



**INSTITUTO FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CAMPUS CABEDELO**  
**CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**FÁBIO GABRIEL DE LIMA MELLO**

**Óleo essencial de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants:  
Atividade antifúngica *in vitro* em cepas de *Sporothrix brasiliensis***

**CABEDELO - PB**

**2024**



**INSTITUTO FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CAMPUS CABEDELO**  
**CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**FÁBIO GABRIEL DE LIMA MELLO**

**Óleo essencial de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants:  
Atividade antifúngica *in vitro* em cepas de *Sporothrix brasiliensis***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba (IFPB), *Campus* Cabedelo, como requisito para conclusão do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas.  
**Orientadora:** Dr<sup>a</sup> Patrícia Fabian de Araújo Diniz

**CABEDELO - PB**

**2024**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação – (CIP)  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba – IFPB

---

M527o Mello, Fábio Gabriell de Lima.

Óleo essencial *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants: Atividade antifúngica *in vitro* em cepas de *Sporothrix brasiliensis* / Fábio Gabriell de Lima Mello – Cabedelo, 2024.  
35 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Instituto Federal de Educação,  
Ciência e Tecnologia da Paraíba – IFPB.  
Orientadora: Profa. Dr. Patrícia Fabian de Araújo Diniz.

1. Fungicida. 2. Ascaridol. 3. Mastruz. I. Título.

CDU 661.163

# FÁBIO GABRIELL DE LIMA MELLO

## Óleo essencial de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants: Atividade antifúngica *in vitro* em cepas de *Sporothrix brasiliensis*

APROVADA EM: 27/02/2024

Cabedelo, 02 de Abril de 2024.

### BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente

gov.br

PATRICIA FABIAN DE ARAUJO DINIZ

Data: 27/08/2024 19:56:02-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. (Dr<sup>a</sup>. Patrícia Fabian de Araújo Diniz)

Orientador – Instituto Federal de Ciência e Tecnologia da Paraíba - IFPB

Documento assinado digitalmente

gov.br

DANIEL CEZAR DA SILVA

Data: 20/08/2024 11:15:01-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. (Dr. Daniel César da Silva)

Membro interno – Instituto Federal de Ciência e Tecnologia da Paraíba - IFPB

Documento assinado digitalmente

gov.br

MARIA ANGELICA RAMOS DA SILVA

Data: 20/08/2024 08:14:37-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. (Dr<sup>a</sup>. Maria Angélica Ramos da Silva)

Membro interno – Instituto Federal de Ciência e Tecnologia da Paraíba - IFPB

Documento assinado digitalmente

gov.br

FELIPE QUEIROGA SARMENTO GUERRA

Data: 22/08/2024 06:36:44-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. (Dr. Felipe Queiroga Sarmiento Guerra)

Membro externo – Universidade Federal da Paraíba

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico essa pesquisa ao meu pai Fábio da Silva Mello, que infelizmente não se encontra mais em vida para me ver crescendo na vida. Onde quer que esteja, sei que estás orgulhoso das minhas conquistas.*

## **AGRADECIMENTOS**

A presente pesquisa deste Trabalho de Conclusão de Curso contou com a parceria de diversas pessoas, dentre as quais agradeço:

Aos representantes, técnicos e colaboradores do Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises (LMCA) e Fitoquímica da Universidade Federal da Paraíba, Dr. Yuri Manguiera, Dr. Josean Fachine, Me. Anauara Lima, Dr. Marcelo Felipe, Marcelo Sobral, Dr. Evandro da Silva, Nonato. Ao Fernando Viana, coordenador do canteiro medicinal.

Aos representantes do Laboratório de Micologia Clínica da Universidade Federal da Paraíba, Dr. Felipe Guerra, Larissa Alves e Laísa Vilar.

A minha orientadora Patrícia Fabian de Araújo Diniz, por ter abraçado a ideia desde o começo e juntos compartilhamos conhecimento, desabafos, tristezas e alegrias.

A minha casa de formação Instituto Federal da Paraíba, *Campus Cabedelo*.

Ao CNPq pelo financiamento desta pesquisa.

Aos meus amigos que fui presenteado no princípio de tudo na empreitada acadêmica, parceiros de viagens de Santa Rita com sentido à Cabedelo Ana Beatriz, Thayná Nóbrega, Thamara Mayni e Ryan Vieira, à vocês, meu total agradecimento por tudo que passamos juntos nesses 4 longos anos, alegrias, choros, desentendimento e livramentos. No entrelaçar desse caminho, conheci novos amigos, Milani Santos, Apolo Camilo, Matheus Santos, Nely Fischer, Lucas Santos, Tcharles Rennan e Juliana Targino.

Aos meus amigos de infância, adolescência e da vida, Joane Micaele, Nathalia Nóbrega, Emily Evely, Larissa Gomes, Ana Kalyne, Aline, Amanda e Alice Morais, Rachel Santos, Brenda Darly, Victor Santos.

À minha família, Alana Mello, Gizélia Vieira, Fátima Tomaz, Eliane Silva, Luciana Vieira, Juvenal Oliveira, Everardo Paulo por todo apoio.

## RESUMO

*Sporothrix* spp. é um fungo dimórfico e termotolerante que agrupa pelo menos seis espécies de importância clínica, como *S. schenckii*, *S. brasilienses*, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. albicans* e *S. lurie*, agente etiológico da esporotricose. A doença é tratada, comumente, através do antifúngico itraconazol, que além de ser um tratamento oneroso e de longo prazo, causa diversos efeitos colaterais em humanos e felinos, acarretando ainda efeitos hepatotóxicos. Desse modo, pesquisas fitoquímicas tem sido realizadas para buscar possíveis tratamentos alternativos para tratar a esporotricose. *Dysphania ambrosioides* (L.), conhecida como mastruz, erva medicinal que apresenta propriedades contra fungos que atuam como patógenos de plantas e também de animais. Seu óleo essencial (OE) possui três compostos químicos majoritários, ascaridol,  $\alpha$ -terpineno e  $\rho$ -cimeno, os quais podem responder por suas propriedades medicinais, não descartando o sinergismo com os demais compostos presentes no OE. A presente pesquisa objetivou realizar a extração e a análise do perfil químico do OE oriundo de partes aéreas de mastruz, além de proceder à avaliação da atividade antifúngica deste OE em cepas de *S. brasiliensis*. Foram coletadas partes aéreas de mastruz em dois períodos distintos: período seco (janeiro/2023) período chuvoso (junho/2023). O material vegetal coletado no período seco apresentava-se em fase de floração, enquanto o material vegetal coletado no período chuvoso apresentava quantidades significativas de sementes maduras e frutos, evidenciando plantas em final de ciclo de vida. Este material foi processado para extração dos OE's por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger. Os rendimentos dos OE's foram calculados. O perfil químico dos OE's foram obtidos por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria De Massas (CG-EM). Foram realizados ensaios microbiológicos com finalidade de determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM). Os rendimentos dos OE's de plantas coletadas em janeiro/2023 e junho/2023 foram de 0,5% e 0,4%, respectivamente. Os compostos majoritários foram ascaridol (58,86%),  $\alpha$ -terpineno (22,09%) e  $\rho$ -cimeno (11,36%) para o OE obtido de plantas coletadas no período chuvoso; para o OE extraído de plantas coletadas no período seco foram  $\alpha$ -terpineno (46,81%), ascaridol (34,82%) e  $\rho$ -cimeno (11,54%). Os OE's foram testados contra seis cepas do *S. brasiliensis*. Os OE's obtidos de plantas coletadas no período chuvoso e no período seco mostraram CIM de 16  $\mu\text{g/mL}$  para a maioria das cepas testadas. Quanto à CFM, os OE's de ambos os períodos mostraram valores de 64  $\mu\text{g/mL}$  para a maioria das cepas testadas. A razão CFM/CIM apresentou valor igual a quatro para a maioria das cepas, evidenciando a atividade fungicida destes OE's. Concluiu-se que o OE de *D. ambrosioides* (L.) é um potencial agente fungicida contra o *S. brasiliensis*, podendo ser um adjuvante ao tratamento com itraconazol. Maiores porcentagens de ascaridol foram encontradas em OE de mastruz coletado em estágio de desenvolvimento com maior produção de sementes; já as maiores porcentagens de  $\alpha$ -terpineno foram encontradas em OE de mastruz coletado quando as plantas estavam na fase de produção de flores. Desta forma, tanto a sazonalidade quanto o estágio de desenvolvimento da planta podem interferir em seu perfil químico. Ressalta-se que este trabalho mostrou a primeira atividade *in vitro* antifúngica e fungicida do OE de *D. ambrosioides* (L.) frente às cepas de *S. brasiliensis*

**Palavras chave:** Alternativa terapêutica, Ascaridol, Esporotricose, Fungicida, Mastruz.

## ABSTRACT

*Sporotrix spp.* is a dimorphic and thermotolerant fungus that groups at least six species of clinical importance, such as *S. schenckii*, *S. brasilienses*, *S. globosa*, *S. americana*, *S. albicans* and *S. lurie*, the etiological agent of sporotrichosis. The disease is commonly treated with the antifungal itraconazole, which, in addition to being an expensive and long-term treatment, causes several side effects in humans and felines, also causing hepatotoxic effects. Therefore, phytochemical research has been carried out to search for possible alternative treatments to treat sporotrichosis. *Dysphania ambrosioides* (L.), known as mastruz, a medicinal herb that has properties against fungi that act as pathogens of plants and animals. Its essential oil (EO) has three main chemical compounds, ascaridol,  $\alpha$ -terpinene and  $p$ -cymene, which may account for its medicinal properties, not ruling out synergism with the other compounds present in EO. The present research aimed to carry out the wear and analysis of the chemical profile of the EO from the aerial parts of the mastruz, in addition to evaluating the antifungal activity of this EO in strains of *S. brasiliensis*. Mastruz aerial parts were collected in two distinct periods: dry period (January/2023) and rainy period (June/2023). The plant material collected in the dry period was in the sulfur phase, while the plant material collected in the rainy period showed significant details of mature seeds and fruits, showing plants at the end of their life cycle. This material was processed to eliminate EOs by hydrodistillation in a Clevenger-type device. EO yields were calculated. The chemical profile of the EOs were obtained by Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry (GC-MS). Microbiological tests were carried out to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicide Concentration (CFM). The yields of plant EOs collected in January/2023 and June/2023 were 0.5% and 0.4%, respectively. The major compounds were ascaridol (58.86%),  $\alpha$ -terpinene (22.09%) and  $p$ -cymene (11.36%) for the EO obtained from plants collected in the rainy season; for the EO extracted from plants collected in the dry period were  $\alpha$ -terpinene (46.81%), ascaridol (34.82%) and  $p$ -cymene (11.54%). The EOs were tested against six strains of *S. brasiliensis*. The EO results of plants collected in the rainy season and dry season showed MIC of 16  $\mu\text{g/mL}$  for most of the strains tested. As for CFM, the OE's from both periods showed values of 64  $\mu\text{g/mL}$  for most of the strains tested. The CFM/MIC ratio presented a value equal to four for most strains, demonstrating the fungicidal activity of these EOs. It is concluded that the EO of *D. ambrosioides* (L.) is a potential fungicidal agent against *S. brasiliensis*, and could be an adjuvant to treatment with itraconazole. Higher percentages of ascaridol were found in OE of mastruz collected at a development stage with greater seed production; The highest percentages of  $\alpha$ -terpinene were found in mastruz EO collected when the plants were in the flower production phase. Therefore, both seasonality and the plant's development stage can affect its chemical profile. It is noteworthy that this work showed the first *in vitro* antifungal and fungicidal activity of the EO of *D. ambrosioides* (L.) against strains of *S. brasiliensis*

**Keywords:** Ascaridole, Fungicide, Mastruz, Sporotrichosis, Therapeutic alternative

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Ramos aéreos de *Dysphania ambrosioides* (L.) oriundas do horto medicinal do IPeFarM .....6
- Figura 2:** Cromatograma de íons totais do óleo essencial oriundo de partes aéreas de *D. ambrosioides* (L.) coletadas no mês de janeiro/2023 em João Pessoa, Paraíba..... 7
- Figura 3:** Cromatograma de íons totais do óleo essencial oriundo de partes aéreas de *D. ambrosioides* (L.) coletadas no mês de junho/2023 em João Pessoa, Paraíba..... 7
- Figura 4:** Variação dos compostos majoritários presentes nos óleos essenciais oriundos de partes aéreas de *Dysphania ambrosioides* (L.) coletadas nos meses de janeiro e junho de 2023 em João Pessoa, Paraíba.....8
- Figura 5:** Mecanismo proposto por Dembtsky *et al.* (2008) para formação de ascaridol e outros monoterpenóides no gênero *Chenopodium* (*Dysphania*) ..... 10

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Perfil Químico dos óleos essenciais de partes aéreas de <i>Dysphania ambrosioides</i> (L.) por CG-MS coletadas nos meses de janeiro e junho de 2023 em João Pessoa, Paraíba.....	8
<b>Tabela 2:</b> Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM <sub>90</sub> ) em µg/mL dos óleos essenciais e do antifúngico itraconazol sobre as cepas de <i>Sporothrix brasiliensis</i> e <i>Candida parapsilosis</i> .....	11
<b>Tabela 3:</b> Concentrações Fungicidas Mínimas (CFM) em µg/mL dos óleos essenciais e do antifúngico itraconazol sobre as cepas de <i>Sporothrix brasiliensis</i> e <i>Candida parapsilosis</i> .....	13
<b>Tabela 4:</b> Razão entre a CFM e a CIM para as cepas de <i>Sporothrix brasiliensis</i> que exibiram maior sensibilidade aos óleos essenciais testados, ou seja, menor valor de CIM.....	14

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	1
MATERIAIS E MÉTODOS .....	3
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	5
CONCLUSÃO .....	14
REFERÊNCIAS.....	15

## INTRODUÇÃO

*Sporothrix* spp. é um fungo saprofítico de distribuição geográfica mundial que compõe o complexo *Sporothrix schenckii* que agrupa, pelo menos seis espécies de importância clínica, sendo elas: *S. schenckii*, *S. brasilienses*, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. albicans* e *S. luriei* (Marimon, *et al.*, 2006 & Marimon *et al.*, 2007). Estes fungos são dimórficos termolerantes, possuindo aspectos micro e macromorfológicos diferentes, variando de acordo com a temperatura. Assim, quando em temperaturas de aproximadamente 25°C apresentam-se em forma micelial, filamentosa e de vida saprofítica; em contrapartida, quando a temperatura encontra-se em torno de 37°C podem apresentar a fase leveduriforme de vida parasitária (Carlos *et al.*, 2009). Além disso, são fungos patogênicos causadores de uma doença denominada esporotricose. Tais fungos encontram-se presentes no solo, em vida saprofítica, ou seja, na forma filamentosa, além de também serem encontrados em plantas, cascas de árvores e material em decomposição, estando preferencialmente em ambientes tropicais e úmidos (Nunes; Escosteguy, 2005 & Marimon *et al.*, 2007).

A esporotricose é uma micose zoonótica cutânea ou sistêmica, a qual acomete os seres humanos e animais e cujo contágio se dá através do contato com secreções de lesões, arranhaduras ou mordeduras de animais, tendo como agente etiológico o *Sporothrix* spp. Segundo Silva *et al.*, (2012), a esporotricose é considerada doença negligenciada, com ocorrência em localidades que apresentam condições sanitárias inadequadas. Além disso, essa zoonose é de difícil controle, devido à falta de informações e conhecimento da população acerca da doença. Dessa forma, o número de animais acometidos vem aumentando (Chaves *et al.*, 2013 & Santos *et al.*, 2018). Além de infectar humanos, a doença pode também afetar cavalos, canídeos, bovinos, suínos, roedores, coelhos, macacos, aves e principalmente os felinos (Cruz, 2010; Schubach *et al.*, 2012 & Aiello, 2017).

A esporotricose nos felinos se difere daquela que se manifesta em outras espécies devido a uma exacerbada quantidade de células fúngicas encontradas nos locais das lesões cutâneas, ocorrendo ainda formações de nódulos no tecido subcutâneo (Marques, 1993 & Aiello, 2017). Ademais, segundo estudos de Cruz (2010), os felinos possuem elevado potencial zoonótico devido à acentuada quantidade de organismos fúngicos encontrados nas lesões, unhas e boca, tornando o gato, e também o cão, transmissores eficientes. Boa parte dos felinos tem o hábito contínuo de se lambe-rem, sendo esse um fator que pode espalhar a doença por todo o corpo, principalmente a área da cabeça, como nariz, focinho e orelha. Além disso, em casos mais graves, porém raros, ela pode se espalhar para órgãos internos como por exemplo, os pulmões, causando a esporotricose sistêmica, que se dá devido à inalação de conídios por meio das vias aéreas. (Kaufman *et al.*, 2000 & Nunes; Escosteguy, 2005)

Para o tratamento da esporotricose é indicado o medicamento itraconazol, que age indiretamente na membrana plasmática do fungo, alterando toda sua permeabilidade, impossibilitando a enzima do citocromo P450 fúngico (*14- $\alpha$ -demetilase*) de converter lanosterol em ergosterol, um esteroide componente de membrana celular fúngica. Ressalta-se que essa conversão é de suma importância para a células do fungo, pois o ergosterol auxilia na estabilidade da membrana celular, que, uma vez alterada, ocasiona um extravasamento do conteúdo celular, acarretando na morte da célula fúngica (Wiebe & Karriker, 2005). É recomendado o uso do medicamento oral itraconazol durante as refeições dos animais acometidos, sendo administrado de 5 a 10 mg/kg, a cada 12 ou 24 horas, apesar de estudos informarem acerca da hepatotoxicidade do medicamento (Lloret *et al.*, 2013). Estes autores ainda informam que, após a cura, deve-se continuar com o uso do medicamento por 30 dias. Também há relatos que informam sobre efeitos citotóxicos do itraconazol sobre o feto.

O itraconazol também pode gerar efeitos tóxicos para o feto, por ser teratogênico, acarretando na toxicidade maternal (Adams, 2003; Spinosa; Górnaiak & Bernardi, 2017). Também causam diminuição do apetite, perda de peso, vômitos e diarreia em felinos (Meinerz *et al.*, 2007). Ademais, segundo Costa (2019), o antifúngico pode ocasionar outros efeitos colaterais severos nos felinos, como por exemplo, icterícia por problemas hepáticos. Em 2016, a Anvisa disponibilizou uma lista, a qual contém outros efeitos adversos da utilização do itraconazol, principalmente em humanos, como dores abdominais, urina escurecida e também insuficiência hepática para casos mais raros (Anvisa, 2016)

Em estudos realizados por Schubach *et al.*, (2006), estes autores analisaram o uso do medicamento em 22 cães, onde foi observado poucos com efeitos colaterais e em dois a cinco meses estes animais já estavam curados. Porém, em gatos, a micose demonstrou-se um pouco mais resistente ao itraconazol. Ademais, Waller *et al.*, (2021) informam que o *Sporothrix brasiliensis* tem demonstrado a capacidade de adquirir resistência ao itraconazol.

Pesquisas fitoquímicas têm sido realizadas para detectar moléculas promissoras contra patógenos resistentes aos antifúngicos convencionais. Dentre as plantas com potencial antifúngico, destacam-se membros da família Lamiaceae, como *Origanum vulgare* (orégano), *Origanum majorana* (manjerona) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim), cujos óleos essenciais (OE's) foram promissores contra o *Sporothrix brasiliensis* (Waller *et al.*, 2016 & Cleff, 2008). O OE da *Melaleuca alternifolia* e de *Citrus limon* também apresentaram atividade *in vitro* satisfatória contra *Sporothrix schenckii* (Santos & Casteluber 2020). Outras plantas medicinais também têm se mostrado efetivas no tratamento de doenças causadas por fungos, como, por exemplo, a *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin Clemants, popularmente conhecida como mastruz ou erva de Santa Maria, pertencente à família Amaranthaceae (Kasali *et al.*, 2021). O óleo essencial do mastruz tem sido considerado um excelente agente fungicida contra fungos filamentosos como *Aspergillus*, *Fusarium* e *Colletotrichum* (Jardim *et al.*, 2008). Chekem *et al.*, (2010), trabalhando com atividade *in vitro* do OE de mastruz, destacaram que o mesmo possui atividade antifúngica contra diferentes espécies de *Candida* spp., entre elas, cepas ATCC de *C. albicans*, também frente à *C. glabrata*, *C. guilliermondi*, *C. krusei*, *C. lusitanae*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*.

O mastruz é comumente utilizado pela população na forma de sucos e infusões para tratar feridas, inflamações, verminoses, parasitoses e problemas respiratórios (Sá, 2015). Seu óleo essencial é constituído principalmente de monoterpenos, sendo o ascaridol o composto comumente presente em grandes quantidades (Jardim *et al.*, 2008). A propriedade anti-helmíntica da planta tem sido atribuída à presença desse monoterpeno (Smillie *et al.*, 1924 & Gupta *et al.*, 2002). Outrossim, a quantidade de ascaridol varia de acordo com o órgão vegetal, sendo que, em óleos essenciais extraídos de folhas, o composto ocupa 9,2% do óleo, já em frutos a quantidade de ascaridol varia de 20% a 90% (Alonso, 2020 & Jardim, 2008).

Apesar de todas as propriedades medicinais dos óleos essenciais, ressalta-se que os mesmos são produtos extraídos de muitas espécies de plantas, mas são altamente concentrados, o que pode lhes conferir uma toxicidade alta, quando comparado com o uso da planta em si (Bisset, 1994). Dessa forma, é importante a realização testes de toxicidade a fim de estudar os possíveis efeitos colaterais que o produto natural pode causar aos animais, incluindo o ser humano (Moura *et al.*, 2012). O OE é um produto natural oriundo do metabolismo secundário vegetal, que possui toxicidade devido ao fato das plantas os sintetizarem para se defender contra os predadores e atrair polinizadores (Simões *et al.*, 2003). Borges *et al.*, (2012), trabalhando com células de mamíferos, relataram que o OE não apresentou citotoxicidade. Além disso, Correa-Royero *et al.*, (2010), informaram que o teste *in vitro* do OE em células renais de macaco também não apresentou toxicidade.

Pesquisas sobre a avaliação da citotoxicidade do OE de *Dysphania ambrosioides* (L.) sobre a linhagem do câncer de mama humano (MCF-7) foram realizadas por Jia-Liang *et al.*, (2013), onde demonstraram que o OE do mastruz possui toxicidade sobre MCF-7, através de um mecanismo relacionado à apoptose. Entretanto, testes de citotoxicidade devem ser conduzidos com mais frequência, uma vez que se pretende a obtenção de uma droga para tratar determinada enfermidade.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo analisar os perfis químicos de óleos essenciais de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants obtidos em dois períodos distintos (janeiro/2023) e (junho/2023) e avaliar a atividade antifúngica dos mesmos frente às cepas de *Sporothrix brasiliensis*, agente etiológico da esporotricose felina.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Identificação botânica do material vegetal**

Partes aéreas de *D. ambrosioides* foram coletadas a partir de indivíduos adultos, sendo que todos eles foram propagados vegetativamente ao mesmo tempo a partir de um mesmo lote inicial de plantas de mastruz presente no horto de plantas medicinais do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), localizado na Universidade Federal da Paraíba, município de João Pessoa, PB, cujas coordenadas são latitude 7° 8' 28''(S) e longitude 34° 50' 47''(W). Uma exsiccata foi produzida e depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier, da UFPB, *Campus* I, município de João Pessoa/PB, sob o número de registro 66814. A atividade foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos, sob número A3919A5.

### **Coleta do material vegetal**

O experimento foi conduzido no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), Laboratório de Micologia Clínica da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), *Campus* I, município de João Pessoa-PB e no Instituto Federal da Paraíba, *Campus* Cabedelo. As coletas ocorreram em dois períodos do ano de 2023 (janeiro e junho), sempre às 08h00. O material vegetal coletado foi submetido ao tratamento de “*quenching*” em nitrogênio líquido, sendo, em seguida, armazenado sob-refrigeração a -20°C. Desta forma, foram constituídos dois tratamentos: T1 (material coletado em janeiro) e T2 (material coletado em junho). Cada tratamento foi constituído por triplicatas. No momento das coletas, o material vegetal foi analisado e seu estágio de desenvolvimento foi registrado. Importante salientar que janeiro é, normalmente, o mês mais seco, enquanto junho faz parte do período mais chuvoso para o local de estudo. Dados de chuva acumulada em vinte e quatro horas e de temperatura média do dia foram registrados de acordo com o Instituto Nacional de Meteorologia (INMET)

### **Extração e rendimento dos óleos essenciais**

As amostras congeladas foram pesadas em balança de precisão e, em sequência, submetidas à trituração em processador, sendo acrescida de água destilada aos poucos a fim de facilitar a trituração e tornar a mistura mais homogênea. A mistura assim obtida foi levada ao balão volumétrico, sendo seu volume completado para 6 L com água destilada.

O método de extração do óleo essencial (OE) consistiu de hidrodestilação por arraste a vapor, utilizando-se um aparelho de Clevenger modificado acoplado a um sistema de refrigeração, durante 3 horas. Os óleos obtidos foram armazenados em frascos de vidro âmbar estéreis de 10 ml de capacidade e armazenados em freezer à temperatura de -20°C.

O rendimento dos óleos foram calculados seguindo a equação abaixo, onde  $R$  é o rendimento (%);  $m_o$  é a massa do óleo essencial (em g);  $m_f$  é massa fresca da amostra vegetal (em g).

$$R (\%) = \frac{m_o}{m_f} \times 100$$

Para a análise estatística do rendimento do óleo, foram realizados teste de homogeneidade de variância (teste de Levene) e normalidade (Shapiro-Wilk). Posteriormente, foi realizado o teste t de Student para comparar os dois tratamentos. Estas análises foram feitas utilizando o software Jamovi (versão 2.3.28.0).

### **Obtenção dos perfis químicos obtidos por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)**

As análises dos perfis químicos dos óleos essenciais foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises (LMCA) da UFPB, *Campus I*, em aparelho de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (CG-EM), modelo SHIMADZU QP2010-PLUS-A, nas seguintes condições operacionais: coluna capilar de sílica fundida, modelo RTX-5MS (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme) (Shimadzu, Japão), com fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup> de hélio como gás de arraste; a temperatura inicial do forno foi de 60°C, mantendo uma rampa de temperatura de 3°C.min<sup>-1</sup> até 240°C. As temperaturas do injetor e do detector foram de 220°C e 230°C, respectivamente. Os compostos voláteis foram identificados por comparação de seus espectros de massas obtidos, com os registros da biblioteca computacional (62 nist.Lib) e também pela determinação dos índices de retenção (Van Den Doll; Kratz, 1963), relativo à série de n-alcenos de (C8 – C40) nas mesmas condições cromatográficas empregadas para os óleos essenciais. Os valores assim obtidos foram comparados com os índices de Adams (IA) de acordo com Adams (2017), disponíveis na literatura.

### **Atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais**

Para as atividades antifúngicas *in vitro* foram utilizadas as cepas de *Sporothrix brasiliensis* (SB): SB 0051, SB 485, SB 366, SB 394, SB 260, SB 44, pertencentes à micoteca do Laboratório de Micologia Clínica da UFPB, *Campus I*. Como controle, foi utilizada a cepa ATCC-22019 de *Candida parapsilosis*.

Para preparação do inóculo, foram realizados repiques em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) e, após 5 dias, as culturas foram cobertas com solução salina 0,9% estéril, para coleta dos conídios. A suspensão de conídios foi transferida para tubo estéril e, após aguardar 3 minutos para deposição das hifas, transferiu-se a suspensão para novo recipiente, onde o inóculo foi ajustado através de contagem em hemocitômetro de Neubauer até obter-se uma concentração correspondente a 1-5 x 10<sup>6</sup> conídios/mL, equivalente à escala 2 de McFarland, comparando visualmente. Em seguida, foram retirados 100 µL de cada inóculo e diluído em meio RPMI 1640 duplamente concentrado (CLSI M38A2, 2002). Para a cepa controle *C. parapsilosis* ATCC-22019, o inóculo foi ajustado correspondendo à concentração 0,5 da escala de McFarland, cuja concentração é a recomendada para ensaios com fungos leveduriformes.

As substâncias testadas foram os óleos essenciais de *Dysphania ambrosioides* (L.) oriundos das plantas coletadas nos dois períodos anuais distintos, sendo eles, T1 (janeiro) e T2 (junho). Esses óleos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) a 5% e tween 80 a 2%, completando-se o volume final com água destilada esterilizada de forma a se obter uma emulsão dos produtos na concentração inicial de 2048 µg/mL. Como controle, foi utilizado o medicamento itraconazol na concentração inicial de 64 µg/mL.

A concentração inibitória mínima (CIM) é definida como a menor concentração de uma substância capaz de inibir visualmente o crescimento de um microrganismo. Para se proceder à determinação da CIM dos produtos foi realizada a técnica de microdiluição em caldo, padronizada no documento (CLSI M38A2, 2002), e em duplicata. Utilizando-se as placas de 96 poços, foram adicionados, em cada orifício da placa, 100 µL do inóculo, previamente diluído ao meio RPMI 1640 duplamente concentrado. Posteriormente, 100 µL da solução dos antifúngicos também duplamente concentrado foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa nas respectivas concentrações preconizadas no documento padrão. E, por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas diferentes concentrações.

O controle de viabilidade dos microrganismos utilizados foi realizado colocando-se nos poços 100 µL do inóculo de cada cepa, previamente diluído ao meio RPMI 1640 duplamente concentrado. O controle de esterilidade também foi realizado, onde foi colocado 200 µL do RPMI 1640 em um orifício sem a suspensão dos fungos. As placas foram seladas e incubadas a 25-28°C, por até 5 dias. Após esse período, foi realizada a leitura.

Para determinação da concentração fungicida mínima (CFM), ou seja, a menor concentração de uma substância capaz de matar um fungo, após a leitura da CIM foram retiradas alíquotas de 10 µL dos poços correspondentes à CIM, CIM x 2, CIM x 4 e CIM x 8, e inoculadas em nova placa de 96 poços contendo caldo 200 µL RPMI 1640. As placas foram seladas e incubadas a 25-28°C por até 5 dias. Após esse período, foi realizada a leitura.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O mastruz coletado em ambos os períodos mostraram uma diferença significativa em suas características morfológicas de acordo com o período da coleta, mesmo sendo todas as amostras coletadas sempre no mesmo canteiro. Durante a coleta realizada no mês de janeiro/2023, observou-se que as plantas encontravam-se no princípio da sua floração, ou seja, apresentavam inflorescências em abundância e folhas exibindo limbos foliares maiores. Em contrapartida, as plantas coletadas no mês de junho/2023 apresentavam-se, visivelmente, em fase final do ciclo de vida, sendo observada uma grande produção de frutos secos do tipo aquênio, contendo sementes maduras e de coloração preta, inflorescências em número bastante reduzido e exibindo folhas com limbo foliar diminuto (figura 1).

## Figura 1

Ramos aéreos de *Dysphania ambrosioides* (L.) oriundas do horto medicinal do IPeFarM



Nota: A – Ramos aéreo de mastruz oriundo do período seco (janeiro/2023); B - Ramos aéreo de mastruz oriundo do período chuvoso (junho/2023);

Observou-se que o óleo obtido das plantas coletadas em janeiro/2023 possuía uma coloração amarela mais escura, enquanto que o óleo obtido de plantas coletadas em junho/2023 mostrava uma coloração amarela mais clara. Ambos os óleos possuíam o mesmo odor forte e característico da planta.

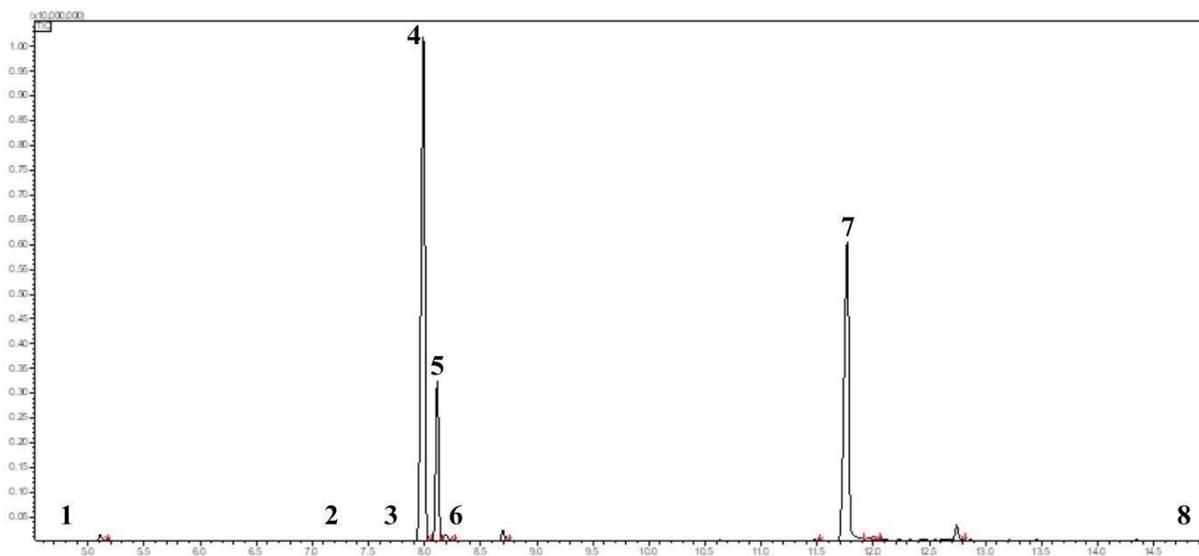
Os óleos essenciais de *D. ambrosioides* (L.) apresentaram diferenças em seus respectivos rendimentos. O mastruz em fase de floração expressiva, durante o período seco, mostrou um maior rendimento do OE (0,5%), quando comparado ao OE obtido das plantas coletadas com frutificação abundante no período chuvoso (0,4%). Estatisticamente, houve diferença entre os dois períodos ( $p=0,03$ ). Alguns autores (Martins; Silva & Almassy Júnior, 2010) informaram que as sementes são as grandes produtoras de óleo essencial no mastruz. No entanto, neste trabalho observou-se um maior rendimento durante a floração, indicando que, possivelmente, flores e folhas também produzem bastante óleo essencial.

Trabalhando com *Salvia officinalis* (sálvia), os autores Putievsky *et al.*; (1986), observaram um rendimento maior no período do verão, caracterizado como estação seca, do que durante o inverno. Em um experimento com *Ocimum basicum* (manjeriço), os autores Silva *et al.*; (2003) relataram que no mês de janeiro o óleo essencial exibiu um maior rendimento (2,26%), diferente do rendimento apresentado pelo OE obtidos de plantas coletadas pelo inverno (0,31%). Além disso, Rahal *et al.*; (2022) trabalhando com frutos frescos de mastruz, coletados ao longo de um ano, informaram que o rendimento do óleo é maior para plantas coletadas nos meses mais quentes e chuvosos (primavera/verão). Na presente pesquisa, o período mais seco do ano foi mais favorável para o rendimento do óleo, mostrando uma possível influência da sazonalidade. No entanto, não se pode desconsiderar a contribuição do estágio de desenvolvimento em que a planta se encontra no momento da coleta para extração de tal OE.

As figuras 2 e 3 abaixo ilustram os cromatogramas de íons totais obtidos para os óleos essenciais oriundos de partes aéreas de *Dysphania ambrosioides* (L.) coletadas no mês janeiro/2023 (figura 2) e junho/2023 (figura 3), respectivamente.

**Figura 2**

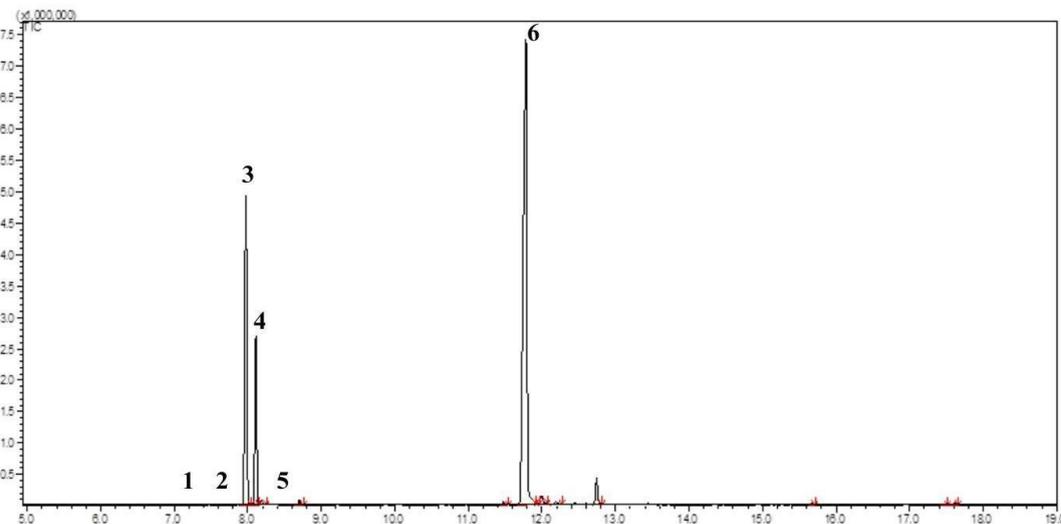
Cromatograma de íons totais obtido da amostra de óleo essencial oriundo de partes aéreas de *D. ambrosioides* (L.) coletadas no mês de janeiro/2023 em João Pessoa, Paraíba.



Nota: 1: n-hexanal; 2: Myrceno; 3:  $\delta$ -3-Careno; 4:  $\alpha$ -terpineno; 5:  $\rho$ -cimeno; 6: Limoneno; 7: Ascaridol; 8:  $\alpha$ -humuleno

**Figura 3**

Cromatograma de íons totais obtido da amostra de óleo essencial oriundo de partes aéreas de *D. ambrosioides* (L.) coletadas no mês de junho/2023 em João Pessoa, Paraíba.



Nota: 1: Myrceno; 2:  $\delta$ -3-Careno; 3:  $\alpha$ -terpineno; 4:  $\rho$ -cimeno; 5: Limoneno; 6: Ascaridol;

Na Tabela 1, está expressa a composição química dos OE's oriundos de plantas coletadas no período seco (janeiro/2023) e chuvoso (junho/2023). No OE oriundo do mês de janeiro, foram identificadas 94,1% das substâncias químicas, totalizando 8 compostos, sendo eles, n-Hexanal (0,07%), Myrceno (0,07%),  $\delta$ -3-careno (0,06%),  $\alpha$ -terpineno (46,81%), limoneno (0,66%),  $\rho$ -cimeno (11,54%), ascaridol (34,82%) e  $\alpha$ -humuleno (0,07%). No OE derivado do mês de junho foram identificadas 92,78% de substâncias químicas, totalizando 6 compostos, sendo eles, Myrceno (0,03%),  $\delta$ -3-careno (0,02%),  $\alpha$ -terpineno (22,09%), limoneno (0,42%),  $\rho$ -cimeno (11,36%), ascaridol (58,86%).

**Tabela 1**

*Perfil Químico dos óleos essenciais de partes aéreas de *Dysphania ambrosioides* (L.) obtido por CG-EM coletadas nos meses de janeiro e junho de 2023 em João Pessoa, Paraíba.*

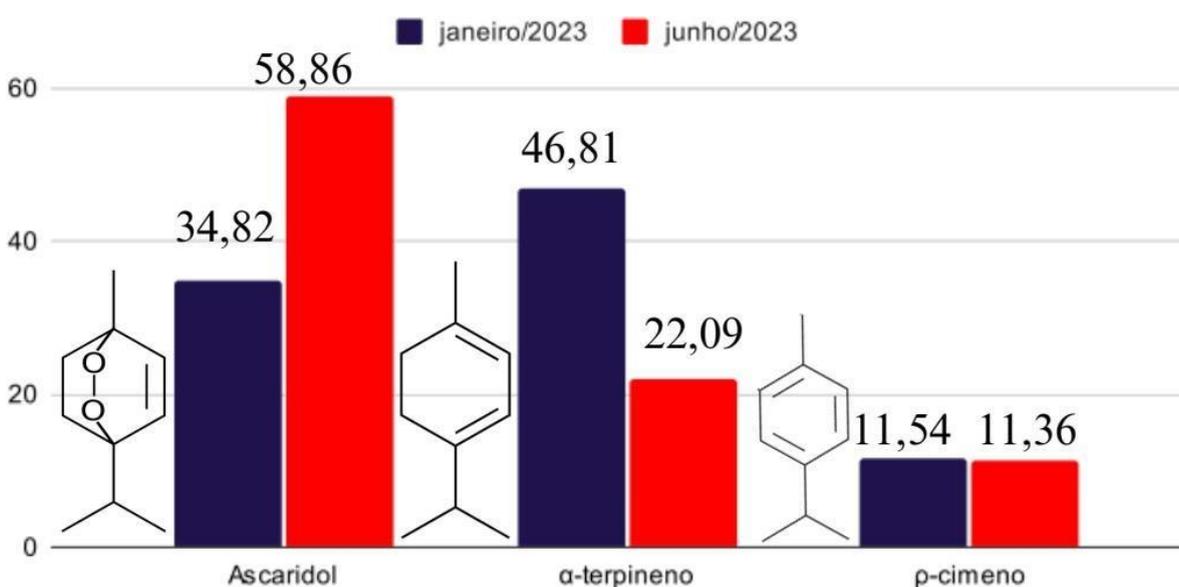
Compostos	Períodos		TR	IRC	IRP
	Janeiro/23	Junho/23			
n-hexanal	0,07	0,00	4,260	801	801*
Myrceno	0,07	0,03	7,478	1000	993*
δ-3-Careno	0,06	0,02	7,869	1012	1012*
α-terpineno	46,81	22,09	7,990	1016	1015*
ρ-cimeno	11,54	11,36	8,113	1020	1016*
Limoneno	0,66	0,42	8,186	1022	1030*
Ascaridol	34,82	58,86	11,767	1239	1234*
α-humuleno	0,07	0,00	14,937	1457	1452*

Nota: Período seco (janeiro/2023); Período chuvoso (junho/2023); TR – Tempo de Retenção do composto; IRC – Índice de Retenção Calculado; IRP – Índice de Retenção Publicado. \*Adams (2017)

Ambos os períodos apresentaram três compostos majoritários em seus OE's (ascaridol, α-terpineno e ρ-cimeno), Conforme figura 4 o OE oriundo das plantas coletadas em janeiro e em junho/2023, estes três compostos somaram 93,17% e 92,31%, respectivamente.

**Figura 4**

*Variação dos compostos majoritários presentes nos óleos essenciais oriundos de partes aéreas de *Dysphania ambrosioides* (L.) coletadas nos meses de janeiro e junho de 2023 em João Pessoa, Paraíba.*



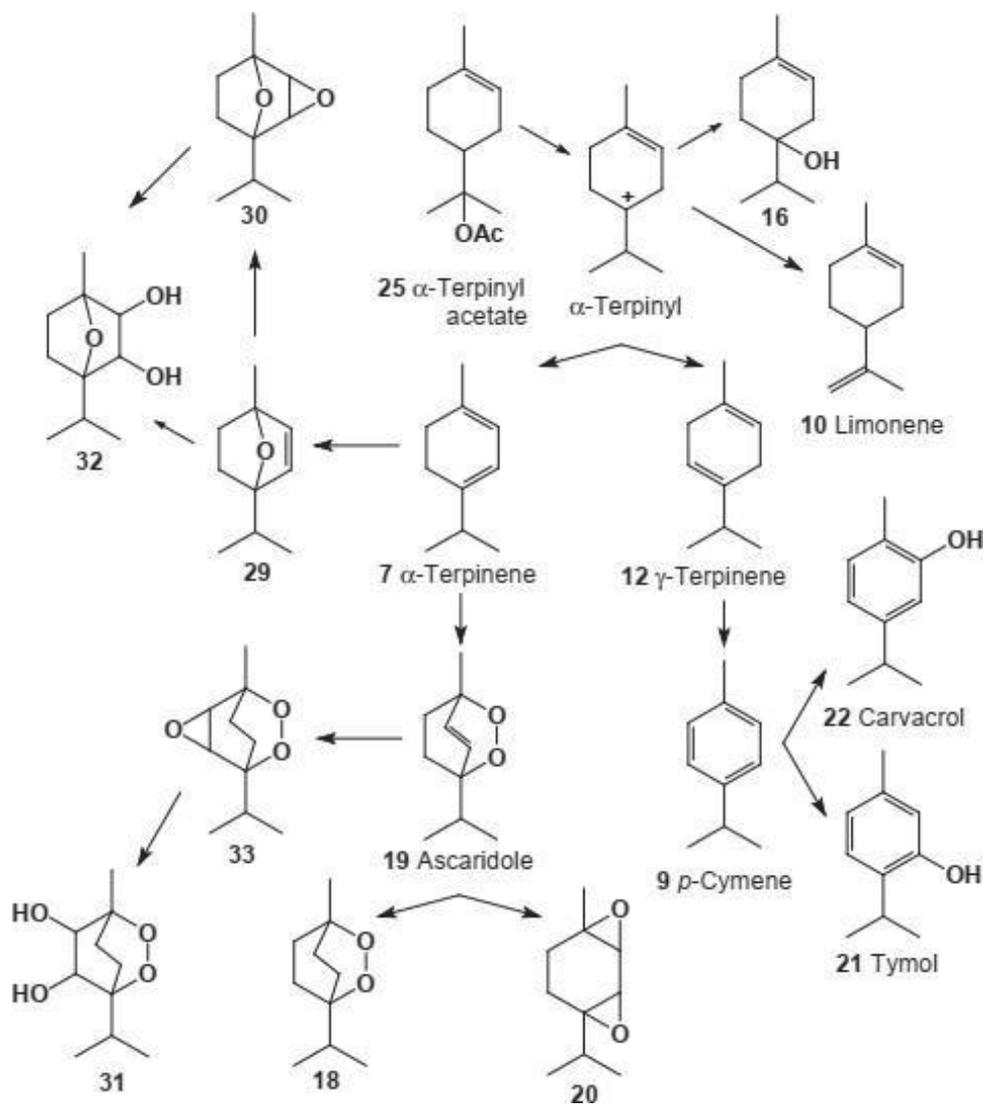
Fonte: elaboração própria

No mês de janeiro/2023, período mais quente e seco e plantas apresentando muitas folhas com limbos maiores, inflorescências e algumas infrutescências, o  $\alpha$ -terpineno (46,81%) foi o composto majoritário; no entanto, para o mês de junho, quando as plantas estavam no final de seu ciclo vital, exibiram folhas de limbo reduzido, abundância de infrutescências com sementes pretas e maduras, o ascaridol (58,86%) foi o composto majoritário. Por fim, o  $\rho$ -cimeno variou um pouco entre os dois períodos, sendo que no mês de junho/2023 apresentou 11,36% e no mês de janeiro/2023 11,54%, ou seja, uma variação de 0,18%. Importante ressaltar a presença de 0,07% de  $\alpha$ -humuleno no óleo do mês de janeiro, enquanto para o mês de junho este composto não foi encontrado.

O mês de janeiro/2023, caracterizado por ser um mês seco, sendo que no dia da coleta a temperatura média foi de 28,2°C e 00mm de chuva acumulada; o mês de junho/2023, mês mais chuvoso, apresentou no dia da coleta, uma temperatura de 25,5°C e 22mm de chuva acumulada. Desta forma, o mês de janeiro/2023 apresentou maior incidência de luz sobre as plantas de mastruz comparado ao mês de junho/2023, devido ao maior volume de chuva. De acordo Dembtsky *et al.* (2008), existe uma via de conversão de  $\alpha$ -terpineno para ascaridol e  $\rho$ -cimeno, a qual é dependente de luz (Figura 5). Essa conversão se inicia a partir do cátion  $\alpha$ -terpenila. Estes autores informaram que quando há pouca luminosidade, o  $\alpha$ - terpineno tende a elevar sua porcentagem de área, em detrimento do ascaridol e do  $\rho$ -cimeno. Na presente pesquisa, percebeu-se o contrário, ou seja, maior quantidade de ascaridol no período mais chuvoso, e maior quantidade de  $\alpha$ -terpineno no período mais seco. Com base nestes resultados é possível que o estágio de desenvolvimento da planta possa influenciar a composição química do óleo, conforme observado nesta pesquisa. Observou-se que em janeiro os frutos ainda estavam imaturos e em junho os mesmos já se encontravam maduros produzindo muitas sementes. Assim, é possível que, à medida que o fruto amadurece, a quantidade de  $\alpha$ -terpineno diminua, enquanto o ascaridol aumenta, sugerindo que o  $\alpha$ -terpineno, a partir do cátion  $\alpha$ -terpenila, vai se convertendo em ascaridol, conforme Dembtsky *et al.* (2008). A quantidade de ascaridol varia de acordo com o órgão coletado, logo, em óleos essenciais extraídos de folhas, o composto ocupa 9,2% do óleo; já em frutos, a quantidade de ascaridol varia de 20% à 90% (Alonso, 2004 & Jardim, 2008). Santos & Corrêa (2006) citaram que a maior quantidade de ascaridol está na semente. Além disso, conforme salientado por Gobbo-Neto & Lopes, 2007, não somente a sazonalidade, mas também o estágio de desenvolvimento, idade e órgão da planta interferem diretamente no rendimento do óleo essencial, bem como na sua composição química.

**Figura 4**

Mecanismo proposto por Dembtsky *et al.* (2008) para formação de ascaridol e outros monoterpênóides no gênero *Chenopodium* (*Dysphania*).



Fonte: Dembtsky *et al.* (2008).

Miller (1996), informou que plantas podem liberar substâncias químicas oriundas de seu metabolismo secundário, as quais podem inibir ou retardar a germinação de indivíduos da mesma espécie (efeito alelopático autotóxico) ou de espécies diferentes (efeito alelopático heterotóxico). Furini *et al* (2020), trabalhando com extratos aquosos de folhas frescas de mastruz, encontraram efeito alelopático sobre a porcentagem e índice de velocidade de germinação de sementes de *Lactuca sativa* L., nas concentrações de 24, 12 e 6 g/L. Carvalho & Carnelossi (2005), informaram que o extrato do mastruz diminuiu a velocidade e aumentou o tempo de germinação de sementes de tomate. Jimenez-Osornio *et al* (1996) relataram que substâncias como saponinas, alcalóides, monoterpênos e flavonóides presentes em partes aéreas e raízes de mastruz podem ter funções diversas e importantes atuando na interação planta-planta, planta-fitopatógenos, combatendo a herbivoria, atraindo polinizadores, e informaram ainda que o monoterpêno ascaridol seria o responsável pela fitotoxicidade da planta, mesmo em baixas concentrações. Desta forma, é possível que, conforme encontrado no presente trabalho, a maior porcentagem de ascaridol em óleos obtidos de partes aéreas de mastruz contendo muitos frutos em processo de

dispersão de sementes e sendo estas já maduras, poderia talvez indicar a possível função do ascaridol como substância alelopática e também eficiente no combate a herbívoros que poderiam preda tais sementes. É possível que o ascaridol tenha um efeito de proteção destas sementes e de garantia da ausência de outros competidores vegetais por recursos, além de talvez induzir a dormência de tais sementes.

Os resultados do ensaio das concentrações inibitórias mínimas das substâncias testadas e do antifúngico itraconazol frente às cepas de *Sporothrix brasiliensis* e *Candida parapsilosis* estão expressos na tabela 2. As substâncias testadas foram os óleos essenciais obtidos de partes aéreas de plantas de *Dysphania ambrosioides* (L.) coletadas no período seco (janeiro/2023) e chuvoso (junho/2023).

**Tabela 2**

*Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM<sub>90</sub>) em µg/mL dos óleos essenciais e do antifúngico itraconazol sobre as cepas de Sporothrix brasiliensis e Candida parapsilosis.*

Substâncias	Concentração Inibitória Mínima (CIM <sub>90</sub> ) µg/mL						
	Microrganismos						
	SB-0051	SB-485	SB-366	SB-394	SB-260	SB-44	<i>C. parapsilosis</i> ATCC-22019
OE de Janeiro/2023	1024	16	16	16	16	16	512
OE de Junho/2023	512	16	16	16	16	16	16
Itraconazol	> 64	0,25	0,125	0,125	0,125	0,125	0,25
Controle de esterilidade do caldo de cultura	-	-	-	-	-	-	-
Controle de viabilidade de crescimento das cepas	+	+	+	+	+	+	+

Nota: Janeiro/2023 (Período seco); Junho/2023 (Período chuvoso); OE: óleo essencial; SB: *Sporothrix brasiliensis*; C: *Candida parapsilosis*; (+): crescimento do microrganismo; (-) ausência de crescimento do microrganismo.

As cepas de *Sporothrix brasiliensis* foram sensíveis aos óleos essenciais do mastruz oriundo de plantas coletadas nos dois períodos diferentes: Janeiro/2023 (período seco) e Junho/2023 (período chuvoso), sendo tais óleos capazes de inibir o crescimento das cepas SB-485, SB-366, SB-394, SB-260, SB-44, até mesmo quando se utilizou a concentração mais baixa (16 µg/ml). Desta forma, percebe-se que a sazonalidade parece não interferir na eficiência do óleo em inibir de tais cepas fúngicas, assim com o estágio de desenvolvimento da planta.

Com relação à cepa SB-0051, o OE oriundo do mês de Janeiro/2023 apresentou CIM de 1024 µg/mL, enquanto o OE derivado do mês de Junho/2023 inibiu o crescimento fúngico na concentração de 512 µg/mL, ou seja, para ambos os períodos, a cepa SB-0051 foi mais resistente do que as demais cepas testadas. No controle

com a cepa ATCC-22019 de *Candida parapsilosis* também observou-se uma resistência quando a mesma foi submetida ao OE do mês de Janeiro/2023, o qual apresentou uma CIM de 512 µg/ml. Entretanto, ao se utilizar o OE do mês de Junho/2023, percebeu-se que a *C. parapsilosis* mostrou-se mais sensível ao mesmo, sendo inibida na concentração de 16 µg/ml. Desta forma, para *C. parapsilosis*, um OE obtido de plantas coletadas no período mais chuvoso que, no caso deste trabalho, correspondeu a plantas em final de ciclo de vida (frutificação) mostrou-se mais eficiente do que o OE obtido na estação seca e de plantas ainda em floração.

O antifúngico itraconazol foi eficaz contra todas as cepas de *Sporothrix brasiliensis*, mostrando CIM de 0,125 µg/ml até >64 µg/ml), sendo que essa CIM mais alta foi devida ao SB-0051. Para a *Candida parapsilosis* utilizada como controle, a CIM do itraconazol foi de 0,25 µg/ml.

Waller *et al* (2016) trabalhando com espécies da família Lamiaceae, entre elas o *Origanum vulgare*, *Origanum majorana* e *Rosmarinus officinalis*, obtiveram CIM's eficazes (0,07 e 0,14 mg/ml; 0,14 e 0,56 mg/ml; 0,28 e 1,12 mg/ mL) contra espécies de *Sporothrix brasiliensis*, respectivamente. Além disso, Luqman *et al.* (2007) trabalhando o OE de manjerona, encontraram uma CIM de 1.110 µg/mL contra *S. schenckii*. Testes realizados por Couto *et al* (2015) com OE de orégano utilizado contra espécies de *Sporothrix* spp (*S. schenckii* e *S. brasiliensis*), encontraram CIM variando entre 216 µg/mL e 867µg/mL. Muitos autores relacionam a atividade inibitória de OE sobre o *S. schenckii* e *S. brasiliensis* à presença do p-cimeno, um monoterpene (Cleff *et al.*, 2008; Waller *et al.*, 2016; Lucman *et al.*, 2007; Couto *et al.*, 2015. De Oliveira *et al.* (2020) analisando a atividade do fitoconstituente p-cimeno isoladamente, concluíram que o mesmo é capaz de inibir o crescimento de 90% das cepas de *Sporothrix*, exibindo CIM variando entre 128 µg/ml e 64 µg/ml.

O OE de *D. ambrosioides* (L.), conforme demonstrado na presente pesquisa, apresentou três compostos majoritários (ascaridol, α-terpineno e p-cimeno), este último em menores porcentagens. Analisando as CIM encontradas no presente trabalho, percebe-se que a CIM diminuiu (16 µg/ml), ou seja, o OE se tornou mais efetivo em inibir o crescimento do fungo em relação ao p-cimeno isolado, este último relatado por Oliveira *et al.* (2020). Portanto, sabendo-se que pela análise do perfil químico do OE do mastruz que o mesmo apresenta ascaridol e α-terpineno em abundância, pode-se inferir que é possível a existência de um efeito sinérgico entre estes 3 compostos, tornando o OE mais eficiente. Isto sugere a necessidade da realização de estudos com estes compostos isoladamente a fim de comprovar a eficiência de cada um e comparar com a eficiência do óleo.

O modo de ação dos OEs sobre microrganismos pode ser devido a grande quantidade de constituintes químicos presentes e não só apenas a uma molécula específica, o que pode possivelmente resultar em diferentes mecanismos de ação e difícil identificação do ponto de vista molecular (Carson *et al.* 2002 & Burt 2004). Dorman & Deans (2000), relataram que a atividade antifúngica do óleo essencial do mastruz pode ser devida à presença de mono e sesquiterpenos no óleo, os quais aumentam a permeabilidade da membrana celular fúngica acarretando na perda de seu conteúdo celular. Estes compostos podem dissolver-se na membrana, resultando em perda de função da mesma. Segundo Cox *et al.* (2000), o óleo também afeta a síntese da parede celular, ocasionando a morte do fungo.

Os resultados obtidos a partir da CFM frente às cepas de *Sporothrix brasiliensis* estão inseridos abaixo na tabela 3.

**Tabela 3**

Concentrações Fungicidas Mínimas (CFM) em µg/mL dos óleos essenciais e do antifúngico itraconazol sobre as cepas de *Sporothrix brasiliensis* e *Candida parapsilosis*.

Substâncias	Concentração Fungicida Mínima (CFM) µg/mL						
	Microrganismos						
	SB-0051	SB-485	SB-366	SB-394	SB-260	SB-44	<i>C. parapsilosis</i> ATCC-22019
OE de Janeiro/2023	> 1024	64	64	64	64	64	> 1024
OE de Junho/2023	> 1024	64	64	64	64	64	64
Itraconazol	> 64	> 2	> 1	> 1	> 1	> 1	> 2
Controle de esterilidade do caldo de cultura	-	-	-	-	-	-	-
Controle de viabilidade de crescimento das cepas	+	+	+	+	+	+	+

Nota: Janeiro/2023 (Período seco); Junho/2023 (Período chuvoso); OE: óleo essencial; SB: *Sporothrix brasiliensis*; C: *Candida parapsilosis*; (+): crescimento do microrganismo; (-) ausência de crescimento do microrganismo

A CFM do OE oriundo do mês de junho/2023 de *D. ambrosioides* (L.) testado contra as cepas de *Sporothrix brasiliensis* foi estabelecida em >1024 µg/mL (SB-0051), 64 µg/mL para (SB-485, SB-366, SB-394, SB-260, SB-44) e também para a cepa ATCC-22019 de *Candida parapsilosis*. Para o óleo essencial derivado de janeiro/2023 de *D. ambrosioides* (janeiro/2023) a CFM foi estabelecida em >1024 µg/mL (SB-0051 e *Candida parapsilosis* ATCC-22019), 64 µg/mL para todas demais (SB-485, SB-366, SB-394, SB-260, SB-44). De acordo com estes resultados, a eficácia do OE de mastruz para matar as células fúngicas independe da sazonalidade ou estágio de desenvolvimento do vegetal. Apenas para *C. parapsilosis* percebe-se que o óleo de junho/23 foi mais eficaz em sua ação fungicida.

A razão da CFM/CIM para fungos é usada para especificar a natureza do efeito antimicrobiano contra um agente patogênico, ou seja, informar se o produto tem efeito fungicida ou fungistático (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Dessa forma, foi calculada a razão CFM/CIM para as cepas mais sensíveis aos produtos testados, de acordo com a tabela 4.

**Tabela 4**

Razão entre a CFM e a CIM para as cepas de *Sporothrix brasiliensis* que exibiram maior sensibilidade aos óleos essenciais testados, ou seja, menor valor de CIM.

Produtos testados	Microrganismos	CFM/CIM
OE de Junho/2023	SB-485	4
	SB-366	4
	SB-394	4
	SB-260	4
	SB-44	4
OE de Janeiro/2023	SB-485	4
	SB-366	4
	SB-394	4
	SB-260	4
	SB-44	4

Nota: Janeiro/2023 (Período seco); Junho/2023 (Período chuvoso); OE: óleo essencial; SB: *Sporothrix brasiliensis*;

Com base em resultados apresentados por De Oliveira *et al.* (2020), uma substância pode ser considerada fungicida quando a razão CFM/CIM for igual ou inferior a 4. Para valores maiores que 4, a substância é considerada fungistática. Desta forma, para as cepas do *Sporothrix brasiliensis* mais sensíveis ao OE, ficou evidente a ação fungicida do óleo essencial do mastruz, independente se o óleo foi obtido de plantas coletadas no período chuvoso ou no período seco, e também parece não depender do estágio de desenvolvimento da planta.

## CONCLUSÃO

Neste trabalho, constatou-se que, durante o mês de janeiro, caracterizado com período seco, o óleo essencial de *Dysphania ambrosioides* (L.) apresentou um maior rendimento do OE quando comparado ao período mais chuvoso. O OE obtido de plantas coletadas no mês de junho/23 e em final do seu ciclo de vida, apresentando muitas infrutescências e sementes maduras, mostrou maior porcentagem de ascaridol, seguido de  $\alpha$ -terpineno. Em contrapartida, o OE oriundo de plantas coletadas no mês mais seco (janeiro/23) e apresentando mais inflorescências, ou seja, na metade do seu ciclo de vida, apresentou maior porcentagem de  $\alpha$ -terpineno, seguindo do ascaridol. Em ambos os OE's, o  $p$ -cimeno foi o terceiro composto majoritário. Foi constatada a primeira atividade in vitro antifúngica e fungicida do óleo essencial de *D. ambrosioides* (L.) frente às cepas de *Sporothrix brasiliensis*; no entanto, há necessidades de estudos sobre o mecanismo de ação deste OE sobre cepas de fungos patogênico. Os dados obtidos neste trabalho sugerem que o óleo essencial de *D. ambrosioides* (L.) tem potencial para ser utilizado com tratamento complementar contra a esporotricose, possibilitando, talvez, um tratamento conjunto com o itraconazol. Esse tratamento complementar, se devidamente comprovada sua eficácia, seria um produto de baixo custo, portanto mais acessível à população que muitas vezes não possui condições financeiras para arcar com os altos custos do tratamento à base exclusiva do itraconazol, o qual é um tratamento de longo prazo, oneroso e causa diversos efeitos colaterais.

## REFERÊNCIAS

- Adams, H. R. (2003). *Farmacologia e terapêutica em veterinária*. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Adams, R. P. (2017). *Identificação de componentes de óleos essenciais por cromatografia gasosa/espectrometria de massa*. 5ª ed. Gruver, TX EUA: Publicação Texensis.
- Aielo, S.E. (2017). *Manual Merk de Veterinária*. 10ª ed. São Paulo: Rocca.
- Alonso, J. (2020). *Tratado de Fitofármacos y nutracéuticos*. 2ª ed. Rosario: Corpus Libros.
- Bisset, N.G. e Wichtl, M. (1994) Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals. *Medpharm GmbH Scientific Publishers*, Stuttgart, CRC Press, Boca Raton, 91-95.
- Borges, A. R., Aires, J. R., Higino, T. M., de Medeiros, M.d, Citó, A. M., Lopes, J. A., & de Figueiredo, R. C. (2012). Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. *Experimental parasitology*, 132(2), 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.06.003>
- Burt, S. (2004). Óleos essenciais: suas propriedades antibacterianas e aplicações potenciais em alimentos – uma revisão. *Jornal internacional de microbiologia alimentar*, 94 (3), 223-253.
- Carlos, I. Z., Sassá, M. F., da Graça Sgarbi, D. B., Placeres, M. C., & Maia, D. C. (2009). Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. *Mycopathologia*, 168(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11046-009-9190-z>
- Carson, C. F., Mee, B. J., & Riley, T. V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(6), 1914-1920.
- Carvalho, L. M., & Carnellosi, M. A. G. (2005). Efeitos alelopáticos do extrato aquoso de mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L-) na germinação do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu*, 7(2), 92-95.
- Chekem, M. S. G., Lunga, P. K., Tamokou, J. D. D., Kuate, J. R., Tane, P., Vilarem, G., & Cerny, M. (2010). Antifungal properties of *Chenopodium ambrosioides* essential oil against *Candida* species. *Pharmaceuticals*, 3(9), 2900-2909.
- Chaves, A. R., de Campos, M. P., Barros, M. B., do Carmo, C. N., Gremião, I. D., Pereira, S. A., & Schubach, T. M. (2013). Treatment abandonment in feline sporotrichosis - study of 147 cases. *Zoonoses and public health*, 60(2), 149–153. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2012.01506.x>
- Cleff, M.B., Meinerz, A.R.M., Schuch, L.F.D., Rodrigues, M.R.A., Meireles, M.C.A., & Mello, J.R.B. (2008) Atividade *in vitro* óleo essencial de *Origanum vulgare* frente à *Sporothrix Schenckii*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.60, n.2, p.513-516. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352008000200039>
- Correa-Royero, J., Tangarife, V., Durán, C., Stashenko, E., & Mesa-Arango, A. (2010). *In vitro* antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20, 734-741. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010005000021>
- Couto, CS, Raposo, NR, Rozental, S., Borba-Santos, LP, Bezerra, LM, de Almeida, PA, & Brandão, MA (2015). Composição química e propriedades antifúngicas do óleo essencial de *Origanum vulgare* Linnaeus (Lamiaceae) contra *Sporothrix schenckii* e *Sporothrix brasiliensis*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 14 (7), 1207-1212.
- Cox, S., Mann, C., Markham, J., Bell, H., Gustafson, J., Warmington, J., & Wyllie, S. (2000). O modo de ação antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (óleo da árvore do chá). *Journal of Applied Microbiology*, 88, 170-17.
- Cruz, L.C.H. (2010). *Micologia veterinária*. Rio de Janeiro: Revinter.
- Dembitsky, V., Shkrob, I., & Hanus, L. O. (2008). Ascaridole and related peroxides from the genus *Chenopodium*. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 152(2), 209–215. <https://doi.org/10.5507/bp.2008.032>

- De Oliveira Lopes, A. L., Neto, H. D., Neta, M. D. N. S., de Oliveira Lima, E., & Guerra, F. Q. S. atividade antifúngica in vitro do p-cimeno frente as cepas do complexo *Sporothrix schenckii*. *Microbiologia: tecnologia a serviço da saúde*, 54.
- Dorman, H. J., & Deans, S. G. (2000). Agentes antimicrobianos de las plantas: actividad antibacteriana de los aceites volátiles de las plantas. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 308-16.
- Furini, T., Santos Furini, S. C., de Oliveira Barros, J., Camargo de Oliveira Domingues, S., & Vera Karsburg, I. (2020). ALELOPATIA E GENOTOXICIDADE DA ERVA DE SANTA MARIA NOS SISTEMAS *Lactuca sativa* L. e *Allium cepa* L. *South American Journal of Basic Education, Technical and Technological*, 7(2), 105–116
- Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2007). Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química nova*, 30, 374-381.
- Gupta, D., Charles, R., Mehta, VK, Garg, SN e Kumar, S. (2002). Exame químico do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L. das colinas do sul da Índia. *Jornal de Pesquisa de Óleos Essenciais*, 14 (2), 93-94. DOI:[10.1080/10412905.2002.9699780](https://doi.org/10.1080/10412905.2002.9699780)
- Jardim, C. M., Jham, G. N., Dhingra, O. D., & Freire, M. M. (2008). Composition and antifungal activity of the essential oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of chemical ecology*, 34(9), 1213–1218. <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9526-z>
- Jia-liang, M., Dan-wei, M., Ya-nan, W., Hong, Z., Bing, H., Qun, L., Zhi-yan, Z & Jing, F. (2013). Cytotoxicity of Essential Oil of *Chenopodium ambrosioides* L against Human Breast Cancer MCF-7 Cells. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research December*. 12 (6): 929-933. DOI: [10.4314/tjpr.v12i6.10](https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i6.10)
- Jiménez-Osornio, FJ, Kumamoto, J., & Wasser, C. (1996). Atividade alelopática de *Chenopodium ambrosioides* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, 24 (3), 195-205.
- Kasali, F. M., Tusiimire, J., Kadima, JN e Agaba, AG (2021). Usos etnomédicos, constituintes químicos e propriedades farmacológicas baseadas em evidências de *Chenopodium ambrosioides* L.: visão geral extensa. *Futuro Jornal de Ciências Farmacêuticas*, 7, 1-36. <https://doi.org/10.1186/s43094-021-00306-3>
- Kauffman, C. A., Hajjeh, R., & Chapman, S. W. (2000). Practice guidelines for the management of patients with sporotrichosis. For the Mycoses Study Group. Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 30(4), 684–687. <https://doi.org/10.1086/313751>
- Lloret, A., Hartmann, K., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hosie, M. J., Lutz, H., Marsilio, F., Möstl, K., Radford, A. D., Thiry, E., Truyen, U., & Horzinek, M. C. (2013). Sporotrichosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of feline medicine and surgery*, 15(7), 619–623. <https://doi.org/10.1177/1098612X13489225>
- Luqman, S., Dwivedi, GR, Darokar, MP, Kalra, A., & Khanuja, SP (2007). Potencial do óleo de alecrim para uso em infecções resistentes a medicamentos. *Terapias Alternativas em Saúde e Medicina*, 13 (5).
- Marques, S. A., Franco, S. R., de Camargo, R. M., Dias, L. D., Haddad Júnior, V., & Fabris, V. E. (1993). Esporotricose do gato doméstico (*Felis catus*): transmissão humana [Sporotrichosis of the domestic cat (*Felis catus*): human transmission]. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 35(4), 327–330.
- Martins, G. N., Silva, F. D., & Almasy Junior, A. A. (2010). Overcoming dormancy in *Chenopodium ambrosioides* L. seeds.
- Marimon, R., Cano, J., Gené, J., Sutton, D. A., Kawasaki, M., & Guarro, J. (2007). *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *Journal of clinical microbiology*, 45(10), 3198–3206. <https://doi.org/10.1128/JCM.00808-07>
- Marimon, R., Gené, J., Cano, J., Trilles, L., Dos Santos Lazéra, M., & Guarro, J. (2006). Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *Journal of clinical microbiology*, 44(9), 3251–3256. <https://doi.org/10.1128/JCM.00081-06>
- Meinerz, A. R. M., Cleff, M. B., Nascente, P. D. S., Nobre, M. D. O., Schuch, L. F. D., Antunes, T. D. Á., ... & Mello, J. R. D. B. (2007). Efeitos de doses elevadas da terbinafina e itraconazol em ratos Wistar. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43, 105-109.
- Miller, DA (1996). Alelopatia em sistemas de cultivo forrageiro. *Revista de Agronomia*, 88 (6), 854-859.

- Moura, N., Vasconcelos, A. C., Bernabé, B., Teixeira, L. J., & Saraiva, S. (2012). Ensaios toxicológicos: um estudo sobre a utilização de testes in vivo e in vitro. *Enciclopédia biosfera*, 8(15).
- Nunes F. C. & Escosteguy C.C. 2005. Esporotricose humana associada à transmissão por gato doméstico. *Clínica Veterinária*, São Paulo 54:66-68.
- Spinosa, H. D. S., Górnaiak, S. L., & Bernardi, M. M. (2006). *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*.
- Putievsky, E., Ravid, U. e Dudai, N. (1986). A influência da estação e da frequência de colheita na produção de óleos essenciais e ervas de um clone puro de sálvia (*Salvia officinalis*) cultivado em condições de cultivo. *Revista de produtos naturais*, 49 (2), 326-329.
- Rahal, I. L., Nunes, A. N., Grunitzky, R. A., Silva, G. C. C., Oliveira, H. L. M. D., Dias, A. B., ... & Gazim, Z. C. (2022). Determinação do rendimento do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L. em função da variação sazonal. *Arq. ciências saúde UNIPAR*, 1099-1110.
- Sá, R. D., Soares, L. A. L., & Randau, K. P. (2015). Óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L.: estado da arte. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 36(2).
- Santos, A. F., Rocha, B. D., Bastos, C. V., Oliveira, C. S. F., Soares, D. F. M., Pais, G. C. T., ... & Brandão, S. T. (2018). Guia prático para enfrentamento da esporotricose felina em Minas Gerais. *Revista Veterinária & Zootecnia em Minas*, 137(38), 16-27.
- Santos, J. R. E dos, & Casteluber, MC da F. (2020). *Citrus limon*, *Melaleuca alternifolia* E *Psidium guajava* como inibidores naturais de *Sporothrix schenckii*. *Revisão Uningá*, 35, eRUR3520. Obtido em <https://revista.uninga.br/uningareviews/article/view/3520>
- Santos, S. G., & Corrêa, R. X. (2006). Diversidade genética de *Chenopodium ambrosioides* da região cacauieira da Bahia com base em marcadores RAPD. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41, 161-164.
- Schubach, T. M. P.; Menezes & R.C.; Wanke, B. (2012) Sporotrichosis. In: Greene, C.E. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 4ª ed. St Louis: Elsevier., p. 645 -650.
- Schubach, T. M., Schubach, A., Okamoto, T., Barros, M. B., Figueiredo, F. B., Cuzzi, T., Pereira, S. A., Dos Santos, I. B., Almeida Paes, R.d, Paes Leme, L. R., & Wanke, B. (2006). Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998-2003). *Medical mycology*, 44(1), 87–92. <https://doi.org/10.1080/13693780500148186>
- Silva, M. B., Costa, M. M., Torres, C. C., Galhardo, M. C., Valle, A. C., Magalhães, M.deA., Sabroza, P. C., & Oliveira, R. M. (2012). Esporotricose urbana: epidemia negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil [Urban sporotrichosis: a neglected epidemic in Rio de Janeiro, Brazil]. *Cadernos de saúde pública*, 28(10), 1867–1880. <https://doi.org/10.1590/s0102-311x2012001000006>
- Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., de Mello, J. C. P., Mentz, L. A., & Petrovick, P. R. (2016). *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Artmed Editora.
- Smillie, W.G. & Pessoa, S.B. (1924). A study of the anthelmintic properties of the constituents of the oil of *Chenopodium*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 24(5):359-70.
- Ultee, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R. J. A. E. M. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology*, 68(4), 1561-1568.
- VandendooL, H., & kratz, P. D. (1963). A Generalization Of The Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography. *Journal of chromatography*, 11, 463–471. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)80947-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)80947-x)
- Waller, S. B., Madrid, I. M., Silva, A. L., Dias de Castro, L. L., Cleff, M. B., Ferraz, V., Meireles, M. C., Zanette, R., & de Mello, J. R. (2016). In Vitro Susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* to Essential Oils of Lamiaceae Family. *Mycopathologia*, 181(11-12), 857–863. <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0047-y>
- Waller, S. B., Dalla Lana, D. F., Quatrin, P. M., Ferreira, M. R. A., Fuentesfria, A. M., & Mezzari, A. (2021). Antifungal resistance on *Sporothrix* species: an overview. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 52(1), 73–80. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00307-z>
- Wiebe, V., & Karriker, M. (2005). Therapy of systemic fungal infections: a pharmacologic perspective. *Clinical techniques in small animal practice*, 20(4), 250–257. <https://doi.org/10.1053/j.ctsap.2005.07.006>

## ANEXOS

### Anexo A – Normas da Revista Brasileira de Medicina Veterinária

- O manuscrito deverá ser formatado em MS-Word (não utilizar formato PDF), tamanho de fonte 10-, 11-, ou 12 com espaçamento entre linhas de 1,5, escrito em INGLÊS.
- Todas as páginas devem ser numeradas no canto inferior direito e as linhas devem ser numeradas continuamente ao longo do manuscrito.

## CARTA DE APRESENTAÇÃO E PÁGINA DE TÍTULO

- O arquivo que contém o manuscrito não deve conter nomes dos autores, suas instituições, afiliações ou declarações, de modo a permitir a avaliação cega por pares.
- Isso significa que além da autoria, o documento submetido não deve conter considerações éticas, conflitos de interesse, fontes de financiamento e agradecimentos ou quaisquer outros detalhes que possam permitir aos revisores identificar os autores ou a instituição de origem.
- Em seu lugar, o manuscrito deverá indicar **“oculto para revisão”** destacado em vermelho. No momento da submissão, o sistema solicitará ao autor a inclusão de uma **carta de apresentação** (conforme modelo fornecido), **página de rosto** (conforme modelo fornecido) e sugestão de três a cinco revisores ad-hoc (nomes e e-mails). - endereços postais de pesquisadores não vinculados ao trabalho ou à instituição), cujos nomes serão informados no sistema.
- Sempre que houver alteração da informação contida na página de rosto, o autor correspondente deverá atualizá-la no sistema antes de enviar a nova versão do manuscrito. Lembre-se que antes de enviar o novo manuscrito a ser avaliado, a versão anterior deverá ser excluída.
- Uma vez aprovado o manuscrito para publicação, o autor correspondente receberá uma mensagem solicitando que os itens rotulados como **“ocultos para revisão”** sejam reinsertados no manuscrito. A versão completa do manuscrito deverá então ser enviada eletronicamente através do sistema junto com a documentação adicional. Todas as informações contidas na última versão da página de título serão utilizadas para completar o artigo para publicação.
- A versão aprovada pelo Conselho Editorial será enviada ao autor correspondente para verificação, aprovação e devolução via sistema.
- A **carta de apresentação** pode ser redigida em português ou inglês (utilize o modelo de formulário disponível, que deverá ser preenchido).

- Deve conter o título do manuscrito e uma descrição resumida do trabalho justificando sua relevância para o Braz J Vet Med. A **carta de apresentação** deverá conter ainda uma declaração abrangendo todos os itens conforme modelo fornecido, identificando o autor correspondente, com sua assinatura.
- A **página de título** do manuscrito (modelo fornecido pelo sistema) deverá conter:
- Título do manuscrito em inglês e português;
- Nomes completos dos autores, suas respectivas afiliações e números ORCID (você pode obtê-los aqui ) (NOTA: Não traduzir nomes de instituições);
- Declaração de que os procedimentos experimentais seguiram as diretrizes vigentes de ética em pesquisa e os requisitos legais pertinentes;
- Fontes de financiamento;
- Declaração de conflitos de interesse dos autores, para identificar a possível influência nos resultados da pesquisa ou no conteúdo do manuscrito;

## CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

- Seguindo as recomendações contidas em < <http://www.icmje.org/recommendations/browse/roles-and-responsabilidades/defining-the-role-of-authors-and-contributors.html> >, para a definição de participação na autoria ;
- Informação sobre a formação acadêmica de cada autor (pelo menos um autor deverá ser médico veterinário);
- Disponibilização de resultados complementares, mediante identificação do repositório onde estão depositados os dados brutos ou declaração pertinente (conforme formulário disponibilizado).

## AGRADECIMENTOS

- Local onde foi realizado o estudo; e
- Autor para correspondência (nome, departamento, instituição, abreviatura, endereço completo e e-mail).
- Todos os artigos, quando aprovados, terão os itens declarativos contidos na página de rosto incluídos entre as conclusões e lista de referências da redação do Braz j vet med.

## AUTORES E COAUTORES

1. Fez contribuições substanciais para a concepção ou desenho da obra; ou a aquisição, análise ou interpretação de dados para o trabalho; E
2. Elaborou o trabalho ou revisou-o criticamente quanto ao conteúdo intelectual importante; E
3. Dada a aprovação final da versão a ser publicada; E
4. Concordou em ser responsável por todos os aspectos do trabalho, garantindo que questões relacionadas à precisão ou integridade de qualquer parte do trabalho sejam adequadamente investigadas e resolvidas.
5. Todos os artigos, quando aprovados, terão os itens declarativos contidos na página de rosto incluídos entre as conclusões e lista de referências da redação do Braz j vet med

## ARTIGO CIENTÍFICO

- Artigos científicos são estudos originais que apresentam novos resultados e conclusões que estão dentro do escopo da revista.
- Os artigos científicos deverão ser sempre organizados na seguinte ordem: TÍTULO, RESUMO, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÃO E REFERÊNCIAS.
- **Título:** O título deve estar em negrito e centralizado.
- **Resumo/Resumo:** Deve ser escrito em um único parágrafo sem citações bibliográficas. O que foi realizado e estudado, relatando os resultados e conclusões mais importantes. O limite máximo de palavras é 250. Ao final deve haver uma lista de três a cinco Palavras-chave.
- **Introdução:** Deve ser breve, com citações bibliográficas específicas, mas sem que estas assumam importância principal, terminando com indicação do objetivo do trabalho.
- **Materiais e Métodos:** Esta seção deve identificar os materiais empregados e descrever os métodos de pesquisa, para permitir que outros pesquisadores repitam o estudo.
- **Resultados:** Esta seção deverá apresentar uma descrição concisa dos dados e achados obtidos, apoiada em tabelas autoexplicativas e elaboradas sem dados supérfluos, apresentando sempre, quando aplicável, médias de diversas repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por meio de gráficos (Figuras), ao apresentá-los e apresentá-los em tabelas extensas.
- **Discussão:** Os resultados devem ser discutidos em comparação com a literatura anterior.
- **Conclusões:** Devem basear-se apenas nos resultados apresentados no trabalho. Também podem ser feitas menções a sugestões para pesquisas futuras.

- **Referências:** A lista deverá incluir apenas os documentos mencionados no texto, em ordem alfabética do sobrenome do primeiro autor. Siga os exemplos no final deste documento.

## **ESTILO DE CITAÇÕES E REFERÊNCIAS**

- As citações no texto corrido ou entre parênteses, e referências a artigos submetidos ao *Braz j vet med*, deverão seguir as diretrizes vigentes da American Psychological Association (APA) (Exemplos de Referência).
- Este periódico não aceita citações de monografias, dissertações, teses, resumos e publicações de anais ou anais de eventos científicos.

## **EXEMPLOS DE REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

### **Um autor:**

Mitchell (2017) ou (Mitchell, 2017)

### **Dois autores**

Mitchell e Smith (2017) ou (Mitchell & Smith, 2017).

### **Três ou mais autores:**

Mitchell et al. (2017) ou (Mitchell et al., 2017).

### **Exceção:**

Para trabalhos publicados no mesmo ano com pequena variação de autores, será necessário incluir os nomes dos demais autores até indicar a diferença:

Kapoor, Bloom, Montez et al. (2017) ou (Kapoor, Bloom, Montez et al., 2017).

Kapoor, Bloom, Zucker et al. (2017) ou (Kapoor, Bloom, Zucker et al., 2017).

Hasan, Liang, Kahn e Jones-Miller (2015) ou (Hasan, Liang, Kahn e Jones-Miller, 2015)

Hasan, Liang, Kahn e Weintraub (2015) ou (Hasan, Liang, Kahn e Weintraub, 2015)

### **Entidades como Autores:**

Quando o autor de uma referência for uma instituição, órgão governamental ou outra entidade, mencionar a organização na frase relevante ou na citação entre parênteses na primeira vez que a fonte for mencionada.

**Primeira citação:**

Organização Mundial da Saúde (OMS, 2019) ou (Organização Mundial da Saúde [OMS], 2019)

Citações subsequentes:

OMS (2019) ou (OMS, 2019)

**Duas ou mais obras no mesmo conjunto de parênteses:**

Para os casos de duas ou mais obras citadas no mesmo conjunto de parênteses, listá-las em ordem alfabética e separá-las com ponto e vírgula.

Exemplo: Vários estudos

(Jones, 2012; Smith, 2009)

**Autores com o mesmo sobrenome:**

Use as iniciais dos nomes junto com o sobrenome para evitar confusão.

Exemplo: (B. Smith, 2009; J. Smith, 2006).

**Duas ou mais obras com a mesma autoria e ano:**

Quando houver duas referências do(s) mesmo(s) autor(es) publicadas no mesmo ano, utilizar letras minúsculas (a, b, c) junto com o ano para ordená-las na lista de referências.

Exemplo: Isto é explicado no estudo de Smith (1999a).

Observe minhas pequenas alterações na capitalização dos itens abaixo. As palavras principais nos títulos dos livros devem ser todas maiúsculas (exceto depois de dois pontos), de acordo com o que aprendi na escola. No entanto, isso foi há 50 anos, então se o estilo mudou, estou corrigido.

**REFERÊNCIAS POR TIPO**

Livros (sem DOI e com DOI): Não incluem local de publicação.

Jones, AF e Wang, L. (2011). *Criaturas espetaculares: a floresta amazônica* (2ª ed.). Minha editora.

Gilovich, T., Griffin, D., & Kahneman, D. (Eds.). (2002). *Heurísticas e preconceitos: a psicologia do julgamento intuitivo*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511808098>.

Mitchell, JA, Thomson, M. e Coyne, RP (2017). *Um guia para citação*. Minha editora.

Observe que os nomes de livros e periódicos devem aparecer em itálico.

### **Capítulos de livros :**

Não inclua o local de publicação.

Aron, L., Botella, M. e Lubart, T. (2019). Artes culinárias: talento e seu desenvolvimento. Em RF Subotnik, P. Olszewski-Kubilius, & FC Worrell (Eds.), *A Psicologia do Alto Desempenho: Desenvolvendo o potencial humano em talentos específicos de domínio* (pp. 345–359). American Psychological Association. <https://doi.org/10.1037/0000120-016>

Tróia, BN (2015). Regras de citação da APA. Em ST, Williams (Ed.). *Um guia para regras de citação* (2ª ed., pp. 50-95). Editores

### **E-books e audiolivros**

Caim, S. (2012). *Silencioso: O poder dos introvertidos em um mundo que não para de falar* (K. Mazur, Narr.) [Audiolivro]. *Áudio aleatório da casa*. <http://bit.ly/2G0Bpbl>.

Chistian, B. e Griffiths, T. (2016). *Algoritmos para viver: A ciência da computação das decisões humanas*. Henry Holt e companhia.

### **Capítulos de e-books:**

Tafoya, N. e Del Vecchio, A. (2005). De volta ao futuro: um exame da experiência do holocausto dos nativos americanos. Em M. Goldrick, J. Giordano, & N. Garcia-Preto (Eds.), *Etnia e Terapia Familiar* (3ª ed., pp. 55-63). Imprensa Guilford. <http://a.co/36xRhBT>.

### **Artigos publicados em periódicos**

#### **Com DOI longo**

Grady, JS, Her, M., Moreno, G., Perez, C., & Yelinek, J. (2019). Emoções em livros de histórias: uma comparação de livros de histórias que representam grupos étnicos e raciais nos Estados Unidos. *Psicologia da Cultura da Mídia Popular*, 8(3), 207–217. <https://doi.org/10.1037/ppm0000185>.

### **Com DOI curto**

(para utilizar um DOI abreviado, é necessário utilizar o serviço da página inicial <http://shortdoi.org/>. Ele fornecerá o DOI abreviado).

Grady, JS, Her, M., Moreno, G., Perez, C., & Yelinek, J. (2019). Emoções em livros de histórias: uma comparação de livros de histórias que representam grupos étnicos e raciais nos Estados Unidos. *Psicologia da Cultura da Mídia Popular*, 8(3), 207–217. <http://doi.org/dk9j>.

### **Sem DOI:**

Anderson, M. (2018). Tornando-se consistente com as consequências. *Liderança Educacional*, 76(1), 26-33.

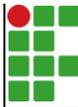
### **Entidades de classe ou agências governamentais**

Sociedade Americana de Dirofilariose. (2020). Diretrizes Caninas Atuais para Prevenção, Diagnóstico e Tratamento da Infecção Dirofilariose (*Dirofilaria immitis*) em Cães. [https://d3ft8sckhnm2.cloudfront.net/images/pdf/2020\\_AHS\\_Canine\\_Guidelines.pdf?1580934824](https://d3ft8sckhnm2.cloudfront.net/images/pdf/2020_AHS_Canine_Guidelines.pdf?1580934824).

Instituto Nacional do Câncer. (2018). Encarando o Futuro: Vida após o tratamento do câncer (Publicação NIH No. 18-2424). Departamento de Saúde dos EUA. <https://www.cancer.gov/publications/paciente-education/life-after-treatment.pdf>.

Na elaboração do texto deverão ser observadas as seguintes regras:

As notas de rodapé devem ser indicadas com algarismos arábicos sobrescritos após a palavra, expressão ou frase que originou a nota. Esta numeração será contínua e as notas aparecerão no final da respectiva página.

	<b>INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA PARAÍBA</b>
	Campus Cabedelo - Código INEP: 25282921
	Rua Santa Rita de Cássia, 1900, Jardim Camboinha, CEP 58103-772, Cabedelo (PB)
	CNPJ: 10.783.898/0010-66 - Telefone: (83) 3248.5400

## Documento Digitalizado Restrito

### Trabalho de Conclusão de curso - Fábio Gabriell de Lima Mello

<b>Assunto:</b>	Trabalho de Conclusão de curso - Fábio Gabriell de Lima Mello
<b>Assinado por:</b>	Fábio Gabriell
<b>Tipo do Documento:</b>	Anexo
<b>Situação:</b>	Finalizado
<b>Nível de Acesso:</b>	Restrito
<b>Hipótese Legal:</b>	Direito Autoral (Art. 24, III, da Lei no 9.610/1998)
<b>Tipo do Conferência:</b>	Cópia Simples

Documento assinado eletronicamente por:

- **Fábio Gabriell de Lima Mello, ALUNO (202017020045) DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CABEDEL0**, em 28/08/2024 18:27:36.

Este documento foi armazenado no SUAP em 28/08/2024. Para comprovar sua integridade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifpb.edu.br/verificar-documento-externo/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 1232897

Código de Autenticação: 9b212bc66d

