



Faculdade de Pindamonhangaba



Ana Theresa da Silva Árcega

Luiza Ohashi Bonnett

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE OVICIDA DE
EXTRATOS VEGETAIS FRENTE A *HAEMONCHUS*
*CONTORTUS***

Pindamonhangaba – SP

2014



Faculdade de Pindamonhangaba



Ana Theresa da Silva Árcega

Luiza Ohashi Bonnett

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE OVICIDA DE
EXTRATOS VEGETAIS FRENTE A *HAEMONCHUS*
*CONTORTUS***

Monografia apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Diploma de Bacharel pelo Curso de Farmácia da Faculdade de Pindamonhangaba.

Orientador: Prof. Dr. Matheus Diniz Gonçalves Coelho

Co-orientador: Prof. Dr. Gokithi Akisue

Pindamonhangaba – SP

2014

Árcega, Ana Theresa da Silva ; Bonnett, Luiza Ohashi
Avaliação *in vitro* da atividade ovicida de extratos vegetais frente a
Haemonchus contortus / Ana Theresa da Silva Árcega; Luiza Ohashi
Bonnett / Pindamonhangaba-SP : FUNVIC Faculdade de
Pindamonhangaba, 2014.

14f. : il.

Monografia (Graduação em Farmácia) FAPI-SP.

Orientador: Prof. Dr. Matheus Diniz Gonçalves Coelho.

1 Extratos vegetais. 2 Atividade ovicida. 3 *Haemonchus contortus*.
I Avaliação *in vitro* da atividade ovicida de extratos vegetais frente a
Haemonchus contortus II Ana Theresa da Silva Árcega; Luiza Ohashi
Bonnett.



Faculdade de Pindamonhangaba



ANA THERESA DA SILVA ÁRCEGA

LUIZA OHASHI BONNETT

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE OVICIDA DE EXTRATOS VEGETAIS
FRENTE A *HAEMONCHUS CONTORTUS***

Monografia apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Diploma de Bacharel pelo Curso de Farmácia da Faculdade de Pindamonhangaba

Data: _____

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. _____ Faculdade de Pindamonhangaba

Assinatura _____

Prof. _____ Faculdade de Pindamonhangaba

Assinatura _____

Prof. _____ Faculdade de Pindamonhangaba

Assinatura _____

AGRADECIMENTOS

A Deus, que nos concedeu esta oportunidade.

Aos nossos familiares, que sempre nos incentivaram.

Ao nosso orientador, Prof. Dr. Matheus Diniz Gonçalves Coelho, e ao co-orientador, Prof. Dr. Gokithi Akisue, que acreditaram e auxiliaram no projeto.

A Thalyta Baldim, que forneceu material biológico das ovelhas para realizar os testes.

A técnica do Laboratório de Parasitologia, Ana Paula da Silva Moreira Alves e a aluna Jéssika Calheiros Ribeiro, que auxiliaram com algumas leituras de lâminas.

Ao responsável técnico do Laboratório de Química, Gervásio Amador Rosa, que nos ajudou com as preparações químicas necessárias para a realização dos métodos.

A Jarina Moradei, que auxiliou na transcrição do trabalho para a língua inglesa.

Só se nos detivermos a pensar nas pequenas coisas chegaremos a compreender as grandes.

José de Sousa Saramago

Este trabalho foi escrito na forma de artigo científico a ser submetido ao *American Journal Animal and Veterinary Sciences*, cujas normas estão em anexo.

Avaliação *in vitro* da atividade ovicida de extratos vegetais frente a *Haemonchus contortus*

Ana Theresa da Silva Árcega¹, Luiza Ohashi Bonnett¹, Matheus Diniz Gonçalves Coelho¹, Gokithi Akisue²

¹ Laboratório de Parasitologia, Fundação Universitária Vida Cristã – FUNVIC, Faculdade de Pindamonhangaba, Pindamonhangaba, São Paulo, Brasil.

² Laboratório de Farmacognosia, Fundação Universitária Vida Cristã – FUNVIC, Faculdade de Pindamonhangaba, Pindamonhangaba, São Paulo, Brasil.

Email:

anatheresa@hotmail.com (Árcega ATS), luizabonnett@hotmail.com (Bonnett LO), profmatheuscoelho@gmail.com (Coelho MDG), gokithiakisue@gmail.com (Akisue G)

Abstract: The sheep industry is a branch in livestock that has been growing over the years, however, the control of gastrointestinal parasites is considered one of the greatest barriers of this practice. In this sense, there is *Haemonchus contortus*, blood-sucking parasite which can cause severe anemia, development of mumps, and death. It is known that the inappropriate use of allopathic medicines has promoted the emergence of resistance by this parasite. Thus, the present study aimed to evaluate the ovicidal activity of plant extracts against *H. contortus*. *H. contortus* eggs were obtained from faecal samples from naturally infected sheep, and purified by modification of Sheather's method. The purified eggs were submitted to six alcoholic extracts, at concentrations of 12.5 mg / ml, 25 mg / ml and 50 mg / ml. The plants which have been evaluated were *Allamanda cathartica*, *Musa* spp, *Nerium oleander*, *Mirabilis jalapa*, *Carica papaya* spp, *Brugmansia suaveolens*. After 168 hours, 50 μ l aliquots were analyzed for the presence of eggs turned into blastomere, embryo, or larvae. It was observed that the alcoholic extracts of *N. oleander* and *M. jalapa* were the most promising, since it prevented the outbreak of larvae in all tested concentrations, thus presenting a high potential for composite products intended for grazing decontamination.

Keywords: Haemonchiasis, *Haemonchus contortus*, Plant extracts

Resumo: A ovinocultura é um ramo na pecuária que vem crescendo ao longo dos anos, entretanto, o controle de parasitoses gastrointestinais é considerado um dos maiores entraves desta prática. Neste sentido, destaca-se *Haemonchus contortus*, parasito hematófago que pode causar anemia severa, desenvolvimento de papeira e morte. Sabe-se que o uso inadequado de medicamentos alopatícos tem promovido o aparecimento de resistência por parte desse parasito. Com isso, no presente trabalho objetivou-se avaliar a atividade ovicida de extratos vegetais frente a *H. contortus*. Ovos de *H. contortus* foram obtidos a partir de amostras fecais de ovelhas naturalmente infectadas, sendo purificados por meio de modificação do método de Sheather's. Os ovos purificados foram submetidos a seis extratos alcoólicos, nas concentrações de 12,5 mg/ml, 25 mg/ml e 50 mg/ml. Os vegetais avaliados foram *Allamanda cathartica*, *Musa* spp, *Nerium oleander*, *Mirabilis jalapa*, *Carica papaya* spp, *Brugmansia suaveolens*. Após 168 horas, alíquotas de 50 μ l foram analisadas quanto à presença de ovos blastomerados, larvados ou larvas. Observou-se que os extratos alcoólicos de *N. oleander* e *M. jalapa* foram os mais promissores, já que impediram a eclosão de larvas em todas as concentrações testadas, apresentando assim um elevado potencial para composição de produtos que visem descontaminação de pasto.

Palavras-chave: Haemoncose, *Haemonchus contortus*, Extratos de plantas

1. Introdução

A ovinocultura é um ramo na pecuária que vem crescendo ao longo dos anos devido aos seus altos lucros e ao baixo custo de manejo, entretanto, o controle de parasitoses

gastrointestinais tem sido considerado um dos maiores entraves da ovinocultura por causarem perdas significativas no rendimento do rebanho. [1]

Existem várias espécies de nematóides gastrointestinais de ovinos, porém a espécie de maior destaque é o *Haemonchus contortus*, pois, além da elevada frequência de infecção, é o mais grave por se tratar do único estrogilídeo que se alimenta diretamente de sangue que pode resultar em hipoproteinemia, anemia com desenvolvimento de “papeira” (edema subcutâneo na região ventral da mandíbula), fraqueza ou fadiga após exercício e diarreia, muitas vezes levando ao óbito. [2]

Os parasitos estrogilídeos apresentam dois estágios em seu ciclo, fase de vida livre e fase parasitária. Na fase de vida livre, em condições adequadas de oxigênio, umidade e temperatura, os ovos presentes nas fezes formam uma larva dentro do ovo em 24 horas. Esta larva eclode e necessita de microrganismos para se alimentar. Esta é a larva L₁. Se as condições do meio continuarem favoráveis, entre 5 e 10 dias, a larva L₁ sofrerá trocas de cutícula, para L₂ e L₃, que é a forma infectante. [2]

O uso frequente e inadequado de medicamentos alopáticos gera intensa pressão de seleção, levando a uma vantagem seletiva para parasitos tolerantes, permitindo que eles se multipliquem nas futuras gerações, ocasionando diminuição da eficácia dos medicamentos alopáticos e promovendo o aparecimento de resistência aos mesmos. [3,4]

Neste sentido torna-se de importância o desenvolvimento de pesquisas que visem a busca por novas alternativas de eliminação deste parasito, quer seja através do tratamento dos animais, quer seja através da descontaminação do pasto. Com isso, objetivou-se no presente trabalho avaliar a atividade ovicida de extratos vegetais que sabidamente possuem atividade antiparasitária, frente a *H. contortus*.

2. Materiais e Métodos

O critério de seleção dos vegetais foi baseado em dados científicos consagrados na literatura, segundo os quais estes extratos já apresentaram atividade ovicida e larvicida frente a nematóides como *Ancylostoma* sp.[5] e *Haemonchus contortus* [6,7]. Para confirmação da identidade botânica, foram depositadas exsiccatas no herbário SPF da Universidade de São Paulo, cujos respectivos números estão citados após o nome científico de cada espécie avaliada. Foram selecionadas seis espécies vegetais para a realização da presente pesquisa: Alamanda (*Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae) – G. Akisue 041), Banana nanica (*Musa* spp – G. Akisue 061), Espirradeira (*Nerium oleander* L.) (Apocynaceae) – G. Akisue 040), Mamão Papaia (*Carica papaya* spp – G. Akisue 062), Maravilha (*Mirabilis jalapa* L. (Nyctaginaceae) – G. Akisue 045) e Trombeteira (*Brugmansia suaveolens* Willd. Solanaceae) - G. Akisue 030 & L.M.L. Cardoso).

Para obtenção dos extratos de Alamanda, Espirradeira, Maravilha e Trombeteira, folhas de cada vegetal foram processadas. Já para obtenção do extrato do Mamão Papaia foram utilizadas as sementes e para o extrato da Banana nanica foi utilizado o coração da bananeira.

O material vegetal coletado foi processado no laboratório de Farmacognosia (LAFAPLAN) da Faculdade de Pindamonhangaba. Após secagem em estufa a 45° C e pulverização em moinho de café elétrico (Cuisinart®), foram preparados extratos alcoólicos, utilizando-se álcool etílico (álcool absoluto PA) como líquido extrator, pelo método de Soxhlet, segundo as normas da Farmacopeia Brasileira, em sua quinta edição, onde se obteve o extrato alcoólico. O mesmo foi concentrado em aparelho de rotavapor por evaporação do solvente, com obtenção do extrato bruto, que, por sua vez, foi diluído em água destilada para obter as concentrações a serem analisadas.

Os experimentos foram realizados no laboratório de Parasitologia da Faculdade de Pindamonhangaba, onde se avaliou a atividade ovicida dos extratos supracitados, sendo estes testados em três diferentes diluições (50 mg/mL, 25 mg/mL e 12,5 mg/mL).

Para realização do teste ovicida, ovos de *H. contortus* foram obtidos a partir de amostras fecais coletadas diretamente da ampola retal de ovelhas da raça Santa Inês, naturalmente infectadas, sendo purificados por meio de modificação do método de Sheather's (centrífugo-flutuação a 1.600 rpm/minuto em solução saturada de sacarose d=1,2 g/mL)[8], com posterior coleta de 2 mL do sobrenadante e lavagens sucessivas com água destilada (por centrifugação a 1.600 rpm/1 minuto).

Os testes ovicidas foram realizados com quantidades padronizadas de ovos imersos nas diluições avaliadas e a atividade foi determinada observando-se a proporção de ovos viáveis após 24, 48, 72 e 168 (7 dias) horas de exposição.

Os resultados foram avaliados estatisticamente utilizando métodos paramétricos (ANOVA) ou não paramétricos (Kruskal-Wallis) de acordo com a normalidade dos resultados obtidos, seguidos de teste de Tukey e o teste de Dunn, respectivamente. Para tanto se utilizou o software BioEstat 5.0.

3. Resultados e discussão

No presente trabalho considerou-se como efetivo apenas os extratos que induziram 100% de inibição de eclosão de ovos. Após 48 horas de experimentação, observou-se que 90% dos ovos do grupo controle eclodiram, e, dos seis extratos avaliados, os mais efetivos foram os obtidos a partir de *M. jalapa* e *N. oleander*, já que inibiram 100% de eclosão dos ovos nas concentrações de 25 mg/mL e 50 mg/mL, conforme tabela 1.

Da mesma forma, após 72 horas, os dois extratos vegetais supracitados mantiveram o mesmo percentual de inibição de eclosão dos ovos nas concentrações de 25mg/mL e 50mg/mL, mantendo-se eficazes, neste sentido, inclusive após 168 horas de exposição, conforme tabela 2. Cabe ressaltar, entretanto, que dos dois extratos vegetais mais eficazes, *N. oleander* apresentou atividade ovicida também

na concentração de 12,5 mg/mL, em todos os intervalos de tempo nos quais as avaliações foram efetuadas.

Entre os demais extratos vegetais avaliados, o extrato obtido a partir de *A. cathartica* apresentou-se eficaz na inibição da eclosão de ovos, apenas na concentração de 50mg/ mL, sendo deste modo, menos promissor do que os dois citados anteriormente. Ainda, o extrato que apresentou menor eficácia foi o de *C. papaya*, particularmente após 72 e 168 horas de tratamento, nas concentrações de 12,5 mg e 25 mg, pois houve uma elevada sobrevivência de larvas, sendo

estatisticamente semelhante ao que foi observado no grupo controle ($p>0,05$).

Os resultados expostos abaixo concordam em parte com os obtidos por Santos et al. [5], que avaliaram a atividade de extratos alcoólicos de 10 diferentes vegetais frente a larvas de Ancylostomidae, e, destes, quatro se apresentaram mais promissores, à saber *N. oleander*, *M. jalapa*, *A. cathartica* e *B. suaveolens*, sendo que este último não apresentou atividade ovicida no presente trabalho.

Tabela 1- Atividade ovicida de extratos alcoólicos de seis vegetais após 24 e 48 horas de exposição, frente a *H. contortus*. Onde, OB: ovo blastomerado; OL: ovo larvado e L: larva.

	24 horas									48 horas								
	12,5mg/mL			25mg/mL			50mg/mL			12,5mg/mL			25mg/mL			50mg/mL		
	OB	OL	L	OB	OL	L	OB	OL	L	OB	OL	L	OB	OL	L	OB	OL	L
<i>A. cathartica</i>	2	18	0	0	20	0	1	19	0	0	19	1	3	15	2	0	20	0
<i>B. suaveolens</i>	6	14	0	7	13	0	0	20	0	2	17	1	3	13	4	4	13	3
<i>C. papaya</i>	9	11	0	4	16	0	5	15	0	3	5	12	5	5	10	3	17	0
<i>M. jalapa</i>	3	17	0	1	19	0	0	20	0	3	16	1	1	19	0	7	13	0
<i>Musa spp</i>	1	19	0	1	19	0	1	19	0	15	2	3	14	3	3	12	4	4
<i>N. oleander</i>	2	18	0	2	18	0	6	14	0	6	14	0	7	13	0	5	15	0
Controle	3	17	0	3	17	0	3	17	0	0	2	18	0	2	18	0	2	18

Tabela 2- Atividade ovicida de extratos alcoólicos de seis vegetais após 72 horas e 7 dias de exposição, frente a *H. contortus*. Onde, OB: ovo blastomerado; OL: ovo larvado e L: larva.

	72 horas									168 horas (7dias)								
	12,5mg/mL			25mg/mL			50mg/mL			12,5mg/mL			25mg/mL			50mg/mL		
	OB	OL	L	OB	OL	L	OB	OL	L	OB	OL	L	OB	OL	L	OB	OL	L
<i>A. cathartica</i>	0	19	1	6	12	2	5	15	0	0	19	1	2	13	5	4	16	0
<i>B. suaveolens</i>	2	12	6	3	11	6	2	10	8	3	7	10	5	4	11	5	8	7
<i>C. papaya</i>	0	0	20	0	0	20	3	12	5	0	4	16	0	4	16	0	16	4
<i>M. jalapa</i>	3	16	1	3	17	0	7	13	0	7	13	0	5	15	0	6	14	0
<i>Musa spp</i>	1	19	0	1	19	0	1	19	0	0	10	10	2	5	13	1	19	0
<i>N. oleander</i>	3	17	0	7	13	0	4	16	0	7	13	0	12	8	0	11	9	0
Controle	0	3	17	0	3	17	0	3	17	1	0	19	1	0	19	1	0	19

Ressalta-se que, na pesquisa realizada por Santos et al. [5], todos os extratos testados não haviam apresentado atividade ovicida, o que possivelmente justificou-se a necessidade de avaliação da atividade larvicida por estes autores. Por outro lado, no presente trabalho, os extratos mais promissores já se demonstraram eficazes quando da inibição da eclosão dos ovos, o que evidencia um maior potencial destes para o controle da hemocose em detrimento a ancilostomíase.

Tal evidência também demonstra que os ovos de *H. contortus* são mais susceptíveis a ação dos extratos vegetais analisados, quando comparados a ovos de ancilostomídeos, representando assim um resultado de importância significativa, já que, conforme citado anteriormente, um dos maiores entraves da ovinocultura está relacionado à resistência que *H. contortus* apresenta frente às drogas alopáticas. [3]

O fato de três dos extratos avaliados não terem se mostrado eficazes, não elimina a possibilidade de que estes venham a ser promissores, já que apesar de não terem apresentado atividade ovicida, poderiam vir a ocasionar mortalidade significativa quando testados quanto a atividade larvicida, destacando neste sentido a importância do delineamento de futuros estudos que objetivem avaliar tal propriedade.

Musa spp., por exemplo, muito embora não tenha apresentado atividade ovicida, demonstrou-se eficiente frente a *H. contortus* na concentração de 75mg/mL, com eficácia de 98,5 à 100%, na inibição de desenvolvimento larvar, em estudo realizado por Oliveira et al.[6].

Por outro lado, o fato de um extrato vegetal não apresentar atividade significativa *in vitro*, não anula a possibilidade do mesmo ser potencialmente útil para o controle da hemoncose *in vivo*. Neste sentido, no que concerne a espécie do gênero *Carica*, a inexpressiva atividade ovicida do extrato etanólico de sementes de *C. papaya* observada no presente trabalho evidencia que o mesmo não seria potencialmente útil para descontaminação de pasto, porém Pereira et al [7] e Nogueira et al [9] demonstraram que a administração de extrato alcoólico para caprinos naturalmente infectados, de sementes dessa mesma espécie, foi capaz de diminuir o número de OPG (ovos por grama de fezes) em 49,23% e 72%, respectivamente, sendo potencialmente útil, desse modo, para uso como antiparasitário ou para complementar a terapia alopática. [10]

4. Conclusão

Conclui-se que os extratos alcoólicos de *A. cathartica*, *M. jalapa* e *N. oleander* são de elevado potencial para uso como descontaminantes de pasto, para o controle da hemoncose no rebanho ovino, considerando-se a propriedade de inibir a eclosão de larvas deste parasito *in vitro*, porém futuros estudos precisam ser delineados para verificar esta propriedade em uma escala maior, bem como para determinar possíveis impactos ambientais decorrentes do uso direto no solo, através de testes de ecotoxicidade.

Referências bibliográficas

- [1] Silva CF, Lôbo KMS, Athayde ACR, Silva WW, Lima EQ, Pequeno NF. Avaliação da resposta hematológica dos animais tratados com *Typha domingensis* Pers e *Operculina hamiltonii* sobre nematóides gastrintestinais de caprinos. Rev Ciênc Agrotec. Lavras 2011; 35(3): 568-574.
- [2] Oliveira LDR. Plantas medicinais como alternativa para o controle de *Haemonchus contortus* em ovinos: testes *in vitro* e *in vivo* [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2013.
- [3] Silva FS. Eficiência anti-helmíntica *in vitro* do extrato aquoso de mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L). [Dissertação]. Patos: Universidade de Campina Grande; 2008.
- [4] Souza GAF. Avaliação do método FAMACHA como estratégia auxiliar no controle de helmintoses gastrintestinais de ovinos no semiárido da Paraíba, Brasil [Dissertação]. Patos: Universidade de Campina Grande; 2011.
- [5] Santos IA; Souza FJMA; Akisui G; Coelho FAZ; Coelho MDG. Avaliação da atividade ovicida e larvicida de dez extratos s vegetais ante *Ancylostoma ssp*. Rev Patologia Tropical. 2013; 42(2): 209-216.
- [6] Oliveira LN, Duarte ER, Nogueira FA, Silva RB, Faria DEF, Geraseev LC. Eficácia de resíduos da bananicultura sobre a inibição do desenvolvimento larval em *Haemonchus spp*. provenientes de ovinos. Rev Ciência Rural. 2010; 40(2): 488-490.
- [7] Pereira JS; Pessoa HF; Bessa EM; Nascimento JO; Coelho WAC; Fonseca ZAAS; Ahid SMM. Avaliação do extrato de semente de mamão formosa (*Carica papaya*, linnaeus) no controle de endoparasitas de ovinos no Rio Grande do Norte, Brasil. Rev Acta Vet Brasilica. 2013; 7(1): 48-51.
- [8] Neves DP, Melo AL, Linardi PM. Parasitologia Humana. Em: Exames Parasitológicos de Fezes. 11rst ed. 2007 p.455 - 464.
- [9] Nogueira DM, Moura EJ, Nascimento TVC. Avaliação de extratos de plantas medicinais no controle de nematódeos Gastrintestinais de cordeiros criados em sistema de produção de frutas. Zootec, São Paulo, SP. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/576723/1/OPB2615.pdf>>
- [10] Vieira LS. Métodos alternativos de controle de nematóides gastrintestinais em caprinos e ovinos. Rev de Tecnologia e Ciências Agropecuárias.2008;2(2):49-56.

ANEXO A

American Journal Animal and Veterinary Sciences

Guide for Authors

Online Submission System

Publishing your research in a Science Publishing Group journal is simple and efficient. Science Publishing Group journals use online submission system: <http://www.sciencepublishinggroup.com/login.aspx> The submission process is compatible with all major web browsers and can be used from PC, Mac, or Unix platforms.

Word Processing Formats

Only the following word processor file formats are acceptable for the manuscript document for all of Science Publishing Group journals:

- Microsoft word 2000/2003(doc)
- Microsoft word 2007/2010(docx)

Manuscript Template

Please click [here](#) to download the template to format your manuscript.

Manuscript Preparation

Manuscript length should be 6 to 18 pages. Science Publishing Group can exceptionally accept shorter or longer manuscripts, provided that the scientific content is of high value. No additional page charges are required if a manuscript is substantially longer than 17 pages. All submitted manuscripts must include the following items:

- Title
- List of authors, their affiliations and email addresses
- Abstract
- Introduction
- Main body
- Results and discussion
- Conclusions
- Acknowledgments (optional)
- References

Title - Make sure that the title is specific and concise. Titles should be presented in title case - all words except the first word should be in lower case letters.

List of authors, their affiliations and email addresses - Provide the full names and affiliations of all the authors. Affiliations should include department, university or organization, city, and country. One of the authors should be designated as the corresponding author, and their email address needs to be included.

Abstract - The abstract should briefly introduce the manuscript, not exceeding 400 words. No citations should be included in the abstract.

Keywords - At least 3 keywords or phrases should be included and must be separated by commas to distinguish them

Introduction - The introduction section should provide a context for your manuscript. When preparing the introduction, please bear in mind that some readers will not be experts in your field of research.

Main body - the main body part should include the main proposed ideas, results and discussions.

Conclusions - A conclusion is where you summarize the paper's findings and generalize their importance, discuss ambiguous data, and recommend further research. An effective conclusion should provide closure for a paper, leaving the reader feeling satisfied that the concepts have been fully explained.

Acknowledgments - You as the author are free to decide whether to include acknowledgments or not. Usually, the acknowledgments section includes the names of people who in some way contributed to the work, but do not fit the criteria to be listed as the authors. This section of your manuscript can also include information about funding sources.

References- Science Publishing Group uses the numbered citation method for reference formatting, with sequential numbering in the text, and respective ordering in a list at the end of the paper.

The list should contain at least ten references and should be arranged in the order of citation in text. List only one reference per reference number. In the text, each reference number should be enclosed by square brackets. Citations of references may be given simply as “in [1] ...”, or as “in reference [1] ...”. Similarly, it is not necessary to mention the authors of a reference, unless the mention is relevant to the text.

Multiple citations within a single set of brackets should be separated by commas. Where there are three or more sequential citations, they should be given as a range [2,7-9,13].

Disponível em:

<http://www.sciencepublishinggroup.com/journal/guideforauthors.aspx?journalid=21>

