



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS E FLORESTAIS

CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

HUGO MACIEL DE FARIA

**ANÁLISE DO EFEITO ANTIMICROBIANO E CITOTÓXICO DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Dysphania ambrosioides* (L.) MOSYAKIN &
CLEMANTS**

MOSSORÓ/RN

2023

HUGO MACIEL DE FARIA

**ANÁLISE DO EFEITO ANTIMICROBIANO E CITOTÓXICO DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Dysphania ambrosioides* (L.) MOSYAKIN &
CLEMANTS**

Monografia apresentada a Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Francisco Marlon Carneiro Feijó,
Prof. Dr.

Co-orientador: Nilza Dutra Alves, Profa. Dra.

MOSSORÓ/RN

2023

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

dd278 de Faria, Hugo Maciel .
a ANÁLISE DO EFEITO ANTIMICROBIANO E CITOTÓXICO
DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Dysphania ambrosioides* (L.)
MOSYAKIN & CLEMANTS / Hugo Maciel de Faria. -
2023.
55 f. : il.

Orientador: Francisco Marlon Carneiro Feijó.
Coorientadora: Nilza Dutra Alves.
Monografia (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de Medicina
Veterinária, 2023.

1. mastruz. 2. antifúngico. 3. antibacteriano.
4. citotoxicidade. 5. microscopia eletrônica de
varredura. I. Feijó, Francisco Marlon Carneiro,
orient. II. Alves, Nilza Dutra, co-orient. III.
Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

HUGO MACIEL DE FARIA

**ANÁLISE DO EFEITO ANTIMICROBIANO E CITOTÓXICO
DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Dysphania ambrosioides* (L.) MOSYAKIN
& CLEMANTS**

Monografia apresentada a
Universidade Federal Rural do Semi-
Árido como requisito para obtenção do
título de Bacharel em Medicina
Veterinária.

Defendida em: 19 / 05 / 2023.

BANCA EXAMINADORA

FRANCISCO MARLON
CARNEIRO
FEIJO:

Assinado de forma digital por
FRANCISCO MARLON CARNEIRO
FEIJO:41688597387
Dados: 2023.05.20 12:15:18 -03'00'

Prof. Dr. Francisco Marlon Carneiro Feijó
Presidente

Med. Vet. Dr. Caio Sérgio Santos
Membro Examinador

Med. Vet. Alysson Leno Marques de
Oliveira Membro Examinador

Med. Vet. Mara Gabriela Rubens
Membro Examinado

A meu c o Lucky (*In Memoriam*), quem tanto me ensinou sobre o amor e o quanto me tornou mais humano.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

À minha mãe, Raimunda Maciel, e meu pai, Hermes de Faria, por sempre me incentivarem e acreditarem no meu potencial.

À minha avó, Maria Maciel, pelo seu amor, cuidado e ensinamentos.

À meus amigos, Gustavo Silva, Nyanne dos Santos, Alysson Leno, Gabriela Rubens, Leon Denner, David Chagas, Gabriel Nobre e Carina Bessa pelas palavras de encorajamento, pelo apoio moral e pela inesquecível companhia durante a nossa jornada.

À esta universidade, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a janela que hoje vislumbro um horizonte superior, eivado pela acendrada confiança no mérito e ética aqui presentes.

À meus orientadores, Dr. Marlon Feijó e Dra. Nilza Dutra, pela oportunidade, credibilidade, compreensão, motivação e ensinamentos, que foram fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa.

À meu supervisor de estágio e orientador de pesquisa, Dr. Caio Santos, pela amizade, ensinamentos, disponibilidade, principalmente, no auxílio inestimável no decorrer deste trabalho.

Aos professores Dra. Alexsandra Pereira e Dr. Moacir Franco pela colaboração junto as análises do presente estudo.

Agradeço a meus colegas do LAMIV, pela parceria e desempenho nos projetos de pesquisas e na rotina do nosso querido laboratório.

“Olho por olho, e o mundo acabará cego”.
Mahatma Gandhi

RESUMO

O óleo essencial (OE) de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants é um produto com diversas aplicações, como agente inseticida, antiparasitária e antimicrobiana. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar a atividade antimicrobiana do OE de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants, bem como a sua citotoxicidade em células, e registrar imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das células microbianas. As avaliações antimicrobianas para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), foram realizadas *in vitro* pelo método de microdiluição em caldo. Para as concentrações bactericida e fungicida mínima (CBM e CFM) utilizou-se o método de crescimento em ágar BHI. A citotoxicidade foi avaliada quanto sua viabilidade e atividade metabólica utilizando células da pele de gata cultivadas *in vitro* e as análises ultraestrutural das células de bactérias e leveduras foram obtidas com o auxílio de um microscópio eletrônico de varredura. Os resultados obtidos demonstraram OE de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants apresentou atividade antibacteriana e antifúngica ao controlar o crescimento de diversos microrganismos patogênicos, tanto cepas padrão quanto isolados de amostras clínicas de animais, sendo estabelecida a CIM e CBM/CFM para os microrganismos testados. Quanto a citotoxicidade, não foram observadas diferenças em sua atividade metabólica quando cultivadas nas diferentes condições avaliadas, sendo assim viável. As imagens de MEV demonstraram que o OE influencia na morfologia da parede celular dos microrganismos, resultando em alterações em sua estrutura. Conclui-se que esses produtos são promissores ao desenvolvimento de alternativas antimicrobianas eficazes. Portanto, estudos posteriores são necessários para firmar o seu uso, ressaltando a necessidade de testes *in vivo*.

Palavras-chave: mastruz, antifúngico, antibacteriano, citotoxicidade, microscopia eletrônica de varredura.

ABSTRACT

The essential oil (EO) of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants is a product with diverse applications, as an insecticide, antiparasitic, and antimicrobial agent. The objective of this research was to evaluate the antimicrobial activity of the EO from *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants, as well as its cytotoxicity in cells, and to record images of scanning electron microscopy (SEM) of the microbial cells. Antimicrobial evaluations to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) were performed *in vitro* using the broth microdilution method. For minimum bactericidal and fungicidal concentrations (CBM and CFM) the method of growth in BHI agar was used. Cytotoxicity was evaluated in terms of viability and metabolic activity using *in vitro* cultured cat skin cells and ultrastructural analyzes of bacteria and yeast cells were obtained with the aid of a scanning electron microscope. The results showed that the EO from *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants showed antibacterial and antifungal activity by controlling the growth of several pathogenic microorganisms, both standard strains and isolates from clinical samples of animals, establishing the MIC and MBC/MFC for the tested microorganisms. As for cytotoxicity, no differences were observed in its metabolic activity when cultivated in the different evaluated conditions, thus being feasible. SEM images demonstrated that EO influences the morphology of the cell wall of microorganisms, resulting in alterations in its structure. It is concluded that these products are promising for the development of effective antimicrobial alternatives. Therefore, further studies are needed to confirm its use, emphasizing the need for *in vivo* tests.

Keywords: mastruz, antifungal, anti-bacterial, cytotoxicity, scanning electron microscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Dysphania ambrosioides</i> (L.) Mosyakin & Clemants. (A) área foliar e caule, (B) fluorescência e sementes imaturas.	18
Figura 2 - Óleo essencial de <i>Dysphania ambrosioides</i> (L.) Mosyakin & Clemants.	20
Figura 3 - Realização da transferência de alíquotas dos poços da CIM para as placas de CBM e CFM dos microrganismos testados.	28
Figura 4 - Placas de CFM com meio Agar Sabouraud semeado com diferentes CIM desafiados a <i>Malassezia pachydermatis</i> . (A) concentração sem crescimento fungico (0,156%), (B) concentração com crescimento fúngico (0,078%), (C) controle com clorexidine sem crescimento.	28
Figura 5 - Poços da CIM com a solução do óleo desafiado a <i>Malassezia pachydermatis</i>	29
Figura 6 - Avaliação morfológica de células obtidas de pele mamária de gata, expostas a clorexidine a 0,2%, solução de óleo a 50% e meio + tween a 50%. (A) Controle negativo (sem presença de clorexidine, solução de óleo, meio + tween), (B) Clorexidine a 0,2%, (C) Solução de Óleo a 50% e (D) Meio + Tween a 50%. Células semelhantes à fibroblastos (setas brancas), barra de escala = 20 µm. Aumento de 10×.	37
Figura 7 - MEV do microrganismo <i>Escherichia coli</i> com aumento de 30.000X. (A) sem exposição e (B) com exposição ao óleo de <i>Dysphania ambrosioides</i> (L.)....	40
Figura 8 - MEV do microrganismo <i>Staphylococcus aureus</i> com aumento de 30.000X. (A) sem exposição e (B) com exposição ao óleo de <i>Dysphania ambrosioides</i> (L.)..	41
Figura 9 - MEV do microrganismo <i>Malassezia pachydermatis</i> com aumento de 15.000X. (A) sem exposição e (B) com exposição ao óleo de <i>Dysphania ambrosioides</i> (L.).....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial de <i>D. ambrosioides</i> L. frente a diversas bactérias e uma levedura.....	33
Tabela 2 - Viabilidade avaliada pelo ensaio de azul de tripan das células da pele mamária de gata cultivadas in vitro após 10 min de incubação em diferentes condições.	38
Tabela 3 - Atividade metabólica avaliada pelo ensaio de MTT das células da pele mamária de gata cultivadas in vitro após 10 min de incubação em diferentes condições.	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OE	Óleo essencial
Dr	Doutor
LC50	Concentração letal
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2il-tetrazólico
OD	Densidade óptica
ME	Meio de extração
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
UFC	Unidade formadora de colônia
DMEM	Meio essencial mínimo modificado por Dulbecco
DMSO	Composto dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
MOSS	Herbário Dárdaro de Andrade-Lima
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
PBS	Tampão fosfato de sódio
TSB	Tryptic Soy Broth
PCL	Células-polímero
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
LAMIV	Laboratório de microbiologia veterinária

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
p	Para
mg	Miligramma
%	Porcentagem
μL	Microlitro
cm	centímetro
L	litro
p/p	Peso por peso
nm	nanómetro
v/v	Volume por volume
γ	Gama

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 Atividade Antimicrobiana De Fitoterápicos	15
3.2 <i>Dysphania ambrosioides</i> (L.) Mosyakin & Clemants.....	16
3.3 Óleo Essencial	19
3.4 Técnicas de Análises de Difusão em Poços e Diluição em Caldo.....	21
3.5 Citotoxicidade.....	22
3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	24
4 METODOLOGIA	25
4.1 Local do estudo.....	25
4.2 Cepas bacterianas e fúngicas.....	25
4.3 Cultivo da planta	25
4.4 Extração do óleo	26
4.5 Concentração Inibitória Mínima (CIM)	26
4.6 Concentração Bactericida/Fungicida Mínima (CBM e CFM)	27
4.7 Teste de Citotoxicidade.....	29
4.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	30
4.9.1 Preparo dos inóculos	30
4.9.2 Preparação para MEV	31
4.9 Análise Estatística	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1. Características organolépticas do óleo essencial	32
5.2 CIM, CBM E CFM.....	32
5.3 Citotoxicidade.....	36
5.4 MEV	39
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXOS	55

1 INTRODUÇÃO

A *Dysphania Ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants conhecida popularmente como “Mastruz” ou “erva maria”, é bastante usada em quase todas as regiões brasileiras, incluindo o Nordeste. É uma herbácea de raízes oblongas, brancas e com interior amarelo de folhas lanceoladas, pequenas e dentadas. Suas flores são pequenas e brancas, ou esverdeadas. Seus frutos são secos, pequenos e possuem numerosas sementes negras. É também conhecida como mastruço, ambrósia, anserina, chá-do-México, mastruz, matruz, mentruz, mentraz e quenopódio e erva-formigueira (SILVA et al., 2015).

É relatado o uso de formulações diversas da planta, de acordo com suas aplicações, seja na área da medicina humana ou medicina veterinária. No Brasil, por exemplo, emprega-se a decocção das partes aéreas para aliviar dores musculares; para tratar lesões nos ossos usa-se o emplastro (GARCIA; DOMINGUES; RODRIGUES, 2010). No Nordeste do país, onde a espécie é largamente usada, as folhas são batidas no liquidificador com leite para tratamentos de gripe (MORAIS et al., 2005). Já na Bolívia, usa-se para gripe um xarope obtido da raiz da planta (HAJDU; HOHMANN, 2012).

Quanto ao uso em animais, Hammond, Fielding e Bishop (1997) relataram a utilização do óleo essencial da planta contra *Toxocara canis* e Ribeiro et al. (2014) acrescentam que a planta é utilizada no tratamento de verminoses em caprinos e ovinos. Essa planta na sua forma inteira é usada para tratar asma, cólera, problemas digestivos, indigestão, problemas de estômago, flatulência, gripe, malária, espasmos, e como vermífugo. As folhas são usadas para tratar inflamações. Folhas, flores e frutos usados para tratar artrite, cólicas e diarreia. Flores são usadas para tratar tosse e taquicardia (Bussmann et al. 2018).

Adicionalmente, a espécie também é usada no Brasil como antifúngico para inflamação uterina e inflamações em geral (CARTAXO; SOUZA; ALBUQUERQUE, 2010; RAMOS; SOLEDADE; BAPTISTA, 2011), e como antibiótico e expectorante (SOUZA; FELFILI, 2006). O óleo essencial de mastruz possui efetividade antimicrobiana em pequenas concentrações, de até 0,6 %, de acordo com o microrganismo desafiado (FARIA, 2022). Portanto, visto o efeito inibitório microbiano, faz-se necessário a ampliação dos estudos mais intrínsecos sobre os efeitos medicinais desta planta frente a cepas padrão e clínicas de bactérias e fungos oriundos de animais domésticos e definição de limiar de citotoxicidade em cultivo de células da epiderme de felinos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o óleo essencial a base de folha e flor de matrúz (*Dysphania Ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants) como antimicrobiano em cepas bacterianas e fúngicas in vitro.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade do óleo essencial de *Dysphania Ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants);
- Analisar sensibilidade e a morfologia de bactérias e fungos quanto a ação do óleo de matrúz.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Atividade Antimicrobiana De Fitoterápicos

A atividade antimicrobiana de fitoterápicos tem sido objeto de estudo em muitos artigos científicos. Diversas plantas medicinais têm sido investigadas por suas propriedades antimicrobianas contra uma ampla gama de microrganismos patogênicos, incluindo bactérias, fungos e vírus. Um exemplo é o extrato de alho (*Allium sativum*), que tem sido amplamente estudado por suas propriedades antimicrobianas. Estudos indicam que o alho possui compostos ativos, como alicina, ajoeno e sulfetos, que apresentam atividade antibacteriana e antifúngica (Cutler, 2005; Ankri & Mirelman, 1999).

Além disso, alguns fitoterápicos têm demonstrado atividade antifúngica. Um exemplo é o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, também conhecido como óleo da árvore do chá. O óleo essencial da *Melaleuca alternifolia* contém terpenoides, como o terpinen-4-ol, que apresentam atividade antifúngica comprovadas contra diferentes espécies de fungos, incluindo *Candida albicans* e dermatófitos (Carson et al., 2006; Hammer et al., 2006).

O extrato de semente de uva (*Vitis vinifera*) também tem sido investigado por sua atividade antimicrobiana. Estudos mostram sua eficácia contra bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, além de possuir propriedades antifúngicas (Li et al., 2015; Mehdizadeh et al., 2016).

A planta medicinal *Rosmarinus officinalis*, conhecida como alecrim, também tem sido objeto de estudos sobre atividade antimicrobiana. Os extratos de alecrim demonstraram atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, além de atividade antifúngica contra *Candida albicans* (Ooi et al., 2006; Juven et al., 1994).

O extrato de chá verde (*Camellia sinensis*) também tem sido amplamente estudado por sua atividade antimicrobiana. Estudos mostram sua eficácia contra bactérias patogênicas, como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, além de possuir atividade antifúngica contra *Candida spp.* (Friedman, 2007; Osterburg et al., 2009).

Além das propriedades antimicrobianas contra bactérias e fungos, alguns fitoterápicos têm sido investigados por sua atividade antiviral. Um exemplo promissor é o extrato de *Echinacea purpurea*, que tem sido estudado por sua capacidade de estimular o sistema imunológico e inibir a replicação viral. Estudos *in vitro* mostraram que os extratos de

Echinacea purpurea podem inibir a replicação de vírus respiratórios, como o vírus da gripe e o vírus sincicial respiratório (Roxas & Jurenka, 2007; Hudson et al., 2011).

A ação fitoterápica do óleo essencial de *Dysphania ambrosioides* (L), também conhecido como erva-de-santa-maria ou mastruço, tem sido amplamente estudada devido às suas potenciais propriedades terapêuticas. Um estudo realizado por Botelho et al. (2018) investigou os efeitos do óleo essencial de *Dysphania ambrosioides* sobre a atividade antimicrobiana e anti-inflamatória. Os resultados mostraram que o óleo essencial apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas, incluindo *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. É importante ressaltar que embora esses estudos sugiram a atividade antimicrobiana de fitoterápicos, é necessário realizar mais pesquisas para compreender completamente os mecanismos de ação e a eficácia desses compostos em diferentes condições. Além disso, é fundamental considerar a padronização dos extratos vegetais, bem como a segurança e a dosagem adequada para o uso terapêutico.

3.2 *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants

A família Amaranthaceae apresenta predominância de ervas e subarbustos tropicais, reunindo 169 gêneros, cerca de 2.360 espécies vegetais e inclui representantes da família Chenopodiaceae (CARVALHO et al., 2010). No Brasil, estão presentes 146 plantas deste grupo taxonômico, sendo 20 espécies com ocorrência exclusiva no segundo maior bioma do país, o Cerrado (CARVALHO et al., 2012; PEREIRA, 2021).

Esta família botânica é economicamente relevante no Brasil, com 7 gêneros e 20 espécies vegetais utilizados como alimentos e/ou para fins medicinais. Os gêneros que têm maior quantidade de espécies com importância econômica são *Alternanthera*, *Amaranthus* e *Gomphrena* (GOMES; BAO, 2010).

Dysphania consiste em um dos gêneros da família Amaranthaceae e inclui plantas com características peculiares, tais como: tricomas glandulares, pelos simples, nervuras foliares laterais bem desenvolvidas, inflorescência frondosa, caule ereto e geralmente pouco ramificado, perianto com glândulas subsessais e sementes de formato subesférico (MOSYAKIN; CLEMANTS, 2002; SHEPHERD; WILSON, 2008; SUKHORUKOV et al., 2015). Uma das espécies desse gênero que tem sido muito estudada e é considerada pela OMS como uma das plantas mais empregadas na medicina popular, é *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants, popularmente conhecida como erva-de-santa-maria, mastruz, epazote,

ambrósia, quenopódio, erva-pomba-rola, erva-formigueira, chá-do-méxico, mastruço, erva-matapulga ou uzaidela (RIBEIRO, 2008; LIMA et al., 2011; BIBIANO et al., 2019).

D. ambrosioides apresenta como sinonímia e basinômio mais importante o nome científico *Chenopodium ambrosioides* L. Esta espécie foi transferida para o grupo *Dysphania* por questões morfológicas e após realização de estudos moleculares mais aprofundados (VERLOOVE, 2013). Consiste em uma herbácea que pode atingir até 1 m de altura e possui aroma forte, ciclo anual ou perene conforme o tipo de variedade, folhas com cinco lobos, de coloração verde pálido e borda dorsal serrilhada, e sementes marrons com ponta chanfrada (GROZEVA; CVETANOVA, 2013; SÁ et al., 2015; SÁ et al., 2016).

A espécie *D. ambrosioides* pertence à Lista Nacional de Plantas Medicinais do Sistema Único de Saúde (RENISUS) (MARMITT et al., 2015), a qual possui relevância na medicina popular brasileira. A infusão das partes aéreas tem sido usada com indicação para atividade diurética, anti-helmíntica, na cicatrização de feridas, problemas respiratórios, processos inflamatórios e dor, bronquite, tuberculose e doenças reumáticas (TRIVELLATOGRASSI et al., 2013), antifúngico (PRASAD et al., 2010), coincidindo com os usos tradicionais do gênero *Chenopodium* na medicina Ayurveda (YADAV et al., 2007). O extrato aquoso das folhas demonstrou atividade de cicatrização de feridas em ratos através da estimulação de proliferação de fibroblastos e miofibroblastos (SÉRVIO et al., 2011; FRANKENBERGER, 2022).

Os compostos voláteis desta espécie localizam-se nos tricomas glandulares, na face abaxial e adaxial foliar (SÁ et al., 2016) e nas sementes, e diferem de acordo com a localização de plantio, sendo α -terpineno (5, massa teórica 136,1252), *p*-cimeno (6, massa teórica 134,1096) e ascaridol (7, massa teórica 168,1150) os terpenos mais relatados como majoritários. O ascaridol é um terpeno endoperóxido, encontrado nas partes aéreas e nas sementes, com grande potencial biológico, com destaque para o efeito sedativo e analgésico (CAVALLI et al., 2004; CHU et al., 2011; TRIVELLATOGRASSI et al., 2013), e já tem sido empregado como ativo repelente e inseticida (ISMAN, 2020).

O óleo essencial (OE) de *D. ambrosioides* apresenta atividades giardicida (NEIVA et al., 2011; FRANKENBERGER, 2022), repelente de mariposas (SINGH; PANDEY, 2018), antiparasitário contra *Taenia saginata*, *Ascaris lumbricoides*, *Leishmania* sp. (MONZOTE et al., 2011), inseticida contra *Blattella germanica* (ZHU et al., 2012), pulgas, carrapatos, piolhos, percevejos, traças, lagartas, além de larvicida contra *Lucilia ingênua* (HARRAZ et al., 2015); apresenta mortalidade contra *Sitophilus granarius* L. acima de 80% em 24 h (discos com 0,2 μ L/cm²) (TAPONDJOU et al., 2002), e em outro estudo o óleo essencial da

espécie coletada na China demonstrou atividade inseticida ($LC_{50} = 3,08 \text{ mg/L}$) através da fumigação contra *S. zeamais* (CHU; FENG HU; LIU, 2011).

Um estudo de 2016 demonstrou que a espécie *D. ambrosioides* coletada em Recife-PE (Brasil) continha 42.14% de α -terpineno, 31.57% de α -terpineil-acetato e 0.87% de ascaridol (responsável pela atividade anti-helmíntica); sendo que a concentração deste último é influenciável pela qualidade do solo e local de coleta (SÁ et al., 2016). Em um estudo de 2016 foi investigado o impacto do manganês sobre o crescimento de *D. ambrosioides* em cultivo hidropônico, sendo o único trabalho encontrado com *D. ambrosioides* envolvendo a hidroponia, onde foi visto que na concentração acima de $10000 \mu\text{mol/L}$ de manganês ocorreu dano intracelular, ocorrendo rompimento da membrana bilamelar dos cloroplastos, além de redução no número de mitocôndrias nas células radiculares (XUE et al., 2016). Segundo Frankenberger (2022), o óleo essencial de *D. ambrosioides* mostrou potencial repelente e inseticida contra *S. zeamais*, e o seu cultivo de forma hidropônica mostrou potencial atividade inseticida contra *B. brassicae* e este mesmo óleo essencial, assim como o óleo essencial de *M. pulegium* apresentou atividade satisfatória contra *L. pseudobrassicae*.

Figura 1 - *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants. (A) área foliar e caule, (B) fluorescência e sementes imaturas.



Fonte: Autoria própria (2023).

3.3 Óleo Essencial

Os óleos essenciais, denominados também de óleos voláteis ou essências, são misturas de compostos químicos voláteis, de baixo peso molecular, que se apresentam na forma líquida oleosa, geralmente com odor intenso e característico (PEREIRA, 2021). Sua produção está relacionada ao metabolismo secundário das plantas, sendo que nem todas as espécies vegetais os sintetizam. As plantas que produzem os componentes de óleos essenciais são chamadas de aromáticas (BAKKALI et al., 2008).

A principal função destas amostras voláteis na planta está relacionada à adaptação no meio ambiente, permitindo a sobrevivência do vegetal e podendo atuar na proteção contra predadores, pois apresentam ações inseticida e antimicrobiana. Podem ser encontrados nos diversos órgãos das plantas (raiz, caule, folhas, flores) e, geralmente, estão presentes em órgãos especializados chamados glândulas ou aparelhos secretores, tais como células secretoras, bolsas secretoras, canais e tricomas glandulares (BAKKALI et al., 2008; GONÇALVES, 2015).

Os óleos voláteis possuem grande importância econômica, pois são utilizados como matéria-prima na produção de alimentos, bebidas e cosméticos, e como coadjuvantes em medicamentos (BIZZO et al., 2009; STEFFENS, 2010). Estes produtos vegetais também são empregados como inseticidas, fungicidas e larvicidas no cultivo de frutas e hortaliças (RIBEIRO, 2016). Diferentes métodos são utilizados para extrair os óleos essenciais. Todavia, dependendo da técnica a ser empregada, a constituição química destes óleos pode variar expressivamente (CASSEL et al., 2009). As técnicas mais utilizadas para a obtenção dos produtos vegetais voláteis são: destilação a vapor, hidrodestilação, extração por solventes orgânicos ou por fluido supercrítico, prensagem a frio e enfloração (LEITE-JÚNIOR, 2018).

O perfil químico dos óleos essenciais normalmente varia em relação ao número de constituintes, podendo apresentar de 20 a 200 compostos, classificados de acordo com suas concentrações na mistura em majoritários (20 a 95%), secundários (1 a 20%) e traços (menores que 1%) (SIMÕES et al., 2017). A composição destes óleos abrange terpenos, como mono e sesquiterpenos, raramente diterpenos, além de fenilpropanoides. Os compostos terpênicos podem apresentar diferentes funções químicas, tais como hidrocarbonetos, álcoois, cetonas, aldeídos, ésteres, fenóis, éteres e outros (WILDWOOD, 1996).

Os monoterpenos são constituídos por duas moléculas isoprênicas ($C_{10}H_{16}$) e sintetizados a partir da via do metileritritol, sendo importantes para a fabricação de medicamentos, perfumes ou biocombustíveis (MARMULLA; HARDER, 2014; YANG et al.,

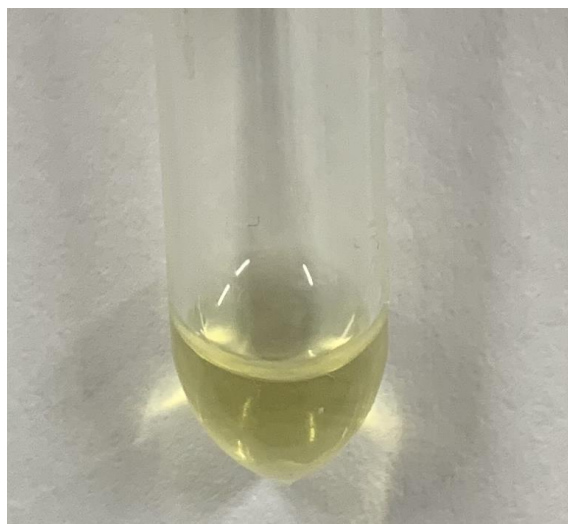
2014). O grupo dos sesquiterpenos é sintetizado em plantas superiores pela rota do mevalonato e apresenta um maior número de representantes de terpeno, incluindo cerca de 5000 substâncias orgânicas naturais, que podem ser oxigenadas ou não oxigenadas (MARTINS, 2012; BARTIKOVA et al., 2014).

Fenilpropanoides são metabólitos secundários constituídos por um anel aromático unido a uma cadeia de três carbonos e sintetizados a partir do aminoácido fenilalanina para proteção das plantas contra infecções, radiação ultravioleta e herbívoros (SILVA et al., 2014). Estes componentes podem ser detectados em proporções significativas em óleos voláteis de certas espécies vegetais, conferindo a estes produtos naturais um odor característico (JAKIEMI, 2008).

A quantidade de compostos químicos, bem como seus teores relativos e rendimento dos óleos essenciais variam significativamente em plantas da mesma espécie (LEITE-JÚNIOR, 2018). A variabilidade química em uma espécie vegetal sugere a existência de diferentes quimiotipos e pode estar relacionada a fatores genéticos e climáticos, alterações na fisiologia, estágios de desenvolvimento ou tipo de material utilizado para extração, disponibilidade de nutrientes e método de coleta (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; ANWAR et al., 2009; MORAIS, 2009; HARRAZ et al., 2014; SÁ et al., 2014).

Os óleos essenciais têm demonstrado importante potencial terapêutico e farmacológico. Dentre as atividades biológicas associadas a estas amostras voláteis, destacam-se as ações antioxidante (RUBERTO; BARATTA, 2000), antifúngica, bactericida, inseticida, anti-inflamatória, antiviral (ALI et al., 2015) e anti-hiperglicemiante (MOMTAZ; ABDOLLAHI, 2010).

Figura 2 - Óleo essencial de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants.



Fonte: Autoria própria (2023).

3.4 Técnicas de Análises de Difusão em Poços e Diluição em Caldo

A técnica de análise de difusão em poços e diluição em caldo é uma metodologia amplamente utilizada em diversos campos da ciência, incluindo microbiologia, imunologia e farmacologia. Esta técnica permite a determinação da atividade antimicrobiana de substâncias, a avaliação da resposta imune e a determinação da concentração efetiva de agentes terapêuticos. Um estudo pioneiro que discute a técnica de análise de difusão em poços foi realizado por Bauer et al. em 1966. O artigo descreve o método de difusão em agar com disco, que é uma variação da técnica de difusão em poços. O estudo estabelece um protocolo para testar a sensibilidade de micro-organismos a antibióticos por meio da medida do diâmetro da zona de inibição.

Outra abordagem comum é a técnica de diluição em caldo, que permite a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de substâncias antimicrobianas. Um estudo relevante nesse campo foi conduzido por Andrews em 2001. O artigo discute as diferentes metodologias de diluição em caldo, incluindo a técnica de microdiluição em caldo, que é amplamente utilizada para avaliar a atividade antimicrobiana de compostos.

Vale ressaltar que, a técnica de análise de difusão em poços tem sido aplicada em diversos estudos de determinação da atividade antimicrobiana de produtos naturais. Em um estudo recente, Zhang et al. (2019) investigaram a atividade antibacteriana de extratos de plantas utilizando a técnica de difusão em poços. O estudo apresenta os resultados da atividade antimicrobiana de diferentes extratos vegetais contra bactérias e leveduras relevantes em dermatologia.

Além da área de microbiologia, a técnica de difusão em poços tem sido utilizada na avaliação de respostas imunes. Em um estudo publicado por Voller et al. (1977) discute-se a aplicação da técnica de difusão em poços no contexto dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA). O artigo aborda os princípios básicos da técnica e sua relevância na detecção de antígenos e anticorpos específicos.

Além disso, a técnica de diluição em caldo tem sido aplicada no campo farmacológico para avaliar a eficácia de agentes terapêuticos. Um exemplo é o estudo de Smith et al. (2015), no qual descreve a utilização da técnica de diluição em caldo para determinar a concentração efetiva de um agente antimicrobiano contra uma determinada cepa bacteriana.

3.5 Citotoxicidade

A chamada citotoxicidade das substâncias solúveis num determinado meio extracelular é a capacidade de as mesmas influenciarem nos mecanismos de quimiotaxia ou quimiorrepulsão nas células migratórias, através da ação de agentes tóxicos como substâncias químicas ou células imunes (OLIVEIRA, 2009; ALBERTS, et al. 2004).

As rígidas regras desenvolvidas pelas entidades protetoras de animais em relação ao seu uso em laboratório foram decisivas para o desenvolvimento de estudos de métodos viáveis de análise *in vitro* de acordo com o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization), o teste de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos (CAO, et al. 2005).

Segundo relato de Spangberg, em 1978, testes *in vitro* servem para analisar a citotoxicidade prévia de determinado material e, de acordo com os achados sugerir ou não o seguimento do experimento *in vivo*. De acordo com Schmalz, em 1994, os testes de citotoxicidade são valiosos para a compreensão do comportamento biológico dos materiais avaliados, considerando-se as limitações destes testes durante a interpretação dos resultados, e que não irão substituir os testes *in vivo*, porém poderão diminuir substancialmente o número de testes, diminuindo o número de materiais com aplicabilidade potencialmente clínica.

Segundo Oliveira (2009), os ensaios *in vitro* são normalmente efetuados como um teste de triagem inicial na primeira fase da avaliação da biocompatibilidade. Citotoxicidade significa causar efeito tóxico no nível celular. Entre os efeitos tóxicos, pode ser citada a morte celular, alterações na permeabilidade da membrana, ou a inibição enzimática. A alta biocompatibilidade é uma importante propriedade dos implantes, e seus métodos de análise, na engenharia de tecidos, são realizados através de implantes *in vivo* ou em culturas de células *in vitro*. A necessidade de estudos do comportamento celular *in vitro* sobre a superfície de diferentes materiais é fundamental para o uso racional e seguro na prática médica. No método *in vitro* podem ser observados os processos de crescimento celular diretamente sobre os biomateriais. Características de adequada permeação e excelente adesividade celular são importantes fatores na avaliação de biomateriais. As propriedades físico-químicas dos biomateriais, tanto do aspecto químico ou morfológico, causam efeitos na adesão, na distribuição, na proliferação, na diferenciação e na função celular (MÜLLER, 2008).

A morfologia celular refere-se ao estudo da forma, tamanho, estrutura e organização das células. A avaliação da morfologia celular em testes de citotoxicidade é importante porque células saudáveis apresentam uma morfologia característica, enquanto células afetadas por substâncias tóxicas podem apresentar alterações significativas na sua forma e estrutura.

A citotoxicidade de um biomaterial pode ser investigada usando diferentes tipos de células pelo ensaio de MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2-il-tetrazólico), o qual mensura a atividade mitocondrial de células vivas e representa um parâmetro de sua atividade metabólica. Dessa maneira, podem ser usadas como células originadas de cultura primária, como no trabalho de Zhu e colaboradores em 2005, ou como linhagem celular usado, em 2007, por Tang e colaboradores.

O ensaio de MTT é um teste laboratorial e um ensaio colorimétrico padrão para mensurar a proliferação celular. Também pode ser usado para a citotoxicidade de um potencial agente medicamentoso ou de outros materiais tóxicos (JAYABALAN, 1993). A viabilidade celular pode ser avaliada por vários métodos; entretanto é aconselhável um processo que utilize uma menor variabilidade e tempo na análise das amostras. (BHATIA; YETTER, 2008).

O sal MTT de coloração amarela (brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico) é reduzido na mitocôndria das células vivas, através da clivagem da enzima succinato desidrogenase, em cristais de formazan, de coloração púrpura. A variável contínua resultante da quantidade de cristais formados é diretamente proporcional ao número de células viáveis. A produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória. A densidade óptica (OD) resultante do Teste MTT é determinada em espectrofotômetro (CASTRO, et al. 2004).

A citotoxicidade pode ser comparada entre diferentes biomateriais, como os derivados da quitosana, celulose, colágeno, látex ou ácido hialurônico. Os resultados são extraídos do contato direto de células cultivadas sobre superfície das películas, ou as células cultivadas e expostas ao meio de extração (ME) dos biomateriais testados. A viabilidade celular é expressa como uma porcentagem de células vivas do material testado versus a porcentagem de células do controle positivo de citotoxicidade (CASTRO, et al. 2004; CÁRDENAS, et al. 2008; FRADE, 2001).

A atividade metabólica das células é avaliada em termos de parâmetros como a taxa de crescimento, a taxa de consumo de oxigênio, a produção de energia, a produção de metabólitos específicos, entre outros. A análise desses parâmetros pode indicar se as células estão sendo afetadas negativamente pela substância testada. Em resumo, a avaliação da

atividade metabólica das células é uma ferramenta importante para avaliar a toxicidade de substâncias em células. A análise da atividade metabólica das células pode fornecer informações valiosas sobre o estado funcional das células e sua capacidade de se adaptar a diferentes condições de estresse.

3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O princípio de um microscópio eletrônico de varredura (MEV) consiste em utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica cuja varredura está perfeitamente sincronizada com aquela do feixe incidente (DEDAVID, 2007).

Basicamente a MEV inclui a geração de elétrons, o controle e focagem do feixe de elétrons, a interação dos elétrons com a amostra e a detecção dos elétrons secundários e retroespalhados. A instrumentação envolvida na MEV inclui o microscópio propriamente dito, os sistemas de vácuo, os sistemas de controle eletrônico e a câmera de detecção.

No trabalho de Dedavid (2007), ainda descreve que quando o feixe primário incide na amostra, parte dos elétrons difunde-se e constitui um volume de interação cuja forma depende principalmente da tensão de aceleração e do número atômico da amostra, neste volume, os elétrons e as ondas eletromagnéticas produzidos são utilizados para formar as imagens ou para efetuar análises físico-químicas. A imagem formada a partir do sinal captado na varredura eletrônica de uma superfície pode apresentar diferentes características, uma vez que a imagem resulta da amplificação de um sinal obtido de uma interação entre o feixe eletrônico e o material da amostra. Diferentes sinais podem ser emitidos pela amostra. Dentre os sinais emitidos, os mais utilizados para obtenção da imagem são originários dos elétrons secundários e/ou dos elétrons retroespalhados.

As aplicações da MEV são variadas, e incluem o estudo de características estruturais e morfológicas de amostras, o estudo de superfícies e interfaces, a análise de falhas em materiais, a análise de tecidos biológicos e a caracterização de partículas e microrganismos. A MEV tem sido difundida no meio científico ao longo dos anos e propiciado grandes contribuições, como no trabalho de Son-di e Salopek (2004), onde foi verificada a ação antimicrobiana de nano partículas de prata, essas nano partículas mostraram-se bactericidas eficazes, e sua ação tem ligação direta com o tamanho das partículas, nas quais foram verificadas por meio da técnica da MEV.

Já no trabalho de Yoshimoto (2003), dispuseram-se da técnica de microscopia eletrônica de varredura, para analisar a superfície das interações das múltiplas camadas de células sob as células-polímero (PCL), e essas interações são favoráveis às aplicações em engenharia do tecido ósseo. A MEV é uma técnica poderosa e versátil que permite a análise de amostras em escala microscópica, e continua a ser uma ferramenta importante para a pesquisa em diversas áreas da ciência.

4 METODOLOGIA

4.1 Local do estudo

O estudo foi conduzido nos Laboratórios de Microbiologia Veterinária (LAMIV), Biotecnologia Animal (LBA), Morfofisiologia Animal Aplicada (LABMORFA), Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) ambos pertencentes a Universidade Federal Rural do Semi-Árido, localizado no município de Mossoró/RN.

4.2 Cepas bacterianas e fúngicas

Foram utilizadas amostras de cepas bacterianas padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), e cepas bacterianas clínicas obtidas de animais domésticos *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, e *Corynebacterium sp.* Dentre as cepas fúngicas foi selecionada uma padrão de *Candida albicans* (ATCC 10231) e uma cepa clínica obtida de animais domésticos de *Malassezia pachydermatis*, mantidas sob refrigeração no laboratório de microbiologia veterinária.

4.3 Cultivo da planta

As folhas e flores de *Dysphania Ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants foram colhidas manualmente no horário de 07 da manhã a partir do cultivo de espécimes presentes na Farmácia Viva Veterinária da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró-RN, sob coordenadas geográficas 5°12'16.0" de latitude sul e 37°19'26.4" de longitude oeste. A programação de irrigação foi estabelecida para duas vezes ao dia, sendo a primeira entre os horários de 06:00-07:00 e a segunda entre 17:00 e 18:00. Estas passaram-se a serem

acondicionadas em sacos individuais de cor preta e levadas ao laboratório de Microbiologia Veterinária, na UFERSA, para o processamento do óleo. As exsiccatas foram levadas ao Herbário Dárdaro de Andrade Lima, para catalogação obtendo o número de tombamento definido como nº15833.

4.4 Extração do óleo

Foi empregado o método de arraste por vapor d'água e/ou destilação a vapor, por um período de 2 horas a partir da ebulição, no equipamento denominado Clevenger. Foram utilizadas 100 g da amostra de *D. ambrosioides* (L) in natura em triplicata para determinação do rendimento expresso em (% p/p). A água foi aquecida em um balão fundo redondo sobre uma manta aquecedora que entra em ebulição, os vapores de água resultantes desse processo são conduzidos sob pressão em direção a outro recipiente, onde se encontra o material vegetal. O calor do vapor faz com que as paredes celulares se abram. Dessa forma, o óleo que estava entre as células evapora junto com vapores de água e os voláteis são conduzidos em direção ao condensador que vai para o tubo de resfriamento; em seguida, o óleo é coletado em um recipiente. O óleo essencial deverá ser acondicionado em vidro âmbar, e mantido sob refrigeração a 5°C.

4.5 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada segundo o método de microdiluição adaptado do CLSI (2003). Neste ensaio foram utilizadas microplacas de 96 poços (12 colunas e oito linhas) com fundo chato. As concentrações do decocto foram preparadas e testadas logo após sua confecção. Enquanto que uma solução-estoque do óleo era previamente preparada dissolvendo 500 µL do óleo essencial em 2.500 µL de Tryptic Soy Broth (TSB) com Tween 80 a 0,5%. A CIM dos produtos testes foi determinada pela microdiluição em caldo Tryptic Soy Broth (TSB) com suspensões bacterianas de 10^8 UFC/mL e fúngicas de 10⁵ UFC/mL, ajustadas por comparação com a escala 0,5 de McFarland (densidade óptica 0,08 a 0,1 avaliada num comprimento de onda de 530nm) e com concentrações do óleo variando de 5,0 a 0,004 %, todas em triplicata. Como controle positivo foi utilizada a clorexidina, testada nas concentrações de 0,5 a 0,0005%, e como controle de crescimento (negativo) o inóculo semeado somente em caldo TSB, também em triplicata. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas para as bactérias e 48 horas para os fungos.

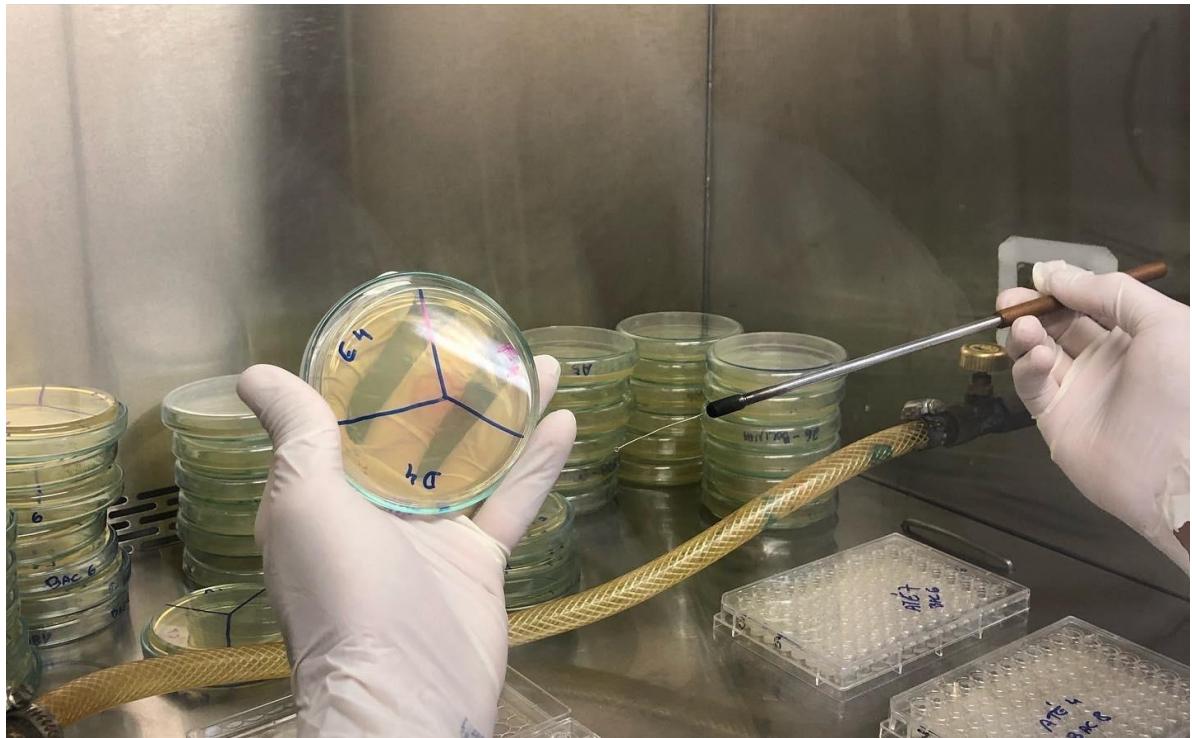
Quanto a cultura da *Malassezia pachydermatis*, foi necessário realizar uma adaptação nos meios de cultura, sendo substituído pelo Caldo de Sabouraud Dextrose adaptado por Rukayadi; Hwang (2006) com 1%(v/v) de puro óleo de oliva para se efetuar a CIM (figura 05) e Agar Sabouraud para efetuar a CFM (figura 04), o crescimento médio foi observado a partir de 72 horas pós semeadura, tanto no caldo quando no meio Agar Sabouraud.

Após esse período, a leitura dos poços com ou sem crescimento microbiano foi realizada pela observação da presença/ausência de turvação, por meio de leitura da absorbância em leitor de microplacas utilizando um comprimento de onda de 630nm. A CIM foi definida como a menor concentração da droga na qual não foi observado crescimento microbiano, ou seja, que não houve diferença entre a média da absorbância inicial e final para cada inóculo.

4.6 Concentração Bactericida/Fungicida Mínima (CBM e CFM)

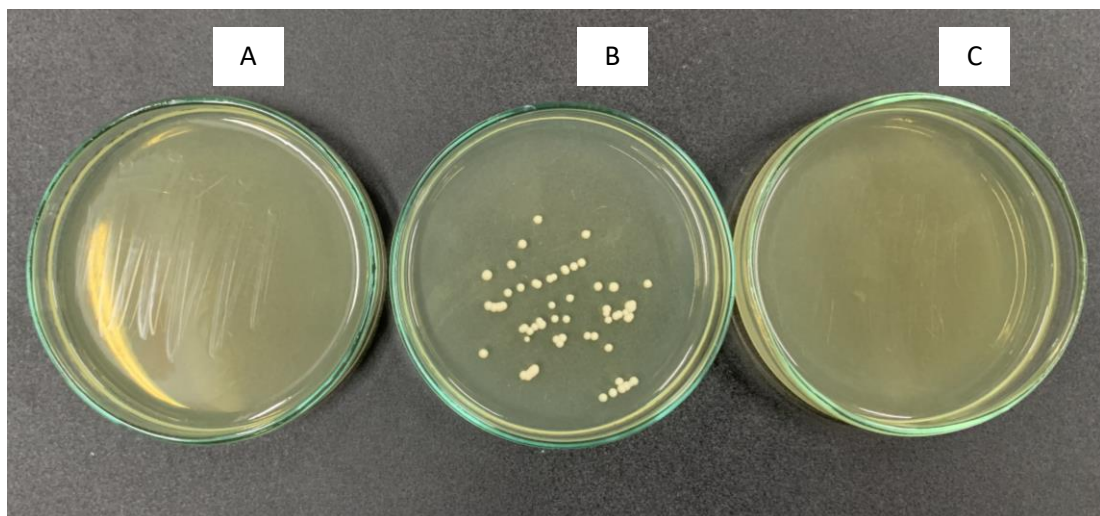
Para determinação da CBM ou CFM, alíquotas de 10 µL dos poços de cada concentração de óleo variando de 5,0 a 0,004 %, testada por microdiluição, os quais não apresentaram crescimento microbiano a olho nu, foram inoculados em regiões previamente identificadas de placas de Petri contendo meios Agar BHI ou Agar Sabouraud, respectivamente, com o auxílio de alça de platina calibrada (figura 03), seguido de incubação a 37°C por 24 h para bactérias e de 48-72 h para os fungos. A menor concentração em que não houve crescimento de colônias bacterianas ou fúngica nas placas foi indicada como a CBM e CFM do óleo para cada cepa microbiana testada.

Figura 3 - Realização da transferência de alíquotas dos poços da CIM para as placas de CBM e CFM dos microrganismos testados.



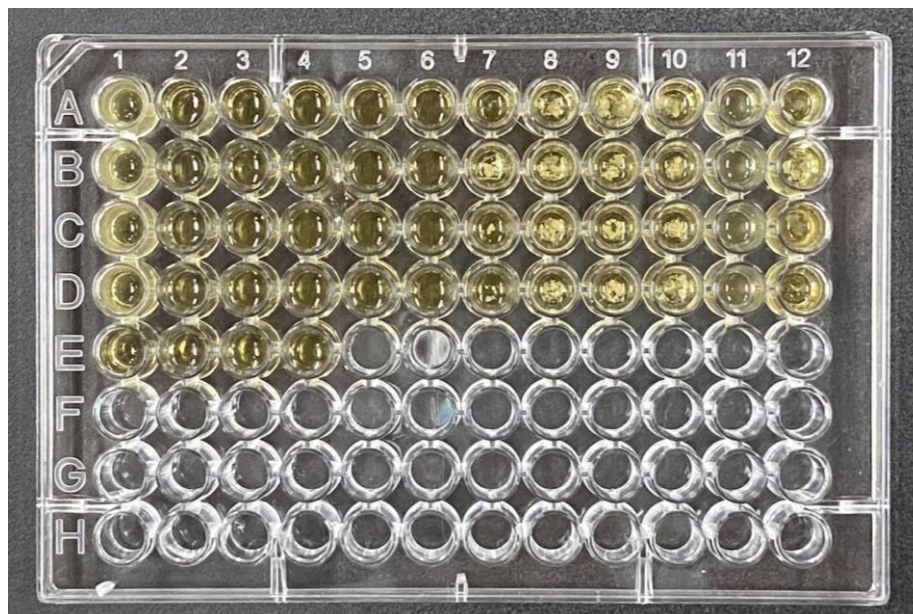
Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 4 - Placas de CFM com meio Agar Sabouraud semeado com diferentes CIM desafiados a *Malassezia pachydermatis*. (A) concentração sem crescimento fungico (0,156%), (B) concentração com crescimento fúngico (0,078%), (C) controle com clorexidine sem crescimento.



Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 5 - Poços da CIM com a solução do óleo desafiado a *Malassezia pachydermatis*.



Fonte: Autoria própria (2023).

4.7 Teste de Citotoxicidade

Para a citotoxicidade, fragmentos da pele do sítio cirúrgico das gatas (9,0 mm³) foram cultivados in vitro em meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2% de solução de antibióticos-antimicóticos a 38,5 °C e 5% CO₂. Células derivadas do cultivo primário e já como subcultivo foram utilizadas para a análise da toxicidade, com 90% de confluência e numa concentração de $5,0 \times 10^4$ células/mL. Estas células foram então divididas em cinco grupos experimentais e incubadas por 10 min: a) sem a presença do extrato (grupo controle negativo); b) Clorexidine a 0,2% (solução mãe a 0,4% - grupo clorexidine); c) Solução de óleo a 50% (solução mãe a 100% - grupo óleo); e d) Meio + Tween a 50% (solução mãe a 100% - grupo Tween). Após o período de incubação, células foram avaliadas quanto à sua morfologia usando microscópio invertido (Nikon TS100, Tokyo, Japan). Além disso, células foram avaliadas quanto à viabilidade usando o ensaio com azul de tripan a 0,4%, sendo células coradas em azul consideradas não viáveis e células incolores consideradas viáveis. Brevemente, após a tripsinização, células foram coradas com azul de tripan e contabilizadas em câmara de Neubauer, sendo a taxa de viabilidade calculada de acordo com a fórmula: $(n^\circ \text{ de células vivas} / n^\circ \text{ total de células contadas}) * 100$

Finalmente, células foram avaliadas quanto à sua atividade metabólica usando o ensaio de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2-il-tetrazólico (MTT). Células foram incubadas com 5 mg/mL de MTT por 3 h. Após esse período, a solução de MTT foi removida e acrescido 1,0 mL de composto dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilização dos cristais de formazan. Adicionalmente, a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Shimadzu® UV-mini-1240, Kyoto, Japão) a uma absorbância de 595 nm. Para a análise estatística, os dados, expressos como média $\pm$ erro padrão de três repetições, foram analisados usando o software GraphPad (Graph-Pad Software Incorporation, La Jolla, CA, USA). Todos os resultados foram verificados para normalidade pelo teste Shapiro-Wilk e homoscedasticidade pelo teste de Levene. Os dados não apresentaram distribuição normal e foram transformados por arco seno.

4.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A preparação das amostras microbianas para a leitura de MEV seguiu as seguintes etapas: preparo dos inóculos e preparação para MEV.

4.9.1 Preparo dos inóculos

As cepas utilizadas na pesquisa foram ajustadas com o auxílio de um espectrofotômetro (Biospectro SP-22), com suspensões bacterianas de 10^8 UFC/mL e fúngicas de 105 UFC/mL, ajustadas por comparação com a escala 0,5 de McFarland (densidade óptica 0,08 a 0,1 avaliada num comprimento de onda de 530nm). Após o ajuste, 1 mL da solução ajustada foi adicionada a 1 mL de meio de cultura Tryptic Soy caldo estéril e incubada em estufa bacteriológica à 37 °C por 24 horas (*C. albicans* por 48h e *M. pachydermatis* por 72h). Posteriormente, 1 mL da solução incubada foi adicionado a 1 mL de solução do óleo no valor de duas vezes a CIM correspondente a cada micro-organismo. Além disso, mais 1 mL da solução de incubação foi novamente adicionado ao mesmo meio de cultura sem o óleo para a obtenção de células saudáveis para comparação, então foram novamente incubados à 37 °C por 24 horas (*C. albicans* por 48h e *M. pachydermatis* por 72h).

4.9.2 Preparação para MEV

Passado o tempo de incubação as amostras foram levadas à centrífuga a 3000 rpm por um período de 10 minutos para a formação dos péletis de processamento. Então, seguiu-se as etapas de preparação das amostras observando-se de acordo com Gama (2023) e Ibrahim (et al., 2013) com algumas modificações. As etapas foram fixação, pós-fixação, desidratação e secagem das células microbianas peletizadas.

Fixação: o material peletizado foi fixado em solução fixadora de glutaraldeído a 25%, solução tampão fosfato de sódio (PBS) a 0.2 M e água (1.2, 5.0 e 3.8 mL, respectivamente) por 12 horas. Passado este tempo, cada pélete foi lavado por três vezes em solução de PBS (0.1 M) durante 30 minutos.

Pós-fixação: para a pós-fixação utilizou-se solução de ósmio (1 g diluído em 100 mL de PBS) durante 30 minutos. Posteriormente, o material foi novamente lavado por três vezes durante 5 minutos.

Desidratação: nesta etapa utilizou-se solução de álcool etílico em diferentes porcentagens variando de 15 até 100% de álcool (15, 25, 30, 50, 70 e 100%). Nas porcentagens de 15 a 70% as células peletizadas ficaram expostas por 10 minutos. Já com o álcool puro (100%) o tempo de exposição foi de apenas 5 minutos.

Secagem: para esta fase, utilizou-se o método físico de secagem, a secagem ao ar, ou seja, as células microbianas foram expostas ao ar em temperatura ambiente até a secagem total do material.

Então, após todas estas etapas de processamento, as amostras secas foram expostas a uma camada de ouro de 9 nm e então foram levadas para as observações em microscópio eletrônico de varredura (Pfeiffer Vacuum – D-35614 Assiar) a um ritmo de tensão acelerada de 30 KV.

4.9 Análise Estatística

Análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey, foi utilizada para comparar a média da absorbância inicial e final de cada inóculo, utilizando-se do software Sisvar versão 5.6. As diferenças foram significativas quando $P \leq 0,05$.

Os resultados da citotoxicidade foram analisados por ANOVA (múltiplas comparações) seguida pelo teste de Tukey, a uma significância de $P < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Características organolépticas do óleo essencial

O rendimento do óleo essencial, obtido pela divisão do volume obtido de óleo essencial (1,6 ml) pela massa vegetal (1.269 gramas), foi de 0,13%. Como propriedades organolépticas o óleo apresenta cor aproximada de um tom verde claro translúcido, sabor moderadamente picante, brilho moderado, textura oleosa e odor forte e levemente cítrico. O óleo essencial de mastruz é rico em compostos como o ascaridol, o limoneno, o p-cimeno e o terpinoleno (SÁ et al., 2016).

5.2 CIM, CBM E CFM

Os resultados obtidos para atividade antimicrobiana do óleo essencial de *D. ambrosioides* (L) expressos como CIM, CBM e CFM, estão dispostos na tabela 1, para as bactérias e fungos testados.

Os dados apresentados indicam que as bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. agalactiae*, *S. enteritidis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Corynebacterium* sp. e os fungos *C. albicans* e *Malassezia pachydermatis* apresentaram sensibilidade ao óleo essencial do mastruz de acordo com a CIM. No entanto, não foi observada CBM do óleo essencial para as bactérias *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, sugerindo-se que sejam testadas concentrações mais altas contra estas cepas. Os dados referentes a CIM e CBM/CFM do controle positivo (clorexidina) foram suprimidos da tabela pois apresentou-se como o mesmo valor (0,003%) para todos os microrganismos testados.

Tabela 1 - Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial de *D. ambrosioides* L. frente a diversas bactérias e uma levedura.

Bactéria/fungo	CIM óleo (%)	CBM óleo (%)	CFM óleo (%)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,039	0,039	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0,039	NO	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0,039	0,039	-
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	0,156	0,156	-
<i>Escherichia coli</i>	0,009	0,009	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,625	NO	-
<i>Corynebacterium</i> sp.	0,019	0,019	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0,009	-	0,009
<i>Malassezia pachydermatis</i>	0,078	-	0,156

*Nota: CIM = Concentração Inibitória Mínima; CBM = Concentração Bactericida Mínima; CFM = Concentração Fúngica Mínima; NO = não observado; (-) = ausência de atividade.

Fonte: Autoria própria (2023).

O estudo de Oliveira em 2019 avaliou a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *D. ambrosioides* contra 17 cepas de bactérias patogênicas. O estudo mostrou que o óleo essencial foi efetivo contra todas as cepas testadas, apresentando concentrações mínimas inibitórias (CIM) entre 62,5 e 500 µg/mL.

Na tabela 01 podemos analisar que o *S. aureus* obteve a média da CIM de 0,039% e CBM de 0,039%, estudos apresentam resultados mostrando que a CMI do óleo essencial de *D. ambrosioides* para as cepas de *S. aureus* testadas variou de 0,125 á 0,250%. (SAJJADI, 2017).

Já na pesquisa de Silva et al. (2020) avaliou a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *D. ambrosioides* contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). O estudo mostrou que o óleo essencial foi efetivo contra as cepas de MRSA testadas, apresentando CIM entre 0,5 e 2 µL/mL.

Com base em uma pesquisa realizada, não foram encontrados estudos específicos que investigaram a concentração mínima inibitória do óleo essencial de *Dysphania Ambrosioides* contra o *Streptococcus agalactiae* e *Corynebacterium* sp. Entretanto a CIM obtida neste trabalho foi de 0,039% para ambas e CBM de 0,039% e 0,019% sequencialmente.

Para *Pseudomonas aeruginosa* o valor da CIM obtido foi de 0,039%, mas a CBM não foi observada, um estudo publicado no “Journal of Applied Pharmaceutical Science” em 2017 avaliou a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *D. Ambrosioides* contra várias cepas bacterianas, incluindo *P. aeruginosa*, demonstrou que o óleo essencial apresentou atividade bactericida contra essa bactéria, com uma CIM de 0,125%, sendo um valor superior ao encontrado nessa pesquisa (CHANDRASHEKAR, 2017). As diferenças nessas concentrações do OE em experimentos diferentes podem ser justificadas pela afirmação de que a concentração dos componentes químicos é diretamente influenciável pela qualidade do solo e local de coleta, o que consequentemente poderá variar resultados sobre sua ação antimicrobiana (SÁ et al., 2016).

Para *Salmonella enteritidis* a CIM obtida foi de 0,156% e CBM de 0,156%, outro estudo publicado no “Journal of Essential Oil Bearing Plants” em 2020 avaliou a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *D. Ambrosioides* contra *S. enteritidis*, Os resultados mostraram que o óleo essencial apresentou atividade antimicrobiana contra todas as cepas testadas, com valores de CIM de até 0,125 % (EL-SABER et al., 2020).

Um estudo de Ribeiro publicado em 2017 avaliou a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *D. ambrosioides* contra cepas de *Escherichia coli*. O estudo demonstrou que o óleo essencial apresentou atividade bactericida contra *E. coli*, com uma concentração inibitória mínima (CIM) de 0,06%. Em contraste com este experimento onde a CIM foi de 0,009% e CBM de 0,009%, representando uma concentração cinco vezes menor.

Já quando observamos os resultados para *Klebsiella pneumoniae*, notamos o maior valor de CIM gerada na análise, que foi de 0,625%, mas a CBM não foi observada. Um estudo publicado na revista "Journal of Applied Pharmaceutical Science" em 2017 avaliou a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Dysphania Ambrosioides* contra várias cepas bacterianas, incluindo *Klebsiella pneumoniae*. Os resultados indicaram que a CIM do óleo essencial para as cepas de *K. pneumoniae* testadas foi de aproximadamente 0,250% (SAJJADI, 2017). Sendo assim uma diferença de concentração de OE bastante relevante.

Os resultados obtidos são justificados na composição do óleo essencial de *D. ambrosioides* onde foram identificados cinco compostos, como o (Z)-ascaridol (87%), α -

terpineno (1,24%), p-cimeno (4,83%), piperitone (0,7%) e (E)-ascaridol (5,04%), que representam 98,81% da sua composição (Vieira et al. (2011). Outros compostos foram relatados por Nascimento et al. (2009) como (E)-ascaridol, além de carvacrol, são componentes ativos que podem estar relacionados a atividade antibacteriana. Além disso, os mesmos autores verificaram que o óleo essencial desta planta apresentou capacidade de inibir cepas de *S. aureus* e *Shigella flexneri* nas concentrações de 2,5%, mas não teve atividade sobre outras gram-negativas como *E. coli*, *Proteus vulgaris* e *Streptococcus β -haemolyticus* mesmo em concentrações maiores (5 e 100%).

A atividade antibacteriana pode ser justificada pelos dados do estudo publicado na revista científica “Molecules” em 2021, que investigou os efeitos do Ascaridol sobre a parede celular de bactérias patogênicas, incluindo *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. Os resultados mostraram que o Ascaridol causa danos na membrana celular dessas bactérias, levando a uma perda de integridade e função da parede celular. O estudo também sugeriu que o Ascaridol pode interagir com a membrana lipídica da bactéria, aumentando a permeabilidade da membrana e permitindo a entrada de outros compostos antimicrobianos (ARAUJO, et al. 2021).

Outro estudo publicado na revista científica “PLOS One” em 2016, investigou os efeitos do Ascaridol sobre a parede celular da bactéria *Escherichia coli*. Os resultados mostraram que o Ascaridol causa danos significativos na parede celular da bactéria, levando a uma perda de integridade da membrana e a uma diminuição da viabilidade celular. O estudo também mostrou que o Ascaridol interage com a membrana lipídica da bactéria, levando a uma perturbação da estrutura da membrana (OLIVEIRA, et al. 2016).

Além disso, um estudo publicado na revista científica “Frontiers in Microbiology” em 2019, investigou os efeitos do Ascaridol sobre a parede celular da bactéria *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA). Os resultados mostraram que o Ascaridol causou danos na parede celular da bactéria, levando a uma diminuição da viabilidade celular. O estudo também sugeriu que o Ascaridol pode interagir com a membrana lipídica da bactéria, aumentando a permeabilidade da membrana e permitindo a entrada de outros compostos antimicrobianos (SOUZA, et al. 2011).

Frankenberger (2022) identificou os compostos identificados no óleo essencial de *D. ambrosioides* foram α -terpineno (43,40%), p-cimeno (19,81%), γ -terpineno (0,63%), terpinoleno (34,32%), ascaridol (1,85%), enoato de 2-metilbutil-2-octila (0,09%), o que comprova que o tipo de solo, local, e época do ano influenciam diretamente na composição química do óleo. Influenciando na capacidade antibacteriana de cepas bacterianas e fungicas.

Quanto aos resultados relacionados a ação antifúngica, verificou-se que a menor CIM, bem como CFM, ambas no valor de 0,009%, foi obtida quando se desafiou a levedura *C. albicans* frente as concentrações do óleo essencial. Além de ação inibitória, relata-se também que o extrato hidralcoólico das folhas da *D. ambrosioides* L. apresenta ação anti-biofilme contra *C. albicans*, cuja ação pode estar relacionada a flavonoides como kaempferol e quercetina (ZAGO et al., 2019). Além disso, outras investigações fitoquímicas também revelaram componentes com ação antifúngica, tais como: p-cimeno (HAMMER et al., 2003; KORDALI et al., 2008; ŠEGVIĆ-KLARIĆ et al., 2007), carvacrol (KORDALI et al., 2008), α -Terpineol, α -pineno, limoneno, γ -terpineno (HAMMER et al., 2003), timol (KORDALI et al., 2008; ŠEGVIĆ-KLARIĆ et al., 2007) e todos os ascaridols (JARDIM et al., 2008).

Em Jardim et al. (2008) sugere-se que os ascaridols são os principais componentes fungitóxicos encontrados no óleo essencial de *D. ambrosioides*, no entanto, acreditam que a fungitoxicidade pode envolver componentes em menor concentração que atuariam com efeitos sinérgicos, como α -terpineno, p-cimeno, piperitone e (E)-ascaridol.

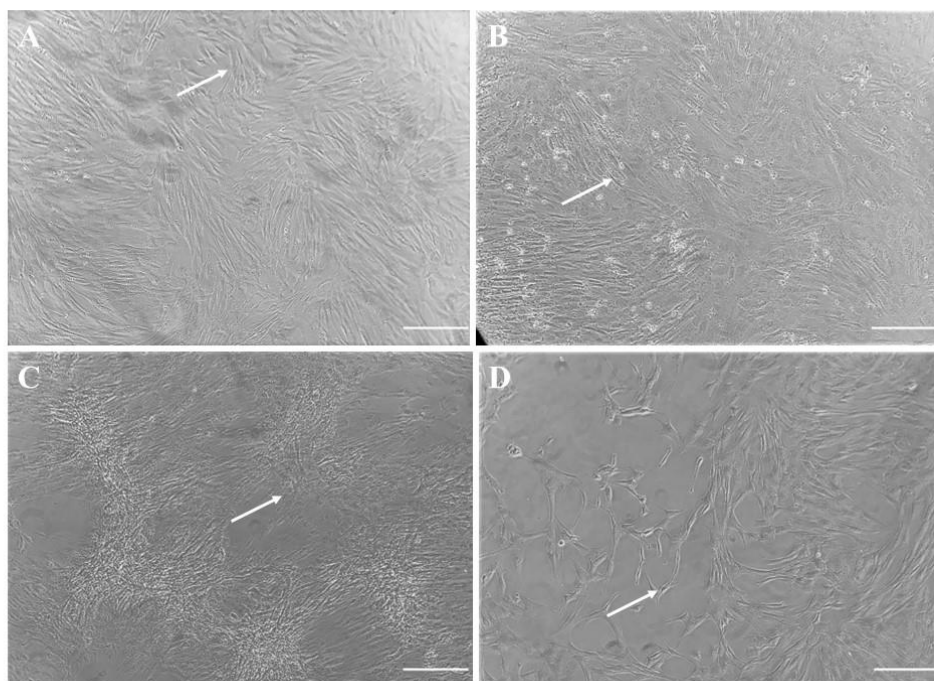
Para *Malassezia pachydermatis* obtivemos uma média CIM de 0,078% e CFM de 0,156%, o que demonstra uma alta sensibilidade desse fungo ao OE. Embora o OE de *Dysphania Ambrosioides* tenha muitos estudos por suas propriedades antimicrobianas e antifúngicas, a pesquisa específica sobre sua atividade contra *M. pachydermatis* é limitada, não havendo estudos específicos.

Em geral, os estudos científicos demonstraram que o óleo essencial de *D. ambrosioides* apresenta atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de bactérias e fungos patogênicos, incluindo cepas resistentes a antibióticos. No entanto, mais pesquisas são necessárias para investigar os mecanismos de ação do óleo essencial e sua eficácia em diferentes condições clínicas.

5.3 Citotoxicidade

Foram observadas diferenças na morfologia das células incubadas com solução de óleo, demonstrando um citoplasma mais translúcido, alguns agrupamentos celulares e desprendimento do tapete celular da placa, em comparação com os outros grupos, que demonstraram células com morfologia semelhante a fibroblastos, com formato fusiforme e prolongamentos citoplasmáticos (Figura 06, A-D).

Figura 6 - Avaliação morfológica de células obtidas de pele mamária de gata, expostas a clorexidine a 0,2%, solução de óleo a 50% e meio + tween a 50%. (A) Controle negativo (sem presença de clorexidine, solução de óleo, meio + tween), (B) Clorexidine a 0,2%, (C) Solução de Óleo a 50% e (D) Meio + Tween a 50%. Células semelhantes à fibroblastos (setas brancas), barra de escala = 20 μ m. Aumento de 10 $\times$.



Fonte: Autoria própria (2023).

Quanto à viabilidade celular avaliada pelo ensaio de azul de tripan (Tabela 02), células incubadas com clorexidine a 0,2% apresentaram maiores taxas de viabilidade pelo ensaio azul de tripan. No entanto, por se tratar de uma técnica que envolve coloração de células, podemos sugerir que a solução testada com o óleo pode interferir quanto a permeabilidade celular, podendo impedir a ação do corante, assim não visualizando possíveis células saudáveis. Pode-se justificar isso quando observamos a atividade metabólica avaliada pelo ensaio de MTT (Tabela 03), no qual apresentou ótimos resultados.

Tabela 2 - Viabilidade avaliada pelo ensaio de azul de tripan das células da pele mamária de gata cultivadas *in vitro* após 10 min de incubação em diferentes condições.

Grupos	Viabilidade celular (%)	P em relação ao controle
Controle negativo	75,6 ± 5,8 ^b	--
Clorexidine a 0,2%	94,5 ± 3,1 ^a	0,0034
Solução de óleo	43,5 ± 6,5 ^c	0,0013
Meio + Tween	56,1 ± 5,4 ^c	0,0204

Valores expressos como média ± desvio padrão (DP). P < 0,05.

Fonte: Autoria própria (2023).

Tabela 3 - Atividade metabólica avaliada pelo ensaio de MTT das células da pele mamária de gata cultivadas *in vitro* após 10 min de incubação em diferentes condições.

Grupos	Atividade metabólica (%)	P em relação ao controle
Controle negativo	96,0 ± 6,1	--
Clorexidine a 0,2%	83,0 ± 15,7	0,6876
Solução de óleo	91,7 ± 7,6	0,9542
Meio + Tween	97,0 ± 5,1	0,9944

Valores expressos como média ± desvio padrão (DP). P > 0,05.

Fonte: Autoria própria (2023).

Quanto à atividade metabólica (Tabela 03), nenhuma diferença foi observada no percentual de atividade metabólica das células cultivadas nas diferentes condições avaliadas (P > 0,05).

No trabalho de Borges et al. (2012) o óleo de *D. ambrosioides* (L.) não apresentou toxicidade contra as células de mamíferos nas concentrações abaixo de 0,5%. Em outro teste, utilizando células renais de macaco, também não foi verificada toxicidade para o óleo essencial da espécie (CORREA-ROYERO et al., 2010). O óleo essencial pode não ser citotóxico em células vivas por diferentes razões, que incluem variações na composição química do óleo em diferentes amostras, ações específicas das substâncias presentes no óleo e diferenças na sensibilidade e resposta das células aos compostos químicos (SILVA, 2012).

Segundo Queiroz et al. (2014) realizaram um ensaio *in vitro* de citotoxicidade com a finalidade de analisar a seletividade das plantas, incluindo *D. ambrosioides* (L.), e constatou que, após 48 horas, nenhuma demonstrou sinais de prejuízo visível à viabilidade de

macrófagos saudáveis. Um dos principais fatores que podem afetar a citotoxicidade do óleo essencial é a variação em sua composição química, que pode ser influenciada por diversos fatores, como a espécie, o local de cultivo, o método de extração e o armazenamento do óleo (PRAKASH, 2014). Diferentes compostos químicos presentes no óleo podem ter efeitos distintos sobre as células, podendo apresentar atividades citotóxicas ou não, e a presença ou ausência desses compostos pode variar entre diferentes amostras de óleo essencial.

Além disso, os compostos químicos presentes no óleo essencial podem ter ações específicas sobre as células, que podem ser benéficas ou prejudiciais, dependendo da concentração e da duração da exposição. Algumas substâncias presentes no óleo essencial podem ter propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias ou antimicrobianas, enquanto outras podem danificar as células ou interferir em seus processos metabólicos (VIEIRA, 2017; PRAKASH, 2014). Por fim, as células também podem apresentar diferenças na sensibilidade e resposta aos compostos químicos presentes no óleo essencial, o que pode influenciar os resultados dos testes de citotoxicidade. Algumas células podem ser mais resistentes ou mais sensíveis a determinados compostos, dependendo de suas características fisiológicas e do seu estado metabólico. Os *ensaios in vitro* do presente estudo comprovou que há uma excelente biocompatibilidade do óleo com células vivas da pele mamária de gata, sendo destacado na tabela 03, onde a atividade metabólica correspondeu a quase 92% quando comparado com meio de controle positivo (clorexidine) no qual apresentou atividade metabólica de 83%, sendo esse um teste de triagem inicial na primeira fase da avaliação de maior importância. No entanto não houve efeito tóxico no nível celular. Assim sugerindo que possa ser efetuado testes *in vivo*.

Portanto, é importante considerar esses fatores ao avaliar a citotoxicidade do óleo essencial em células vivas e realizar testes em diferentes linhagens celulares e condições experimentais para obter resultados mais precisos e confiáveis.

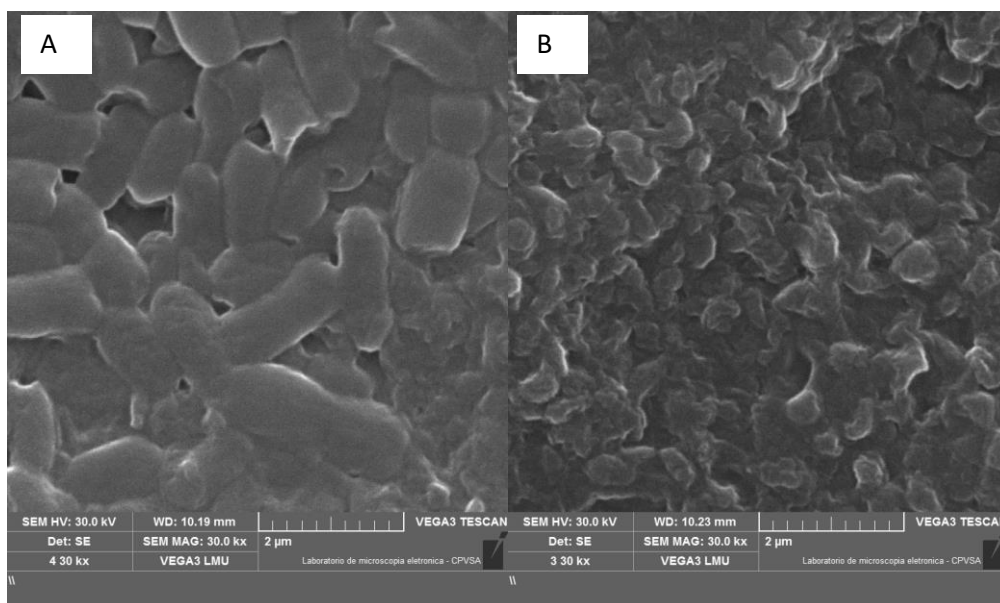
5.4 MEV

Nessa etapa utilizou-se a solução do óleo variando suas concentrações com base nos parâmetros (CIM, CBM e CFM) obtidos desafiando os microrganismos na tabela 01, além disso, as microscopias eletrônicas de varredura de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Malassezia pachydermatis* foram as melhores imagens obtidas na avaliação e são

apresentadas a seguir. Para esses três microrganismos as alterações causadas foram semelhantes, destacando as alterações nas paredes celulares dos microrganismos tratados.

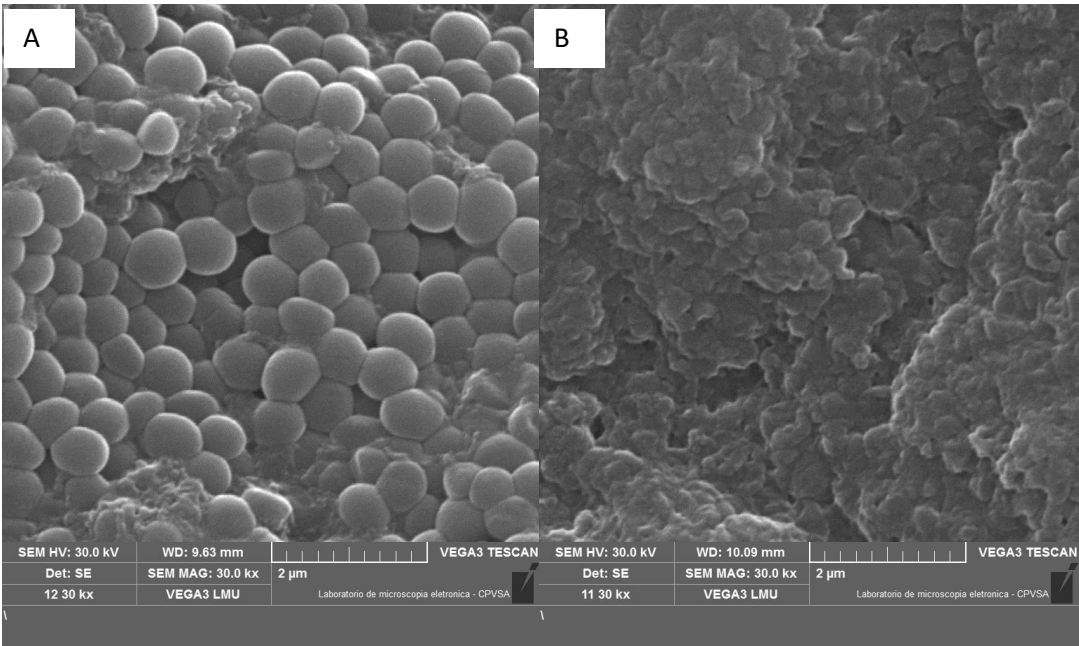
Conforme mostrado nas figuras 07 (B), 08 (B) e 09 (B) houve mudanças significativas nas paredes celulares apresentando diferenças no tamanho e aparência das células bacterianas dos microrganismos após 24 horas de exposição ao óleo de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants, nas figuras 07 (A), 08 (A) e 09 (A) mostram controle negativo onde não há exposição a solução contendo o óleo. Essas distorções são as modificações nas estruturas de bactérias gram negativas conforme observadas por outro estudo realizado por Zakharov e outros em 2003, quando usou a MEV para visualizar a estrutura da parede celular de *E. coli* e de outras bactérias gram-negativas. O estudo mostrou que a parede celular de *E. coli* é composta por camadas de peptidoglicano e LPS que se organizam de maneira complexa. E ainda nas estruturas de um estudo de Arranz et al. (2020) utilizaram técnicas de espectrometria de massa para analisar a composição proteica da parede celular de *E. coli* e descobriu a presença de uma grande variedade de proteínas associadas à parede celular, muitas das quais estão envolvidas em funções importantes como a biossíntese de peptidoglicano, a regulação do crescimento celular e a virulência bacteriana.

Figura 7 - MEV do microrganismo *Escherichia coli* com aumento de 30.000X. (A) sem exposição e (B) com exposição ao óleo de *Dysphania ambrosioides* (L.).



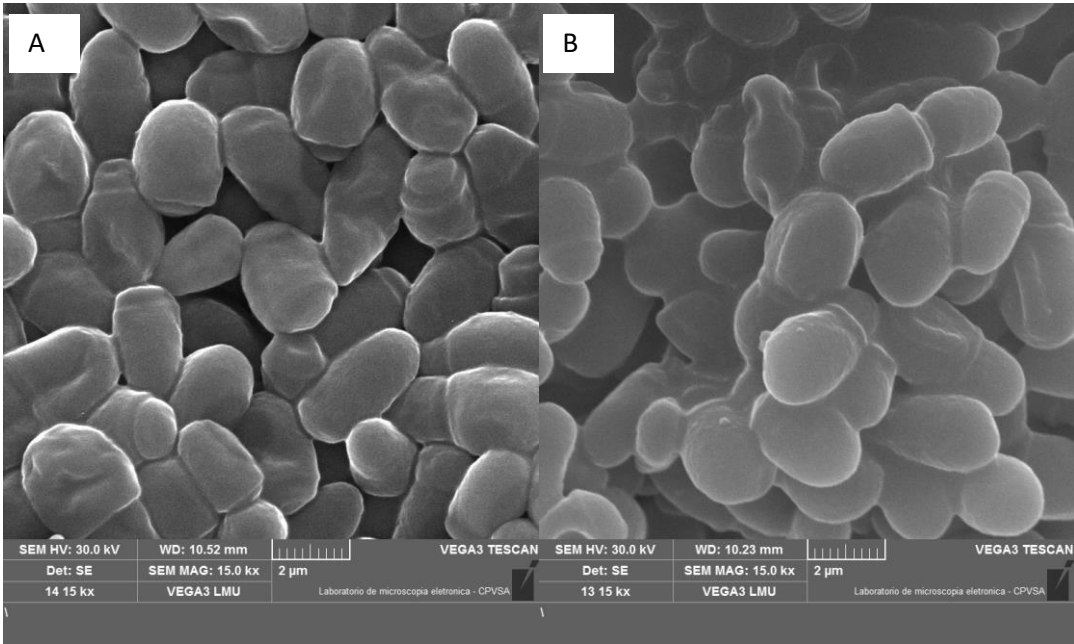
Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 8 - MEV do microrganismo *Staphylococcus aureus* com aumento de 30.000X. (A) sem exposição e (B) com exposição ao óleo de *Dysphania ambrosioides* (L.).



Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 9 - MEV do microrganismo *Malassezia pachydermatis* com aumento de 15.000X. (A) sem exposição e (B) com exposição ao óleo de *Dysphania ambrosioides* (L.).



Fonte: Autoria própria (2023).

Na figura 7 (A) pode-se observar a forma de bastonete regular da *E. coli*, no entanto por a imagem conter um grupamento muito alto de bactérias não é possível observar maiores detalhes quanto sua morfologia. Ainda na figura 7 (B) é notável que praticamente todas as células foram danificadas, observando o enrugamento e células extravasadas. O que corrobora com o estudo de Ribeiro publicado em 2017, que avaliou a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Dysphania ambrosioides* contra cepas de *E. coli*, nele relatou que o óleo essencial de *Dysphania ambrosioides* foi capaz de danificar a membrana celular de *E. coli*, o que leva à liberação de conteúdo celular e subsequente morte da bactéria. Esse efeito foi observado pela microscopia eletrônica de varredura, que mostrou alterações na morfologia da superfície celular após a exposição ao óleo.

Na figura 8 (A) notamos a forma de esferas do *S. aureus* antes da exposição ao óleo essencial. A parede celular de *S. aureus* é composta por uma camada espessa de peptidoglicano, que é responsável por manter a integridade estrutural da célula e protegê-la contra os efeitos prejudiciais de seu ambiente. Essa camada de peptidoglicano é composta por longas cadeias de glicanos interligados por peptídeos, que formam uma malha tridimensional ao redor da célula (LEE, 2006). Na figura 8 (B) é possível observar que todo o arranjo esférico das células foi danificado pós-exposição ao óleo essencial de *Dysphania ambrosioides*, também apresentando o enrugamento e células extravasadas. Sugerindo assim que o óleo essencial estudado pode apresentar alta capacidade de desfazer as cadeias de glicanos da parede celular. Alterações semelhantes são vistas no trabalho de Gama (2023), onde se avaliou a atividade microbiana do extrato pirolenhoso de eucalipto e de bambu sobre cepas bacterianas e fungicas, entre elas a *S. aureus* na qual teve sua estrutura natural da parede celular modificada, consequentemente alterando sua permeabilidade e rigidez da parede, realizado com base na MEV, onde pode-se observar que o efeito causado na membrana das células dos microrganismos testados foram semelhantes ao do presente trabalho, dentre eles o extravasamento celular, enrugamento e formação de poros.

Já na figura 9 (A) é visível a forma oval a elipsoidal, com diâmetro variando entre 2 e 7 micrômetros. A parede celular de *Malassezia pachydermatis* é composta por diversas camadas, cada uma com uma composição química específica. A camada mais externa é formada por polissacarídeos, principalmente manose, que conferem proteção à célula contra o sistema imunológico do hospedeiro. Além disso, essa camada também desempenha um papel importante na aderência da célula a superfícies biológicas. Em microscopia eletrônica de varredura, a superfície da célula de *M. pachydermatis* é observada como rugosa e irregular, com a presença de pequenas projeções (CAFARCHIA, 2008).

Na figura 9 (B) observa-se pequenas variações morfológicas, mas vale salientar que houve enrugamento de algumas células e formação de poros, sendo possível que o tempo de exposição possa ter sido insuficiente para se obter um resultado mais expressivo, julgando que o tempo de exposição foi de apenas 24 horas, sendo que em média a *M. pachydermatis* apresenta crescimento com cerca de 72 horas de cultivo.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O óleo essencial de *D. ambrosioides* (L) apresentou atividade antibacteriana e antifúngica ao controlar o crescimento de diversos microrganismos patogênicos, tanto cepas padrão quanto isolados de amostras clínicas de animais, sendo estabelecida a CIM e CBM/CFM para a maioria os microrganismos testados. Quanto a citotoxicidade, células da gata não diferem na sua atividade metabólica quando cultivadas nas diferentes condições avaliadas.

Quanto a MEV, foi possível observar que o OE de *D. ambrosioides* (L) possui capacidade de causar danos irreparáveis na estrutura da parede celular de bactérias e fungos, resultando no comprometimento de suas funções.

O óleo essencial de *D. ambrosioides* (L) é uma fonte potencial de compostos bioativos com atividade antimicrobiana. Estudos in vitro mostraram que o óleo essencial tem atividade contra uma ampla variedade de bactérias e fungos, tornando-o um candidato promissor para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. No entanto, estudos adicionais são necessários para entender completamente os mecanismos pelos quais o óleo essencial exerce sua atividade e para avaliar sua eficácia em testes in vivo e em seres humanos e animais.

Nesse contexto, diante dos resultados obtidos nesse estudo, a atividade antimicrobiana do OE de *D. ambrosioides* (L.) sugere que este produto possa ser utilizado como uma alternativa antimicrobiana natural às drogas sintéticas já comercializadas. Uma vez que o uso indiscriminado desses medicamentos, tanto na medicina humana quanto na veterinária, vem provocando resistência bacteriana ou fúngica, o uso de novas alternativas medicinais é uma abordagem promissora.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; et al. **Biologia Molecular da Célula**. 4 ed. (ArtMed). Porto Alegre; 1065-1125; 2004.
- ALI, B.; AL-WABEL, N. A.; SHAMS, S.; AHAMAD, A.; KHAN, S. A.; ANWAR, F. Essential oils used in aromatherapy: a systemic review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 8, p. 601-11, 2015.
- ALIZADEH BEHBAHANI, B., SHAHIDI, F., & YAZDI, F. T. Antioxidant and antimicrobial effects of basil leaves and its essential oils against most common bacteria. **Journal of food science and technology**, 52(11), 7591-7599. 2015.
- ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 48(Supplement_1), 5-16. 2001.
- ANKRI, S., & MIRELMAN, D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. **Microbes and infection**, 1(2), 125-129. 1999.
- ANWAR, F.; HUSSAIN, A. I.; SHERAZI, S. T. H.; BHANGER, M. I. Changes in composition and antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) fruit at different stages of maturity. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 15, p. 187-202, 2009.
- ARAÚJO, L. S. et al. Ascaridol from the Brazilian Medicinal Plant *Chenopodium ambrosioides* L. Induces Bacterial Membrane Damage and Cell Death in *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, 26(1), 137. 2021.
- ARRANZ Y, EREÑO-ORBEA J, ESPINOSA-MANSILLA A, GUTIÉRREZ-DE-TERÁN H, GÓMEZ-NAVARRO C, ABRESCIA NG. The proteome of the bacterial wall microenvironment: underappreciated players in bacterial physiology and pathogenicity. **PLoS Pathog**. 2020 Mar 2;16(3):e1008341. doi: 10.1371/journal.ppat.1008341. PMID: 32119650. 2020.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–75, 2008.
- BARTIKOVA, H.; HANUSOVA, V.; SKALOVA, L.; AMBROZ, M.; BOUSOVA, I. Antioxidant, prooxidant and other biological activities of sesquiterpenes. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 2478–94, 2014.
- BAUER, A. W., et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, 45(4), 493-496. 1966.

BHATIA, SK; YETTER, AB; Correlation of visual cytotoxicity ratings of biomaterials with quantitative in vitro cell viability measurements. **Cell Biol Toxicol.** 24:315-319; 2008.

BIBIANO, C. S.; CARVALHO, A. A.; BERTOLUCCI, S. K. V.; TORRES, S. S.; CORRÊA, R. C.; PINTO, J. E. B. P. Organic manure sources play fundamental roles in growth and qualitative production of essential oil from *Dysphania ambrosioides* L. *Industrial Crops and Products*, v. 139, p. 1-7, 2019.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-94, 2009.

Borges AR, Aires JRA, Higino TMM, Medeiros MGF, Citó AMGL, Lopes JAD, Figueiredo RCBQ. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Exp Parasitol.**;132:123-8; 2012.

BOTELHO MA, et al. Antibacterial, anti-inflammatory, and cytotoxic activity of extracts and constituents from *Dysphania ambrosioides*. **J Ethnopharmacol.**;214:175-183. 2018.

BOZOLLA JJ, RUSSEL LD. **Electron Microscopy: principles and techniques for biologists**. 2ª ed. Sudbury: MA Jones and Bartlett, 1999.

BUSSMANN RW, Paniagua-Zambrana NY, Romero C, Hart RE. Astonishing diversity – the medicinal plant markets of Bogotá, Colombia. **J Ethnobiol Ethnomed.** 2018;14(1):43. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13002-018-0241-8>. Acesso em: 04 fev. 2023.

CAFARCHIA C, Gasser RB, Otranto D. The genus *Malassezia* with an emphasis on *Malassezia pachydermatis* and its significance in veterinary medicine. **Vet Microbiol.**;132(1-2):1-13. doi:10.1016/j.vetmic.2008.05.015. 2008.

CAMPANA, E. H. et al. Avaliação das metodologias M.I.C.E.®, Etest® e microdiluição em caldo para determinação da CIM em isolados clínicos. *J. Bras. Patol. Med. Lab*, v. 47, p.157-164, 2011.

CAO Y, CROLL TI, LEES JG, et al. Scaffolds, Stem Cells, and Tissue Engineering: A Potent Combination!. **Australian Journal of Chemistry**. 58(10): 691-703; 2005.

CÁRDENAS, G; ANAYA, P; VON, PRESSING C; et al.; Chitosan composite films. Biomaterial applications. *J Mater Sci: Mater Med*. 19:2397-2405; 2008.

CARSON, C. F., HAMMER, K. A., & RILEY, T. V.. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical microbiology reviews**, 19(1), 50-62. 2006.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 326-342, 2010.

CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F.; MARTINEZ, N.; LORENZO, D.; DELLACASSA, E. Steam distillation modeling for essential oil extraction process. **Industrial Crops and Products**, v. 29, n. 1, p. 171-76, 2009.

CASTRO, CMMB; AGUIAR, JLA; MELO, FAD; et al. Citotoxicidade de Polímero de Cana-de-Açúcar. *An. Fac. Méd. Univ. Fed. Pernambuco. Recife.* ; 49(2):119-123; 2004.

CAVALLI, J. F.; TOMI, F.; BERNARDINI, A. F.; CASANOVA, J. Combined analysis of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* by GC, GC-MS and ¹³C-NMR spectroscopy: Quantitative determination of ascaridole, a heat-sensitive compound. **Phytochemical Analysis**, v. 15, n. 5, p. 275–279, 2004.

CHU, S. S.; FENG HU, J.; LIU, Z. L. Composition of essential oil of Chinese *Chenopodium ambrosioides* and insecticidal activity against maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Pest Management Science**, v. 67, n. 6, p. 714–718, 2011.

Correa-Royero J, Tangarife V, Durán C, Stashenko E, Mesa- Arango A. In vitro antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*. **Rev Bras Farmacogn.**;20(5):734-41; 2010.

CUTLER, R. R. Antibacterial activity of a new, stable, aqueous extract of allicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **British journal of biomedical science**, 62(2), 71-74. 2005.

DAGUANO, J. K. M. F.; SANTOS, C.; ROGERO, S. O. Avaliação da Citotoxicidade de Biocerâmicas Desenvolvidas para uso em Sistemas de Implantes. *Matéria*, v. 12, n. 1, p.134-139, 2007.

DEDAVID, B. A. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores [recurso eletrônico] / Berenice Anina Dedavid, Carmem Isse Gomes, Giovanna Machado. – Porto Alegre : EDIPUCRS, 2007.

EL-SABER BATIHA, G., MAGDY BESHBIHY, A., WASEF L.S., ELEWA, Y.H.A., AL-SAGAN, A.A., & ABD EL-HACK, M.E. Chemical constituents and antimicrobial activity of *Dysphania ambrosioides* essential oil against foodborne pathogens and skin infection bacteria. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, 23(4), 871-886. 2020.

FANK-DE-CARVALHO, S. M.; BÁO, S. N.; MARCHIORETTO, M. S. Amaranthaceae as a bioindicator of neotropical savannah diversity. **Open access peer-reviewed**, p. 235-62, 2012.

FANK-DE-CARVALHO, S. M.; MARCHIORETTO, M. S.; BÁO, S. N. Anatomia foliar, morfologia e aspectos ecológicos das espécies da família Amaranthaceae da Reserva Particular do Patrimônio Natural Cara Preta, em Alto Paraíso, GO, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 4, p. 77-86, 2010.

FARIA, Hugo Maciel De et al. Ação antimicrobiana in vitro do óleo essencial e decocto de *dysphania ambrosioides* (L.). In: **Anais do Congresso Brasileiro Interdisciplinar em**

Ciência e Tecnologia. Anais...Diamantina (MG) online, 2022. Disponível em: [https://www.even3.com.br/anais/cobicet2022/516344-acao-antimicrobiana-in-vitro-do-oleo-essencial-e-decocto-de-dysphania-ambrosioides-\(l\)](https://www.even3.com.br/anais/cobicet2022/516344-acao-antimicrobiana-in-vitro-do-oleo-essencial-e-decocto-de-dysphania-ambrosioides-(l)). Acesso em: 03 fev. 2023.

FRADE, MAC; VALVERDE, RV; DE ASSIS, RVC; Chronic phebopathic cutaneous ulcer: a therapeutic proposal. **Inter J Dermatol.** 40:238-240; 2001.

FRANKENBERGER, Larissa. Obtenção e caracterização de óleos essenciais de *Dysphania ambrosioides* L. (AMARANTHACEAE), *Cola nitida* (Vent.) Schott & Endl. (MALVACEAE) e *Mentha pulegium* (LAMIACEAE) para avaliação de atividade repelente e inseticida. / Larissa Frankenberger; orientadora, Dra. Maique Weber Biavatti, coorientadora, Dra. Christiane Meyre da Silva Bittencourt, 158 p. 2022.

FRIEDMAN, M. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. **Molecular nutrition & food research**, 51(1), 116-134. 2007.

GAMA, Gil Sander Próspero. Avaliação da ação antimicrobiana do extrato pirolenhoso neutralizado e bidestilado. Orientador: Alexandre Santos Pimenta. 2023. 95f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Florestais) - Escola Agrícola de Jundiaí, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2023.

GARCIA, D.; DOMINGUES, M. V.; RODRIGUES, E. Ethnopharmacological survey among migrants living in the Southeast Atlantic Forest of Diadema, São Paulo, Brazil. **J Ethnobiology Ethnomedicine**, v. 6, 2010.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374–81, 2007.

GOMES, M. R. A.; BAO, S. N. Anatomia, histoquímica e ultra-estrutura de folhas de *Gomphrena virgata* Mart. (Amaranthaceae). In: 62ª Reunião Anual da SBPC, 2010, Natal, Rio Grande do Norte. **Anais** (on-line). Disponível em: <<http://www.sbpnet.org.br/livro/62ra/resumos/resumos/3323.htm>>. Acesso em: 22 fev. 2023.

GONÇALVES, J. M. Atividades biológicas e composição química dos óleos essenciais de *Achyrocline satureioides* (Lam) DC. e *Ageratum conyzoides* L. encontradas no semiárido baiano. 2015. 111 f. **Tese** (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2015.

GROZEVA, N.; CVETANOVA, Y. C. Karyological and morphological variations within the genus *Dysphania* (Chenopodiaceae) in Bulgaria. **Acta Botanica Croatica**, v. 72, n. 1, p. 49-69, 2013.

HAJDU, Z.; HOHMANN, J. An ethnopharmacological survey of the traditional medicine utilized in the community of Porvenir, Bajo Paraguá Indian Reservation, Bolivia. **J Ethnopharmacol.**, v. 139, p. 838-57, 2012.

HAMMER, K. A. et al. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, p. 853–860, 2003.

HAMMER, K. A., CARSON, C. F., & RILEY, T. V. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Journal of applied microbiology**, 100(5), 856-863. 2006.

HAMMOND, J.; FIELDING, D.; BISHOP, S. Prospects for Plant Anthelmintics in Tropical **Veterinary Medicine**. *Vet Res Commun*, v. 21, p. 213–228, 1997.

HARRAZ, F. M.; HAMMODA, H. M.; GHAZOULY, M. G. E.; FARAG, M. A.; EL-ASWAD, A. F.; BASSAM, S. M. Chemical composition, antimicrobial and insecticidal activities of the essential oils of *Conyza linifolia* and *Chenopodium ambrosioides*. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, v. 29, n. 9, p. 879-82, 2014.

HARRAZ, F. M.; HAMMODA, H.; EL GHAZOULY, M. G.; EL-ASWAD, A. F.; BASSAM, S. M. Chemical composition, antimicrobial and insecticidal activities of the essential oils of *Conyza linifolia* and *Chenopodium ambrosioides*. **Natural Product Research**, v. 29, n. 9, p. 879–882, 2015.

HUDSON, J. B., GRAHAM, E. A., & TOWERS, G. H. Antiviral activities of Echinacea extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, 136(1), 86-91. 2011.

IBRAHIM, D.; KASSIM, J.; SHEH-HONG, L.; RUSLI, W. Efficacy of pyroligneous acid from *Rhizophora apiculata* on pathogenic *Candida albicans*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.3, n.7, p.7-13, Disponível em: <https://doi.org/10.7324/JAPS.2013.3702>. 2013.

ISMAN, M. B. Bioinsecticides based on plant essential oils: A short overview. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, v. 75, n. 78, p. 179–182, 2020.

ISMAN, M. B. Botanical insecticides in the twenty-first century-fulfilling their promise? **Annual Review of Entomology**, v. 65, p. 233–249, 2020.

JAKIEMIU, E. A. R. Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.). 2008. 90 f. **Dissertação** (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

JARDIM C. M. et al. Composition and antifungal activity of the essential oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. **J Chem Ecol**. v. 34, p. 1213-8, 2008.

JAYABALAN, M; Biological interactions: causes for risks and failures of biomaterials and devices. **J Biomater**. 8:64-71; 1993.

JESUS, R. S.; BAUERMANN, L. F. In vitro antimicrobial and antimycobacterial activity and HPLC–DAD screening of phenolics from *Chenopodium ambrosioides* L., Braz. **J. Microbiol.**, v. 49, p. 296-302, 2018.

KORDALI et al. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. **Bioresource Technology**, Barking, v. 99, p. 8788-8795, 2008.

LEE JC. *Staphylococcus aureus* Capsule. In: Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI (eds) *Gram-Positive Pathogens*. **ASM Press**, Washington, DC. pp. 425-433. 2006.

LEITE-JÚNIOR, J. D. C. Avaliação da atividade moluscicida do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck frente aos caramujos transmissores da esquistossomose. 2018. 73 f. **Dissertação** (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2018.

LEITE-JÚNIOR, J. D. C. Avaliação da atividade moluscicida do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck frente aos caramujos transmissores da esquistossomose. 2018. 73 f. **Dissertação** (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2018.

LI, Y., et al. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **International journal of nanomedicine**, 10, 1387-1401. 2015.

LIMA, E. M. S.; SOUSA, A. K.; DA SILVA, L. R. N.; SENA, C. C. L.; SOARES, L. M. M.; MARTINS, M. F. A. L.; SOUSA, I. M. P. S. Cicatrização de feridas com a utilização do extrato de *Chenopodium ambrosioides* (mastruz) e cobertura secundária estéril de gaze em ratos. **ConScientiae Saúde**, v. 10, n. 3, p. 441-48, 2011.

MARMITT, D. J.; GOETTERT, M. I.; REMPEL, C. S.; SILVA, A. C. Plantas medicinais da relação nacional de plantas medicinais de interesse ao Sistema Único de Saúde com potencial antiparasitário. **Scientia Amazonia**, v. 4, n. 3, p. 54-62, 2015.

MARMULLA, R.; HARDER, J. Microbial monoterpene transformations - a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-14, 2014.

MARREIROS, N. A.; FERREIRA, E. C.; LUCENA, C. M.; LUCENA, R. F. P. Conhecimento botânico tradicional sobre plantas medicinais no semiárido da Paraíba. **Rev. Ouricuri**, Paulo Afonso, Bahia, v.5, n.1, p.110-144. mar./abr., 2015. Disponível em: <http://www.revistaouricuri.uneb.br>. | ISSN 2317-0131. Acesso em: 22 mar. 2023.

MARTINS, C.M. Estudo químico, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e análise do óleo essencial da espécie *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc (pau-santo) do cerrado. 2012. 117 f. **Dissertação** (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

MEHDIZADEH, L., et al. Antibacterial effect of grape seed extract on *Staphylococcus aureus* in dairy products. **Advanced biomedical research**, 5(1), 2. 2016.

MIMICA-DUKIĆ, N., et al. Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. **Planta medica**, 69(5), 413-419. 2003.

MOMTAZ, S.; ABDOLLAHI, M. An update on pharmacology of *Satureja* species, from antioxidant, antimicrobial, antidiabetes and anti-hyperlipidemic to reproductive stimulation. **International Journal of Pharmacology**, v. 6, p. 346–53, 2010.

MONZOTE, L.; NANCE, M. R.; GARCÍA, M.; SCULL, R.; SETZER, W. N. Comparative chemical, cytotoxicity and antileishmanial properties of essential oils from *Chenopodium ambrosioides*. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 2, p. 281–286, 2011.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. S4050-63, 2009.

MORAIS, S. M. de et al. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 15, p. 169-177, 2005.

MOSYAKIN, S. L.; CLEMANTS, S. E. New nomenclatural combinations in *Dysphania* R.Br. (Chenopodiaceae): taxa occurring in **North America**. *Ukraïns'kyï botanichnyi zhurnal*, v. 59, n. 4, p. 380-85, 2002.

MÜLLER U. In vitro biocompatibility testing of biomaterials and medical device. **Med Device Technol.**; 19(2): 30, 32-4; 2008.

NEIVA, V.A.; RIBEIRO, M. N. S.; CARTÁGENES, M. S. S.; MORAES-COUTINHO, D. F.; NASCIMENTO, F. R. F.; REIS, A. S. et al. Estudos pré-clínicos de atividade giardicida de *Chenopodium ambrosioides* L. e a padronização dos extratos na pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos. **Revista de Ciências da Saúde**, v. 13, n. 2, p. 155–165, 2011.

OLIVEIRA, J.V. et al. Antimicrobial activity of essential oil of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants against pathogenic bacterial strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 275-281, 2019.

OLIVEIRA, L. G. et al. Ascaridol from *Chenopodium ambrosioides* effect in vitro synergistically with gentamicin against *Escherichia coli*. **PLoS One**, 11(2), e0149217. 2016.

OLIVEIRA, Milton Paulo de. Análise in vitro da citotoxicidade e proliferação celular em equivalentes de pele humana. 2009. 71 f. **Dissertação** (Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

OSTERBURG, A. R., DENG, S., & STORKSON, J. M. Comparison of tea seed oil with tea oil oxidized by heating. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 86(5), 437-443. 2009.

PAIVA, S. R.; SANTOS, M. C. F. S.; MORAES, M. G.; SANTOS, M. G.; PINTO, L. J. S. O Uso de Plantas Medicinais Pode Trazer Riscos à Saúde Humana? Interagir: pensando a extensão, [S.l.], n. 11, p. 121, fev. 2016. Disponível em: <https://www.e-publicacoes.uerj.br/index.php/interagir/article/view/2527/15676>. Acesso em: 22 fev. 2023.

PEREIRA, Luciana Patrícia Lima Alves. Potencial de óleos essenciais no controle da esquistossomose: estado da arte e avaliação das atividades moluscicida e cercaricida do óleo volátil de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants (mastruz). 2021. 133 f. **Tese** (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - RENORBIO/CCBS) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2021.

POGGIO S, TAKACS CN, VOLLMER W, JACOBS-WAGNER C. A protein critical for cell constriction in the Gram-negative bacterium *Escherichia coli* localizes to the division site through its N- and C-terminal domains. **Mol Microbiol.** 2002 Jun;45(5):1001-17. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03087.x. PMID: 12123452.

PRAKASH, B., et al. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic effects of *Anethum graveolens* L. essential oil and its major constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 94(14), 2892-2897. 2014.

PRASAD, C. S.; SHUKLA, R.; KUMAR, A.; DUBEY, N. K. In vitro and in vivo antifungal activity of essential oils of *Cymbopogon martini* and *Chenopodium ambrosioides* and their synergism against dermatophytes. **Mycoses**, v. 53, n. 2, p. 123–129, 2010.

QUEIROZ, Aline Cavalcanti de et al. Antileishmanial activity of medicinal plants used in endemic areas in northeastern Brazil. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2014.

RAMOS, UF; SOLEDADE, SC; BAPTISTA, ER. Utilização de plantas medicinais pela comunidade atendida no programa saúde da família da Pirajá, Belém, PA. **Revista Infarma**, v. 24, 2011.

RIBEIRO, A. et al. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, p. 912-930, 2014.

RIBEIRO, E. C. G. Atividade moluscicida de óleos essenciais de plantas aromáticas da região Amazônica Maranhense. 2016. 91 f. **Dissertação** (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2016.

RIBEIRO, R. V. Influência do sumo de *Chenopodium ambrosioides* L. (erva de santa maria) na contração de feridas cutâneas induzidas em dorso de ratos da linhagem wistar. **Revista Eletrônica do UNIVAG**, n. 3, p. 64-74, 2008.

RIBEIRO-Santos R, Andrade MA, de Sousa DP, et al. Antimicrobial Activity of the Essential Oil from *Dysphania ambrosioides* along with Its Major Components. **Phytomedicine**.;25:37-42. doi:10.1016/j.phymed.2016.12.003. 2017.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias, **Material Research**, v. 6, n. 3, p.317-320, 2003.

RUBERTO, G.; BARATTA, M. T. Antioxidant activity of selected essential oil componentes in two lipid model systems. **Food Chemistry**, v. 69, n. 2, p. 167-74, 2000.

RUKAYADI, Y.; HWANG, J.-K. In vitro anti-Malassezia activity of xanthorrhizol isolated from Curcuma xanthorrhiza Roxb. J. Compilat. – **T. Soci. A. Microb.**, v. 44, p. 126-130, 2006.

SÁ, R. D.; GALVÃO, M. A. M.; FERREIRA, M. R. A.; SOARES, L. A. L.; RANDAU, K. P. Chemical composition of the essential oil from leaves of Chenopodium ambrosioides L. grown in Recife-PE, Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 95, p. 855-66, 2014.

SÁ, R. D.; SANTANA, A. S.C.O.; SILVA, F. C.L.; SOARES, L. A. L.; RANDAUA, K. P. Anatomical and histochemical analysis of Dysphania ambrosioides supported by light and electron microscopy. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 26, n. 5, p. 533–543, 2016.

SÁ, R. D.; SOARES, L. A. L.; RANDAU, K. P. Óleo essencial de Chenopodium ambrosioides L.: estado da arte. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, p. 267-76, 2015.

SAJJADI, S. E., GHOLAMZADEH, S., & HASSANZADEH, M.; Antimicrobial activity of essential oil of Dysphania ambrosioides against some pathogenic microbial strains. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, 7(11), 46-50. 2017.

SCHMALZ G, SCHWEIK H. Characterization of an in vitro dentin barrier test using standard toxicant. **J Endod.** 20(12):592-4; 1994.

ŠEGVIC-KLARIC, M. et al. Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 44, p. 36–42, 2007.

SÉRVIO, E. M. L.; ARAÚJO, K. S.; NASCIMENTO, L. R. S.; COSTA, C. L. S.; MENDES, L. M. S.; MAIA FILHO, A. L. M. et al. Cicatrização de feridas com a utilização do extrato de Chenopodium ambrosioides (mastruz) e cobertura secundária estéril de gaze em ratos. **ConScientiae Saúde**, v. 10, n. 3, p. 441–448, 2011.

SHEPHERD, K. A.; WILSON, P. G. New combinations in the genus Dysphania (Chenopodiaceae). **Nuytsia**, v. 18, p. 267–72, 2008.

SILVA, A.B. ET AL. THE USE OF MEDICINAL PLANTS FOR ELDERLY USERS OF A BASIC FAMILY HEALTH UNIT. **JNurs UFPE** on line, v.9, n. 3, p.7636-7643, 2015.

SILVA, D.R. et al. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of Dysphania ambrosioides Against Multidrug-Resistant Strains. **Molecules**, v. 25, n. 4, p. 817, 2020.

SILVA, J. K., et al. (2012). Chemical composition and antibacterial activities of Lippia alba essential oils and terpenoids. **Journal of Applied Microbiology**, 112(3), 761-71. 2012.

SILVA, L. O.; SOUZA, J. P. A.; CRESPIAN, E. R.; ROMERO, R. B.; ROMERO, A. L. Avaliação de fenilpropanóides naturais frente a enzimas HIV-1 protease e HIV-1 integrase: um estudo utilizando ferramentas de quimioinformática. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, 2014.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: **Artmed**, 2017.

SINGH, P.; PANDEY, A. K. Prospective of essential oils of the genus mentha as biopesticides: a review. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 2018.

SMITH, R., COAST, J., & MILLAR, M. Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of an antimicrobial agent. **Journal of Visualized Experiments**, (95), e56945. 2015.

SONDI, I.; Salopek-Sondi, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E-coli as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 275, n. 1, p. 177-182, 2004.

SOUSA, J. P. B. et al. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 137(1), 713-717. 2011.

SPANGBERG LS. Correlation of in vivo and in vitro screening tests. **J Endod.** 4(10):296-9; 1978.

STEFFENS, A. H. Estudo da composição química dos óleos essenciais obtidos por destilação por arraste a vapor em escala laboratorial e industrial. 2010. 68 f. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

SUKHORUKOV, A. P.; ZHANG, M.; KUSHUNINA, M. A new species of Dysphania (Chenopodioideae, Chenopodiaceae) from South-West Tibet and East Himalaya. **Phytotaxa**, v. 203, n. 2, p. 138–46, 2015.

TANG, LL; LIU, H; WANG, YL; et al. Evaluation of biocompatibility of acellular porcine dermis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 57:215-218; 2007.

TAPONDJOU, L. A.; ADLER, C.; BOUDA, H.; FONTEM, D. A. Efficacy of powder and essential oil from *Chenopodium ambrosioides* leaves as post-harvest grain protectants against six-stored product beetles. **Journal of Stored Products Research**, v. 38, n. 4, p. 395–402, 2002.

TRIVELLATOGRASSI, L.; MALHEIROS, A.; MEYRE-SILVA, C.; BUSS, Z. S.; MONGUILHOTT, E. D.; FRÖDE, T. S. et al. From popular use to pharmacological validation: A study of the anti-inflammatory, anti-nociceptive and healing effects of *Chenopodium ambrosioides* extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, p. 127–138, 2013.

VERLOOVE, F. A new combination in Oxybasis (Amaranthaceae). **New Journal of Botany**, v. 3, n. 1, p. 59-60, 2013.

VIEIRA D. F. et al. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Chenopodium ambrosioides* L. **Anais XV**. Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e XI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba [online]. 2011.

VIEIRA, G. D. V., et al. Cytotoxicity and mode of action of α -bisabolol and α -bisabolol-rich essential oil from *Vanillosmopsis arborea* (Asteraceae) against human tumor cell lines. **Molecules**, 22(8), 1282. 2017.

VOLLER, A., BIDWELL, D. E., & BARTLETT, A. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. **Journal of Clinical Pathology**, 30(6), 507-520. 1977.

WILDWOOD, C. **The encyclopedia of aromatherapy**. Healing Arts Press, 1996.

XUE, S.; ZHU, F.; WU, C.; LEI, J.; HARTLEY, W.; PAN, W. Effects of manganese on the microstructures of *Chenopodium ambrosioides* L., a manganese tolerant plant. **International Journal of Phytoremediation**, v. 18, n. 7, p. 710–719, 2016.

YADAV, N. et al. Medicinal properties of genus *Chenopodium* linn. Indian **Journal of Natural Products and Resources**, v. 6, n. 2, p. 131–134, 2007.

YANG, F.; LONG, E.; WEN, J.; CAO, L.; ZHU, C.; HU, H., et al. Linalool, derived from *Cinnamomum camphora* (L.) Presl leaf extracts, possesses molluscicidal activity against *Oncomelania hupensis* and inhibits infection of *Schistosoma japonicum*. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 1–13, 2014.

YOSHIMOTO, H. A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 24, n. 12, p. 2077-2082, 2003.

ZAGO, P. M. W. et al. Anti-biofilm Action of *Chenopodium ambrosioides* Extract, Cytotoxic Potential and Effects on Acrylic Denture Surface. **Front Microbiol.**, v. 10, p. 1724, 2019.

ZAKHAROV SD, EGOROV AM, CHIZHOV IO, SHUVALOV VA. The structure of the *Escherichia coli* cell wall as observed by high-voltage electron microscopy. **Microbiology**. 2003.

ZHANG, J., et al. Screening of medicinal plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. **Journal of Ethnopharmacology**, 243, 111546. 2019.

ZHU, W. X.; ZHAO, K.; CHU, S. S.; LIU, Z. L. et al. Evaluation of essential oil and its three main active ingredients of Chinese *CHENOPODIUM AMBROSIOIDES* (Family: Chenopodiaceae) against *Blattella germanica*. **Journal of Arthropod-Borne Diseases**, v. 6, n. 2, p. 90–97, 2012.

ZHU, X; CHIAN, KS; CHAN-PARK, MBE; et al. Effect of argon-plasma treatment on proliferation of human-skin-derived fibroblast on chitosan membrane in vitro. **J Biomed Mater Res B**. Appl. 73(3):264-274; 2005.

ANEXOS

Anexo A - Comprovante de publicação de dados sobre ação antimicrobiana in vitro do óleo essencial e decocto de *Dysphania ambrosioides* (L.) no Anais do III Congresso Brasileiro Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia.

Anais do III CoBICET – Trabalho completo
Congresso Brasileiro Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia
“15 anos dos BIs e LIs: retrospectiva, resistência e futuro”



AÇÃO ANTIMICROBIANA IN VITRO DO ÓLEO ESSENCIAL E DECOCTO DE *Dysphania ambrosioides* (L.)

Hugo Maciel de Faria¹, Leon Denner Moreira Benício², Enilson Cláudio da Silva Junior², Francisco Marlon Carneiro Feijó², Nilza Dutra Alves², Caio Sérgio Santos²

¹Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, Brasil
(hugo.faria@alunos.ufersa.edu.br)

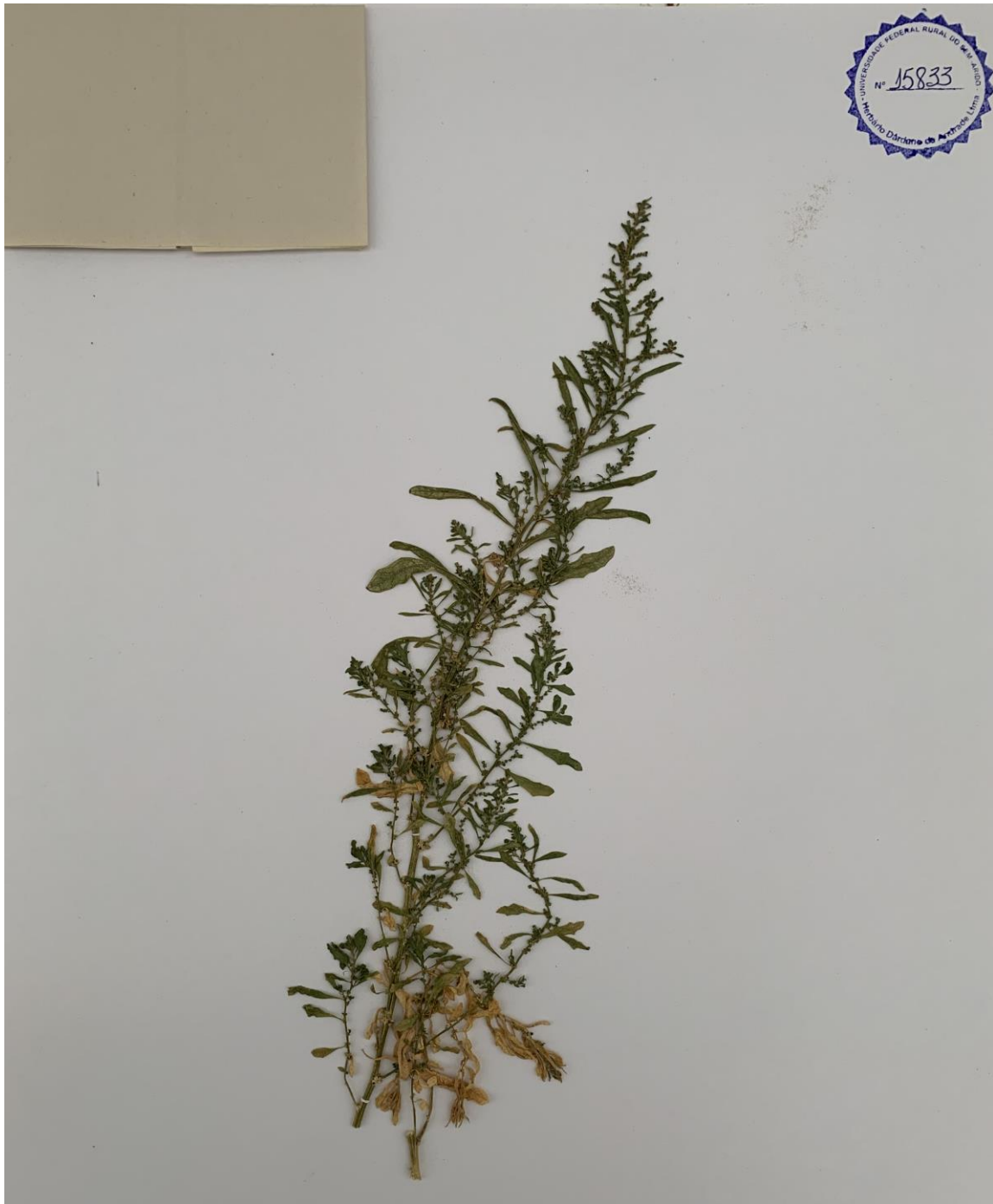
²Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, Brasil

Resumo: O objetivo do estudo foi avaliar a ação antimicrobiana do decocto e do óleo essencial das folhas da *Dysphania ambrosioides* L., conhecida popularmente como mastruz. Esses produtos foram testados frente a microrganismos padrão e clínicos isolados de animais. Utilizou-se a técnica de microdiluição para definir a Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida/Fungicida Mínima. Os resultados demonstraram ação antibacteriana e antifúngica somente do óleo essencial sobre as cepas testadas.

Palavras-chave: mastruz; antibacteriano; antifúngico; microdiluição

Fonte: Elaboração do autor (2023).

Anexo B - Exsicata de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants¹.



Fonte: Autoria própria (2023).

¹ Exsicata foi coletada no município de Mossoró-RN e o espécime testemunho foi incorporado ao acervo do Herbário Dárdaro de Andrade-Lima (MOSS), da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA, Mossoró-RN), identificado pelo tombo de número 15833.