



Boletim Técnico-Científico Insecta

Volume 2 | Número 3
2022

ISSN: 2763-6887

Sobre os Autores:

Malena Andrade Nogueira é Engenheira Agrônoma/UFRB e Mestranda em Ciências Agrárias/UFRB.

Maiara Janine Machado Caldas é Engenheira Agrônoma/UFRB, Mestre em Recursos Genéticos Vegetais/UFRB e Doutoranda em Ciências Agrárias/UFRB.

Emmanuel Emydio Gomes Pinheiro é Médico Veterinário/UFRB, Mestre em Ciência Animal nos Trópicos/UFBA e Doutorando em Ciências Agrárias/UFRB.

Ediane Rodrigues Brito é Agroecóloga/IFBAIANO, campus Uruçuca e Mestranda em Ciências Agrárias/UFRB.

Miriam Monteiro da Costa é Agroecóloga/UFAL e Mestranda em Ciências Agrárias/UFRB.

Jefferson Alves dos Santos é Agroecólogo/IFBAIANO, campus Uruçuca e Mestrando em Ciências Agrárias/UFRB.

Carlos Alfredo Lopes de Carvalho é Engenheiro Agrônomo/UFBA, Mestre em Ciências Agrárias/UFBA e Doutor em Ciências (Entomologia)/USP.

Publicação do Grupo de Pesquisa Insecta do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

PROCEDIMENTOS PARA CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS DE ABELHAS EM GELO

Malena Andrade Nogueira

Maiara Janine Machado Caldas

Emmanuel Emydio Gomes Pinheiro

Ediane Rodrigues Brito

Miriam Monteiro da Costa

Jefferson Alves dos Santos

Carlos Alfredo Lopes de Carvalho

**Sobre o Grupo de
Pesquisa Insecta:**

Continuação dos egressos do Grupo de Pesquisa Insecta durante o período da UFBA (em ordem alfabética) (formação no âmbito do GPI na UFBA e situação atual, quando foi possível obter essa informação): Candice Ferreira de Brito Damasceno (Estágio Voluntário em Entomologia Agrícola, Estágio Curricular Supervisionado e Iniciação Científica_CNPq/FAPESB/UFBA) (Atualmente é Mestre e Advogada); Carlos Augusto Vidal (Estágio Voluntário em Entomologia Agrícola e Monitor de Entomologia Agrícola/UFBA) (Atualmente Mestre e Fiscal da Agência de Defesa Agropecuária da Bahia-ADAB); Carlos Costa Bichara Filho (Mestrado/UFBA) (Atualmente é Doutor e Docente da UEFS); Carlos Henrique Pereira Viana (Estágio Voluntário em Entomologia Agrícola e Mestrado/UFBA); Cecínio dos Santos Neto (Estágio Curricular Supervisionado/UFBA); Cerilene Santiago Machado (Estágio Voluntário em Entomologia Agrícola, Estágio Curricular Supervisionado, Iniciação Científica_CNPq/FAPESB e Estágio Docente/UFBA) (Atualmente é Doutora e ex Bolsista do Programa Nacional de Pós-Doutorado da CAPES); Cosme da Silva Farias (Estágio Curricular Supervisionado/UFBA); Cristovam Alves de Lima Júnior (Estágio Voluntário em Entomologia Agrícola, Estágio Curricular Supervisionado e Iniciação Científica_CNPq/UFBA) (Atualmente é Doutor e Docente do IFBAIANO); Edimilson Santos Silva (Estágio Curricular Supervisionado/UFBA) (Atualmente é Doutor e Docente da UFAL); Edson Fernandes Araújo Macedo (Estágio Curricular Supervisionado/UFBA); Emile Suze da Paz Santos (Estágio Voluntário em Entomologia Agrícola/UFBA) (Atualmente é Doutora e Docente do IFBAIANO); continua no próximo número).

Apresentação

O Boletim Técnico Científico Insecta tem por objetivo divulgar técnicas e informações científicas de aplicação na entomologia e áreas afins, de maneira clara e objetiva, contribuindo para suprir lacunas da literatura brasileira ou ampliando as informações disponíveis sobre temas específicos, focando no estudo dos insetos, seus produtos ou nas suas relações com outras áreas do conhecimento.

Pretende-se colaborar na divulgação de técnicas e ferramentas que ajudem na execução de ensaios técnicos e científicos, assim como, revisões e impressões sobre temas específicos da entomologia e áreas correlatas.

Neste número é abordado o tema PROCEDIMENTOS PARA CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS DE ABELHAS EM GELO, uma importante contribuição para os interessados no desenvolvimento da pesquisa com abelhas.

Conselho Editorial

PROCEDIMENTOS PARA CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS DE ABELHAS EM GELO

Malena Andrade Nogueira^{1*}, Maiara Janine Machado Caldas², Emmanuel Emydio Gomes Pinheiro², Ediane Rodrigues Brito¹, Miriam Monteiro da Costa¹, Jefferson Alves dos Santos¹ & Carlos Alfredo Lopes de Carvalho³

1 Discentes do Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas-BA. <https://orcid.org/0000-0002-4866-6341>; <https://orcid.org/0000-0003-2236-1045>; <https://orcid.org/0000-0002-0360-3435>

2 Discentes do Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas-BA. <https://orcid.org/0000-0002-7000-5750>; <https://orcid.org/0000-0002-6302-2085>

3 Docente da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas-BA. <http://orcid.org/0000-0002-3306-3003>

* Autor correspondente: a.malenanogueira@hotmail.com

Resumo: Neste trabalho foi avaliada diferentes formas de gelo para conservar amostras de abelhas para ensaios científicos.

Palavras-chaves: Bioensaios, conservação de amostras, qualidade das amostras.

Abstract: In this paper, different forms of ice were evaluated to preserve bee samples for scientific tests.

Key words: Bioassays, sample conservation, sample quality.

Os materiais biológicos seguem um ciclo natural de deterioração e alteração irreversível que resulta na interrupção das atividades biológicas essenciais para manutenção da vida. Esses materiais perdem, ao longo do tempo, algumas de suas características. O aprimoramento de protocolos eficazes para a preservação de microrganismos tem sido objeto de pesquisas, onde busca-se métodos de armazenamento de amostras biológicas em diferentes prazos (Neuber et al., 2023).

No contexto da manipulação de amostras biológicas, a atenção especial à estocagem, conservação e manutenção é fundamental para assegurar a integridade desses materiais, que abrangem desde células animais e humanas até material genético como DNA e RNA (Moškrič et al., 2023).

O alvo de qualquer método de manutenção é preservar a viabilidade e principalmente proporcionar estabilidade genética no isolamento, pelo maior tempo possível, evitando assim a ocorrência de mutações que alterem suas características. Além disso, procura-se adequar a escolha de uma técnica de conservação baseando-se nas particularidades do agente, nas características do próprio método a ser aplicado, nos custos de manutenção da técnica, da importância do acervo e principalmente na capacidade laboratorial e disponibilidade de equipamentos (ABREU; TUTUNJI, 2004; GIRÃO et al., 2004).

Considerando as exigências dos microrganismos e o manuseio em laboratórios, a manutenção de genealogias pode ocorrer em curtos períodos, onde as amostras podem ser mantidas a temperaturas relativamente baixas (4 -10°C). Para a coleta de crias anormais, indica-se que a amostra seja acondicionada imediatamente após a coleta (-20°C), mantendo o material em freezer até o envio para o laboratório. O envio deve ocorrer em até 48h, quando a análise for feita em temperatura ambiente (COSTA et al., 2009; TEIXEIRA; MESSAGE, 2010).

A escolha do método de manutenção das amostras biológicas mais adequado deve ser baseada nas características do material a ser conservado, no objeto do estudo, assim como nas vantagens e desvantagens de cada técnica disponível. Estudos com amostras vivas é ainda mais difícil e muitas vezes é necessário o desenvolvimento de novas metodologias. Neste caso, observa-se escassez de publicações científicas voltada para essa temática. Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar diferentes procedimentos de conservação de amostras de abelhas com gelo.

REFERENCIAL TEÓRICO

Para o procedimento de coleta e envio de amostras de abelhas depende do objetivo das análises. Para estudo sobre a saúde das abelhas uma das recomendações é a coleta em torno de 20 abelhas de cada colmeia com no mínimo, cinco amostras (colmeias) por apiário; as amostras devem ser armazenadas em potes fechados com furos suficientes para ventilação (fazer com prego aquecido, por exemplo); identificar as amostras com número referente à colmeia e as iniciais do produtor; congelar os potes imediatamente após a coleta; as abelhas devem ser congeladas ainda vivas e as amostras devem permanecer no congelador por um período mínimo de 8 horas; acondicionar as amostras em caixa de isopor, junto a embalagens de gelo descartável, para encaminhamento a transportadora ou técnico responsável pelo envio (TEIXEIRA; MESSAGE, 2010).

A manutenção dessas amostras sob resfriamento durante as 48h de transporte depende da capacidade do gelo utilizado. A recomendação dos laboratórios é de utilização do gelo descartável. Buscando-se diferentes opções de manutenção da temperatura foram criados três tratamentos com composições de gelo distintas, sendo elas, gelo comum (água congelada), gelo com algodão (50% de água e 50% de algodão) e gelo em gel (composto de Ágar Batata Dextrose-BDA e Glicerina).

Glicerina

A glicerina é um líquido viscoso e incolor, de paladar adocicado e higroscópico à temperatura ambiente. Ocorre naturalmente em formas combinadas como acilglicerídeos em

todos os óleos graxos de origem animal e vegetal. É raramente encontrada no estado livre em óleos e gorduras e está presente em todas as células animais e vegetais na forma de lipídios, como a lecitina e as cefalinas (KNOTHE et al., 2006).

O termo glicerol aplica-se somente ao composto puro 1,2,3-propanotriol, enquanto o termo glicerina aplica-se aos produtos comerciais purificados que normalmente contêm quantidades maiores ou iguais a 95% de glicerol. Vários tipos de glicerina estão disponíveis comercialmente. Eles diferem um pouco em seu conteúdo de glicerol e em outras características como cor, odor e teor de impurezas (KNOTHE et al., 2006).

O glicerol possui total solubilidade com a água e pode ser usado como aditivo anticongelante aplicado como fluido refrigerante secundário, em sistemas de refrigeração indireta e com termoacumulação. A total solubilidade do glicerol na água pode provocar alterações no ponto de congelamento da solução: surge então a aplicação do glicerol como agente anticongelante (FINK, 2003).

Há centenas de usos para a glicerina em uma ampla variedade de produtos, como cosméticos (eg.: pasta de dente), alimentos, fármacos, espumas de uretano e resinas sintéticas (KNOTHE et al., 2006).

Meio de cultura: Ágar Batata Dextrose - BDA

O Ágar Batata Dextrose - BDA é um meio de cultura em conformidade com as especificações da Farmacopeia Brasileira, recomendado para uso no desempenho de testes de limite microbiano. O Ágar Batata Dextrose é usado para o cultivo e enumeração de fungos. Este meio também é recomendado pela *American Public Health Association* para contagem em placas de bolores e leveduras em análise de alimentos e laticínios (VIEIRA, 2012).

Devido às grandes variações das necessidades nutritivas dos microrganismos, os meios de cultura são bastante diferentes em sua composição. Quanto ao estado físico, podem ser sólidos – apresentam em sua composição de 1,5 a 2,5% de ágar ou semissólidos – apresentam em sua composição até 1% de ágar. De acordo com a sua composição e os objetivos a que se destinam, os meios de cultura podem receber uma outra classificação, nesse caso, de transporte - são aqueles utilizados para o armazenamento e manutenção temporária de determinado material, cuja principal função é manter a viabilidade dos possíveis microrganismos presentes (VIEIRA, 2012).

Para fins de transporte, o produto pode permanecer em temperatura ambiente por até 72h. No laboratório as placas devem ser armazenadas em temperatura de 2 a 25°C, condições em que se mantêm estáveis. O uso de refrigerador tipo *frost-free* não é recomendado para meios de cultura devido ao efeito desidratante deste tipo de equipamento. Considerando que este produto

é gelatinoso e sua composição pode apresentar até 80% de água, podendo condensar ao sofrer variações de temperatura (quente-frio ou frio-quente) (VIEIRA, 2012).

Neste contexto, optou-se por utilizar as propriedades do meio de cultura BDA e da Glicerina para criar um Gelo em gel (semissólido).

DETALHAMENTO DO EXPERIMENTO

Os ensaios experimentais foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia Aplicada aos Insetos e seus Produtos, do Grupo de Pesquisa INSECTA, da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB).

Foram utilizados três tipos de gelos diferentes, preparados no mesmo dia e mantidos em Freezer -80°C para congelamento por 24 horas. Cada gelo representou um tratamento: T1 - Gelo comum (Gelo de água encanada); T2 - gelo em gel (BDA + Glicerina); e T3- Gelo com algodão (Algodão + água encanada).

Preparação dos gelos

T1 - Gelo comum: o preparo do gelo consistiu em colocar 300ml de água comum em um saco plástico, transparente, selado com seladora manual com temporizador. Posteriormente, 30 unidades de microtubos de 2 ml com as abelhas foram colocados dentro de um saco plástico, fechado e dispostos sobre o saco com água. Depois que as amostras já estavam dispostas, outro saco plástico de igual tamanho foi posto sobre os microtubos e levados para congelar em freezer.

T2 - Gelo em gel: o gelo em gel foi feito com BDA (batata-dextrose-ágar) comercial e glicerina, onde 3g de BDA foi colocado em um Becker com 100ml de água destilada e aquecido até ferver dissolvendo completamente o mesmo. Depois da fervura foi acrescentado ao meio de cultura 110g de glicerina diluída em 500ml de água destilada e adicionada ao meio de cultura. A mistura foi esterilizada em autoclave a 121°C por 15 minutos e depois resfriada em temperatura ambiente. Posteriormente o composto foi colocado em saco de plástico transparente fechado com seladora manual. Depois 30 unidades de microtubos de 2 ml com abelhas foram colocados dentro de um saco de plástico, fechado e dispostos sobre o saco contendo gelo em gel. Em seguida, outra embalagem do gelo em gel foi posta sobre os microtubos e levados para congelamento em freezer.

T3 - Gelo com algodão: o preparo do gelo consistiu em colocar uma manta de algodão sobre uma bandeja plástica de laboratório. Posteriormente, 30 unidades de microtubos de 2 mL cm cada, contendo as abelhas, foram colocados dentro de um saco plástico, fechado e acomodados dentro da manta de algodão e em seguida outra manta foi posta sobre a anterior.

Depois foi acrescentado 2,5 litros de água encanada na bandeja plástica, o conjunto foi levado para congelar em freezer.

Aferição da Temperatura

Cada gelo foi colocado em caixa de isopor com termômetro digital para monitoração da temperatura durante 48h, sendo que as avaliações ocorreram inicialmente com intervalo de 6h até as 24h. A partir desse tempo as avaliações passaram a cada 3h até atingir as 48h. Os diferentes tipos de gelo foram acondicionados em caixas de isopor com um termômetro no seu interior, conforme Figura 1. A temperatura do interior de cada caixa de isopor foi mensurada quando foi colocado o gelo (tempo 0) e nos intervalos de tempo 6, 12, 18, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45 e 48h, após o acondicionamento dos tratamentos.

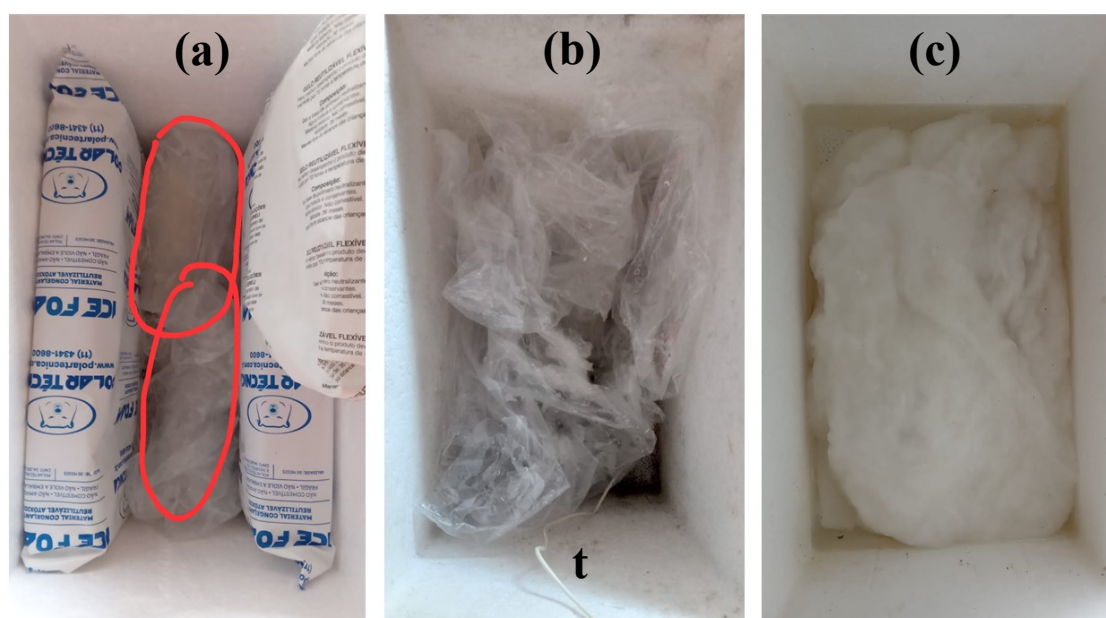


Figura 1. Os diferentes tipos de gelo acondicionados em caixas de isopor: (a) T2 – Gelo em gel; (b) T1 – Gelo comum; (c) T3 – Gelo com algodão. t = detalhe o termômetro (Acervo Insecta, 2022).

Análise estatística

Os resultados foram submetidos a análise de variância e como não seguiram os critérios de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias para realização de análise paramétrica. Foi aplicado o teste não-paramétrico de Friedman por se tratar de dados pareados com medidas repetidas ao longo do tempo (SHELDON et al., 1996), testando a hipótese nula de que as medianas dos diferentes tratamentos são iguais ($p > 0,05$).

Deste modo, os diferentes tipos de gelo foram considerados como variável independente, os horários de avaliação de temperatura como fator e a temperatura como variável dependente.

Quando foi encontrada diferença significativa entre os tipos de gelo pelo teste de Friedman, foi aplicado o teste post-hoc de Nemenyi com ajustes do p-valor pelo método de Bonferroni, para identificar as diferenças entre os tipos de gelo. As análises foram realizadas utilizando o *Software* estatístico R (R Core Team, 2022).

DISCUSSÃO

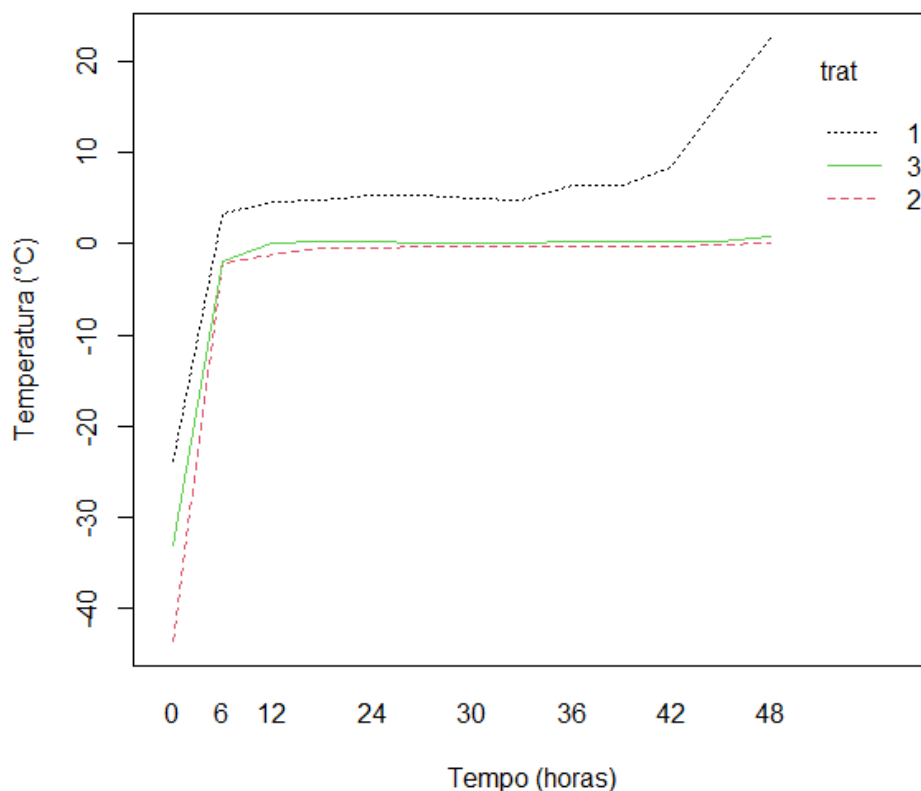
As medições de temperatura nas primeiras 24 horas resultaram nos dados expostos na Tabela 1. Evidencia-se a diferença entre os tratamentos logo após o congelamento e início das medições. O gelo em gel (T2) foi o que alcançou menor temperatura inicial (-43,6°C) e mesmo após as 24h ainda permanecia com temperaturas abaixo de 0°C dentro do isopor. Após o período de 24 horas o T2 Gelo em gel ainda apresentou temperaturas negativas e/ou muito próximas de 0°C, quando atingiu esse valor no final das 48h.

Tabela 1. Variação da temperatura no interior das caixas de isopor até as 48h, após o acondicionamento dos tratamentos: T1 - Gelo comum; T2 - Gelo em gel; T3 - Gelo com algodão.

Medição	T1	T2	T3
0h	- 23,9°C	- 43,6°C	- 33,1°C
6h	+ 3,4°C	- 2°C	- 1,9°C
12h	+ 4,7°C	- 1,2°C	+ 0,1°C
18h	+ 4,8°C	- 0,4°C	+ 0,2°C
24h	+ 5,4°C	- 0,4°C	+ 0,2°C
27h	+5,3°C	-0,3°C	+0,1°C
30h	+5,0°C	-0,3°C	+0,1°C
33h	+4,8°C	-0,3°C	+0,1°C
36h	+6,4°C	-0,3°C	+0,2°C
39h	+6,4°C	-0,2°C	+0,3°C
42h	+8,4°C	-0,2°C	+0,3°C
45h	+15,8°C	-0,1°C	+0,3°C
48h	+22,6°C	0,0°C	+0,8°C

A curva de aquecimento nos diferentes tratamentos ao longo do tempo revelou diferenças, a partir das 6 horas do experimento (Figura 2). O aumento da temperatura no T1 – Gelo comum foi maior que os outros tratamentos, tornando-o menos eficaz na conservação das amostras após as 24 horas.

Figura 2. Curva de aquecimento no interior das caixas de isopor até as 48h, após o acondicionamento dos tratamentos: T1 – Gelo comum; T2 – Gelo em gel; T3 – Gelo com algodão.



A variação de temperatura no interior das caixas de isopor nos três tratamentos demonstrou que os tratamentos T2 e T3 obtiveram os melhores resultados com menor variação das temperaturas, ou seja, maior eficácia para intervalos de conservação da amostra acima de 6 horas (Figura 3).

De acordo com o teste de Friedman, há diferença significativa entre os tratamentos em relação a variação de temperatura ao longo do tempo ($\chi^2=26$, $df= 2$, $p<0,01$). As diferenças foram confirmadas pelo teste de post-hoc de Nemenyi, sendo significativa todas as interações entre os tratamentos (Tabela 3).

Deste modo, o tratamento T2, gelo em gel, produzido com meio de cultura BDA + glicerina, obteve a menor variação de temperatura ($M_d= -0,3$, $iqr=0,2$), seguido pelo tratamento com gelo produzido com algodão ($M_d= 0,2$, $iqr=0,2$). O tratamento com gelo comum teve a maior variação de temperatura ($M_d= 5,3$, $iqr=1,6$).

Figura 3. Variação da temperatura no interior das caixas de isopor nos diferentes tratamentos: T1- Gelo comum; T2- Gelo em gel; T3- Gelo com algodão.

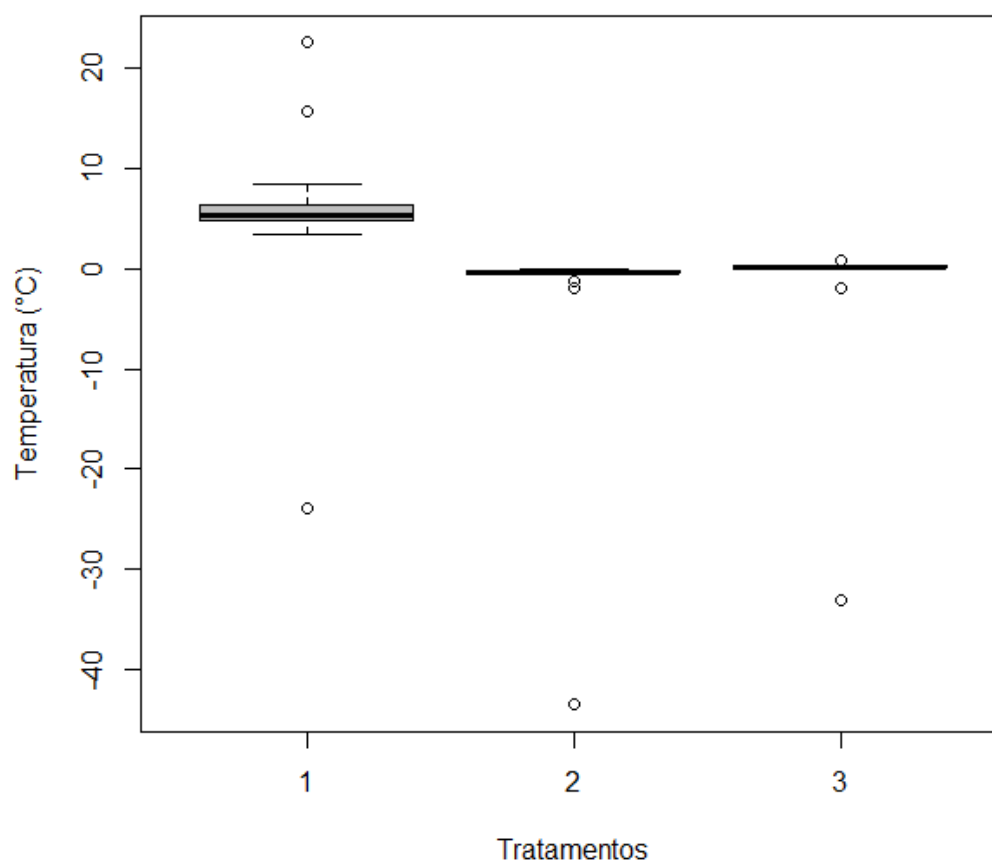


Tabela 3. Comparações de pares usando o teste Nemenyi de todos os pares com valores de p ajustados pelo método de Bonferroni.

	T1: Gelo comum	T2: Gelo em gel
T2: Gelo em gel	p<0,01	-
T3: Gelo com algodão	p=0,029	p=0,029

Neste trabalho ficou evidente que as propriedades da glicerina e do meio de cultura BDA foram eficientes para a composição de um gelo semissólido. Esse gelo auxiliou na manutenção da temperatura para conservação das amostras de abelhas pelo período mínimo de 24 horas em temperaturas abaixo de 0°C, mostrando-se eficiente até as 48h, quando atingiu zero grau. A análise comparativa confirmou a melhor performance do gelo em gel frente ao gelo comum e ao gelo em algodão.

Agradecimentos

Aos Consultores *ad hoc* pelas contribuições no texto final. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Código de Financiamento 01, pelas bolsas de pós-graduação concedida à MAN, MJMC, ERB e MMC. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por meio dos Processos 406973/2021-0 e 305950/2021-5.

Referências Bibliográficas

ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB. *Universitas: Ciências da Saúde*, Brasília, v.02 n.2, p. 236-25, 2004

FINK, J. K. *Oil Field Chemicals*. Burlington-MA, USA: Gulf Professional Publishing, 2003.

GIRÃO, M. D.; PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Rio de Janeiro, v.37, n.3, p. 229-233, 2004.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L.P. *Manual de Biodiesel*. São Paulo: Edgard Blücher Editora, 2006.

MOŠKRIČ, A.; PAVLIN, A.; MOLE, K.; MARINČ, A.; BUBNIČ, J.; OPARA, A.; ... & PREŠERN, J. Cutting corners: The impact of storage and DNA extraction on quality and quantity of DNA in honeybee (*Apis mellifera*) spermatheca. *Frontiers in Physiology*, v.14, p.300, 2023.

NEUBER, A. C.; KOMOTO, T. T.; DA SILVA, E. C. A.; DUVAL, V. D. S.; SCAPULATEMPO-NETO, C.; MARQUES, M. M. Quality Assessment of Cryopreserved Human Biological Samples from the Biobank of Barretos Cancer Hospital. *Biopreservation and Biobanking*, v. 21, n. 1, p. 74-80. 2023.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2022. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 06 de dez de 2022.

SHELDON, M. R.; FILLYAW, M. J.; THOMPSON, W. D. O uso e interpretação do teste de Friedman na análise de dados de escala ordinal em projetos de medidas repetidas. *Physiotherapy Research International*, v. 1, n. 4, pág. 221-228, 1996.

TEIXEIRA, E. W.; MESSAGE, D. Abelhas: *Apis mellifera*. In: __ Manual de colheita e envio de amostras. Organização Pan Americana da Saúde, 2010.

VIEIRA, D.A.P. *Microbiologia Aplicada*. Inhumas: IFG; Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2012.



**Boletim Técnico-Científico
Insecta, v.2, n. 3, 2022**

Esta publicação está disponível no
endereço:
<https://www.ufrb.edu.br/boletiminsecta>

1ª Edição
Versão eletrônica (2021)

Grupo de Pesquisa Insecta, CCAAB,
UFRB, Rua Rui Barbosa, 710 - Centro -
Cruz das Almas/BA - 44.380-000

Conselho Editorial:

Carlos Alfredo Lopes de Carvalho
Edilson Divino Araújo
Geni da Silva Sodré
Gilberto Marcos de Mendonça Santos
Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa
Reginaldo Barros
Yzila Liziane Farias Maia de Araújo
Zuleide Silva de Carvalho