH. Após homogeneização, a mistura foi mantida em repouso por 15 minutos, tempo determinado na etapa anterior, e 30 minutos, conforme Schubert et al. (2007). Para ambos foi observada a mudança de coloração. A leitura da absorbância foi realizada a 515 nm. Álcool etílico foi usado como branco. Os resultados foram dispostos em gráfico, sendo as concentrações de DPPH dispostas no eixo X e as respectivas absorbâncias no eixo Y. A curva foi realizada em triplicata em dias diferentes, por três analistas distintos (analistas 1, 2 e 3), visando avaliar a reprodutibilidade.

A determinação da atividade antioxidante total (AAT) também é realizada em ambiente escuro. Transferiu-se 150  $\mu\text{L}$  do extrato de fruto da erva-mate para tubos de ensaio contendo 5,850 mL de DPPH, a mistura foi homogeneizada e a absorbância dos tubos (515 nm) foi obtida após 15 e 30 minutos. A reação

foi desenvolvida em triplicata. Álcool etílico absoluto foi utilizado como branco. Um tubo foi preparado com álcool etílico em substituição ao extrato para controle negativo.

A concentração de antioxidantes no tubo de reação  $[CT]$  é expressa em concentração equivalente de Trolox ( $\mu\text{M}$ ). Mediante reta da curva de calibração pode-se calcular o valor  $[CT]$  usando a Equação 1.

$$[CT] = \frac{(Abs_{am} - b)}{a} \quad (1)$$

Sendo:

$Abs_{am}$  = absorbância da amostra.

$a$  = coeficiente angular obtido para a curva de calibração.

$b$  = coeficiente linear obtido para a curva de calibração.

Levando em consideração a quantidade em gramas de polpa utilizada para extração (3 g em 100 mL de água), tem-se a atividade oxi-redox da amostra expressa em equivalente Trolox ( $\mu\text{mol/grama de polpa}$ ) ( $TEAC_m$ ), Equação 2.

$$TEAC_m = [CT] \times \frac{(0,1 L)}{(3 g)} \quad (2)$$

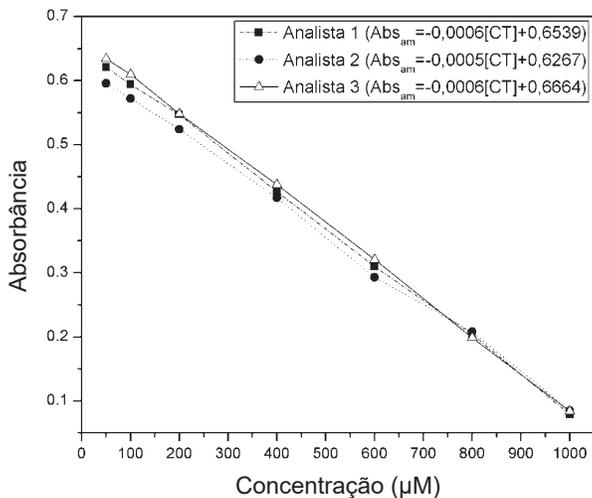
As Curvas de Calibração de Trolox foram obtidas utilizando tempo de reação de 30 minutos, conforme Schubert et al. (2007). As análises foram realizadas em triplicata, por analistas diferentes em dias distintos, sendo obtidos valores de R<sup>2</sup> de 0,9994; 0,9985 e 0,9998 para os analistas 1, 2 e 3, respectivamente, como mostrado na Tabela 2. A média calculada para estes valores foi 0,9992 e o respectivo desvio padrão foi 0,0007. Estes resultados expressam a precisão da equação da reta em representar a variação da absorbância em relação à concentração. Além disso, o desvio padrão obtido entre as leituras das diferentes concentrações nos três dias variou de 0,003 e 0,019, indicando boa reprodutibilidade da curva padrão. Os coeficientes de correlação entre

concentração e absorbância nas três análises foram -0,999, indicando boa relação entre as variáveis. As curvas de calibração são apresentadas na Figura 2.

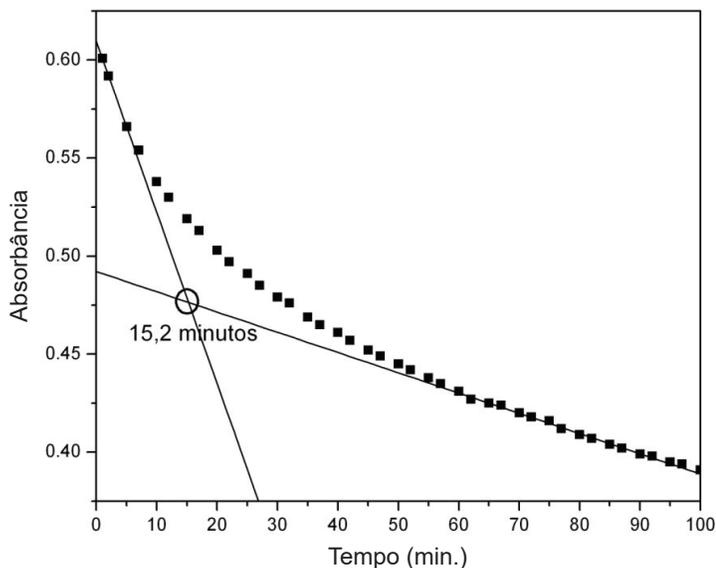
O tempo de reação foi determinado por meio da curva cinética de reação entre o DPPH e o extrato do fruto da erva-mate (Figura 3), sendo possível verificar a mudança de velocidade de reação. Mediante o cruzamento das tangentes do início com o final da reação pode-se determinar o ponto onde se pode aperfeiçoar a análise, visando diminuir o tempo analítico sem perda de qualidade da resposta. Quando esta tendência é avaliada, o ponto de intersecção entre ambas as tangentes se encontra em 15,2 minutos. Assim, pode-se considerar o tempo de reação de 15 minutos suficiente para avaliar os antioxidantes presentes na polpa de erva mate. Na literatura são encontrados

**Tabela 2.** Resultados de absorbância das Curvas de Calibração de Trolox e DPPH utilizando tempo de reação de 30 minutos.

Concentração (µM)	Absorbância				
	Analista 1 / dia 1	Analista 2 / dia 2	Analista 3 / dia 3	Média	Desvio Padrão
50	0,621	0,596	0,634	0,617	0,019
100	0,594	0,572	0,61	0,592	0,019
200	0,547	0,524	0,548	0,540	0,014
400	0,427	0,417	0,438	0,427	0,010
600	0,310	0,293	0,321	0,308	0,014
800	0,204	0,208	0,199	0,204	0,005
1000	0,079	0,085	0,084	0,083	0,003
Coefficiente de Correlação	-0,999	-0,999	-0,999	-0,999	



**Figura 2.** Curvas de calibração obtidas por três analistas, em dias de análise diferentes, utilizando tempo de reação de 30 minutos.



**Figura 3.** Curva cinética de reação entre DPPH e extrato do fruto da erva-mate.

tempos de reação entre DPPH e extrato de frutos da erva-mate de 30 minutos até 24 horas (Schubert et al., 2007; Fernandes et al., 2016, 2017). Desta forma, o uso desta metodologia poderá reduzir o tempo desta análise.

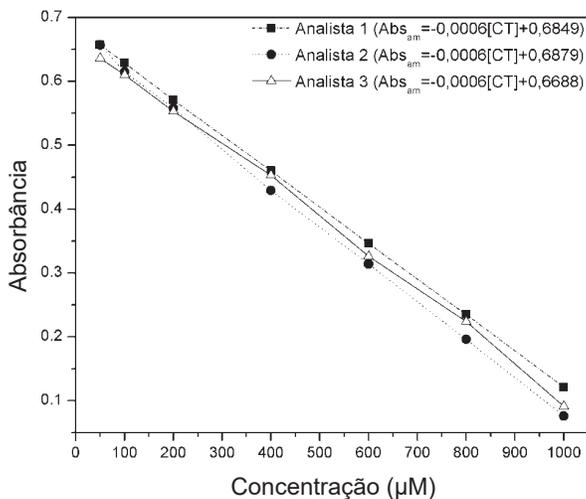
A partir da determinação do tempo de reação de 15 minutos, foram realizadas três análises de curva padrão em dias diferentes, por operadores distintos. Foram obtidos resultados de  $R^2$  nos valores de 0,9999; 0,9995 e 0,9998 para os

analistas 1, 2 e 3, respectivamente, sendo sua média igual a 0,9998 e respectivo desvio padrão de 0,0003 (Tabela 3). Estes resultados indicam boa precisão da equação da reta e, quando comparados aos resultados obtidos para o tempo de 30 minutos ( $R^2 = 0,9994$ ; 0,9985 e 0,9998, média = 0,9992 e desvio padrão = 0,0007), são ainda mais significativos. O desvio padrão obtido entre as leituras nos três dias variou de 0,009 a 0,023. Estes valores indicam boa reprodutibilidade das análises, apesar de inferiores aos das curvas obtidas para 30 minutos (0,003-0,019). Os coeficientes de correlação entre concentração e absorbância para as três análises foi -0,999, similar aos obtidos em 30 minutos. As curvas de calibração obtidas são representadas na Figura 4.

Para a determinação da atividade antioxidante total (AAT), os extratos da polpa dos frutos da erva-mate foram submetidos à reação com DPPH em triplicata, utilizando os tempos de reação de 15 e 30 minutos. As concentrações obtidas foram  $163,72 \pm 26,86 \mu\text{M}$  de Trolox (15 min) e  $184,83 \pm 23,92 \mu\text{M}$  de Trolox (30 minutos). Não há diferença estatisticamente significativa entre os dois resultados, isto é, a utilização de um tempo de reação de 15 minutos não implicou em variações significativas de concentração quando comparado ao tempo de 30 minutos de reação. Considerando as massas de polpa de fruto de erva mate usadas, nos tempos de 15 e 30 minutos de reação, pode-se calcular, usando a Equação 2, o teor de antioxidantes por grama, obtendo-se

**Tabela 3.** Resultados de absorbância das Curvas de Calibração de Trolox e DPPH utilizando tempo de reação de 15 minutos.

Concentração ( $\mu\text{M}$ )	Absorbância				
	Analista 1 / dia 1	Analista 2 / dia 2	Analista 3 / dia 3	Média	Desvio Padrão
50	0,657	0,657	0,636	0,650	0,012
100	0,629	0,615	0,610	0,618	0,010
200	0,571	0,558	0,553	0,561	0,009
400	0,460	0,429	0,453	0,447	0,016
600	0,346	0,314	0,326	0,329	0,016
800	0,235	0,196	0,224	0,218	0,020
1000	0,121	0,076	0,091	0,096	0,023
Coefficiente de Correlação	-0,999	-0,999	-0,999	-0,999	



**Figura 4.** Curvas de calibração obtidas por três analistas, em dias de análise diferentes, utilizando tempo de reação de 15 minutos.

respectivamente os valores de  $5,46 \pm 0,90$   $\mu\text{mol}$  de Trolox (15 minutos) e  $6,16 \pm 0,80$   $\mu\text{mol}$  de Trolox (30 minutos).

Borges et al. (2013) analisaram sucos obtidos utilizando 2 kg de diferentes clones de uva Concord, obtendo resultados entre 12.120,38 e 12.944,86 expressos em  $\mu\text{M}$  de Trolox. Segundo Guerra et al. (2016), o rendimento da extração de sucos de uva é de aproximadamente 50%. Assim, os sucos de uva apresentaram concentração de antioxidantes de 6,06 a 6,47  $\mu\text{mol}$  de Trolox por grama de uva, para os diferentes clones analisados.

Outro estudo utilizando polpa comercial de açaí obteve 117,2  $\mu\text{mol}$  de Trolox por grama de peso fresco do produto (Borges et al., 2016).

Quando comparado a metodologias reportadas na literatura, para análise de antioxidantes em frutos da erva-mate, o método ora proposto apresenta menor

tempo de reação e baixa toxicidade, pois foi utilizada água como líquido extrator e etanol como solvente (Schubert et al., 2007; Fernandes et al., 2016, 2017). Os resultados de teor de antioxidantes por massa de polpa foram semelhantes aos observados por Borges et al. (2013) para os diferentes clones de uva Concord.

## Conclusões

A metodologia adaptada para análise de antioxidantes utilizando DPPH é aplicável para extratos de polpa de frutos da erva-mate. Dentre as vantagens do método estão a redução do tempo de reação e a alta reprodutibilidade verificada para três operadores diferentes, em dias de teste distintos. Além disso, foi utilizado extrato bruto, sem necessidade

de diluição ou fracionamento. Foi usada água como solvente extrator e etanol como solvente nas análises, propiciando menor toxicidade quando comparada ao uso de metanol.

## Referências

- BORGES, R. S.; SILVA, G. A.; ROBERTO, S. R.; ASSIS, M. A.; YAMAMOTO, L. Y. Phenolic compounds, favorable oxi-redox activity and juice color of "Concord" grapevine clones. **Scientia Horticulturae**, v. 161, p. 188-192, 2013. DOI: 10.1016/j.scienta.2013.07.011.
- BORGES, R. S.; TAVARES, E. G.; GUIMARÃES, I. C.; ROCHA, R. P.; ARAUJO, A. B. S.; NUNES, E. E.; BOAS, E. V. B. V. Obtaining a protocol for extraction of phenolics from açai fruit pulp through Plackett–Burman design and response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 210, p. 189-199, 2016. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.04.077.
- BRITO, F. C.; GOSMANN, G.; OLIVEIRA, G. T. Extracts of the unripe fruit of *Ilex paraguariensis* as a potential chemical control against the golden apple snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda, Ampullariidae). **Natural Product Research**, p. 1-4, 2018. DOI: 10.1080/14786419.2018.1443084.
- FERNANDES, C. E. F.; KUHN, F.; SCAPINELLO, J.; LAZZAROTTO, M.; BOHN, A.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; ZANATTA, M. S.; ZANATTA, L.; DAL MAGRO, J.; OLIVEIRA, J. V. Phytochemical profile, antioxidant and hypolipemiant potential of *Ilex paraguariensis* fruit extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 81, p. 139-146, 2016. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.11.078.
- FERNANDES, C. E. F.; SCAPINELLO, J.; BOHN, A.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; DAL MAGRO, J.; PALLIGA, M.; OLIVEIRA, J. V.; TRES, M. V. Phytochemical profile, antioxidant and antimicrobial activity of extracts obtained from erva-mate (*Ilex paraguariensis*) fruit using compressed propane and supercritical CO<sub>2</sub>. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 98-104, 2017. DOI: 10.1007/s13197-016-2440-4.
- FORREST, V. J.; KANG, Y.; MCCLAIN, D. E.; ROBINSON, D. H.; RAMAKRISHNAN, N. Oxidative stress-induced apoptosis prevented by trolox. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 16, n. 6, p. 675-684, 1994. DOI: 10.1016/0891-5849(94)90182-1.
- GUERRA, C. C.; BITARELO, H.; BEN, R. L.; MARIN, A. **Sistema de elaboração de suco de uva integral em pequenos volumes: suquificador integral**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2016. 32 p. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 96).
- IBGE. **Produção da extração vegetal e silvicultura**. Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/289>>. Acesso em: 28 abr. 2018.
- KEDARE, S. B.; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 4, p. 412-422, 2011. DOI: 10.1007/s13197-011-0251-1.
- MAZUCHOWSKI, J. Z. **Manual da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.)**. Curitiba: EMATER-PR, 1989.
- MIRÓ, C. P.; FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia de frutos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no desenvolvimento do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 8, p. 1261-1270, 1998.
- OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 36-44, 2015. DOI: 10.1590/1983-084X/12\_165.
- PALANISAMY, U. D.; LING, L. T.; MANAHARAN, T.; APPLETON, D. Rapid isolation of geraniin from *Nephelema lappaceum* rind waste and its anti-hyperglycemic activity. **Food Chemistry**, v. 127, n. 1, p. 21-27, 2011. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.12.070.

SCHUBERT, A.; PEREIRA, D. F.; ZANIN, F. F.; ALVES, S. H.; BECK, R. C. R.; ATHAYDE, M. R. Comparison of antioxidant activities and total polyphenolic and methylxanthine contents between the unripe fruit and leaves of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. **Pharmazie**, v. 62, n. 11, p. 876-880, 2007.

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263-269, 2012. DOI: 10.17921/2447-8938.2012v14n4p%25p.

Exemplares desta edição  
podem ser adquiridos na:

**Embrapa Florestas**

Estrada da Ribeira, km 111, Guaraituba,  
Caixa Postal 319  
83411-000, Colombo, PR, Brasil  
Fone: (41) 3675-5600  
[www.embrapa.br/florestas](http://www.embrapa.br/florestas)  
[www.embrapa.br](http://www.embrapa.br)  
[www.embrapa.br/fale-conosco/sac](http://www.embrapa.br/fale-conosco/sac)

1ª edição

Versão digital (2018)



MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO

Comitê Local de Publicações  
da Embrapa Florestas

Presidente

*Patrícia Póvoa de Mattos*

Vice-Presidente

*José Elidney Pinto Júnior*

Secretária-Executiva

*Neide Makiko Furukawa*

Membros

*Álvaro Figueredo dos Santos, Gizelda Maia*

*Rego, Guilherme Schnell e Schühli, Ivar*

*Wendling, Luis Cláudio Maranhão Froufe,*

*Maria Izabel Radomski, Marlice Cordeiro*

*Garrastazu, Valderês Aparecida de Sousa*

Supervisão editorial/Revisão de texto

*José Elidney Pinto Júnior*

Normalização bibliográfica

*Francisca Rasche*

Projeto gráfico da coleção

*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica

*Neide Makiko Furukawa*

CGPE 14920