



UNIVERSIDADE FEDERAL DO DELTA DO PARNAÍBA  
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO  
CURSO DE BIOMEDICINA

SAMARA MARQUES DE OLIVEIRA

**SUSCEPTIBILIDADE *in vitro* DE FUNGOS MELANIZADOS ISOLADOS DA CARNAÚBA  
(*Copernicia prunifera*) À ANFOTERICINA B**

PARNAÍBA-PI

2023

SAMARA MARQUES DE OLIVEIRA

**SUSCEPTIBILIDADE *in vitro* DE FUNGOS MELANIZADOS ISOLADOS DA CARNAÚBA  
(*Copernicia prunifera*) À ANFOTERICINA B**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal do Delta do Parnaíba, como requisito obrigatório para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tatiane Caroline Daboit

**Coorientadora:** Dr.<sup>a</sup> Belize Rodrigues Leite

PARNAÍBA-PI

2023

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, meu refúgio e causa primordial de todas as coisas.

Aos meus pais e familiares, minha força e incentivo.

Aos meus amigos, pelo amparo e leveza durante a jornada.

E a mim mesma, pela perseverança.

## AGRADECIMENTOS

A minha família, em especial aos meus pais, Maria do Livramento e Antônio Aldenir, agradeço pelo amor, orações e cuidado. As minhas irmãs, Sabrina Marques pela ajuda, paciência e por ser exemplo de caráter e profissionalismo e a Sarah Mércia pelas risadas, alegria e companheirismo. A minha prima Tuana Lia Marques, por ouvir meus anseios e pela amizade incondicional. Não há dúvidas que sou totalmente grata por tudo que fazem por mim.

Ao GEAMICOL pela oportunidade e contribuição na minha carreira enquanto cientista. Sou grata a professora Tatiane Daboit por ser um exemplo e apoio para uma boa formação em pesquisa e à Belize Leite pela confiança e ensinamentos iniciais nessa linha de pesquisa. Aos meus companheiros e amigos de iniciação científica Jade, Luiz, Andressa e Neilma pela troca e ensinamentos diários. Aos colegas Clara, Beatriz e Wesley que também exploraram comigo o início dessa jornada. À Renata, à Sasha, ao Igor, e a todos que também convivi no GEAMICOL e que de alguma forma me ensinaram algo.

Meus amigos, vocês também foram essenciais. Obrigada, por terem sido família e por comemorarem comigo cada conquista e tornarem os dias de cansaço mais alegres e significativos. Sou grata por todas as vezes que acreditaram em mim e dedicaram um pouquinho do tempo de vocês para estarem comigo e entenderem meus momentos de ausência por estar no laboratório me dedicando à realização deste trabalho.

A Deus, meus infinitos agradecimentos pelo dom da vida, força e resiliência durante todo o processo, sobretudo, pela felicidade em poder somar meus ideais de vida com a minha escolha profissional e avançar mais um passo no alcance dos meus sonhos.

"Você não pode pular direto para o final, a jornada é a melhor parte".

- Robin Scherbatsky (*How I Met Your Mother*).

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Tronco (A), folha verde (B) e folha seca (C) da carnaúba (*Copernicia prunifera*), material vegetal dos quais os isolados fúngicos foram obtidos.....13
- Figura 2: Carnaubal localizado próximo à rodovia PI- 116 do qual foi obtido o material vegetal para isolamento dos fungos negros empregados neste estudo.....13
- Figura 3: Modelo de Placa de 96 Poços para Testes de Microdiluição em Caldo.....14

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos isolados de fungos negros obtidos da carnaúba ( <i>Copernicia prunifera</i> ) frente à anfotericina B (AmB).....	15
---	----

## **LISTA DE SIGLAS**

**AmB** – Anfotericina B

**ATCC** - **do inglês** *American Type Culture Collection*

**BDA** – Ágar Batata Dextrose

**CIM** - Concentração Inibitória Mínima

**CLSI** – **do inglês** *Clinical and Laboratory Standards Institute*

**CBM**– Cromoblastomicose

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**GEAMICOL** - Grupo de Estudos Avançados em Micologia

**MOPS** - Ácido 3-(N-morfolino)-propano sulfônico



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2. METODOLOGIA .....</b>	<b>13</b>
2.1 AMOSTRAS FÚNGICAS .....	13
2.2 ENSAIOS DE SUSCEPTIBILIDADE <i>in vitro</i> .....	13
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>14</b>
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>17</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>19</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>20</b>

**Susceptibilidade *in vitro* de fungos melanizados isolados da carnaúba(*Copernicia prunifera*) à anfotericina B**

Artigo formatado de acordo com as normas da revista **Research, Society and Development**

---

*In vitro* susceptibility of melanized fungi isolated from carnauba (*Copernicia prunifera*) to amphotericin B  
Susceptibilidade *in vitro* de fungos melanizados isolados da carnaúba (*Copernicia prunifera*) à anfotericina B  
Susceptibilidad *in vitro* de hongos melanizados aislados de carnauba (*Copernicia prunifera*) a la anfotericina B

**Samara Marques de Oliveira**

Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-0034-5685>

Universidade Federal do Delta do Parnaíba.

E-mail: sammarques@ufpi.edu.br

**Belize Rodrigues Leite**

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-9267-4904>

Biólogo marinho e microbiológico.

E-mail: Belize-leite@saude.rs.gov.br

**Tatiane Caroline Daboit**

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-5186-7382>

Universidade Federal do Delta do Parnaíba.

E-mail: tatiane.daboit@ufpi.edu.br

#### **Resumo:**

Os fungos negros, podem ser encontrados nas diferentes partes das plantas, em geral, essa associação propicia a contaminação em humanos que entram em contato com esses vegetais. A carnaúba (*Copernicia prunifera*) é uma palmeira de grande valor cultural e econômico, que recebe as mais diversas aplicabilidades. A anfotericina B (AmB) é um fármaco de amplo espectro de ação considerado padrão-ouro no tratamento da maioria das micoses sistêmicas, embora tenha seu uso limitado devido à indução de efeitos colaterais. O presente estudo é pioneiro, objetivou avaliar, por meio de ensaios *in vitro*, a susceptibilidade de fungos negros isolados da carnaúba à AmB. O ensaio de susceptibilidade fúngica foi realizado de acordo com o documento M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Os resultados demonstraram que a AmB inibiu o crescimento de 50% dos fungos testados. Os isolados que demonstram sensibilidade, apresentaram Concentração Inibitória Mínima (CIM) entre 0,125µg/mL e 1µg/mL. Observou-se ainda que três fungos apresentaram CIM superior a concentração máxima de AmB utilizada (>16µg/mL), e dois isolados foram inibidos, porém em doses altas. Foram encontrados isolados resistentes, o que indica a importância da análise da suscetibilidade desses fungos antes de ser instituído um tratamento. Portanto, a presença dos fungos negros na carnaúba e de cepas resistentes justificam a importância da conscientização das pessoas que trabalham com essa planta, quanto aos cuidados que devem seguir para evitar a sua contaminação por esses microrganismos, visto que as doenças que podem ser ocasionadas por esses fungos possuem grande significância para a saúde pública.

**Palavras-chave:** Carnaúba; Fungos negros; Atividade antifúngica *in vitro*; Polienos.

#### **Abstract:**

Black fungi can be found in different parts of plants, in general, this association promotes contamination in humans who come into contact with these plants. Carnauba (*Copernicia prunifera*) is a palm tree of great cultural and economic value,

which has the most diverse applications. Amphotericin B (AmB) is a drug with a broad spectrum of action, considered the gold standard in the treatment of most systemic mycoses, although its use is limited due to the induction of side effects. This pioneering study aimed to evaluate, through *in vitro* assays, the susceptibility of black fungi isolated from carnauba to AmB. Fungal susceptibility testing was performed in accordance with Clinical and Laboratory Standards Institute document M38-A2. The results showed that AmB inhibited the growth of 50% of the fungi tested. The isolates that demonstrate sensitivity presented Minimum Inhibitory Concentration (MIC) between 0.125µg/mL and 1µg/mL. It was also observed that three fungi showed MIC higher than the maximum concentration of AmB used (>16µg/mL), and two isolates were inhibited, but at high doses. Resistant isolates were found, which indicates the importance of analyzing the susceptibility of these fungi before starting a treatment. Therefore, the presence of black fungi in carnauba and resistant strains justify the importance of making people who work with this plant aware of the care they must follow to avoid contamination by these microorganisms, since the diseases that can be caused by these fungi have great significance for public health.

**Palavras-chave:** Carnauba; Black fungus; *In vitro* antifungal activity; Polyenes.

#### **Resumen:**

Los hongos negros se pueden encontrar en diferentes partes de las plantas, por lo general, esta asociación promueve la contaminación en los humanos que entran en contacto con estas plantas. La carnauba (*Copernicia prunifera*) es una palmera de gran valor cultural y económico, que tiene las más diversas aplicaciones. La anfotericina B (AmB) es un fármaco de amplio espectro considerado el estándar de oro en el tratamiento de la mayoría de las micosis sistémicas, aunque su uso es limitado debido a la inducción de efectos secundarios. Este estudio pionero tuvo como objetivo evaluar, a través de ensayos *in vitro*, la susceptibilidad de hongos negros aislados de carnauba a AmB. Las pruebas de susceptibilidad fúngica se realizaron de acuerdo con el documento M38-A2 del Clinical and Laboratory Standards Institute. Los resultados mostraron que AmB inhibió el crecimiento del 50% de los hongos probados. Los aislados que demostraron sensibilidad presentaron Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) entre 0,125µg/mL y 1µg/mL. También se observó que tres hongos mostraron una CIM superior a la concentración máxima de AmB utilizada (>16 µg/mL), y dos aislados fueron inhibidos, pero a dosis altas. Se encontraron aislados resistentes, lo que indica la importancia de analizar la susceptibilidad de estos hongos antes de iniciar un tratamiento. Por tanto, la presencia de hongos negros en carnauba y cepas resistentes justifican la importancia de concienciar a las personas que trabajan con esta planta sobre los cuidados que deben seguir para evitar la contaminación por estos microorganismos, ya que las enfermedades que pueden provocar estos hongos son de gran importancia para la salud pública.

**Palavras-chave:** Carnaúba; Hongo negro; Actividad antifúngica *in vitro*; Polienos.

#### **1. Introdução**

Os fungos demáceos são ascomicetos caracterizados, principalmente, pela parede espessa de coloração escura devido aos depósitos de melanina. Podem ocorrer tanto sob a forma de levedura, hifas ou aglomerados meristemáticos. Tais particularidades conferem aos mesmos a resistência necessária para que habitem diferentes ambientes (DE HOOG, 1993). Assim, estes microrganismos são frequentemente encontrados associados a plantas, principalmente em regiões tropicais, de clima árido, ou solos contaminados com hidrocarbonetos, bem como, metais pesados; (DIANESE, 2000; DE HOOG, 2014).

Sabe-se que as plantas, por produzirem açúcares simples, polissacarídeos e outros carbonetos proporcionam diversos substratos que favorecem o crescimento e a colonização de fungos (PHAFF; STARMER, 1980; BANNO; MIKATA, 1981; ROBBS et al., 1989). Estes fungos podem ser encontrados nas diferentes partes das plantas, habitando tecidos internos (endofíticos) ou a superfície (epifíticos). Em geral, essa associação propicia a contaminação em humanos ou animais que entram em contato com esses vegetais (SAIKONNEN et al., 2004). Em humanos, a principal forma de infecção é por inoculação traumática na pele, que normalmente se dá pelo contato de um ferimento pré-existente com espinhos, cascas e farpas de madeira, ou por ferimento provocado pelo próprio vegetal (CHOWDHARY et al., 2015).

A carnaúba (*Copernicia prunifera*) é uma palmeira nativa do Nordeste brasileiro, que agrega grande valor cultural e está relacionada a uma gama de atividades econômicas que gera emprego para diversos trabalhadores da região. Na maioria das vezes, as condições físicas no trabalho são bem precárias, colocando em risco a integridade do trabalhador, os deixando expostos a adquirir diversas infecções, incluindo as fúngicas (ALVES; COELHO, 2008; CARVALHO; GOMES, 2008; QUEIROGA et al. 2013; BRAGA et.al., 2022). Ademais, é comprovada a presença de microrganismos na palmeira que podem causar malefícios a ela ou a quem entra em contato com a planta (MOBIN; CAVALCANTI, 2000; FREIRE; BARGUIL, 2009; ARAÚJO et al, 2018).

A Feohifomicose, o Micetoma e a Cromoblastomicose (CBM) são as principais micoses causadas por fungos negros, sendo os gêneros *Fonsecaea*, *Exophiala*, *Cladophialophora*, *Phialophora* e *Rhinocladiella* seus principais causadores (AFSARIAN et al., 2012). Dentre os fármacos mais utilizados no tratamento destas micoses estão o itraconazol, a terbinafina e o posaconazol (MOUCHALOUAT, 2008; DINIZ et al., 2021). A Anfotericina B (AmB) é um fármaco poliênico, o qual foi primeiro antifúngico aprovado para uso sistêmico. É padrão-ouro para a maioria das infecções fúngicas sistêmicas, porém foi sendo substituído ao longo do tempo, no que se refere ao tratamento de micoses por fungos negros, por outros com menor incidência de efeitos adversos e melhor resposta (FILIPPIN, 2006; MOUCHALOUAT, 2008; DABOIT, 2013; CAMPOY; ADRIO, 2017).

Pouco se sabe a respeito da patogenicidade ou da susceptibilidade antifúngica de fungos negros de origem ambiental (VICENTE et al., 2008; DUARTE et al., 2013). Alguns estudos têm avaliado o efeito da AmB em cepas ambientais de espécies associadas à CBM (DE HOOG et al., 2006; VITALE; PEREZ-BLANCO; DE HOOG, 2009; DUARTE et al., 2013; NAJAFZADEH et al., 2014; YAZDANPARAST et al., 2017). Observou-se, então, uma variação da susceptibilidade de acordo com a espécie avaliada (VITALE; PEREZ-BLANCO; DE HOOG, 2009). Além disso, é comprovado que o fármaco mostrou-se capaz de inibir o crescimento de isolados de fungos negros de origem ambiental (NAJAFZADEH et al., 2014; YAZDANPARAST et al., 2017). Isso demonstra a efetividade de um antifúngico, cujo uso isolado já estava em queda em casos de micoses por fungos melanizados.

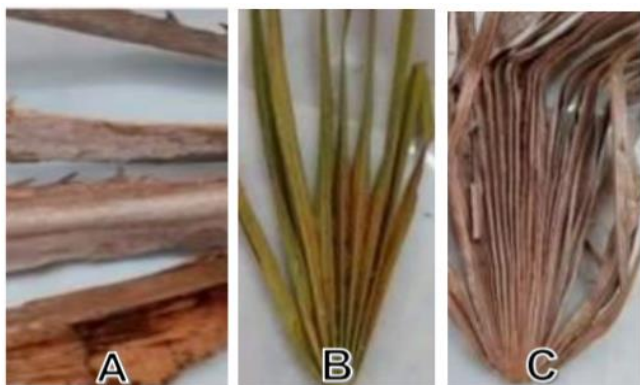
Nesse contexto, é evidente que a carnaúba é fonte em potencial para o desenvolvimento de microrganismos, no entanto, estudos que avaliam a suscetibilidade aos antifúngicos de fungos melanizados isolados na palmeira é inexistente. Ademais, no Maranhão, onde CBM é endêmica, foram isoladas fungos associados a essa doença de coco-de-babaçu (*Orbignya phalerata Martius*) (MARQUES et al., 2006). Geograficamente próximo ao Maranhão, o Piauí conta com a presença da carnaúba em sua constituição vegetal, porém são escassos estudos a respeito do isolamento de fungos demáceos a partir de flora nativa. Dessa forma, o trabalho objetivou avaliar, por meio de ensaios *in vitro*, a susceptibilidade de fungos negros isolados da carnaúba (*Copernicia prunifera*) à anfotericina B (AmB).

## 2. Metodologia

### 2.1 Amostras Fúngicas

Para a realização do experimento utilizou-se 10 fungos negros, sendo 6 isolados do tronco (**Figura 1 – A**), 2 da folha verde (**Figura 1 – B**) e 2 da folha seca (**Figura 1 – C**) da carnaúba. O material vegetal foi obtido de palmeiras adultas, localizadas em uma planície de inundação próxima à rodovia PI-116 que conecta o centro da cidade de Parnaíba à Praia da Pedra do Sal, no Litoral do Piauí (2°51'59" S, 41°46'51" O) (**Figura 3**). O projeto foi devidamente cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen (Cadastro nº A22E225). Para fins comparativos e de controle dos experimentos, a cepa *Candida krusei* ATCC 6258 foi utilizada. Todas as amostras pertencem à micoteca do Grupo de Estudos Avançados em Micologia Médica (GEAMICOL), Universidade Federal do Delta do Parnaíba – UFDPAr. Anterior a realização do teste de susceptibilidade, os isolados foram reativados em placas contendo Ágar Batata Dextrose (BDA), e incubados durante 7 a 10 dias, a 35 °C.

**Figura 1:** Tronco (A), folha verde (B) e folha seca (C) da carnaúba (*Copernicia prunifera*), material vegetal dos quais os isolados fúngicos foram obtidos.



**Fonte:** Belize Leite (arquivos do GEAMicol).

**Figura 2:** Carnaubal localizado próximo à rodovia PI-116 do qual foi obtido o material vegetal para isolamento dos fungos negros empregados neste estudo.



**Fonte:** Belize Leite (arquivos do GEAMicol)

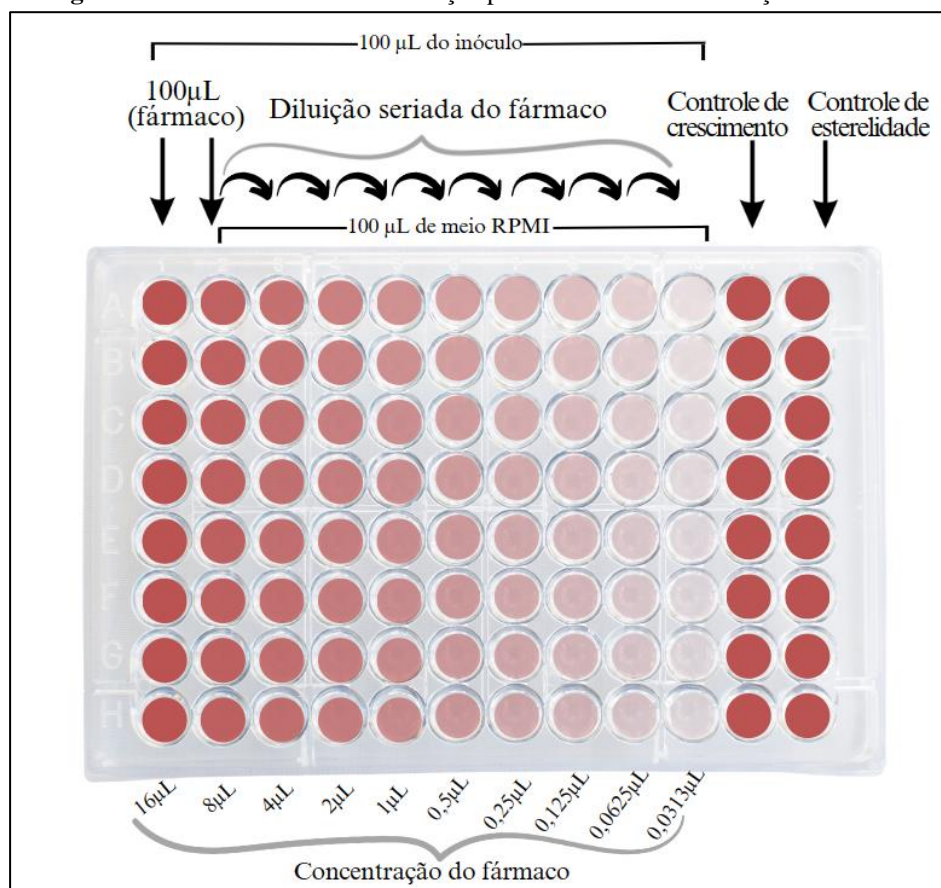
### 2.2 Ensaios de susceptibilidade *in vitro*

A avaliação da atividade antifúngica da AmB contra os fungos negros oriundos da carnaúba foi realizada através da técnica de microdiluição em caldo, preconizada pelo documento M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008). O ensaio foi realizado em placas estéreis de 96 poços com fundo em “U”. No primeiro poço, tem-se a concentração máxima do fármaco AmB, a qual foi diluída previamente em dimetilsulfóxido (DMSO, Vetec, Brasil) e na sequência diluída em meio RPMI 1640 (MP Biomedicals, France) tamponado com ácido 3-[N-morfolino]propanosulfônico (MOPS, Neon, Brasil), a fim de se obter uma faixa de concentração final de 0.0313 a 16 µg/mL (CLSI, 2008).

Os poços de 2 a 12 foram preenchidos com 100 µL de meio RPMI 1640 tamponado com MOPS. Com exceção dos poços 11 e 12, todos os outros poços continham o fármaco testado (100 µL) e o inóculo (100 µL). O poço 11 é considerado o controle de crescimento, por conter somente o meio de cultura com o inóculo - suspensão do fungo padronizada com auxílio do espectrofotômetro (QUIMIS, São Paulo, Brasil) na faixa de transmitância de 68-70%,  $\lambda =$

530 nm e diluída na proporção de 1:50 em RPMI 1640 tamponado. No poço 12 tem-se o controle de esterilidade, utilizado para atestar a ausência de contaminantes, uma vez que este apresenta apenas o meio RPMI 1640 tamponado (200  $\mu$ L). A **Figura 3** ilustra esse processo. Os testes foram desenvolvidos em triplicata, a fim de garantir uma maior confiabilidade na leitura dos resultados e a cepa *Candida krusei* ATCC 6258 foi utilizada como controle de qualidade dos testes. Por fim, as placas foram incubadas por 7 a 10 dias, a 35 °C para obtenção dos resultados.

**Figura 3:** Modelo de Placa de 96 Poços para Testes de Microdiluição em Caldo.



**Fonte:** Autoria própria.

Os resultados da CIM foram determinados através da leitura visual das placas. O crescimento foi observado e comparado com os controles de crescimento e de esterilidade. Os resultados da triplicata do teste também foram comparados internamente para verificar discrepância entre os dados ou de discordância com o previsto pelo documento M38-A2.

### 3. Resultados

Na tabela 1 é possível observar as CIMs das amostras fúngicas inseridas no estudo frente a AmB e sua interpretação. Em geral, as CIMs  $\leq 1,0$   $\mu$ g/mL são utilizadas como marcador de potencial suscetibilidade à maioria dos fármacos usados na terapia de infecções ocasionadas por fungos negros (REVANKAR e SUTTON, 2010; DABOIT et al., 2014).

**Tabela 1:** Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos isolados de fungos negros obtidos da carnaúba (*Copernicia prunifera*) frente a anfotericina B (AmB).

Isolados Fúngicos	Valores da CIM para AmB (µg/mL)	Interpretação
<sup>a</sup> MTR3	2,0	Resistente
<sup>a</sup> MTR8	0,25	Sensível
<sup>a</sup> MTR9	1,0	Sensível
<sup>a</sup> MTR16	8,0	Resistente
<sup>a</sup> MTR19	0,125	Sensível
<sup>a</sup> MTR23	0,5	Sensível
<sup>b</sup> FV23	>16	Resistente
<sup>b</sup> F34	>16	Resistente
<sup>c</sup> FS36	0,25	Sensível
<sup>c</sup> FS37	>16	Resistente

<sup>a</sup>MTR: Tronco da carnaúba; <sup>b</sup>FV e <sup>b</sup>F: Folha verde da carnaúba; <sup>c</sup>FS: Folha seca da carnaúba.

**Fonte:** Autoria própria.

Analisando os dados obtidos, constatou-se que a AmB inibiu o crescimento de 50% dos fungos testados. Os isolados que demonstraram sensibilidade apresentaram CIM entre 0,125 µg/mL e 1,0 µg/mL. Observou-se ainda que três fungos (FV23, F34 e FS37) apresentaram CIM superior a concentração máxima de AmB utilizada (>16 µg/mL), e dois isolados (MTR3 e MTR16) foram inibidos, porém em doses altas (2 µg/mL e 8 µg/mL respectivamente). Assim, evidenciou-se que 50% das amostras apresentaram resistência ao fármaco utilizado.

#### 4. Discussão

O tratamento de doenças ocasionadas por fungos negros é longo e sujeito à recidiva. Normalmente não há uma terapia de escolha, sendo utilizados antifúngicos de forma isolada ou conjunta. Nas últimas décadas, os azóis têm sido os fármacos muito utilizados, sobretudo para CMB (LEMKE, 2017). O presente trabalho foi o primeiro a relatar a ação da AmB em espécies de fungos demáceos isolados do Estado do Piauí.

As CIMs observadas foram semelhantes a estudos anteriores que relataram o efeito da AmB em espécies associadas à CBM isoladas do ambiente (DE HOOG et al., 2006, DUARTE et al., 2013, NAJAFZADEH et al., 2014; YAZDANPARAST et al., 2017). Najafzadeh et al. (2014), avaliaram a susceptibilidade de 104 isolados clínicos e ambientais de espécies de *Aureobasidium pullulans*. Foi relatado pelos autores que embora a concentração mínima efetiva para 90% das cepas testadas foi  $\leq 1$  µg/ml, a CIM obtida variou entre  $\leq 0.016$ –16 µg/ml. Vitale et al. (2009), também demonstraram resultados similares, ao verificarem a susceptibilidade de 41 isolados clínicos e ambientais de *Cladophialophora carrionii* e de *Cladophialophora yegresii*. Estes autores observaram que a CIM variou entre 0,5 µg/ml e 16 µg/ml para AmB, concentrações também relatadas no nosso estudo.

Sabe-se que os fungos negros diferenciam-se quanto à morfologia e fisiologia e ocupam microhabitats específicos no ambiente (DE HOOG, 1993; SAIKONNEN et al., 2004). Ademais, a susceptibilidade aos antifúngicos é variável mesmo entre espécies do mesmo gênero (VITALE; PEREZ-BLANCO; DE HOOG, 2009). Duarte et al. (2013), ao avaliarem a suscetibilidade à AmB de 47 isolados obtidos a partir de solo de garagem contaminado com hidrocarbonetos, evidenciaram que as CIMs para as cepas de *Exophiala dermatitidis* variaram de 0,12 a 2,0 mg/L, ao contrário do que foi observado para *Exophiala spinifera* (CIM de 16 mg/L). Partindo desse pressuposto, pode-se explicar as diferentes CIMs observadas nos testes realizados com as amostras obtidas da carnaúba. A CIM dos isolados da folha verde (FV23 e F34), por exemplo, distinguiram-se dos resultados dos isolados obtidos do tronco. O que pode estar



relacionado a diferentes espécies que podem ser encontradas nas diversas partes da planta, devido aos diferentes componentes desses fragmentos da palmeira. A folha da carnaúba, por exemplo possui uma camada de pó que dificulta a perda de água por transpiração e protege a planta contra o ataque de fungos. Deste modo, os isolados fúngicos presentes nessa estrutura provavelmente possuem maiores propriedades patogênicas (ALVES; COELHO, 2008). Isso pode estar relacionado, ainda, com a menor quantidade de ergosterol presentes em algumas espécies fúngicas, o que prejudica a ação do antifúngico, visto que a AmB atua formando poros ou canais na membrana plasmática fúngica ligando-se ao ergosterol, resultando em uma grande perda do conteúdo intracelular e à morte da célula (BRAGA et.al., 2022).

Dentre as mais complicada das micoses causadas por fungos negros está a CBM, que é de difícil tratamento, porque não existe uma metodologia padrão ou medicamento de escolha (TORRES-GUERRERO, 2012). É uma doença crônica que ocorre na pele e no tecido subcutâneo e acomete principalmente os membros inferiores de trabalhadores rurais das zonas tropicais e subtropicais do planeta (QUEIRÓZ et al., 2017). Os agentes da CBM se adaptam a fatores hormonais ou genéticos do hospedeiro, acometendo sobretudo indivíduos do sexo masculino, em idade reprodutiva, que trabalham no campo (DABOIT, 2013; PAULO, 2021). De modo geral, é quase impossível de se alcançar sua cura, especialmente quando os pacientes apresentam formas clínicas graves e avançadas da doença. Normalmente, necessitam de uma longa duração do tratamento antifúngico sistêmico, e muitas vezes é necessário recorrer a outras opções, incluindo tratamentos não farmacológicos, tais como excisão, eletrocoagulação e criocirurgia (BONIFAZ; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ; PERUSQUÍA-ORTIZ, 2010; QUEIROZ-TELLES, 2017).

Nessa perspectiva, isolados resistentes (MTR3, MTR16, FV23, F34 e FS37) são considerados um risco aos indivíduos que entram em contato com a carnaúba, já que ao desenvolverem uma infecção ocasionada por esse grupo de fungos negros, possuem grandes chances de falha terapêutica. Yazdanparast et al. (2017), analisaram a suscetibilidade de fungos negros à AmB, obtiveram uma CIM que variou de 0.016 —0.5 mg/L para *Exophiala dermatitidis* (n=20), e de 0.031—0.25 mg/L para *Exophiala phaeomuriformis* (n = 9). Somando a esse achado, Daboit et al. (2014), ao avaliar a suscetibilidade *in vitro* de agentes da CBM à combinação de AmB e terbinafina, observaram interação sinérgica para 58 de 60 isolados testados. E ao avaliar a ação isolada de AmB obteve-se média geométrica de MICs 4.046 µg ml<sup>-1</sup>. Isso demonstra a importância de estudos que avaliem o uso de AmB, isoladamente e/ou em combinação contra fungos negros causadores de CBM. A combinação de fármacos é vista como uma solução promissora para a resistência fúngica e redução dos efeitos adversos provocados pelo uso da AmB.

Sabe-se que os indivíduos que trabalham no extrativismo e na indústria da carnaúba, são geralmente moradores do campo desprovidos de organização e de capital. As precárias condições físicas de trabalho, devido ao extrativismo rudimentar, insalubre e sem a utilização de ferramentas ou vestimentas adequadas, fazem com que esse grupo de pessoas sejam mais susceptíveis a adquirir infecções, inclusive doenças provocadas por fungos, como a CBM (ALVES; COELHO, 2008; QUEIROGA et al. 2013). Demonstrando a importância de medidas de combate à resistência e de controle de infecções que os trabalhadores da região podem vir a desenvolver.

## 5. Conclusão

Esse trabalho é pioneiro, traz informações inéditas sobre a avaliação *in vitro* da suscetibilidade à AmB de fungos negros isolados da carnaúba no estado do Piauí. Embora o fármaco do estudo não seja considerado como terapia de primeira linha para fungos melanizados, o antifúngico foi capaz de inibir o crescimento de parte dos isolados testados quando avaliados *in vitro*, demonstrando que esse medicamento pode ser empregado no tratamento de infecções

ocasionadas por esses microrganismos. Além disso, apesar da quantidade amostral reduzida, foram encontrados isolados resistentes, o que indica a importância da análise da suscetibilidade desses fungos antes de ser instituído um tratamento, sendo importante também considerar que *in vivo* os resultados podem sofrer alteração. Portanto, a presença dos fungos negros na carnaúba e de cepas resistentes, justificam a grande importância da conscientização das pessoas que trabalham com a extração dessa planta, quanto aos cuidados que devem seguir, principalmente relacionada ao uso de equipamentos de proteção individual. Visto que apesar de raramente as doenças causadas por esses fungos apresentarem-se na forma disseminada ou invasiva, são de difícil controle, e sem um diagnóstico acurado e precoce para que o tratamento seja eficaz, causam diversos transtornos para a qualidade de vida do paciente e para sistema público de saúde. Ademais, o presente trabalho aponta perspectivas para o futuro em relação à identificação molecular desses isolados para melhor conhecer a suscetibilidade à AmB nos diferentes gêneros encontrados.

## Referências

- Afsarian, M. H., Shokohi, T., Arzanlou, M., Taheri Sarvtin, M., & Badali, H. (2012). Phaeohyphomycosis due to Dematiaceous Fungi A Review of the Literature. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 22(92), 100-126.
- Alves, M. O., & Coelho, J. D. (2008). Extrativismo da carnaúba: relações de produção, tecnologia e mercados. Fortaleza, CE: Banco do Nordeste do Brasil, 214 p.
- Araujo, M. B. M., Lima, C. S., Rabelo Filho, F. D. A., Ootani, M. A., Bezerra, A. M. E., & Cardoso, J. E. (2018). First report of *Colletotrichum theobromicola* and *C. tropicale* causing anthracnose on fruits of carnauba palm in Brazil. *Plant Disease*, 102(1), 244.
- Arikan, S. (2007). Current status of antifungal susceptibility testing methods. *Medical Mycology*, v. 45, n. 7, 569-587.
- Banno, I. (1981). Ascomycetous yeast isolated from forest materials in Japan. *IFO Research Communications*, 10, 10-19.
- Barbieri, R., & Carvalho, F. (2001). Coevolução de plantas e fungos patogênicos. *Current Agricultural Science and Technology*, 7(2).
- Bonifaz, A., Vázquez-González, D., & Perusquía-Ortiz, A. M. (2010). Subcutaneous mycoses: chromoblastomycosis, sporotrichosis and mycetoma. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 8(8), 619-628.
- Braga, S. S., Kanitz, H. G., Perinotto, A. R. C., & Gonçalves, M. F. (2022). A Carnaúba e seus Possíveis usos Turísticos no litoral do Piauí. *Revista de Turismo Contemporâneo*, Natal, v. 10, n. 3, p. 516-535.
- Campoy, S., & Adrio, J. L. (2017). Antifungals. *Biochemical pharmacology*, 133, 86-96.
- Carvalho, F. P. A. D., & Gomes, J. M. A. (2008). Eco-eficiência na produção de cera de Carnaúba no município de Campo Maior, Piauí, 2004. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, 46, 421-453.
- Chomnunti, P., Ko, T. W. K., Chukeatirote, E., Hyde, K. D., Cai, L., Jones, E. G., ... & Chen, H. (2012). Phylogeny of Chaetothyriaceae in northern Thailand including three new species. *Mycologia*, 104(2), 382-395.
- Chowdhary, A., Perfect, J., & de Hoog, G. S. (2015). Black molds and melanized yeasts pathogenic to humans. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(8), a019570.
- Daboit, T. C., Massotti Magagnin, C., Heidrich, D., Czekster Antchevis, L., Vigolo, S., Collares Meirelles, L., ... & Scroferneker, M. L. (2014). *In vitro* susceptibility of chromoblastomycosis agents to five antifungal drugs and to the combination of terbinafine and amphotericin B. *Mycoses*, 57(2), 116-120.
- Daboit, T. C. (2013). Nanoemulsões de anfotericina B e itraconazol: avaliação da atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* em agentes da cromoblastomicose. Dissertação de doutorado (Programa de Pós- Graduação em Medicina: Ciências Médicas). UFRGS. Porto Alegre 2013.
- DeFeo, C. P., & Harber, L. C. (1959). Chromoblastomycosis treated with local infiltration of amphotericin b solution: report of second case. *Journal of the American Medical Association*, 171(14), 1961-1963.
- De Hoog, G. S. (2014). Ecology and phylogeny of black yeast-like fungi: diversity in unexplored habitats. *Fungal Diversity*. v. 65, p.1-2.
- De Hoog, G. S. (1993). Evolution of black yeasts: possible adaptation to the human host. *Antonie van Leeuwenhoek*, 63, 105-109.
- De Hoog, G. S., Zeng, J. S., Harrak, M. J., & Sutton, D. A. (2006). *Exophiala xenobiotica* sp. nov., an opportunistic black yeast inhabiting environments rich in hydrocarbons. *Antonie van Leeuwenhoek*, 90, 257-268.

- de Souza, R. C., Modesto, S. P. B., Maués, K. M. G., dos Santos, J. C., Farias, A. N., Biancalana, A., & Biancalana, F. S. C. (2020). Avaliação da ocorrência de fungos demáceos em espinhos de limoeiro-taiti (*citrus latifolia tanaka*) no município de Soure-Pa. *Brazilian Journal of Health Review*, 3(5), 14894-14910.
- Dianese, J. C. (2000). Micodiversidade associada a plantas nativas do Cerrado. In: T.B. Cavalcanti; B. M. T. Walter. (Org.). Tópicos atuais em Botânica. 1 ed. Brasília: Sociedade Brasileira de Botânica, EMBRAPA, 109-115.
- Diniz, Y. C. M., Diniz, D. M., Branco, L. D. C. M. C., Sauaia, B. A., da Silva, R. R., Marques, S. G., ... & de Azevedo, S. (2021). CROMOBLASTOMICOSE: Apresentação clínica, evolução terapêutica e associação com achados histopatológicos no Maranhão. *Brazilian Journal of Development*, 7(11), 102468-102489.
- Dixon, D. M., Shadomy, H. J., & Shadomy, S. (1980). Dematiaceous fungal pathogens isolated from nature. *Mycopathologia*, 70, 153-161.
- Duarte, A. P. M., Pagnocca, F. C., Baron, N. C., de Souza Carvalho Melhem, M., Palmeira, G. A., de Franceschi de Angelis, D., & Attili-Angelis, D. (2013). *In vitro* susceptibility of environmental isolates of *Exophiala dermatitidis* to five antifungal drugs. *Mycopathologia*, 175, 455-461.
- Filippin, F. B., & Souza, L. C. (2006). Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42, 167-194.
- Freire, F. C. O., & Barguil, B. M. (2009). Ocorrência de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de carnaubeira no Brasil. *Summa phytopathology Botucatu*, v. 35, n. 1, p. 68.
- Gostinčar, C., Muggia, L., & Grube, M. (2012). Polyextremotolerant black fungi: oligotrophism, adaptive potential, and a link to lichen symbioses. *Frontiers in Microbiology*, 3, 390.
- Henderson, A., Galeno, G., & Bernal, R. (1995). Palms of the Americas. Princeton, Princeton University Press, New Jersey.
- Iwatsu, T., Miyaji, M., & Okamoto, S. (1981). Isolation of *Phialophora verrucosa* and *Fonsecaea pedrosoi* from nature in Japan. *Mycopathologia*, 75, 149-158.
- Koehler, A., Heidrich, D., Pagani, D. M., Corbellini, V. A., & Scrofermeker, M. L. (2021). Melanin and chromoblastomycosis agents: Characterization, functions, and relation with antifungals. *Journal of Basic Microbiology*, 61(3), 203-211.
- Lemke, T. L. (2017). Essentials Of Foy's Principles Of Medicinal Chemistry. *Wolters Kluwer*, e.1.
- Lorenzi, H., Souza, H. M. D., Cerqueira, L. S. C. D., Medeiros-Costa, J. T. D., & Behr, N. V. (1996). Palmeiras no Brasil: nativas e exóticas (No. 584.5 P165p). São Paulo, BR: Edit. Plantarum.
- Marques, S. G., Silva, C. D. M. P., Saldanha, P. C., Rezende, M. A., Vicente, V. A., Queiroz-Telles, F., & Costa, J. M. L. (2006). Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the shell of the babassu coconut (*Orbignya phalerata* Martius) in the Amazon region of Maranhão Brazil. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 47(4), 305-311.
- Mobin, M., & Cavalcanti, L. H. I. (2000). Myxomycetes em carnaubeira (*Copernicia prullifera* (Miller) H.E. Moore). *Acta Botanica Brasilica*, v. 1, n. 14, p. 71-75.
- Molnárová, J., Vadkertiová, R., & Stratilová, E. (2014). Extracellular enzymatic activities and physiological profiles of yeasts colonizing fruit trees. *Journal of basic microbiology*, 54(S1), S74-S84.
- Mouchalouat, M. D. F. (2008). Cromoblastomicose. Estudo de uma série de 14 casos atendidos no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas-Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, de 1994 a 2005.
- Najafzadeh MJ, Sutton DA, Keisari MS, Zarrinfar H, de Hoog GS, Chowdhary A, & Meis JF. (2014). *In vitro* activities of eight antifungal drugs against 104 environmental and clinical isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 58(9):5629-31.
- Nascimento, M. M., Vicente, V. A., Bittencourt, J. V., Gelinski, J. M. L., Prenafeta-Boldú, F. X., Romero-Güiza, M., ... & De Hoog, G. S. (2017). Diversity of opportunistic black fungi on babassu coconut shells, a rich source of esters and hydrocarbons. *Fungal biology*, 121(5), 488-500.
- Nogueira, D. H. (2009). Qualidade e potencial de utilização de frutos de genótipos de carnaubeira (*Copernicia prunifera*) oriundos do estado do Ceará. Odds, F. C., Brown, A. J., & Gow, N. A. (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends in microbiology*, 11(6), 272-279.
- Paulo, L. N. M. (2021). Avaliação da resposta imune induzida por células dendríticas previamente ativadas com agonistas das vias TLR-2 e TLR-9 na Cromoblastomicose experimental (OU) Avaliação da resposta imune induzida por células dendríticas previamente ativadas por *Fonsecaea pedrosoi* e agonistas das vias de TLR-2 e TLR-9 na Cromoblastomicose experimental (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Phaff, H. J., & Starmer, W. T. (1980). Specificity of natural habitats for yeasts and yeast-like organisms. *Biological and Activities of Yeasts*, 79-101.
- Pirozynski, K. A., & Hawksworth, D. L. (1988). Coevolution of fungi with plants and animals. *Academic Press*.
- Queiroga, V. D. P., Ramos, G. A., Assunção, M. V., & Almeida, F. A. C. (2013). Carnaubeira: tecnologia de plantio e aproveitamento industrial. Campina Grande: UFCG, 204.
- Queiroz-Telles, F., de Hoog, S., Santos, D. W. C., Salgado, C. G., Vicente, V. A., Bonifaz, A., ... & Walsh, T. J. (2017). Chromoblastomycosis. *Clinical microbiology reviews*, 30(1), 233-276.

Queiroz-Telles, F., Nucci, M., Colombo, A. L., Tobón, A., & Restrepo, A. (2011). Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Medical mycology*, 49(3), 225-236.

Reference Method for broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi Approved Standard – Second Edition. CLSI document M38-A2, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

Revankar, S. G., & Sutton, D. A. (2012). Melanized fungi in human disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(4), 720.

Robbs, P. G., Hagler, A. N., & Mendonça-Hagler, L. C. (1989). Yeasts associated with a pineapple plantation in Rio de Janeiro, Brazil. *Yeast* (Chichester), 5, 485-489.

Saikkonen, K., Wäli, P., Helander, M., & Faeth, S. H. (2004). Evolution of endophyte–plant symbioses. *Trends in plant science*, 9(6), 275-280.

Salgado, C. G., Silva, J. P. D., Diniz, J. A. P., Silva, M. B. D., Costa, P. F. D., Teixeira, C., & Salgado, U. I. (2004). Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 46, 33-36.

Sanglard, D., & Odds, F. C. (2002). Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *The Lancet infectious diseases*, 2(2), 73-85.

Seyedmousavi, S., Netea, M. G., Mouton, J. W., Melchers, W. J., Verweij, P. E., & De Hoog, G. S. (2014). Black yeasts and their filamentous relatives: principles of pathogenesis and host defense. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3), 527-542.

Silva, R. A. R., Pinheiro, L. G., das Chagas, K. P. T., Freire, A. D. S. M., dos Santos, J. R. M., & de Almeida Vieira, F. (2017). Características biométricas dos frutos e sementes da palmeira *Copernicia prunifera* (Arecaceae). *Revista de Ciências Agroambientais*, 15(2), 144-149.

Silva, S.; & Tassara, H. (1996). Frutas no Brasil. 4. ed. São Paulo: *Empresa das Artes*, 321.

Siqueira, I. M. (2016). Imunopatologia da cromoblastomicose: modulação da resposta inflamatória por formas do fungo *Fonsecaea pedrosoi* e seu impacto na cromoblastomicose murina.

Sterflinger, K. (2006). Black yeasts and meristematic fungi: ecology, diversity and identification. *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*, 501-514.

Teixeira, M. D. M., Moreno, L. F., Stielow, B. J., Muszewska, A., Hainaut, M., Gonzaga, L., ... & de Hoog, G. S. (2017). Exploring the genomic diversity of black yeasts and relatives (Chaetothyriales, Ascomycota). *Studies in mycology*, 86(1), 1-28.

Torres-Guerrero E, Isa-Isa R, Isa M, & Arenas R. (2012). Chromoblastomycosis. *Clinical Dermatology*. 30(4):403-8.

Urán, M. E., & Cano, L. E. (2008). Melanin: implications in some disease pathogenesis and its capacity to evade the host immune response. *Infection*, 12(2), 128-148.

Vicente, V. A., Attili-Angelis, D., Pie, M. R., Queiroz-Telles, F., Cruz, L. M., Najafzadeh, M. J., ... & Pizzirani-Kleiner, A. (2008). Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. *Studies in Mycology*, 61(1), 137-144.

Vitale, R. G., Perez-Blanco, M., & De Hoog, G. S. (2009). *In vitro* activity of antifungal drugs against *Cladophialophora* species associated with human chromoblastomycosis. *Medical Mycology*, 47(1), 35-40.

Xiao, X., Li, Y., Lan, Y., Zhang, J., He, Y., Cai, W., ... & Zhang, J. (2021). Deletion of *pksA* attenuates the melanogenesis, growth and sporulation ability and causes increased sensitivity to stress response and antifungal drugs in the human pathogenic fungus *Fonsecaea monophora*. *Microbiological research*, 244, 126668.

Yazdanparast, S. A., Mohseni, S., De Hoog, G. S., Aslani, N., Sadeh, A., & Badali, H. (2017). Consistent high prevalence of *Exophiala dermatitidis*, a neurotropic opportunist, on railway sleepers. *Journal de Mycologie Médicale*, 27(2), 180-187.

Zeppenfeldt, G., Richard-Yegres, N., Yegres, F., & Hernández, R. (1994). *Cladosporium carrionii*: hongo dimórfico en cactáceas de la zona endémica para la cromomycosis en Venezuela. *Revista Iberoamericana de Micología*, 11(3), 61-63.

## AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado Piauí – FAPEPI e a Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Inovação – PROPOPI da Universidade Federal do Delta do Parnaíba – UFDPAr pelas bolsas de pesquisa e pelo fomento concedido.

## ANEXOS

### Anexo 1: Regras de Formatação da Revista “Research, Society and Development”

#### 1) Text structure:

- Title in this sequence: English, Portuguese and Spanish.
- The authors of the article (must be placed in this sequence: name, ORCID, institution, e-mail). NOTE: The ORCID number is individual for each author, and it is necessary for registration at the DOI, and in case of error, it is not possible to register at the DOI).
- Abstract and Keywords in this sequence: Portuguese, English and Spanish (the abstract must contain the objective of the article, methodology, results and conclusion of the study. It must have between 150 and 250 words);
- Body of the text (must contain the sections: 1. Introduction, in which there is context, problem studied and objective of the article; 2. Methodology used in the study, as well as authors supporting the methodology; 3. Results (or alternatively, 3. Results and Discussion, renumbering the other subitems), 4. Discussion and, 5. Final considerations or Conclusion);
- References: (Authors, the article must have at least 20 references as current as possible. Both the citation in the text and the item of References, use the formatting style of the APA - American Psychological Association. References must be complete and updated Placed in ascending alphabetical order, by the surname of the first author of the reference, they must not be numbered, they must be placed in size 8 and 1.0 spacing, separated from each other by a blank space).

#### 1) Estrutura textual

- Título nesta sequência: Inglês, Português e Espanhol.
- Resumo e Palavras-chave nesta sequência: Português, Inglês e Espanhol (o resumo deve conter o objetivo do artigo, metodologia, resultados e conclusão do estudo. Deve ter entre 150 e 250 palavras);
- Corpo do texto (deve conter as seções: 1. Introdução, em que há contexto, problema estudado e objetivo do artigo; 2. Metodologia utilizada no estudo, bem como autores que apoiam a metodologia; 3. Resultados (ou, alternativamente, 3. Resultados e Discussão, renumerando os demais subitens), 4. Discussão e, 5. Considerações Finais ou Conclusão);
- Referências: (Autores, o artigo deve ter pelo menos 20 referências o mais atual possível. Tanto a citação no texto quanto o item de Referências, utilizam o estilo de formatação da APA - American Psychological Association. As referências devem ser completas e atualizadas Colocadas em ordem alfabética crescente, pelo sobrenome do primeiro autor da referência, elas não devem ser numeradas, devem ser colocadas em espaçamento de tamanho 8 e 1.0, separadas umas das outras por um espaço em branco).

## 2) Layout:

- Word format (.doc);
- Written in 1.5 cm space, using Times New Roman font 10, in A4 format and the margins of the text must be lower, upper, right and left of 1.5 cm .;
- Indents are made in the text editor ruler (not by the TAB key);

## 2) Layout:

- Escrito em espaço de 1,5 cm, utilizando fonte Times New Roman 10, em formato A4;
- Os recuos são feitos na régua do editor de texto (não pela tecla TAB);

## 3) Figures:

The use of images, tables and illustrations must follow common sense and, preferably, the ethics and axiology of the scientific community that discusses the themes of the manuscript. Note: the maximum file size to be submitted is 10 MB (10 mega).

Figures, tables, charts etc. (they must have their call in the text before they are inserted. After their insertion, the source (where the figure or table comes from ...) and a comment paragraph in which to say what the reader must observe is important in this resource The figures, tables and charts ... must be numbered in ascending order, the titles of the tables, figures or charts must be placed at the top and the sources at the bottom.

## 3) Figuras:

O uso de imagens, tabelas e ilustrações deve seguir o bom senso e, preferencialmente, a ética e a axiologia da comunidade científica que discute os temas do manuscrito.

Figuras, tabelas, gráficos etc. (eles devem ter sua chamada no texto antes de serem inseridos. Após a sua inserção, a fonte (de onde vem a figura ou tabela ...) e um parágrafo de comentário no qual dizer o que o leitor deve observar é importante neste recurso As figuras, tabelas e gráficos ... devem ser numerados por ordem crescente, os títulos das tabelas, figuras ou gráficos devem ser colocados no topo e as fontes na parte inferior.