



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA
LEGAL/REDE BIONORTE



Potencial anti-fúngico dos óleos fixos de *Copaifera* sp., *Carapa guianensis* Aubl. e *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd. sobre *Aspergillus nomius* Kurtzman, Horn & Hesseltine e *Aspergillus fumigatus* Fresenius isolados de *Bertholletia excelsa* Humb. & Bompland e avaliação da toxicidade aguda em *Danio rerio*

Jurema do Socorro Azevedo Dias

Macapá- AP

Março/2019

JUREMA DO SOCORRO AZEVEDO DIAS

Potencial anti-fúngico dos óleos fixos de *Copaifera* sp., *Carapa guianensis* Aubl. e *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd. sobre *Aspergillus nomius* Kurtzman, Horn & Hesseltine e *Aspergillus fumigatus* Fresenius isolados de *Bertholletia excelsa* Humb. & Bompland e avaliação da toxicidade aguda em *Danio rerio*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal da Universidade Federal do Amapá, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho

Macapá-AP

Março/2019

Dados Internacionais de Catalogação da Publicação (CIP)**Biblioteca da Embrapa Amapá**

D541p Dias, Jurema do Socorro Azevedo
Potencial anti-fúngico dos óleos fixos de *Copaifera* sp., *Carapa guianensis* Aubl. e *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd. sobre *Aspergillus nomius* Kurtzman, Horn & Hesselstine e *Aspergillus fumigatus* Fresenius isolados de *Bertholletia excelsa* Humb. & Bompland e avaliação da toxicidade aguda em *Danio rerio*/ Jurema do Socorro Azevedo Dias; Orientador, José Carlos Tavares Carvalho. – Macapá, 2019.

216 f .

Tese (Doutorado) - Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal.

1. Andiroba. 2. Copaíba. 3. Cumaru. 4. Planta medicinal. 5. Contaminação fúngica. 6. Controle natural. 7. Zebrafish. I. Carvalho, José Carlos Tavares, orientador. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

CDD (21. ed.) 338.064

JUREMA DO SOCORRO AZEVEDO DIAS

Potencial anti-fúngico dos óleos fixos de *Copaifera* sp., *Carapa guianensis* Aubl. e *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd. sobre *Aspergillus nomius* Kurtzman, Horn & Hesseltine e *Aspergillus fumigatus* Fresenius isolados de *Bertholletia excelsa* Humb. & Bompl. e avaliação da toxicidade aguda em *Danio rerio*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal da Universidade Federal do Amapá, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

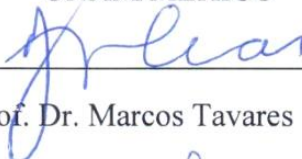
Banca Examinadora:



Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho
Orientador – BIONORTE/UNIFAP

Profa. Dra. Brenda Lorena Sánchez-Ortíz

UNAM/MÉXICO



Prof. Dr. Marcos Tavares Dias
BIONORTE/EMBRAPA-AP

Prof. Dr. Ricardo Adaime da Silva

BIONORTE/EMBRAPA-AP



Prof. Dr. Adilson Lopes Lima

EMBRAPA-AP

Macapá-AP: 22/Março/2019

DEDICO aos meus pais, Oscar da Silva e Oswaldina Azevedo da Silva, *in Memoriam*, os grandes responsáveis pela minha formação pessoal e profissional.

OFEREÇO ao meu esposo Fernando Dias e aos meus filhos

Fernanda, Felipe e Juliana Azevedo Dias

Pelo apoio e compreensão imensuráveis

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todos os seus benefícios.

À Universidade Federal do Amapá, pela oportunidade.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, na pessoa do Dr. Nagib Melén Júnior, por minha liberação para cursar o Doutorado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho, pela orientação, apoio e compreensão em toda a trajetória deste projeto.

Ao Prof. Dr. Irlon Ferreira Maciel, pelas análises fitoquímicas.

À Profa. Dra. Brenda Lorena Sánchez-Ortíz, pela orientação, apoio e compreensão ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Gisele Custódio de Souza, pela orientação quanto ao desenvolvimento das atividades relacionadas às análises histopatológicas com o Zebrafish.

À Profa. Dra. Raphaele Sousa Borges, pela orientação quanto às análises dos dados relacionadas ao Zebrafish.

À Profa. Dra. Anna Eliza Maciel, ao Prof. Dr. Caio Fernandes e ao mestrando Jhonatan, quanto ao apoio dispensado para o preparo das Nanoemulsões.

À Doutoranda Nayara Melo e a Prof. Dra. Beatriz Sá Hiacynth, pelo apoio e companhia ao longo desta caminhada.

À Dra. Gláucia Midorikawa, pelo apoio quanto à análise taxonômica molecular dos isolados fúngicos.

Ao Dr. Adilson Lopes Lima, pelo apoio e orientações quanto às técnicas fitopatológicas.

À Mestre Adriana Bariani, ao Mestre Francisco Pereira, Dr. Antônio Cláudio Carvalho e ao Dr. Gilberto Ken-Iti Yokomizo, pelo apoio quanto às análises estatísticas.

À Dra. Ana Cláudia Lira Guedes, pelo apoio quanto à coleta e extração dos óleos fixos de Andiroba e resina de Copaíba e ao Dr. Marcelino Guedes, pelo apoio quanto à coleta dos ouriços e sementes de castanha-do-Brasil.

E, a todos aqueles que direta ou indiretamente me apoiaram e caminharam comigo ao longo desta trajetória.

Potencial anti-fúngico dos óleos fixos de *Copaifera* sp., *Carapa guianensis* Aubl. e *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd. sobre *Aspergillus nomius* Kurtzman, Horn & Hesseltine e *Aspergillus fumigatus* Fresenius isolados de *Bertholletia excelsa* Humb. & Bompland e avaliação da toxicidade aguda em *Danio rerio*

Jurema do Socorro Azevedo Dias, José Carlos Tavares Carvalho

RESUMO

A crescente demanda por alimentos isentos de resíduos oriundos de defensivos agrícolas tem alterado o comportamento de produtores na busca de novas formas eficientes de produção, com baixo custo e menor agressividade ao meio ambiente. Como fonte de produtos fungicidas tem-se utilizado diversas plantas e seus produtos, dos quais já foram isolados compostos como flavonoides, cumarinas e terpenóides com atividades fungicidas que podem ser utilizados como conservantes naturais em alimentos. Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial anti-fúngico dos óleos fixos de *Carapa guianensis*, *Copaifera* sp. e *Dipteryx odorata* sobre *Aspergillus nomius* e *Aspergillus fumigatus* e a toxicidade aguda em *Danio rerio*. Os óleos fixos obtidos por diferentes técnicas de extração, de amêndoas de *C. guianensis*, diretamente do tronco de *Copaifera* sp. e por prensa hidráulica, de sementes de *D. odorata*, avaliados pela metodologia “Poison food” e testados em diferentes concentrações, em meio de cultura CYA, diferiram entre si quanto à atividade antifúngica contra os patógenos *A. nomius* e *A. fumigatus* isolados de *Bertholletia excelsa*. Observou-se que o óleo de *Copaifera* sp. quando comparado aos óleos de *C. guianensis* e *D. odorata* apresentou maior efeito inibitório sobre *A. nomius* e *A. fumigatus*, inclusive demonstrando maior efeito inibitório, quando comparado à nanoemulsão constituída por este mesmo óleo. Por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM), estabeleceu-se a composição do óleo fixo de *Dipteryx odorata*. Através desta técnica, foram identificados ácidos graxos saturados (20%), ácidos graxos monoinsaturados (55%) e ácidos graxos poliinsaturados (8%), correspondendo a 83% de sua constituição. Dentre estes, 53% foi de ácido oleico, 13% de ácido palmítico, 8% de ácido linoleico, 2% de ácido vacênico e 7% de ácido esteárico. A atividade antimicrobiana de *D. odorata*, assim como acontece com *Copaifera* sp., talvez possa estar relacionada à natureza lipofílica dos óleos resinas, essa lipofilicidade favorece uma interação entre os componentes do óleo e os lipídios da parede e membrana celular fúngica, interferindo em sua permeabilidade, causando mudanças estruturais. Desta forma, verificou-se que o potencial antifúngico dos óleos de *Copaifera* sp. e *D. odorata* apresentaram efeitos fungicida e fungistático, respectivamente. Enquanto que, o óleo de *Carapa guianensis* demonstrou efeito fungicida nas primeiras 24 horas, porém,

perdendo seu efeito ao longo das avaliações. Porém, ao comparar-se a ação anti-fúngica do óleo de *Copaífera* sp. com a ação anti-fúngica de sua nanoemulsão, verificou-se que o óleo nas concentrações de 0,1 µg/ml; 0,5 µg/ml; 1,0 µg/ml; 1,5 µg/ml; 2,0 µg/ml; 4,0 µg/ml; 6,0 µg/ml, apresentou maior porcentagem de inibição do crescimento micelial sobre *A. nomius* (PIC = 60%, nas 24, 48 e 72 h) e sobre *A. fumigatus* (PIC = 100%, nas 24h; 80% nas 48h e 60% nas 72h), do que a nanoemulsão, nas concentrações de 500 µg/mL (26,4% nas 216 h), 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL e 31,2 µg/mL. Embora, tenha-se verificado, que a nanoemulsão na concentração de 500 µg/ml, inibiu a esporulação de *A. nomius*, quando comparada ao controle (meio de cultura sem a nanoemulsão), de acordo com a fotomicrografia eletrônica de varredura (MEV). Verificou-se também, que a ação do óleo de *D. odorata*, foi superior ao efeito do Itraconazol sobre *A. nomius*, enquanto que a ação do óleo igualou-se ao efeito do Itraconazol sobre o crescimento micelial de *A. fumigatus*, nas primeiras 24 h. Quanto à toxicidade do óleo de *D. odorata* em *Danio rerio*, foi possível verificar que o mesmo não causou a morte dos animais. Porém, foi capaz de ocasionar alterações histopatológicas em seus órgãos internos e mudanças comportamentais, após 48 horas de aplicação por via oral (gavage). Verificando-se que os órgãos mais afetados neste estudo histopatológico, foram o intestino, seguido dos rins e do fígado. Portanto, considerando-se os resultados obtidos e a característica química do principal marcador fitoquímico do óleo fixo de *D. odorata*, o ácido oleico, e os demais constituintes, ácido palmítico, ácido linoleico, ácido vacênico e ácido esteárico, pode-se sugerir que, em função das doses, estes compostos possam ter influenciado nos danos histopatológicos causados nos órgãos internos de *D. rerio*, assim como possam ter contribuído através das diferentes concentrações dos óleos, para a inibição *in vitro* do crescimento micelial de *A. nomius* e *A. fumigatus*. Desta forma, com base nos resultados obtidos, foi possível afirmar que a metodologia de Poison Food, foi eficiente em expressar o potencial inibitório dos óleos sobre o crescimento micelial de *A. nomius* e *A. fumigatus*, através do teste anti-fúngico. Assim como, foi possível demonstrar as alterações histopatológicas provocadas pela toxicidade aguda por via oral (gavage), após a aplicação do óleo de *D. odorata*, utilizando-se o modelo *Danio rerio*.

Palavras-Chave: Copaiba; andiroba; cumaru; atividade fungitóxica; alterações histopatológicas; zebrafish.

Anti-fungal potential of the fixed oils of *Copaifera* sp., *Carapa guianensis* Aubl. and *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd. on *Aspergillus nomius* Kurtzman, Horn & Hesseltine and *Aspergillus fumigatus* Fresenius isolated from *Bertholletia excelsa* Humb. & Bompland and evaluation of acute toxicity in *Danio rerio*

Jurema do Socorro Azevedo, José Carlos Tavares Carvalho

ABSTRACT

The growing demand for food free of residues from agricultural pesticides has altered the behavior of producers in search of new efficient forms of production, with low cost and less aggressiveness to the environment. As a source of fungicide products, several plants and their products have been used, of which compounds such as flavonoids, coumarins and terpenoids have already been isolated with fungicidal activities that can be used as natural preservatives in foods. This study aimed to evaluate the antifungal potential of the oils of *Carapa guianensis*, *Copaifera* sp. and *Dipteryx odorata* on *Aspergillus nomius* and *Aspergillus fumigatus* and evaluation of acute toxicity in *Danio rerio*. The fixed oils obtained by different extraction techniques, from *C. guianensis* almonds, directly from the stem of *Copaifera* sp. and by hydraulic press of *D. odorata* seeds, evaluated by the "poison food" methodology and tested in different concentrations, in CYA culture medium, differed among themselves regarding the antifungal activity against pathogens, *A. nomius* and *A. fumigatus* isolates of *Bertholletia excelsa*. It was observed that *Copaifera* sp. when compared to the oils of *C. guianensis* and *D.odorata* presented greater inhibitory effect on *A. nomius* and *A. fumigatus*. Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS), the fixed oil composition of *Dipteryx odorata* was established. Through this technique, saturated fatty acids (20%), monounsaturated fatty acids (55%) and polyunsaturated fatty acids (8%) were identified, corresponding to 83% of their constitution. Among these, 53% was oleic acid, 13% palmitic acid, 8% linoleic acid, 2% vaccenic acid and 7% stearic acid. The antimicrobial activity of *Dipteryx odorata*, as with *Copaifera* sp. may be related to the lipophilic nature of the oleoresins, this lipophilicity favors an interaction between the oil components and the lipids of the fungal cell walls and membranes, interfering in their permeability, causing structural changes. Thus, it was verified that the antifungal potential of *Copaifera* sp. and *D. odorata* presented fungicidal and fungistatic effects, respectively. While the oil of *Carapa guianensis* showed fungicidal effect in the first 24 hours, however, losing its effect throughout the evaluations. However, when comparing the antifungal action of *Copaifera* sp. with the antifungal action of its nanoemulsion, it was verified that the oil in the concentrations of 0.1 µg/ml; 0.5 µg/ml; 1.0 µg/ml; 1.5 µg/ml; 2.0 µg/ml; 4.0 µg/ml; 6.0 µg/ml, showed a

higher percentage of inhibition of mycelial growth on *A. nomius* (PIC = 60%, at 24, 48 and 72 h) and on *A. fumigatus* (PIC = 100% in 24h, 80% in 48h and 60% in 72h), than in nanoemulsion at concentrations of 500 µg / mL (26,4% at 216 h), 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL and 31,2 µg/mL. Although it has been found that nanoemulsion at the concentration of 500 µg/mL inhibited the sporulation of *A. nomius* when compared to the control (culture medium without nanoemulsion) according to the scanning electron photomicrograph (SEM). As for the toxicity of the oil of *D. odorata* in *Danio rerio*, it was possible to verify that it did not cause death of the animals. However, he was able to cause histopathological changes in his internal organs and behavioral changes, after 48 hours of oral application. It was verified that the organs most affected in this histopathological study were the intestine, followed by the kidneys and the liver. Therefore, considering the results obtained and the chemical characterization of the major phytochemical marker of OFDo, oleic acid, and the other constituents, palmitic acid, linoleic acid, vaccinic acid and stearic acid, it may be suggested that, depending on the doses, these compounds may have influenced the histopathological damage caused in the internal organs of *D. rerio*, as well as may have contributed through the different concentrations of the oils, for the *in vitro* inhibition of the mycelial growth of *A. nomius* and *A. fumigatus*. Based on the results obtained, it was possible to affirm that the Poison Food methodology was efficient in expressing the inhibitory potential of the oils on the mycelial growth of *A. nomius* and *A. fumigatus*, through the anti-fungal test. As well as, it was possible to demonstrate the histopathological changes caused by acute oral toxicity (gavage), after the application of *D. odorata* oil, using the *Danio rerio* model.

Keywords: Copaiba; andiroba; cumaru; activity fungitoxic; zebrafish; histopathological changes.

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEORICO

Figura 1	Diagrama sumarizado dos métodos recomendados para a identificação e caracterização de espécies de <i>Aspergillus</i> .	30
Figura 2.1 A	Colônias de <i>A. nomius</i> .	32
Figura 2.1 B	<i>A. flavus var. flavus</i> .	32
Figura 2.2	Esclerócio de <i>A. flavus var. flavus</i> .	32
Figura 2.3	Esclerócio de <i>A. nomius</i> .	32
Figura 2.4	Conidióforos de <i>Aspergillus nomius</i> .	32
Figura 2.5	Fotomicrografia do conídio de <i>A. nomius</i> .	32
Figura 2.6	Fotomicrografia em microscópio eletrônico de um conídio de <i>A. nomius</i> .	32
Figura 3.A-C	Colônias de <i>A. fumigatus</i> em meio de cultura.	33
Figura 3.D-I	Estruturas reprodutivas: cabeças conidiais.	33
Figura 3.J-K	Conídios.	33
Figura 4	Estruturas químicas das Aflatoxinas.	37
Figura 5.a	Inflorescência de <i>Dipteryx odorata</i> .	51
Figura 5.b	Ramo e fruto imaturo de <i>Dipteryx odorata</i>	51
Figura 5.c	Fruto maduro deiscente com única semente de <i>Dipteryx odorata</i>	51
Figura 5.d	Sementes de <i>Dipteryx odorata</i> .	51
Figura 6	<i>Danio rerio</i> .	56

CAPITULO 1

Figura 1	Reserva Extrativista do Rio Cajari-RESEX CAJARI.	79
Figura 2.a	Ponto de amontoa dos ouriços.	80
Figura 2.b	Castanha-da-Amazônia em casca, fora dos ouriços na floresta.	80
Figura 3.a	Coleta de castanhas-da-Amazônia, em área de transição de floresta e cerrado.	80
Figura 3.b	Armazenamento em paiol.	80
Figura 4.a.b	Transporte da castanha-da-Amazônia da floresta (RESEX CAJARI) para o laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amapá.	82
Figura 5.a.b.	Processamento das amêndoas de castanha-da-Amazônia para análise.	82
Figura 5 c.d	Processamento das amêndoas de castanha-da-Amazônia para análise.	83
Figura 6.a.b	Medição da atividade de água das amostras de castanha-da-Amazônia, por leitura direta em medidor de atividade de água portátil.	83
Figura 7	Método por diluição e plaqueamento em superfície.	84
Figura 8	Método por diluição e plaqueamento em superfície.	85
Figura 9a e b	Contagem de colônias, pelo método por diluição e plaqueamento em superfície.	86

CAPITULO 2

Figura 1	Árvore de <i>Dipteryx odorata</i> (cumaru), localizada na Rodovia Macapá-Fazendinha, AP, Brasil.	99
Figura 2	Diagrama de coleta, secagem, extração por prensa hidráulica a frio, transesterificação e análise por CG-MS, do óleo de <i>D. odorata</i> .	100
Figura 3.a	Sistema de quarentena do <i>Danio rerio</i> .	105
Figura 3.b	Sistema de conservação do <i>Danio rerio</i> , utilizado ao longo do experimento.	105

Figura 4.a	Aplicação oral (gavage) das doses do óleo de <i>D. odorata</i> em <i>D. rerio</i> .	107
Figura 4.b	Observação do comportamento de <i>D. rerio</i> , após a aplicação das doses.	107
Figura 5	Preparo das amostras de <i>D. rerio</i> para corte no micrótomo.	108
Figura 5.a	Remoção das nadadeiras.	108
Figura 5.b	Corte longitudinal até a porção posterior da nadadeira dorsal.	108
Figura 5.c	<i>D. rerio</i> em blocos de parafina.	108
Figura 6	Cromatograma (GC-MS) do etil éster derivado de <i>Dipteryx odorata</i> .	110
Figura 7	Compostos identificados no óleo fixo de <i>Dipteryx odorata</i> (Aubl.) Willd.	111
Figura 8.a	Colônia filamentosa de <i>A. nomius</i> em meio CYA.	112
Figura 8.b	Conídios e conidióforos de <i>Aspergillus nomius</i> .	112
Figura 8.c	Esclerócios de <i>A. nomius</i> .	112
Figura 8.3	Esclerócio em forma de bala de <i>A. nomius</i> .	112
Figura 9.a	Colônia pulverulenta de <i>A. fumigatus</i> em meio CYA.	113
Figura 9.b	Conídios e conidióforos com 48h.	113
Figura 9.c	Radiografia do tórax	113
Figura 10	Efeito do óleo de <i>Dipteryx odorata</i> (OFDo) sobre o crescimento micelial A) <i>A. nomius</i> e B) <i>A. fumigatus</i> .	117
Figura 11.A	Efeitos do óleo de <i>Dipteryx odorata</i> (OFDo) sobre o crescimento micelial de <i>A. nomius</i> , Curso temporal da inibição do crescimento micelial às 24, 48, 72, 96, 120, 144 horas.	118
Figura 11.B	Efeitos do óleo de <i>Dipteryx odorata</i> (OFDo), na concentração de 100 µg/mL, expresso através da utilização do meio de cultura BDA em relação aos meios CYA e <i>B. excelsa</i> , com base na área sob a curva de inibição do crescimento micelial de <i>A. nomius</i> .	118
Figura 12	Efeitos do óleo de <i>Dipteryx odorata</i> (OFDo) sobre o crescimento micelial de <i>A. fumigatus</i> , na concentração de 1000 µg/mL, expresso no meio de <i>B. excelsa</i> em relação aos meios CYA e BDA. Curso temporal da inibição do crescimento micelial às 24, 48, 72, 96, 120, 144 horas.	119
Figura 13	Alterações histopatológicas no fígado, intestino e rins, após tratamento por via oral (gavage) de <i>Danio rerio</i> com o óleo de <i>Dipteryx odorata</i> e controles.	122
Figura 14	Alterações histopatológicas no fígado de zebrafish.	126
Figura 15	Alterações histopatológicas no intestino de zebrafish.	128
Figura 16	Alterações histopatológicas dos rins de zebrafish	131
CAPITULO 3		
Figura 1	Distribuição do tamanho da partícula da nanoemulsão.	152
Figura 2	Efeito inibitório do óleo de <i>Copaifera</i> sp. sobre <i>A. nomius</i> .	156
Figura 3	Efeito inibitório do óleo resina de <i>Copaifera</i> sp. após 24 h de inoculação, sobre o crescimento micelial de <i>A. nomius</i> .	157
Figura 4	Efeito inibitório do óleo resina de <i>Copaifera</i> sp., após 48 h de inoculação, sobre <i>A. nomius</i> .	157
Figura 5	Efeito inibitório do óleo resina de <i>Copaifera</i> sp., após 72h de inoculação, sobre <i>A. nomius</i> .	158
Figura 6	Efeito inibitório do óleo resina de <i>Copaifera</i> sp. sobre o crescimento micelial de <i>A. fumigatus</i> ao longo de 72 h de inoculação.	159
Figura 7	Efeito inibitório do óleo resina de <i>Copaifera</i> sp. sobre o crescimento micelial de <i>A. fumigatus</i> , após 24 horas de inoculação.	160

Figura 8	Efeito inibitório do óleo resina de <i>Copaifera</i> sp. sobre <i>A. fumigatus</i> , após 48h de inoculação.	160
Figura 9	Efeito inibitório do óleo resina de <i>Copaifera</i> sp., sobre <i>A. fumigatus</i> , após 72h de inoculação.	161
Figura 10	Efeito inibitório do óleo de <i>Copaifera</i> sp. sobre <i>A. nomius</i> .	162
Figura 11	Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo resina de <i>Copaifera</i> sp. sobre <i>A. nomius</i> , após 24h de inoculação.	162
Figura 12	Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo de <i>Copaifera</i> sp. sobre <i>A. nomius</i> , após 48h de inoculação.	163
Figura 13	Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo resina de <i>Copaifera</i> sp. sobre <i>A. nomius</i> , após 72h de inoculação.	163
Figura 14	Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo resina de <i>Copaifera</i> sp. sobre <i>A. nomius</i> , após 96 h de inoculação.	164
Figura 15	Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo resina de <i>Copaifera</i> sp. sobre <i>A. nomius</i> , após 120h de inoculação.	164
Figura 16	Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo resina de <i>Copaifera</i> sp. sobre <i>A. nomius</i> , após 144h de inoculação.	165
Figura 17	Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo de <i>Copaifera</i> sp. sobre <i>A. nomius</i> , após 168h de inoculação.	165
Figura 18	Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo resina de <i>Copaifera</i> sp. sobre <i>A. nomius</i> , após 216h de inoculação.	166
Figura 19 A e B	Fotomicrografia Eletrônica de Varredura (MEV) do efeito inibitório da nanoemulsão do óleo resina de <i>Copaifera</i> sp. sobre o crescimento micelial de <i>A. nomius</i> . A. Colônia fúngica sem a nanoemulsão do óleo de <i>Copaifera</i> sp.; B. Colônia fúngica com Tween 80.	166
Figura 19 C	C. Colônia fúngica sob ação da nanoemulsão do óleo de <i>Copaifera</i> sp. sobre <i>A. nomius</i> na concentração de 500 µg/mL, apresentando somente crescimento vegetativo e sem esporulação.	167
Figura 20	Efeito inibitório óleo resina de <i>Copaifera</i> sp. sobre <i>A. fumigatus</i> .	167
Figura 21	Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo de <i>Copaifera</i> sp. sobre <i>A. fumigatus</i> , após 24h de inoculação.	168
Figura 22	Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo de <i>Copaifera</i> sp. sobre <i>A. fumigatus</i> , após 48h de inoculação.	168
Figura 23	Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo de <i>Copaifera</i> sp. sobre <i>A. fumigatus</i> , após 72h de inoculação.	169
Figura 24	Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo resina de <i>Copaifera</i> sp. sobre <i>A. fumigatus</i> , após 96 h de inoculação.	169
Figura 25	Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo resina de <i>Copaifera</i> sp. sobre <i>A. fumigatus</i> , após 120 h de inoculação.	170
Figura 26	Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo resina de <i>Copaifera</i> sp. sobre <i>A. fumigatus</i> , após 144h de inoculação.	170
Figura 27	. Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo resina de <i>Copaifera</i> sp. sobre <i>fumigatus</i> , após 168h de inoculação.	171
Figura 28	Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo resina de <i>Copaifera</i> sp. sobre <i>A. fumigatus</i> , após 216 h de inoculação.	171

CAPITULO 4

Figura 1	Efeito inibitório do óleo fixo de <i>C. guianensis</i> sp. sobre <i>A.nomius</i> .	188
Figura 2	Efeito inibitório do óleo fixo de <i>C. guianensis</i> sobre <i>A. nomius</i> após 24h de inoculação.	189
Figura 3	Efeito inibitório das diferentes concentrações do óleo fixo de <i>C. guianensis</i> sobre <i>A. nomius</i> após 48 horas de inoculação.	190
Figura 4	Efeito inibitório do óleo fixo de <i>Carapa guianensis</i> sobre <i>A. nomius</i> após 72h de inoculação.	190
Figura 5	Efeito inibitório do óleo fixo de <i>Carapa guianensis</i> sobre <i>A. fumigatus</i> .	191
Figura 6	Efeito inibitório do óleo fixo de <i>Carapa guianensis</i> (95%) sobre <i>A. fumigatus</i> , após 24h de incubação.	192
Figura 7	Efeito inibitório do óleo fixo de <i>Carapa guianensis</i> sobre <i>A. fumigatus</i> , após 48h de incubação.	193
Figura 8	Efeito inibitório do óleo fixo de <i>Carapa guianensis</i> sobre <i>A. fumigatus</i> , após 72h de inoculação.	193

CAPITULO 5

Figura 1	Compostos com atividades anti-inflamatórias isolados de <i>Copaifera</i> sp.	205
Figura 2	Compostos com atividades biológicas isolados de <i>Carapa guianensis</i> Aubl.	208

LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1	Frequência e número de linhagens de <i>Aspergillus</i> isolada de castanha-da-Amazônia, proveniente de três Estados da região amazônica brasileira, com base na análise molecular.	26
Tabela 2	Espécies fungicas isoladas da castanha-da-Amazônia e seus metabólitos, assim como suas respectivas fontes de referências.	27
Tabela 3	Primers e temperaturas de anelamento usados para amplificação e sequenciamento de espécies de <i>Aspergillus</i> .	29
Tabela 4	Medidas preventivas e corretivas para controle de micotoxinas.	35
Tabela 5	Composição química do óleo resina e óleo essencial de <i>Copaifera multijuga</i> Hayne.	48

CAPITULO 1

Tabela 1	Locais e pontos de coleta de amostragem de castanha-da-Amazônia na Reserva Extrativista rio Cajari, no Sul do Amapá.	81
Tabela 2	Valores médios das variáveis físicas e microbiológicas.	87
Tabela 3	Valores médios da atividade das aflatoxinas ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) nas amêndoas de castanha-da-Amazônia armazenadas por 480 dias.	88

CAPITULO 2

Tabela 1	Composição dos ácidos graxos presentes nas sementes de <i>Dipteryx odorata</i> .	110
Tabela 2	Identificação, origem, taxonomia morfológica de <i>A. nomius</i> e <i>A. fumigatus</i> .	114
Tabela 3	Caracterização dos isolados fúngicos quanto à produção de aflatoxinas.	114
Tabela 4	Alterações comportamentais após tratamento com diferentes doses do óleo fixo de <i>Dipteryx odorata</i> e grupo controle sobre zebrafish em diferentes tempos de observação.	121
Tabela 5	Escala descritiva estabelecida de acordo com os Índices de Alterações Histopatológicas encontradas no Fígado, Intestino e Rins, após o teste de toxicidade aguda em <i>Danio rerio</i> .	123
Tabela 6	Análise de variância realizada com base nas diferentes doses aplicadas sobre os três órgãos avaliados em <i>Danio rerio</i> .	123
Tabela 7	Porcentagem de alterações histopatológicas por estágio, em função das diferentes dosagens do óleo de <i>Dipteryx odorata</i> em <i>Danio rerio</i> .	124
Tabela 8	Alterações histopatológicas consideradas para análise do fígado de zebrafish tratado com diferentes doses e concentrações do óleo fixo de <i>Dipteryx odorata</i> .	125
Tabela 9	Alterações histopatológicas consideradas para análise do intestino de zebrafish tratado com diferentes doses e concentrações do óleo fixo de <i>Dipteryx odorata</i> .	127
Tabela 10	Alterações histopatológicas consideradas para análise dos rins de zebrafish tratado com diferentes doses e concentrações do óleo fixo de <i>Dipteryx odorata</i> .	130

CAPITULO 3

Tabela 1	Determinação da diluição, do tamanho da gotícula e Índice de	152
----------	--	-----

	Polidispersão (pdi) da nanoemulsão preparada com o óleo resina de <i>Copaifera</i> sp. e surfactante hidrofílico	
Tabela 2	Identificação, origem, taxonomia morfológica e molecular, Análise BLASTn (rDNA ITS), cobertura, E valor, Máxima de identidade, Acesso ao NCBI.	154
Tabela 3	Caracterização dos isolados fúngicos quanto à produção de aflatoxinas.	155
CAPITULO 4		
Tabela 1	Identificação, origem, taxonomia morfológica e molecular de <i>A. nomius</i> e <i>A. fumigatus</i> .	187
Tabela 2	Caracterização dos isolados fúngicos <i>A. nomius</i> e <i>A. fumigatus</i> quanto à produção de aflatoxinas.	188

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

CYA	Meio de Czapeck
CG/EM	Cromatografia a gas acoplado ao massas
RESEX-Cajari	Reserva Extrativista do Rio Cajari
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
ITS	Internal Transcribed Spacer
BLAST2GO	Basic Local Alignment Search Tool
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
HPLC – UV	High Performance Liquid Chromatography Ultraviolet
APA	Área de Proteção Ambiental
SISGEN	Sistema de Gestão do Patrimônio Genético
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
ICMBIO	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
W/O	Nanoemulsão em água e óleo
O/W	Nanoemulsão em óleo e água
PIC	Porcentagem de Inibição do Crescimento Micelial
DMSO	Dimetilsulfóxido
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
VMA	Valor Médio de Avaliação
IAH	Índice de Alterações Histológicas
ANOVA	Análise de Variância
BDA	Batata Dextrose Agar
ELISA	Enzyme Liked Immuno Sorbent Assay

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
Lista de figuras	x
Lista de Tabelas	xiv
Lista de Abreviaturas e símbolos	xvi
1. Introdução geral	22
2. Referencial Teórico	25
2.1. A castanha-da-Amazônia (<i>Bertholletia excelsa</i> Humbl. & Bonpland)	25
2.2. Aspectos fitossanitários na produção extrativista da Castanha-da-Amazônia	25
2.3. Espécies fúngicas e a produção de micotoxinas associadas à castanha-da-Amazônia	25
2.4. Filogenia, identificação e nomenclatura do gênero <i>Aspergillus</i>	28
2.5. <i>Aspergillus flavus</i>	31
2.6. <i>Aspergillus nomius</i>	31
2.7. <i>Aspergillus fumigatus</i>	33
2.8. Micotoxinas	34
2.8.1. Estratégias de controle de micotoxinas	35
2.9. Aflatoxinas	36
2.10. Meios usados para caracterização morfológica de espécies de <i>Aspergillus</i>	38
2.11. Esclerócios	39
2.12. <i>Carapa guianensis</i> Aubl.	39
2.12.1. Botânica	39
2.12.2. Distribuição geográfica	40
2.12.3. Uso popular	40
2.12.4. Composição química e atividade biológica de <i>Carapa guianensis</i>	40
2.12.5. Atividade biológica de <i>Carapa guianensis</i>	42
2.12.6. Toxicidade do óleo de <i>Carapa guianensis</i> Aubl.	42
2.13. <i>Copaifera</i> sp.	42
2.13.1. Botânica	42
2.13.2. Distribuição geográfica	43
2.13.3. O óleo resina de <i>Copaifera</i> spp.	44
2.13.4. Composição química de <i>Copaifera</i> spp.	45
2.13.5. Uso medicinal de <i>Copaifera</i> sp.	46
2.13.6. Atividades biológicas com o óleo resina <i>in natura</i> de <i>Copaifera</i> spp.	48
2.13.7. Mecanismos de ação de <i>Copaifera</i> spp.	50
2.13.8. Fungitoxicidade do óleo resina de <i>Copaifera</i> spp. no controle de fitopatógeno	50
2.14. <i>Dipteryx odorata</i> (Aubl.) Willd.	51
2.14.1. Classificação taxonômica	51
2.14.2. Botânica	52
2.14.3. Atividades antifúngica do óleo <i>in natura</i> de <i>Dipteryx odorata</i> no controle <i>in vitro</i> de <i>Aspergillus nomius</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i>	54
2.14.4. Farmacológica	54
2.14.5. Caracterização química de <i>Dipteryx odorata</i>	54
2.15. <i>Danio rerio</i>	56
2.15.1. Biologia	56
2.15.2. Zebrafish como organismo modelo	56
2.15.3. Zebrafish em estudos de toxicidade	58
2.16. Nanoemulsão como forma de transporte na aplicação de óleos fixos no controle <i>in vitro</i> de <i>A. nomius</i> e <i>A. fumigatus</i>	58
3.REFERÊNCIAS	60

4. PROBLEMAS	72
5. HIPÓTESES	72
6. OBJETIVOS	72
6.1. OBJETIVO GERAL	72
6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	72
7. JUSTIFICATIVA	73
CAPÍTULO 1 - Pontos críticos de contaminação em <i>Bertholletia excelsa</i> Bonpland, 1808 por fungos potencialmente aflatoxigênicos na Reserva Extrativista do Rio Cajari-AP	74
RESUMO	75
ABSTRACT	75
1. INTRODUÇÃO	77
2. MATERIAL E MÉTODOS	78
2.1. Área de Coleta	78
2.2. Coleta de castanha-da-Amazônia	79
2.3. Preparo das amostras em laboratório para análises	82
2.4. Diluição em placas das amostras de castanha-da-Amazônia em meio <i>Aspergillus flavus</i> e <i>A. parasiticus</i> Agar (AFPA)	84
2.4.1. Leitura	85
3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	86
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
5. CONCLUSÃO	91
6. REFERÊNCIAS	91
CAPÍTULO 2 - Potencial anti-fúngico do óleo fixo de <i>Dipteryx odorata</i> (Aubl.) Willd., Fabaceae, sobre <i>Aspergillus nomius</i> Kurtzman, Horn & Hesseltine e <i>Aspergillus fumigatus</i> Fresenius isolados de <i>Bertholletia excelsa</i> Humbl. & Bonpland e toxicidade aguda do óleo de <i>D. odorata</i> em <i>Danio rerio</i> .	94
RESUMO	95
ABSTRACT	97
1. INTRODUÇÃO	98
2. MATERIAL E MÉTODOS	99
2.1. Experimento 1: Potencial antifúngico do óleo de <i>Dipteryx odorata</i> sobre <i>A. nomius</i> e <i>A. fumigatus</i>	99
2.1.1. Material Botânico de <i>Dipteryx odorata</i>	99
2.1.2. Coleta e obtenção do óleo de <i>Dipteryx odorata</i> (Aubl.) Willd.	100
2.1.3. Transesterificação do óleo de <i>Dipteryx odorata</i> para análise por cromatografia à gás acoplada ao espectrômetro de massa	101
2.1.4. Isolamento das espécies fúngicas <i>A. nomius</i> e <i>A. fumigatus</i> isolados de <i>B. excelsa</i>	101
2.1.5. Extração do DNA genômico dos fungos <i>Aspergillus nomius</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i>	102
2.1.6. Identidade taxonômica molecular dos fungos <i>Aspergillus nomius</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i>	102
2.1.7. Caracterização dos isolados fúngicos quanto à produção de aflatoxinas	102
2.1.8. Avaliação do potencial antifúngico in vitro do óleo de <i>Dipteryx odorata</i> sobre <i>A. nomius</i> e <i>A. fumigatus</i>	104
2.1.9. Análise estatística	104
2.2. Experimento 2: Teste de toxicidade aguda do óleo de <i>Dipteryx odorata</i> sobre Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	105
2.2.1. Animais experimentais	105
2.2.2. Observação de <i>Danio rerio</i> inicialmente em quarentena	105
2.2.3. Avaliação dos parâmetros comportamentais de <i>Danio rerio</i>	106

2.2.4. Monitoramento da mortalidade	107
2.2.5. Avaliação dos parâmetros histopatológicos	107
2.2.6. Análise histopatológica	108
2.2.7. Análise estatística	109
3.RESULTADOS	109
3.1. Obtenção do óleo de <i>Dipteryx odorata</i> (Aubl.) Willd.	109
3.2. Transesterificação do óleo de <i>Dipteryx odorata</i> para análise por cromatografia à gas acoplada ao espectrômetro de massa	109
3.3. Caracterização através da taxonomia morfológica, molecular, sequenciamento e produção de metabólitos secundários das espécies <i>Aspergillus nomius</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i>	111
3.3.1. Taxonomia morfológica de <i>A. nomius</i>	112
3.3.2. Taxonomia morfológica de <i>A. fumigatus</i>	113
3.3.3. Taxonomia molecular das espécies <i>Aspergillus nomius</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i>	113
3.4. Potencial antifúngico do óleo de <i>Dipteryx odorata</i> no controle <i>in vitro</i> de <i>A. nomius</i> e <i>A. fumigatus</i> .	116
3.5. Avaliação da toxicidade aguda do óleo de <i>Dipteryx odorata</i> no modelo <i>Danio rerio</i>	120
4. DISCUSSÃO	132
5. CONCLUSÕES	137
6. REFERÊNCIAS	138
CAPÍTULO 3 - Potencial anti-fúngico do óleo resina e nanoemulsão de <i>Copaifera</i> sp. sobre <i>Aspergillus nomius</i> Kurtzman, Horn & Hesseltine e <i>Aspergillus fumigatus</i> Fresenius isolados de <i>Bertholletia excelsa</i> Humbl. & Bompland	143
RESUMO	144
ABSTRACT	145
1. INTRODUÇÃO	145
2. MATERIAL E MÉTODOS	148
2.1. Coleta das castanhas-da-Amazônia	148
2.2. Isolamento fúngico	148
2.3. Extração do DNA genômico fúngico	148
2.4. Identidade taxonômica das espécies fúngicas	148
2.5. Caracterização de isolados do gênero <i>Aspergillus</i> quanto a produção de aflatoxinas.	149
2.6. Coleta e caracterização do óleo de <i>Copaifera</i> sp.	149
2.7. Experimento 1: Potencial fungitóxico do óleo de <i>Copaifera</i> sp. sobre <i>Aspergillus nomius</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i>	150
2.8. Avaliação dos tratamentos e análise dos dados	150
2.9. Análise Estatística	150
2.10. Experimento 2: Potencial anti-fúngico da nanoemulsão de <i>Copaifera</i> sp. sobre <i>A. nomius</i> e <i>A. fumigatus</i> .	151
2.10.1. Obtenção da nanoemulsão do óleo resina de <i>Copaifera</i> sp.	151
2.10.2. Preparo da Nanoemulsão de <i>Copaifera</i> sp.	151
2.10.3. Avaliação da Estabilidade da Nanoemulsão de <i>Copaifera</i> sp.	151
2.10.4. Tamanho da gotícula e Polidispersão	151
2.10.5. Potencial fungitóxico da nanoemulsão de <i>Copaifera</i> sp. sobre <i>Aspergillus nomius</i> e <i>A. fumigatus</i>	153
2.11. Análise estatística	154
3. Resultados	154
3.1. Taxonomia morfológica e molecular das espécies <i>Aspergillus nomius</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i>	154
3.2. Caracterização dos isolados fúngicos quanto à produção de aflatoxinas.	155

3.3. Experimento 1: Avaliação do potencial fungitóxico do óleo resina de <i>Copaifera</i> sp. no controle <i>in vitro</i> de <i>Aspergillus nomius</i> e <i>A. fumigatus</i>	155
3.3.1. Experimento 1: Avaliação do potencial fungitóxico do óleo resina de <i>Copaifera</i> sp. no controle <i>in vitro</i> de <i>Aspergillus nomius</i> após 24 h, 48 h e 72 h, de avaliação.	155
3.3.2. Experimento 2: Avaliação do potencial fungitóxico do óleo resina de <i>Copaifera</i> sp. no controle <i>in vitro</i> de <i>A. fumigatus</i> após 24 h, 48 h e 72 h, de avaliação.	158
3.4. Avaliação do potencial fungitóxico <i>in vitro</i> da nanoemulsão constituída pelo óleo resina de <i>Copaifera</i> sp. no controle de <i>Aspergillus nomius</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i>	161
3.4.1 Experimento 1: Avaliação do potencial fungitóxico <i>in vitro</i> da nanoemulsão constituída pelo óleo resina de <i>Copaifera</i> sp. no controle de <i>Aspergillus nomius</i> .	161
3.4.2. Experimento 2: Avaliação do potencial fungitóxico <i>in vitro</i> da nanoemulsão constituída de óleo resina de <i>Copaifera</i> sp. no controle de <i>Aspergillus fumigatus</i> .	167
4. DISCUSSÃO	172
5. CONCLUSÃO	174
6.REFERÊNCIAS	175
CAPÍTULO 4 - Potencial anti-fúngico do óleo fixo de <i>Carapa guianensis</i> Aubl. sobre <i>Aspergillus nomius</i> Kurtzman, Horn & Hesseltine e <i>Aspergillus fumigatus</i> Fresenius isolados de <i>Bertholletia excelsa</i> Humbl. & Bompland	180
RESUMO	181
ABSTRACT	182
1. INTRODUÇÃO	182
2. MATERIAL E MÉTODOS	184
2.1. Coleta das amostras de castanha-do-Brasil	184
2.2. Isolamento das espécies fúngicas	184
2.3. Extração do DNA genômico	184
2.4. Identidade taxonômica	184
2.5. Caracterização dos isolados fúngicos quanto à produção de aflatoxinas.	185
2.6. Material Botânico de <i>Carapa guianensis</i> Aubl.	185
2.6.1. Coleta e obtenção do óleo de <i>Carapa guianensis</i>	185
2.7. Atividade antifúngica <i>in vitro</i> do óleo fixo de <i>Carapa guianensis</i> no controle de <i>Aspergillus nomius</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i>	186
3. RESULTADOS	187
3.1 Taxonomia molecular das espécies <i>Aspergillus nomius</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i>	187
3.2. Avaliação do potencial fungitóxico <i>in vitro</i> do óleo fixo de <i>Carapa guianensis</i> no controle de <i>Aspergillus nomius</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i>	188
3.2.1. Experimento 1. Avaliação do potencial fungitóxico <i>in vitro</i> de <i>C. guianensis</i> no controle de <i>Aspergillus nomius</i>	188
3.2.2. Experimento 2: Avaliação do potencial fungitóxico <i>in vitro</i> do óleo de andiroba no controle de <i>Aspergillus fumigatus</i>	191
4. DISCUSSÃO	194
5. CONCLUSÃO	196
6. REFERÊNCIAS	196
CAPÍTULO 5 - <i>Copaifera</i> sp. e <i>Carapa guianensis</i> Aubl.: fitoterápicos anti-inflamatórios para uso tópico	199
<i>Copaifera</i> sp	200
ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E MECANISMOS DE AÇÃO DO ÓLEO DE COPAÍBA E COMPOSTOS ISOLADOS	201
FORMULAÇÕES E APLICAÇÕES TÓPICAS	204
<i>Carapa guianensis</i> Aubl.	206
ATIVIDADE BIOLÓGICA E MECANISMOS DE AÇÃO DO ÓLEO DE <i>Carapa guianensis</i> E COMPOSTOS ISOLADOS	207
REFERÊNCIAS	209

CONCLUSÕES
CONSIDERAÇÕES FINAIS

213
214

1.INTRODUÇÃO

As interações entre as plantas e os fungos patogênicos são de extremo interesse para a humanidade, uma vez que grande parte da economia mundial tem por base a utilização de espécies vegetais, as quais podem sofrer sérios danos em virtude do ataque de patógenos. A devastação de uma espécie cultivada devido à ação de fungos, pode ter como última consequência não somente a fome das pessoas que dependem diretamente do cultivo desta espécie, como também envolver a mudança de costumes de toda uma nação. Cerca de dois terços das espécies conhecidas de fungos estabelecem íntimas relações com outros organismos vivos, em relações parasíticas, comensalísticas ou mutualistas. Os fungos exercem uma grande influência na evolução de seus hospedeiros, adaptando-se por vezes às mudanças do genótipo hospedeiro, aumentando as situações de íntima coevolução (PYROZINSKI; HAWKSWORTH, 1988).

Os fungos patogênicos incluem um grande e heterogêneo grupo de organismos que ocupam posições de grande relevância tanto na agricultura como nas populações naturais. Eles demonstram uma enorme diversidade no modo pelo qual interagem com seus hospedeiros, sendo que enquanto alguns podem viver por longos períodos em tecidos mortos ou saprofiticamente no solo, outros dependem completamente das células vivas (BURDON; SILK, 1997).

A castanha-da-Amazônia (*Bertholletia excelsa*) pertencente à família Lecythidaceae, possui participação significativa na geração de divisas para a região amazônica, de forma acentuada na área de alimentos (amêndoas), através de sua exportação para os mercados internos e externos. Sua produção extrativista é considerada orgânica, uma vez que não são utilizados insumos químicos para o seu manejo (FREITAS-SILVA; VENÂNCIO, 2011).

Espécies de *Aspergillus*, reconhecidas como oportunistas, oriundas de solos, contaminam sementes em sua pré e pós colheita, ocasionando sua deteriorização e apodrecimento, trazendo como consequências prejuízos ao setor agrícola e florestal. O consumo de alimentos contaminados tem sido negligenciado, havendo a necessidade de maiores estudos, principalmente sobre os fungos contaminantes de sementes. Estes fungos também são conhecidos como produtores de micotoxinas, metabólitos secundários cancerígenos, prejudiciais à saúde humana e animal.

Espécies de *Aspergillus* foram identificadas em materiais de castanha-da-Amazônia, provenientes de cooperativas dos estados da região amazônica como, Amazonas, Acre e Amapá. Quando se considerou o total de cada espécie, proveniente das três áreas

analisadas, verificou-se que a espécie aflatoxigênica *Aspergillus nomius*, foi prevalescente no Estado do Amapá (MIDORIKAWA et al., 2014).

Atualmente, em todos os lugares do mundo onde se pratica uma agricultura econômica, a intervenção para o controle de doenças de plantas é largamente realizada através de pesticidas (KIMATI et al, 1997), o qual em curto prazo, apresenta um efeito positivo para o produtor. Porém, a longo prazo, promove consequências irreversíveis à saúde da população e ao meio ambiente, em função de seus resíduos.

Um dos enfoques da agricultura alternativa é o controle alternativo de doenças de plantas, o qual inclui o controle biológico e a indução de resistência em plantas, não sendo incluídos nesse contexto, o controle químico e o melhoramento genético (BETTIOL, 1991).

Agentes bióticos ou abióticos como, papila, lignificação e tilose ou bioquímicos como o acúmulo de fitoalexinas e de proteínas relacionadas à patogênese, a exemplo da Beta-1,3 glucanase e quitinase, atuam como degradadoras da parede celular dos fungos e têm sido utilizadas pela indústria de defensivos (ZADOCKS, 1997).

A diversidade biológica dos biomas brasileiros, gera novos conhecimentos e inovação tecnológica, por ser uma fantástica alternativa como matéria-prima *in natura* para a descoberta de novos fungicidas, a exemplo de óleos constituídos por vários compostos químicos, como alcalóides, terpenos, lignanas, flavonoides e cumarinas, utilizados no controle de patógenos. Porém, muitas referências têm sido citadas quanto ao uso de óleos essenciais e extratos vegetais, em testes anti-fúngicos na literatura. Embora, pouco conhecimento se tenha à respeito da aplicação de óleos fixos oriundos de vegetais, havendo a necessidade de maiores estudos, quanto à sua composição química, toxicidade e utilização como forma de controle de fungos fitopatogênicos.

Neste sentido, abordagens de estudos toxicológicos com zebrafish são variadas, podendo ser do tipo comportamental, histopatológica entre outras, utilizando não apenas agentes farmacológicos, como também agentes ambientais (BAMBINO; CHU, 2017). Este modelo tem como vantagens a redução de custos, quanto à sua aquisição e manejo, motivo pelo qual seu uso tem sido sugerido em testes pré-clínicos e será utilizado neste estudo.

Assim, este estudo objetiva: 1. Identificar as espécies fúngicas contaminantes da castanha-da-Amazônia, coletadas em áreas de castanhais localizados na RESEX Cajari, através da morfologia e análise molecular; 2. Identificar os componentes químicos dos óleos em estudo; 3. Testar a fungitoxicidade *in vitro* dos óleos de *Copaifera sp.*, *Carapa guianensis* e *Dipteryx odorata* no controle de *Aspergillus nomius* e *Aspergillus fumigatus*; 4. Testar a fungitoxicidade da nanoemulsão do óleo resina de *Copaifera sp.* e o óleo resina sobre as espécies fúngicas *Aspergillus nomius* e *A. fumigatus*; 5. Testar a toxicidade aguda do óleo de

Dipteryx odorata no modelo Zebrafish, visando oferecer subsídios ao controle alternativo de fungos filamentosos nas áreas de fármaco, agrícola e alimentos. O presente estudo encontra-se estruturado na forma de artigos, de acordo com as normas do Programa de Pós-graduação da Rede Bionorte. Os capítulos que o compõe, são:

Capítulo 1. Pontos críticos de contaminação em *Bertholletia excelsa* Humbl. & Bonpland, 1808, por fungos potencialmente aflatoxigênicos na Reserva Extrativista do Rio Cajari-AP.

Capítulo 2. Potencial anti-fúngico do óleo fixo de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd., Fabaceae, sobre *Aspergillus nomius* Kurtzman, Horn & Hesseltine e *Aspergillus fumigatus* Fresenius isolados de *Bertholletia excelsa* Humbl. & Bonpland e toxicidade aguda do óleo de *D. odorata* em *Danio rerio*.

Capítulo 3. Potencial anti-fúngico do óleo resina e nanoemulsão de *Copaifera* sp. em *Aspergillus nomius* Kurtzman, Horn & Hesseltine e *Aspergillus fumigatus* Fresenius isolados de *Bertholletia excelsa* Humbl. & Bonpland.

Capítulo 4. Potencial anti-fúngico do óleo fixo de *Carapa guianensis* Aubl. sobre *Aspergillus nomius* Kurtzman, Horn & Hesseltine e *Aspergillus fumigatus* Fresenius isolados de *Bertholletia excelsa* Humbl. & Bonpland.

Capítulo 5. *Copaifera* sp. e *Carapa guianensis* Aubl.: fitoterápicos anti-inflamatórios para uso tópico.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. A castanha-da-Amazônia (*Bertholletia excelsa* Humbl. & Bonpland)

A castanha-da-Amazônia é uma espécie arbórea pertencente à classe Magnoliopsida, subclasse Dilleneida, ordem Lecythidales, família Lecythidaceae e única representante em seu gênero (MORI; PRANCE, 1987). Sua amêndoa é constituída principalmente por ácidos graxos insaturados e proteínas de alto valor biológico. É rica em todos os aminoácidos essenciais, principalmente a metionina e a cisteína. Também, é uma importante fonte de fibras, vitaminas e minerais, entre eles a tiamina, niacina, vitamina E, vitamina B6, selênio (Se), magnésio (Mg), fósforo (P), cálcio (Ca), ferro (Fe), potássio (K), zinco (Zn) e cobre (Cu), favorecendo assim, uma única diversidade de espécies fúngicas, diferente daquelas encontradas em áreas cultivadas (PACHECO; SCUSSEL, 2006; TANIWAKI et al., 2017).

2.2. Aspectos fitossanitários na produção extrativista da Castanha-da-Amazônia

Estudos sobre a presença de fungos e aflatoxinas em castanha-da-Amazônia foram desenvolvidos por Arrus et al. (2005); Baquião et al. (2012, 2013), Calderari et al. (2013), Gonçalves et al. (2012), Iamanaka et al. (2014) e Massi et al. (2014). Todos esses estudos, têm mostrado elevada ocorrência de fungos do gênero *Aspergillus* seção *Flavi*, em amostras de castanha-da-Amazônia. Entretanto, poucos estudos têm sido desenvolvidos, permitindo uma rastreabilidade da microbiota presente em castanha-da-Amazônia, da floresta até o consumidor, considerando-se os diferentes ambientes, nos quais é armazenada ou comercializada.

Neste sentido, Taniwaki et al. (2017) avaliaram a microbiota da castanha-da-Amazônia, desde a floresta amazônica (Estados do Pará e Amazonas) até o consumidor (Estado de São Paulo), usando métodos tradicionais, técnicas moleculares e a produção de extrólitos produzidos pelos isolados, como ferramentas para a identificação das espécies. Além disso, a produção de micotoxinas e de outros metabólitos produzidos, também foram analisados na identificação de espécies de *Aspergillus* seção *Flavi* e *Aspergillus* seção *Nigri*.

2.3. Espécies fúngicas e a produção de micotoxinas associadas à castanha-da-Amazônia

Freire et al. (2000) com base na análise de amostras de castanha-da-Amazônia, identificaram espécies de fungos filamentosos, sendo as mais comuns *Aspergillus flavus*, *Penicillium glabrum*, *Cunninghamella elegans*, *Penicillium citrinum*, *Rhizopus oryzae*, *A. niger* e *Fusarium oxysporum*. Bayman et al. (2002) relataram que *Rhizopus* foi a espécie fúngica mais prevalente, seguida de *Aspergillus flavus*, *Penicillium spp.*, *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans* e *A. fumigatus*, em amostras de castanha-da-

Amazônia, adquirida na Califórnia. Outros autores identificaram as espécies *Aspergillus flavus*, *A. nomius*, *A. pseudonomius*, *A. niger*, *A. tamarii*, *Penicillium glabrum*, *P. citrinum*, *Penicillium spp.*, *Rhizopus spp.*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium spp.*, *Phialemonium spp.*, *Phaeoacremonium spp* (CALDERARI et al., 2013; GONÇALVES et al., 2012; OLSEN et al., 2008; REIS et al., 2012) e *Aspergillus bertholletius*, uma nova espécie também descrita, pertencente a *Aspergillus* seção *Flavi* (TANIWAKI et al., 2012).

Espécies de *Aspergillus* foram identificadas em materiais de castanha-da-Amazônia, provenientes de cooperativas dos Estados da região amazônica, Amazonas, Acre e Amapá, no período de 2009 a 2012. O estudo teve como objetivo identificar espécies de *Aspergillus* que ocorrem nos três Estados, com base na morfologia, biologia molecular e na produção de extrólitos, seguido do desenvolvimento do método de PCR, para a identificação de espécies membros do gênero *Aspergillus*. Quando se considerou o total de cada espécie, proveniente das três áreas analisadas, verificou-se que as espécies aflatoxigênicas *Aspergillus nomius* (Amapá e Amazonas) e *Aspergillus flavus* (Amazonas e Acre), foram as mais abundantes, representando 43,1% e 42,3% de todos os *Aspergillus* isolados, respectivamente. Dentre estas, *A. nomius*, foi a espécie de maior incidência em castanhas provenientes do Estado do Amapá. Quanto à análise qualitativa do potencial micotoxigênico, entre os três Estados, de 11 linhagens avaliadas de *Aspergillus flavus*, 6 produziram, AFB1, AFB2 e ácido ciclopiazônico (CPA) e 5 linhagens, produziram AFB1 e CPA. De 7 linhagens de *Aspergillus nomius*, 5 produziram AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2; 1 produziu B1 e G1 e 1 produziu, B1, G1 e G2. CPA, não foi detectado em *A. nomius* (Tabela 1) (MIDORIKAWA et al., 2014).

Table 1. Frequência e número de linhagens de *Aspergillus* isoladas de castanha-da-Amazônia (*Bertholletia excelsa*), provenientes de três Estados da região amazônica brasileira, com base na análise molecular.

	<i>A. nomius</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. tamarii</i>	<i>A. niger</i>
Acre	1 (5.3)*	18 (94.7)	0	0	0
Amapá	20 (95.2)	0	1 (4.8)	0	0
Amazonas					
Coari	5 (83.3)	0	0	1 (16.7)	0
Humaitá	7 (14.3)	40 (81.6)	0	1 (2.05)	1 (2.05)
Itacoatiara	19 (90.5)	0	0	2 (9.5)	0
Manicoré	7 (33.33)	0	0	14 (66.66)	0
Total	59 (43.1)	58 (42.3)	1 (0.73)	18 (13.13)	1 (0.73)

*Valores em parênteses indicam percentagens para cada espécie em cada região geográfica (Fonte: MIDORIKAWA et al., 2014).

Taniwaki et al. (2017) analisaram um total de 177 amostras de castanha-da-Amazônia (114 com casca e 58 descascadas) provenientes de regiões da floresta amazônica (Estados do

Pará e Amazonas) e do Estado de São Paulo, coletadas, nos diferentes estágios da cadeia produtiva da castanha-da-Amazônia: floresta, mercados, plantas processadas e supermercados. A microbiota das amostras da castanha-da-Amazônia, foi avaliada e também comparada em relação à atividade de água. Uma diversidade de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* foram encontradas, assim como *Eurotium* spp., *Zygomycetes* e fungos dematiaceos. Uma abordagem polifásica, usando características morfológicas e fisiológicas, bem como molecular e produção de extrólitos, foi utilizada para distinguir as espécies de *Aspergillus*, pertencentes às mais importantes seções, *Flavi* e *Nigri* (Tabela 2). Para a análise dos extrólitos foi utilizado o HPLC com diodo (FRISVAD; THRANE, 1987).

Na Tabela 2, estão relacionadas algumas espécies fúngicas isoladas da castanha-da-Amazônia e seus metabólitos, assim como suas respectivas fontes de referências.

Tabela 2. Espécies fúngicas e extrólitos isolados da castanha-da-Amazônia.

Espécies Fúngicas	Extrólitos	Fontes
<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Penicillium glabrum</i> , <i>Cunninghamella elegans</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>A. niger</i> e <i>Fusarium oxysporum</i> .	-	Freire et al. (2000)
<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Penicillium</i> spp., <i>Aspergillus tamaraii</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. nidulans</i> e <i>A. fumigatus</i>	-	Bayman et al. (2002)
<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. pseudonomius</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. tamaraii</i> , <i>Penicillium glabrum</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>Penicillium</i> spp., <i>Rhizopus</i> spp., <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium</i> spp., <i>Phialemonium</i> spp., <i>Phaeoacremonium</i> spp, <i>A. bertholletius</i> .	-	Calderari et al. (2013); Gonçalves et al. (2012); Freire et al. (2000); Bayman et al. (2002); Reis et al. (2012); Taniwaki et al. (2012).
<i>A. flavus</i> <i>A. nomius</i> <i>A. tamaraii</i> <i>A. niger</i> <i>A. fumigatus</i>	AFB1, AFB2 e CPA AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 - - -	Midorikawa et al. (2014)
Cont. <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus nomius</i>	AFB1 e AFB2 AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2	Olsen et al. (2008)

<p><i>Aspergillus niger</i> (3%) e <i>Aspergillus carbonarius</i> (100%). <i>Aspergillus arachidicola</i>, <i>Aspergillus bombycis</i>, <i>Aspergillus nomius</i>, <i>Aspergillus pseudocaelatus</i> e <i>Aspergillus pseudonomius</i> (em todos os isolados).</p>	<p>Ocratoxina A (OTA). AFB e AFG</p>	<p>Taniwaki et al. (2017)</p>
<p><i>Aspergillus flavus</i> (38%) e <i>Aspergillus pseudotamarii</i> (em todos os isolados). <i>Aspergillus bertholletius</i> (94%), <i>Aspergillus tamarii</i> (100%), <i>Aspergillus caelatus</i> (54%) e <i>Aspergillus flavus</i> (41%).</p>	<p>AFB Ácido ciclopiazônico (CPA).</p>	
<p><i>Aspergillus bertholletius</i> (47%), <i>Aspergillus caelatus</i> (77%), <i>Aspergillus nomius</i> (55%), <i>Aspergillus pseudonomius</i> (75%), <i>Aspergillus arachidicola</i> (50%) e <i>Aspergillus bombycis</i> (100%).</p>	<p>Ácido tenuazônico.</p>	

2.4. Filogenia, identificação e nomenclatura do gênero *Aspergillus*

A taxonomia do gênero *Aspergillus* é complexa, com características morfológicas e propriedades bioquímicas sobrepostas entre as espécies, bem como o polimorfismo intraespecífico (RODRIGUES et al., 2009; SAMSON; VARGA, 2009).

O gênero *Aspergillus* pertencente à seção *Flavi* compreende mais de 20 espécies membro, sendo um grande número aflatoxigênicas, incluindo *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. arachidicola*, *A. bombycis*, *A. minisclerotigenes*, *A. parvisclerotigenus*, *A. pseudocaelatus*, *A. pseudonomius* e *A. pseudotamarii*; *A. novoparasiticus*, *A. mottae*, *A. sergii* e *A. transmontanensis* (GONÇALVES et al., 2012; TANIWAKI et al., 2012)

Dados de caracteres morfológicos podem ser insuficientes para distinguir certas espécies pertencentes à seção *Flavi*. Numerosos estudos têm sido desenvolvidos tomando-se como base a técnica molecular, incluindo análises de rDNA e ITS regiões intergênicas, aflR e aflJ, para a diferenciação de *A. flavus* e *A. parasiticus* (RODRIGUES et al., 2007; EL KHOURY et al., 2011), bem como análises de AFLP e SNP para a diferenciação de *A. flavus*

de *A. oryzae*, *A. parasiticus* de *A. sojae*, *A. tamarii* e *A. nomius* (MONTIEL et al., 2003; LEE; LIOU; YUAN, 2006).

Sequência de bases incluindo análises de rDNA ITS e regiões variáveis de 28S rRNA juntamente com regiões gênicas de calmodulina e β -tubulina podem ser apropriadas para a resolução de espécies de *Aspergillus* estreitamente relacionadas (PILDAIN et al., 2008).

De acordo com Samson et al. (2014), o gênero *Aspergillus* compreende um diverso grupo de espécies, baseado em caracteres morfológicos, fisiológicos e filogenéticos, os quais impactam significativamente na biotecnologia, produção de alimentos, ambientes fechados e na saúde humana. Espécies de *Aspergillus* eram tradicionalmente associadas a nove gêneros teleomorfos, mas dados filogenéticos sugerem que junto com os gêneros *Polypaecilum*, *Phialosimplex*, *Dichotomomyces* e *Cristaspora*, este gênero forme um clade estreitamente relacionado à espécie *Penicillium*. Assim, mudanças no Código Internacional de Nomenclatura para algas, fungos e plantas resultaram no deslocamento para um nome por espécie. Desta forma, esses autores forneceram uma lista atualizada de espécies aceitas para o gênero, contendo agora 339 espécies. Informações acerca dos números dos tipos, das coleções de culturas vivas e os números de acessos ao GenBank, para avaliar sequências representativas de ITS, também foram adicionadas a esta lista. Assim, as regiões de ITS (ITS1-5.8S-ITS2), passaram a ser utilizadas como o Código de barras de DNA oficial para fungos (SCHOCH et al., 2012) e Calmodulina, como um marcador secundário para a identificação de espécies de *Aspergillus*.

Na Tabela 3, são apresentados os primers e temperatura de anelamento usados para a amplificação e sequenciamento de espécies de *Aspergillus*, neste estudo.

Tabela 3. Primers e temperaturas de anelamento usados para amplificação e sequenciamento das espécies de *Aspergillus* em estudo.

Locus	Amplific.	Temperatura anelamento (°C)	Ciclos	Primer	Direção	Primer sequence (5'-3')	Referências
Internal Transcribed Spacer (ITS)	Padrão	55 (alt. 52)	35	ITS1	Forward	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	White et al. 1990
				ITS4	Reverse	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	White et al. 1990
Calmodulina (CaM)	Padrão	55 (alt. 52)	35	CMD5	Forward	CCG AGT ACA AGG ARG CCT TC	Hong et al. 2005
				CMD6	Reverse	CCG ATR GAG GTC ATR ACG TGG	Hong et al. 2005

No diagrama abaixo estão presentes os métodos recomendados, para a identificação e caracterização de espécies de *Aspergillus*, com base em características morfológicas, taxonomia molecular e produção de extrólitos (metabólitos secundários) (SAMSON et al., 2014) (Figura 1).

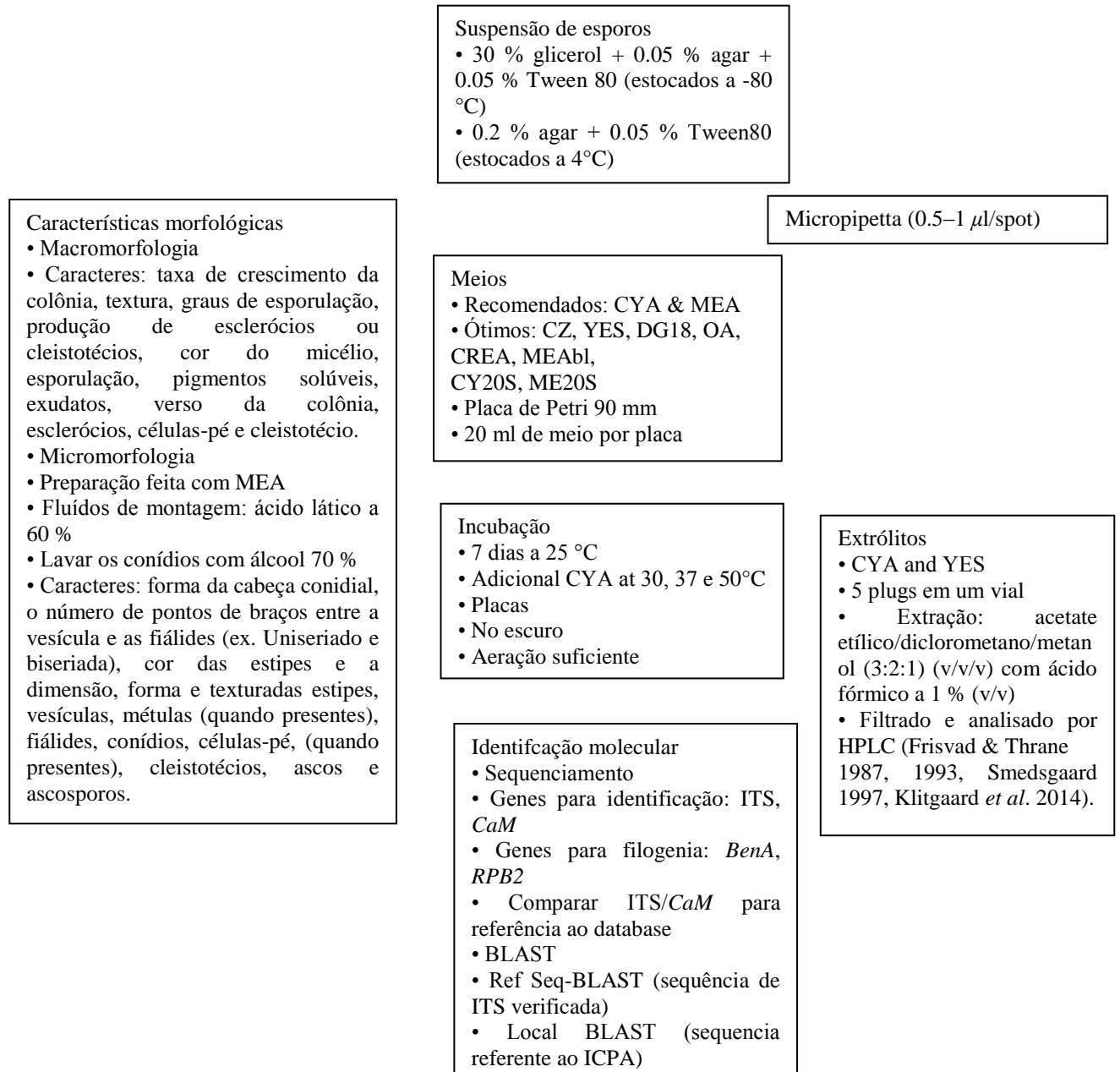


Figura 1. Diagrama sumarizado dos métodos recomendados para a identificação e caracterização de espécies de *Aspergillus* (Fonte: SAMSON et al., 2014).

2.5. *Aspergillus flavus*

Aspergillus flavus é um fungo filamentoso imperfeito, conhecido como um patógeno oportunista causador da aspergilose invasiva e não invasiva em humanos, animais e insetos. Ele pode causar reações alérgicas em humanos e infectar cultivos agrícolas e grãos estocados e ainda produzir o metabólito carcinogênico, mais tóxico e mais potente, as aflatoxinas, dentre outras micotoxinas. Avanços no genoma de *A. flavus* podem levar à melhoria da saúde humana, da segurança alimentar e da economia agrícola. A disponibilidade de dados genômicos deste fungo, marca uma nova era na pesquisa da biologia fúngica, micologia médica, ecologia agrícola, patogenicidade, biossíntese de micotoxinas e evolução, permitindo avançar no desenvolvimento de medicamentos terapêuticos e fornecer pistas vitais para a engenharia de culturas comerciais, resistentes à infecção por fungos através da incorporação de genes antifúngicos, que possam prevenir a contaminação da colheita agrícola por aflatoxinas (YU et al., 2005).

2.6. *Aspergillus nomius*

De acordo com Moore et al. (2015) *Aspergillus nomius*, assim como *A. flavus*, é outro patógeno oportunista e um dos três mais importantes produtores de aflatoxinas da seção *Flavi*. Este fungo tem sido relatado por contaminar produtos agrícolas, embora tenha sido relatado também em áreas não agricultáveis. Entretanto, a variedade de seus hospedeiros ainda é pouco conhecida. Tem um perfil similar às micotoxinas produzidas por *A. parasiticus*, sendo capaz de secretar as aflatoxinas B e G. Este autor descobriu também, que a linhagem-tipo *A. nomius* (NRRL 13137) tem o tamanho do genoma de aproximadamente 36Mb, comparável a outras espécies de *Aspergillus*, que tiveram seus genomas sequenciados. Seu genoma de *A. nomius*, engloba 11.918 genes preditos, dos quais 72% foram designados com termos tipo GO usando BLAST2GO. Mais de 1.200 desses genes preditos, foram identificados como únicos para *A. nomius* e a categoria GO mais significativamente enriquecida entre estes genes, foi a atividade da oxoreucatase. A inferência filogenômica mostra NRRL 13137 como ancestral às outras espécies aflatoxigênicas examinadas na seção *Flavi*. Esta estirpe contém um único idiomorfismo de tipo acoplamento designado como MAT1-1. Assim, este estudo promoveu uma análise preliminar do genoma de *A. nomius*. Dado o potencial recentemente descoberto para que *A. nomius* se submeta à recombinação sexual e com base nestes achados, esta sequência do genoma forneça um ponto de referência evolutivo adicional para o estudo da genética e biologia da produção de aflatoxinas.

De acordo com Kurtzman, Horn e Hesseltine (1987), A diferença entre *A. nomius* e *A. flavus* foi baseada na presença de estruturas macroscópicas: Colônias de *A. nomius* (Figura 2.1.A), representa uma nova espécie aflatoxigênica fenotipicamente semelhante a *A. flavus* (Figura 2.1.B) e esclerócios (Figura 2.2, *A. flavus*; Figura 2.3, *A. nomius*) indeterminados e uma menor temperatura de crescimento. Estruturas microscópicas: Fig. 2.4. Conidióforos de *Aspergillus nomius* NRRL 13137; Figura 2.5. Fotomicrografia do conídio de *A. nomius* NRRL 13137; Figura 2.6. Fotomicrografia em microscópio eletrônico de um conídio de *A. nomius* NRRL 13137.

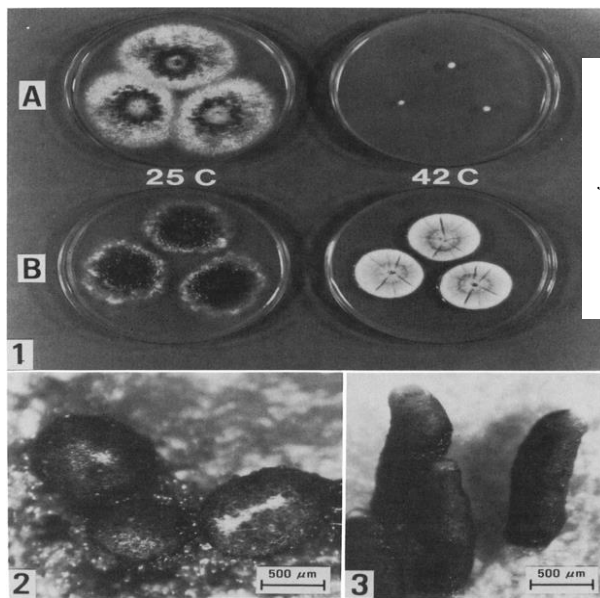


Fig. 2.1.A. Colônias de *A. nomius*, NRRL 13137 e **2.1.B.** *A. flavus* var. *flavus* NRRL 1957, 25°C e 42°C sobre Czapek agar; **Fig. 2.2** Esclerócio de *A. flavus* var. *flavus* NRRL 1957; **Fig. 2.3.** Esclerócio de *A. nomius* NRRL 13137. (KURTZMAN, HORN & HESSELTINE. *Antonie van Leeuwenhoek* 53:147-158, 1987).

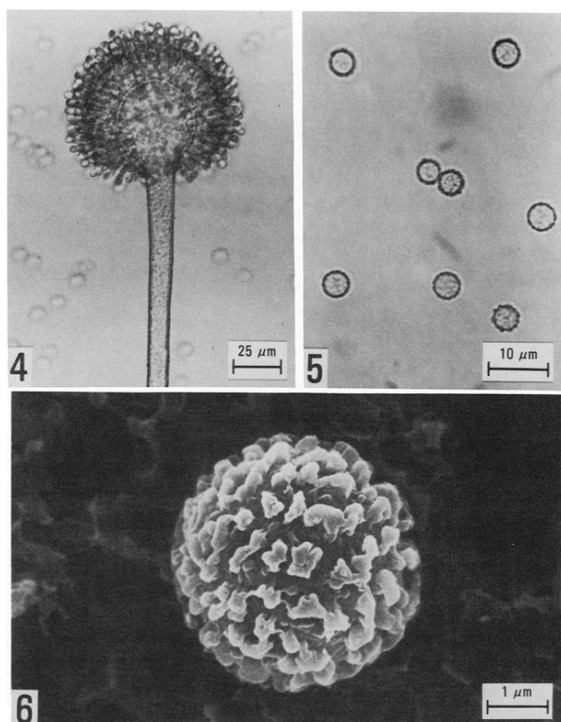


Fig. 2.4. Conidióforos de *Aspergillus nomius* NRRL 13137; **Fig. 2.5.** Fotomicrografia do conídio de *A. nomius* NRRL 13137; **Fig. 2.6.** Fotomicrografia em microscópio eletrônico de um conídio de *A. nomius* NRRL 13137. (KURTZMAN e HESSELTINE. *Antonie van Leeuwenhoek* 53:147-158, 1987).

2.7. *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Eurotiomycetes, Ordem Eurotiales, Família Trichocomaceae, Gênero *Aspergillus*. Sinônimos: *Neosartorya fumigata* (O'GORMAN, FULLER; DYER, 2008).

Na Figura 3, estão presentes as colônias de *A. fumigatus* em meio de cultura; estruturas reprodutivas: cabeças conidiais; e os conídios de acordo com O'Gorman; Fuller; Dyer (2008).

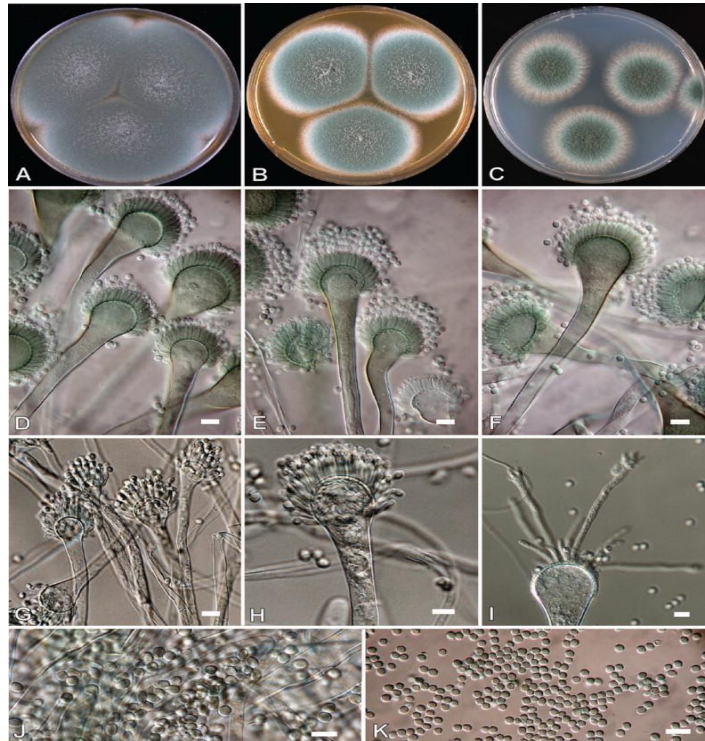


Figura. 3. A-C. Colônias de *A. fumigatus* em meio de cultura; D-I. Estruturas reprodutivas: cabeças conidiais; J-K. Conídios (O'GORMAN; FULLER; DYER, 2008).

O fungo *A. fumigatus* é o principal agente etiológico da aspergilose invasiva, podendo causar outras doenças como aspergilose broncopulmonar alérgica e aspergilose pulmonar crônica. É o mais importante fungo filamentoso patogênico para seres humanos, e uma das principais causas de morte por infecção em pacientes com a defesa imunológica deprimida. Seu tratamento é feito com terapia antifúngica associada à terapia imunomodulatória (LAMOTH, 2016). No entanto, recentemente têm surgido linhagens resistentes a agentes antifúngicos, como os do tipo azole, a exemplo do antifúngico comercial Itraconazol (MEIS et al., 2016).

No meio ambiente, *A. fumigatus* é um fungo saprófita assim como as demais espécies do gênero *Aspergillus*. Graças à sua capacidade de sobrevivência a uma ampla faixa de

temperatura (entre 25 °C a mais de 37 °C), essa espécie é encontrada praticamente em todo o mundo em diversos ambientes, como no ar, solo e vegetação em decomposição. Embora possa causar doenças no ser humano, *A. fumigatus* não habita o trato respiratório humano tipicamente (VAN DER VEERDONK et al., 2017). Em seu ciclo de vida, apresenta estruturas nas formas de conídio, ascósporo e micélio. Porém, em situações adversas ele produz esporos assexuais, os conídios, dentro de conidióforos, sendo facilmente dispersos no ar e inalados por seres humanos. Em indivíduos comprometidos, os esporos permanecem nos pulmões, gerando uma infecção invasiva ao germinarem. Após a germinação, surgem as hifas que darão origem aos micélios, formando então uma colônia. Esta colônia se caracteriza por apresentar micélios septados, formados por células multinucleares, embebidas em uma matriz extracelular, formando um biofilme, ocasionando o aspergiloma.

É importante frisar que, segundo Lamoth (2016), existe um complexo de espécies críticas de *Aspergillus*, que podem ser confundidas com *A. fumigatus*, dificultando um diagnóstico mais preciso.

Embora, a partir de 2009, tenha sido observado o cruzamento entre duas linhagens de *A. fumigatus* diferentes, gerando cleistotécios (corpos de frutificação completamente fechados) contendo numerosos ascósporos internos, comprovando-se a existência da fase sexuada deste fungo. Esse cruzamento ocorre em situações muito específicas e não fisiológicas e embora não tenha sido observado diretamente na natureza, hipotetiza-se que ocorra em situações ambientais desfavoráveis, aumentando a sua variabilidade e conseqüentemente as chances de sua sobrevivência. (VAN DER VEERDONK et al., 2017).

2.8. Micotoxinas

O termo micotoxinas é originado da palavra grega “mykes”, que significa fungo; e do latim “toxicum”, que significa veneno ou toxina (BULLERMAN, 1979).

A produção de micotoxinas depende de uma série de fatores, incluindo a suscetibilidade do substrato à colonização do fungo produtor; fatores físicos como temperatura do ambiente, umidade do substrato, umidade relativa do ar durante o armazenamento, aeração, danos mecânicos e tempo de armazenamento; fatores biológicos como a capacidade genética do fungo em produzir micotoxinas, quantidade de esporos viáveis, interação de diferentes fungos existentes no mesmo substrato, interação de micotoxinas e presença de insetos (CIEGLER, 1978).

2.8.1. Estratégias de controle de micotoxinas

As micotoxinas estão em destaque tanto no mercado interno como no externo. Alimentos contaminados são considerados um risco à saúde humana e animal e por isso vários métodos, não somente para evitar a contaminação, como também para destoxificar os alimentos estão em andamento. Na Tabela 4 são apresentadas as principais estratégias de controle discutidas atualmente. Algumas estão em estudo ou apresentam certa eficiência para determinadas 11 toxinas e para outras não, ou ainda têm efeitos indesejáveis para alguns tipos de alimentos.

Tabela 4 Medidas preventivas e corretivas para controle de micotoxinas.

Preventivas	
Pré-Colheita	<p>Correta irrigação, fornecimento de nutrientes e proteção contra Insetos (evitar danos). Eliminar resíduos agrícolas. Rotação de cultura. Variedades resistentes à contaminação fúngica. Aplicação de agentes químicos – fungicidas. Controle biológico na plantação (insetos, microrganismos etc).</p>
Pós-Colheita	<p>Colheitas feitas no tempo seco (chuvas aumentam umidade e Favorecem o crescimento dos fungos). Remoção dos grãos danificados. Secagem adequada (abaixo de 10% umidade) antes da estocagem. Manter as condições de temperatura e umidade adequadas durante o armazenamento. Controle de pragas e limpeza dos armazéns e máquinas que entram em contato com o alimento. Aplicação de agentes químicos – fungicidas como ácido propiônico e acético. Radiação gama para a morte do fungo (ainda em estudo).</p>
Corretivas	
Físicos	<p>Exposição à lâmpada ultravioleta – grãos que fluorescem devem ser se parados e descartados. Microondas (eficiente para tricotecenos), degradação solar (eficiente para aflatoxina), extrusão (eficiente para fumoniosina) e torrefação. Moagem úmida. Radiação Gama (ainda em estudo).</p>
Químicos	<p>Hidrólise alcalina. Utilização de bissulfito, amônia, peróxido de hidrogênio/bicarbonato de sódio. Ozônio.</p>
Biológicos	<p>Bactérias lácticas. Fermentação.</p>

Adsorventes
e intervenção
dietética

Aditivos nutricionais como colina, metionina, selênio, vitaminas, proteínas, gorduras, antioxidantes e indutores de enzimas metabólicas, produtos adicionados principalmente em rações para prevenir toxicidade aguda - sequestrar e diminuir a biodisponibilidade das micotoxinas no trato gastrointestinal.

Adsorventes como aluminossilicato de sódio e cálcio hidratado, Carvão ativado, bentonites, zeólitos e parede celular de levedura.

Adaptada de Bennett; Klich (2003)

2.9. Aflatoxinas

Aflatoxinas são as micotoxinas mais amplamente estudadas, por serem compostos de alto risco à saúde humana e animal. Em 1960, na Inglaterra, foram relatadas as primeiras pesquisas em relação a esta micotoxina, devido ao caso “Turkey X Disease” onde perus e patos morreram intoxicados após serem alimentados com amendoim, ingrediente base da ração destes animais, provenientes do Brasil e África, (HUSSEIN; BRASEL, 2001). Atualmente, são conhecidos 18 compostos similares designados pelo termo aflatoxina, porém as mais importantes são AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 (MIDORIKAWA et al., 2014).

Quimicamente, são moléculas de dihidrofuranos unidas a anéis cumarínicos, sendo distinguidos por suas propriedades fluorescentes: AFB1 e AFB2 apresentam fluorescência azul violeta, enquanto as AFG1 e AFG2 apresentam fluorescência azul esverdeada (KELLER et al., 2005). São compostos de natureza cristalina, instáveis à luz, muito estáveis a alta temperatura (termoestáveis) e solúveis em solventes polares como clorofórmio e metanol. Apesar das aflatoxinas serem semelhantes, a AFB1 apresenta o maior grau de toxicidade, sendo o mais potente carcinógeno natural conhecido e produzido em maior quantidade pelas cepas toxigênicas (KLISCH, 2007), seguida por AFG1, AFB2 e AFG2 (LEESON et al., 1995).

O fígado é o principal órgão atingido após uma ingestão aguda de aflatoxinas, contudo, as mesmas são encontradas em outros tecidos e produtos animais, sendo o exemplo mais efetivo deste tipo de contaminação as aflatoxinas M1 e M2, que são metabólitos hidroxilados das aflatoxinas B1 e B2, presentes no leite e em produtos derivados obtidos de animais que ingeriram ração contaminada com estas micotoxinas (ROSMANINHO et al., 2001). Assim, ligações covalentes das aflatoxinas resultam no decréscimo da síntese do DNA e RNA, no fígado. Porém, a inibição da síntese de proteína não é tão rápida ou extensa como

as dos ácidos nucléicos, ocorrendo uma desagregação polissomal paralelamente, sendo o que parece representar o mecanismo de ação ou o modo de inibição da síntese proteica (ROEBUCK; MAXUITENKO, 1994), podendo acarretar, danos como hemorragias, edemas, imunossupressão e carcinoma hepático (SMITH; ROSSI, 1991).

Dentre outras características das aflatoxinas, estão o baixo peso molecular, baixa solubilidade em água (o que acarreta na difícil eliminação do organismo), alta solubilidade em solventes moderadamente polares (clorofórmio, metanol e dimetilsulfóxido). São sensíveis à luz, principalmente à ultravioleta e, quando secas, são estáveis em temperaturas muito elevadas. O ponto de fusão das aflatoxinas é de 269 °C e são destruídas por autoclavagem na presença de amônia e em tratamento com hipoclorito (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1979).

As aflatoxinas podem ser detectadas usando métodos analíticos, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), a Cromatografia em Camada Delgada (CCD), a Cromatografia Gasosa (CG) e ELISA (SCOTT, 1990).

Mesmo antes da Era Cristã, os alimentos já eram submetidos a legislações e inspeções. Essas legislações foram evoluindo até o início do século XX, quando foi adotada uma legislação oficial, com o propósito de controlar a qualidade e proteger o consumidor, sendo incluído então, regulamentos para contaminantes (SABINO, 2004).

No Brasil, o Ministério da Saúde através da Resolução RDC 274, ANVISA, 15/10/02 (ANVISA, 2002) e o Ministério da Agricultura com a Portaria MAARA nº 183, 21/03/96, estabeleceram o limite de 20 µg/Kg para aflatoxinas B1 + B2 + G1 + G2 (BRASIL/MAARA, 1996). Estruturas das Aflatoxinas (Figura 4).

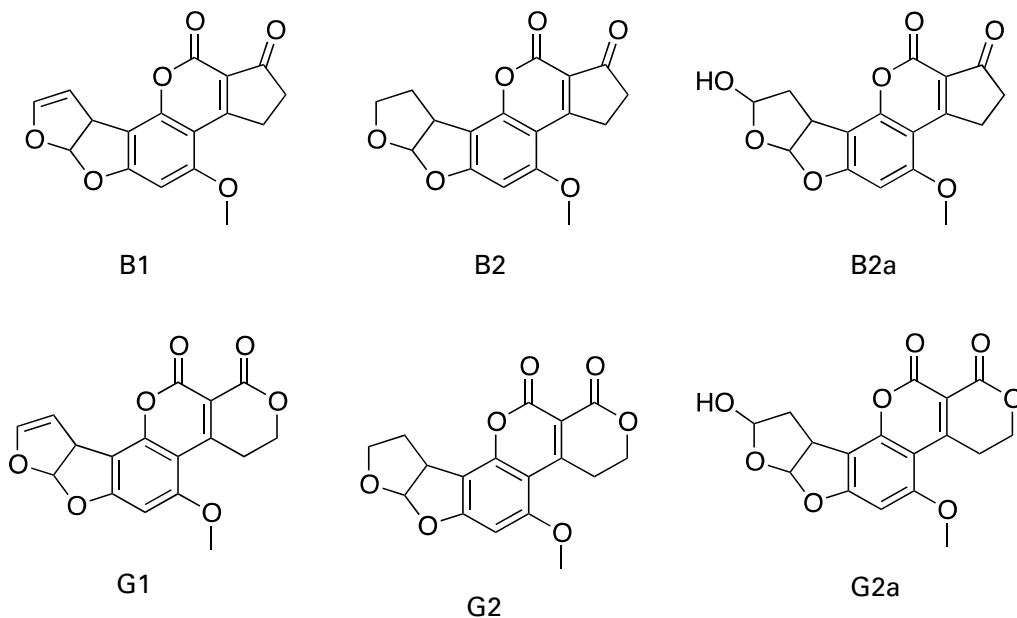


Figura 4. Estruturas químicas das Aflatoxinas. Fonte: FAO. <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab482s/AB482S13.htm>

2.10. Meios usados para caracterização morfológica de espécies de *Aspergillus*

Os meios utilizados para a enumeração de fungos em alimentos e outros substratos têm tradicionalmente sido de alta atividade de água (aw), na faixa de 0,999-0,997. Embora esses meios sejam satisfatórios para enumerar e isolar leveduras e fungos de alimentos frescos, como frutas, legumes, produtos lácteos e carne, são inadequados para a amostragem da flora fúngica de alimentos secos e semi secos tais como frutas secas, condimentos e especiarias, produtos de carne e peixe secos e, cereais armazenados e nozes. Meios com reduzida aw, para enumeração de fungos em alimentos têm sido tradicionalmente baseados em NaCl (CHRISTENSEN, 1946), embora alguns pesquisadores tenham preferido usar meio à base de sacarose (PITT, 1975).

Pitt e Hocking (1977) mostraram que o glicerol é um soluto adequado para o cultivo de uma variedade de fungos xerofílicos. Ele é menos inibitório a algumas espécies do que o NaCl, produz meio transparente e é mais facilmente manuseado do que os açúcares a altas concentrações. No entanto, o mesmo meio formulado com glicerol não resolve o problema de controle do crescimento do grupo *A. glaucus* em baixas atividades de água (aw).

O dicloran (2,6-dicloro-4-nitroanilina), isolado e em combinação com rosa de bengala, mostrou inibição sobre a propagação de fungos mucoráceos, limitando o diâmetro das colônias de outros gêneros em um meio de quantificação de fungos de alimentos (KING et al., 1979).

De acordo com Hocking e Pitt (1980) o meio contendo baixa atividade de água (aw) (0,95 aw) e 18% (wt/wt) de glicerol e 2 µg de dicloran por ml, foi desenvolvido para enumerar a flora fúngica de alimentos secos e semi secos. O meio, designado DG18, mostrou-se significativamente melhor do que o de Christensen Sal de Malte Agar, quando ambos foram testados com gêneros alimentícios e com culturas puras de inóculos.

O meio AFPA (*Aspergillus flavus parasiticus* Agar), usado para identificação de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, tem sido validado através de um estudo comparativo incluindo nove laboratórios localizados na Austrália, Brasil, Suíça, Reino Unido, Dinamarca, Irlanda entre outros. Três misturas fúngicas congeladas em freezer, contendo *A. flavus*, *A. parasiticus* e uma mistura de outros fungos, foram produzidas e homogenizadas. Os coeficientes de variância foram baixos, variando de 0,81% a 1,09% para a contagem de fungos totais e entre 2,50% a 2,72% para contagem de *A. flavus* e *A. parasiticus*. Os laboratórios analisaram os conteúdos dos dois vials de cada mistura sobre o AFPA comercial, o formulado em laboratório e um meio padrão (DG18). Os valores de reprodutibilidade para DG18 foram mais altos. Não existiu diferenças em quantidade de *A. flavus* e *A. parasiticus*

entre os meios AFPA e DG18. Entretanto, o DG18 resultou em uma quantidade maior de fungos totais comparado ao AFPA (FRÄNDBERG et al., 2003).

2.11. Esclerócios

Esclerócios são estruturas de resistência produzidas por algumas espécies fúngicas, incluindo *A. flavus* que visam suportar condições ambientais adversas (WICKLOW et al., 1984). Geralmente, apresentam-se ovaladas a globosas, de coloração escura, rígidas e compostas por uma massa compacta de hifas inativas com material de reserva que se mantém dormente até que uma condição favorável permita o crescimento micelial. Acredita-se que os esclerócios possam servir como fonte de inoculação primária, através da germinação miceliônica em algumas culturas (WICKLOW; DONAHUE, 1984).

Quanto à produção de esclerócios, as cepas de *A. flavus*, podem ser divididas em dois grupos: cepas S, produtoras de numerosos e pequenos esclerócios (diâmetro < 400 µm) e altos níveis de aflatoxinas; e as cepas L, de grandes e poucos esclerócios (diâmetro > 400 µm) e baixos níveis de aflatoxinas (SAITO et al., 1986).

Os isolados do tipo S são subdivididos em S_B, produtores apenas de aflatoxinas do tipo B ou em S_{BG}, isolados atípicos, que produzem aflatoxinas B e G (SAITO et al., 1989). Porém, o fenótipo esclerocial S, não é necessariamente previsível com respeito à produção de aflatoxinas (GEISER et al., 2000).

Estudo desenvolvido por Cardwell e Cotty (2002) na América do Norte, demonstrou que cepas S são frequentemente encontradas em regiões com altas temperaturas e baixo índice pluviométrico. Os autores postularam que a produção de pequenos esclerócios pela cepa S, pode ser um mecanismo de sobrevivência para um organismo adaptado às flutuações climáticas.

2.12. *Carapa guianensis* Aubl.

2.12.1. Botânica

A andirobeira (*Carapa guianensis* Aubl.) pertence à família Meliaceae, conhecida como Andiroba, andiroba-saruba, iandirova, iandiroba, carapá, carapa, nandiroba (LORENZI; MATOS, 2002). Em média, essa árvore atinge entre 25 e 35 metros de altura, embora possam chegar a 55 metros; a copa é média e densa, composta por ramos eretos (FERRAZ et al. 2003). As finalidades dadas ao óleo extraído da andiroba são bastante vastas. É uma árvore de múltiplos usos, a madeira é de alta qualidade e frequentemente comparada ao mogno (*Swietenia macrophylla*) devido a esta característica; sua casca apresenta propriedades

medicinais e as sementes fornecem um dos óleos medicinais mais utilizados na Amazônia (LORENZI; MATOS, 2002). Da casca é feito chá, usado na medicina tradicional contra a febre, vermes e bactérias; moída, a casca é usada como agente cicatrizante. A madeira, resistente ao ataque de insetos, é de excelente qualidade para a construção civil. O óleo, que tem diversas aplicações na medicina tradicional, é exportado para a Europa e Estados Unidos (SHANLEY et al., 2011).

2.12.2. Distribuição geográfica

Carapa guianensis, é uma espécie bastante plástica, adaptada a diferentes ambientes, ocorrendo no sul da América Central, na Colômbia, Venezuela, Suriname, Guiana Francesa, Brasil, Peru, Paraguai e nas ilhas do Caribe. No Brasil, é encontrada em toda a bacia amazônica, preferencialmente nas várzeas e áreas alagáveis ao longo dos cursos de água e em terra firme (BOUFLEUER, 2004).

2.12.3. Uso popular de *Carapa guianensis*

A partir de sementes de *C. guianensis*, o nativo amazônico extrai o óleo de andiroba, tradicionalmente usado como febrífugo, antipalúdico, inseticida e repelente (MIRANDA-JÚNIOR et al., 2012). O óleo de andiroba, extraído das amêndoas, é amarelo-claro e tem gosto fortemente amargo. Em temperaturas abaixo de 25 °C o óleo solidifica-se, ficando com a consistência semelhante à da vaselina (FERRAZ et al., 2003). Popularmente, o óleo é usado pelos extrativistas, índios e ribeirinhos em picadas de serpentes, escorpiões e abelhas; no combate a vermes e protozoários; artrite, tétano, reumatismo, infecção renal e no fígado, hepatite, icterícia, dispepsias, fadiga muscular, dores nos pés, resfriados, gripes, tosse, sarna, micose, lepra, malária, herpes e úlceras graves. O óleo misturado ao corante urucum (*Bixa orellana* L.) é usado pelos indígenas por apresentar ação repelente (BOUFLEUER, 2004). Possui atividade antialérgica, anti-inflamatória, analgésica, larvicida sobre mosquitos *Aedes*, antiplasmódica, acaricida, inseticida, atividade de cicatrização e Antitripanosoma (MARQUES et al., 2016). Também apresentou eficácia *in vitro* no controle de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) (FARIAS et al., 2007) e atividade *in vitro* contra larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos e ovinos (FARIAS et al., 2010).

2.12.4. Composição química e atividade biológica de *Carapa guianensis*

É uma substância rica, composta de ácidos graxos, como o ácido oleico (56 a 59%), ácido palmítico (9 a 12%), mirístico (18%), linoleico (7,7 a 9,5%), ácido esteárico e ácido araquídico (GABRIEL, 2007). Além de ácidos graxos, há fitoesteróis como o β -sitosterol e

limonóides como a andirobina, gedunina, desoxigedunina, entre outros (JESUS et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2018; NINOMIYA et al., 2016).

Substâncias conhecidas como limonóides, foram isoladas de árvores de andiroba, sendo classificadas em quatro subclasses: tetranortriterpenóides (TNTP) (6a-acetoxigedunine, 7-esacetoxine-7-oxogedunine, andirobin, metilangolensate, 6-Acetoxiepoxaazadiradione e gedunine), com atividades antialérgica, anti-inflamatória, analgésica e antimalárica; carapanolides A-X, com atividade citotóxica sobre leucemia; andirolides A-Y, com atividade citotóxica sobre leucemia e atividade antimalárica sobre *Plasmodium falciparum*; e guianolides AB (MARQUES et al., 2016).

Qi et al. (2004) isolaram nove compostos a partir do extrato etanólico (EtOH) do galho de *C. guianensis* e com base no método espectroscópico, suas estruturas foram elucidadas como 1,3-di-benzene carbon amine-2-octadecylic acid-glyceride; hexacosanoic acid-2,3-dihydroxy-glyceride; ursolic acid; naringenin; scopoletin; 3,4-dihydroxymethylbenzoate; 2,6-dihydroxymethylbenzoate; tetratriacontanoic acid; triacontanoic acid. As frações não saponificáveis separadas do óleo são ricas em limonóides, as quais são atribuídos efeitos farmacológicos. As frações ricas em limonóides foram submetidas ao fracionamento e identificação de seus constituintes majoritários. Os limonóides identificados no óleo foi gedunin; 6alpha-acetoxypedunin; 7-deacetoxy-7-oxogedunin; 7-deacetylgedunin; 1,2-dihydro-3beta-hydroxy-7-deacetoxy-7-oxogedunin e andirobin. Gedunin e derivados têm sido registrados como antimaláricos. Estudos realizados confirmaram o uso tradicional do óleo de andiroba como antiplasmodial e comprovaram, não ser tóxico em bioensaios realizados com camundongos (MIRANDA-JÚNIOR et al., 2012).

Inoue et al. (2013) isolaram dois limonóides, denominados A e B, de sementes de *C. guianensis*. Suas estruturas foram estabilizadas pela análise de espectroscopia e cristalografia de raio x. Guianolides A e B apresentaram um esqueleto de carbono, através da formação de uma ligação C-11-C-21.

O óleo essencial obtido por hidrodestilação de suas folhas foi analisado por GC-FID e GC-MS. Vinte e três componentes foram identificados, constituindo 93.7% do óleo. Os constituintes mais abundantes foram bicyclogermacrene (28.5%), alpha-humulene (17.2%), germacrene B (11.9%), and trans-beta-caryophyllene (9.9%). Miyake et al. (2015) isolaram dois limonóides tipo mexicanolide; carapanolídes T-U (1-2) e três limonóides tipo fragmalin, carapanolides V-X (3-5), de suas sementes e suas estruturas foram determinadas com base na espectroscopia de RMN 1D e 2D.

2.12.5. Atividade biológica de *Carapa guianensis*

Além de sua atividade antioxidante, outras propriedades importantes são conhecidas. Na medicina tradicional, o óleo é usado para contusões, inflamações, como agente cicatrizante, entre outros (SHANLEY et al., 2011). Experimentalmente, o óleo já apresentou atividade antileishmanial (OLIVEIRA et al., 2018), hepatoprotetiva (NINOMIYA et al., 2016), anti-inflamatória (PENIDO et al., 2005; INOUE et al., 2018), antimalárica (MIRANDA-JÚNIOR et al., 2012; PEREIRA et al., 2014) e cicatrizante (SILVA et al., 2015) essa atividade cicatrizante parece ser devido a indução da síntese de colágeno por seus limonóides (MORIKAWA et al., 2018). Não foi encontrado na literatura ensaios sobre sua atividade antibacteriana ou antifúngica. Porém, a atividade antimicrobiana do óleo essencial, bem como os extratos brutos das folhas, obtidos por refluxo das folhas secas com n-hexano, diclorometano e metanol, foi determinado utilizando o ensaio de difusão em disco. A atividade sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 29923 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 foi somente encontrada pelo óleo essencial e o extrato metanólico, a uma concentração mínima inibitória (MIC) de 400 µg/mL e 50 µg/mL (MECCIA et al., 2013). Este é o primeiro estudo sobre atividade antifúngica da *Carapa guianensis* sobre *Aspergillus nomius* e *A. fumigatus*.

2.12.6. Toxicidade do óleo de *Carapa guianensis* Aubl.

A toxicidade do óleo (hematotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade) já foi testada em ensaios de micronúcleo e cometa (MILHOMEM-PAIXÃO et al., 2016). Os resultados mostraram que o óleo não exibiu nenhuma das toxicidades avaliadas, pelo contrário, sua atividade antioxidante tendeu a proteger o DNA de danos moleculares causados por oxidação.

2.13. *Copaifera* sp.

2.13.1. Botânica

As copaiibeiras são plantas com hábito arbóreo, pertencente à família Leguminosae Juss, subfamília Caesalpinoideae Kunth, no sistema Engler, embora a literatura apresente também outras classificações como Caesalpiniaceae (Sistema Cronquist) ou Fabaceae (ARRUDA et al., 2019). Suas árvores apresentam folhas com raque-alado, alternas, compostas, contendo de dois a seis pares de folíolos, inflorescência espiciforme, frutos tipo legumes deiscentes com 3,5 a 4,0 cm de diâmetro, ovóides e com uma única semente

envolvida por um arilo amarelo (ALMEIDA, 1998; PINTO et al., 2000). Essas árvores podem viver até 400 anos, atingindo alturas entre 25 e 40 m e diâmetros entre 0,4 a 4 m. O nome copaíba vem do tupi-guarani “cupa-yba” que significa “árvore de depósito”, em referência à sua oleoresina (PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009). Embora a taxonomia do gênero *Copaifera* tenha sido extensivamente estudada, ainda há dificuldade em se identificar algumas espécies devido à complexa morfologia de suas flores, ou mesmo a ausência de estruturas reprodutivas nas amostras usadas (TRINDADE; SILVA; SETZER, 2018)

Suas árvores apresentam folhas com raque-alado, alternas, compostas, contendo de dois a seis pares de folíolos, inflorescência espiciforme, frutos tipo legumes deiscentes com 3,5 a 4,0 cm de diâmetro, ovóides e com uma única semente envolvida por um arilo amarelo (ALMEIDA, 1998; PINTO et al., 2000).

2.13.2. Distribuição geográfica

As copaíbas são árvores nativas da região tropical da América Latina e também da África Ocidental. Na América Latina, são encontradas espécies na região que se estende do México ao norte da Argentina, sendo conhecidas popularmente nas regiões amazônica e centro-oeste do Brasil como copaibeiras ou pau d’óleo (VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002). Esse gênero abrange mais de 70 espécies distribuídas principalmente na América Central e do Sul, embora algumas possam ser encontradas no continente africano. O Brasil é o país com maior diversidade de copaibeiras, com 26 espécies e pelo menos oito variedades (TRINDADE; SILVA; SETZER, 2018). Na África Ocidental são descritas 19 espécies, na região que inclui Congo, Camarões, Guiné e Angola. Destas, as espécies *C. convertifolia*, *C. demeusii* (Copal do Congo), *C. coleosperma* (Copal da Rodésia), *C. conjugata*, *C. hymenaefolia*, *C. chodatiana* e *C. fissicuspis*, têm sinonímia nos gêneros *Guibourtia*, *Gorakia* (*Gorakia conjugata*) e *Cynometra* (*C. fissicuspis*). Na Ilha de Bornéu, Malásia, há ainda uma espécie conhecida como *Copaifera palustris*, que apresenta caracteres bastante semelhantes aos das espécies africanas e ao gênero *Pseudosindora* (VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002). De acordo com estes autores, entre as espécies de *Copaifera* mais abundantes, destacam-se: *C. officinalis* L. (norte do Amazonas, Roraima, Colômbia, Venezuela e San Salvador), *C. guianensis* Desf. (Guianas), *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne (Amazônia), *C. confertiflora* Bth (Piauí), *C. langsdorfii* Desf. (Brasil, Argentina e Paraguai), *C. coriacea* Mart. (Bahia), *C. cearensis* Huber ex Ducke (Ceará).

No Brasil, a espécie *C. langsdorfii* Desf. é particularmente importante por estar distribuída por todo o território (da Amazônia a Santa Catarina) e por possuir quatro

diferentes variedades: *C. langsdorfii* var. *grandifolia*, *grandiflora*, *laxa* e *glabra*. Martins-da-Silva et al. (2008) citam ainda na Amazônia, *Copaifera duckei*, *C. glycyarpa*, *C. guyanensis*, *C. martii*, *C. multijuga*, *C. paupera*, *C. piresii*, *C. pubiflora* e *C. reticulata*.

2.13.3. O óleo resina de *Copaifera* spp.

O óleo resina de *Copaifera* spp. é um líquido translúcido e consistente que difere de cor conforme a espécie, variando do amarelo-claro ao marrom, sabor amargo e odor aromático, insolúvel em água e parcialmente solúvel em álcool (DUCKE, 1939).

É extraído do tronco de diversas espécies do gênero, sendo conhecido popularmente como óleo ou bálsamo de copaíba (MACIEL et al., 2002), sendo esta a designação correta, por ser um exsudato constituído por ácidos resinosos e compostos voláteis. E, não um bálsamo verdadeiro, por não conter derivados do ácido benzóico ou cinâmico, sendo as espécies *C. reticulata*, *C. guianensis*, *C. multijuga*, *C. officinalis* (VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002) e *C. duckei* as mais frequentemente utilizadas na produção deste óleo.

O óleo resina de *Copaifera* spp. pode ser usado puro (*in natura* ou destilado), ou como componente na preparação de uma variedade de produtos terapêuticos e cosméticos, como xaropes, pomadas, cápsulas, óvulos vaginais, cremes, sabonetes, xampus, detergentes e loções; possui ainda potencial para uso industrial em tintas, vernizes e como fixador de fragrância de perfumes (RIGAMONTE-AZEVEDO et al., 2006).

A produção de substâncias bioativas pelas plantas ocorre através de diferentes vias metabólicas, gerando grande número de compostos, muitos dos quais somente identificados em determinados grupos de plantas e em concentrações variáveis (MARCANO et al., 2005).

Além da frequente utilização na medicina tradicional devido às suas propriedades terapêuticas, o óleo tem grande valor industrial, principalmente para indústrias farmacêuticas e cosméticas. A partir do óleo são feitas pomadas, comprimidos, sabonetes, perfumes, entre outros (ARRUDA et al., 2019).

O óleo resina de *Copaifera* spp. possui atividades bactericida, anti-inflamatória, gastroprotetora, antitumoral, antisséptica, antifúngica, tripanossomicida e larvicida contra *Culex quinquefasciatus* Say (CASCON et al., 2000; VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002; SILVA et al., 2003), sendo evidenciado que o óleo resina de *C. reticulata*, pode ser viável também em análises quanto a seus efeitos terapêuticos em testes *in vivo*, contra Leishmaníase Visceral (LV) canina no Brasil (RONDON et al., 2012).

2.13.4. Composição química de *Copaifera* spp.

O óleo resina de Copaíba é um líquido transparente com variável cor e viscosidade. Ele consiste de uma mistura de sesquiterpenos e diterpenos. O estudo mais antigo com o óleo resina de copaíba data do início do século XIX, quando Schweitzer, em 1829, descreveu como o óleo resina de copaíba, quando deixado em sentido vertical, tornou-se em uma substância sólida e cristalizada. Ele chamou esta substância de ácido copaivico (VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002).

Uma lista de sesquiterpenos e diterpenos, componentes do óleo de copaíba, foram listados em um artigo de revisão datado de 2002 (VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002). Desde então, novas substâncias e outros terpenóides não descritos nesta obra, foram publicados. Pelo menos 38 outros sesquiterpenos foram identificados (LEANDRO et al. 2012). Destes, 35 foram encontrados no óleo resina de *C. duckei*, *C. paupera*, *C. piresii*, *C. pubiflora* e *C. reticulata*: cyclosativene, 7-episesquithujene, cyperene, cis- α -bergamotene, trans- α -bergamotene, (Z)- β -farnesene, guaia-6,9-diene, epi- β -santene, (E)- β -farnesene, sesquisabinene, 4,5-diepiaristolochene, β -chamigrene, cis- β -guaiene, viridiflorene, γ -gurjunene, γ -curcumene, valencene, trans- β -guaiene, (E,E)- α -farnesene, (Z)- α -bisabolene, α -bulnesene, β -curcumene, (Z)- γ -bisabolene (LAMEIRA et al. 2009; ZOGHBI et al. 2009a; HERRERO-JÁUREGUI et al. 2011); germacrene A, trans-cadina-1 (6), 4-diene, epi-cubebol (ZOGHBI et al. 2009b); 7-epi- α -selinene (ZOGHBI et al. 2009b; HERRERO-JÁUREGUI et al. 2011); trans-cadina-1 (2), 4-diene (ZOGHBI et al. 2009b); (E)- γ -bisabolene (LAMEIRA et al. 2009; ZOGHBI et al. 2009a; HERRERO-JÁUREGUI et al. 2011); globulol (ZOGHBI et al. 2009b); humulene epoxide II (ZOGHBI et al. 2009a); epicubenol, cubenol, epi- α -muurolol (ZOGHBI et al. 2009b); e epi- β -bisabolol (LAMEIRA et al. 2009).

Da hidrodestilação de *C. langsdorffi* e do óleo resina de *C. martii*, foram identificados três sesquiterpenos: seline-3-7(11)-diene (GRAMOSA; SILVEIRA, 2005), α -calacorene e gleenol (ZOGHBI; LAMEIRA; OLIVEIRA, 2007). Em função da grande variação que a composição química deste óleo resina apresenta, β -cariofileno, é considerado um marcador químico e o constituinte majoritário deste óleo resina (CASCON; GILBERT, 2000). Contudo, α -copaene foi o maior constituinte de amostras do óleo resina de *C. paupera* e *C. piresii* coletados nos Estados do Acre e Rondônia, respectivamente (ZOGHBI; SILVA; TRIGO, 2009b) e foi também o maior constituinte em amostras de óleos resinas de *C. martii* coletadas no Pará e extraídas por hidrodestilação. Enquanto isso, β -bisaboleno foi o constituinte majoritário de várias amostras de *C. duckei* e *C. reticulata* coletadas no Estado do Pará (LAMEIRA et al. 2009; ZOGHBI et al. 2009a).

Com relação aos diterpenos, pelo menos 15 outros diterpenos não relatados no artigo de revisão de 2002 foram identificados, incluindo quatro com esqueletos tipo kaurane: ent-kaur-16-ene, ent-kaur-16-en-19-al, ent-kaur-16-en-19-ol e 19-nor-kaur-16-en-4 α -ol (GRAMOSA, 2001; GRAMOSA et al. 2010); três esqueletos do tipo clerodane: clerodane-15,18-dioic acid (PINTO et al., 2000), 7 α -acetoxyhardwickiic acid (SPANEVERELLO; VILA, 1994) e 7 α -acetoxybacchotricuneatin D (MONTI; TILIACOS; FAURE, 1996) e oito com esqueleto do tipo labdane: ent-4-epi-agathic acid (GRAMOSA et al. 2010), 3-hydroxycopallic acid (MAHAJAN; FERREIRA, 1971), 3-acetoxy-copallic acid (CASCON; GILBERT, 2000), 14, 15-dinorlabd-8 (17)-en-13-one (TINCUSI et al., 2002), (-)-3- β -hydroxy-15,16-dinorlabd-8(17)-ene-13-one (MONTI; TILIACOS; FAURE, 1996), (-)-15,16-dinorlabd-8(17)-en-3 β ,13-diol (MONTI; TILIACOS; FAURE, 1999), (-)-13R-14,15-dinorlabd-8(17)-ene-3,13-diol (ROMERO; BAPTISTELLA; IMAMURA, 2009) e pauperol (TINCUSI et al., 2002). Existem algumas dúvidas quanto às estruturas exatas destes dois últimos diterpenos. O ent-dinorlabdane (-)-13(R)-14,15-dinorlabd-8(17)-ene-3,13-diol, foi isolado de um óleo resina comercial (ROMERO; BAPTISTELLA; IMAMURA, 2009). Esta substância pode ter sido degradada do 3-hydroxycopallic acid, desde que o óleo resina, sem identificação, tenha sido exposto à luz e a condições de temperaturas que poderiam levar à perda de parte da cadeia. O outro é um C35 methyl ester, uma substância produzida pelo acoplamento de um diterpeno labdanóico e um álcool, originando o ester pauperol, isolado de *C. paupera* (TINCUSI et al., 2002). De acordo com Leandro et al. (2012), esta substância pode não estar presente originalmente no óleo resina, uma vez que os autores relatam que realizaram esterificação (diazometano) antes do isolamento.

2.13.5. Uso medicinal de *Copaifera* sp.

Copaifera langsdorffii Desf. (Fabaceae, Caesalpinioideae), popularmente conhecida como “copaíba” ou “pau d’óleo”, é uma espécie de árvore que é encontrada em todo o Brasil. As folhas desta árvore são usadas na medicina popular, para tratar de cálculo renal. Os derivados do ácido galoilquínico e flavonoides são os principais metabólitos secundários encontrados nas folhas de *C. langsdorffii* e são comumente responsáveis pela efetividade deste tratamento. Óleo resinas de diferentes espécies de *Copaifera* são usados na medicina popular e na indústria cosmética, sem ser dada a devida consideração às diferenças entre elas. Ao se fazer comparações entre as composições dos óleos resinas provenientes de *Copaifera guianensis* Desf. e *Copaifera duckei* Dwyer, espécies agora examinadas e da melhor espécie conhecida, *Copaifera multijuga* Hayne, todas de ocorrência na Amazônia Brasileira, mostram

que variações químicas significantes ocorrem, não somente entre as espécies mas também dentro de uma dada espécie e em uma árvore individualmente. (CASCON; GILBERT, 2000).

A produção de substâncias bioativas pelas plantas ocorre através de diferentes vias metabólicas, gerando grande número de compostos, muitos dos quais somente identificados em determinados grupos de plantas e em concentrações variáveis (MARCANO et al., 2005).

Através da análise por GC/MS, utilizando-se o índice de retenção e comparação com padrões autênticos quando viáveis, foi revelada a presença dos seguintes compostos: β -elemene (RI = 1371), β -cubebene (RI = 1384), α -elemene (RI = 1399), β -caryophyllene (RI = 1415), α -bergamotene (KI = 1426), α -caryophyllene (KI = 1451), α -amorphene (KI = 1469), β -cadinene (KI = 1476), β -selinene (KI = 1484), α -selinene (KI = 1491), β -bisabolene (KI = 1501), δ -cadinene (KI = 1511), α -bisabolene (KI = 1531), um sesquiterpene não conhecido (KI = 1574) e α -cedrol (KI = 1604). Como nenhuma amostra autêntica foi acessível, os compostos β -elemene, α -cubebene, α -elemene, δ -cadinene, α -amorphene, β -selinene, α -selinene, δ -cadinene e α -cedrol foram tentativamente identificados por comparação de espectro e índice de retenção (BONAN et al., 2015).

Na composição química de *Copaifera* spp., foram identificados sesquiterpenos como o β -cariofileno, com propriedades antiendêmica, anti-inflamatória, bactericida e insetífuga. E, o β -bisaboleno, com atividades anti-inflamatória e analgésica (VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002; OLIVEIRA et al, 2006).

O óleo da copaíba é composto de terpenos – principalmente sesquiterpenos e diterpenos. O composto majoritário é comumente o sesquiterpene hidrocarboneto β -cariofileno, que corresponde a aproximadamente metade do óleo, outros sesquiterpenos presentes em quantidades significativas são α -humuleno, α -copaeno, α -bergamoteno e δ -cadineno; entre os diterpenos destacam-se o ácido copálico, ácido kaurenóico, ácido kolavenico e ácido clorechínico (TOBOUTI et al., 2017). É importante ressaltar que embora a composição do óleo de copaíba seja semelhante dentro do gênero, há diferenças dependendo da espécie (ARRUDA et al., 2019).

Portanto, estes autores afirmam que muitos trabalhos têm sido publicados sobre a composição química do óleo resina de copaíba, porém, várias questões permanecem indissolúveis, tais como a composição química das diferentes espécies e a presença de biomarcadores, provavelmente uma combinação de ácidos sesquiterpenos e diterpênicos. Estudos etnofarmacológicos indicam muitas atividades que ainda não foram entendidas através de experimentos farmacológicos. Tanto que, as atividades dos compostos isolados não

explicam a forte atividade do óleo resina cru ou natural. Na verdade, várias substâncias foram descritas, e novos estudos biológicos foram publicados, que vão de forma a desvendar o mecanismo de ação dos sesquiterpenos e diterpenos isolados. Todos esses tópicos ainda precisam de mais investigação, já que o óleo de copaíba é um recurso no qual ainda há muito trabalho a ser feito. Na Tabela 5 estão presentes 23 constituintes do óleo resina e 7 constituintes do óleo essencial de *Copaifera multijuga* Hayne, após análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) de acordo com Deus et al. (2011).

Tabela 5. Composição química do óleo resina e óleo essencial de *Copaifera multijuga* Hayne. (DEUS et al., 2011).

Pico	IR	IK	Componentes	Conc no Óleo resina (%)	Conc. na Fração do óleo essencial F10 (%)
1	20.57	1339	δ -elemeno	0,38	-
2	21.09	1352	α -cubebeno	0,26	-
3	22.19	1382	α -copaeno	3,04	3,29
4	22.82	1391	β -elemeno	0,90	-
5	23.12	1409	α -gurjuneno	0,19	-
6	24.20	1426	β -cariofileno	67,07	57,29
7	24.67	1436	Trans- α -bergamoteno	6,08	5,31
8	24.92	1442	NI	0,25	-
9	25.35	1457	α -humuleno	10,87	9,11
10	25.52	1461	allo-aromadendreno	0,33	-
11	26.35	1477	γ -muuruleno	3,27	1,63
12	27.10	1499	α -muuruleno	0,75	-
13	27.47	1509	β -bisaboleno	1,43	1,08
14	28.02	1524	δ -cadineno	1,34	-
15	28.31	1542	NI	0,10	-
16	28.75	1554	NI	0,12	-
17	29.68	1562	NI	0,62	-
18	30.15	1581	Óxido de cariofileno	0,64	10,34
19	31.45	1595	NI	0,11	-
20	31.88	1625	NI	0,10	-
21	32.20	1645	α -muurolol	0,57	-
22	32.53	1691	juniper cânfora	0,60	-
23	32.81	1700	Acetato de cariofileno	0,30	-

2.13.6. Atividades biológicas com o óleo resina *in natura* de *Copaifera* spp.

A atividade antimicrobiana do óleo resina de copaíba é uma das propriedades frequentemente estudadas e vários trabalhos têm sido avaliados sobre os fungos *A. flavus*, *A. niger*, *A. tamari*, *A. terreus* (SANTOS et al., 2008a; DEUS et al., 2009; DEUS et al., 2011). A atividade fungicida do óleo resina *in natura* de *C. multijuga* e as frações voláteis obtidas por hidrodestilação deste óleo, foram avaliadas *in vitro* sobre fungos filamentosos (*Aspergillus*) e sobre levedura (*Candida*). As amostras comparadas com o antibiótico Nitrato de Miconazole

(MIC = 0,1 – 0,5 µg/mL), demonstrou que a fração volátil mais ativa apresentou um MIC = 0,08 – 0,5 µg/mL) (DEUS et al., 2009; DEUS et al., 2011).

Muitas espécies de *Copaifera* têm sido descritas, mas somente algumas têm estudos biológicos na literatura que avaliem o uso tradicional. Em alguns casos, estes estudos não discriminam entre as espécies estudadas, alguns usam o óleo resina de copaíba comercial. Algumas atividades biológicas e farmacológicas já foram testadas com o óleo de diversas espécies de *Copaifera in natura*, tais como: *Copaifera cearenses* Huber ex Ducke, *C. duckei* Dwyer, *C. langsdorffi* Desf., *C. martii* Hayne; *C. multijuga* Hayne, *C. reticulata* Ducke (SANTOS et al., 2008b; CASTRO-E-SILVA et al., 2004; CORREA et al., 2008; VEIGA-JÚNIOR et al., 2007; MENDONÇA; ONOFRE, 2009; DEUS et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2010; RIBAS; CARREÑO, 2010; CASCON et al., 2000; VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002; SILVA et al., 2003), em estudos como, atividades antimicrobiana, perfusão da pele, antileishmaniose, atenuação de esquia/reperfusão intestinal induzida, anti-inflamatória, inseticida, bactericida, gastroprotetiva, antitumoral, antisséptica, antifúngica, tripanossomida e larvicida contra *Culex quinquefasciatus* Say, Leishmaníase Visceral (LV) canina no Brasil entre outros.

Amaral e Bara (2005), utilizando para controle biológico, a concentração de 0,1% do óleo resina de *Copaifera reticulata*, demonstrou que o óleo possui princípios ativos, sesquiterpenos, que possuem atividade fungicida.

Em sua composição química de *Copaifera* spp., foram identificados sesquiterpenos como o β-cariofileno, com propriedades antiendêmica, anti-inflamatória, bactericida, insetífuga e antifúngica, especificamente sobre *Aspergillus fumigatus* (TOBOUTI et al., 2017). E, o β-bisaboleno, com atividades anti-inflamatória e analgésica (VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002; OLIVEIRA et al, 2006). O óleo de copaíba tem sido usado por mais de 390 anos, entretanto, considerando o tempo de uso empírico, existe um escasso número de publicações sobre suas atividades. Seu óleo essencial é um fitomedicamento comprovadamente eficiente contra alguns microrganismos. Entretanto, os estudos antimicrobianos sobre o óleo de copaíba, podem apresentar algum viés devido à falta de padronização. Neste sentido, Tobouti et al. (2017), através de sua revisão, sumariza recentes trabalhos publicados no período de 2009 a 2016, sobre as atividades antibacterianas e antifúngicas do óleo de copaíba; discute questões que afetam estudos sobre este óleo, sugerindo mais estudos *in vitro* e clínicos.

Diversas atividades biológicas/farmacológicas já foram reportadas em estudos experimentais com óleo de copaíba, entre elas estão atividades antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória, antileishmanial, antinoceptiva, gastroprotetora, antioxidante, entre outros

(LEANDRO et al., 2012; DIEFENBACH et al., 2018; VEIGA-JÚNIOR et al., 2007). A atividade antimicrobiana já foi demonstrada em diversas bactérias patogênicas, gram-negativas e principalmente gram-positivas. Contra fungos, o óleo já foi reportado por exercer atividade fungistática em espécies dos gêneros *Candida*, *Trichophyton* e *Aspergillus*; dentro do gênero *Aspergillus*, a atividade fungistática já foi reportada nas espécies *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* e *A. fumigatus* (TOBOUTI et al., 2017).

2.13.7. Mecanismos de ação de *Copaifera* spp.

Embora as atividades biológicas sejam conhecidas, seus mecanismos de ação não foram completamente elucidados (ARRUDA et al., 2019). A atividade anti-inflamatória e antinoceptiva é presumivelmente devido à sua composição terpênica; os terpenos são conhecidos inibidores do NF- κ B, um importante fator de transcrição de citocinas pró-inflamatórias (BORGES et al., 2019). Já a atividade antimicrobiana está relacionada à natureza lipofílica dos óleos resinas, essa lipofilicidade favorece uma interação entre os componentes do óleo e os lipídios da parede e membrana celular fúngica, interferindo na sua permeabilidade e causando mudanças estruturais (DIEFENBACH et al., 2018; TOBOUTI et al., 2017).

2.13.8. Fungitoxicidade do óleo resina de *Copaifera* spp. no controle de fitopatógeno

Oliveira et al. (2006), utilizando óleo resina de *Copaifera* spp. demonstraram a toxicidade deste óleo contra *R. solani* e *S. rolfsii*, evidenciando que as espécies do gênero *Copaifera*, de uma maneira geral podem ser utilizadas no controle de espécies fúngicas *in vitro*.

De acordo com Lameira (2008), todas as concentrações de óleo resina de *Copaifera duckei* utilizadas no controle da inibição micelial do fitopatógeno *Rizoctonia solani* mostraram-se eficientes em relação à testemunha, onde a inibição do crescimento de *R. solani* foram superiores a 66%, sendo a concentração de 0,75% a de maior poder inibitório, apresentando resultado superior a 76%. De acordo com o mesmo autor, o fitopatógeno *Sclerotium rolfsii* foi inibido eficientemente com o óleo resina da *Copaifera duckei* somente em concentrações superiores a 0,2% onde a inibição do fungo foi superior a 60% na concentração de 0,2% e de 75% na concentração mais elevada, 0,75%. Os resultados mostraram, de uma maneira geral, que à medida que se aumentava a concentração do óleo resina de *Copaifera reticulata* a inibição do crescimento micelial *in vitro* era mais eficiente.

Já para o fungo *M. phaseolina* nenhuma das concentrações utilizadas apresentou resultados na inibição do crescimento micelial superiores a 50%. Este é o primeiro relato da atividade fungitóxicas *in vitro* do óleo resina de *Copaifera* sp. no controle de *Aspergillus nomius*.

2.14. *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd.

2.14.1. Classificação taxonômica

De acordo com o sistema de classificação baseado no The Angiosperm Phylogeny Group (APG) II (2003), citado por Carvalho (2009), *Dipteryx odorata* pertence à Divisão *Angiospermae*; Clado Eurosídeas I; Ordem: *Fabales* (Cronquist classifica como *Rosales*); Família: *Fabaceae* (Cronquist classifica como *Leguminosae*); Subfamília: *Faboideae* (*Papilionoideae*); Gênero: *Dipteryx*; Sinonímia botânica: *Coumarouna odorata* Aubl.

Na Figura 5, estão presentes a inflorescência de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd, o ramo e fruto imaturo; o fruto maduro deiscente com única semente e as sementes de *Dipteryx odorata*.



Figura 5. a. Inflorescência de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd; b. Ramo e fruto imaturo; c. Fruto maduro deiscente com única semente. d. sementes de *Dipteryx odorata*. Foto: Jurema do S. A. Dias.

2.14.2. Botânica

Dipteryx odorata (Aubl) Willd = *Coumarouna* Aublet (*Baryosma Tongo* Gaertner, *Dipteryx odorata* Willd.), é uma espécie nativa da América do Norte, Central e do Sul (OLIVEROS-BASTIDAS et al., 2013; DA CUNHA et al., 2016). Conhecida como Cumaru verdadeiro, Cumarú Amarelo, Cumaru do Amazonas, Cumaruzeiro, Kumbaru, Muirapayé (“árvore dos feiticeiros”), dos aborígenes; Paru – Sinonímia extr.: Cuamara, na Guiana Inglesa; Faux Gaiac e Guayac, na Guyana Francesa; Sarrapia, na Colômbia e na Venezuela, tendo ainda neste país o nome de Yape; Tonka-Bean Tree, dos Norte-americanos (CORRÊA, 1931). O cumaru ou cumaru-ferro comercialmente é conhecido no exterior como “tonka”. O nome genérico *Dypteryx* refere-se à característica das flores por apresentar duas asas, enquanto o epíteto *odorata* se refere ao cheiro forte de cumarina. Pertence à família Fabaceae na classificação da APG II (Cronquist classifica como Leguminosae) (CARVALHO, 2009).

Árvore grande, elegante e frondosa, caule reto até 32 m de altura e 60 cm de diâmetro; casca avermelhada ou amarelo-claro-acinzentada, pouco espessa, com epiderme quebradiça e que se desprende facilmente; folhas grandes, alternas, alado-pecioladas, imparipinadas, compostas de 6 a 8 folíolos alternos, curto-peciolados, com um apêndice chato, linear, depois do último par, sendo os folíolos oblongos ou ovados, arredondado-obliquo-obtusos na base e curto-obtuso-acuminados no ápice, até 20 cm de comprimento e 8 cm de largura, ou pouco mais, coriáceos, rígidos, luzídios, finamente reticulado-nervados, glabros nas duas páginas; estípulas muito caducas; flores vermelhas, muito aromáticas, dispostas em panículas ferrugíneo-pubescentes, tendo as sépalas coriáceas, denso-ferrugíneo-tomentosas, pétalas róseo-lilacinas e estandarte brancacento; ovário glabro, alongado; fruto vagem drupácea, ovóide ou oblonga, pubescente, de 5 a 7 cm, verde-amarelada quando madura, fibrosa e esponjosa, envolvendo uma semente dura, lisa, de 25 a 40 mm, roxo-escura, achatado-oblonga. O fruto desta árvore, embora indeiscente, separa-se facilmente no sentido longitudinal, em duas partes rigorosamente iguais, desde que seja exposto ao sol; a semente é oblonga, levemente comprimida na região do hilo. O tegumento seminal apresenta cutícula delgada e lisa, macrosclereídeos, osteosclereídeos, mesófilo interno e membrana basal. O embrião constitui-se de dois cotilédones e o eixo embrionário retilíneo, formado por plúmula, epicótilo e radícula (CORRÊA, 1931).

De acordo com Bessa et al. (2001), a semente de *D. odorata* é oblonga, levemente comprimida na região próxima ao hilo; tegumento papiráceo, brilhante, liso extremamente marron escuro a claro, menos intenso na superfície interna e passando a opaco, tornando-se enrugado e enegrecido; o tegumento apresenta uma cutícula delgada, lisa, pouco visível,

mesmo com grande aumento e paliçada, constituída por uma camada de célula (macroesclereídeos), fortemente unidas entre si. O hilo é oblongo e subapical. A semente é constituída por dois cotilédones e o eixo embrionário retilíneo, apresentando radícula, epicótilo e plúmula. Foi observado ainda, no eixo embrionário, pequena quantidade de amido e gotículas de óleo.

A semente que o fruto encerra é a famosa “fava de cumarú”, “fava de tanha”, “fava de Tonka”, ou “fava do Tonkin” do comércio (“fava da Índia”, dos antigos portugueses; “feve de Tonka”, dos franceses; “sêmen Tonka”, das farmácias; “Tonka bean” dos Anglo-americanos; “Tonka-bohnen”, dos alemães). Descrita por von Martius no século 19, como antiespasmódica, diaforética, cardíaca e emenagoga (BREITBACH et al., 2013); tais virtudes medicinais resultam da presença da “cumarina”, substância branca, cristalizável em prismas acinaciformes, de sabor acre ao princípio e depois agradável, muito solúvel em água fervente, com o ponto de fusão a 60°C e destilando entre 290°5 e 291°.

Costa (1986) e Oliveira (1991) ressaltam a importância da investigação botânica para a diagnose das espécies medicinais. O conhecimento da morfo-anatomia, da semente de *Dipteryx odorata*, permite sua identificação e distinção de outras espécies, contribuindo assim, para os estudos farmacognósticos da espécie, dada a comprovada ação terapêutica, fornecida pelo princípio ativo da cumarina.

Efetivamente o extrato é um veneno moderador e retardador da respiração e dos movimentos cardíacos, ao mesmo tempo que é um anestésico, como o demonstraram experiências realizadas no Museu Nacional do Rio de Janeiro, em rãs, cobaias e frangos: o extrato “atua sobre o sistema nervoso cérebro-espinhal, donde a anestesia e os fenômenos sensitivo-motores verificados; e age sobre os centros nervosos intra-cardíacos, de modo a tornar as pausas diastólicas mais longas, de onde sístoles compensadoras mais enérgicas, e esgotamento final da atividade do órgão em diástole”, segundo o Dr. Roquette Pinto (CORRÊA, 1931).

Desta espécie foi isolada a partir de sua amêndoa a primeira cumarina em 1820, originando o nome da família das cumarinas; desde então, várias outras cumarinas foram isoladas de outras espécies vegetais, principalmente vegetais superiores (SARKER; NAHAR, 2017).

2.14.3. Atividades antifúngica do óleo *in natura* de *Dipteryx odorata* no controle *in vitro* de *Aspergillus nomius* e *Aspergillus fumigatus*

Assim como acontece com sua fitoquímica, as informações disponíveis a respeito das atividades biológicas de *Dipteryx odorata*, principalmente do óleo de suas amêndoas, são escassas, indicando a necessidade de mais pesquisas experimentais (CARVALHO, 2009).

2.14.4. Farmacológica

De acordo com Carvalho (2009), as sementes são usadas como diaforéticas ou sudoríficas e a partir do cozimento destas sementes e dos frutos, um remédio fortificante é obtido, tendo propriedades anestésicas e auxílio no tratamento de problemas respiratórios e cardíacos. Além de que, o óleo da amêndoa é usado na medicina popular contra úlceras bucais, otite, e problemas no couro cabeludo. Sendo também usado na formulação de venenos para rato, devido a sua capacidade de inibir a coagulação sanguínea.

Extratos obtidos das sementes já foram reportados por exercer atividade acaricida (GLEYE et al., 2003) e algumas de suas moléculas, como a chalcona isoliquiritigenina, apresentaram atividade quimioprotetora em células HeLa (JANG et al., 2003).

2.14.5. Caracterização química de *Dipteryx odorata*

A caracterização química e o potencial fitotóxico dos extratos polares e não-polares proveniente das sementes de *D. odorata* foram realizados por Oliveros-Bastidas et al. (2013). A determinação estrutural, foi acompanhada pela derivatização química e pela análise de GC/MS. A composição química da fração não-polar (hexano e diclorometano) apresentou ácidos graxos, como os maiores constituintes. As frações polar e médio polar (Acetato etílico e etanol:água) continham ácido carboxílico e alto conteúdo de 6,7-Dihidrocumarina- β -D-glicopiranosídeo, que ainda não haviam sido relatados para sementes de *D. odorata*. Os extratos mostraram um nível significativo de atividade fitotóxica, correlacionado ao conteúdo de derivados de cumarina, predominantemente na fração polar. β -glucosídeos dos ácidos cumarínico e o-cumárico foram detectados em extratos do cotilédone, exocarpo e folhas de plântulas de cumaru. A existência destes compostos e a presença de uma β -glucosidase tendo especificidade para o glicosídeo cumarinil, sugere que, *D. odorata*, sintetize cumarina por uma via metabólica similar àquela encontrada em trevo doce (Sweetclover) (HASKINS; GORZ, 1963).

Da Cunha et al. (2016), isolaram e identificaram os flavonóides do endocarpo de *D. odorata*, minimizando custos com solventes, tempo e resíduos, através da cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC). Seis flavonóides, 3',4',7-triidroxiflavona, 3',4',7-triidroxiflavanona, 3',4',6-triidroxiaurona, 3',4',5,7-tetraidroxiflavona, 2',3,4,4'-tetraidroxichalcona e 2',4,4'-triidroxichalcona foram isolados. Os flavonóides 3',4',7-triidroxiflavona e 2',3,4,4'-tetraidroxichalcona foram identificados pela primeira vez nesta espécie. A metodologia, segundo os autores, foi efetiva no isolamento de flavonóides e viável econômica e ambientalmente.

De acordo com Jang et al. (2003), um cassane diterpene, ácido dipteryxico (1) e uma isoflavonolignana, 5-methoxyxanthocercin A (2), bem como quatro compostos ativos conhecidos, isoliquiritigenin (3), 6, 4'-dihydroxy-3'-methoxyaurone (4), sulfuretin (5) e (\pm)-balanophonin (6) e cinco compostos inativos conhecidos, butin, eriodictyol, 7-hydroxychromone, 7,3'-dihydroxy-8,4'-dimethoxyisoflavone e (-)-lariciresinol, foram isolados de um extrato solúvel acetato etílico de sementes de *D. odorata*, usando um bioensaio baseado na indução de quinona redutase (QR) em cultura Hepa 1c1c7 de células de hepatoma de camundongos para monitorar o fracionamento cromatográfico. A estrutura dos compostos 1 e 2 foram elucidadas por interpretação de dados espectroscópicos. A análise de difração de raio-X de monocristal foi usada para confirmar a relativa estereoquímica do composto 1. Os compostos selecionados (3-5) foram avaliados em um ensaio com cultura de órgãos com isoliquiritigenin (3), exibindo 76% de inibição à dose de 10 μ g/ml.

Bajer et al. (2018) empregaram a microextração fase sólida espaço-cabeça, simultaneamente à extração por destilação (SDE) e extração por fluído supercrítico (SFE), para preparar extratos voláteis de *D. odorata*. Um total de 190 compostos foram determinados por cromatografia a gas/espectrometria de massas (GC/MS) em comparação com o índice de retenção. Estes incluíram 156 (HS-SPME), 77 (SDE) e 36 (SFE) compostos (álcoois, compostos carbonílicos, ácidos, estéres, terpenóides, terpenos, lactonas, hidrocarbonetos alifático e aromáticos e outros compostos não categorizados). Uma avaliação semiquantitativa de compostos individuais foi realizada, usando-se cromatografia a gas acoplada a um detector de ionização de chamas. O principal constituinte detectado em todo o extrato foi a cumarina (51 a 85%, independente do método de extração), pertencente ao grupo das lactonas. Uma comparação foi feita entre os três métodos, em termos de perfis voláteis, categorização de compostos e representação individual de grupos de compostos. O extrato preparado por HS-SPME, foi rico em álcoois, carbonilas e ácidos do que em outros extratos. Os resultados

permitiram informações essenciais quanto à aplicação de diferentes tratamentos de tonka bean, nas indústrias de aromas.

2.15. *Danio rerio*

2.15.1. Biologia

Danio rerio (Figura 6) é um peixe teleósteo tropical da família Cyprinidae, descrito pela primeira vez por Francis Hamilton em 1822 no nordeste da Índia. Hoje se tem registro desse animal em outras regiões de planície de inundação da Índia, Paquistão, Nepal e Bangladesh. Em condições naturais, o zebrafish já foi reportado em locais de temperaturas entre 12 e 39 °C, pH entre 5.9 e 9.8, altitudes entre 8 e 1.576 metros, e salinidade entre 0.01 e 0.8. Na natureza, o zebrafish é onívoro, se alimenta de insetos adultos ou larvas, pequenos crustáceos, zooplâncton, algas, restos de plantas e detritos variados. Embora em laboratório possa se reproduzir durante todo o ano, na natureza se reproduz preferencialmente durante as monções de verão (PARICHY, 2015).



Figura 6. *Danio rerio*. Fonte: [https://www.google.com](https://www.google.com;);

2.15.2. Zebrafish como organismo modelo

O zebrafish foi usado pela primeira vez como organismo modelo por George Streisinger, da Universidade de Oregon, em pesquisas de genética e desenvolvimento, que até hoje continuam sendo executadas (PARICHY, 2015). Porém, desde então vem ganhando crescente interesse em outras áreas das pesquisas biomédicas, principalmente na pesquisa de novos fármacos (MACRAE; PETERSON, 2015) e em testes de toxicidade (SIPES; PADILHA; KNUDSEN, 2011). Em 2003, o National Institutes of Health (NIH) ranqueou este organismo modelo como o terceiro mais importante, atrás apenas do rato e camundongo (<http://www.fda.gov/forconsumers/consumerupdates/ucm343940.htm>)

A triagem de moléculas baseada em fenótipo usando zebrafish oferece vantagens por ser feita usando um organismo intacto, ao invés de culturas de células com número de fenótipos limitado, que não podem modelar, por exemplo: dor, sedação, metástases tumorais, tônus vascular e motilidade intestinal. Além disso, ensaios com culturas de células (*in vitro*) dão poucas informações sobre absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADME-Tox), comparados aos ensaios com zebrafish *in vivo* (MACRAE; PETERSON, 2015). Embora outros animais possam ser utilizados como modelos em ensaios *in vivo* (ex: *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans*), o zebrafish tem vantagens em relação a esses por ser um vertebrado, e, portanto, mais próximo filogeneticamente aos humanos.

O uso do zebrafish como organismo modelo tem ainda como vantagem sua extensivamente estudada biologia, devido às pesquisas em genética em desenvolvimento, no qual foi inicialmente utilizado. As vantagens em relação aos roedores incluem menor tempo de desenvolvimento, menor custo e menores restrições legais (HILL et al., 2005). Apesar de ser mais distante filogeneticamente dos humanos comparado aos roedores, o zebrafish possui 82% dos alvos farmacológicos conservados, grande número de vias metabólicas em comum (MACRAE; PETERSON, 2015), 85% de homologia genética em relação aos humanos e sua resposta a substâncias tóxicas comparada aos mamíferos é muito semelhante (HE et al., 2014).

O tamanho reduzido do zebrafish, assim como de seus embriões, favorece não apenas o menor custo de criação, mas também torna necessário menores doses da molécula a ser testada, de reagentes, e permite um grande número de réplicas experimentais agrupadas no mesmo lugar. O peixe possui grande fecundidade, botando entre 200 e 300 ovos em uma manhã a cada 5 ou 7 dias, favorecendo o número de indivíduos usados por ensaio; o seu desenvolvimento é rápido, a maturação sexual ocorre em aproximadamente 100 dias, permitindo tempos de pesquisa menores. Por fim, o fato dos embriões de zebrafish serem transparentes permite fácil visualização dos fenótipos de interesse durante o seu desenvolvimento (HILL et al., 2005).

No estudo de infecções e da imunidade inata, o zebrafish é uma ferramenta poderosa, em parte devido à ausência de uma resposta imunológica integrada e funcional até 4 a 6 semanas após a fertilização; isso permitiu elegantes pesquisas sobre a interação parasita-hospedeiro de vários agentes infecciosos, como bactérias, vírus e fungos (SULLIVAN et al., 2017).

2.15.3. Zebrafish em estudos de toxicidade

Com relação a estudos de toxicidade, o zebrafish é aceito para teste tanto pela FDA (Food and Drug Administration), quanto pela EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Product) (HE et al., 2014). As abordagens de estudos toxicológicos com zebrafish são variadas, podem ser comportamentais, de desenvolvimento e teratogênese, histopatológicas, metabôlicas, taxa de sobrevivência, entre outras. Os estudos toxicológicos com zebrafish são executados não apenas com agentes farmacológicos, mas também com agentes ambientais (BAMBINO; CHU, 2017).

Neste trabalho serão abordados estudos toxicológicos do óleo fixo de *Dipteryx odorata odorata*, sob os aspectos comportamentais e histopatológicos em zebrafish .

2.16. Nanoemulsão como forma de transporte na aplicação de óleos fixos no controle *in vitro* de *A. nomicus* e *A. fumigatus*

Nanoemulsões são dispersões cineticamente estáveis do tipo líquido-líquido com gotículas esféricas de diâmetro na ordem de 100 nanômetros, embora geralmente menor que 500 nanômetros e com índices de polidispersão geralmente baixos (menores que 20%). São formadas por dois líquidos imiscíveis, podendo ser principalmente de água em óleo (W/O) ou de óleo em água (O/W), estabilizados por um estabilizador anfifílico.

O pequeno tamanho de suas gotículas, confere características particulares úteis a essas dispersões, como grande superfície de área por volume, robusta estabilidade, transparência óptica, reologia ajustável, e aumento da absorção. Graças a essas propriedades, as nanoemulsões têm ganhado aplicação em áreas diversas como na liberação controlada de fármacos, alimentos, cosméticos, medicamentos e na síntese de materiais (GUPTA et al., 2016; SINGH et al., 2017; ALI et al., 2017).

Os métodos de preparo de nanoemulsão são divididos em duas categorias: os métodos de baixo e alto aporte de energia; dentre os métodos de alto aporte de energia estão a homogeneização de alta pressão e ultrassonificação, e entre os métodos de baixo aporte estão temperatura de inversão de fase e ponto de inversão de emulsão. As nanoemulsões podem se desestabilizar e eventualmente a solução sofrer cremação e separar-se em fases através da combinação das gotículas (coalescência), agregação das gotículas sem combinarem-se (floculação), e por formação de gotículas maiores a partir da incorporação das gotículas menores (Ostwald ripening) (GUPTA et al., 2016). Entretanto, comparada às dispersões com gotículas maiores, as nanoemulsões tem maior estabilidade, isso ocorre devido ao tamanho de

suas gotículas, que está mais sujeita ao movimento browniano que o efeito da gravidade ou viscosidade (ALI et al., 2017).

A adição do estabilizador – o emulsificante – é imprescindível para o preparo da nanoemulsão, pois diminui a tensão superficial, que é a quantidade de energia por unidade de área entre a água e o óleo; o emulsificante também estabiliza a nanoemulsão através de interações eletrostáticas repulsivas e impedimento estérico. Surfactantes são geralmente utilizados como emulsificante, mas algumas proteínas e lipídeos também já foram usados.

Entre as aplicações das nanoemulsões na indústria farmacêutica está sua capacidade de aumentar a biodisponibilidade de compostos ativos administrados oralmente, o que também pode ser útil na indústria de nutracêuticos e suplementos) não só oralmente, as nanoemulsões podem aumentar a eficiência de fármacos aplicados dermicamente, transdermicamente, por via venosa, intranasal, ou mesmo ocular. As formas de administração da nanoemulsão também podem variar, elas podem estar em forma líquida, creme, spray, gel, aerossol, ou espuma (SINGH et al., 2017), por fim, as nanoemulsões tem a vantagem de poder solubilizar tanto compostos hidrossolúveis quanto lipossolúveis (ALI et al., 2017).

Soliman (2017) enfatizou as vantagens do uso de nanopartículas, incluindo-se as nanoemulsões como sistema de administração de fármacos antifúngicos. De acordo com esse autor, os agentes antifúngicos são hidrofóbicos, causando baixa solubilidade em água, baixa biodisponibilidade por administração oral e poucas opções de formulação (ex: clotrimazole, miconazole, econazole, etc). Além disso, administrados sistemicamente há o risco de toxicidade, um exemplo disso é a anfotericina-B, que pode ser tóxica para os rins. Isso poderia ser contornado empregando nanoemulsões, que podem resolver também problemas de permeabilidade limitada do tecido a ser remediado, farmacocinética baixa da droga, e efeitos colaterais. Estudos com nanoemulsões de agentes antifúngicos têm mostrado que na forma de nanoemulsão, essas drogas têm apresentado maior efeito comparado ao fármaco na forma livre, isso se deve à maior permeabilidade em membranas biológicas por meio das nanoemulsões.

3. REFERÊNCIAS

ALI, A.; ANSARI, V. A.; AHMAD, U.; AKHTAR, J.; JAHAN, A. Nanoemulsion: An Advanced Vehicle For Efficient Drug Delivery. DOI. <https://doi.org/10.1055/s-0043-115124> Published online: 2017 Drug Res © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York ISSN 2194-9379.

ALMEIDA, J.C. Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne-Leguminosa, na Amazônia Central. 1 – Germinação. *Acta Amazonica*, v.11, n.1, p. 3-11, 1998.

ALVES DE SOUZA, B. A. et al. Effects of Andiroba oil (*Carapa guianensis*) on wound healing in alloxan-diabetic rats. *International Archives of Medicine*, v. 10, n. October, 28 out. 2017.

AMARAL, M.F.Z.J.; BARA, M. T. F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. *Revista Eletrônica de Farmácia* 2: 5-8. 2005.

ANVISA. RESOLUÇÃO-RDC Nº 274, DE 15 DE OUTUBRO DE 2002. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) a tomar ... Disponível em URL: <http://www.anvisa.gov.br> [dezembro 2001]. 3. ... Reapresentado em 21/2/2002.

ARRUDA, C.; MEJÍA, J. A. A.; RIBEIRO, A, V. P.; BORGES, B, C. H. G.; MARTINS, B. C. H.G.; VENEZIANIB, R. C. S.; AMBRÓSIO, B, S. R.; BASTOSA, J. K. Occurrence, chemical composition, biological activities and analytical methods on *Copaifera* genus —A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 109 (2019) 1-20.

ARRUS, K.; BLANK, G.; CLEAR, R.; HOLLEY, R.A.; ABRAMSON, D. Microbiological and aflatoxin evaluation of Brazil nut pods and the effects of unit processing operations. *J. Food Prot.* 2005, 68:1060-1065.

BAMBINO, K.; CHU, J. Zebrafish in Toxicology and Environmental Health. *Current Topics in Developmental Biology*, Volume 124 # 2017 Elsevier Inc. ISSN 0070-2153

BAQUIÃO, A. C.; ZORZETE, P.; REIS, T. A.; ASSUNÇÃO, E.; VERGUEIRO, S.; CORREA, B. Mycoflora and mycotoxins in field samples of Brazil nuts. *Food Control* 2012, 28: 224-229. 2012

BAQUIÃO, A. C.; OLIVEIRA, M. M. M.; REIS, T. A.; ZORZETE, P.; ATAYDE, D. D.; CORREA, B. Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. *Food Chem.*, 139:1127-1132. 2013.

BAYMAN, P.; BAKER, J.; MAHONEY, N. *Aspergillus* on tree nuts. *Mycopathologia*, 155: 161-169. 2002.

BENNETT, J.W.; KLICH, M. (2003) Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 497-516.doi.org/10.1128/CMR.16.3.497-516. 2003.

BESSA, D.T.O.; MENDONÇA, M. S. de; ARAÚJO, M. G. P. de. Morfo-anatomia de sementes de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Will. (Fabaceae) como contribuição ao estudo farmacognóstico de plantas da região amazônica. *Acta Amazônica* 31(3):357-364, 2001.

BETTIOL, W. (Ed.). Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna: Embrapa – CNPDA, 1991. 388p. (Embrapa CNPDA. Documentos, 15).

BONAN, R. F., et al. (2015). "In vitro antimicrobial activity of solution blow spun poly(lactic acid)/polyvinylpyrrolidone nanofibers loaded with Copaiba (*Copaifera* sp.) oil." *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 48: 372-377.

BORGES, R. S. et al. *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity and mechanisms of action involved. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 229, n. October 2018, p. 29–45, 2019.

BOUFLEUR, N. T. Aspectos ecológicos da Andiroba (*Carapa guianensis* Aublet.; Meliaceae) visando o seu manejo e conservação. 2004. 86f. Dissertação (Mestrado em ecologia e manejo dos recursos naturais) – Universidade Federal do Acre – Rio Branco, 2004.

BRASIL. Portaria MAARA No.183 de 21 de março de 1996. Diário Oficial da União, Brasília (DF), 25 mar 1996. Seção I. p. 4929.

BULLERMAN, L. B. (1979) Significance of Mycotoxins to Food Safety and Human Health. *Journal of Food Protection*: January 1979, Vol. 42, No. 1, pp. 65-86.

BURDON, J.J; SILK, J. Souces and Patterns of Diversity in Plant-Pathogenic fungi. Published on line: 20 Feb.2007/[httpqdoi.org/10.1094/Phyto.1997.87.7.664](http://qdoi.org/10.1094/Phyto.1997.87.7.664).

CALDERARI, T.O.; IAMANAKA, B.T.; FRISVAD, J.C.; PITT, J.I.; SARTORI, D.; PEREIRA, J.L.; FUNGARO, M.H.P.; TANIWAKI, M.H., 2013. The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in Brazil nuts: from rainforest to consumer. *Int. J. Food Microbiol.* 2013, 160:267-272.

CARDWELL, K. F.; COTTY, P.J. Distribution of *Aspergillus* section *Flavi* among field soils from four agroecological zones of the Republico of Bénin, West Africa. *Plant Dis.* v. 86. P. 434-439. 2002.

CARVALHO, P. E. R. Cumaru-Ferro *Dipteryx odorata*. Embrapa, 2009.

CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. *Phytochemistry* 2000., 55, 773-778.

CASTRO-E-SILVA, O., JR.; ZUCOLOTO, S.; RAMALHO, F.S.; RAMALHO, L.N.Z.; REIS, J.M.C.; BASTOS, A.A.C.; BRITO, M.V.H. Antiproliferative activity of *Copaifera duckei* oleoresin on liver regeneration in rats. *Phytother. Res.* 2004, 18, 92–94.

CHRISTENSEN, W. B. Urea Decomposition as a Means of Differentiating *Proteus* and *Paracolon* Cultures from Each Other and from *Salmonella* and *Shigella* Types. *J Bacteriol.* 1946 Oct;52(4):461–466.

CIEGLER, A. Fungi that produce mycotoxins: condition and occurrence. *Mycopathology*, v. 65, p. 5-11. 1978.

CORREIA, A.F.; SEGOVIA, J.F.O.; GONÇALVES, M.C.A.; OLIVEIRA, V.L.; SILVEIRA, D.; CARVALHO, J.C.T.; KANZAKI, L.I.B. Amazonian plant crude extract screening for activity against multidrug-resistant bacteria. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 12, 369–380. 2008.

CORREA, M.P. Dicionário de plantas uteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: MINAGRI, v.2. p.311. 1931.

COSTA, A.F. Farmacognosia. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 1, 1032p. 1986.

DA CUNHA, C. P.; GODOY, R. L. O.; BRAZ FILHO, R. Isolation of Flavonoids from *Dipteryx odorata* by High Performance Liquid Chromatography. *Rev. Virtual Quim.*, 2016, 8 (1), 43-56. Data de publicação na Web: 3 de janeiro de 2016 <http://rvq.sbq.org.br>

DEUS, R. J. A.; CARVALHO, A. S. C.; BANNA, D. A. D. S.; ARRUDA, M. S. P.; ALVES, C. N.; SANTOS, A. S. Efeito fungitóxico *in vitro* do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). *Ver. Bras. Pl. Med.*, 11, 347-353. 2009.

DEUS, R. J. A.; ALVES, C. N.; ARRUDA, M. S. P. Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). *Ver. Bras. Pl. Med.* 2011, 13, 1-7.

DIEFENBACH, A. L. *et al.* Antimicrobial activity of copaiba oil (*Copaifera* spp.) on oral pathogens: Systematic review. *Phytotherapy Research*, v. 32, n. 4, p. 586–596, 2018.

DUCKE, A.; As Leguminosas da Amazônia Brasileira; Ministério da Agricultura: Rio de Janeiro, 1939, p. 56.

EL KOURY, A.; ATOUI, A.; RIZK, T.; LTEIF, R.; KALLASSY, M.; LEBRIHI, A.: Differentiation between *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* from Pure Culture and Aflatoxin-Contaminated Grapes Using PCR-RFLP Analysis of aflR-aflJ Intergenic Spacer. *J Food Sci.* 2011, 76:M247–M253.

FERRAZ, I.; CAMARGO, J. L.; SAMPAIO, P. DE T. B. Andiroba - *Carapa guianensis* Aubl. *Cararapa procera* D. C. Meliaceae. In: FERRAZ, I.; CAMARGO, J. L.; SAMPAIO, P. DE T. B. (Eds.). Manual de Sementes da Amazônia. Manaus: INPA, 2003. v. 1p. 1–2.

FRANDBERG, E.; PITT, J.; OLSEN, M. Quality control of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* agar and comparison with dichloran 18% glycerol agar: a collaborative study. *International Journal of Food Microbiology* 89 (2003) 99 – 102.

FREIRE, F.C.O.; KOZAKIEWICZ, Z.; PATERSON, R.M. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. *Mycopathologia*, 2000, 149: 13-19.

FREITAS-SILVA; VENÂNCIO, A. Brazil nuts: Benefits and risks associated with the contamination by fungi and mycotoxins. *Food Res. Int.* 2011.

FRISVARD, J. C.; THRANE, U. 1987. Standardized high performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkylphenone retention indices and UV-VIS spectra (diode array detection). I. Chromatogr. A 404, 195-204.

GABRIEL, V. A Amazônia e a sabedoria do seu povo. Disponível em: <<http://www.amazonia.com.br/canais/beleza/chama3.asp>>. Acesso em: 13 de junho de 2007.

GEISER, G. M.; DORNER, J. W.; HORN, B. W. TAYLOR, J. W. The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium production in *A. flavus* and *A. oryzae*. Fungal Genet Biol. 31: 169-179. 2000.

GLEYE, C. *et al.* Acaricidal activity of tonka bean extracts. Synthesis and structure-activity relationships of bioactive derivatives. Journal of Natural Products, v. 66, n. 5, p. 690–692, 2003.

GONÇALVES, S. S; STCHIGEL, A. M.; CANO, J. F.; GODOY-MARTINEZ, P. C.; COLOMBO, A. L.; GUARRO, J: *Aspergillus novoparasiticus*: a new clinical species of the section Flavi. Med Mycol 2012, 50:152–160.

GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; CAVALCANTI, B. C.; FERREIRA, J. R. O.; ALMEIDA, F. S.; RAO, V. S.; COSTA-LOTUFO, L. V.; ODORICO-DE-MORAES, M.; PESSOA, C. Chemistry and pharmacology of *Copaifera langsdorffii* Desf.: Na overview. Rec. Prog. Med. Plants, 2010, 27, 235-260.

GRAMOSA, N. V; SILVEIRA, E. R. Volatiles constituents of *Copaifera langsdorffii* from the Brazilian Northeast. J. Essent. Oil Res. 2005, 17, 130-132.

GRAMOSA, N. V. Estudo Químico-farmacológico de *Copaifera langsdorffii* Desf. Doctoral Tesis in Chemistry. Federal University of Ceará, Brazil, 2001.

GUPTA, A.; ERAL, H. B.; HATTON, T. A.; DOYLE, P. S. Nanoemulsions: formation, properties and applications. Soft Matter, v. 12, p. 2826-2841, 2016.

HASKINS, F. A.; GORZ, H. J. Glucosides of Coumarinic and *o*-Coumaric Acids in the Tonka Bean. DOI: 10.1126/science.139.3554.496

HE, J. H.; GAO, J. M.; HUANG, C. J.; LI, C. Q. Zebrafish models for assessing developmental and reproductive toxicity. ELSEVIER. Neurotoxicology and Teratology. 42. 2014. 35-42.

HERRERO-JÁUREGUI, C.; CASADO, M. A.; ZOGHBI, M. G. B.; MARTINS-DA-SILVA, R. C. V. Chemical variability of *Copaifera reticulata* Ducke oilresin. Chem. Biodivers. 2011, 8, 674-685.

HILL, A. J.; TERAOKA, H.; HEIDEMAN, W.; PETERSON, R. E. “Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity”, toxicological Sciences. 86, 6-19. 2005.

HOCKING, A. D.; PITT, J. I. Dichloran-Glycerol Medium for Enumeration of Xerophilic Fungi from Low-Moisture Foods. Applied and Environmental Microbiology, vol. 11, n. 3, p. 488-492, 1980.

- HUSSEIN, S.H.; BRASEL J.M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, Amsterdam, v.167, n.2, p.101-134, 2001.
- IAMANAKA, B.T.; NAKANO, F.; LEMES, D.P.; FERRANTI, L.S.; TANIWAKI, M.H., 2014. Aflatoxin evaluation in ready-to-eat Brazil nuts using reversed phase liquid chromatography and post column derivatisation. *Food Addit. Contam. A*. 2014, 31: 917-923.
- INOUE, T. et al. Carapanosins D—F from the Seeds of Andiroba (*Carapa guianensis*, Meliaceae) and Their Effects on LPS-Activated NO Production. *Molecules*, v. 23, n. 7, p. 1778, 19 jul. 2018.
- INOUE, T. MATDUI, Y. KIKOCHI, T. et al. Guianolides A and B, New carbon skeletal Limonoids from the seed of *Carapa guianensis*. *Organic letters*, v. 15, n. 12, p, 3018 – 3021, 2013.
- JANG, D. S.; PARK, E. J.; HAWTHORNE, M. E.; VIGO, J. G.; GRAHAM, J. S.; CABIESES, F.; SANTARSIERO, B. D.; MESECAR, A. D. ; FONG, H. H. S.; MEHTA, R. G.; PEZZUTO, J. M. AND KINGHORN, A. D. Potential Cancer Chemopreventive Constituents of the Seeds of *Dipteryx odorata* (Tonka Bean). *Journal of Natural Products*. © Copyright 2003 by the American Chemical Society and the American Society of Pharmacognosy Volume 66, Number 5 May 2003.
- JESUS, F. L. M. et al. Preparation of a Nanoemulsion with *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) Oil by a Low-Energy/Solvent-Free Method and Evaluation of Its Preliminary Residual Larvicidal Activity. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2017, 2017.
- KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETTI, J. W. Fungal secondary metabolism – Biochemistry to genomics. *Nature Publishing Group – Nature Reviews*, v. 3, p. 937-947. 2005.
- KLISCH, M. A. Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycoscience*, 48, p.71-80, 2007.
- KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, O. A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. ed. *Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. 3a. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. V. 2. 774p.
- KING, A. D., A. D. HOCKING, AND J. I. PITT. 1979. Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 37:959-964.
- KURTZMAN, C. P.; HORN, B. W.; HESSELTINE, C. W. 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamaritii*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 53 (3): 147-158.
- LAMEIRA, O. S.; MARTINS- da-SILVA, R. C. V.; ZOGHBI, M.G.B.; OLIVEIRA, E.C.P. Seasonal variation in the volatiles of *Copaifera duckei* Dwyer growing wild in the state of Pará – Brazil. *J. Essent. Oil Res.* 2009, 21, 105-107.
- LAMEIRA, C. N.; LAMEIRA, O. A.; OLIVEIRA, E. C. P. 2008. Atividade do óleo de copaíba no crescimento micelial *in vitro* de fitopatógenos. In: Congresso Brasileiro de Olericultura, 48. *Resumos...*Maringá: ABH. p. S2462-2467(CD –ROM):Disponível em www.abhorticultura.com.br/

LAMOTH, F. *Aspergillus fumigatus* – Related Species in clinical Practice. Front Microbiol. 2016, May 17; 7; 683. Doi:10.3389/fmicb.2016.00683.

LEE, C. Z.; LIOU, G. Y.; YUAN, G. F.: Comparison of the aflR gene sequences of strains in *Aspergillus* section Flavi. Microbiology. 2006, 152:161–170.

LEANDRO, L. M.; VARGAS, F. DE S.; BARBOSA, P. C. S.; NEVES, J. K. O.; SILVA, J. A. DA; VEIGA-Jr., V. F. Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) Oleoresins. Molecules, 2012, 17, 3866-3889; doi: 10.3390/molecules17043866.

LEESON, S., DIAZ, G. J. & SUMMERS, J. D. Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins. Guelph, Ontario: University Books, 1995. p.249-280.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais na Amazônia. Nova Odessa, (SP): Instituto Plantarum, 2002. 512p.

MACIEL, M.A.M; PINTO, A.C.; VEIGA Junior, V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. Química Nova, v.25. n.3. p.429-438, 2002.

MACRAE, C. A.; PETERSON, R. Zebrafish as tools for drug Discovery. NATURE REVIEWS | DRUG DISCOVERY VOLUME 14 | OCTOBER 2015 | 721

MAISTRO, E.L.; CARVALHO, J.C.T.; CASCON, V.; KAPLAN, M.A.C. *In vivo* evaluation of the mutagenic potential and phytochemical characterization of oleoresin from *Copaifera duckei* Dwyer. Genet. Mol. Biol. 2005, 28, 833–838.

MAHAJAN, J. R; FERREIRA, G.A.L. New diterpenoids from copaiba oil. Na. Acad. Bras. Cienc. 1971, 43, 611-613.

MARCANO, D. A. de; VARGAS, N.; PIRE, A. Efecto de extractos vegetales y fungicidas sintéticos sobre el crecimiento micelial *in vitro* de *Sclerotium rolfsii* y *Thielaviopsis basicola*. Rev. Fac. Agron. (LUZ), 22: 315-323. 2005.

MARQUES, E. P.; CAVALCANTE, G. H. R.; CAVALCANTE, K. S. B.; MARTINIANO, L. C.; MARQUES, A. L. B. Estudo viscosimétrico de polióis a base do óleo de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.). Revista Virtual de Química, v.8, n.3, p.926-944, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20160067>.

MASSI, F. P.; VIEIRA, M. L. C.; SARTORI, D.; PENHA, R. E. S.; MUNHOZ, C. F.; FERREIRA, J. M.; IAMANAKA, B.T.; TANIWAKI, M.H.; FRISVAD, J.C.; FUNGARO, M.H.P. Brazil nuts are subject to infection with B and G aflatoxin-producing fungus, *Aspergillus pseudonominus*. Int. J. Food Microbiol. 2014, 186:14-21

MECCIA, G. QUINTERO, P. ROJAS, L. B. et al. Chemical composition of the essential oil from the leaves of *Carapa guianensis* collected from Venezuelan Guayana and the antimicrobial activity of the oil and crude extracts. Natural product communications, v. 8, n. 11, p. 1641-1642, 2013.

MEIS, J. F.; CHWDHARY, A.; RHODES, J. L.; FISHER, M. C.; VERWEIJ, P. E. Clinical implications of globally emerging azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2016 Dec 5; 371(1709): 20150460. doi: 10.1098/rstb.2015.0460

MENDONÇA, D.E.; ONOFRE, S.B. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaiba – *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). *Rev. Bras. Farmacogn.* 2009, 19, 577–581.

MENDONÇA, F.A.C.; SILVA, K.F.S.; SANTOS, K.K.; RIBEIRO, K.A.L., JR.; SANT'ANA, A.E.G. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *Fitoterapia* 2005, 76, 629–636.

MIDORIKAWA, G. E. O.; SOUSA, M. de L. M. de; SILVA, O. F.; DIAS, J. do S. A.; KANZAKI, L. I. B.; MESQUITA, R. M. L. C.; GONÇALVES, R. C.; ÁLVARES, V. S.; BITTENCOURT, D. M. C.; MILLER, R. N. G. Characterization of *Aspergillus* species on Brazil nut from the Brazilian Amazonian region and development of a PCR assay for identification at the genus level. *BMC Microbiology*, 2014, 14:138.

MILHOMEM-PAIXÃO, S. S. R. *et al.* The lipidome, genotoxicity, hematotoxicity and antioxidant properties of andiroba oil from the Brazilian Amazon. *Genetics and Molecular Biology*, v. 39, n. 2, p. 248–256, 2016.

MIRANDA JÚNIOR, R. N. C. *et al.* Antiplasmodial activity of the andiroba (*Carapa guianensis* Aubl., Meliaceae) oil and its limonoid-rich fraction. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 142, n. 3, p. 679–683, ago. 2012.

MIYAKE, T.; ISHIMOTO, S.; ISHIMATSU, N.; HIGUCHI, K.; MINOURA, K.; KIKUCHI, T.; YAMADA, T.; MURAOKA, O.; TANAKA, R. Carapanolides T-X from *Carapa guianensis* (Andiroba) Seeds. *Molecules*, v.20, n.11, p.20955-20966, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules201119737>

MONTI, H.; TILIACOS, N.; FAURE, R. Two diterpenoids from copaiba oil. *Phytochemistry*, 1996, 42, 1653-1656.

MONTI, H.; TILIACOS, N.; FAURE, R. Copaiba oil: Isolation and characterization of a new diterpenoid with the dinorlabdane skeleton. *Phytochemistry*, 1999, 51, 1013-1015.

MONTIEL, D.; DICKINSON, M. J.; LEE, H. A.; DRYER, P. S.; JEENES, D. J.; ROBERTS, I. N.; JAMES, S.; FULLER, L. J.; MATSUCHIMA, K.; ARCHER, D. B.: Genetic differentiation of the *Aspergillus* section *Flavi* complex using AFLP fingerprints. *Mycol Res*, 2003, 107:1427–1434.

MOORE, G.G.; MACK, B.M.; BELTZ, S.B. Genomic sequence of the aflatoxigenic filamentous fungus *Aspergillus nomius*. *BMC Genomics*. 16:551. 2015. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1719-6>.

MORI, S. A.; PRANCE, G. T. Phenology of the Lecythidaceae. *Memoirs of the New York Botanical Garden*. Mew York: New York Botanical Garden. 44:124-136p. 1987.

MORIKAWA, T. *et al.* Collagen Synthesis-Promoting Effects of Andiroba Oil and its Limonoid Constituents in Normal Human Dermal Fibroblasts. *Journal of Oleo Science*, v. 67, n. 10, p. 1271–1277, 2018.

NINOMIYA, K. *et al.* Hepatoprotective limonoids from andiroba (*Carapa guianensis*). *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 4, 2016.

O'GORMAN, C. M. FULLER, H. T. DYER, P. S. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. ©2008 Macmillan Publishers Limited doi:10.1038/nature07528.

OLIVEIRA, F., AKISUE, G., AKISUE, M.K. *Farmacognosia*. São Paulo: Atheneu. 412p. 1991.

OLIVEIRA, I. D. S. D. S. *et al.* *Carapa guianensis* Aublet (Andiroba) Seed Oil: Chemical Composition and Antileishmanial Activity of Limonoid-Rich Fractions. *BioMed Research International*, v. 2018, 2018.

OLIVEIRA, R.V.M.; OHARA, M.T.; VILA, M.M.D.C.; GONÇALVES, M.M. *In vitro* evaluation of copaíba oil as a kojic acid skin enhancer. *Braz. J. Pharm. Sci.* **2010**, *46*, 363–370.

OLIVEIRA, B. R. de; RESENDE, D. B.; PICCOLI, R. H. ; BATISTA, L. R. Identificação de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger* produtores de micotoxinas em castanha-do-brasil comercializada no município de Lavras/MG. In.: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 11º, 2006, Curitiba, Resumos... Área: Microbiologia, Micotoxicologia e Biotecnologia

OLIVEROS-BASTIDAS, A., *et al.* (2013). "Chemical characterization by GC-MS and phytotoxic potential of non-polar and polar fractions of seeds of *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd. From Venezuelan regions." *Química Nova* **36**(4): 502-506.

OLSEN, M.; JOHNSON, P.; MOLLER, T.; PALADINO, R.; LINDBLAD, M.: *Aspergillus nomius*, an important aflatoxin producer in Brazil nuts? *World Mycotoxin J.*, 2008, 1:123–126.

PACHECO, A. M.; SCUSSEL, V. M. *Castanha-do-brasil: da floresta tropical ao consumidor*. Florianópolis: Ediograf, 2006.

PARICHY D. M. Advancing biology through a deeper understanding of zebrafish ecology and evolution. *eLife* 2015;4:e05635. DOI: 10.7554/eLife.05635

PENIDO, C. *et al.* Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on allergen-induced vascular permeability and hyperalgesia. *Inflammation Research*, v. 54, n. 7, p. 295–303, 2005.

PEREIRA, T. B. *et al.* *In vitro* and *in vivo* anti-malarial activity of limonoids isolated from the residual seed biomass from *Carapa guianensis* (andiroba) oil production. *Malaria Journal*, v. 13, n. 1, p. 4–11, 2014.

PIERI, F.A; MUSSI, M.C.; MOREIRA, M.A.S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, v.11, n.4, p.465-472, 2009.

PILDAIN, M. B.; FRISVAD, J. C.; VAAMONDE, G.; CABRAL, D.; VARGA, J.; SAMSON, R. A.: Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *Int J Syst Evol Micr.*, 2008, 58:725–735.

PINTO, A.C.; BRAGA, W.F.; REZENDE, C.M.; GARRIDO, F.M.S.; VEIGA, V.F. JR.; BERGTER, L.; PATITUCCI, M.L.; ANTUNES, O.A.C. Separation of Acid Diterpenes of *Copaifera cearenses* Huber ex Ducke by flash chromatography using potassium hydroxide impregnated silics gel. *J. Braz. Chem. Soc.* 2000, 11, 355-360.

PITT, J. I. Xerophilic fungi and the spoilage of foods of plant origin, p. 273-307. In R. B. Duckworth (ed.), *Water relations of foods*. Academic Press Inc., London. 1975.

PITT, J.I. & HOCKING, A.D. Influence of solute and hydrogen ion concentration on the water relations of some xerophilic fungi. *Journal of General Microbiology* 101,3540. 1977.

PYROZYNSKI, K.A.; HAWKSWORTH, D.L. Coevolution of fungi with plants and animals: introduction and overview. In: PIROZINSKY, K.A.; HAWKSWORTH, D.L. *Coevolution of fungi with plants and animals*. London: Academic Press, 1988. p. 1-29. 1988.

QI, S.H. WU, D. G. ZHANG S. LUO, X. D. Constituents of *Carapa guianensis* Aubl. (Meliaceae). *Pharmazie*. 2004;59(6):488-90.

RIBAS, J.; CARREÑO, A.M. Avaliação do uso de repelentes contra picada de mosquitos em militares na Bacia Amazônica. *An. Bras. Dermatol.* 2010, 85, 33–38.

REIS, T. A.; OLIVEIRA, T. D.; BAQUIÃO, A. C.; GONÇALVES, S. S.; ZORZETE, P.; CORRÊA, B.: Mycobiota and mycotoxins in Brazil nut samples from different states of the Brazilian Amazon region. *Int J Food Microbiol.* 2012, 159:61–68.

RIGAMONTE AZEVEDO, O.C. et al. Potencial de produção de óleo-resina de copaíba (*Copaifera* sp.) de populações naturais do sudoeste da Amazônia. *Revista Árvore*, v.30, n.4, p.583-91, 2006.

RODRIGUES, P.; VENÂNCIO, A.; KOZAKIEWICZ, Z.; LIMA, N.: A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. *Int J Food Micro* 2009, 129:187–193.

RODRIGUES, P.; SOARES, C.; KOZAKIEWICZ, Z.; PATERSON, R.; LIMA, N.; VENÂNCIO, A.: Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins. In *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Edited by Méndez-Villas A. Badajoz: Formatex; 2007, 527–534.

ROEBUCH, B.D.; MAXUILENKO, Y.Y. Biochemical mechanism and biological implications of the toxicity of aflatoxins as related to aflatoxin carcinogenesis. In: *THE TOXICOLOGY of aflatoxins*. London: Academic Press, 1994. p. 27-43.

ROMERO, A.L.; BAPTISTELLA, L.H.B.; IMAMURA, P.M. Absolute configuration of some dinorlabdanes from the copaíba oil. *J. Braz. Chem. Soc.* 2009, 20, 1036-1040.

RONDON, F.C.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; ACCIOLY M.P.; MORAIS S.M.; ANDRADE-JÚNIOR, H.F.; CARVALHO, C.A.; LIMA J.C.; MAGALHÃES, H.C.R. In vitro efficacy of

Coriandrum sativum, *Lippia sidoides* and *Copaifera reticulata* against *Leishmania chagasi* Rev. Bras. Parasitol. Vet, 21 (2012), pp. 185-191

ROSMANINHO, J.F.; OLIVEIRA, C.A.F.; BITTENCOURT, A.B.F. Efeitos das micotoxinoses crônicas na produção avícola. Arquivos do Instituto de Biologia, v.68, p.107-114, 2001.

SABINO, M. Retrospectiva e situação atual das micotoxinas. In: Encontro Nacional de Micotoxinas, 11, 2004. Piracicaba. Resumos...Piracicaba: Laboratório de Micotoxinas – LAN/ESALQ-USP, 2004. p. 10-12.

SAITO, M.; TSURUTA, O.; SIRIACHA, P.; KAWASUGI, S.; MANABE, M.; BUANGSUMON, D. Distribution and aflatoxin productivity of the atypical strains of *Aspergillus flavus* isolated from soils in Thailand. Proc. Jpn. Assoc. Mycological. V. 24, p. 41-46, 1986.

SAITO, M., TSURUTA, O., SIRIACHA, P.; MANABE, M. Atypical strains of *Aspergillus flavus* isolated in maize fields. Japan Agricultural Research Quarterly 23:151–154. 1989.

SAMSON, R.A.; VISAGIE, C.M.; HOUBRAKEN, J. et al. Phylogeny, Identification and Nomenclature of the genus *Aspergillus*. Studies in Mycology. 78:141-173. 2014.

SAMSON, R. A.; VARGA, J.: What is a species in *Aspergillus*? Med Mycol, 2009, 47(Suppl 1):13–20.

SANTOS, A.O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; VEIGA, V.F., JR.; PINTO, A.C.; NAKAMURA, C.V. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2008a, 103, 277–281.

SARKER, S.D.; NAHAR, L. Progress in the Chemistry of Naturally Occurring Coumarins. © Springer International Publishing AG 2017 A.D. Kinghorn, H. Falk, S. Gibbons, J. Kobayashi (eds.), Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, Vol. 106, DOI 10.1007/978-3-319-59542-9_3

SCHOCH, C. L; SEIFERT, K. A; HUHDORF, S. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109: 6241–6246. 2012.

SCHEUERELL, S. MAHAFFEE, W. Compost Tea: Principles and Prospects For Plant Disease Control. Compost Science & Utilization (2002), vol. 10 N° 4. 313-338.

SCOTY, P. M. Natural poisons. In: HELRICH, K. (Ed.) Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th ed. Washington: AOAC, 1990. 1193p.

SHANLEY, P. et al. (EDS.). Fruit trees and useful plants in Amazonian life. English ed ed. [s.l.] Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2011.

SILVA, I. G.; ZANON, V. O. M.; SILVA, H. H. G. Larvicidal activity of *Copaifera reticulata* Ducke oil-resin against *Culex quinquefasciatus* say (Diptera: Culicidae). Neotrop. Entomol. 2003, 32, 729–732.

SILVA, T. M. JARDIM, F. C. S. SILVA, M. S. SHANLEY, P. O. MERCADO DE AMÊNDOAS DE *Dipteryx odorata* (CUMARU) NO ESTADO DO PARÁ. FLORESTA, Curitiba, PR, v. 40, n. 3, p. 603-614, jul./set. 2010. (2015)

SIPES, N. S. PADILLA, S. KNUDSEN, T. B. Zebrafish—As an Integrative Model for Twenty-first Century Toxicity Testing. *Birth Defects Research (Part C)* 93:256–267. 2011

SINGH, Y. MEHER, J. G. RAVAL, K. KHAN, F. A. M. CHAURASIA, M. NITIN K. JAIN, M. CHOURASIA, K. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *Journal of Controlled Release*. doi:10.1016/j.jconrel.2017.03.008

SMITH, J. E.; ROSSI, I. C. The toxigenic *Aspergillus*. In: SMITH, J. E.; HENDRERSON, R. S. *Mycotoxins and Animal Foods*. London: CRC PRESS. p. 31-61. 1991.

SOLIMAN, G. M. Nanoparticles as safe and effective delivery systems of antifungal agentes: Achievements and challenger. *International Journal of Pharmaceutics* 523 (2017) 15 – 32. Elsevier.

SPANEVERELLO, R.O.; VILA, A. J. 7- α -acetoxyhardwickiiic acid: A furanoid clerodane. *Phytochemistry*, 1994, 42, 1653-1656.

SULLIVAN, C. MATTU, M. A. JURCZYSZAK, D. GABOR, K. A. MILLARD, P. J. TOBIN, D. M. KIM, C. H. Infectious disease models in zebrafisch. *Methods in Cell Biology*, Volume 138, ISSN 0091-679X, <http://dx.doi.org/10.1016/bs.mcb.2016.10.005> © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

TANIWAKI, M. H.; FRISVAD, J. C.; FERRATI, L. S.; LOPES, A. de S.; LARSEN, T. O.; FUNGARO, M. H. P.; IAMANAKA, B. T. Biodiversity of mycobiota throughout the Brazil nut supply chain: From rainforest to consumer. *M.H. Food Microbiology*, 61:14-22, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2016.08.002>.

TANIWAKI, M.H.; PITT, J.I.; IAMANAKA, B.T.; SARTORI, D.; COPETTI, M.V.; BALAJEE, A.; FUNGARO, M.H.P.; FRISVAD, J.C. *Aspergillus bertholletius* sp. nov. from Brazil nuts. *PLOS ONE* 7(8):1-7, 2012.

TINCUSI, B. M.; JIMÉNEZ, I. A.; BAZZOCCHI, I. L.; MOUJIR, L. M.; MAMANI, Z. A.; BARROSO, J. P.; RAVELO, A. G.; HERNÁNDEZ, B. V. Antimicrobial terpenoids from the oilresin of the peruvian medicinal plant *Copaifera paupera*. *Plant Med.* 2002, 68, 808-812.

TOBOUTI, P. L.; DE ANDRADE MARTINS, T. C.; PEREIRA, T. J.; MUSSI, M. C. M. Antimicrobial activity of copaiba oil: A review and a call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 94, p. 93–99, out. 2017.

TRINDADE, R.; SILVA, J.; SETZER, W. *Copaifera* of the Neotropics: A Review of the Phytochemistry and Pharmacology. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 5, p. 1511, 18 maio 2018.

TRUJILLO, L. S.; BELLOSO O. M.; MCCLEMENTS, D. J. Excipient Nanoemulsions for Improving Oral Bioavailability of Bioactives. *Nanomaterials* 2016, 6, 17; doi:10.3390/nano6010017.

VAN DER VEERDONK, F. L.; GRESNIGT, V. D.; ROMANI, M. S.; NETEA, L.; LATGÉ, M. G.; *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. *Nature Reviews Microbiology* volume15, pages661–674 (2017).

VEIGA-JÚNIOR, V. F.; ROSAS, E.C.; CARVALHO, M.V.; HENRIQUES, M.G.M.O.; PINTO, A.C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne-A comparative study. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *112*, 248–254.

VEIGA-JÚNIOR, V. F.; PINTO, A.C. O gênero *Copaifera* L. *Quím. Nova*, 2002, *25*: 273-286.

WICKLOW, D. T. *Aspergillus flavus* sclerotia form in wound-inoculated pre harvested com. *Mycologia* (in the Press). 1984.

WICKLOW, D. T.; DONAHUE, J. E. Sporogenic germination of sclerotia in: *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* *Transactions of the British Mycological Society.* *8*, 621-624. 1984.

WORLD HEALTH ORGANIZATION & Onchocerciasis Control Programme in the Volta River Basin Area. (1979). Progress report of the World Health Organization for 1979. Onchocerciasis Control Programme in the Volta River Basin Area. <http://www.who.int/iris/handle/10665/279836>

YU, J.L.; CLEVELAND, T.E.; NIERMAN, W.C.; BENNETT, J.W. *Rev. Iberoam. Micol. Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. *Dec;22(4):194-202.* 2005.

ZADOKS, J.C. Modern plant protection. Developments and perspectives. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R. (Ed.). *Palestras do XXX Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Fitopatologia Brasileira*, p.16-26, 1997.

ZHOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A.; MARTINS-DA-SILVA, R.C.V.; TRIGO, J.R. Chemical variation in the volatiles of *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae) growing wild in the states of Pará and Amapá, Brazil. *J. Essent. Oil Res.* 2009, *21*, 501-503a

ZOGHBI, M. G. B.; MARTINS-DA-SILVA, R.C.V.; TRIGO, J. R. Volatiles of oilresins of *Copaifera paupera* (Herzog) Dwyer, *C. piresii* Dwyer and *C. pubiflora* Benth. (Leguminosae). *J. Essent. Oil Res.* 2009, *21* 403-404b.

ZOGHBI, M. G. B; LAMEIRA, O.S.; OLIVEIRA, E.C.P. Seasonal variation of oleoresin and volatiles from *Copaifera martii* Hayne growing wild in the state of Pará, Brazil. *J. Essent. Oil res.* 2007, *19*, 504-506.

4.PROBLEMAS

A crescente demanda por alimentos isentos de resíduos químicos, tem levado à busca de moléculas, oriundas do metabolismo secundário de plantas. Neste sentido, o uso de óleos fixos e essenciais, surgem como alternativas aos defensivos sintéticos, como fontes de produtos anti-fúngicos, na busca de formas eficientes de produção na indústria de alimentos e fármacos.

5.HIPÓTESES

O uso de anti-fúngicos constituídos de moléculas, oriundas do metabolismo secundário de plantas, poderá substituir o uso de anti-fúngicos ou fungicidas sintéticos, reduzindo assim problemas com contaminação ambiental e efeitos relacionados à resistência de cepas fúngicas e bacterianas a produtos agrícolas e hospitalares em uso.

6.OBJETIVOS

6.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial antifúngico dos óleos de *Carapa guianensis* (Aubl.), *Copaifera* sp. e *D. odorata* sobre *A. nomius* e *A. fumigatus*

6.2. Objetivos Específicos

- . Identificar as espécies fúngicas contaminantes da castanha-da-Amazônia através da morfologia e análise molecular;
- . Caracterizar fitoquimicamente os óleos de *C. guianensis*, *Copaifera* sp. e *Dipteryx odorata*;
- . Testar a fungitoxicidade *in vitro* dos óleos de *Copaifera* sp., *C. guianensis* e *D. odorata* sobre *A. nomius* e *A. fumigatus*;
- . Testar a toxicidade aguda do óleo de *D. odorata* em zebrafish.

7.JUSTIFICATIVA

Produtos agrícolas e florestais são susceptíveis ao ataque de fungos. Os fungos são microrganismos pertencentes ao Reino Fungi, podendo ser encontrados no solo, água, ar, plantas, matéria orgânica em decomposição e crescendo em quase todos os tipos de substratos. A razão da grande proliferação dos fungos deve-se à sua alta taxa de reprodução, através de esporos. Os fungos de armazenamento, a exemplo de *Aspergillus*, são encontrados em grande número em armazéns, em locais úmidos, nos castanhais, em todos os lugares onde os produtos agrícolas são manuseados e processados. Causam danos ao produto somente se as condições de armazenamento forem impróprias à manutenção da qualidade do produto. Os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são os indicadores de deterioração em sementes e grãos, causando danos no germe, descoloração, alterações nutricionais, perda da matéria seca e os primeiros estágios de deterioração microbiológica.

Alguns fungos associados aos grãos podem produzir substâncias tóxicas, denominadas micotoxinas, que são altamente nocivas à saúde do homem. As aflatoxinas são substâncias produzidas principalmente por *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* e *A. fumigatus*.

A crescente demanda por alimentos isentos de resíduos oriundos de defensivos sintéticos têm alterado o comportamento de produtores na busca de novas formas eficientes de produção, com baixo custo e menor agressividade ao meio ambiente. Como fontes de produtos fungicidas tem-se utilizado diversas plantas e seus produtos, dos quais já foram isolados compostos como flavonoides, cumarinas e terpenóides com atividades fungicidas que podem ser utilizados como conservantes naturais em alimentos.

Assim, este trabalho visa testar óleos fixos de *Carapa guianensis*, resina de *Copaifera* sp. e *Dipteryx odorata* sobre *Aspergillus nomius* e *Aspergillus fumigatus*, de forma a subsidiar a produção de antifúngicos naturais, provenientes de fontes vegetais, no controle alternativo de fungos prejudiciais às plantas, à saúde animal e humana.

CAPÍTULO 1

Pontos críticos de contaminação em *Bertholletia excelsa* Bonpland, 1808 por fungos potencialmente aflatoxigênicos na Reserva Extrativista do Rio Cajari-AP

Pontos críticos de contaminação em *Bertholletia excelsa* Bonpland, 1808 por fungos potencialmente aflatoxigênicos na Reserva Extrativista do Rio Cajari-AP

Jurema do Socorro Azevedo Dias¹, Virgínia de Souza Álvares², David Aquino da Costa³, Leandro Fernandes Damasceno⁴, José Carlos Tavares Carvalho⁵

¹ Estudante do Curso de Doutorado da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (Rede BIONORTE), Coordenação Estadual, Universidade Federal do Amapá;

¹ Pesquisadora da Embrapa Amapá, Macapá, AP

² Pesquisadora da Embrapa Acre, Rio Branco, Acre.

³ Estudante do curso de Doutorado em Produção Vegetal da Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre.

⁴ Analista da Embrapa Amapá, Macapá, AP.

⁵ Coordenador do Laboratório de Fármacos, da Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, Macapá, AP

RESUMO

O extrativismo de *Bertholletia excelsa*, concentrado na região sul do Amapá, exerce uma importante função socioeconômica no Estado. Nesta região pode-se destacar a Reserva Extrativista Rio Cajari – RESEXCA, área criada com o objetivo de preservar o meio ambiente e garantir a continuidade da extração de *Bertholletia excelsa* pelas comunidades locais. A falta de práticas de manejo adequadas na coleta e armazenamento que garanta a qualidade do produto causa preocupação com relação à segurança alimentar por colocar em risco a saúde do consumidor. Soma-se a isso a insuficiência de informações de contaminação da produção castanheira do Amapá por fungos produtores de toxinas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi identificar as etapas críticas da cadeia produtiva de *Bertholletia excelsa* e quantificar a contaminação por fungos filamentosos totais e por fungos potencialmente produtores de aflatoxina em três comunidades localizadas na RESEXCA, com vistas ao manejo e controle destes fungos na cultura. As amostras de *Bertholletia excelsa* foram coletadas em três etapas da cadeia produtiva, sendo duas exploradas por moradores das vilas do Martins e do Marinho, regiões estas de floresta densa e na localidade de Pedra Preta, região de transição de floresta com cerrado, constituindo os seguintes tratamentos: T1 = Local 1, A1 (ponto de amontoa e quebra dos ouriços); T2 = Local, A2 (quebra dos ouriços após a amontoa por 36 dias na floresta); T3 = local 3, A1 (quebra dos ouriços após 11 dias na floresta); T4 = Local 3, A1 (quebra dos ouriços no ponto de amontoa); T5 = Local 3, A3 (após o armazenamento das

castanhas em sacos de ráfia, por 39 dias na casa do produtor); T6 = Local 2, A1 (quebra dos ouriços no ponto de amontoa após 6 dias na floresta). Após preparo das amostras, estas foram analisadas quanto ao teor de umidade, atividade de água, contagem total de fungos filamentosos e fungos potencialmente produtores de aflatoxinas. Os dados foram analisados em delineamento inteiramente casualizados, com seis tratamentos e três repetições, utilizando-se o programa estatístico SISVAR. Observou-se que o armazenamento dos ouriços por 36 dias na floresta, seguido da quebra destes e armazenamento das castanhas na floresta por 11 dias em sacos de ráfia no local 1, (tratamentos T1, T2 e T3), embora tenham favorecido a redução da umidade das amêndoas de 21,80% para 7,12% (redução de 67,34%), não foi suficiente para reduzir significativamente a atividade de água e os fungos potencialmente produtores de aflatoxinas (FPPA). Por outro lado, no T5, local 3, onde as castanhas foram armazenadas por 39 dias em sacos de ráfia, na casa do produtor, embora havendo uma redução da umidade das castanhas em comparação com o T4, de 26,73% para 20,29% (redução de 6,44%), houve uma maior contaminação de fungos filamentosos totais (FFT), com 5,03 log UFC.g⁻¹, não sendo identificados porém, como fungos potencialmente produtores de aflatoxinas. Em relação à análise de aflatoxinas, não se constatou nenhum tratamento contaminado, mesmo naquele com aparecimento de FPPA (T3).

PALAVRAS-CHAVE: Aflatoxina, cromatografia, Amapá.

ABSTRACT

The extractivism of *Bertholletia excelsa*, concentrated in the southern region of Amapá, exerts an important socioeconomic function in the State. In this region the Rio Cajari Extractive Reserve - RESEXCA, an area created with the objective of preserving the environment and guaranteeing the continuity of the extraction of *Bertholletia excelsa* by local communities can be highlighted. The lack of adequate management practices in the collection and storage that guarantees the quality of the product causes concern with regard to food safety because it endangers the health of the consumer. Add to this the insufficient information on the contamination of the Amapá nut production by toxin-producing fungi. Therefore, the objective of this work was to identify the critical stages of the *Bertholletia excelsa* productive chain and to quantify the contamination by total filamentous fungi and by fungi potentially producing aflatoxin in three communities located in RESEXCA, with a view to the management and control of these fungi in the crop. The *Bertholletia excelsa* samples were collected in three stages of the productive chain, two of which were explored by residents of the Martins and Marinho villages, these regions of dense forest and in the locality of Pedra

Preta, forest transition region with cerrado, constituting the following treatments: T1 = Place 1, A1 (point of assembly and breaking of the hedgehogs); T2 = Local, A2 (breaking of hedgehogs after heaping for 36 days in the forest); T3 = local 3, A1 (breaking of the hedgehogs after 11 days in the forest); T4 = Location 3, A1 (breakage of the hedgehogs at the heap point); T5 = Local 3, A3 (after storing chestnuts in raffia bags, for 39 days at producer's home); T6 = Location 2, A1 (breakage of hedgehogs at heap point after 6 days in the forest). After preparation of the samples, they were analyzed for moisture content, water activity, total count of filamentous fungi and fungi potentially aflatoxins. The data were analyzed in a completely randomized design, with six treatments and three replicates, using the statistical program SISVAR. It was observed that the storage of the hedgehogs for 36 days in the forest, followed by the breakage of these and storage of the nuts in the forest for 11 days in raffia bags at the site 1 (treatments T1, T2 and T3), although they favored the reduction of the (reduction of 67.34%), was not enough to significantly reduce the activity of water and potentially aflatoxin-producing fungi (FPPA). On the other hand, in the T5, site 3, where the nuts were stored for 39 days in raffia bags, in the producer's house, although there was a reduction in the humidity of the nuts compared to T4, from 26.73% to 20, 29% (reduction of 6.44%), there was a greater contamination of total filamentous fungi (FFT), with 5.03 log CFU.g-1, but they were not identified as fungi potentially producing aflatoxins. Regarding the analysis of aflatoxins, no contaminated treatment was found, even in the one with the appearance of FPPA (T3).

KEYWORDS: Aflatoxin, chromatography, Amapá.

1. INTRODUÇÃO

O extrativismo de *Bertholletia excelsa*, concentrada na região sul do Amapá, exerce uma importante função socioeconômica no Estado. Nesta região pode-se destacar a Reserva Extrativista Rio Cajari – RESEXCA, área criada com o objetivo de preservar o meio ambiente e garantir a continuidade da extração da castanha-da-Amazônia pelas comunidades locais (SHERZER, 2010; SOUSA, 2009). As amêndoas de castanha-da-Amazônia estão contidas em ouriços (frutos), que no Amapá caem das árvores no período de janeiro a junho. Nesta época a região é contemplada com muitas chuvas, favorecendo o atraso na coleta dos ouriços e a contaminação por fungos produtores de aflatoxina, uma micotoxina potencialmente cancerígena.

As principais etapas da cadeia produtiva da castanha-da-Amazônia no estado são a coleta, amontoa, armazenamento e quebra dos ouriços, transporte, armazenamento,

processamento e comercialização das castanhas, sendo que algumas destas etapas podem ou não ocorrer em alguma localidade. Desta forma, os ouriços são amontoados na floresta até a quebra, após sua permanência por um certo período neste local. Acontecendo também das castanhas serem coletadas e transportadas e armazenadas na casa do produtor.

A falta de práticas de manejo adequadas na coleta e armazenamento que garanta a qualidade do produto causa preocupação com relação à segurança alimentar por colocar em risco a saúde do consumidor quando da presença de aflatoxinas (MIDORIKAWA et al., 2014). Soma-se a isso a insuficiência de informações de contaminação da produção castanheira do Amapá por fungos produtores de toxinas.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi identificar as etapas críticas da cadeia produtiva da castanha-da-Amazônia em relação à contaminação por fungos filamentosos totais (FFT) e fungos potencialmente produtores de aflatoxina (FPPA) em três localidades da Reserva Extrativista do Rio Cajari-RESEXCA, com vistas ao manejo do produto para a prevenção de contaminações por fungos filamentosos na cultura de *Bertholletia excelsa*.

2.MATERIAL E MÉTODOS

2.1.Área de Coleta

A Reserva Extrativista do Rio Cajari, Amapá, Amazônia Oriental, Brasil, foi criada pelo Decreto Federal nº 99.145, de 12 de março de 1990, nas vizinhanças das comunidades Martins (52°17'30"W; 0°34'36"S), Marinho (52°13'25"W; 0°34'40"S) e Pedra Preta, no município de Laranjal do Jari. O clima da região é do tipo AM, segundo Köppen, apresentando temperatura média anual de 25 °C e precipitação média de 2300 mm, concentrada entre os meses de dezembro e junho. O relevo é muito acidentado e o solo predominante é do tipo latossolo profundo de origem Terciária (PAIVA; GUEDES; FUNI, 2011) (Figura 1).

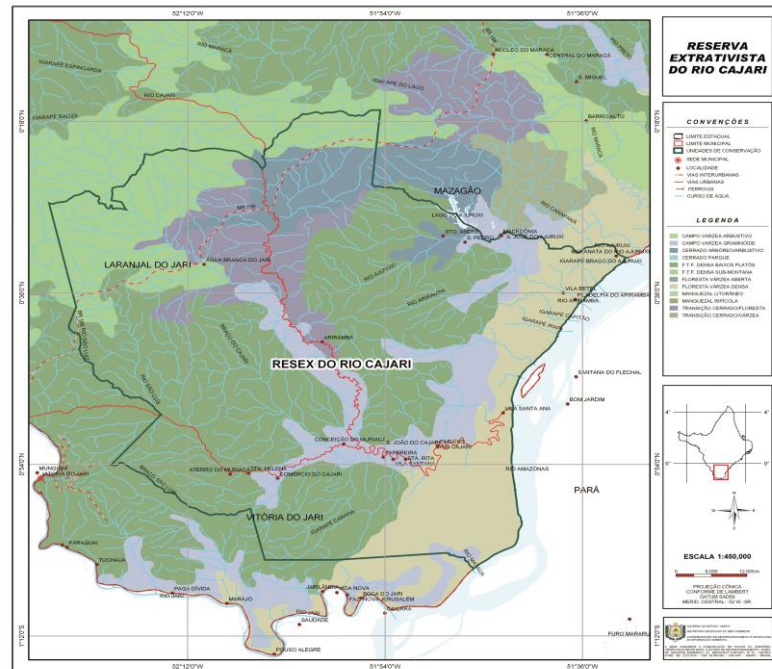


Figura 1. Reserva Extrativista do Rio Cajari-RESEX CAJARI.

Fonte: http://www.mpap.mp.br/gerenciador/arquivos/Image/meio_ambiente/RESEX%20DO%20RIO%20CAJARI.jpg

2.2. Coleta de castanha-da-Amazônia

Amostras de castanha-da-Amazônia com casca foram coletadas em três localidades no sul do Estado do Amapá, sendo duas exploradas por moradores das vilas do Martins (Local 1) e vila do Marinho (Local 2), regiões de floresta densa, e uma na localidade de Pedra Preta (Local 3), região de transição de floresta e cerrado.

Estas coletas foram realizadas em três etapas da cadeia produtiva na floresta (A1=amontoa e quebra; A2= após armazenamento dos ouriços por 36 dias na floresta; A3= após armazenamento das castanhas por até 39 dias, na casa do produtor). Respeitado o manejo natural do produto pelo extrativista durante a cadeia produtiva, cada Local sofreu um manejo e número de tratamentos diferenciados, conforme Tabela 1.

No Local 1, após amontoar, parte dos ouriços foram quebrados para a retirada de amostra (ponto de coleta A1) e o restante permaneceu armazenado na floresta por 36 dias para posterior coleta das castanhas (ponto de coleta A2) (Figura 2).



Figura 2. a. Ponto de amontoa dos ouriços; b. castanha-da-Amazônia em casca, fora dos ouriços na floresta (Locação Vila dos Martins). (Fonte: Jurema do S. A. Dias).

No Local 3, todos os ouriços foram quebrados na floresta e as castanhas colocadas em um paiol (A1) e posteriormente ensacadas e levadas para a casa do produtor e armazenadas por 39 dias, com uma segunda coleta posterior a este período (A3) (Figura 3).



Figura 3. a. Coleta de castanhas-da-Amazônia, em área de transição de floresta e cerrado; b. armazenadas em paiol (Locação Pedra Preta) (Fonte: Jurema do S. A. Dias).

Com exceção de um castanhal Local 2 (Vila do Marinho) onde os ouriços permaneceram amontoados por 6 dias, nos demais estes foram quebrados no mesmo dia da

amontoa. Considerando que começaram a cair em janeiro, os ouriços estavam com 2 a 3,5 meses após a queda das árvores. O ponto de coleta A3, correspondente à coleta das castanhas após um período de armazenamento fora do ouriço, onde o produto permaneceu ensacado na floresta por 11 dias (Locação Vila dos Martins) e ensacado por 39 dias na casa do produtor (Locação Pedra Preta).

Desta forma, os tratamentos considerados foram os seguintes: T1 = Local 1, A1 (quebra dos ouriços no ponto de amontoa); T2 = Local 1, A2 (quebra dos ouriços após a amontoa por 36 dias na floresta); T3 = Local 1, A3 (coleta das castanhas após o armazenamento das castanhas em sacos de ráfia por 11 dias na floresta); T4 = Local 3, A1 (quebra dos ouriços no ponto de amontoa e armazenamento em paiol); T5 = Local 3, A3 (coleta das castanhas após o armazenamento das castanhas em sacos de ráfia por 39 dias na casa do produtor); T6 = Local 2, A1 (quebra dos ouriços no ponto de amontoa), conforme Tabela 1.

Tabela 1. Locais e pontos de coleta de amostras de castanha-da-Amazônia na Reserva Extrativista Rio Cajari, no Sul do Amapá, 2009

Local	Tratamentos	Pontos de coleta	Descrição
1 Vila do Martins	T1	A1	Quebra dos ouriços no ponto de amontoa
	T2	A2	Quebra dos ouriços após a amontoa por 36 dias na floresta
	T3	A3	Coleta das castanhas após o armazenamento em sacos de ráfia por 11 dias na floresta
3Pedra Preta	T4	A1	Quebra dos ouriços no ponto de amontoa e armazenamento em paiol na floresta
	T5	A3	Coleta das castanhas após o armazenamento das castanhas em sacos de ráfia por 39 dias na casa do produtor
2Vila do Marinho	T6	A1	Quebra dos ouriços no ponto de amontoa na floresta

Após as coletas, as amêndoas foram acondicionadas em sacos plásticos, transportadas para o Laboratório de Fitopatologia, na Embrapa Amapá (Figura 4).

**a****b**

Figura 4. a e b. Transporte da castanha-da-Amazônia da floresta (RESEX CAJARI) para o laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amapá (Fonte: Jurema do S. A. Dias).

2.3. Preparo das amostras em laboratório para análises

No laboratório, as semestes foram quebradas manualmente e moídas em multiprocessador e congeladas em freezer a 10 °C (Figura 5).

**a****b**



c

d

Figura 5. a, b, c e d. Processamento das amêndoas de castanha-da-Amazônia para análise.

Posteriormente, as amostras foram transportadas para a Embrapa Acre, em Rio Branco, onde foram analisadas quanto ao teor de umidade em estufa com circulação de ar (S180ST, Biopar, Porto Alegre, Brasil) a 105 °C/ 8 horas (AOAC, 2012); atividade de água por leitura direta em medidor de atividade de água portátil (Pawkit, Decagon, Toowoomba, Austrália) (Figura 6).



a

b

Figura 6. a e b. Medição da atividade de água das amostras de castanha-da-Amazônia, por leitura direta em medidor de atividade de água portátil (Fonte: Jurema do S. A. Dias).

2.4. Diluição em placas das amostras de castanha-da-Amazônia em meio *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* Agar (AFPA)

A contagem total de fungos filamentosos e potencialmente produtores de aflatoxinas (*Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*) foi realizada, utilizando-se o método por plaqueamento por diluição em superfície, conforme Pitt et al. (1983).

Em uma bolsa de stomacher (bolsa dupla para prevenir vazamentos), foram pesados 40 gramas de castanha-da-Amazônia, adicionando-se 360 ml de água peptonada a 0,1%. Em seguida as bolsas foram colocadas em um Becker e a amostra deixada de molho por 30 minutos. Após isso, homogeneizou-se a amostra por dois minutos, a qual ao final do processo, equivale a uma amostra diluída dez vezes (diluição 10^{-1}), deixando-a em repouso por 4 minutos. Em seguida foram realizadas diluições seriadas de 10^{-2} a 10^{-5} (Figura 7).

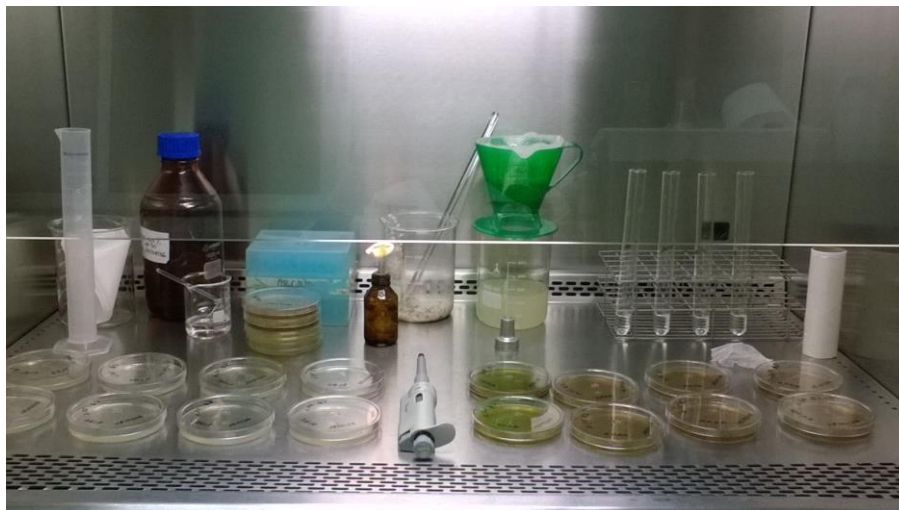


Figura 7. Método por diluição e plaqueamento em superfície, conforme Pitt et al. (1983), adaptado (Fonte: Jurema do S. A. Dias).

Transferiu-se 0,1 ml de cada diluição, começando com a maior diluição para as triplicatas de placas com o meio *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* Agar (AFPA), marcadas. Em seguida o líquido foi espalhado uniformemente nas placas utilizando-se uma alça de Driglski. Observando-se que a diluição final nas placas, quando distribuído 0,1 ml, passa a ter uma magnitude maior comparada com a diluição no tubo de ensaio correspondente (isto é, 0,1 ml do tubo de ensaio com diluição 10^{-3} passa a ser 10^{-4} na placa). As placas foram incubadas em sacos plásticos com as tampas voltadas para cima, a $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 45 ± 3 horas, sem fotoperíodo (Figura 8)



Figura 8. Método por diluição e plaqueamento em superfície, conforme Pitt et al. (1983), adaptado (Fonte: Jurema do S. A. Dias).

2.4.1.Leitura

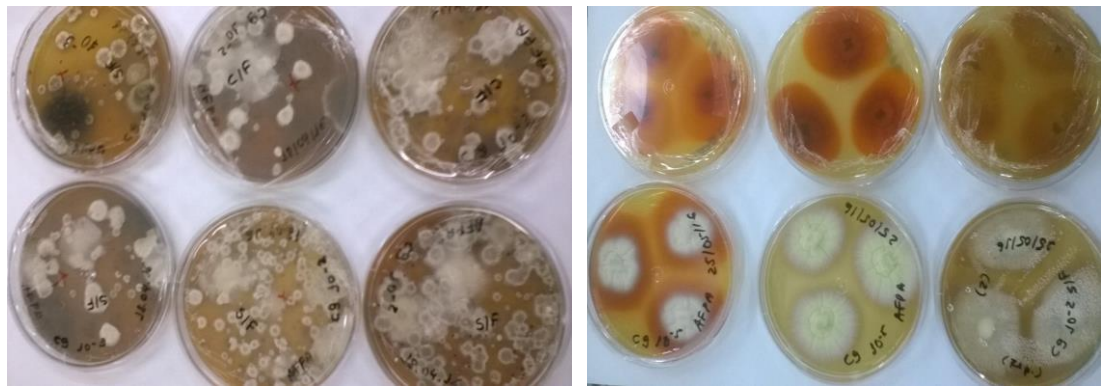
Para cada diluição, foram contadas as colônias que apresentaram uma coloração alaranjada no verso. Calculou-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Aspergillus* por grama de amostra:

$$\text{Concentração média de Microrganismos (Y) = } \frac{\mathbf{C1+C2...Cn}}{\mathbf{W1+W2....Wn}} \text{ ufc/g , onde:}$$

$C1+C2+...+Cn$ = Número de colônias contadas nas diferentes placas

$W1+W2+...Wn$ = Volume de amostra correspondente

O limite de detecção normalmente definido é de 100 ufc por grama de amostra quando a diluição mais baixa for de 10^{-2} . Observando-se que de forma a detectar níveis < 100 ufc por grama, as placas deverão ser feitas tomando-se 1 ml da diluição inicial (10^{-1}) e homogeneizando-se cuidadosamente com o substrato fundido. O limite de detecção será então ajustado para 10 ufc por grama de amostra (NORDIC COMMITTEE ON FOOD ANALYSIS, Nº 177, *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, determination in Food and Feed) (Figura 9)



a

b

Figura 9. a. Contagem de colônias, pelo método por diluição e plaqueamento em superfície. b. Colônias repicadas.

As análises de aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e Totais, foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência-CLAE (Shimadzu, Kyoto, Japan) com detector de fluorescência e derivatização pós-coluna por célula eletroquímica, de acordo com AOAC (2012) e Stroka et al. (2000), utilizando-se uma coluna C18, com fluxo de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados em delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos e três repetições, utilizando-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias para as variáveis físicas e microbiológicas obtidas no experimento da castanha-da-Amazônia em 3 Locais e diferentes pontos de coleta podem ser observadas na Tabela 2.

Tabela 2. Valores médios das variáveis físicas e microbiológicas das amêndoas submetidas a diferentes tratamentos¹

Tratamentos ¹	Umidade da amêndoa (%)	Atividade de água	FFT (Log UFC.g ⁻¹)	FPPA (Log UFC.g ⁻¹)
T1 (V. Martins)	21,80 ^{ab}	0,99 ^a	4,70 ^{ab}	0,00 ^a
T2 (V. Martins)	12,55 ^{bc}	0,99 ^a	4,62 ^{ab}	0,00 ^a
T3 (V. Martins)	7,12 ^c	0,99 ^a	4,32 ^b	1,20 ^a
T4 (P. preta)	26,73 ^a	0,99 ^a	4,17 ^b	0,00 ^a
T5 (P. preta)	20,29 ^{ab}	0,99 ^a	5,03 ^a	0,00 ^a
T6 (V. Marinho)	22,73 ^{ab}	0,99 ^a	4,66 ^{ab}	0,00 ^a
Média	18,42	0,99	4,58	0,20
CV (%)	19,71	-	5,46	424,26

*Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si ao nível de 5% de significância, pelo teste de Tukey. ¹ T1 = Local 1, A1 (ponto de amontoa e quebra dos ouriços); T2 = Local 1, A2 (após o amontoa dos ouriços por 36 dias na floresta); T3 = Local 1, A3 (após o armazenamento das castanhas por 11 dias na floresta, em sacos de ráfia); T4 = Local 3, A1 (ponto de amontoa e quebra dos ouriços); T5 = Local 3, A3 (após o armazenamento das castanhas por 39 dias na casa do produtor); T6 = Local 2, A1 (ponto de amontoa e quebra dos ouriços). FFT= fungos filamentosos totais; FPPA= fungos potencialmente produtores de aflatoxina

O armazenamento dos ouriços por 36 dias na floresta, seguido da quebra destes e armazenamento das castanhas também na floresta por 11 dias em sacos de ráfia no Local 1 (tratamentos T1, T2 e T3), embora tenham favorecido a redução da umidade das amêndoas de 21,80% para 7,12% (redução de 67,34%), não foi eficiente para reduzir significativamente a atividade de água e os fungos potencialmente produtores de aflatoxinas (FPPA) (Tabela 2). Embora tenha havido uma tendência à redução na contaminação dos fungos filamentosos totais (FFT), houve o aparecimento de FPPA nas castanhas armazenadas após a quebra dos ouriços, mostrando, então, a importância da redução da atividade de água na prevenção desta contaminação. Por outro lado, no Local 3, onde não houve o armazenamento dos ouriços (etapa A2) e as castanhas foram armazenadas por 39 dias na casa do produtor (T5) em sacos de ráfia (etapa A3), houve uma menor redução da umidade das amêndoas em comparação ao Local 1, de 26,73 para 20,29% (redução de 6,44%) também sem redução da atividade de água. Entretanto a maior contaminação de fungos filamentosos totais (FFT) foi encontrada neste local, com 5,03 log UFC.g⁻¹ (Tabela 2), podendo sugerir que a pré-secagem natural das castanhas ainda nos ouriços é mais segura em termos de contaminação por fungos totais do que após a quebra destes, já que o tempo de armazenamento total foi maior no Local 1 (47 dias) que no Local 2 (39 dias). Leite (2008) obteve valores de fungos filamentosos totais

correspondentes a 4,22 log UFC.g⁻¹ para castanhas coletadas após a quebra e 4,51 log UFC.g⁻¹ para submetidas a amontoa, ambos iguais ($p > 0,05$) aos obtidos neste trabalho. Embora tenha ocorrido uma maior contaminação por fungos totais nas castanhas armazenadas na casa do produtor (T5), estes não foram identificados como FPPA como nas castanhas armazenadas na floresta (T3). Contudo devido ao elevado coeficiente de variação, não houve diferença significativa entre os pontos de coleta para FPPA (Tabela 1), com a contaminação sendo encontrada apenas em um ponto (T3 = após o armazenamento das castanhas por 11 dias na floresta, Local 1). Esta contaminação alerta que, segundo os procedimentos para o controle higiênico-sanitário da castanha-da-Amazônia na floresta (ÁLVARES; WADT, 2011), deve-se evitar este armazenamento na floresta, transportando-as o quanto antes para a realização de uma pré-secagem como medida de prevenção da contaminação, o que é reforçado pela observação de Costa (2012) que, de preferência, as castanhas não devam ser armazenadas nas comunidades. Estes valores de contaminação, encontrados com base no FPPA são iguais ($p > 0,05$) aos obtidos por Leite (2008) em castanha-da-Amazônia, em diferentes épocas de coleta (1,11 log UFC.g⁻¹) e para os tipos de seleção na amontoa na floresta (1,56 log UFC.g⁻¹). Esta variação pode ser considerada comum, assim como para fungos filamentosos totais. A elevada umidade nestes primeiros locais de coleta, juntamente com o extenso período em que os ouriços ficaram armazenados na floresta antes da quebra (de 2 a 3,5 meses) podem ter influenciado numa maior contaminação por estes fungos.

Em relação às aflatoxinas analisadas (B1, B2, G1, G2 e Totais), não foi detectada a presença de aflatoxinas em nenhum tratamento avaliado nem mesmo naquele com aparecimento de FPPA (Tabela 3).

Tabela 3. Valores médios da atividade das aflatoxinas ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) nas amêndoas de castanha-da-Amazônia armazenadas por 480 dias

Pontos de coleta ¹	Aflatoxinas ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)				
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	Totais
T1	0,000 ^a	0,000 ^a	0,000 ^a	0,000 ^a	0,000 ^a
T2	0,000 ^a	0,000 ^a	0,000 ^a	0,000 ^a	0,000 ^a
T3	0,000 ^a	0,000 ^a	0,000 ^a	0,000 ^a	0,000 ^a
T4	0,000 ^a	0,000 ^a	0,000 ^a	0,000 ^a	0,000 ^a
T5	0,000 ^a	0,000 ^a	0,000 ^a	0,000 ^a	0,000 ^a
T6	0,000 ^a	0,000 ^a	0,000 ^a	0,000 ^a	0,000 ^a
Média	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
CV(%)	-	-	-	-	-

*Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de

Tukey.

Olsen et al. (2008) e Leite (2008) explicam que somente a constatação da presença de fungos potencialmente aflatoxigênicos, não seja suficiente para se constatar a produção de aflatoxinas, corroborando com o resultado alcançado neste estudo. Embora, Olsen et al. (2008), tenham isolado *A. nomius*, comprovando a produção de AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2, por este fungo.

Midorikawa et al. (2014) isolaram e identificaram espécies de *Aspergillus* em materiais de castanha-da-Amazônia, provenientes de cooperativas dos Estados da região amazônica, Amazonas, Acre e Amapá, no período de 2009 a 2012. O estudo teve como objetivo identificar espécies de *Aspergillus* que ocorriam nos três Estados, com base na morfologia, biologia molecular e na produção de extrólitos, seguido do desenvolvimento do método de PCR, para a identificação de espécies membros deste gênero. Quando se considerou o total de cada espécie, proveniente das três áreas analisadas, verificou-se que as espécies aflatoxigênicas *Aspergillus nomius* (Amapá e Amazonas) e *Aspergillus flavus* (Amazonas e Acre), foram as mais abundantes, representando 43,1 e 42,3% de todos os *Aspergillus* isolados, respectivamente. Dentre estas, *A. nomius*, foi a espécie de maior incidência em castanhas provenientes do Estado do Amapá. Baseado na análise qualitativa do potencial micotoxigênico, entre os três Estados, de 11 linhagens avaliadas de *Aspergillus flavus*, 6 produziram, AFB1, AFB2 e ácido ciclopiazônico (CPA) e 5 linhagens, produziram AFB1 e ácido ciclopiazônico (CPA). Enquanto que, de 7 linhagens de *Aspergillus nomius*, 5 produziram AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2; 1 produziu B1 e G1 e 1 produziu, B1, G1 e G2. CPA, não foi detectado em *A. nomius*. Verificou-se através deste estudo, que os autores utilizaram o meio seletivo DG18, para isolamento dos fungos e os conservaram em glicerol. De acordo com Hocking e Pitt (1980) este meio contém baixa atividade de água (aw) (0,95 aw) e 18% (wt/wt) de glicerol e 2 µg de dicloran por ml, sendo desenvolvido para enumerar a flora fúngica de alimentos secos e semi secos. Além de demonstrar-se significativamente melhor do que o meio de Christensen Sal de Malte Agar, quando ambos foram testados com gêneros alimentícios e com culturas puras de inóculos.

Taniwaki et al. (2017) analisaram um total de 177 amostras de castanha-da-Amazônia (114 com casca e 58 descascadas) provenientes de regiões da floresta amazônica (Estados do Pará e Amazonas) e do Estado de São Paulo, coletadas, nos diferentes estágios da cadeia produtiva da castanha-da-Amazônia: floresta, mercados, plantas processadas e supermercados. Através de uma abordagem polifásica, conseguiram identificar diversas espécies fúngicas, dentre as quais *A. nomius*, como produtor das aflatoxinas AFB e AFG, além do Ácido tenuazônico.

Verificou-se neste estudo que a atividade de água das amêndoas não foi influenciada ($p > 0,05$) pelos pontos de coleta (Tabela 2), apresentando valor médio de 0,99 para os tratamentos, resultados similares ao obtido (0,98) por Leite (2008), para castanhas oriundas da floresta em diferentes épocas de coleta e por Carrillo (2003) e Pereira et al. (2002), os quais afirmam que a atividade de água ideal para o crescimento de fungos do gênero *Aspergillus* encontra-se na faixa de 0,80 a 0,98, próxima dos valores encontrados neste trabalho.

É importante mostrar que Midorikawa et al. (2014), para a caracterização dos isolados de *Aspergillus*, inclusive *A. nomius* quanto à sua capacidade de produção de aflatoxinas, utilizaram a metodologia de acordo com Schmidt-Heydt et al. (2009), onde o meio utilizado foi o semi-sólido e indutor para a produção de aflatoxinas, Yeast Extract Sucrose (YES) (20g/L de extrato de levedura; 0,5 g/L de $MgSO_4 \cdot 5H_2O$; 150 g/L de sacarose; 0,1 g de $ZnSO_4$; 0,05 g $CuSO_4$; 15 g/L de agar) com ajuste do pH 7,0 e atividade da água (Wa) com glicerol, usando uma mistura de glicerol/água (glicerol/ Wa 10,8 ml/ 0,99 Wa) para cultivo e incubação por 7 dias à 25°C, das espécies fúngicas. E, após o tempo de cultivo, todo o conteúdo micotoxigênico sendo extraído de cada placa colonizada, sob agitação constante em 10 mL de metanol à temperatura ambiente durante 60 minutos. Pois, de acordo com Hsieh e Atkinson (2001), a AFB1 é um pró-carcinógeno que requer ativação para exercer suas ações citotóxicas e genotóxicas. Além de que, as ligações covalentes das aflatoxinas resultam no decréscimo da síntese do DNA e RNA, no fígado. Sendo que a inibição da síntese de proteína não se apresenta tão rápida ou extensa como as dos ácidos nucleicos, ocorrendo uma desagregação polissomal paralelamente. Este mecanismo, é o que parece representar o modo de inibição da síntese de proteína (ROEBUCK; MAXUITENKO, 1994), causando danos como hemorragia, edemas, imunossupressão e carcinoma hepático (SMITH; ROSSI, 1991). Classificando assim, as Aflatoxinas na classe 1, dos carcinógenos humanos, pela International Agency for Research on Cancer (IARC, 1993). Assim sendo, verifica-se que para a detecção das micotoxinas, é preciso que se faça a indução da produção destas micotoxinas *in vitro*, através da utilização de um meio de cultura específico, constituído de micronutrientes, semelhantes aqueles presentes no substrato de onde foram isolados.

Além de que, em condições naturais, deve-se levar em consideração a influência de vários fatores abióticos, incluindo a suscetibilidade do substrato à colonização do fungo produtor; fatores físicos como temperatura do ambiente, umidade do substrato, umidade relativa do ar durante o armazenamento, aeração, danos mecânicos e tempo de armazenamento; fatores biológicos como capacidade genética do fungo em produzir

micotoxinas, quantidade de esporos viáveis, interação de diferentes fungos existentes no mesmo substrato, interação de micotoxinas e presença de insetos, de acordo com Ciegler (1978).

Sendo importante lembrar que o processo de coleta e pré-secagem das castanhas na floresta deve ser realizado o mais rápido possível, atendendo assim às boas práticas extrativistas, para não favorecer as condições de crescimento dos fungos e a possível sintetização de aflatoxinas. Embora, Pascholati (1995) afirme que a toxina provavelmente seja liberada durante a germinação dos esporos, no momento da infecção e que somente os isolados fúngicos que produzem a toxina em cultura sejam patogênicos. Este autor também afirma que, as fitotoxinas seletivas (específicas) mostram-se tóxicas, em concentrações fisiológicas, somente às espécies de plantas ou cultivares que servem como hospedeiras do microrganismo produtor da toxina.

5.CONCLUSÃO

O armazenamento da castanha-da-Amazônia na floresta, não é recomendado devido à contaminação por fungos potencialmente produtores de aflatoxina (FPPA), e na casa do produtor, pela alta incidência de fungos filamentosos totais (FFT), uma vez que estas espécies fúngicas também são conhecidas como fungos de armazenamento, sendo estas etapas consideradas críticas da cadeia produtiva da castanha-da-Amazônia, nos locais de coleta em estudo. Embora com base nas análises, não tenha sido constatada a presença de aflatoxinas nas amostras em estudo.

6.REFERÊNCIAS

AOAC INTERNATIONAL. Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces. February 24, 2012.

ÁLVARES, V. de S.; WADT, L. H. de O. Procedimentos para o controle higiênico-sanitário da castanha-do-brasil na floresta. Rio Branco:Embrapa Acre, 2011. 16p. il. Color.

CARRILLO, L. Microbiología Agrícola. Hongos. Capítulo 7. 2003. p. 1-14.

CIEGLER, A. fungi that produce mycotoxins: condition and occurrence. **Mycopathologia**, v.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: Reunião anual da Região Brasileira da sociedade Internacional de Biometria, 45, 2000, São Carlos. Programas e resumos. São Carlos: Ufscar, 2000. P. 255-258.

HOCKING, A.D.; PITT, J. 1. Dichloran-Glycerol Medium for Enumeration of Xerophilic Fungi from Low-Moisture Foods. *Applied and Environmental Microbiology*, Mar. 1980, p. 488-492.

INTERNATIONAL AGENCY ON RESEARCH IN CANCER (IARC). Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins In: *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. Monograph 56. Lyon. 1993.

LEITE, F. M. N. Fungos aflatoxigênicos na castanha-do-brasil sob as condições da floresta e de armazenagem comunitária no Acre. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Acre, Rio Branco – Acre, 2008. 97f.

MIDORIKAWA, G. E. O.; SOUSA, M. de L. M. de; SILVA, O. F.; DIAS, J. do S. A.; KANZAKI, L. I. B.; MESQUITA, R. M. L. C.; GONÇALVES, R. C.; ÁLVARES, V. S.; BITTENCOURT, D. M. C.; MILLER, R. N. G. Characterization of *Aspergillus* species on Brazil nut from the Brazilian Amazonian region and development of a PCR assay for identification at the genus level. *BMC Microbiology*, 2014, 14:138.

NORDIC COMMITTEE ON FOOD ANALYSIS, N° 177, *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. Determination in Food and Feed.

OLSEN, M.; JOHNSON, P.; MOLLER, T.; PALADINO, R.; LINDBLAD, M. *Aspergillus nomius*, an important producer in Brazil nuts? **World Mycotoxin Journal**, v 1, n. 2, p. 123-126, 2008.

PAIVA, P. M.; GUEDES, M. C.; FUNI, C. Brazil nut conservation through shifting cultivation. *Forest Ecology and Management* 261 (2011) 508–514. journal homepage: www.elsevier.com/locate/foreco.

PASCHOLATI, S.F. Fitopatógenos: Fitotoxinas e Hormônios. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. *Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos*. Editora Agrônômica Ceres Ltda. São Paulo, SP. 1995. p.365 a 392.

PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E. P. DE; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **B. Ceppa**, Curitiba, v 20, v. 1, p. 114-156, 2002.

PITT, J. I.; HOCKING, AILSA D.; GLENND, I. An improved medium for the detection of *Aspergillus fravus* and *A. parasiticus*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 54, 109-114. 1983.

ROEBUCH, B.D.; MAXUILENKO, Y.Y. Biochemical mechanism and biological implications of the toxicity of aflatoxins as related to aflatoxin carcinogenesis. In: *THE TOXICOLOGY of aflatoxins*. London: Academic Press, 1994. p. 27-43.

SHERZER, A. B. I. Produção de castanha-do-brasil no território sul do Amapá: comparação entre o retorno econômico e o salário mínimo. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2010. (Monografia).

SCHMIDT-HEYDT, M., HÄCKEL, S., RÜFER, C.E. et al. *Mycotox Res* (2009) 25: 141. <https://doi.org/10.1007/s12550-009-0019-x>

SMITH, J. E; ROSSI, I. C. the toxigenic *Aspergillus*. In SMITH, J. E. HENDERSON, R. S. *Mycotoxins and Animal foods*. London: CRC Press, 1991. P. 30 -61.

STROKA, J.; ANKLAM, E.; JOERISSEN, U. E.; GILBERT, J. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using pos-column bromitation for determination of

aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste, and paprika powder: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 83 (2): 320-340. 2000.

SOUSA, W. P. de; EULER, A. M.C. Diagnóstico do setor produtivo e da comercialização da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) no território Sul do Amapá. VI Congresso Brasileiro de Agroecologia. 2009.

TANIWAKI, M. H.; FRISVAD, J. C.; FERRATI, L. S.; LOPES, A. de S.; LARSEN, T. O.; FUNGARO, M. H. P.; IAMANAKA, B. T. Biodiversity of mycobiota throughout the Brazil nut supply chain: From rainforest to consumer. M.H. *Food Microbiology*, 61:14-22, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2016.08.002>.

CAPÍTULO 2

Potencial anti-fúngico do óleo fixo de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd., Fabaceae, sobre *Aspergillus nomius* Kurtzman, Horn & Hesseltine e *Aspergillus fumigatus* Fresenius isolados de *Bertholletia excelsa* Humbl. & Bompland e toxicidade aguda do óleo de *D. odorata* em *Danio rerio*.

Potencial anti-fúngico do óleo fixo de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd., Fabaceae, sobre *Aspergillus nomius* Kurtzman, Horn & Hesselstine e *Aspergillus fumigatus* Fresenius isolados de *Bertholletia excelsa* Humbl. & Bompland e toxicidade aguda do óleo de *D. odorata* em *Danio rerio*

Jurema do Socorro Azevedo Dias¹, Gláucia E. O. Midorikawa², Maria de L. M. de Sousa³, Brenda Lorena Sanchez-Ortiz⁴, Raphaëlle Sousa Borges⁵, Gisele Custódio de Souza⁵, Irlon Maciel Ferreira⁶, Matheus Mercês Ramos⁶, Pedro Henrique da Silva Barata⁶, José Carlos Tavares Carvalho^{1,5}

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Bionorte; Embrapa Amapá, Rodovia J.K., Km 05, 2600, 68.903-419, Macapá, AP, Brasil

²Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, Av. W3 Norte, Ed. Sede 70770-901, Brasília, DF.

³Embrapa Agroindústria de Alimentos – CTAA, Av. das Américas, Guaratiba, RJ, Brasil.

⁴Universidad Nacional do México - UNAM

⁵Laboratório de Pesquisa em Fármacos, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Amapá, Rodovia Juscelino Kubitschek, Km 02, 68902-280 Macapá, AP, Brazil

⁶Laboratório de Biocatálise, Universidade Federal do Amapá, Rodovia Juscelino Kubitschek, Km 02, 68902-280 Macapá, AP, Brasil

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial anti-fúngico *in vitro* do óleo fixo de *Dipteryx odorata*, nas concentrações de 10 µg/mL, 100 µg/mL e 1000 µg/mL, usando a técnica de Poison Food e CYA, como meio indutor de produção de micotoxinas, sobre as espécies fúngicas *Aspergillus nomius* e *Aspergillus fumigatus* e a toxicidade aguda deste óleo no modelo *Danio rerio*, utilizando-se o método de gavage (via oral). Através da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa foi possível identificar na composição do OFDo, os ácidos graxos ácido oleico (C18:1n-9) monoinsaturado, com 53% de abundância relativa; o ácido palmítico (C16:0) saturado, com 13%; ácido linoleico (C18:2n-6) poliinsaturado, com 8%; o ácido esteárico (C18:0) saturado, com 7% e o ácido vacênico (C18:1n-7) monoinsaturado, com 2%. Os isolados fúngicos, tiveram suas identidades comprovadas, por meio da taxonomia morfológica e molecular, onde 26NAT, teve sua identidade demonstrada em 100% de identidade com *Aspergillus nomius*, quando

comparada à amostra tipo NRRL 6552, através do BLASTn e da região ITS, comprovada pelo marcador secundário Calmodulina. Enquanto que, o isolado 4K7, teve sua identidade demonstrada em 100% com *Aspergillus fumigatus*, quando comparada à amostra tipo ATCC MYA4609, através do BLASTn e 99% de identidade com a amostra tipo NRRL 6113 e comprovada através do marcador secundário Calmodulina. Ambos sendo confirmados como produtores das aflatoxinas AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2. Quanto ao experimento de fungitoxicidade, observou-se que o efeito do óleo fixo de *D. odorata* em relação ao percentual de inibição do crescimento micelial (% PIC) de *A. nomius*, foi maior na concentração de 100 µg/mL, alcançando 35% de inibição, ao final do teste (144 h, após avaliação). Enquanto que, o efeito do OFDo em relação ao percentual de inibição do crescimento micelial (% PIC) de *A. fumigatus*, foi maior na concentração de 1000 µg/mL, apresentando, um potencial de inibição de 27,4% às 72 h e de 24,27% às 144 h de avaliação. Permitindo-se verificar, que este óleo apresentou maior potencial inibitório sobre a espécie fúngica, *A. nomius*, entre as duas espécies fúngicas testadas. Porém, após a reativação das colônias fúngicas, proporcionada pela transferência de seções das colônias, do meio de cultura BDA (meio com menos componentes e sem metais) para o meio CYA (meio com mais componentes e com metais), o efeito fungicida foi reduzido, demonstrado pela alteração no crescimento micelial dos fungos, sugerindo ao invés de um efeito fungicida, um efeito fungistático do OFDo sobre estas espécies fúngicas. Quanto ao experimento de toxicidade aguda do OFDo, por via oral (gavage) em *Danio rerio*, verificou-se que os diferentes tratamentos (doses de 1000 mg/kg do óleo fixo + Tween20, 3000 mg/kg do óleo fixo + Tween20; 1000 mg/kg, 5000 mg/kg e 8000 mg/kg do óleo puro e os controles) desencadearam inicialmente alterações comportamentais, porém sem causar a morte dos animais. Embora, com base nos Índices de Alterações Histopatológicas (IAH) apresentados, verificou-se que o óleo causou alterações no Fígado, apenas nos animais tratados com a dose de 8000 mg/kg do óleo puro de *D. odorata* apresentando índices que classificaram esse órgão com alterações de moderadas a graves. Enquanto que, os IAH do intestino de todos os grupos de tratamento com o óleo de cumarú (1000, 3000 mg/kg do óleo + Tween20; 1000, 5000 e 8000 mg/kg do óleo puro) por via oral, caracterizaram esse órgão com alterações de moderadas a graves. E, as alterações causadas pelo tratamento por via oral, foram mais severas para os rins dos animais tratados com as doses do óleo de cumarú puro (1000, 5000 e 8000 mg/kg), pois os IAH classificaram esse órgão com alterações de moderadas a graves. E, ainda com base nos resultados obtidos e composição química dos compostos identificados no OFDo sugere-se que, o ácido oleico (marcador), o ácido palmítico, o ácido linoleico, o ácido vacênico e o ácido esteárico, dependendo da dose, possam ter ocasionado a inibição do

crescimento micelial das espécies fúngicas, assim como a produção dos danos histopatológicos nos órgãos de *Danio rerio*, destacados neste estudo.

Palavras chave: Fungitoxicidade, cumaru, fungos filamentosos, castanha-da-Amazônia, Zebrafish.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the in vitro antifungal potential of *Dipteryx odorata* fixed oil at concentrations of 10 µg/mL, 100 µg/mL and 1000 µg/mL using the Poison Food and CYA technique as the inducing medium of mycotoxins production, on the fungal species *Aspergillus nomius* and *Aspergillus fumigatus* and the acute toxicity of this oil in the model *Danio rerio*, using the method of gavage (oral). By means of gas chromatography coupled to mass spectrometry, it was possible to identify the fatty acids oleic acid (C18: 1n-9) monounsaturated in the composition of OFDo, with 53% of relative abundance; palmitic acid (C16: 0) saturated, with 13%; polyunsaturated linoleic acid (C18: 2n-6), 8%; saturated 7% stearic acid (C18: 0) and 2% monounsaturated (C18: 1n-7) vaccinic acid (C18: 1n-7). The fungal isolates had their identities proven through morphological and molecular taxonomy, where 26NAT had its identity demonstrated in 100% identity with *Aspergillus nomius*, when compared to sample type NRRL 6552, through BLASTn and the ITS region, proven by the secondary marker Calmodulin. While the 4K7 isolate had its identity demonstrated 100% with *Aspergillus fumigatus*, compared to the ATCC MYA4609 type sample, through the BLASTn and 99% identity with the type NRRL 6113 sample and proven through the secondary marker Calmodulin. Both being confirmed as aflatoxin producers AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2. As for the fungitoxicity experiment, it was observed that the effect of the fixed oil of *D. odorata* in relation to the percentage of inhibition of mycelial growth (% PIC) of *A. nomius* was higher in the concentration of 100 µg/mL, reaching 35% of inhibition at the end of the test (144 h after evaluation). While the effect of OFDo in relation to the percent inhibition of mycelial growth (% PIC) of *A. fumigatus*, was higher at the concentration of 1000 µg/mL, presenting a potential of inhibition of 27.4% at 72 hours 24.27% at 144 h of evaluation. It is possible to verify that this oil had a greater inhibitory potential on the fungal species, *A. nomius*, between the two fungal species tested. However, after the reactivation of the fungal colonies, provided by the transfer of sections of the colonies, the BDA culture medium (medium with less components and without metals) to the CYA medium (medium with more components and metals), the fungicidal effect was reduced, demonstrated by the alteration in fungal mycelial growth, suggesting

instead of a fungicidal effect, a fungistatic effect of OFDo on these fungal species. As for the acute oral toxicity experiment of OFDo in *Danio rerio*, it was found that the different treatments (doses of 1000 mg/kg of fixed oil + Tween20, 3000 mg/kg of fixed oil + Tween20; 1000 mg/kg, 5000 mg/kg and 8000 mg/kg of pure oil and controls) initially triggered behavioral changes, but did not cause the animals to die.

Although, based on the Histopathological Changes Indexes (AHI) presented, the oil was found to have alterations in the Liver only in the animals treated with the dose of 8000 mg / kg of the pure oil of *D. odorata*, presenting indexes that classified this organ with moderate to severe changes. While the intestinal AHI of all coumaru oil treatment groups (1000, 3000 mg / kg of oil + Tween20, 1000, 5000 and 8000 mg / kg of pure oil) orally characterized this organ with alterations moderate to severe. And, alterations caused by oral treatment were more severe for the kidneys of the animals treated with doses of pure coumaru oil (1000, 5000 and 8000 mg / kg), since AHI classified this organ with moderate to serious. Therefore, considering the results obtained and the chemical characteristics of the compounds identified in the fixed oil of *D. odorata* as, oleic acid (marker), palmitic acid, linoleic acid, vaccinic acid and stearic acid, it is suggested that, depending on the dose, these compounds may have influenced the effect of the oil on the percentage inhibition of mycelial growth of fungal species, as well as in the production of the histopathological damages caused in the organs of *Danio rerio*, highlighted in this study.

Key words: Fungitoxicity, coumaru, filamentous fungi, Amazon nuts, Zebrafish.

1. INTRODUÇÃO

Descrita por von Martius no século 19, a semente de *Dipteryx odorata* (coumaru), também conhecida como “fava de coumarú”, “fava de tanha”, “fava de Tonka”, ou “fava do Tonkin” do comércio (“fava da Índia”, dos antigos portugueses; “feve de Tonka”, dos franceses; “sêmen Tonka”, das farmácias; “Tonka bean” dos Anglo-americanos; “Tonka-bohnen”, dos alemães), apresenta características farmacológicas como antiespasmódica, diaforética, cardíaca, emenagoga (BREITBACH et al., 2013). Segundo este autor, estas características também resultam da presença da “coumarina”, substância branca, cristalizável em prismas acinaciformes, de sabor acre em princípio e depois agradável, muito solúvel em água fervente, com o ponto de fusão a 60°C e destilando entre 290°5 e 291° e quimioprotetora (CARVALHO et al., 2009). De acordo com Gleye et al. (2003), seu óleo é também usado na medicina popular contra úlceras bucais, otite e problemas no couro cabeludo. Assim como, na

formulação de raticidas, devido à sua capacidade em inibir a coagulação sanguínea de roedores. Bem como, atividade acaricida, comprovada através do extrato obtido de suas sementes (CARVALHO et al., 2009). Porém, poucos estudos têm sido relatados quanto à atividade biológica do óleo de suas sementes sobre espécies fúngicas filamentosas. Assim sendo, este estudo teve como objetivos, avaliar o potencial anti-fúngico do óleo fixo de *Dipteryx odorata*, em três diferentes concentrações, 10 µg/mL, 100 µg/mL e 1000 µg/mL, utilizando a técnica de Poison Food, sobre as espécies fúngicas aflatoxigênicas *Aspergillus nomius* e *Aspergillus fumigatus* isoladas de *Bertholletia excelsa* e a sua toxicidade aguda em *Danio rerio*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi dividido em dois experimentos.

2.1. Experimento 1: Potencial anti-fúngico do óleo de *Dipteryx odorata* sobre *A. nomius* e *A. fumigatus*

2.1.1. Material Botânico de *Dipteryx odorata*

Os frutos de *Dipteryx odorata* foram coletados de um espécime localizado na Rodovia Macapá-Fazendinha, AP, BR, cuja exsicata encontra-se depositada na Coleção de Espécies Botânicas do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá (HAMAB/IEPA) registrada sob o número 019172 (Figura 1).



Figura 1. Árvore de *Dipteryx odorata* (cumaru), localizada na Rodovia Macapá-Fazendinha, AP, Brasil (SISGEN A82017D). Fonte: Jurema do S. A. Dias.

2.1.2. Coleta e obtenção do óleo de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd.

Após a coleta dos frutos, estes foram armazenados em um saco plástico e transportados ao Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amapá. Após a secagem em temperatura ambiente, os frutos tiveram seus tegumentos escarificados e através de aberturas laterais e naturais dos frutos, as sementes foram retiradas. As sementes foram pesadas, para a obtenção do peso fresco. Em seguida, as sementes foram colocadas sobre papel alumínio e levadas à estufa de secagem e esterilização, à temperatura de 60°C. A estabilidade do peso seco foi obtida após 96 h, medida a cada 24 h (Figura 2, diagrama de coleta, secagem, extração e análise por CG-MS, do óleo de *D. odorata*).

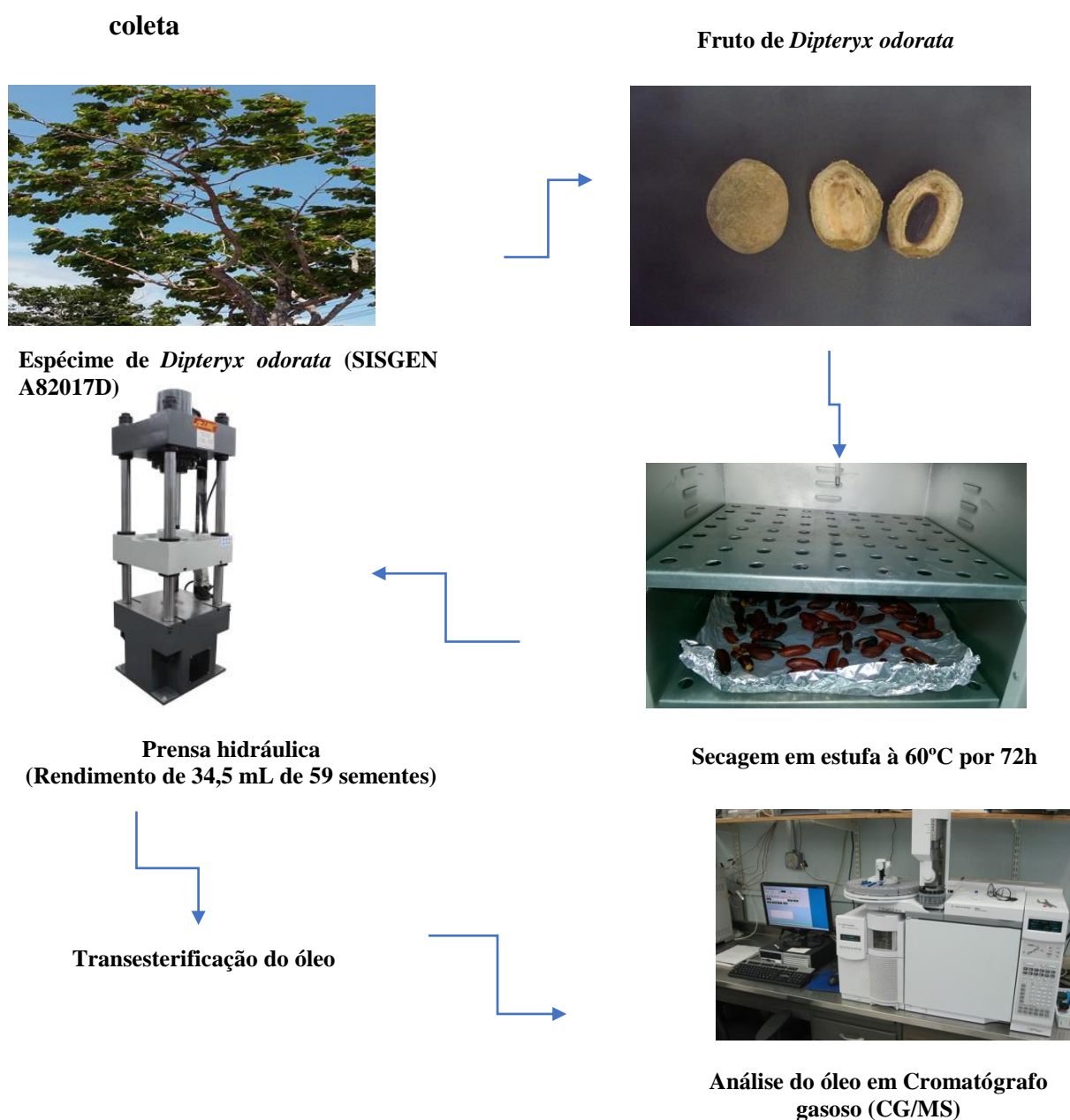


Figura 2. Diagrama de coleta, secagem, extração por prensa hidráulica a frio, transesterificação e análise por CG-MS, do óleo de *D. odorata*.

2.1.3. Transesterificação do óleo de *Dipteryx odorata* para análise por cromatografia gasosa acoplada a massa

A produção do éster etílico oriundo de *Dipteryx odorata* por catálise enzimática foi colocado em um frasco erlemeyer de 3 ml contendo 150 mg (154 µL) of OFDo, 475 µL de etanol e 15 mg de CALB. A mistura foi incubada a 32°C sobre um shaker orbital a 130 rpm (LUCADEMA). Após 24 h, a reação foi completada e filtrada e a fase orgânica seca com sulfato de sódio e o solvente removido sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel com uma mistura de n-hexano e acetato etílico (9:1) como eluente e a análise caracterizada usando um GC-MS (SOUZA et al., 2017).

A cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS) foi realizada sobre um aparato Shimadzu/GC 2010 acoplado a um Shimadzu/AOC-5000 auto-injetor e um detector de impacto eletrônico (Shimadzu MS2010 Plus) (70 eV), equipado com DB-5MS fundido a uma coluna de sílica gel (Agilent J & W Advanced 30 m x 0.25 mm x 0.25 mm) (65 kPa). Os parâmetros foram: 1:15 split ratio, o Helium usado como gás de arraste, volume de injeção de 1.0 mL, temperatura de injeção: 250°C, detector de temperatura a 270°C, temperatura inicial da coluna: 100°C, permanecendo por 2 min, a uma taxa de aquecimento de 6°C/min a 280°C, permanecendo por 5 min. O tempo total da análise foi de 37 min. A identificação dos ésteres dos ácidos graxos foi realizada por comparação dos espectros de fragmentação com aqueles contidos na biblioteca do CG-MS (MS database, NIST 5.0) (FERREIRA et al., 2016).

2.1.4. Isolamento das espécies fúngicas *A. nomius* e *A. fumigatus* isolados de *B. excelsa*

As sementes de castanha-da-Amazônia, foram coletadas na Reserva Extrativista do Rio Cajari, Amapá, Amazônia Oriental, Brasil, nas localidades Martins (52°17'30"W; 0°34'36"S), Marinho (52°13'25"W; 0°34'40"S) e Pedra Preta, no município de Laranjal do Jari. O clima da região é do tipo AM, segundo Köppen, apresentando temperatura média anual de 25°C e precipitação média de 2300 mm, concentrada entre os meses de dezembro e junho. O relevo é muito acidentado e o solo predominante é do tipo latossolo profundo de origem Terciária (PAIVA; GUEDES; FUNI, 2011).

Os isolados fúngicos 4K7 e 26 Nat (SISGEN A5331F0), foram obtidos por isolamento indireto em meio DG18 (Peptona, 5 g; Glicose, 10g; Fosfato Monobásico de Potássio, 1 g; Sulfato de Magnésio, 0,5 g; Sulfato de Zinco, 0,01 g; Sulfato de Cobre, 0,005 g; Dicloran, 0,002 g; Cloranfenicol, 0,05 g; Clorotetraciclina, 0,05 g; Agar, 15 g, suplementado com Glicerol, 220 g). Após desinfestação em etanol (70% por 5 min.), NaOCl (12500 ppm por 5 min.) e em água destilada esterilizada, inoculou-se quatro fragmentos de amêndoas e cascas

de castanha-da-Amazônia por placa, após desinfestação em álcool 70% (1 min.), hipoclorito de sódio (1 min.) e água destilada esterilizada (2 min.). Incubando-os por sete dias a 25°C, em fotoperíodo de 12 h no escuro e 12 h no claro (DIAS et al., 2011). Após obtenção dos isolados monospóricos, estes foram enviados ao Laboratório de Fitopatologia da UNB, para a realização da taxonomia molecular.

2.1.5. Extração do DNA genômico dos fungos *Aspergillus nomius* e *Aspergillus fumigatus*

A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com o método de extração descrito por Raeder e Broda (1985) a partir de cultivos líquidos em meio Czapek Yeast Extract medium (CYA) (PITT; HOCKING, 2009) incubados a 28 °C, 180 rpm por 3 dias.

2.1.6. Identidade taxonômica molecular dos fungos *Aspergillus nomius* e *Aspergillus fumigatus*

A identidade taxonômica dos isolados fúngicos, foi realizada a partir da análise de sequência da região nuclear ITS1-5, 8S-ITS2 do DNA ribossomal e gene parcial da calmodulina. Cada reação de PCR foi realizada com 10 ng de DNA genômico, 2,5 mmol⁻¹ de cada primer, 1 mmol⁻¹ dNTPs, 4mmol⁻¹ MgCl₂, 1 U de Taq Platinum[®] polymerase (Invitrogen) e 1X Taq Platinum[®] polymerase buffer (Invitrogen). A região ITS do DNA ribossomal foi amplificada usando os primers ITS 5 e ITS 4 (WHITE et al., 1990) e a região da calmodulina amplificada com os primers Cmd 5 e Cmd 6 (HONG et al., 2006). Os ciclos da PCR foram realizados de acordo com o programa: desnaturação inicial a 94 °C por 4 min, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento do primer por 1 min, a 50 °C para os primers ITS 5 e ITS 4, e a 60 °C para os primers Cmd 5 e Cmd 6, extensão a 72 °C por 1 min, e uma extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos de PCR foram purificados com ExoSAP-IT[®] (USB, Cleveland, Ohio, USA) e sequenciados usando Big Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing chemistry (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) no ABI 3700 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A identificação molecular foi realizada por meio de comparação das sequências no banco de dados NCBI usando o algoritmo BLASTn (ALTSCHUL et al., 1990).

2.1.7. Caracterização dos isolados fúngicos quanto à produção de aflatoxinas

A caracterização dos isolados fúngicos quanto à capacidade de produção de aflatoxinas, foi realizada de acordo com Midorikawa et al. (2014). As amostras foram cultivadas em meio semi-sólido indutor para a produção de aflatoxinas, Yeast Extract Sucrose (YES) (20g/L de extrato de levedura; 0,5 g/L de MgSO₄.5H₂O; 150 g/L de sacarose; 0,1 g de

ZnSO₄; 0,05 g CuSO₄; 15 g/L de agar, pH 7,0. A atividade da água (Wa) do meio de cultura foi ajustada com glicerol usando uma mistura de glicerol/água (glicerol/ Wa 10,8 ml/ 0,99 Wa), de acordo com Schmidt-Heydt et al. (2009). Os isolados de *A. nomius* e *A. fumigatus*, foram cultivados por 7 dias à 25°C. Após o tempo de cultivo, todo o conteúdo micotoxigênico foi extraído de cada placa colonizada, sob agitação constante em 10 mL de metanol à temperatura ambiente durante 60 minutos. Seguida a agitação, 0,5 mL do sobrenadante foi filtrado em papel de filtro Whatman No. 1. A essa alíquota filtrada, foram adicionados 0,5 mL de água purificada tipo I e uma nova filtração em membrana de teflon 0,22 µm foi realizada. Um total de 10 mL do filtrado foi diluído em 990 µL de acetonitrila: água (20:80, v/v). A diluição do filtrado foi submetida a análise UPLC/MS/MS (Cromatografia Líquida de Ultra Performance acoplada com espectrometria de massa tandem). Padrões das aflatoxinas e ácido ciclopiazônico foram obtidas da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA), e os solventes líquidos para cromatografia da Merck (Darmstadt, Germany). As curvas de calibração foram preparadas para cada padrão de micotoxina usando seis concentrações: AFB1 0.25, 0.5, 1.0, 5.0, 7.5 e 10.0 ng/mL; AFB2 0.06, 0.125, 0.25, 1.25, 1.875, 2.50 ng/mL; AFG1 0.25, 0.50, 1.0, 5.0, 7.6, 10.0 ng/mL; AFG2 0.06, 0.125, 0.25, 1.25, 1.875, 2.50 ng/mL). O R² variou entre 0,94 e 0,994, dependendo da toxina. Os limites de quantificação foram 0,1 ng/mL para AFB1; 0,04 para AFB2; 0,10 para AFG1; 0,02 para AFG2. As análises em UPLC-MS/MS foram realizadas em um sistema ACQUITY UPLCTM, com sistema de separação acoplado ao espectrômetro de massas de quadrupolo sequencial Quattro PremierTM XE (Waters, Manchester, UK). O software MassLynx 4.1 equipado com software QuanLynx (Waters) foi usado para controle dos instrumentos e a análise de dados. A separação cromatográfica foi feita em uma coluna ACQUITY UPLC BEH C18 (1.7 µm, 2.1 × 100 mm; Waters). A eluição foi realizada utilizando o gradiente: fase móvel A (água + 0,2 % de ácido fórmico) e fase móvel B (acetonitrila + ácido fórmico 0,2 %) : 0–1 minuto (10 % B); 10 min (50 % B), : 10,5 minutos (85 % B); 11 minutos (10 % B), e 12 minutos (10 % B). O fluxo foi de 0,4 mL/min, temperatura de 40°C e o tempo total de corrida de 12 minutos. Foi usado uma programação para o loop total da injeção, com um volume de injeção de 10 µL. O Espectrômetro de massas foi operado em modo positivo com fonte de ionização por eletronspray (ESI). Os parâmetros de operação foram otimizados para as condições de voltagem do capilar 3,5 kV (mode positivo), com temperatura da fonte de íons 120 °C e temperatura de desolvacão de 450 °C. Fluxo do gás no cone foi de 50 L/h.

2.1.8. Potencial anti-fúngico *in vitro* do óleo de *Dipteryx odorata* sobre *A. nomius* e *A. fumigatus*

A atividade antifúngica foi realizada utilizando-se o método de Poison Food, descrito por Thomidis e Filotheou (2016) adaptado. O meio de cultura utilizado foi o CYA (Sacarose, 30 g; Extrato de Levedura, 5 g; K₂HPO₄, 1 g; NaNO₃, 2g; KCl, 0,5 g; MgSO₄.7H₂O, 0,5 g; FeSO₄.7H₂O, 0,01g; ZnSO₄.7H₂O, 0,01g; CuSO₄.5 H₂O, 0,005 g; Cloranfenicol, 0,01 g; agar, 20 g; água, 1L) (PITT; HOCKING, 2009) adaptado, autoclavado, por 20 min. a 121 °C. As soluções foram adicionadas ao meio, após atingirem 45 °C e homogeneizadas com a ajuda de um bastão de vidro. O Itraconazol, foi utilizado na concentração de 10 µg/mL, pesando-se 25 µg do Itraconazol, dissolvido em 2,5 mL de DMSO. Desta solução, retirou-se 250 µL, colocando-se em um erlemeyer de 250 mL de meio CYA. Do controle de DMSO, retirou-se 250 µL de DMSO, colocados em 250 mL de meio CYA. Os controles utilizados foram, Itraconazol + DMSO (positivo), DMSO + meio, tween 20 + meio e o meio CYA sem os controles.

Um disco de micélio de cada colônia de *Aspergillus nomius* e *Aspergillus fumigatus* respectivamente, foi retirado da borda de uma cultura de três dias de idade, com a ajuda de uma ponteira, cortada ao meio, utilizando-se o seu maior diâmetro e colocado no centro de cada placa de Petri com o meio CYA e incubados a 28 ± 2°C, em regime de fotoperíodo, 12 horas de luz e 12 horas no escuro.

2.1.9. Análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado e os tratamentos representados pelas diferentes concentrações, 10 µg/mL, 100 µg/mL e 1000 µg/mL, replicados cinco vezes e os dados foram obtidos através da medição do diâmetro transversal e longitudinal de cada colônia, a cada 24 h, calculando-se posteriormente a percentagem de inibição do crescimento micelial (% PIC) (THOMIDIS; FILOTHEOU, 2016) do óleo de *D.odorata* sobre *Aspergillus nomius* e *A. fumigatus*:

$$\text{PIC} = \{(\text{diâmetro da test.} - \text{diâmetro do trat.})/\text{diâm. da test.}\} \times 100$$

correlacionanda às diferentes concentrações do óleo. A análise estatística foi realizada através da ANAVA seguida do teste de Tukey a 5%, aplicando-se o Software GraphPad Prism versão 6.0.

2.2. Experimento 2: Teste de toxicidade aguda do óleo de *Dipteryx odorata* sobre Zebrafish (*Danio rerio*)

2.2.1. Animais experimentais

Os animais foram adquiridos da empresa Acqua New Aquários e Animais LTDA ME situada em Itagassu – PE, sob o protocolo de autorização de uso nº 526140011289802 de 25 de maio de 2018, com registro no IBAMA nº 82957, sendo transportado por via aérea até a cidade de Macapá pela empresa Gollog Serviços de Cargas Aéreas, protocolo de envio nº 12700094619755.

2.2.2. Observação de *Danio rerio* inicialmente em quarentena

Para a realização deste estudo, foram utilizados peixes da espécie *Danio rerio*, os quais foram analisados inicialmente quanto ao seu comportamento, após a aplicação das diferentes doses do óleo de *Dipteryx odorata*, sendo em seguida, preparados para a realização da análise histopatológica. Para todos os estudos foram utilizados animais adultos (12 a 14 meses), os quais ao chegarem no laboratório foram deixados inicialmente em quarentena, para observação dos animais (Figura 3).

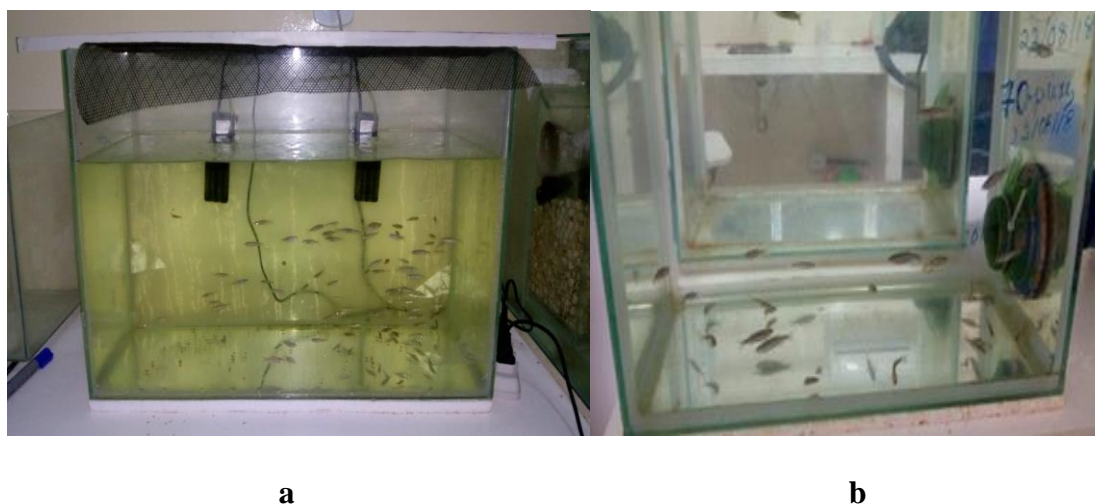


Figura 3. **a.** Sistema de quarentena; **b.** Sistema de conservação dos *Danio rerio*, utilizado ao longo do experimento (Fonte: Jurema do S. A. Dias).

Os *D. rerio* foram mantidos na temperatura de $26 \pm 10^\circ\text{C}$ e 10h claro/14h escuro. Foi utilizada água normalizada (ISSO 1996) para a manutenção dos *D. rerio* adultos. Para a produção de água padronizada, foi preparada a partir de água desionizada e os seguintes sais foram adicionados: $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (117,6 mg/L), $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (49.3 mg/L), NaHCO_3 (25.9 mg/L) e cloreto de potássio (2,3 mg/L) (Sigma Aldrich).

A água do sistema foi constituída por água desmineralizada misturada com água não clorada (16:1), adicionada de NaCl a uma condutividade de cerca de $275 \mu\text{S}$ (132 mg L^{-1}), o

que é ótimo para o zebrafish de acordo com Nusselin-Volhard e Dahm (2002), e também previne o crescimento de fungos. As concentrações (em mg L⁻¹) dos ions predominantes na água do tanque mãe são: SO₄²⁻ - 4.25, Na⁺ 43.19, NO₃⁻ 0.09, Mg²⁺ 0.75, K⁺ 0.21, Cl⁻ 63.93, Ca²⁺ 5.31, e HCO₃⁻ 19.31, total de ~ 137 mg L⁻¹. O fotoperíodo foi de 10:14 (luz: escuro), onde o período de luz foi iniciado no nascer do sol artificial. O nascer do sol foi realizado aumentando gradualmente a tensão da lâmpada luminosa fracas por 10 minutos antes da intensidade luminosa rosa na sala. Os aquários foram iluminados com 95-105 Lux a partir de uma fonte de luz artificial.

Os *D. rerio* adulto foram alimentados com ração comercial duas vezes ao dia, tendo-se o cuidado de retirar-se os resíduos deixados no fundo do aquário, para se evitar a alteração no pH da água e presença de microrganismos. O tratamento dos animais, foi estabelecido de acordo com o guia para o cuidado e uso de animais de experimentação.

2.2.3. Avaliação dos parâmetros comportamentais de *Danio rerio*

A análise comportamental foi realizada pela administração das diferentes doses (tratamentos): 1000 mg/kg O+T, 3000 mg/kg O+T, 1000 mg/kg OP, 5000 mg/kg OP e 8000 mg/kg OP e os controles, água salina e tween 20, através de via oral (gavage) (Figura 4a), antes os peixes passaram por um período de 24h de jejum. Foram utilizados 12 animais x 7 tratamentos (5 doses e 2 controles) (triplicata N=12/dose, distribuídos em 3 aquários) (Figura 4b) e observados por 48 hs. Nesse período foi observado o comportamento do animal após a aplicação do óleo puro e em solução de óleo + Tween 20. As observações foram realizadas após 0, 3, 24 e 48 h, seguindo-se a metodologia de Souza et al. (2016). As reações comportamentais foram caracterizadas em 3 estágios:

Estágio I: 1) aumento na atividade do nado e 2) tremores no eixo da cauda;

Estágio II: 1) Nado Circular e 2) Perda da postura

Estágio III: 1) Perda da motilidade; 2) Deposição do animal no fundo do aquário e 3) Morte.

**a****b**

Figura 4. **a.** aplicação oral (gavage) das doses do óleo de *D. odorata* em *D. rerio*. **b.** Observação do comportamento de *D. rerio*, após a aplicação das doses.

2.2.4. Monitoramento da mortalidade

A mortalidade foi monitorizada ao longo de 48 h e os animais considerados mortos, quando o movimento do opérculo e resposta a estímulos mecânicos já não puderam ser detectados. Não ocorrendo a morte dos peixes, estes foram submetidos à eutanásia em água gelada, a 5°C.

2.2.5. Avaliação dos parâmetros histopatológicos

Para avaliação histopatológica, os órgãos (fígado, rins e intestino) foram fixados em solução de Bowin por 24 hs. Os animais fixados tiveram as nadadeiras removidas e a calda seccionada na linha que vai do ânus até a porção posterior da nadadeira dorsal, este procedimento reduz o tamanho dos blocos, o que facilitou a microtomia. Após a fixação, as peças foram descalcificadas em solução de EDTA a 7% por 48 hs. As metades foram desidratadas em uma bateria de álcoois, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina (em lentilhas, marca Inlab) (Figura 5).

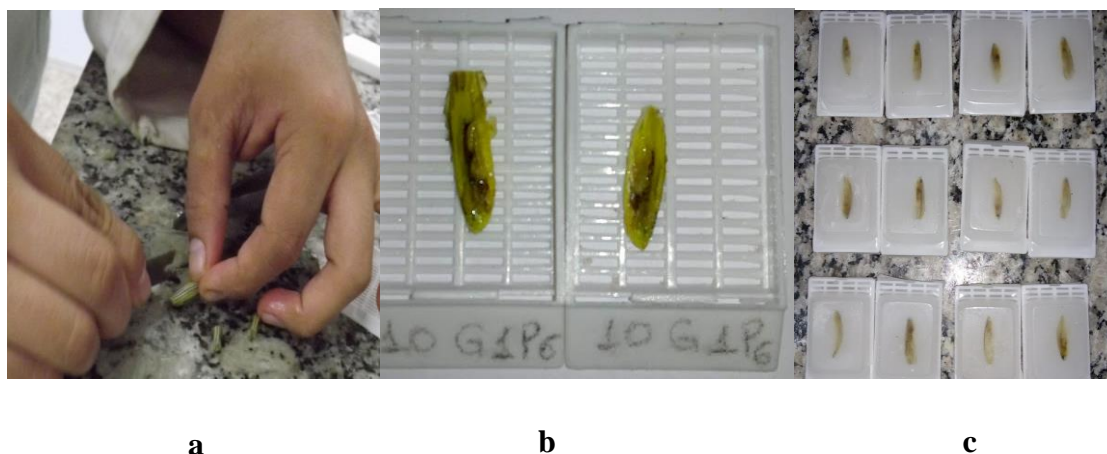


Figura 5. Preparo das amostras de *D. rerio* para corte no micrótomo. **a.** remoção das nadadeiras; **b.** corte longitudinal até a porção posterior da nadadeira dorsal; **c.** *D. rerio* em blocos de parafina.

Os blocos foram cortados longitudinalmente em micrótomo rotativo (Slee Medical) com navalhas descartáveis (Slee) na espessura de 5 μm . Para a realização dos cortes, os animais foram posicionados em decúbito lateral. Os cortes foram dispostos em lâminas de vidro para microscopia óptica, as quais foram deixadas por 25 minutos em estufa a 50°C para a secagem e melhor aderência do material. O material foi corado em HE (hematoxilina de Harris-LABORCLIN e eosina amarelada-INLAB), de acordo com a técnica descrita por Souza et al. (2016).

Para a análise dos órgãos dos animais submetidos aos testes de toxicidade (N = 12 animais por dose), foram obtidas 4 lâminas por animal, com cada lâmina contendo de 4 a 6 cortes. Os cortes foram realizados seguindo-se a técnica descrita por Borges et al. (2018).

As lâminas foram observadas em microscópios ópticos marcas Olympus-micronal BX41 e fotografadas com câmera MDCE-5C USB 2.0 (digital).

2.2.6. Análise histopatológica

Para a análise histopatológica foram consideradas as alterações histopatológicas observadas no fígado, rins e intestino. Tomou-se como base uma escala descritiva de acordo com os índices de alterações histopatológicas (IAH) utilizado por Poleksic; Mitrovic-Tutundzic (1994). A classificação foi estabelecida de acordo com a ocorrência e a gravidade das alterações histopatológicas, presentes nos órgãos avaliados segundo Souza et al. (2016); Borges et al, (2018) e Carvalho et al. (2017).

2.2.7. Análise estatística

Para análise dos dados histopatológicos aplicou-se ANAVA (one-way) seguida do teste de Tukey-Kramer para comparação dos grupos testes e controle. Os dados foram expressos como média \pm o erro padrão médio. Resultados com $p < 0,05$, foram considerados estatisticamente significativos, aplicando-se o Software GraphPad Prism versão 6.0.

3.RESULTADOS

3.1.Obtenção do óleo de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd.

Após a secagem em temperatura ambiente, os frutos de *Dipteryx odorata*, tiveram seus tegumentos escarificados e através de aberturas laterais e naturais dos frutos, as sementes foram retiradas. As sementes foram pesadas, para a obtenção do peso fresco, obtendo-se o valor de 147,31 g de peso fresco, correspondente a 59 sementes. Em seguida, as sementes foram colocadas sobre papel alumínio e levadas à estufa de secagem e esterilização, à temperatura de 60°C. A estabilidade do peso seco foi obtida após 96 h, medida a cada 24 h, obtendo-se um valor de 136,94 g de peso seco. Após a prensagem das 59 sementes por prensa hidráulica a frio, obteve-se um volume (rendimento) de óleo de 34,5 mL e peso total do bagaço de 101,7 g.

3.2. Transesterificação do óleo de *Dipteryx odorata* para análise por cromatografia gasosa acoplada a massa

Segundo as análises por CG-MS os principais ácidos graxos presentes no óleo extraído das sementes de *Dipteryx odorata* foram o ácido oleico (C18:1n-9) monoinsaturado, com 53% de abundância relativa, e em seguida o ácido palmítico (C16:0) saturado, apresentando aproximadamente 13% do total relativo da mistura. Os demais ácidos graxos identificados, como o polinsaturado linoleico e monoinsaturado vaccênico também foi encontrado nesta amostra, porém ambos com baixa concentração relativa, 8% e 2%, respectivamente, como descrito na Tabela 1, Figura 6. O perfil dos ácidos graxos identificados nessas sementes de *Dipteryx odorata* foi semelhante ao encontrado por Santos et. al (2016).

Tabela 1. Composição dos ácidos graxos presentes nas sementes de *Dipteryx odorata* determinados por análise de CG-MS, por derivatização via transesterificação.

Fatty acid ^b	Peak (min)	Molecular formula ^a	Relative Concentration ^b (%)
Palmitic	1	C16:0	13
Linoleic	2	C18:2n-6	8
Oleic	3	C18:1n-9	53
Vaccenic	4	C18:1n-7	2
Stearic	7	C18:0	7
Σ Saturated	-	-	20
Σ Monounsaturated	-	-	55
Σ Polyunsaturated	-	-	8

^aMS database (NIST 5.0); ^b % of FAEE corresponding fatty acid. ** Peaks 5, 6 and 8 no identification.

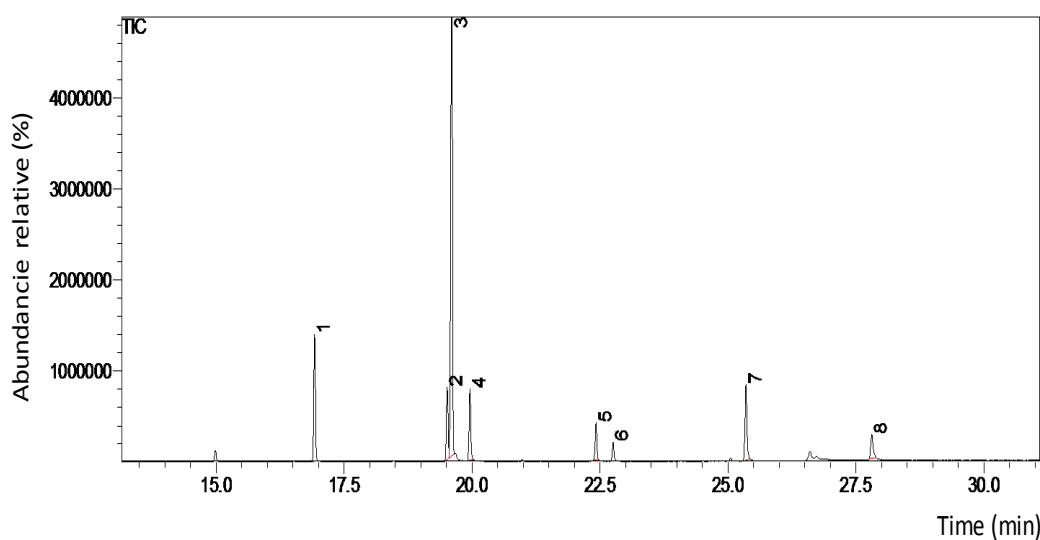


Figura 6. Cromatograma (GC-MS) do etil éster derivado de *Dipteryx odorata* via catálise por CAL-B.

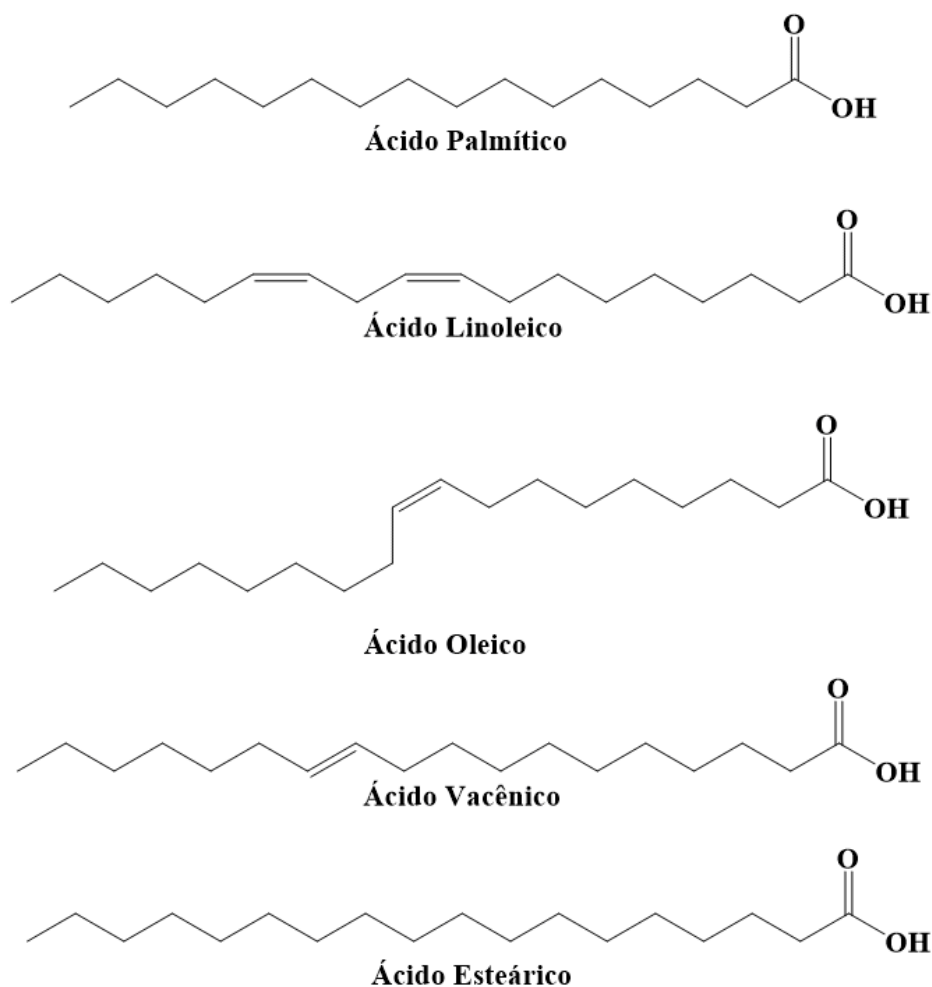
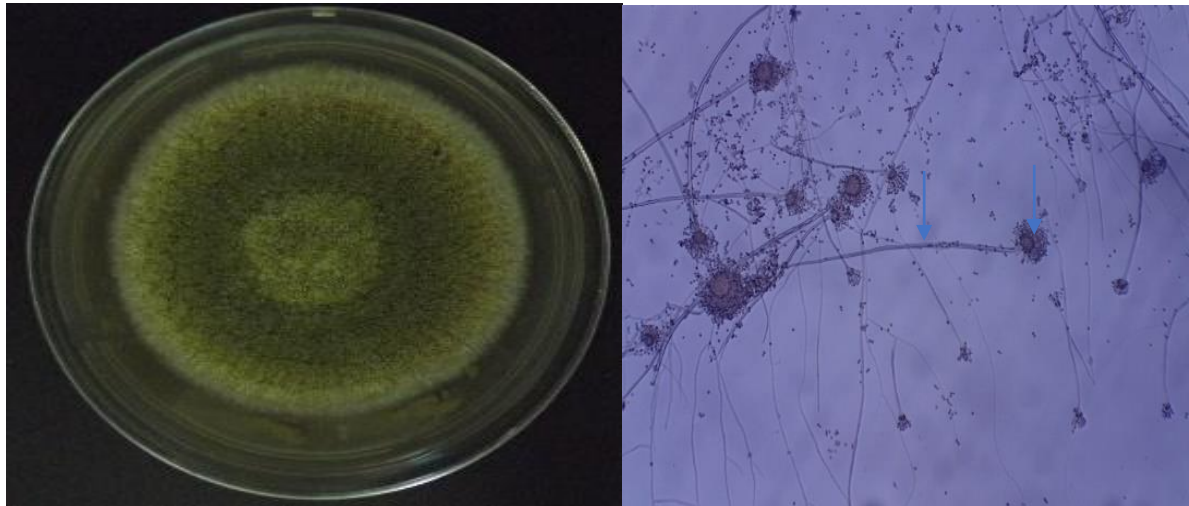


Figura 7. Compostos identificados no óleo fixo de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd.

3.3. Caracterização através da taxonomia morfológica, molecular, sequenciamento e produção de metabólitos secundários das espécies *Aspergillus nomius* e *Aspergillus fumigatus*

As espécies fúngicas, após a identificação e a caracterização por meio da taxonomia morfológica e da biologia molecular, seguidas de sequenciamento e produção de metabólitos secundários, tiveram seus registros efetuados no SisGen sob o registro de número A5331F0 (Figuras 8, 9 e Tabela 2 e 3).

3.3.1. Taxonomia morfológica de *A. nomius*

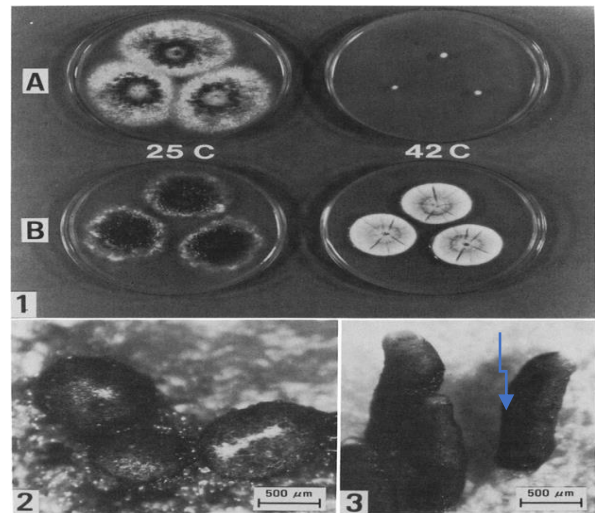


a

b



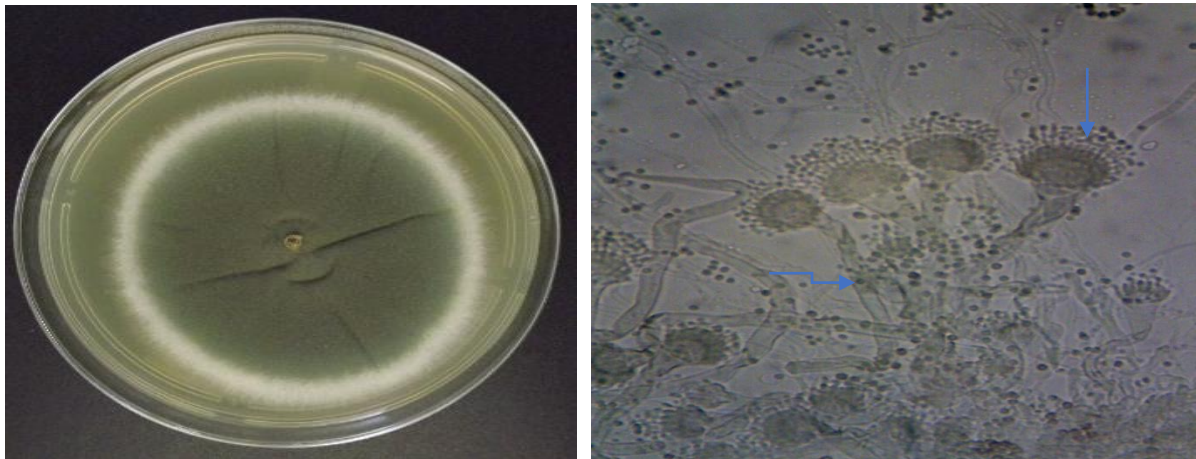
c



8.3

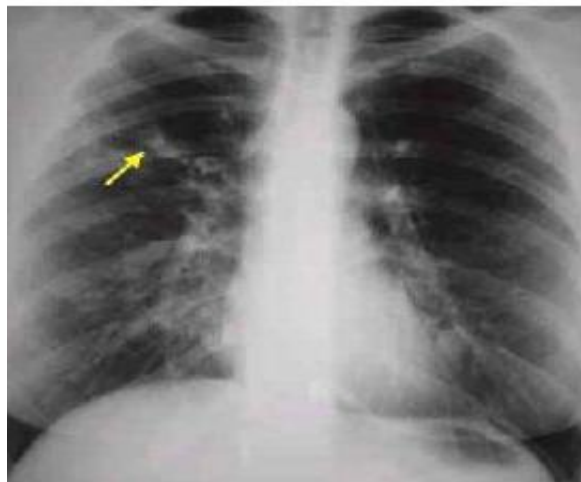
Figura 8. a. Colônia filamentosa de *A. nomius* em meio CYA; b. conídios e conidióforos de *Aspergillus nomius*; c. esclerócios de *A. nomius* (SISGEN A5331F0) (Fonte: Jurema do S. A. Dias). **8.3.** esclerócio em forma de bala de *A. nomius* (NRRL 13137) (Kurtzman, Horn e Hesseltine (1987)).

3.3.2. Taxonomia morfológica de *A. fumigatus*



a

b



c

Figura 9. a. colônia pulverulenta de *A. fumigatus* em meio CYA; b. Conídios e conidióforos com 48h (SISGEN A5331F0). Fonte: Jurema do S. A. Dias. c. Radiografia de tórax com sinal de dedo e luva (seta amarela). Fonte: Jornal de Pneumologia, Ano 2019, vol. 45, nº 2, mar/abr.

3.3.3. Taxonomia molecular das espécies *Aspergillus nomius* e *Aspergillus fumigatus*

As espécies fúngicas, após a identificação e a caracterização por meio da taxonomia morfológica e da biologia molecular, seguidas de sequenciamento, tiveram seus registros efetuados na Coleção micológica do Laboratório de Interação Planta-Praga do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Em relação ao isolado 4K7, a região do BLASTn mostrou 100% identidade com *A. fumigatus*, amostra tipo, ATCC MYA4609 e 99% identidade com NRRL 6113, isto sendo confirmado através do marcador secundário Calmodulina. Enquanto que o isolado 26NAT, de acordo com o marcador secundário, região

da calmodulina e o BLASTn, demonstraram 100% de identidade com *A. nomius*, quando comparado à amostra tipo, NRRL 6552; e de acordo com a região ITS, demonstrou 100% de identidade com *A. nomius*, ao ser comparado à amostra NRRL 6552 (Tabela 2).

Tabela 2. Identificação, origem, taxonomia morfológica, Análise BLASTn (rDNA ITS), cobertura, E valor, Máxima de identidade, Acesso ao NCBI.

Identificação Isolado UnB	Origem geográfica	Taxonomia morfológica	BLASTn (rDNA ITS)	Cobertura	E valor	Máxima de Identidade	Acesso ao NCBI
4K7	Laranjal do Jari, AP	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	97%	0.0	99%	JX092088.1
26NAT	Laranjal do Jari, AP	<i>A. nomius</i>	<i>A. nomius</i>	95%	0.0	99%	AF338647.1

Os isolados também foram caracterizados quanto à produção de metabólitos secundários, identificando-se as Aflatoxinas, AFB1⁺⁺, AFB2⁺⁺⁺, AFG1⁺⁺, AFG2⁺⁺ e AFM1⁺⁺, produzidas por *A. nomius*, enquanto que as mesmas aflatoxinas foram produzidas por *A. fumigatus*, variando apenas quanto à intensidade por *A. fumigatus*, AFB1⁺⁺⁺, AFB2⁺⁺⁺, AFG1⁺⁺⁺, AFG2⁺⁺ e AFM1⁺⁺⁺ de acordo com a metodologia de Schmidt-Heydt et al. (2009) (Tabela 3).

Tabela 3. Caracterização dos isolados fúngicos quanto à produção de aflatoxinas.

Área Natanael					Produção de AFLs			
					AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
2	DG18	I2C5P15	<i>A. nomius</i>	35°C Foto	++	+++	++	++
Área K7					Produção de AFLs			
					AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
26	DG18	I2C4P14	<i>A. fumigatus</i>	35°C Esc.	+++	+++	+++	++

Legenda: - não produziu; + e ++ houve produção, +++ muito produção.

A. fumigatus, foi isolado da castanha-da-Amazônia, por Bayman et al. (2002), porém sem ter seus extrólitos ou metabólitos secundários identificados. Assim como, Calderari et al., (2013); Gonçalves et al., (2012); Freire et al., (2000); Bayman et al., (2002); Reis et al., (2012); Taniwaki et al., (2012), isolaram *A. nomius* juntamente com outras espécies fúngicas de castanha-da-Amazônia, porém sem ter seus metabólitos secundários identificados. Enquanto que, Olsen et al. (2008), isolou *A. nomius* da castanha-da-Amazônia, identificando-o como produtor das Aflatoxinas AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2, concordando assim com os dados encontrados neste estudo.

Midorikawa et al. (2014), identificaram *A. nomius*, da castanha-da-Amazônia, como produtor de AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2, concordando com os resultados obtidos por essa espécie em estudo; *A. flavus*, apenas como produtor AFB1 e AFB2, enquanto que *A. fumigatus*, não teve seus metabólitos identificados. Taniwaki et al. (2017), identificou *A. nomius*, isolado da castanha-da-Amazônia, como produtor das AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2, corroborando com os resultados obtidos em estudo, além do ácido tenuazônico. Identificando também, *A. flavus*, como produtor apenas de AFB1 e AFB2 e do ácido ciclopiazônico (CPA).

Dados de caracteres morfológicos podem ser insuficientes para distinguir certas espécies pertencentes à seção *Flavi*, numerosas pesquisas têm sido desenvolvidas, tomando-se como base a técnica molecular, incluindo análises de rDNA ITS e regiões intergênicas, *aflR* e *aflaJ*, para a diferenciação de *A. flavus* e *A. parasiticus* (RODRIGUES et al., 2007; EL KHOURY et al., 2011), bem como análises de AFLP e SNP para a diferenciação de *A. flavus* de *A. oryzae*, *A. parasiticus* de *A. sojae*, *A. tamarii* e *A. nomius* (MONTIEL et al., 2003; Lee; LIOU; YUAN, 2006).

Sequência de bases incluindo análises de rDNA ITS e regiões variáveis de 28S rRNA (HINRIKSON et al., 2005; SAMSON; HONG; FRISVAD, 2006) juntamente com regiões gênicas de calmodulina e β -tubulina (VARGA; FRISVAD; SAMSON, 2011; SAMSON; HONG; FRISVAD, 2006; GLASS; DONALDSON, 1995) podem ser apropriadas para a resolução de espécies de *Aspergillus* estreitamente relacionadas (PILDAIN et al., 2008).

De acordo com Samson et al. (2014) *Aspergillus* compreende um diverso grupo de espécies, baseado em caracteres morfológicos, fisiológicos e filogenéticos, os quais impactam significativamente na biotecnologia, produção de alimentos, ambientes fechados e na saúde humana. Mudanças no Código Internacional de Nomenclatura para algas, fungos e plantas resultaram no deslocamento para um nome por espécie. Assim esses autores, forneceram uma lista atualizada de espécies aceitas para o gênero, contendo agora 339 espécies. Informações acerca dos números dos tipos, das coleções de culturas vivas e os números de acessos ao GenBank, para avaliar sequências representativas de ITS, também foram adicionadas a esta

lista. Assim, as regiões de ITS (ITS1-5.8S-ITS2), são utilizadas como o Código de barras de DNA oficial para fungos (SCHÖCH et al.2012) e Calmodulina, como um marcador secundário para a identificação de espécies de *Aspergillus*. Os quais, foram utilizados para a análise das espécies fúngicas em estudo, comprovando suas identidades.

3.4. Potencial anti-fúngico do óleo de *Dipteryx odorata* no controle *in vitro* de *A. nomius* e *A. fumigatus*.

Na avaliação do efeito antifúngico do óleo de *Dipteryx odorata* (OFDo) foram testadas três concentrações, 10 µg/mL, 100 µg/mL e 1000 µg/mL do óleo, utilizando-se o meio de cultura CYA em todos os testes, demonstrando o crescimento radial dos fungos *A. nomius* e *A. fumigatus* nas 72 h, correspondentes ao crescimento micelial até a metade da placa de Petri e nas 144 h, correspondentes ao crescimento micelial em toda a placa de Petri. As porcentagens de inibição do crescimento micelial (PIC%) foram calculadas fazendo-se comparações com o controle negativo (meio de cultivo sem o óleo).

Como resultado, na inibição do crescimento micelial de *A. nomius*, pode-se observar na Figura 10, que o efeito mudou em relação ao tempo de medição, verificando-se que a concentração de 100 µg/mL apresentou um potencial de inibição do crescimento micelial do fungo, em 39% ao final das 144 h de avaliação, constituindo-se no efeito mais significativo. Enquanto que, sobre *A. fumigatus*, verifica-se que os efeitos mais significativos, ocorreram na concentração de 1000 µg/mL do óleo, proporcionando uma percentagem de inibição de 27,4% nas 72h e de 24,27% nas 144 h de avaliação. Verificando-se assim, maior potencial inibitório do OFDo sobre *A. nomius* em relação a *A. fumigatus*.

Porém, quando comparado ao efeito inibitório do antifúngico comercial Itraconazol, na concentração de 10 µg/mL, o antifúngico padrão comercial, sobrepujou o efeito do OFDo puro em 75 % sobre *A. nomius* e 100 % sobre *A. fumigatus* (Figura 10). Isto pode ser explicado, pelo fato do óleo puro, ter uma mistura de compostos, os quais podem sofrer mudanças quanto ao seu efeito em condições adversas de temperatura, pH, conservação, entre outros fatores, em comparação a um composto puro.

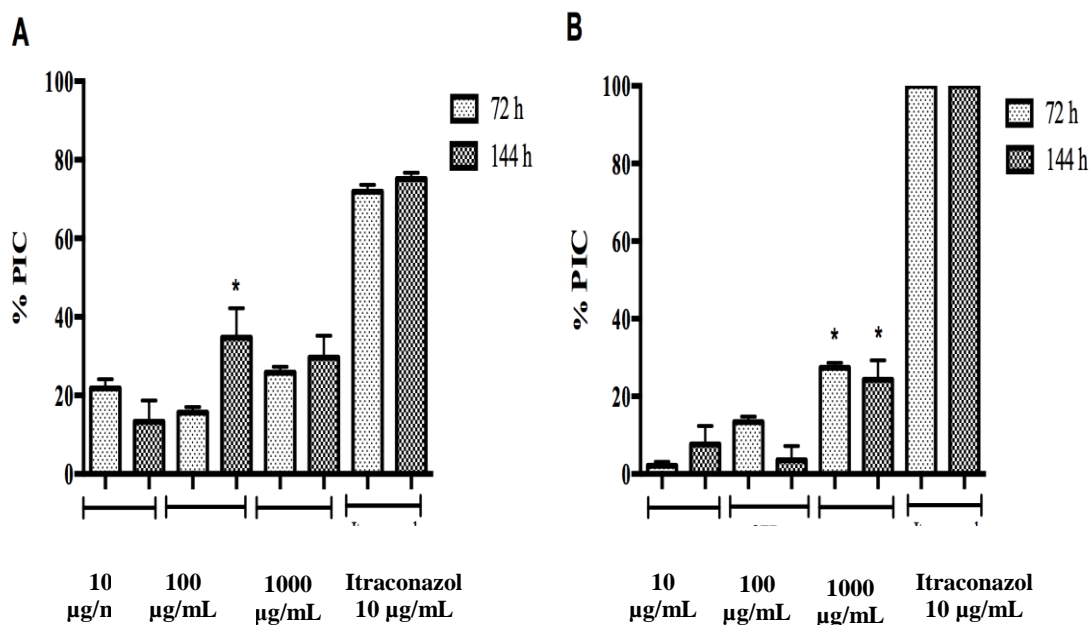
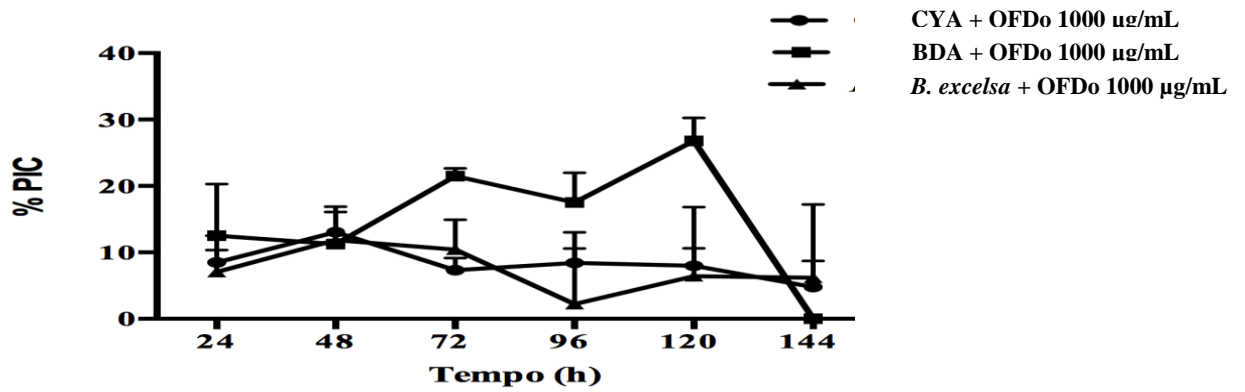


Figura 10. Efeito do óleo de *Dipteryx odorata* (OFDo) sobre o crescimento micelial A) *A. nomius* e B) *A. fumigatus* usando-se três concentrações 10 µg/mL, 100 µg/mL e 1000 µg/mL, expressos como percentagem de inibição do crescimento micelial às 72 h (metade do desenvolvimento) e 144 h (fim do desenvolvimento). Aplicou-se a ANAVA (one-way) seguida do teste de Tukey-Kramer para comparação dos grupos testes e controle. Os dados foram expressos como média \pm o erro padrão médio. Resultados com $p < 0.05$, foram considerados estatisticamente significativos, aplicando-se o Software GraphPad Prism versão 6.0.

Ao testar-se o efeito inibitório do óleo de *D. odorata* (OFDo) sobre o crescimento micelial de *A. nomius* em diferentes meios, observou-se que os efeitos nos meios CYA e *B. excelsa*, onde foi usada a castanha-da-Amazônia, como substrato natural, foram semelhantes apresentando uma porcentagem de inibição, na faixa de 8% e 7% às 24 h com um máximo de inibição de 13% às 48 h para ambos os meios. Enquanto que, o meio BDA expressou o crescente efeito de inibição do OFDo sobre *A. nomius*, desde as 24 h com 13% até a inibição máxima de 27% às 120 h de incubação, ficando demonstrada sua eficiência quanto à sua utilização, na expressão máxima do efeito inibitório do OFDo sobre este fungo (Figura 11A).



Figuras 11A. Efeitos do óleo de *Dipteryx odorata* (OFDo) sobre o crescimento micelial de *A. nomius*, usando uma concentração de 1000 µg/mL, nos três meios de cultura CYA, BDA e *B. excelsa*. Curso temporal da inibição do crescimento micelial às 24, 48, 72, 96, 120, 144 horas.

Este resultado confirmou-se na análise da área sob a curva do curso temporário do efeito inibitório do óleo de *D. odorata* (OFDo) nos três meios de cultura onde o meio BDA permitiu expressar a maior ação inibitória do OFDo sobre o crescimento micelial de *A. nomius*, quando comparado aos meios de cultura CYA e de *B. excelsa* (Figura 11B).

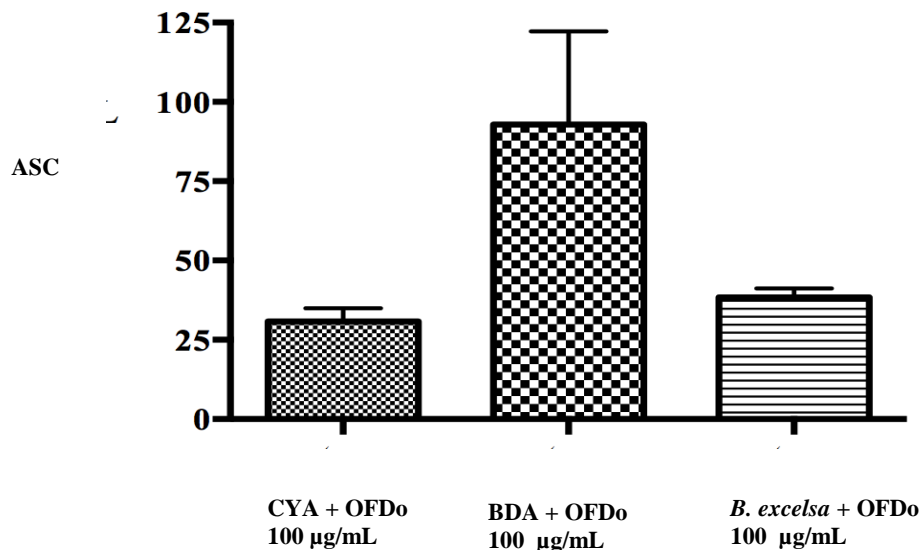
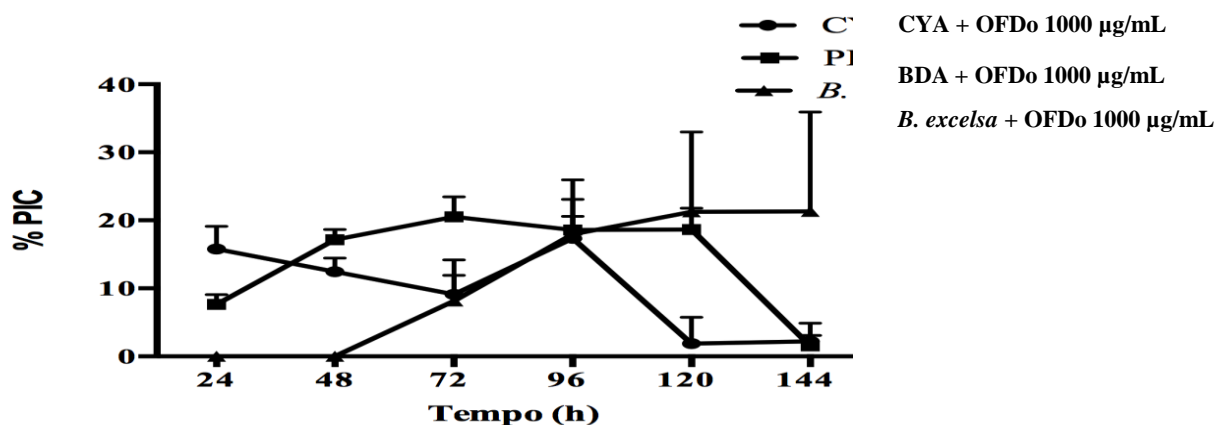


Figura 11B. Efeitos do óleo de *Dipteryx odorata* (OFDo), na concentração de 100 µg/mL, expresso através da utilização do meio de cultura BDA em relação aos meios CYA e *B. excelsa*, com base na área sob a curva de inibição do crescimento micelial de *A. nomius*.

Aplicou-se a ANAVA (one-way) seguida do teste de Tukey-Kramer para comparação dos grupos testes e controle. Os dados foram expressos como média \pm o erro padrão médio. Resultados com $p < 0.05$, foram considerados estatisticamente significativos, aplicando-se o Software GraphPad Prism versão 6.0.

Observou-se que os efeitos inibitórios do OFDo sobre *A. fumigatus* no meio CYA e BDA, ocorreram desde as primeiras 24 h de avaliação, onde no meio CYA o efeito foi de 15% permanecendo até às 96 h, a partir da qual alcançou um efeito máximo de 18%, porém caindo às 120 h. Enquanto que, no meio BDA o óleo começa a fazer efeito a partir das 24 h (8%), aumentando a sua eficiência ao longo das avaliações até as 72 h, quando alcança uma inibição máxima de 20 %, diminuindo a partir das 96 h até o final do teste. Porém, o efeito inibitório do OFDo, no meio *B. excelsa* (castanha-da-Amazônia, como substrato natural) começa às 72 h com 8% atingindo o efeito máximo de 21% nas 120 horas, permanecendo até o final do experimento, às 144 h (21%). Verificando-se assim, que o meio de cultura constituído de castanha-da-Amazônia, como substrato natural, permitiu expressar melhor o efeito inibitório do OFDo sobre o crescimento micelial de *A. fumigatus*, na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 12A).



Figuras 12A. Efeitos do óleo de *Dipteryx odorata* (OFDo) sobre o crescimento micelial de *A. fumigatus*, na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, expresso no meio de *B. excelsa* em relação aos meios CYA e BDA. Curso temporal da inibição do crescimento micelial às 24, 48, 72, 96, 120, 144 horas.

Com a finalidade de verificar se o efeito do óleo de *D. odorata* na inibição do crescimento micelial dos fungos *A. nomius* e *A. fumigatus* teria uma ação fungicida ou fungistática, após 144 horas de avaliação. As colônias fúngicas crescidas em BDA e *B.*

excelsa, foram reativadas em meio CYA, onde se observou um maior crescimento micelial ao longo do tempo de avaliação. Isto pode ser explicado, pelo fato do CYA, ser um meio mais rico em sua composição, inclusive apresentando os metais de Fe, Cu e Zn, necessários ao crescimento dos fungos, *in vitro* e na natureza. Permitindo assim, demonstrar-se como resultado o efeito fungistático do OFDo sobre estas espécies fúngicas, visto que houve crescimento micelial de ambos os fungos em CYA, após a repicagem, diferindo do efeito inibitório inicial, quando da aplicação do OFDo sobre o fungos nos meios de cultura BDA (*A. nomius*) e de *B. excelsa* (*A. fumigatus*).

Ao se reativar as colônias fúngicas em meio CYA, anteriormente crescidas em meio BDA, verificou-se que após sete dias, a maioria dos tratamentos com o fungo *A. nomius*, a colônia cresceu com característica filamentososa e esporulou (colônia verde amarelada), assim como aconteceu com a colônia de *A. fumigatus*, apresentando porém uma colônia pulverulenta e esverdeada, após esporulação. O verso, apresentou cor alaranjada, com provável produção de micotoxinas, quase que imperceptível e as bordas filamentosas e esbranquiçadas. Porém, os resultados demonstraram que, embora os fungos tenham se recuperado, a presença do óleo de *D. odorata* no meio, causou alterações em suas características morfológicas.

3.5. Avaliação da toxicidade aguda do óleo de *Dipteryx odorata* no modelo *Danio rerio*

O tratamento por via oral (gavage) do zebrafish com as doses (1000, 3000 mg/kg do óleo + Tween20; 1000, 5000 e 8000 mg/kg do óleo puro e controles) desencadearam alterações comportamentais significativas nesses animais. Os sinais de estresse foram observados em todos os grupos de tratamento, tendo maior incidência nas primeiras 24 horas após a administração das doses. E foram observados: espasmos, tremores na cauda, perda da postura e motilidade, permanência no fundo do aquário. Porém, apesar das altas doses, não foi registrada mortalidade em nenhum dos grupos (Tabela 4).

Tabela 4. Alterações comportamentais após tratamento com diferentes doses do óleo fixo de *Dipteryx odorata* e grupo controle sobre zebrafish em diferentes tempos de observação. Estágio I: Aumento na atividade natatória, termores na cauda; Estágio II: Movimento natatório circular, perda de postura; Estágio III: Clones, perda da motilidade, deposição do animal na base do aquário, morte.

Grupo	Estágio I			Estágio II			Estágio III		
	0	24	48	0	24	48	0	24	48
Controle	X	-	-	X	-	-	X	-	-
Tween20	X	-	-	X	-	-	X	-	-
1000 mg/kg O+T	X	-	-	X	-	-	X	-	-
3000 mg/kg O+T	X	-	-	X	-	-	X	-	-
1000 mg/kg O	X	X	-	X	X	-	X	-	-
5000 mg/kg O	X	X	-	X	X	-	X	-	-
8000 mg/kg O	X	X	-	X	X	-	X	-	-

O tratamento via oral (gavage) aplicado em *Danio rerio*, com o óleo de *D. odorata* e controles, produziram alterações histopatológicas no fígado, intestino e rins (Figura 13).

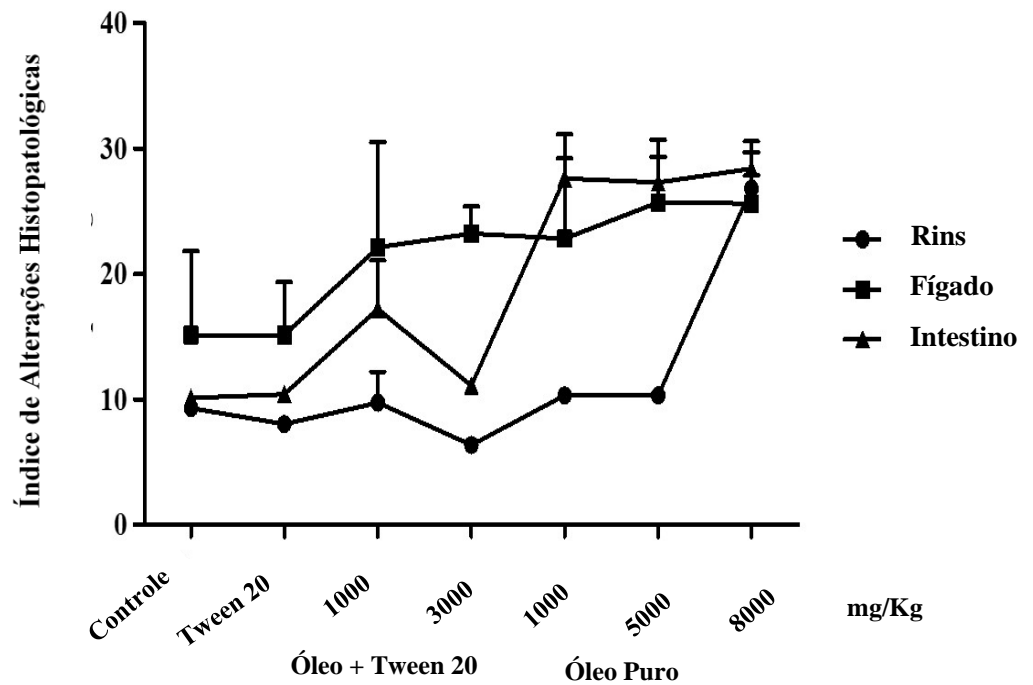


Figura 13. Alterações histopatológicas no fígado, intestino e rins, após tratamento por via oral (gavage) de *Danio rerio* com o óleo de *Dipteryx odorata* e controles.

A partir da sistematização dessas alterações, foi possível calcular o Índice de Alterações Histopatológicas (IHA), estabelecendo-se uma escala descritiva (Tabela 5), a partir da classificação das lesões em estágios, ficando determinado que a cinética das alterações ocorre em função de um crescimento exponencial. Então:

- Para o primeiro estágio : 10^0
- Para o segundo estágio: 10^1
- Para o terceiro estágio: 10^2

Assim, os índices foram calculados de acordo com a seguinte equação:

$$I = \frac{\sum_{i=1}^{na} a_i + 10 \sum_{i=1}^{nb} b_i + 10^2 \sum_{i=1}^{nc} c_i}{N}$$

Sendo:

- a) Primeiro estágio de alterações;
- b) Segundo estágio de alterações;
- c) Terceiro estágio de alterações;

na: número total de alterações consideradas como sendo do primeiro estágio;

nb: número total de alterações consideradas com sendo do segundo estágio;

nc: número total de alterações como sendo do terceiro estágio;

N: número de peixes analisados por tratamento

Tabela 5. Escala descritiva estabelecida de acordo com os Índices de Alterações Histopatológicas encontradas no Fígado, Intestino e Rins, após o teste de toxicidade aguda em *Danio rerio*, de acordo com Souza et al. (2016), adaptada.

Valores de IHA	Classificação
0-10	Órgão funcionalmente normal
11-20	Órgão com alterações de leves a moderadas
21-50	Órgão com alterações de moderadas a graves
> 100	Órgão com danos irreversíveis

A Tabela 6, apresenta a análise de variância realizada com base nas diferentes doses aplicadas sobre os três órgãos avaliados em *Danio rerio*.

Tabela 6. Análise de variância dos tratamentos representados pelas diferentes doses de OFDo em *Danio rerio*.

Tratamentos/órgãos	Fígado	Intestino	Rins
Controle	9.3±0.360 ^b	15.1±6.686 ^b	10.1±0.504 ^b
Tween20	8.0±0.545 ^b	15.1±4.225 ^b	10.4±0.513 ^b
1000 mg/kg O+T	9.73±2.454 ^b	22.1±8.404 ^a	17.2±3.873 ^b
3000 mg/kg O+T	6.36±0.218 ^b	23.2±2.186 ^a	11.1±0.617 ^b
1000 mg/kg OP	10.3±0.665 ^b	22.8±6.394 ^a	27.6±3.500 ^a
5000 mg/kg OP	10.3±0.665 ^b	25.7±4.974 ^a	27.3±2.027 ^a
8000 mg/kg OP	26.8±1.027 ^a	25.2±4.080 ^a	28.4±2.170 ^a

*Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

A porcentagem de alterações histopatológicas totais por estágio, está representada na Tabela 7.

Tabela 7. Porcentagem de alterações histopatológicas por estágio, em função das diferentes dosagens do óleo de *Dipteryx odorata* em *Danio rerio*.

Grupo/órgãos	Estagio I	Estgio II	Estágio III	Total	%
Fígado					
Control	7/11	6/8	0/1	13/20	65
Tween20	6/11	4/8	0/1	10/20	50
1000 mg/kg O+T	7/11	6/8	1/1	14/20	70
3000 mg/kg O+T	6/11	3/8	0/1	9/20	45
1000 mg/kg OP	7/11	5/8	0/1	12/20	60
5000 mg/kg OP	5/11	5/8	0/1	10/20	50
8000 mg/kg OP	9/11	8/8	1/1	18/20	90
Intestino					
Control	12/15	4/5	1/1	17/21	80.9
Tween20	10/15	4/5	1/1	15/21	71.4
1000 mg/kg O+T	11/15	6/5	1/1	17/21	80.9
3000 mg/kg O+T	10/15	4/5	1/1	15/21	71.4
1000 mg/kg OP	10/15	4/5	1/1	15/21	71.4
5000 mg/kg OP	12/15	5/5	1/1	18/21	85.7
8000 mg/kg OP	10/15	6/5	1/1	17/21	80.9
Rins					
Control	8/15	5/9	0/1	13/22	59.0
Tween20	6/15	5/9	0/1	9/22	40.9
1000 mg/kg O+T	7/12	6/9	1/1	14/22	63.6
3000 mg/kg O+T	4/12	5/9	1/1	10/22	45.4
1000 mg/kg OP	5/12	6/9	1/1	12/22	54.5
5000 mg/kg OP	8/12	9/9	1/1	18/22	81.8
8000 mg/kg OP	9/12	7/9	1/1	17/22	77.2

Porcentagem de alterações totais em cada estágio. A porcentagem foi determinada com base no número de peixes por grupo (tratamento) (n=12), de acordo com Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994), Rigolin-Sa´ (1998) Takashima e Hibiya (1995).

No Fígado, ocorreram várias alterações histopatológicas (Table 8, Figuras 14), no entanto, de acordo com os IAHS representados na Tabela 6, apenas os animais tratados com a dose de 8000 mg/kg do óleo puro de *D. odorata* apresentaram índices que classificaram esse

órgão com alterações de moderadas a graves. Os demais grupos apresentaram índices que classificaram o órgão com alterações de leves a moderadas.

Tabela 8. Alterações histopatológicas consideradas para análise do fígado de zebrafish tratado com diferentes doses e concentrações do óleo fixo de *Dipteryx odorata*.

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS	ESTÁGIOS
Desarranjo do cordão hepático	I
Perda de células de contorno ou atípico	I
Perda de contorno de célula nuclear ou atípico	I
Aumento no volume da célula	I
Aumento no volume do núcleo	I
Intensa vacuolação citoplasmática	I
Diminuição na frequência relativa de núcleos	I
Redução de glicogênio	I
Estagnação biliar	I
Aumento na frequência relativa de vasos sanguíneos	I
Aumento relativo de vasos sanguíneos	I
Atrofia nuclear	II
Vacuolação nuclear	II
Degeneração citoplasmática	II
Degeneração nuclear	II
Ruptura celular	II
Hiperemia	II
Ruptura dos vasos	II
Degeneração dos canalículos biliares	II
Necrose	III

Estágios considerados para cada alteração indicados na segunda coluna, de acordo com Souza et al. (2016).

A diminuição na frequência relativa de núcleos, a vacuolização citoplasmática e a diminuição de glicogênio, perda do contorno celular e hiperemia foram as alterações de estágio I mais frequentes em todos os grupos. As alterações do estágio II mais frequentes foram degeneração nuclear e degeneração celular. A necrose focal foi registrada somente no fígado dos animais tratados com as doses de 1000 mg/kg do óleo + Tween20 e 8000 mg/kg do óleo puro. A Figura 14B mostra os aspectos normais do fígado do zebrafish. Somente o IAH dos animais tratados com a dose de 8000 mg/kg do óleo puro foi estatisticamente significativo quando comparado com o controle e com as demais doses de tratamento $p < 0,05$ (Tabela 6, Figura 14).

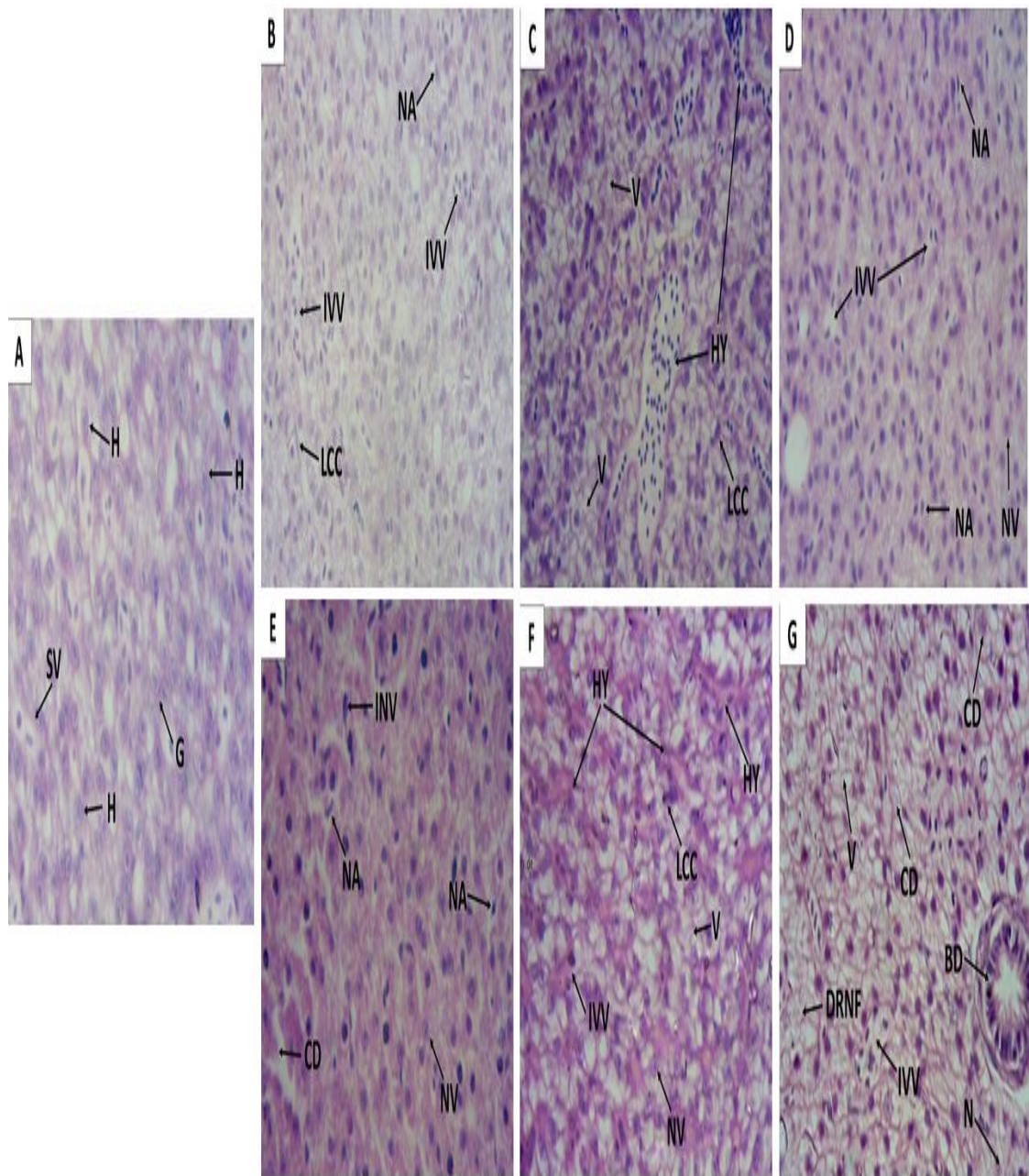


Figura 14. A. Grupo G2; Solução salina; órgão: fígado; IHA:9,3; classificação: normal; H: Hepatócitos; \sv; sinusóides venenosos. G: Glicogênio.B. Grupo G1; (Tween); órgão: Fígado; IHA: 8,0; classificação: normal; IVV: aumento do volume de vasos; LCC: perda do contorno celular; NA: atrofia nuclear. C. Grupo 10G1; óleo + tween 1000 mg; órgão: Fígado; IHA: 9,7; classificação: normal; V:vacuolização; HY: hiperemia; LCC: perda do contorno celular. D. Grupo 30G2(óleo + tween 3000 mg); órgão: Fígado; IHA: 6,3; classificação: normal; IVV: aumento do volume relativo dos vasos; NV: vacuolização nuclear; NA: atrofia nuclear. E. Grupo G3 (óleo 1000 mg); órgão: Fígado; IHA: 10,3; classificação: normal; NV: vacuolização nuclear; NA: atrofia nuclear; INV: aumento do volume nuclear; CD: ruptura celular. F. Grupo G4 (óleo 5000 mg); órgão: Fígado; IHA: 10,3; classificação: normal; HY: hiperemia; IVV: aumento do volume relativo de vasos; NV: vacuolização nuclear; V: vacuolização citoplasmática; LCC: perda do contorno celular. G. G5 (óleo 8000 mg); órgão: Fígado; IHA: 28,6; classificação: alterações moderadas a graves; V: vacuolização; CD: ruptura celular; BD: degeneração de canaliculos biliares; DRNF: diminuição da frequência relativa de núcleos; N: necrose; IVV: aumento do volume relativo dos vasos.

O intestino de *Danio rerio* possui vilosidades compostas de células epiteliais e células caliciformes, protegidas por uma importante barreira mucosa (Figura 15A). Neste estudo, todos os tratamentos com OFDo causaram alterações no tecido intestinal dos animais, como pode ser visto na Figura 15 e na Tabela 9.

Tabela 9. Alterações histopatológicas consideradas para análise do intestino de zebrafish tratado com diferentes doses e concentrações do óleo fixo de *Dipteryx odorata*.

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS	ESTÁGIOS
Dilatação dos vasos presentes nas vilosidades	I
Deslocamento do revestimento epithelial do ápice das vilosidades intestinais	I
Hipertrofia das células epiteliais	I
Hiperplasia das células caliciformes	I
Infiltração linfocítica estromal	I
Infiltração de leucócitos	I
Edema	I
Presença de parasitas	I
Degeneração da camada muscular	I
Degeneração celular	II
Atrofia vilosa	II
Hemorragia na lâmina própria	II
Vacuolização de enterócitos	II
Necrose	III

Estágios considerados para cada alteração indicados na segunda coluna de acordo com Carvalho et al (2017).

Na Tabela 9, observa-se que os IAH do intestino de todos os grupos de tratamento com o óleo de cumarú (1000, 3000 mg/kg do óleo + Tween20; 1000, 5000 e 8000 mg/kg do óleo puro) por via oral caracterizaram esse órgão com alterações de moderadas a graves. Apenas os controles (Solução salina e Tween20) apresentaram IAH que classificou o órgão com alterações de leves a moderadas. Sendo este entre os três órgãos (grupos), o mais afetado por todas as doses do OFDo, seguido pelos rins e por último pelo fígado (com a única dose de 8.000 mg/Kg e média do IAH de 26.8 ± 1.027).

Dentre as alterações histopatológicas mais registradas, a degeneração da camada muscular, a hiperplasia das células caliciformes, a infiltração de leucócitos e o edema foram as principais alterações do estágio I. As alterações mais frequentes do estágio II foram: degeneração celular, atrofia vilositária e vacuolização de enterócitos. A alteração do estágio III registrada foi necrose, observadas em todos os grupos de tratamento. Todos os resultados dos IAH no intestino desses animais (tratamentos=doses), foram estatisticamente significativos, quando comparados aos controles $p < 0,05$, porém, não havendo diferença significativa entre eles, $p > 0,05$ (Figura 15).

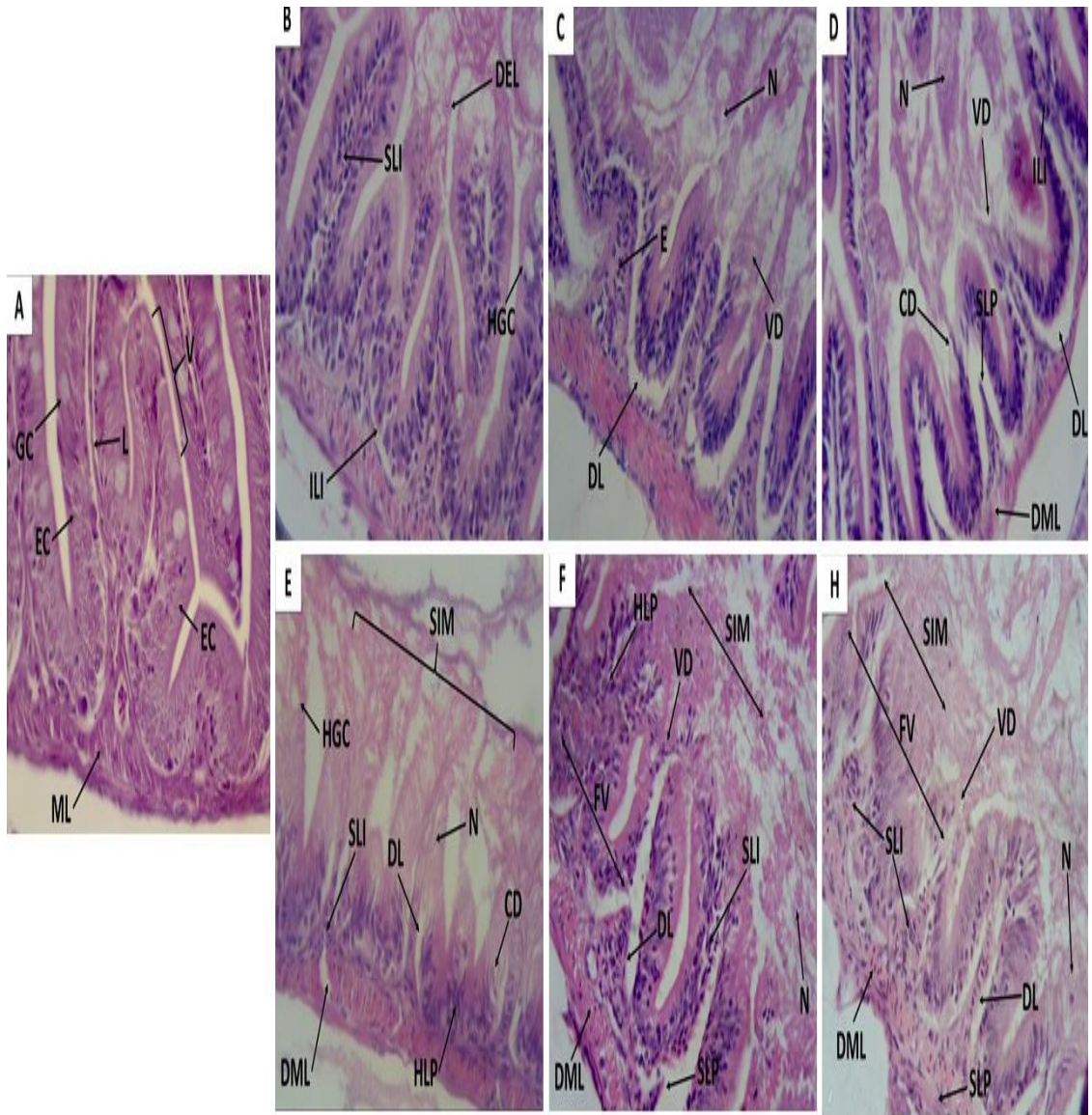


Figura 15 A. G2 (solução salina); órgão: intestino; IHA: 15,1; classificação: alterações leves a moderadas; GC: células caliciformes; EC: enterócitos; V: vilos; L: lâmina própria; ML: camada muscular. B. G1 (tween); órgão: intestino; IHA: 18,4; classificação: alterações leves a moderadas; SLI: infiltração linfocítica estomal; DEL: Distanciamento do revestimento epithelial do ápice do vilo intestinal; ILI: infiltração de leucócitos; HGC: Hiperplasia de células caliciformes. C. Grupo G1 (Tween); órgão: Intestino; IHA: 18,4; classificação: alterações leves a moderadas; SLI: Infiltração linfocítica estomal; DEL: Distanciamento do revestimento epitelial do ápice do vilo intestinal; ILI: Infiltração de leucócitos; HGC: Hiperplasia de células caliciformes. D. Grupo: 10G1 (óleo + Tween 1000 mg); órgão: Intestino; IHA: 22,1; classificação: alterações moderadas a graves; E. Edema; DL: Distanciamento da lâmina própria; VD: Degeneração dos vilos; N: necrose. E. Grupo: G3 (óleo 1000 mg); órgão: Intestino; IHA: 22,8; classificação: alterações moderadas a graves; HGC: Hiperplasia de células caliciformes; DML: Degeneração da camada muscular; SLI: Infiltração linfocítica estomal; DL: Distanciamento da lâmina própria; SIM: Descamação da mucosa intestinal; HLP: Hemorragia na lâmina própria; CD: Degeneração celular; N: necrose. F. Grupo: G4 (óleo 5000 mg); órgão: Intestino; IHA: 25,7; classificação: alterações moderadas a graves; SLP: Encurtamento da lâmina própria; DL: Distanciamento da lâmina própria;

SIM: Descamação da mucosa intestinal; FV: Fusão parcial ou complete de vilos; HLP: Hemorragia na lâmina própria; N: necrose; VD: Degeneração nos vilos; DML: Degeneração da camada muscular; SLI: Infiltração linfocítica estomal. H. Grupo: G5 (óleo 8000 mg); órgão: Intestino; IHA: 25,2; classificação: alterações moderadas a graves; SLP: Encurtamento da lâmina própria; DL: Distanciamento da lâmina própria; SIM: Descamação da mucosa intestinal; FV: Fusão parcial ou complete de vilos; N: necrose; VD: Degeneração nos vilos; DML: Degeneração da camada muscular; SLI: Infiltração linfocítica estomal. Na Tabela 6 e Figura 16, é possível observar as alterações mais frequentes encontradas nos rins de zebrafish tratados com o óleo de cumarú. Neste estudo, as alterações causadas pelo tratamento por via oral foram mais severas para os rins dos animais tratados com as doses do óleo de cumarú puro (1000, 5000 e 8000 mg/kg), pois os IAH classificaram esse órgão com alterações de moderadas a graves. Enquanto que, as demais doses de tratamento e controles, apresentaram IAH que classifica esse órgão com alterações de leves a moderadas.

De acordo com os IAH (Tabela 6) calculados, observa-se que apenas os resultados dos grupos tratados com o óleo puro, foram estatisticamente significativas quando comparadas com o controle e entre elas $p < 0,05$.

Assim, muitas alterações foram registradas para esse órgão, sendo que, as principais alterações de estágio I observadas nos grupos tratados com o óleo de cumarú foram: degeneração hialina tubular leve, hipertrofia de células tubulares e aumento de lúmen tubular. A degeneração citoplasmática das células tubulares, degeneração tubular hialina grave, degeneração dos túbulos e glomérulos foram as alterações mais evidentes no estágio II. A necrose é a alteração do estágio III considerada a mais grave das alterações foi registrada apenas nos animais tratados com as doses do óleo (Tabela 10, Figura 16).

Tabela 10. Alterações histopatológicas consideradas para análise dos rins de zebrafish tratado com diferentes doses e concentrações do óleo fixo de *Dipterys odorata*.

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS	ESTÁGIOS
Perda de contorno celular ou contorno celular atípico	I
Baixa degeneração hialina das células tubulares	I
Hipertrofia das células tubulares	I
Desorganização tubular	I
Desorganização glomerular	I
Aumento no espaço da cápsula de Bowman	I
Diminuição no espaço da cápsula de Bowman	I
Dilatação de capilares glomerulares	I
Presença de túbulos regenerados ou novos néfrons	I
Presença de vários grânulos PAS positivos no epitélio tubular	I
Obstrução tubular	I
Aumento no lúmen tubular	I
Diminuição da frequência relativa do glomérulo	I
Dilatação de vasos sanguíneos	I
<hr/>	
Degeneração severa hialina tubular	II
Degeneração tubular	II
Degeneração glomerular	II
Degeneração citoplasmática de células tubulares	II
Degeneração nuclear de células tubulares	II
Presença de tecido linfóide na cápsula de Bowman	II
Hiperemia	II
Ruptura de vasos sanguíneos	II
<hr/>	
Necrose	III

Estágios considerados para cada alteração indicados na segunda coluna de acordo com Souza et al., (2016) e Takashima & Hibiya (1995).

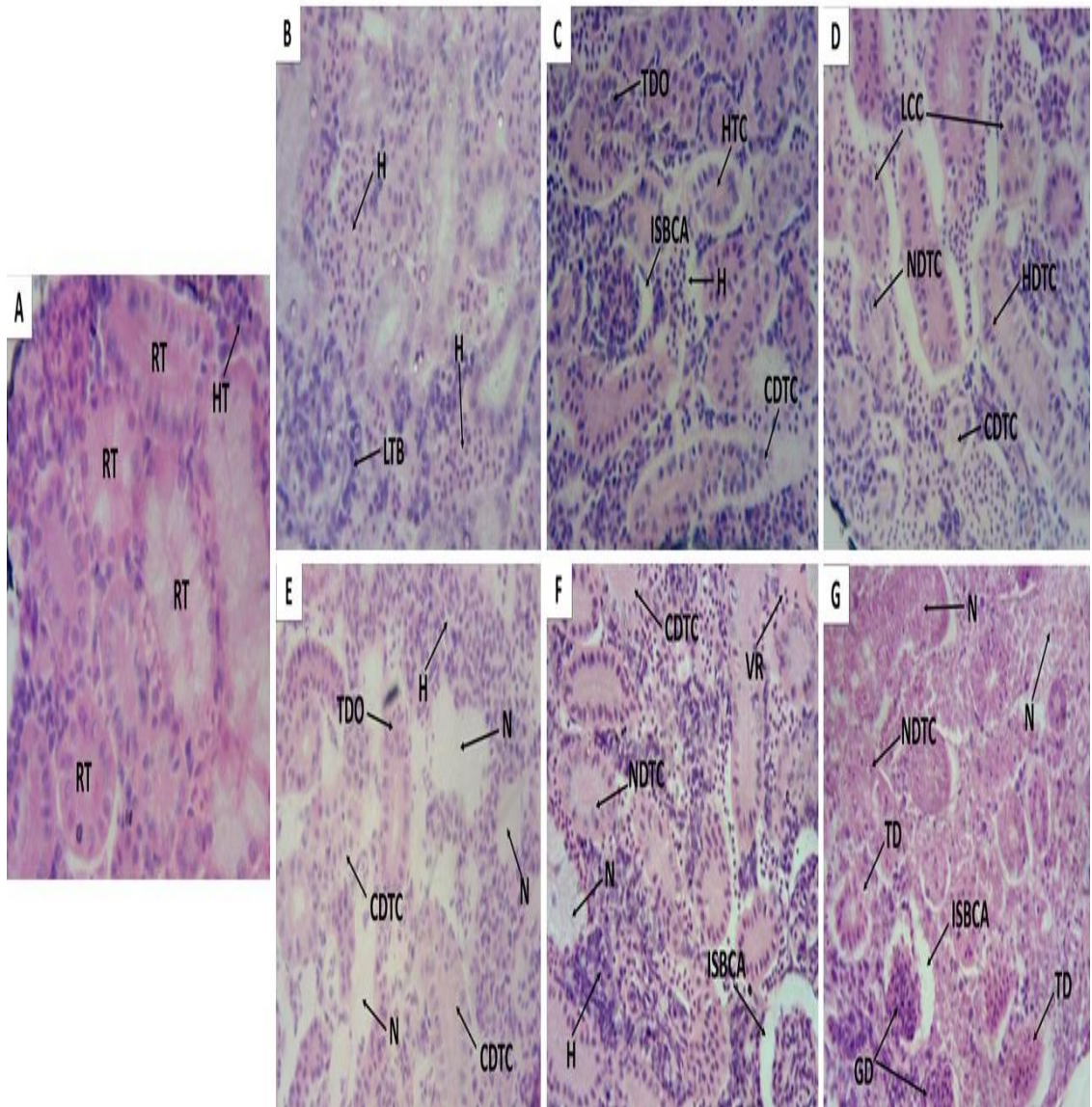


Figura 16. A. Grupo G2: solução salina; órgão: Rins; IHA: 10,0; classificação: normal; RT: túbulos renais; HT: Tecido hematopoético. B. Grupo G1 (Tween); órgão: Rins; IHA: 10,0; classificação: normal; H: hiperemia; LTB: presença de tecido linfóide na cápsula de Bowman. C. Grupo 10G1 (óleo + tween 1000 mg); órgão: Rim; IHA: 17,4; classificação: alterações leves a moderadas; TDO: desorganização tubular; HTC: hipertrofia das células tubulares; CDTC: degeneração citoplasmática das células tubulares; H: hiperemia; ISBCA: aumento do espaço da cápsula de Bowman. D. Grupo 30G2: (óleo + tween 3000 mg); órgão: Rim; IHA: 11,2; classificação: alterações leves a moderadas; LCC: perda do contorno celular; CDTC: degeneração citoplasmática das células tubulares; NDTC: degeneração nuclear das células tubulares; CDTC: Degeneração hialina das células tubulares. E. Grupo G3 : (óleo 1000 mg); órgão: Rim; IHA: 27,6; classificação: alterações moderadas a graves; TDO: Desorganização tubular; CDTC: Degeneração citoplasmática das células tubulares; H: hiperemia; N: necrose. F: Grupo G4 (óleo 5000 mg); órgão: Rim; IHA: 27,3; classificação: alterações moderadas a graves; NDTC: Degeneração nuclear das células tubulares; CDTC: Degeneração citoplasmática das células tubulares; ISBCA: aumento do espaço da cápsula de Bowman; H: hiperemia; VR: ruptura dos vasos; N: necrose. G. Grupo G5 (óleo 8000 mg); órgão: Rim; IHA: 28,4; classificação: alterações moderadas a graves; TD: Degeneração tubular; NDTC: Degeneração nuclear das células tubulares; ISBCA: aumento do espaço da cápsula de Bowman; GD: Degeneração glomerular; N: necrose.

4. DISCUSSÃO

O interesse em plantas superiores com atividades anti-fúngicas tem se intensificado, devido a algumas desvantagens que estão associadas com o uso de químicos sintéticos. Um número de estudos tem destacado o potencial de várias espécies de plantas por exibirem atividades anti-fúngicas sobre uma variedade de fungos fitopatogênicos incluindo fungos de solos (ABIDIN, 2011). No presente estudo foi avaliada a atividade antifúngica de três espécies vegetais sobre dois fungos de solos através da técnica de Poison Food. Esta técnica é uma das mais usadas em ensaios de atividades anti-fúngicas *in vitro*, quanto ao efeito anti-fúngico de plantas (PUSHPAVATHI et al., 2017).

O óleo fixo de *Dipteryx odorata*, apresentou inibição significativa do crescimento micelial dos fungos *A. nomius* e *A. fumigatus*. Isto pode ter sido causado pela presença de ácidos graxos, cuja composição foi de 20% de ácidos graxos saturados, 55% de ácidos graxos monoinsaturados e 8% de ácidos graxos poli-insaturados, dentre os quais encontram-se distribuídos, 53% de ácido oleico, 13% de ácido palmítico, 8% de ácido linoleico, 2% de ácido vacênico e 7% de ácido esteárico.

Tais resultados foram confirmados em estudos com extratos polares e não-polares de sementes de *D. odorata* realizados por OLIVEROS-BASTIDAS et al. (2013) onde a composição química da fração não-polar (hexano e diclorometano) analisada por GC/MS após derivatização química, apresentou ácidos graxos, como os maiores constituintes, concordando assim, com os dados aqui apresentados em estudo. Além disso, este efeito foi similar ao efeito que teve o extrato da casca de *Dipteryx odorata*, de onde foram identificados ácidos graxos como compostos químicos, com atividade antimicrobiana com uma MIC de 12,5 µg/mL sobre *M. tuberculosis*.

Pushpavathi et al. (2017) testando a atividade antifúngica do extrato de 9 espécies vegetais sobre 6 fungos de solo, através do método de poison food, obteve como um dos resultados a inibição do fungo fitopatogênico e de solo *A. fumigatus*, em 58,9% pela espécie vegetal *S. tetrasperma* e 33,33% por *R. repens* e *K. africana*.

Os ácidos graxos são metabólitos secundários, que fazem parte do grupo de compostos de baixo peso molecular conhecidos como fitoalexinas, usadas pelas plantas para protegerem-se do ataque de agentes patogênicos (PURKAYASTHA, 1995; SMITH, 1996).

A nível fisiológico, o principal efeito das fitoalexinas resume-se em alterações na membrana plasmática do microrganismo, o que resulta na perda da integridade estrutural

dessa membrana, tendo como consequência a perda exagerada de eletrólitos e a morte celular. Além disso, esses compostos podem também afetar diretamente o metabolismo respiratório (PASCHOLATI; LEITE, 1995). No caso dos fungos, a natureza lipofílica do óleo, favorece a interação entre os componentes do óleo e os lipídios da parede e membrana celular do fungo, interferindo em sua permeabilidade e favorecendo o acúmulo de fitoalexinas que degradam a parede celular fúngica (DIEFENBACH et al., 2018; TOBOUTI et al., 2017; BONALDO et al., 2004), inibindo o crescimento micelial, assim como a germinação e alongação do tubo germinativo, resultando na granulação citoplasmática, desorganização dos conteúdos celulares, ruptura da membrana plasmática e inibição de enzimas fúngicas (LO et al., 1998), envolvidas na síntese da parede celular, causando como consequência o intumescimento e ruptura das hifas (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

É por isso que, o efeito fungistático que apresentou o óleo de *Dipteryx odorata* sobre o crescimento micelial dos fungos, *A. nomius* e *A. fumigatus* foi considerado como uma inibição significativa na concentração de 10 µg/mL, visto que estes fungos são conhecidos como fungos oportunistas, sendo encontrados no solo, no ar, em plantas e insetos, afetando a produção agrícola e florestal. Além disso, *A. fumigatus* é conhecido como o principal agente etiológico da aspergilose invasiva, podendo causar outras doenças como aspergilose broncopulmonar alérgica e aspergilose pulmonar crônica. Sendo este fungo, considerado como o mais importante fungo filamentosos patogênico para seres humanos e uma das principais causas de morte por infecção em pacientes com a defesa imunológica deprimida. Seu tratamento é feito com terapia antifúngica associada à terapia imunomodulatória (LAMOTH, 2016).

O efeito fungistático apresentado pelo óleo de *Dipteryx odorata* neste estudo também é importante, porque assim como acontece com sua fitoquímica, as informações disponíveis a respeito das atividades biológicas, principalmente do óleo de suas amêndoas, são escassas, indicando a necessidade de mais pesquisas experimentais (CARVALHO, 2009). Sendo este o primeiro relato da extração do óleo fixo da semente de *Dipteryx odorata* através de prensa hidráulica a frio e de sua aplicação como atividade anti-fúngica *in vitro*, no controle de *Aspergillus nomius* e *Aspergillus fumigatus*.

Na avaliação do teste de toxicidade aguda sobre zebrafish, após a administração das doses do óleo de *Dipteryx odorata*, observou-se que os animais apresentaram alterações comportamentais em todos os grupos de tratamento. Everds et al. (2013), afirma que em ensaios de toxicidade o estresse nos animais é comum, podendo gerar alterações no peso corporal, no consumo de alimentos, no comportamento, na circulação sanguínea e nas funções

reprodutivas. Entretanto, nem todos esses fatores são normalmente avaliados em determinados estudos (SOUZA et al., 2016; BORGES et al., 2018).

O aumento na atividade da natação que foi observado nesse estudo, é considerado por Little et al. (1993) como um indicador que integra o status interno do animal. A exposição do animal a uma situação de estresse desencadeia em seu primeiro mecanismo de defesa, que na maioria das vezes é o comportamento de fuga, para reduzir a probabilidade de morte.

Nesse estudo, não foi observado morte em nenhum dos animais tratados. No entanto, internamente, outros danos podem ocorrer, como alterações histopatológicas em diferentes órgãos (SOUZA et al., 2016).

Estudos anteriores já mostraram que o tratamento com altas doses pode causar maior IHA (SOUZA et al., 2016; BORGES et al., 2018). No entanto, no fígado dos animais desse estudo, apenas na maior dose (8000 mg/kg) do óleo puro o IHA caracterizou o órgão como alterações de moderadas a graves. Borges et al., (2018) afirma que, isso só é possível se a substância testada for suficientemente tóxica sem causar mortalidade (SOUZA et al., 2016; BORGES et al., 2018).

O fígado do zebrafish apresenta semelhança ao de mamíferos nos principais processos fisiológicos realizados, apesar de sua estrutura ser diferente. É o local mais importante na síntese e biotransformação, sendo essencial a síntese da bile, o armazenamento de lipídios e glicogênio, bem como a produção de vitelogenina, uma proteína presente no filme que envolve o ovo (GOKSOYR; HUSOY, 1998). Dessa forma, após o tratamento com substâncias tóxicas, sua histopatologia pode ser comparada às lesões hepáticas de mamíferos (VLIEGENTHART et al, 2014; BORGES et al., 2018). Apenas a maior dose pode alterar o funcionamento normal desse órgão, resultando em menor potencial metabólico, bem como diminuição da capacidade de armazenamento de glicogênio.

A vacuolização foi uma das alterações mais frequentes observadas no fígado dos animais tratados com o óleo de cumarú. Em estudo com nanoemulsões administradas por via oral em zebrafish, Borges et al., (2018) afirma que essa alteração pode estar relacionada à redução das reservas de glicogênio nos hepatócitos e ao acúmulo de lipídios combinados com agentes tóxicos, podendo alterar o funcionamento normal do órgão. A diminuição do glicogênio no tecido hepático também pode ser justificada pela agilidade do zebrafish, que diminui as reservas devido ao seu metabolismo acelerado (CARVALHO et. al, 2017).

A degeneração celular e a hiperemia foram alterações observadas nos animais tratados com as maiores doses (5000 e 8000 mg/kg do óleo puro). Borges et al., (2018) considera essas alterações como mecanismo de defesa a agentes tóxicos. A hiperemia ocorre como tentativa de aumentar o fluxo sanguíneo geral no fígado e ampliar a liberação de nutrientes e oxigênio

para as áreas afetadas, evitando a hipóxia (TAKASHIMA; HIBIYA, 1984; CARVALHO et. al, 2017, BORGES et. al, 2018). A necrose hepática foi registrada apenas para os animais tratados com as doses de 1000 mg/kg do óleo + Tween20 e 8000 mg/kg do óleo puro. Segundo Borges et al., (2018) a necrose é provocada por agentes tóxicos em doses elevadas.

Nesse estudo, o intestino do zebrafish foi bastante afetado apenas nos animais tratados com as doses do óleo puro e óleo + Tween20, uma vez que foi o primeiro órgão de contato com as doses de tratamento. Segundo Carvalho et al., (2017) o intestino do zebrafish é formado por camada mucosa com células caliciformes, células inflamatórias e enterócitos com funções que vão além da absorção de nutrientes, neste epitélio intestinal, existem respostas imunes e equilíbrio osmótico (BORGES et al., 2018). É também um local de reciclagem de enzimas e macronutrientes (ALVAREZ-PELLITERO; SITJA-BOBADILLA, 2011).

Até recentemente, os estudos envolvendo a histologia do intestino do zebrafish eram baseados apenas em observações (ROBERTS; ELLIS, 2012). No entanto, estudos recentes ampliaram o conhecimento sobre as alterações histopatológicas que podem ocorrer no intestino desse animal (CARVALHO et al., 2017; BORGES et al., 2018). A exposição a substâncias tóxicas causa danos à mucosa intestinal e ao desenvolvimento celular, podendo perturbar a fisiologia do órgão e provocar diversas alterações histopatológicas (CARVALHO et. al, 2017; TAKASHIMA, HIBIYA, 1984).

Em todos os grupos de tratamento, foram observadas infiltração de leucócitos e infiltração linfocítica na camada mucosa. Borges et al., (2018) também observou essas alterações em animais tratados por via oral com nanoemulsões a base de *Rosmarinus officinalis* L. Esse resultado indica que o óleo de cumarú puro e óleo + Tween foi tóxico, pois ocasionou o aumento de células de defesa no epitélio intestinal podendo estar relacionado com a presença de inflamação na lâmina própria (CARVALHO et. al, 2017; ROBERTS; ELLIS, 2012).

O deslocamento da mucosa intestinal foi observado nos animais tratados com o óleo. Essa alteração também é comum no intestino de peixes expostos a agentes tóxicos (ROBERTS; ELLIS, 2012). A vacuolização também foi observada nesses grupos. Essa alteração é frequente após a exposição a substâncias com elevada toxicidade, geralmente, precedendo a necrose (TAKASHIMA; HIBIYA, 1984). Este fato justifica a presença de necrose intestinal em todos os grupos de tratamento, incluindo os controles.

O rim do *Danio rerio* adulto contém néfrons que são responsáveis pela filtração de resíduos sanguíneos e pela absorção de sal e água. Apresenta o corpúsculo renal, o túbulo proximal e distal contorcido (Figura 4A). O rim do zebrafish desempenha a função importante

de excreção do volume de água que entra no peixe através da boca. Também realiza a filtração de resíduos e a absorção de sal e água (TASHIMA; HIBIYA, 1995; HOLDEN et al., 2012; BORGES et al., 2018). É um dos órgãos mais afetados por substâncias tóxicas de acordo com Carvalho et. al. (2017). Nesse estudo, foi o órgão mais afetado quando tratado com as doses do óleo puro.

Os grupos de animais tratados em todas as doses apresentaram hipertrofia das células tubulares no tecido renal. Segundo Carvalho et al. (2017), essa condição ocorre devido ao ressecamento das células epiteliais dos túbulos renais, e em alguns caso, como nesse estudo e em estudo realizado por Borges et al., (2018) podendo preceder a degeneração hialina, que consiste no aumento da quantidade de grânulos eosinofílicos no citoplasma dessas células (CARVALHO et. al, 2017). A degeneração hialina, condição observada nesse estudo, pode estar relacionada à reabsorção de substâncias protéicas sintetizadas em excesso pelo glomérulo (TAKASHIMA; HIBIYA, 1984).

A hiperemia, alteração observada em todos os grupos de tratamento com o óleo de cumarú puro, consiste no aumento da quantidade de sangue circulante e pode estar associada à ruptura de vasos (BORGES et al., 2018). Nos rins, pode ser provocada a partir da pressão exercida pela dilatação dos capilares glomerulares na presença de substâncias tóxicas (CARVALHO et. al., 2017).

Outras alterações, como desorganização tubular, degeneração tubular e degeneração citoplasmática das células tubulares, também foram frequentes nesses grupos tratados com o óleo puro. De acordo com Carvalho et. al (2017), alterações tubulares observadas em rins de zebrafish podem ser provocadas indiretamente pela disfunção metabólica induzida pela exposição a substâncias tóxicas. Essas alterações podem frequentemente culminar em necrose nos rins (TAKASHIMA; HIBIYA, 1984). Este fato, justifica a presença de necrose nos rins dos animais tratados com as doses do óleo puro.

A caracterização química e o potencial fitotóxico dos extratos polares e não-polares proveniente das sementes de *D. odorata*, foram realizados por Oliveros-Bastidas et al. (2013). A determinação estrutural, foi acompanhada pela derivatização química e pela análise de GC/MS. A composição química da fração não-polar (hexano e diclorometano) apresentou ácidos graxos, como os maiores constituintes. As frações polar e médio polar (Acetato etílico e etanol:água) continham ácido carboxílico e alto conteúdo de 6,7-Dihidrocumarina- β -D-glicopiranosídeo, que ainda não haviam sido relatados para sementes de *D. odorata*. Os extratos mostraram um nível significativo de atividade fitotóxica, correlacionado ao conteúdo de derivativos de cumarina, predominantemente na fração polar. β -glucosídeos dos ácidos cumarínico e o-cumárico foram detectados em extratos do cotilédone, exocarpo e folhas de

plântulas de cumaru. A existência destes compostos e a presença de uma β -glucosidase tendo especificidade para o glicosídeo cumarinil, sugere que, *Dipteryx odorata*, sintetize cumarina por uma via metabólica similar àquela encontrada em trevo doce (Sweetclover) (HASKINS; GORZ, 1963). O fato de ter sido testado somente o óleo fixo de *Dipteryx odorata* em Zebrafish, causando alterações em seus órgãos, este estudo sugere a realização de testes com a nanoemulsão de *Dipteryx odorata* para avaliar seu potencial antifúngico e a toxicidade em Zebrafish.

Uma vez que Soliman (2017) enfatiza as vantagens do emprego de nanopartículas, incluindo-se as nanoemulsões, como sistema de administração de fármacos antifúngicos. De acordo com o autor, os agentes antifúngicos são hidrofóbicos, causando baixa solubilidade em água, baixa biodisponibilidade por administração oral e poucas opções de formulação (ex: clotrimazola, miconazola, econazola, etc). Além disso, administrados sistemicamente há o risco de toxicidade, um exemplo disso é a Anfotericina-B, que pode ser tóxica aos rins. Isso poderia ser contornado empregando-se nanoemulsões, que podem resolver também problemas de permeabilidade limitada do tecido a ser remediado, farmacocinética baixa da droga, e efeitos colaterais. Estudos com nanoemulsões de agentes antifúngicos têm mostrado que na forma de nanoemulsão, essas drogas têm apresentado maior efeito comparado ao fármaco na forma livre, isso se deve à maior permeabilidade em membranas biológicas por meio das nanoemulsões.

5. CONCLUSÕES

O óleo de *Dipteryx odorata* (OFDo), demonstrou potencial antifúngico desde a menor concentração testada de 10 $\mu\text{g/mL}$, no entanto teve o melhor efeito inibitório de 35 % para *A. nomius*, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ e 27% para *A. fumigatus*, na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$.

O melhor meio de cultura para avaliação da atividade antifúngica do OFDo sobre *A. nomius*, foi o BDA, por ter uma composição mais simples na formulação. Enquanto que, o meio com *B. excelsa* em sua constituição, ajudou a expressar melhor o efeito inibitório do OFDo sobre *A. fumigatus*.

O potencial antifúngico do óleo de *D. odorata* (OFDo), quanto à inibição do crescimento do micélio dos fungos *A. nomius* e *A. fumigatus* demonstrou um efeito fungistático, ao final da avaliação de sete dias (144 h).

O tratamento com as doses do óleo de *D. odorata* (OFDo), por via oral por 48 horas, induziu alterações comportamentais nos animais, no entanto não causou mortalidade. Porém, os órgãos internos, sofreram alterações histopatológicas, onde o intestino (grupo 1) apresentou índices de alterações histopatológicas ocasionados por todas as concentrações do óleo aplicadas (IAH) por via oral (gavage), seguido dos rins (grupo 2) e do fígado (grupo 3, com a dose de 8.000 mg/kg). Portanto, considerando-se os resultados obtidos e a característica química do principal marcador fitoquímico do OFDo, ácido oleico, juntamente com o ácido palmítico, ácido linoleico, ácido vacênico e ácido esteárico, pode-se sugerir que, dependendo da dose, estes composto possam ter influenciado na produção de danos histopatológicos nos órgãos destacados neste estudo. Além de que, ficou demonstrado que tanto a técnica de Poison Food, aplicado no teste anti-fúngico, quanto o modelo *Danio rerio*, usado no teste de toxicidade aguda, foram capazes de expressar os efeitos, tanto inibitório sobre as espécies fúngicas quanto tóxico em *Danio rerio*.

6. REFERÊNCIAS

- ABIDIN Z. A review on bioactive compounds isolated from plants against plant pathogenic fungi. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011 Dec 16; 5(30):6584-9.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., LIPMAN, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- ALVAREZ-PELLITERO P, SITJA-BOBADILLA A (2011) Pathology of Myxosporea in marine fish culture. *Dis Aquat Org* 17:229–238
- BAYMAN, P.; BAKER, J.; MAHONEY, N. *Aspergillus* on tree nuts. *Mycopathologia*, 2002, 155: 161-169.
- BONALDO, S. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; TESSMANN, D. J.; SCAPIM, C. A. Fungitoxicidade, Atividade Elicitora de Fitoalexinas e Proteção de Pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo Extrato Aquoso de *Eucalyptus citriodora*. *Fitopatol. bras.* 29(2), mar - abr 2004.
- BORGES S. B; KEITA H; ORTIZ B. L. S; SAMPAIO T. I. S; FERREIRA I. M; LIMA E. S; SILVA M. J. A; FERNANDES C. P; OLIVEIRA A.E.M. F. M; CONCEIÇÃO E. C; RODRIGUES A. B. L; PEREIRA FILHO A.C.M; CASTRO N. A; CARVALHO J.C.T. (2018) Anti-inflammatory activity of nanormulsions of essential oil from *Rosmarinus officinalis* L.: in vitro and zebrafish studies. **Inflammopharmacology**. Doi.org/10.1007/s10787-017-0438-9.
- BREITBACH, U. B.; NIEHUES, M.; LOPES, N. P.; FARIA, J. E. Q.; BRANDÃO, M. G. L. Amazonian Brazilian medicinal plants described by C.F.P. von Martius in the 19th century. *Journal of Ethnopharmacology* 147 (2013) 180–189. journal homepage: www.elsevier.com/locate/jep
- CALDERARI, T.O.; IAMANAKA, B.T.; FRISVAD, J.C.; PITT, J.I.; SARTORI, D.; PEREIRA, J.L.; FUNGARO, M.H.P.; TANIWAKI, M.H., 2013. The biodiversity of

Aspergillus section *Flavi* in Brazil nuts: from rainforest to consumer. *Int. J. Food Microbiol.* 2013, 160:267-272.

CARVALHO, P. E. R. **Cumaru-Ferro *Dipteryx odorata***. Embrapa, 2009.

CARVALHO, J. C.T., KEITA, H., SANTANA, G. R., SOUZ,A G. C., SANTOS, I. V. F., AMADO, J. R. R., KOUROUMA, A., PRADA, A. L., CARVALHO, H. O., SILVA, M.L. Effects of *Bothrops alternatus* venom in zebrafish: a histopathological study. ***Inflammopharmacology*** 25:1–12. 2017.

DIEFENBACH, A. L.; MUNIZ, F. W. M. G.; OBALLE, H. J. R.; RÖSING, C. K. Antimicrobial activity of copaiba oil (*Copaifera* ssp.) on oral pathogens: Systematic review. ***Phytotherapy Research***, v. 32, n. 4, p. 586–596, 2018.

EVERDS, N.E., SNYDER, P.W., BAILEY, K.L., BOLON, B., CREASY, D.M., FOLEY, G.L., ROSOL, T.J., SELLERS, T., 2013. Interpreting Stress Responses during Routine Toxicity Studies: A Review of the Biology, Impact, and Assessment. *Toxicol. Pathol.* 41, 560–614. <https://doi.org/10.1177/0192623312466452>.

EL KOURY, A.; ATOUI, A.; RIZK, T.; LTEIF, R.; KALLASSY, M.; LEBRIHI, A.: Differentiation between *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* from Pure Culture and Aflatoxin-Contaminated Grapes Using PCR-RFLP Analysis of aflR-aflJ Intergenic Spacer. *J Food Sci.* 2011, 76:M247–M253.

FERREIRA, I. M.; DE S. GANZELI, LUISA ; ROSSET, ISAC G. ; YOSHIOKA, SÉRGIO A. ; PORTO, ANDRÉ L. M. . Ethylic Biodiesel Production Using Lipase Immobilized in Silk Fibroin-Alginate Spheres by Encapsulation. *Catalysis Letters* ^{JCR}, v. 147, p. 269, 2016.

FREIRE, F.C.O.; KOZAKIEWICZ, Z.; PATERSON, R.M. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. *Mycopathologia*, 2000, 149: 13-19.

GLASS, N. L; DONALDSON, G. C: Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol* 1995, 61:1323–1330.

GLEYE, C. *et al.* Acaricidal activity of tonka bean extracts. Synthesis and structure-activity relationships of bioactive derivatives. ***Journal of Natural Products***, v. 66, n. 5, p. 690–692, 2003.

GONÇALVES, S. S; STCHIGEL, A. M.; CANO, J. F.; GODOY-MARTINEZ, P. C.; COLOMBO, A. L.; GUARRO, J: *Aspergillus novoparasiticus*: a new clinical species of the section *Flavi*. *Med Mycol* 2012, 50:152–160.

GOKSOYR, A.; HUSOY, A. M. Immunochemical approaches to studies of CYPIA localization and induction by xenobiotics in fish. *Fish Ecotoxicology* ed. by T. Braunbeck, D. E. Hinton and B. Streit © 1998 Birkhauser Verlag Basel/Switzerland

HASKINS, F.A.; GORZ, H. J. Glucosides of Coumarinic and o-Coumaric Acids in the Tonka Bean. *Science* 139 (3554), 496-497. DOI: 10.1126/science.139.3554.496.

HINRIKSON, H. P; HURST, S. F; LOTT, T. J; WARNOCK, D. W; MORRISON, C. J: Assessment of ribosomal large-subunit D1-D2, internal transcribed spacer 1, and internal transcribed spacer 2 regions as targets for molecular identification of medically important *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol.* 2005, 43:2092–2103.

HOLDEN, J. A, LAYFIELD, L.L., MATTHEWS, J.L. (2012) The zebrafish: atlas of macroscopic and microscopic anatomy. Cambridge University Press, Cambridge, pp 58–100

- HONG, S. B.; CHO, H. S.; SHIN, H. D.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. (2006). Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology* 56: 477–486.
- KOURY EL A.; ATOUI, A.; RIZK, T.; LTEIF, R.; KALLASSY, M.; LEBRIHI, A.: Differentiation between *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* from Pure Culture and Aflatoxin-Contaminated Grapes Using PCR-RFLP Analysis of aflR-aflJ Intergenic Spacer. *J Food Sci.* 2011, 76:M247–M253.
- KURTZMAN, C.P.; HORN, B.W.; HESSELTINE, C.W. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 53:147-158, 1987.
- LEE, C. Z.; LIOU, G. Y.; YUAN, G. F.: Comparison of the aflR gene sequences of strains in *Aspergillus* section Flavi. *Microbiology*. 2006, 152:161–170.
- LITTLE, E.E., FAIRCHILD, J.F., DELONAY, A.J. (1993) Behavioral methods for assessing impacts of contaminants on early life stage fishes. In: *Am. Fish. Soc. Symp.*
- LAMOTH, F.; JUVVADI, P.R.; STEINBACH, W.J. Editorial: Advances in *Aspergillus fumigatus* Pathobiology. In: LAMOTH, F.; JUVVADI, P.R.; STEINBACH, W.J. *Advances in Aspergillus fumigatus* Pathobiology. *Frontiers in Microbiology*. v. 7. 2016. p. 4-6.
- LO, Y. M. D.; TEIN, M. S. C.; LAU, T. K.; HAINES, C. J.; LEUNG, T. N.; POON, P. M. K.; WAINSCOAT, J. S.; JOHNSON, P. J.; CHANG, A. M. Z.; MAGNUS, N. H. Quantitative Analysis of Fetal DNA in Maternal Plasma and Serum: Implications for Noninvasive Prenatal Diagnosis. *Am. J. Hum. Genet.* 62:768–775, 1998.
- MIDORIKAWA, G. E. O.; SOUSA, M. de L. M. de; SILVA, O. F.; DIAS, J. do S. A.; KANZAKI, L. I. B.; MESQUITA, R. M. L. C.; GONÇALVES, R. C.; ÁLVARES, V. S.; BITTENCOURT, D. M. C.; MILLER, R. N. G. Characterization of *Aspergillus* species on Brazil nut from the Brazilian Amazonian region and development of a PCR assay for identification at the genus level. *BMC Microbiology*, 2014, 14:138.
- MONTIEL, D.; DICKINSON, M. J.; LEE, H. A.; DRYER, P. S.; JEENES, D. J.; ROBERTS, I. N.; JAMES, S.; FULLER, L. J.; MATSUCHIMA, K.; ARCHER, D. B.: Genetic differentiation of the *Aspergillus* section Flavi complex using AFLP fingerprints. *Mycol Res*, 2003, 107:1427–1434.
- NUSSLEIN-VOLHARD, C.; DAHM, R. *Zebrafish: a practical approach*. New York: Oxford University Press: 303 p. 2002.
- OLSEN, M.; JOHNSON, P.; MOLLER, T.; PALADINO, R.; LINDBLAD, M.: *Aspergillus nomius*, an important aflatoxin producer in Brazil nuts? *World Mycotoxin J.*, 2008, 1:123–126.
- OLIVEROS-BASTIDAS, A., et al. (2013). "Chemical characterization by GC-MS and phytotoxic potential of non-polar and polar fractions of seeds of *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd. From Venezuelan regions." *Química Nova* 36(4): 502-506.
- PAIVA, P. M.; GUEDES, M. C.; FUNI, C. Brazil nut conservation through shifting cultivation. *Forest Ecology and Management* 261 (2011) 508–514. journal homepage: www.elsevier.com/locate/foreco.
- PASCHOLATI, S.F; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismo de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. *Manual de Fitopatologia. Princípios e conceitos*. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p.433 a 440.

- PILDAIN, M. B.; FRISVAD, J. C.; VAAMONDE, G.; CABRAL, D.; VARGA, J.; SAMSON, R. A.: Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *Int J Syst Evol Micr.*, 58:725–735. 2008.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. *Fungi and Food Spoilage*. 3rd edition. New York: Springer; 2009.
- POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC. Fish gills as a monitor of sub lethal and chronic effects of pollution In: Müller R & Lloyd R. *Sub lethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish*. Fishing News Books, USA, 339-352. 1994.
- PURKAYASTHA, R. P. Progress in phytoalexin research during the past 50 years. In: DANIEL, M.; PURKAYASTHA, R. P. (Ed.). *Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action*. New York: Marcel Dekker, p.1-39. 1995.
- PUSHPAVATHI D, SHILPA M, TEJASWINI PETKAR, AYESHA SIDDIQHA, PRASHITH KEKUDA T.R. Evaluation of antifungal activity of some plants against seed-borne fungi. *Sch J Agric Vet Sci.*; 4(4):155-159. 2017.
- RAEDER, U. AND BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1: 17–20. 1985. doi:10.1111/j.1472-765X.1985.tb01479.x
- REIS, T. A.; OLIVEIRA, T. D.; BAQUIÃO, A. C.; GONÇALVES, S. S.; ZORZETE, P.; CORRÊA, B.: Mycobiota and mycotoxins in Brazil nut samples from different states of the Brazilian Amazon region. *Int J Food Microbiol.*, 159:61–68. 2012.
- ROBERTS, R. J., ELLIS, A. E. The anatomy and physiology of teleosts. In: Roberts RJ (ed) *Fish pathology*, 3rd edn. W. B. Saunders, Philadelphia, pp 12–54. 2012.
- ROSSET, I. G.; PORTO, A. L. M. Enzymatic Esterification of Oleic Acid with Aliphatic Alcohols for the Biodiesel Production by *Candida antarctica* Lipase. *Catal. Lett.*, 143:863-872. 2013. DOI 10.1007/s 10562-013-1044-0.
- RODRIGUES, P.; SOARES, C.; KOZAKIEWCZ, Z.; PATERSON, R.; LIMA, N.; VENÂNCIO, A.: Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins. In *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Edited by Méndez-Villas A. Badajoz: Formatex; 527–534. 2007.
- SANTOS, P. dos; AGUIAR, A. C. de; VIGANÓ, J.; BOEING, J. S.; VISENTAINERB, J. V.; MARTÍNEZ, J. Supercritical CO₂ extraction of cumbaru oil (*Dipteryx alata* Vogel) assisted by ultrasound: Global yield, kinetics and fatty acid composition. *The Journal of Supercritical Fluids*. 107 (2016) 75–83. journal home page: www.elsevier.com/locate/supflu.
- SAMSON, R.A.; VISAGIE, C.M.; HOUBRAKEN, J. et al. Phylogeny, Identification and Nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*. 78:141-173. 2014.
- SAMSON, R. A.; HONG, S. B.; FRISVAD, J. C.: Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Med Mycol*, 44:133–148. 2006.
- SCHOCH, C. L; SEIFERT, K. A; HUHDORF, S. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 6241–6246. 2012.
- SCHMIDT-HEYDT, M., HÄCKEL, S., RÜFER, C.E. ET AL. MYCOTOX. RES. 25: 141. 2009. <https://doi.org/10.1007/s12550-009-0019-x>
- SMITH, C. J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. *The New Phytologist*, v.132, p.1-45, 1996.

- SOLIMAN, G. M. Nanoparticles as safe and effective delivery systems of antifungal agentes: Achievements and challenger. *International Journal of Pharmaceutics* 523:15-32. 2017. Elsevier.
- SOUZA, G. C., DUARTE, J. L., FERNANDES, C. P., MOYADO, J. A. V., NAVARRETE, A., CARVALHO, J. C.T. Obtainment and study of the toxicity of perillyl alcohol nanoemulsion on zebrafish (*Danio rerio*). *J Nanomed Res.* 4(4):93. 2016.
- SOUZA, B. S. F. E. ; CARVALHO, H. O. ; FERREIRA, IRLON M. ; TOSTE, E. S. L. ; BARROS, A. S. ; TAGLIALEGNA, T. ; CARVALHO, J. C. T. Effect of the treatment with *Euterpe oleracea* Mart. oil in rats with Triton-induced dyslipidemia. *Biomedicine & Pharmacotherapy* ^{JCR}, v. 90, p. 542-547. 2017.
- TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. An atlas of fish histology-normal and pathological features. Kodansha Ltd Tôquio 69(3):406. 1984.
- TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. (eds). An atlas of fish histology. In: Normal and pathological features, 2nd edn. Kodansha Ltd, Tokyo. 1995.
- TANIWAKI, M. H.; FRISVAD, J. C.; FERRATI, L. S.; LOPES, A. de S.; LARSEN, T. O.; FUNGARO, M. H. P.; IAMANAKA, B. T. Biodiversity of mycobiota throughout the Brazil nut supply chain: From rainforest to consumer. *M.H. Food Microbiology*, 61:14-22. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2016.08.002>.
- TANIWAKI, M.H.; PITT, J.I.; IAMANAKA, B.T.; SARTORI, D.; COPETTI, M.V.; BALAJEE, A.; FUNGARO, M.H.P.; FRISVAD, J.C. *Aspergillus bertholletius* sp. nov. from Brazil nuts. *PLOS ONE* 7(8):1-7. 2012.
- THOMIDIS, T.; FILOTHEOU, A. Evaluation of five essential oils as bio-fungicides on the control of *Pilidiella granati* in pomegranate. *Crop Protection*, 89:66-71. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2016.07.002>.
- TOBOUTI, P. L.; DE ANDRADE MARTINS, T. C.; PEREIRA, T. J.; MUSSI, M. C. M. Antimicrobial activity of copaiba oil: A review and a call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 94, p. 93–99, out. 2017.
- WICKLOW, D. T.; DONAHUE, J. E. Sporogenic germination of sclerotia in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Transactions of the British Mycological Society* 8a, 621-624. 1984.
- WICKLOW, D. T.; HORN, B. W.). *Aspergillus flavus* sclerotia form in wound-inoculated preharvested corn. *Mycologia* (In the Press). 1984.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A; Gelfand, D. H; Sninsky, J. J; White, T. J, editors. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. 282–287. 1990.
- VARGA, J.; FRISVAD, J. C; SAMSON, R. A.: Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section Flavi. *Stud Mycol*, 69:57–80. 2011.
- VLIEGENTHART, A.D.; TUCKER, C. S.; DEL POZO, J., DEAR, J.W. Zebrafish as model organisms for studying drug-induced liver injury. *British journal of clinical pharmacology*, v. 78, n. 6, p. 1217-1227. 2014.

CAPÍTULO 3

Potencial anti-fúngico do óleo resina e nanoemulsão de *Copaifera* sp. sobre *Aspergillus nomius* Kurtzman, Horn & Hesseltine e *Aspergillus fumigatus* Fresenius isolados de *Bertholletia excelsa* Humbl. & Bompland

Potencial anti-fúngico do óleo resina e nanoemulsão de *Copaifera* sp. sobre *Aspergillus nomius* Kurtzman, Horn & Hesseltine e *Aspergillus fumigatus* Fresenius isolados de *Bertholletia excelsa* Humbl. & Bonpland.

Jurema do Socorro Azevedo Dias¹, Gláucia E. O. Midorikawa², Maria de L. M. de Sousa³, Anna E. M. de F. M. Oliveira⁴, Caio Pinho Fernandes⁴; Brenda Lorena Sanchez-Ortiz⁵, Irlon Maciel Ferreira⁷, Jhonatan⁷, Matheus Mercês Ramos⁷, Pedro Henrique da Silva Barata⁷, Adriana Bariani⁸, José Carlos Tavares Carvalho^{1,6}

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Bionorte, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Amapá, Rodovia Juscelino Kubitschek, Km 02, 68902-280 Macapá, AP, Brasil; Pesquisadora Embrapa Amapá.

²Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, Av. W3 Norte, Ed. Sede 70770-901, Brasília, DF.

³Embrapa Agroindústria de Alimentos – CTAA, Av. das Américas, Guaratiba, RJ, Brasil.

⁴ Laboratório de Nanobiotecnologia Fitofarmacêutica, Colegiado de Farmácia, Universidade Federal do Amapá, Rodovia Juscelino Kubitschek, Km 02, 68.902-280, Macapá, AP, Brasil

⁵Univerdade do México, UNAM

⁶Laboratório de Pesquisa em Fármacos, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Colegiado de Farmácia, Universidade Federal do Amapá, Macapá, AP, Brasil

⁷Laboratório de Química, Universidade Federal do Amapá, Macapá, AP, Brasil

⁴Universidade do México, UNAM

⁸Analista da Embrapa Amapá, Rodovia Juscelino Kubitschek, Km 02, 68.902-280, Macapá, AP, Brasil

RESUMO

Copaifera sp. é de grande importância em termos de uso na Amazonia, como também nas diferentes regiões do Brasil. O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antifúngica do óleo resina e da nanoemulsão de *Copaifera* sp. em *Aspergillus nomius* e *A. fumigatus* isolados de *Bertholletia excelsa* (castanha-da-Amazônia). A fungitoxicidade, foi determinada pela técnica de Poison Food, utilizando o meio de cultura CYA. A nanoemulsão apresentou aparência azulada e transparente com tamanhos de gotículas variando entre $132,9 \pm 0,8544$ e $144,5 \pm 1,852$, apresentando alta estabilidade cinética por 7 dias, sem separação de fases, sedimentação ou cremação. A melhor ação inibitória da nanoemulsão do óleo de copaíba,

sobre *A. nomius*, foi na concentração de 500 µg/mL, enquanto que em *A. fumigatus* esta ação ocorreu quando da aplicação das concentrações de 31,2 µg/mL e 62,5 µg/mL. Mas, tanto o óleo quanto a nanoemulsão do óleo de copaíba, foram potencialmente inibidores do crescimento micelial dos fungos *A. nomius* e *A. fumigatus*. Porém, em concentrações diferenciadas, de acordo com as características de cada fungo e de cada produto.

Palavras-chave: Copaíba, nanoemulsão, fungos, planta medicinal.

ABSTRACT

Copaifera sp. is of great importance in terms of use in the Amazon, as well as in the different regions of Brazil. The objective of this work was to evaluate the antifungal activity of resin oil and nanoemulsion of *Copaifera* sp. in *Aspergillus nomius* and *A. fumigatus* isolated from *Bertholletia excelsa* (Amazon nuts). The fungitoxicity was determined by the Poison Food technique. The nanoemulsion presented bluish and transparent appearance with droplet sizes ranging from 132.9 ± 0.8544 to 144.5 ± 1.852 , presenting high kinetic stability for 7 days, without phase separation, sedimentation or cream. The best inhibitory action of the nanoemulsion of copaiba oil, about *A. nomius*, was at the concentration of 500 µg/mL, while in *A. fumigatus* this action occurred when the concentrations of 31.2 µg / mL and 62.5 µg/mL were applied. However, both oil and nanoemulsion of copaiba oil were potentially inhibitors of the mycelial growth of fungi *A. nomius* and *A. fumigatus*. However, in differentiated concentrations, according to the characteristics of each fungus and each product.

Key words: Copaíba, nanoemulsion, fungi, medicinal plant.

1.INTRODUÇÃO

A castanha-da-Amazônia é um dos produtos mais importantes, extraídos da região de floresta úmida amazônica. Porém, o clima equatorial quente e úmido, apresentando médias de temperatura de 26 °C e umidade relativa de 80 e 95%, favorece a ocorrência de espécies fúngicas a exemplo de *Aspergillus flavus*, *A. nomius*, *A. pseudonomius*, *A. niger*, *A. tamarii*, *Penicillium glabrum*, *P. citrinum*, *Penicillium spp.*, *Rhizopus spp.*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium spp.*, *Phialemonium spp.*, *Phaeoacremonium spp.* (ARRUS et al., 2005; BAQUIÃO et al., 2012, 2013; CALDERARI et al., 2013; GONÇALVES et al., 2012; IAMANAKA et al., 2014; MASSI et al., 2014; OLSEN et al., 2008; FREIRE et al., 2000; BAYMAN et al., 2002; REIS et al., 2012).

Aspergillus são fungos filamentosos encontrados em todas as estações do ano, dispersos no solo, em vegetais ou qualquer matéria em decomposição (OLIVEIRA et al., 2002; STEVENS, 2001).

Investigações sistemáticas sobre aspectos microbiológicos, profiláticos e terapêuticos de infecções oportunas (RODRIGUES et al., 1997), ressaltam a importância das infecções fúngicas, correspondentes até 10% do total de casos, com predomínio de microrganismos pertencentes ao gênero *Aspergillus* (KOSHI; CHERIAN, 1995; MYLONAKIS; CALDERWOOD, 2001).

Rapper e Fennell (1988), afirmam a existência de aproximadamente 900 espécies de *Aspergillus*, classificadas em dezoito grupos, dentre estes doze são causadores de doenças humanas, entre os quais destacam-se as espécies *A. fumigatus* (85%), *A. flavus* (5-10%) e *A. niger* (2-3%), espécies determinantes da aspergilose pulmonar, condição infecciosa, não contagiosa, de etiologia fúngica (STEVENS, 2001)

O principal tratamento para a infecção fúngica é a antibioticoterapia, endovenosa prolongada (VERGHESE et al., 1998; MENESALVAS; BOUZA, 1998). O tratamento específico de doenças causadas por fungos é prolongado em função da dificuldade de diagnóstico, mais do que as infecções causadas por bactérias; fato este que limita o arsenal antimicrobiano contra este tipo de patógeno.

A utilização dos azóis antifúngicos não apresenta boa resposta, embora alguns autores indicam a utilização do itraconazol associada à corticoterapia a fim de reduzir a dosagem de corticoide (DENNING; STEVENS, 1990). O emprego dos azóis antifúngicos apresenta como vantagem menos efeitos colaterais quando comparado à Anfotericina B (corticoide). O itraconazol na dose de 200 mg, duas vezes ao dia, pode ser um substituto da anfotericina B quando não se alcançar uma dose resposta terapêutica inicial ou quando houver intolerância à anfotericina. Em pacientes com o aspergiloma, sem comprometimento do sistema nervoso central, o itraconazol é uma boa droga (LOPES et al., 2004).

Paralelamente, à busca de antimicrobianos de origem natural que apresentem atividade sobre grande espectro de microrganismos e que possam ser usados como alternativa aos antibióticos convencionais, existe o interesse da classe científica, sobretudo sobre as moléculas de origem vegetal, visto que as plantas possuem grande potencial em sintetizar substâncias químicas com estruturas diversificadas, como sistema de defesa contra agentes patogênicos (RODRIGUES et al., 1997).

Deste modo, a busca de antimicrobianos de origem vegetal apresenta-se com grande potencial, em função das células vegetais reagirem contra este tipo de patógeno, podendo ser

mais eficiente no tratamento dessas infecções micóticas e menos tóxicas aos pacientes (RECIO et al., 1989; FARNSWORTH, 1996).

Popularmente o óleo de copaiba, é utilizado como anti-inflamatório (BRAGA et al., 1998; CASCON; GILBERT, 200; PINTO et al., 200) anti-inflamatório das vias urinárias, em afecções pulmonares (tosses e bronquites, gripes e resfriados), antiúlcera (PAIVA et al., 1998); antiasmático, expectorante, pneumonia, sinusite, disenteria, incontinência urinária, cistite e leucorréia (VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002), como analgésico (PINTO et al., 2000) e como antitumoral (OHSAKI et al., 1994).

As emulsões são amplamente empregadas como veículos nas indústrias cosmética e farmacêutica por apresentarem vantagens como a veiculação de fármacos ou ativos hidrofílicos e lipofílicos na mesma formulação, além de possibilitarem o controle de aspectos sensoriais adaptados às necessidades da via de administração para as quais se destinam (CAMARGO, 2008).

Os óleos vegetais são comumente incorporados em formulações cosméticas emulsionadas, com dispersões de duas fases líquidas entre si, que com um tensoativo tornam-se estáveis (FERNANDEZ et al., 2004). São compostas basicamente de três componentes: água, óleo e tensoativo, cujas propriedades físico-químicas podem afetar o comportamento do sistema (SAJJADI et al., 2003).

As nanoemulsões com diâmetro de gotículas variando entre 20 e 300 nm são mais vantajosas em relação às demais nanoemulsões por apresentarem maior estabilidade frente à cremeação e sedimentação, utilizarem baixa concentração de tensoativos, serem transparentes e fluidas e aumentarem a molhabilidade, espalhabilidade e penetração devido à baixa tensão interfacial (SOLANS, 2005).

São considerados sistemas metaestáveis, ou seja, estáveis por longo período de tempo, cuja estrutura depende do processo de preparo e da estabilização estérica quando se emprega tensoativos não-iônicos e/ou polímeros, na preparação (TADROS et al., 2004).

Embora o óleo de copaiba tenha sido usado por mais de 500 anos na medicina tradicional popular, com uma grande diversidade de aplicações, os estudos desenvolvidos sobre este óleo, mostram-se ainda restritos e escassos (PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009).

Assim o objetivo deste trabalho foi testar a ação antifúngica do óleo resina e da nanoemulsão de copaiba, sobre os fungos filamentosos, *Aspergillus nomius* e *A. fumigatus*.

2.MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Coleta das castanhas-da-Amazônia

As sementes de castanha-da-Amazônia, foram coletadas na Reserva Extrativista do Rio Cajari, Amapá, Amazônia Oriental, Brasil, nas localidades Martins (52°17'30"W; 0°34'36"S), Marinho (52°13'25"W; 0°34'40"S) e Pedra Preta, no município de Laranjal do Jari. O clima da região é do tipo AM, segundo Köppen, apresentando temperatura média anual de 25 °C e precipitação média de 2300 mm, concentrada entre os meses de dezembro e junho. O relevo é muito acidentado e o solo predominante é do tipo latossolo profundo de origem Terciária (PAIVA; GUEDES; FUNI, 2011).

2.2. Isolamento fúngico

Os isolados fúngicos 4K7 e 26 Nat (SISGEN A5331F0), foram obtidos por isolamento indireto em meio DG18 (Peptona, 5 g; Glicose, 10g; Fosfato Monobásico de Potássio, 1 g; Sulfato de Magnésio, 0,5 g; Sulfato de Zinco, 0,01 g; Sulfato de Cobre, 0,005 g; Dicloran, 0,002 g; Cloranfenicol, 0,05 g; Clorotetraciclina, 0,05 g; Agar, 15 g, suplementado com Glicerol, 220 g). Após desinfestação em etanol (70% por 5 min.), NaOCl (12500 ppm por 5 min.) e em água destilada esterilizada, inoculou-se quatro fragmentos de amêndoas e cascas de castanha-da-Amazônia por placa, após desinfestação em álcool 70% (1 min.), hipoclorito de sódio (1 min.) e água destilada esterilizada (2 min.). Incubando-os por sete dias a 25 °C, em fotoperíodo de 12 h no escuro e 12 h no claro (DIAS et al., 2011). Após obtenção dos isolados monospóricos, estes foram enviados ao Laboratório de Fitopatologia da UNB, para a realização da taxonomia molecular.

2.3. Extração do DNA genômico fúngico

A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com o método de extração descrito por Raeder & Broda (1985) a partir de cultivos líquidos Czapek Yeast Extract medium (CYA) (PITT; HOCKING, 2009) incubados à 28°C, 180 rpm por 3 dias.

2.4. Identidade taxonômica dos fungos

A identidade taxonômica foi realizada a partir da análise de sequência da região nuclear ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal e gene parcial da calmodulina. Cada reação de PCR foi realizada com 10ng de DNA genômico, 2,5mmol⁻¹ de cada primer, 1 mmol⁻¹ dNTPs, 4mmol⁻¹ MgCl₂, 1 U de Taq Platinum® polymerase (Invitrogen) e 1X Taq

Platinum® polymerase buffer (Invitrogen). A região ITS do DNA ribossomal foi amplificada usando os primers ITS5 e ITS4 (WHITE et al., 1990) e a região da calmodulina amplificada com os primers Cmd5 e Cmd6 (HONG et al., 2006). Os ciclos da PCR foram realizados de acordo com o programa: desnaturação inicial à 94°C por 4 min, 30 ciclos de desnaturação à 94°C por 1 min, anelamento do primer por 1 min, à 50°C para os primers ITS5 e ITS4, e à 60°C para os primers Cmd5 e Cmd6, extensão à 72°C por 1 min, e uma extensão final à 72°C por 5 min. Os produtos de PCR foram purificados com ExoSAP-IT® (USB, Cleveland, Ohio, USA) e sequenciados usando Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing chemistry (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) no ABI 3700 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A identificação molecular foi realizada por meio de comparação das sequências no banco de dados NCBI usando o algoritmo BLASTn (ALTSCHUL et al., 1990).

2.5. Caracterização de isolados do gênero *Aspergillus* quanto a produção de aflatoxinas.

A caracterização dos isolados do gênero *Aspergillus* da seção Flavi quanto a sua capacidade de produção de aflatoxinas foi realizada de acordo com Schmidt-Heydt et al. (2009). As amostras foram cultivadas em meio semi-sólido indutor para a produção de aflatoxinas Yeast Extract Sucrose (YES) (20g/L de extrato de levedura; 0,5g/L de MgSO₄.5H₂O; 150g/L de sacarose; 0,1g de ZnSO₄; 0,05g CuSO₄; 15g/L de agar, pH 7,0. A atividade da água (Wa) do meio de cultura foi ajustada com glicerol usando uma mistura de glicerol/água (glicerol/ Wa 10,8 ml/ 0,99 Wa). Os isolados de *A. nomius* e *A. fumigatus*, foram cultivados por 7 dias a 25°C. Após o tempo de cultivo, todo o conteúdo micotoxigênico foi extraído de cada placa colonizada sob agitação constante, em 10 mL de metanol à temperatura ambiente durante 60 minutos.

2.6. Coleta e caracterização do óleo de *Copaifera* sp.

O material genético foi coletado de população nativa de *Copaifera* sp., em área de assentamento Nova Canaã, situada no município de Porto Grande, AP. Para a identificação da espécie, uma exsicata foi enviada para o Herbário do Instituto de Pesquisa e Tecnologia do Estado do Amapá – IEPA. A coleta foi realizada no mês de outubro/2017.

2.7. Experimento 1: Potencial fungitóxico do óleo de *Copaifera* sp. sobre *Aspergillus nomius* e *Aspergillus fumigatus*

O teste de fungitoxicidade foi determinado pela técnica de Poison Food (THOMIDIS; FILOTHEOU, 2016) adaptado, utilizando-se o óleo de copaíba, cuja densidade foi de 0,965 g/ml. Preparou-se uma emulsão numa concentração de 20 mg de copaíba para 5 µL de Tween 20, em 1 mL de água destilada, a qual foi adicionada ao meio de cultura Czapeck Yeast Autolysate Agar - CYA (Saccharose, 30 g; Power Yeast Extract, 5 g; K₂HPO₄, 1 g; NaNO₃, 2 g; KCl, 0,5 g; MgSO₄.7H₂O, 0,5 g; FeSO₄.7H₂O, 0,01 g; ZnSO₄.7H₂O, 0,01 g; CuSO₄.5H₂O, 0,005; Cloranfenicol, 0,1 g; agar, 20 g; água destilada, 1 L) (PITT; HOCKING, 2009) adaptado, autoclavado por 20 minutos a 121 °C. As concentrações utilizadas nos tratamentos foram: T1 (0,1 µg/ml); T2 (0,5 µg/ml); T3 (1,0 µg/ml); T4 (1,5 µg/ml); T5 (2,0 µg/ml); T6 (4,0 µg/ml); T7 (6,0 µg/ml). Assim que o meio de cultura atingiu aproximadamente 45°C, adicionou-se a emulsão, homogeneizando-a ao meio com a ajuda de um bastão de vidro. Em seguida, o meio foi vertido nas placas de Petri (20 mL) e após a sua solidificação, realizou-se a inoculação do fungo, retirando-se uma porção do micélio da borda de uma colônia de 3 dias de idade, colocando-a no centro de uma Placa de Petri. Utilizou-se o antifúngico comercial, Itraconazol (marca: Prati; Lote: 16A43N) na concentração de 1,6 µg/mL, como controle positivo e o Tween 20 na concentração de 1,6 µg/ml, como controle negativo. E, o fungo em meio de cultura sem o óleo, para fins de comparação com os demais tratamentos.

2.8. Avaliação dos tratamentos e análise dos dados

Os tratamentos foram realizados em triplicata e o registro do crescimento micelial foi avaliado a cada 24h, 48h e 72h, medindo-se os diâmetros transversal e longitudinal, para a análise do crescimento radial diário e da Porcentagem de Inibição do Crescimento Micelial (% PIC), de acordo com Thomidis e Filotheou (2016).

$$\text{PIC} = \{(\text{diâmetro da test.} - \text{diâmetro do trat.})/\text{diâm. da test.}\} \times 100$$

2.9. Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial, 7 x 2 x 3 x 3 (concentrações x fungos x controles x repetições) realizando-se a análise

de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa SISVAR (5.6) (FERREIRA, 2014)

2.10. Experimento 2: Potencial anti-fúngico da nanoemulsão de *Copaifera* sp. sobre *A. nomius* e *A. fumigatus*.

2.10.1. Obtenção da nanoemulsão do óleo resina de *Copaifera* sp.

A nanoemulsão formulada com o óleo resina de *Copaifera* sp., utilizada neste estudo, foi preparada no Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica da Universidade Federal do Amapá.

2.10.2. Preparo da Nanoemulsão de *Copaifera* sp.

A nanoemulsão de copaíba, foi preparada por um método de baixo aporte de energia. A massa final foi de 4 g; composta de 5% (p/p) de óleo resina de Copaíba; 5% (p/p) de tensoativo e 90% (p/p) de água destilada esterilizada. A fase oleosa foi constituída pelo óleo e um surfactante hidrofílico (POLISORBATO 80, EHL 15). Para isso, o óleo resina e o tensoativo foram reunidos e submetidos à agitação intensa (800 rpm), em vórtex (mod. AP59 – Phoenix) durante 2 minutos. Após isto, adicionou-se o volume de água destilada gota a gota, sob agitação. Agitando-se por mais 2 minutos. Durante 3 dias, deixou-se a nanoemulsão preparada em repouso, sob temperatura ambiente, em local arejado e livre de impacto, inicialmente para caracterização.

2.10.3. Avaliação da Estabilidade da Nanoemulsão de *Copaifera* sp.

A estabilidade da nanoemulsão foi avaliada durante 0, 1 e 7 dias de manipulação, pela análise macroscópica da formulação, avaliando-se parâmetros como aspecto, presença de cremagem, viscosidade e cor. Durante este período, a nanoemulsão foi mantida sob temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), em tubos de vidro com tampa de rosca. A nanoemulsão tipo óleo em água, foi caracterizada pela diluição da formulação em água destilada esterilizada.

2.10.4. Tamanho da gotícula e Polidispersão

O tamanho da gotícula e a polidispersão da nanoemulsão foram determinadas pela espectroscopia de correlação de fótons, utilizando-se um equipamento tipo Zetasizer ZS, Malvern, UK com 10 mW “red” laser ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$) e a amostra foi medida por um detector, para a medição do tamanho das gotículas, tomando-se um ângulo de dispersão de 90° . O

efeito da diluição sobre a média do tamanho da gotícula e o índice de dispersão (pdi) foram obtidos utilizando-se o fator de diluição 1:25 (Tabela 1; Figura 1). A nanoemulsão foi também analisada por um programa de rampa linear programada, variando de 25°C a 80°C a intervalos de 5°C e os resultados expressos como média \pm desvio padrão.

A nanoemulsão foi formada em água, misturada em surfactante hidrofílico Tween 80 e o óleo resina de *Copaifera* sp. Obteve-se uma nanoemulsão (O/A) azulada e transparente com tamanhos de gotículas variando entre $132,9 \pm 0,8544$ e $144,5 \pm 1,852$ nm. O tamanho da gota de nanoemulsão foi medido pela dinâmica de dispersão de luz. A nanoemulsão preparada, apresentou alta estabilidade cinética por 7 dias, sem separação de fases, sedimentação ou cremação.

Tabela 1. Determinação da diluição, do tamanho da gotícula e Índice de Polidispersão (pdi) da nanoemulsão preparada com o óleo resina de *Copaifera* sp. e surfactante hidrofílico (Polisorbato 80, HLB = 15). Cada medida representa a média e o desvio padrão. Cada análise foi realizada em triplicata.

Leitura (Diluição 1:25)	Polisorbato 80	
	Tamanho (nm)	Pdi
0 dia	132.9 ± 0.8544	0.295 ± 0.000
1 dia	137.0 ± 0.8622	0.298 ± 0.003
7 dias	144.5 ± 1.852	0.316 ± 0.034

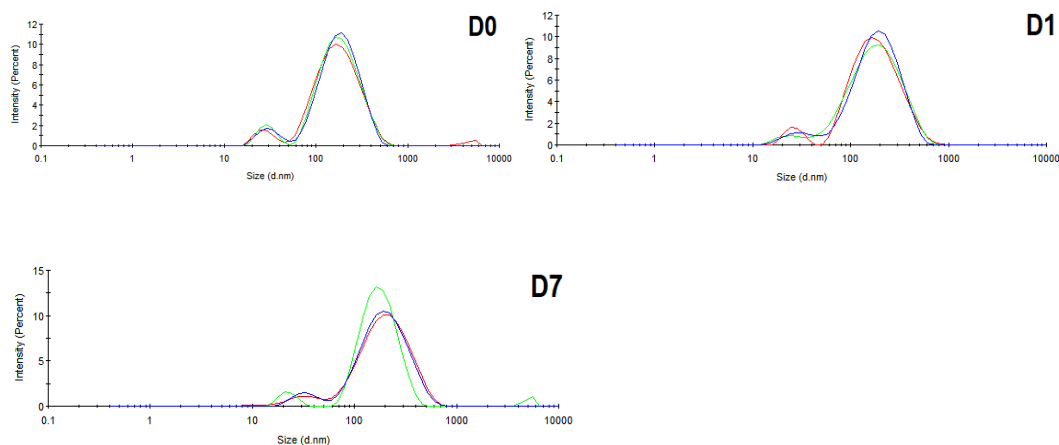


Figura 1. Distribuição do tamanho da partícula da nanoemulsão constituída de 5% (w/w) de óleo de copaíba, 5% (w/w) de polisorbato 80 e 90% (w/w) de água. Tamanho da gotícula e polidispersão: (A) 132.9 ± 0.8544 nm; 0.295 ± 0.000 (com 0 dia de manipulação); (B) 137.0 ± 0.8622 nm; 0.298 ± 0.003 (após 1 dia de manipulação); (C) 144.5 ± 1.852 nm; 0.316 ± 0.034 (após 7 dias de manipulação).

2.10.5. Potencial fungitóxico da nanoemulsão de *Copaifera* sp. sobre *Aspergillus nomius* e *Aspergillus nomius* e *A. fumigatus*

A atividade fungitóxica da nanoemulsão de Copaíba foi testada sobre as espécies *Aspergillus nomius* e *Aspergillus fumigatus*, por meio da técnica de Poison Food segundo Thomidis e Filotheou (2016). O meio de cultura utilizado foi o Czapeck Yeast Autolysate Agar (CYA) adaptado (Saccharose, 30 g; Power Yeast Extract, 5 g; K_2HPO_4 , 1 g; $NaNO_3$, 2 g; KCl, 0,5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 g; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 g; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,005; Cloranfenicol, 0,1 g; agar, 20 g; água destilada, 1 L), autoclavado por 20 minutos a 121 °C. Todos os materiais utilizados foram autoclavados à exceção da nanoemulsão e colocados sob luz ultravioleta, em câmara de fluxo laminar vertical. Após esfriamento à temperatura de 45°C, cada concentração (500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL e 31,2 µg/mL) da nanoemulsão, foi adicionada separadamente a um erlemeyer de 250 ml com o meio de cultura CYA e vertidos 20 mL, por placa de Petri. Inoculou-se no centro de cada placa de Petri, uma pequena porção do micélio fúngico, retirada da margem de uma cultura pura de cada fungo, com 3 dias de crescimento, incubando-as a 28 ± 2 °C por 7 dias, sob fotoperíodo de 12 horas no escuro e 12 horas no claro. Utilizou-se o antifúngico comercial, Itraconazol (marca: Prati; Lote: 16A43N) na concentração de 1,6 µg/mL, como controle positivo e o Tween 80 na concentração de 1,6 µg/ml, como controle negativo, e o fungo no meio de cultura sem o óleo. Os tratamentos foram realizados em triplicata e o registro do crescimento micelial foi avaliado a cada 24h, 48h e 72h, medindo-se os diâmetros transversal e longitudinal, para a análise do crescimento micelial e da Percentagem de Inibição do Crescimento Micelial (% PIC), de acordo com Thomidis e Filotheou (2016).

$$PIC = \{(\text{diâmetro da test.} - \text{diâmetro do trat.})/\text{diâm. da test.}\} \times 100$$

2.11. Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial, 5 x 2 x 3 x 3 (concentrações x fungos x controles x repetições), a análise estatística, foi realizada através da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa SISVAR (6.0) (FERREIRA, 2014).

3. RESULTADOS

3.1. Taxonomia morfológica e molecular das espécies *Aspergillus nomius* e *Aspergillus fumigatus*

As espécies fúngicas, após a identificação e a caracterização por meio da taxonomia morfológica e da biologia molecular, seguidas de sequenciamento, tiveram seus registros efetuados na Coleção micológica do Laboratório de Interação Planta-Praga do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Em relação ao isolado 4K7, a região do BLASTn mostrou 100% identidade com *A. fumigatus*, amostra tipo, ATCC MYA4609 e 99% de identidade com NRRL 6113, isto sendo confirmado através do marcador secundário Calmodulina. Enquanto que o isolado 26NAT, de acordo com o marcador secundário, região da calmodulina e o BLASTn, demonstraram 100% de identidade com *A. nomius*, quando comparado à amostra tipo, NRRL 6552; e de acordo com a região ITS, demonstrou 100% de identidade com *A. nomius*, ao ser comparado à amostra NRRL 6552 (Tabela 2).

Tabela 2. Identificação, origem, taxonomia morfológica e molecular, Análise BLASTn (rDNA ITS), cobertura, E valor, Máxima de identidade, Acesso ao NCBI.

Identificação Isolado UnB	Origem geográfica	Taxonomia morfológica	BLASTn (rDNA ITS)	Cober tura	E valor	Máxima de Identidad e	Acesso ao NCBI
4K7	Laranjal do Jari, AP	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	97%	0.0	99%	JX092088.1
26NAT	Laranjal do Jari, AP	<i>A. nomius</i>	<i>A. nomius</i>	95%	0.0	99%	AF338647.1

3.2. Caracterização dos isolados fúngicos quanto à produção de aflatoxinas.

Na tabela 3, estão presentes as aflatoxinas identificadas segundo metodologia estabelecida por Schmidt-Heydt et al. (2009), após isolamento das espécies fúngicas *A. nomius* e *A. fumigatus* oriundos de *Bertholletia excelsa*.

Tabela 3. Caracterização dos isolados fúngicos quanto à produção de aflatoxinas.

Área Natanael					Produção de AFLs			
					AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
2	DG18	I2C5P15	<i>A. nomius</i>	35°C Foto	++	+++	++	++
Área K7					Produção de AFLs			
					AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
26	DG18	I2C4P14	<i>A. fumigatus</i>	35°C Esc.	+++	+++	+++	++

Legenda: - não produziu; + e ++ houve produção, +++ muito produção. 26NAT e 4K7, isolados utilizados nos testes biológicos.

3.3. Experimento 1: Avaliação do potencial fungitóxico do óleo resina de *Copaifera* sp. no controle *in vitro* de *Aspergillus nomius* e *A. fumigatus*

3.3.1. Experimento 1: Avaliação do Potencial fungitóxico do óleo resina de *Copaifera* sp. no controle *in vitro* de *Aspergillus nomius* após 24 h, 48 h e 72 h, de avaliação.

Considerando-se as porcentagens de inibição de crescimento micelial de *A. nomius* em função das diferentes concentrações do óleo de Copaíba, observa-se que a curva indica que o melhor tempo em todas as concentrações foi de 48 horas, com curva tendendo a aumentar a inibição em concentrações superiores. Havendo uma tendência de maiores porcentagens de inibição com maiores concentrações do óleo, exceto para as avaliações às 24 horas. O tempo de incubação de 72 horas com desempenho inferior nas menores concentrações apresenta tendência de superar 24 e 48 horas em concentrações acima das estudadas, conforme comportamento da curva (Figura 2).

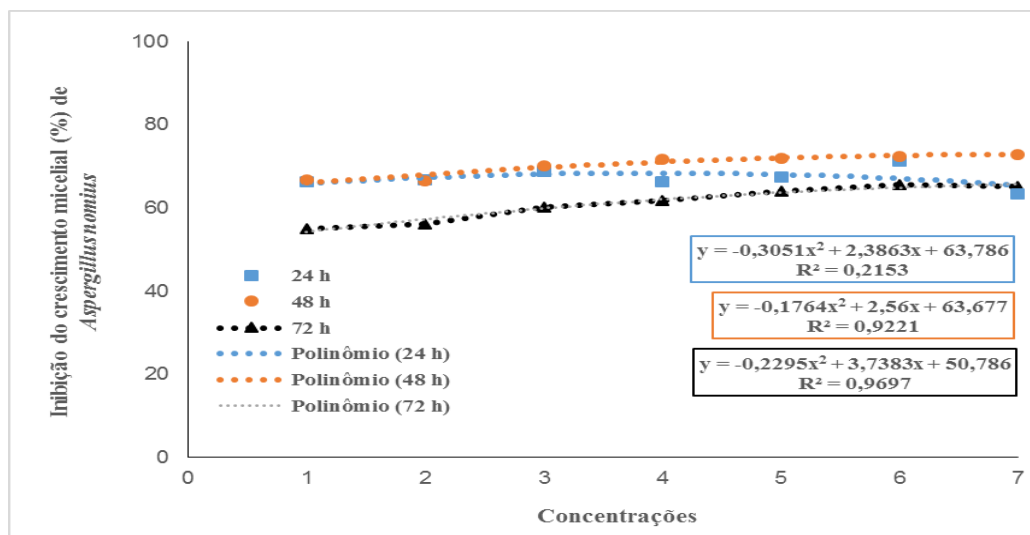


Figura 2. Efeito inibitório das diferentes concentrações: 1 = 0,1 µg/mL; 2 = 0,5 µg/mL; 3 = 1,0 µg/mL; 4 = 1,5 µg/mL; 5 = 2,0 µg/mL; 6 = 4,0 µg/mL; 7 = 6,0 µg/mL do óleo de *Copaifera* sp. sobre *A. nomius*.

Considerando-se as porcentagens de inibição e horas, observa-se a tendência de diminuição da capacidade de inibição do crescimento micelial de *A. nomius* nas concentrações de óleo de copaíba de 0,1 µg/mL ; 0,5 µg/mL; 1,0 µg/mL; 1,5 µg/mL; 2,0 µg/mL e 4,0 µg/mL até as 72 horas no gráfico e com aparente perda de desempenho nas horas subsequentes.

Ressaltando-se que a eficiência nas primeiras 48 horas apresentou tendência superior nas concentrações de 1,5 µg/mL; 2,0 µg/mL e 6,0 µg/mL, com maiores porcentagens de inibição.

Na primeira avaliação as 24 horas, todas as concentrações de óleo apresentaram capacidade de inibição superiores à ITZ+DMSO, quando foi efetuada a avaliação as 48 horas e 72, o tratamento controle teve desempenho inferior apenas em relação às concentrações de 0,1 µg/mL e 0,5 µg/mL, ou seja, as concentrações acima de 0,5 µg/mL foram mais efetivos em inibição do crescimento do fungo entre 48 e 72 horas

Na Figura 3, verifica-se que na primeira avaliação às 24 horas, todas as concentrações do óleo de copaíba apresentaram capacidade de inibição superiores à ITZ.

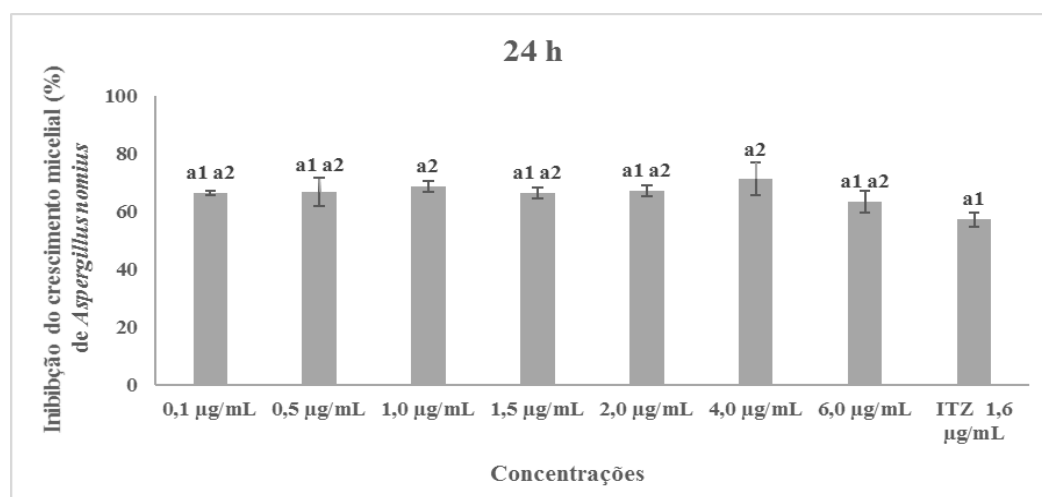


Figura 3. Efeito inibitório do óleo resina de *Copaifera* sp. após 24 h de inoculação, sobre o crescimento micelial de *A. nomius*, nas diferentes concentrações.

Diferenças entre números expressam a diferença significativa entre as médias a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6)

Ressaltando-se que a eficiência nas primeiras 48 h apresentou tendência superior nas concentrações de 1,5 µg/mL; 2,0 µg/mL e 6,0 µg/mL, com maiores porcentagens de inibição.

Quando foi efetuada a avaliação às 48 h e 72 h, o tratamento controle teve desempenho inferior apenas em relação às concentrações de 0,1 µg/mL e 0,5 µg/mL, ou seja, as concentrações acima de 0,5 µg/mL foram mais efetivas em inibição do crescimento do fungo entre 48 h e 72 h. (Figura 4).

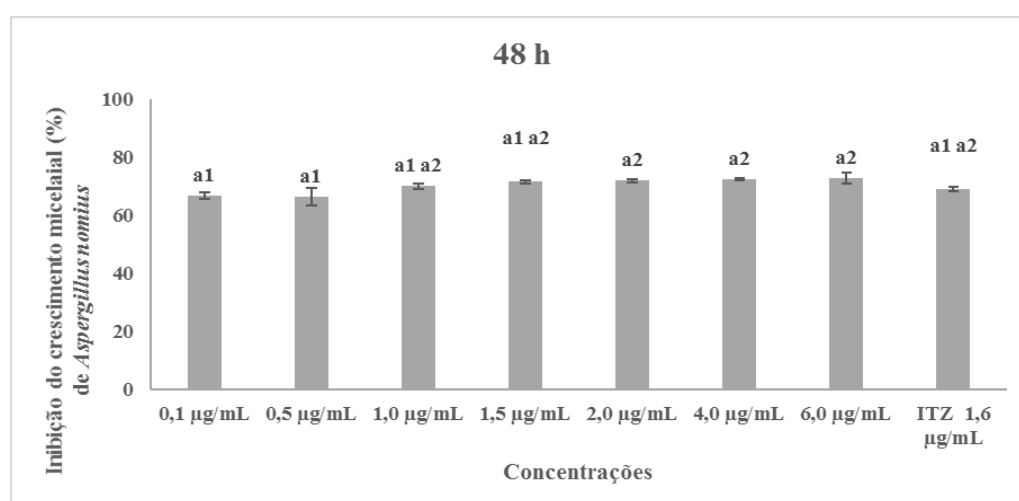


Figura 4. Efeito inibitório do óleo resina de *Copaifera* sp., após 48 h de inoculação, sobre *A. nomius*, nas diferentes concentrações.

Diferenças entre números expressam a diferença significativa entre as médias a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6).

Considerando-se as porcentagens de inibição e horas, observa-se a tendência de diminuição da capacidade de inibição do crescimento micelial de *A. nomius* nas concentrações

de óleo de copaíba de 1 = 0,1µg/mL; 2 = 0,5 µg/mL; 3 = 1,0 µg/mL; 4 = 1,5 µg/mL; 5 = 2,0 µg/mL; 6 = 4,0 µg/mL; 7 = 6,0 µg/mL até as 72 h no gráfico e com aparente perda de desempenho nas horas subsequentes (Figura 5).

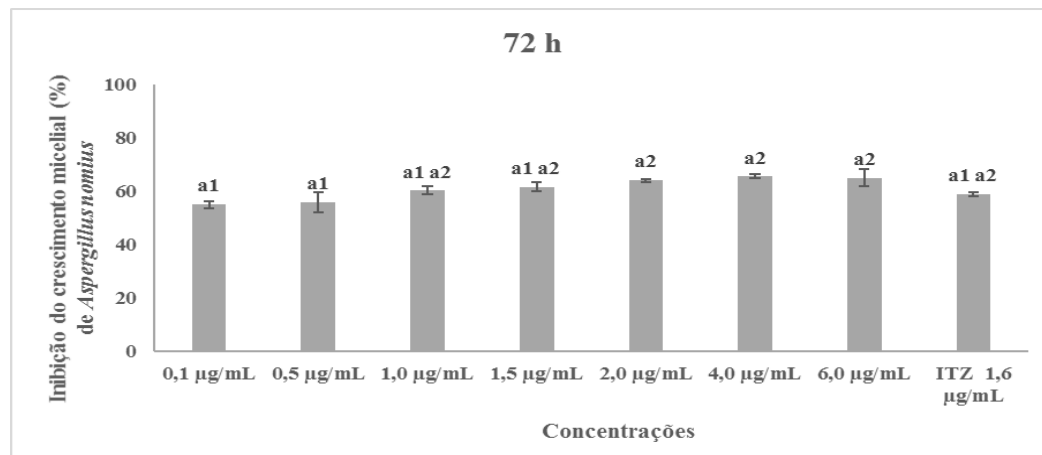


Figura 5. Efeito inibitório do óleo resina de *Copaifera* sp., após 72h de inoculação, sobre *A. nomius*, nas diferentes concentrações.

Diferenças entre números expressam a diferença significativa entre as médias a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6)

3.3.2. Experimento 2: Avaliação do Potencial fungitóxico do óleo resina de *Copaifera* sp. no controle *in vitro* de *A. fumigatus* após 24 h, 48 h e 72 h, de avaliação.

Considerando-se as porcentagens de inibição de crescimento de *A. fumigatus* em relação às diferentes concentrações do óleo de *Copaifera* sp., observa-se que a curva indica que o melhor tempo em todas as concentrações foi de 24 horas, com a curva mantendo a eficácia de inibição de crescimento do fungo. Havendo uma tendência de maiores porcentagens de inibição com maiores concentrações do óleo para 48 e 72 horas. O tempo de incubação de 72 horas com desempenho inferior nas menores concentrações apresenta tendência de atingir o mesmo comportamento das 24 horas em concentrações acima das estudadas, conforme comportamento da curva, de forma mais acentuada que as 48 horas, que também aparenta tendência à melhor capacidade de inibição em concentrações acima das estudadas (Figura 6).

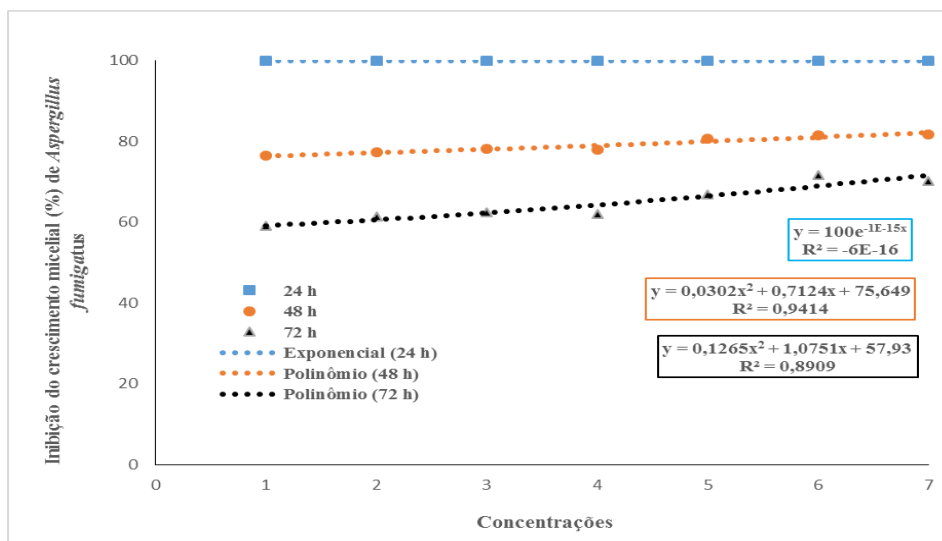


Figura 6. Efeito inibitório do óleo resina de *Copaifera* sp. sobre o crescimento micelial de *A. fumigatus* ao longo de 72 h de inoculação em meio CYA. 1 = 0,1 µg/mL; 2 = 0,5 µg/mL; 3 = 1,0 µg/mL; 4 = 1,5 µg/mL; 5 = 2,0 µg/mL; 6 = 4,0 µg/mL; 7 = 6,0 µg/mL do óleo de *Copaifera* sp. sobre *A. nomius*.

Considerando-se as porcentagens de inibição e horas, observa-se a tendência da capacidade de inibição do crescimento micelial de *A. fumigatus* em todas as concentrações de óleo de copaíba avaliados, ressaltando-se que o controle ITZ+DMSO manteve-se eficiente em todas as avaliações com total inibição. Ressaltando-se que a eficiência nas primeiras 24 horas foi semelhante e total em todas as concentrações. Já nas 48 horas as concentrações de 4,0 µg/mL e 6,0 µg/mL comparativamente com as demais concentrações foram as mais efetivas. Observando-se a perda da eficiência da inibição de crescimento no sentido 24 horas para 72 horas em todas as concentrações do óleo de copaíba empregadas nesta pesquisa. Nas 72 horas de incubação, a efetividade de inibição está diretamente associada com a concentração do óleo de copaíba utilizado, em que quanto maiores as concentrações melhores foram as capacidades de inibição de crescimento do fungo.

Considerando-se as porcentagens de inibição e horas, observa-se a tendência da capacidade de inibição do crescimento micelial de *A. fumigatus* em todas as concentrações do óleo de copaíba avaliados, ressaltando-se que o controle ITZ manteve-se eficiente em todas as avaliações com total inibição. Ressaltando-se ainda que a eficiência nas primeiras 24 horas foi semelhante e total em todas as concentrações, alcançando um PIC de 100% (Figura 7).

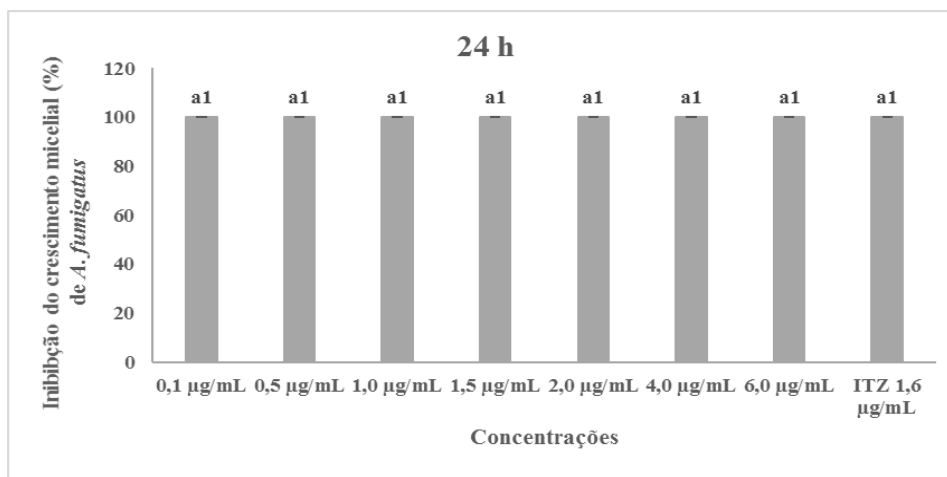


Figura 7. Efeito inibitório do óleo resina de *Copaifera* sp. sobre o crescimento micelial de *A. fumigatus*, após 24 horas de inoculação, nas diferentes concentrações.

Diferenças entre números expressam a diferença significativa entre as médias a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6)

Já nas 48 horas as concentrações de 4,0 µg/mL e 6,0 µg/mL comparativamente com as demais concentrações foram as mais efetivas (Figura 8).

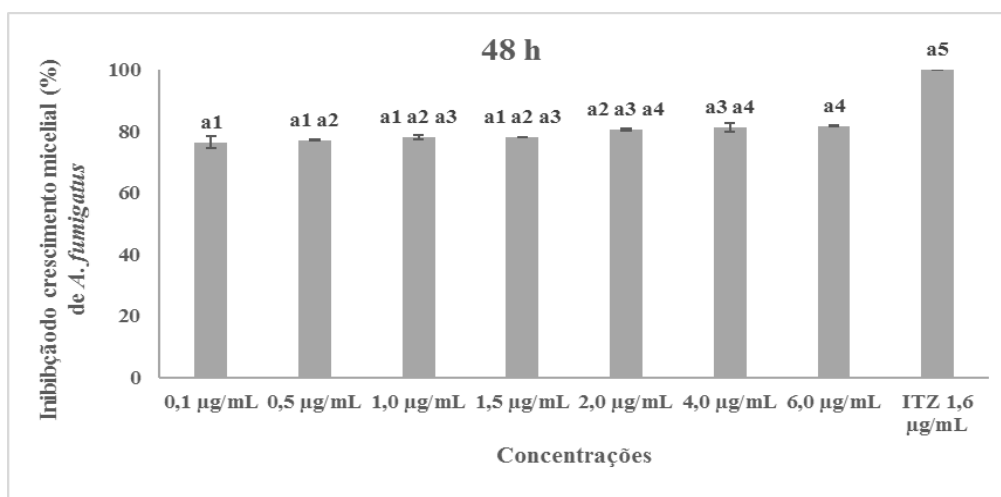


Figura 8. Efeito inibitório do óleo resina de *Copaifera* sp. sobre *A. fumigatus*, após 48h de inoculação, nas diferentes concentrações.

Diferenças entre números expressam a diferença significativa entre as médias a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6) (FERREIRA, 2014)

Observando-se a perda da eficiência da inibição de crescimento no sentido 24 horas para 72 horas em todas as concentrações do óleo de *Copaifera* sp. empregadas nesta pesquisa. Nas 72 horas de incubação, a efetividade de inibição está diretamente associada com a concentração do óleo de *Copaifera* sp. utilizado, visto que quanto maiores as concentrações, melhores foram em capacidade de inibição de crescimento do fungo (Figura 9).

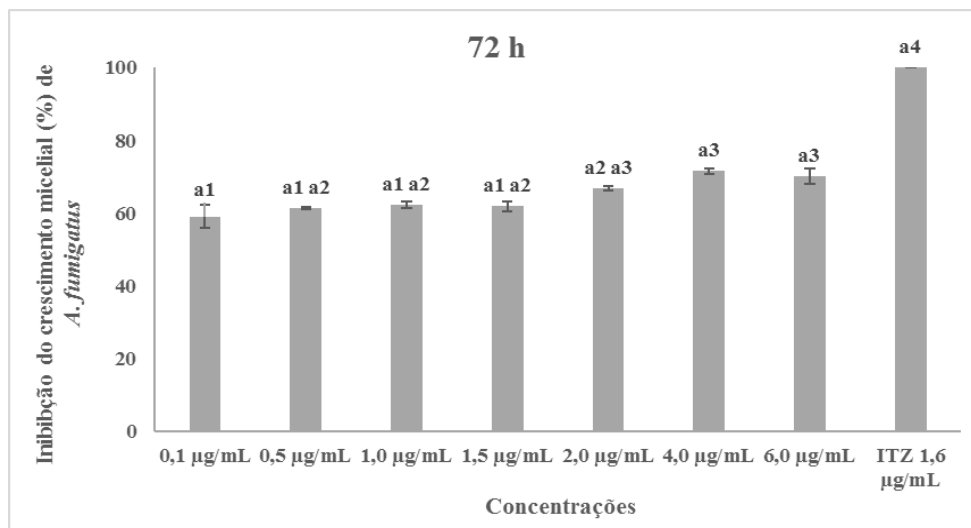


Figura 9. Efeito inibitório do óleo resina de *Copaifera* sp., sobre *A. fumigatus*, após 72h de inoculação, nas diferentes concentrações.

Diferenças entre números expressam a diferença significativa entre as médias a nível de 5% pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6) (FERREIRA, 2014)

3.4. Avaliação do potencial fungitóxico *in vitro* da nanoemulsão constituída pelo óleo resina de *Copaifera* sp. no controle de *Aspergillus nomius* e *Aspergillus fumigatus*

3.4.1 Experimento 1: Avaliação do potencial fungitóxico *in vitro* da nanoemulsão constituída pelo óleo resina de *Copaifera* sp. no controle de *Aspergillus nomius*.

Considerando-se as porcentagens de inibição em relação às diferentes concentrações da nanoemulsão do óleo resina de copaiba, verifica-se que conforme há aumento de concentração da nanoemulsão do óleo de *Copaifera* sp., efetivamente nas avaliações realizadas, o melhor tratamento foi obtido com 24 horas. Existindo a tendência de crescimento de inibição com 48 horas (curva laranja), ultrapassar num ponto, conforme a equação estimada, com um aumento de concentração acima do 5 (500 µg/mL), tornando-se o melhor tratamento sobre *A. nomius*.

Considerando as concentrações, acima de 5, observa-se uma tendência de inversão da inibição entre 24 horas, 48 horas e 72 horas, sendo que antes deste ponto, 24 horas mostra-se mais eficiente e após este ponto, 48 horas pode torna-se mais eficiente. Isso também ocorre para 72 horas que apresenta a tendência de ultrapassar a eficiência de inibição em relação as 24 horas e 48 horas. Atingindo o mesmo potencial do Itraconazol (Figura 10).

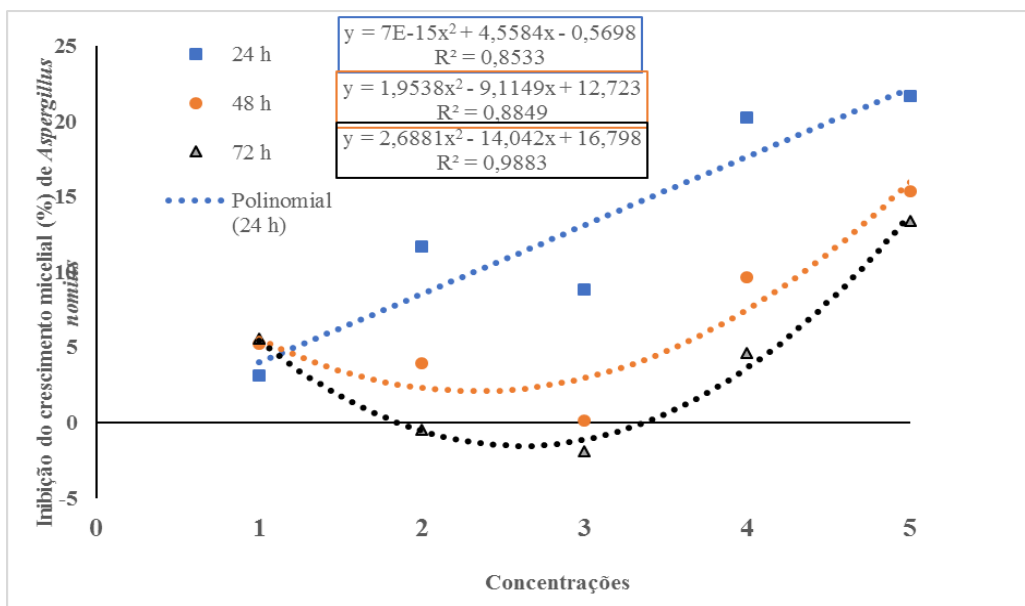


Figura 10. Efeito inibitório das diferentes concentrações: 1 = 31,2 µg/mL; 2 = 62,5 µg/mL; 3 = 125 µg/mL; 4 = 250 µg/mL; 5 = 500 µg/mL da nanoemulsão do óleo de *Copaifera* sp. sobre *A. nomius*.

A Figura 11, mostra o efeito inibitório da nanoemulsão de *Copaifera* sp. sobre *A. nomius* após 24h de inoculação.

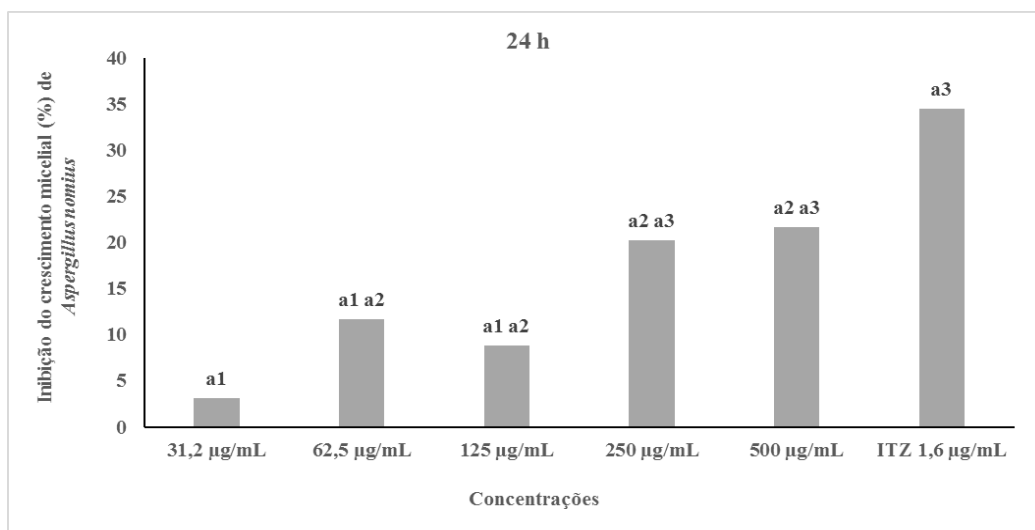


Figura 11. Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo resina de *Copaifera* sp. sobre *A. nomius*, após 24h de inoculação.

Diferenças entre números expressam a diferença significativa entre as médias a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6)

A Figura 12, mostra o efeito inibitório da nanoemulsão de *Copaifera* sp. sobre *A. nomius* após 48h de inoculação.

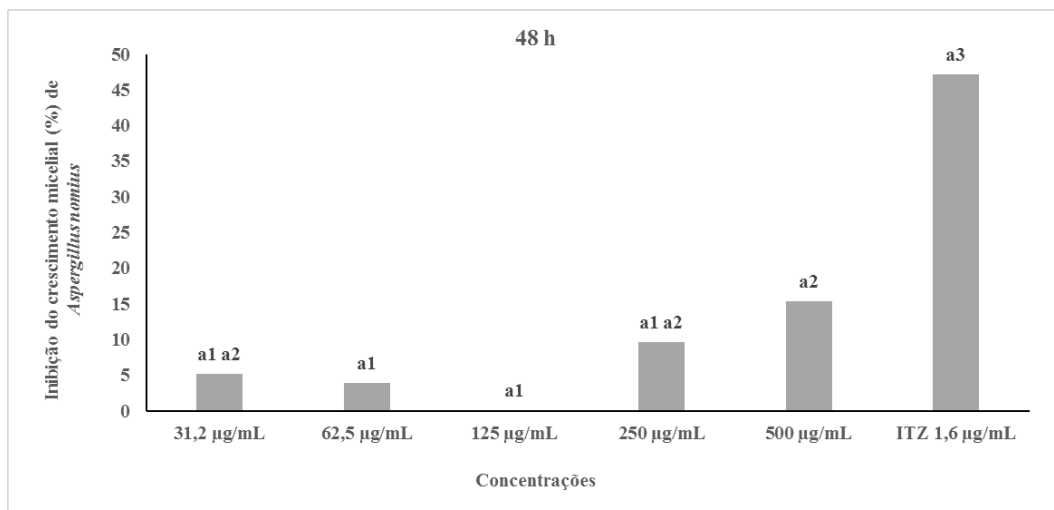


Figura 12. Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo de *Copaifera* sp. sobre *A. nomius*, após 48h de inoculação.

Diferenças entre números expressam a diferença significativa entre as médias a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6)

A Figura 13, mostra o efeito inibitório da nanoemulsão de *Copaifera* sp. sobre *A. nomius* após 72 h de inoculação.

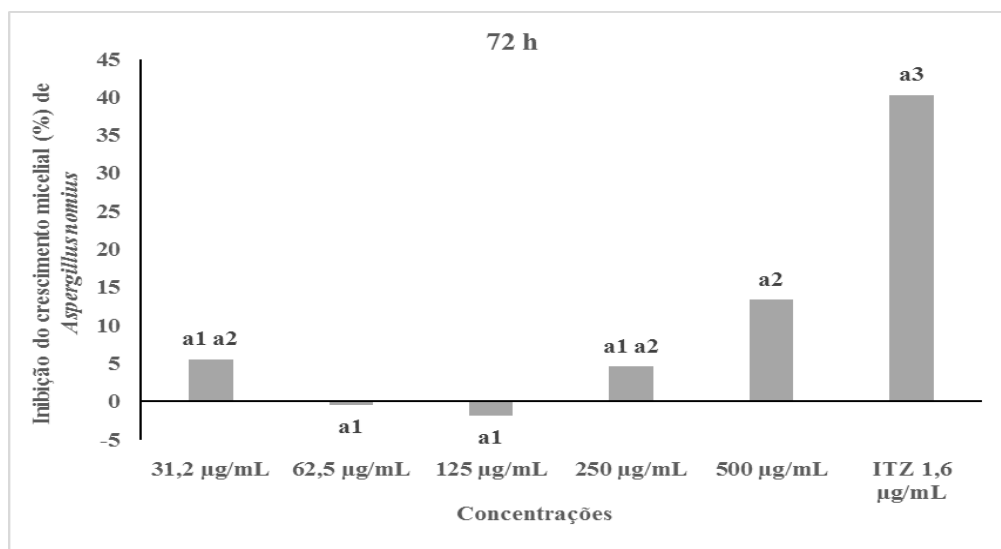


Figura 13. Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo resina de *Copaifera* sp. sobre *A. nomius*, após 72h de inoculação.

Diferenças entre números expressam a diferença significativa entre as médias a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6)

A Figura 14, mostra o efeito inibitório de *Copaifera* sp. sobre *A. nomius* após 96 h de inoculação.

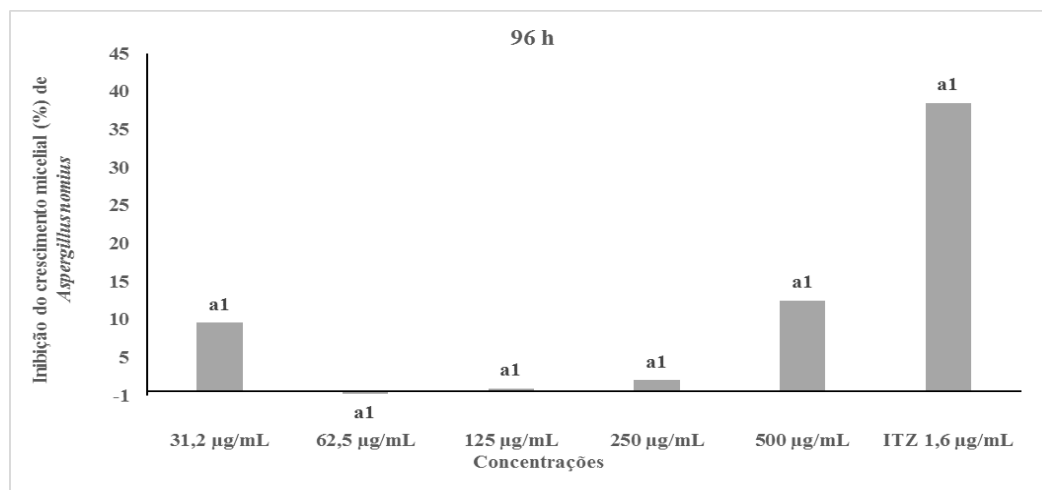


Figura 14. Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo resina de *Copaifera* sp. sobre *A. nomius*, após 96 h de inoculação.

Diferenças entre números expressam a diferença significativa entre as médias a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6)

A Figura 15 mostra o efeito inibitório da nanoemulsão de *Copaifera* sp. sobre *A. nomius* após 120 h de inoculação.

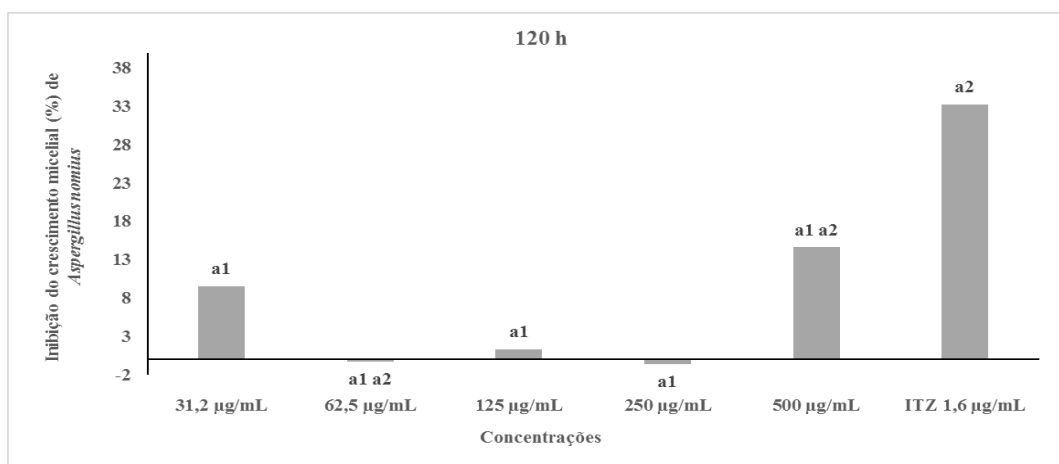


Figura 15. Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo resina de *Copaifera* sp. sobre *A. nomius*, após 120h de inoculação.

Diferenças entre números expressam a diferença significativa entre as médias a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6) (FERREIRA, 2014)

A Figura 16 mostra o efeito inibitório da nanoemulsão de *Copaifera* sp. após 144 h de inoculação.

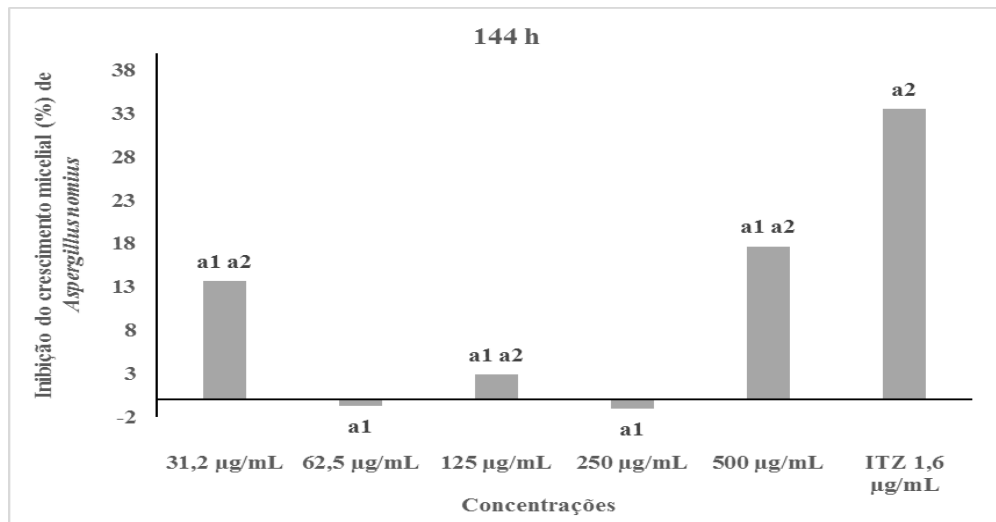


Figura 16. Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo resina de *Copaifera* sp. sobre *A. nomius*, após 144h de inoculação.

Diferenças entre números expressam a diferença significativa entre as médias a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6)

A Figura 17 mostra o efeito inibitório da nanoemulsão de *Copaifera* sp. sobre *A. nomius* após 168 h de inoculação.

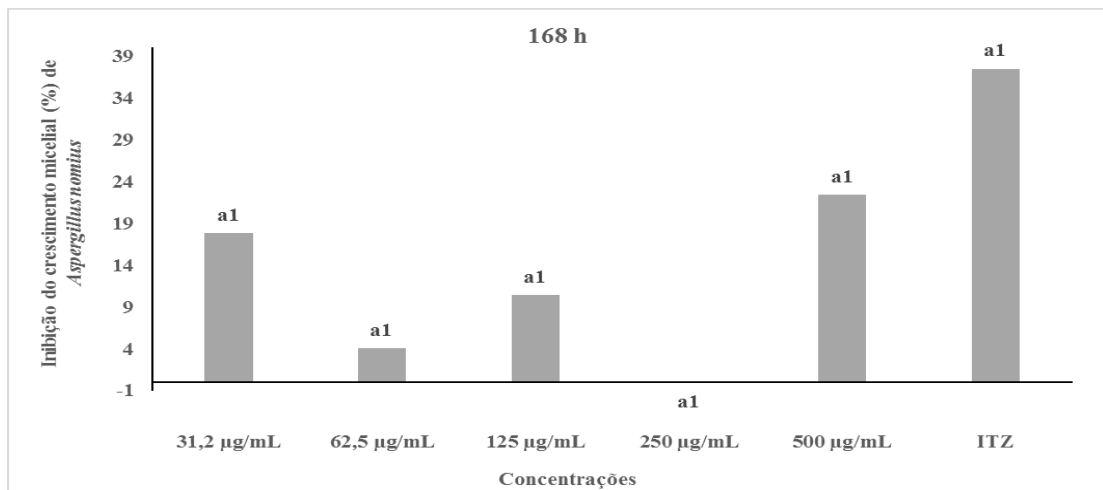


Figura 17. Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo de *Copaifera* sp. sobre *A. nomius*, após 168h de inoculação.

Diferenças entre números expressam a diferença significativa entre as médias a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6) (FERREIRA, 2014)

A Figura 18 mostra o efeito inibitório da nanoemulsão de *Copaifera* sp. sobre *A. nomius* após 216 h de inoculação.

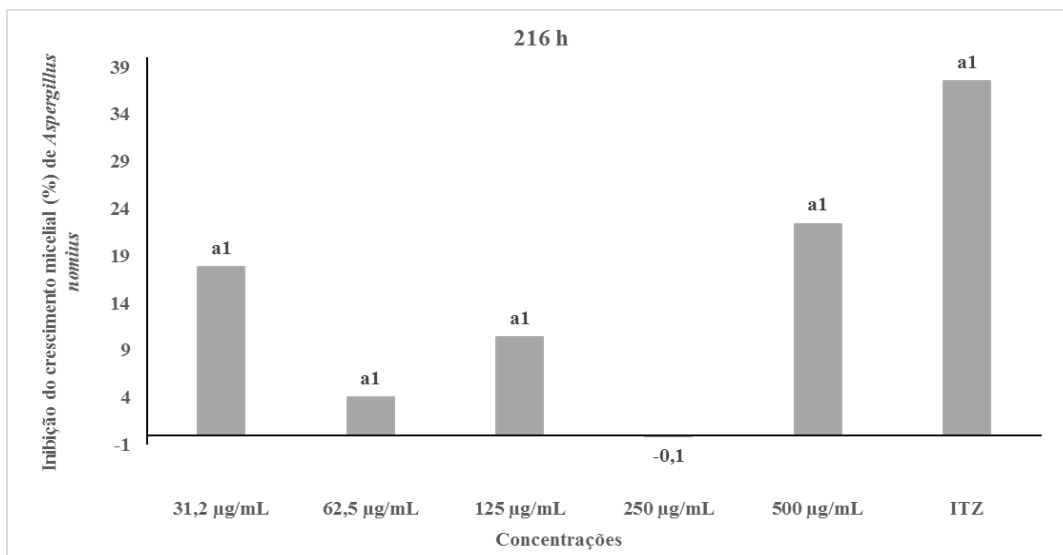
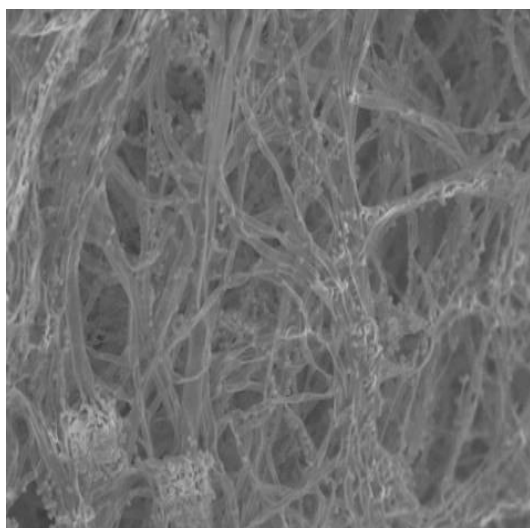


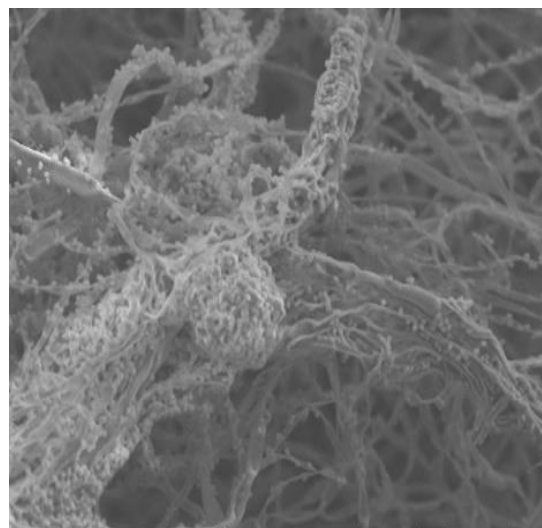
Figura 18. Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo resina de *Copaifera* sp. sobre *A. nomius*, após 216h de inoculação.

Diferenças entre números expressam a diferença significativa entre as médias a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6) (FERREIRA, 2014)

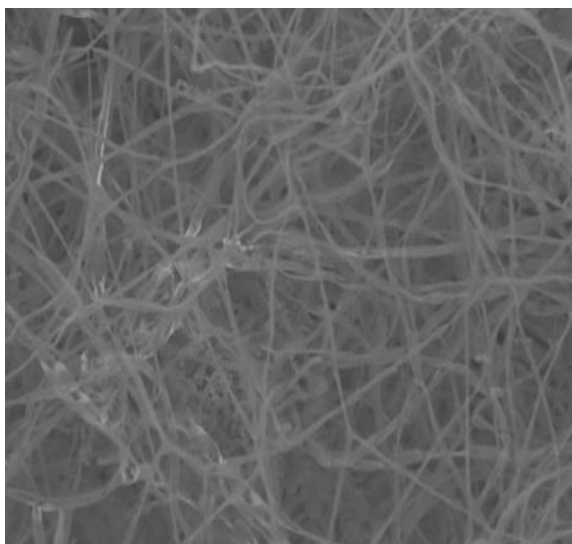
A Figura 19 apresenta a comparação entre uma colônia fúngica sem a nanoemulsão de *Copaifera* sp. (Figura A), uma colônia com tween 80 (Figura B) e outra colônia sob o efeito da nanoemulsão de *Copaifera* sp., na concentração de 500 µg/mL sobre o crescimento micelial e a esporulação de *A. nomius* através de uma fotomicrografia eletrônica de varredura (MEV) (Figura C).



A



B



C

Figura 19. Fotomicrografia Eletrônica de Varredura (MEV) do efeito inibitório da nanoemulsão do óleo resina de *Copaifera* sp. sobre o crescimento micelial de *A. nomius*. A. Colônia fúngica sem a nanoemulsão do óleo de *Copaifera* sp.; B. Colônia fúngica com Tween 80; C. Colônia fúngica sob ação da nanoemulsão do óleo de *Copaifera* sp. sobre *A. nomius* na concentração de 500 µg/mL, apresentando somente crescimento vegetativo e sem esporulação.

3.4.2. Experimento 2: Avaliação do potencial fungitóxico *in vitro* da nanoemulsão constituída de óleo resina de *Copaifera* sp. no controle de *Aspergillus fumigatus*.

No gráfico de porcentagens de inibição em relação às diferentes concentrações do óleo resina de Copaíba. Considerando as 5 concentrações crescentes, sempre a avaliação às 24 horas foi mais eficiente na inibição do crescimento. Aparentemente as avaliações realizadas as 24 horas apresentam uma tendência, com aumento de concentrações do óleo, conforme as curvas obtidas de sempre ser superior as demais horas envolvidas na pesquisa (Figura 20).

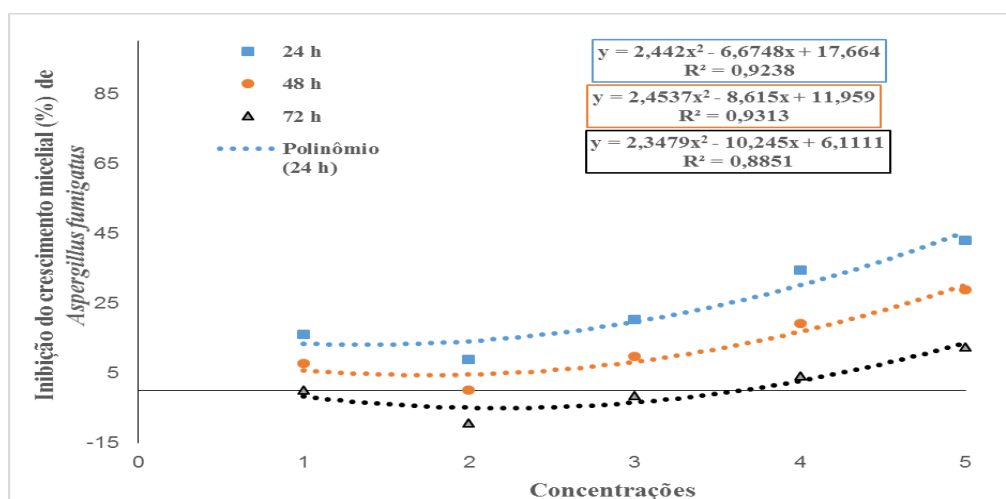


Figura 20. Efeito inibitório das diferentes concentrações: 1= 31,2 µg/mL; 2 = 62,5 µg/mL; 3 = 125 µg/mL; 4 = 250 µg/mL; 5 = 500 µg/mL da nanoemulsão constituída de óleo resina de *Copaifera* sp. sobre *A. fumigatus*

A Figura 21 mostra o efeito inibitório da nanoemulsão de *Copaifera* sp. sobre *A. fumigatus* após 24 h de inoculação.

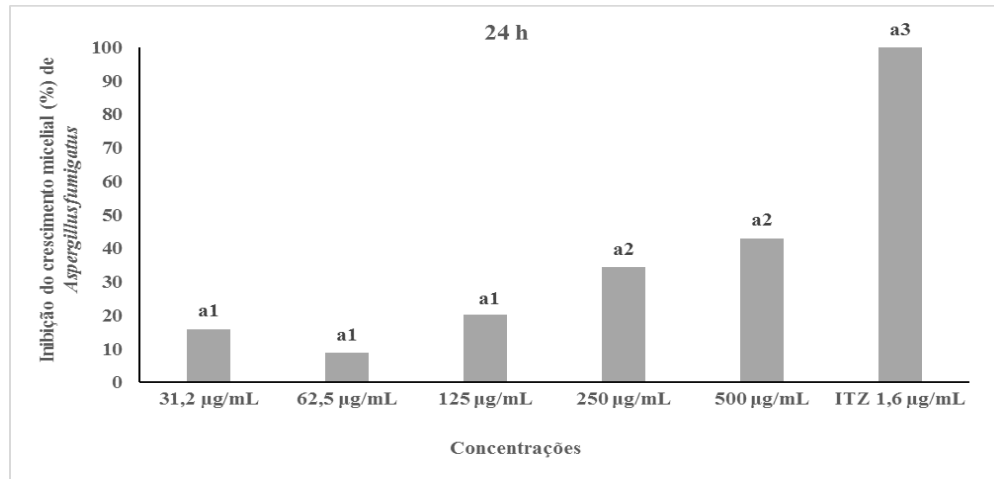


Figura 21. Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo de *Copaifera* sp. sobre *A. fumigatus*, após 24h de inoculação.

Diferenças entre números expressam a diferença significativa entre as médias a nível de 5% pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6) (FERREIRA, 2014)

A Figura 22 mostra o efeito inibitório da nanoemulsão de *Copaifera* sp. sobre *A. fumigatus* após 48 h de inoculação.

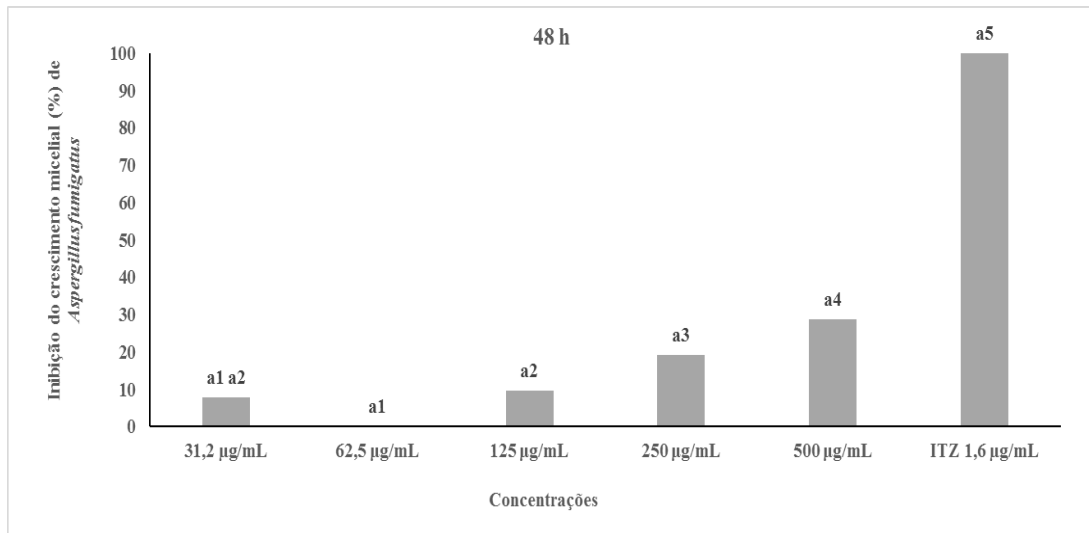


Figura 22. Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo de *Copaifera* sp. sobre *A. fumigatus*, após 48h de inoculação.

Diferenças entre números expressam a diferença significativa entre as médias a nível de 5% pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6) (FERREIRA, 2014)

A Figura 23 mostra o efeito inibitório da nanoemulsão de *Copaifera* sp. sobre *A. fumigatus* após 72 h de inoculação.

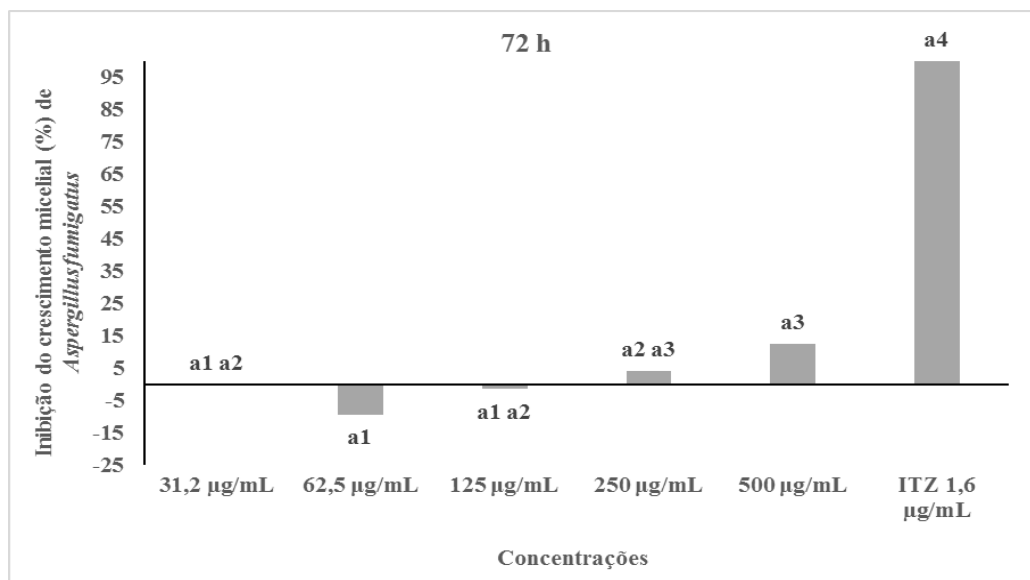


Figura 23. Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo de *Copaifera* sp. sobre *A. fumigatus*, após 72h de inoculação.

Diferenças entre números expressam a diferença significativa entre as médias a nível de 5% pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6) (FERREIRA, 2014)

A Figura 24 mostra o efeito inibitório da nanoemulsão de *Copaifera* sp. sobre *A. fumigatus* após 96 h de inoculação.

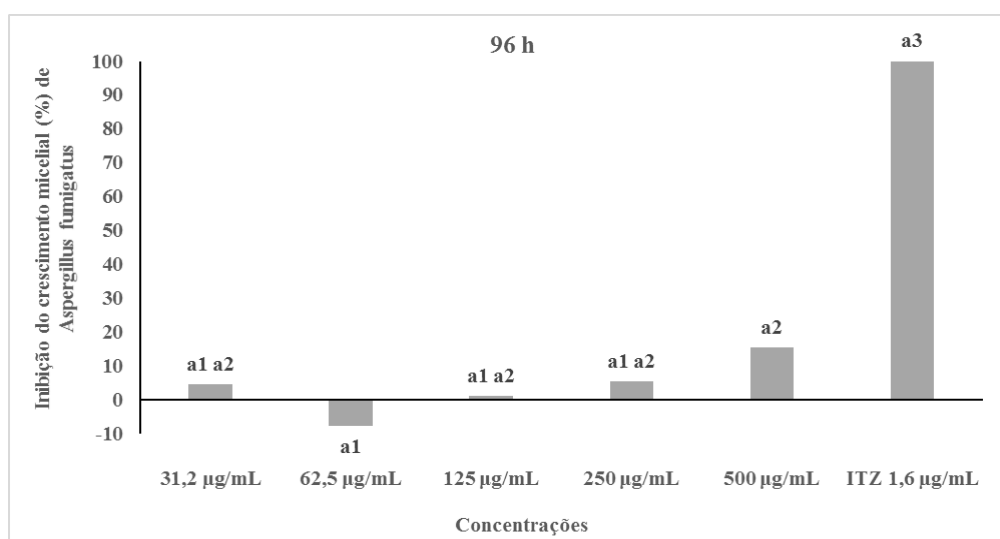


Figura 24. Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo resina de *Copaifera* sp. sobre *A. fumigatus*, após 96 h de inoculação.

Diferenças entre números expressam a diferença significativa entre as médias a nível de 5% pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6) (FERREIRA, 2014)

A Figura 25 mostra o efeito inibitório da nanoemulsão de *Copaifera* sp. sobre *A. fumigatus* após 120 h de inoculação.

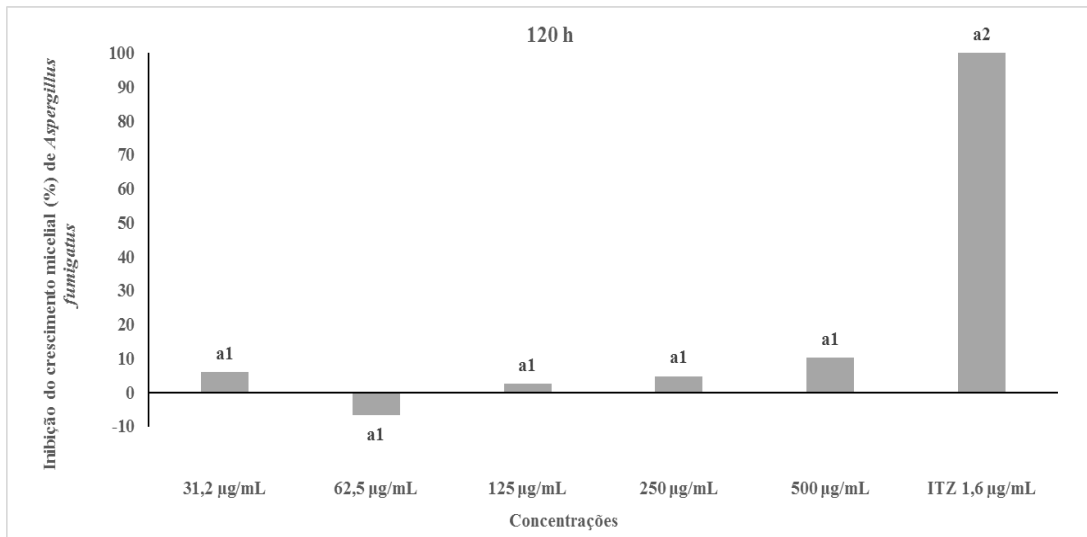


Figura 25. Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo resina de *Copaifera* sp. sobre *A. fumigatus*, após 120 h de inoculação.

Diferenças entre números expressam a diferença significativa entre as médias a nível de 5% pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6) (FERREIRA, 2014)

A Figura 26 mostra o efeito inibitório da nanoemulsão de *Copaifera* sp. sobre *A. fumigatus* após 144 h de inoculação.

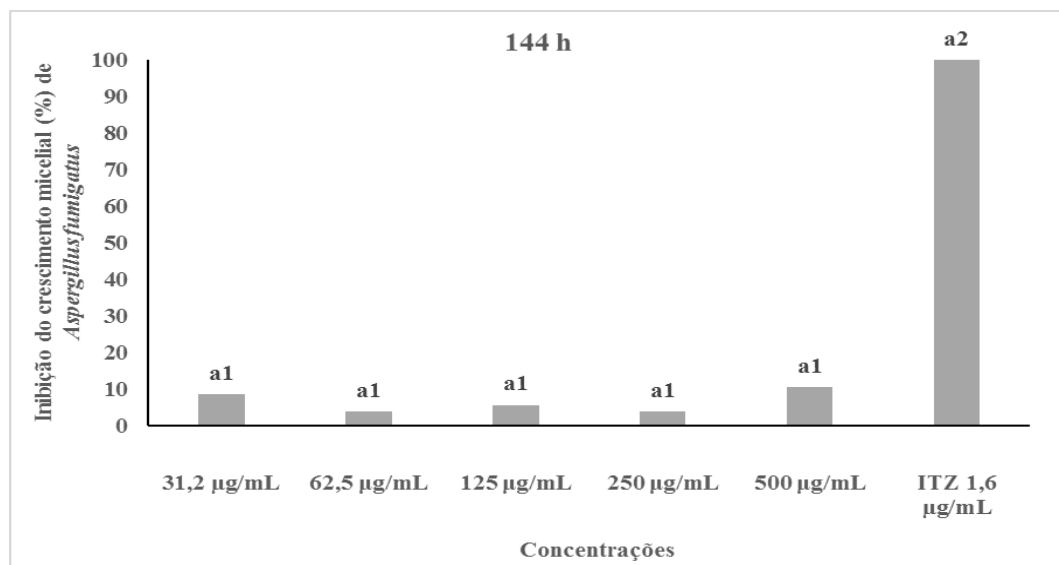


Figura 26. Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo resina de *Copaifera* sp. sobre *A. fumigatus*, após 144h de inoculação.

Diferenças entre números expressam a diferença significativa entre as médias a nível de 5% pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6)

A Figura 27 mostra o efeito inibitório da nanoemulsão de *Copaifera* sp. sobre *A. fumigatus* após 168 h de inoculação.

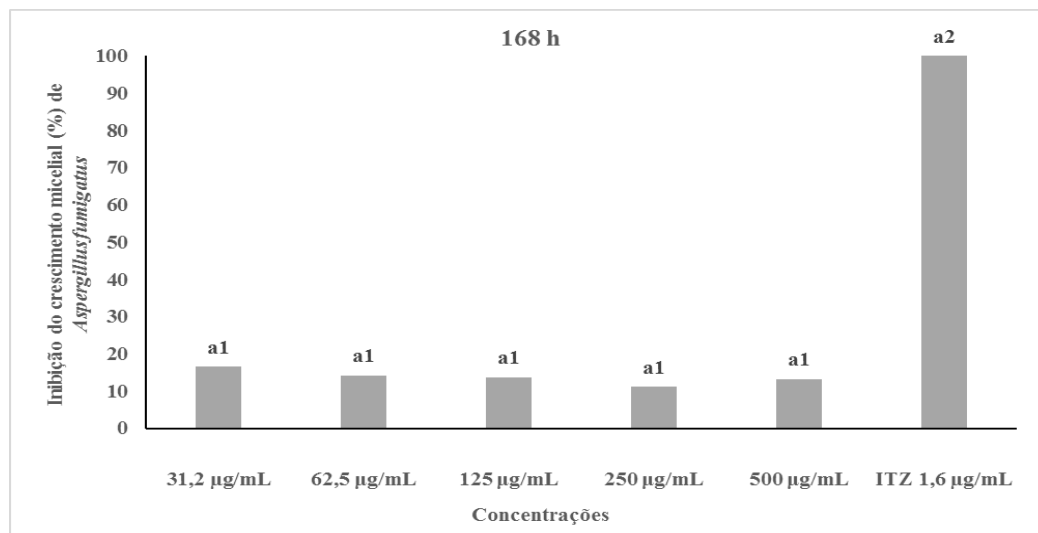


Figura 27. Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo resina de *Copaifera* sp. sobre *fumigatus*, após 168h de inoculação.

Diferenças entre números expressam a diferença significativa entre as médias a nível de 5% pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6) (FERREIRA, 2014)

A Figura 28 mostra o efeito inibitório da nanoemulsão de *Copaifera* sp. sobre *A. fumigatus* após 216 h de inoculação.

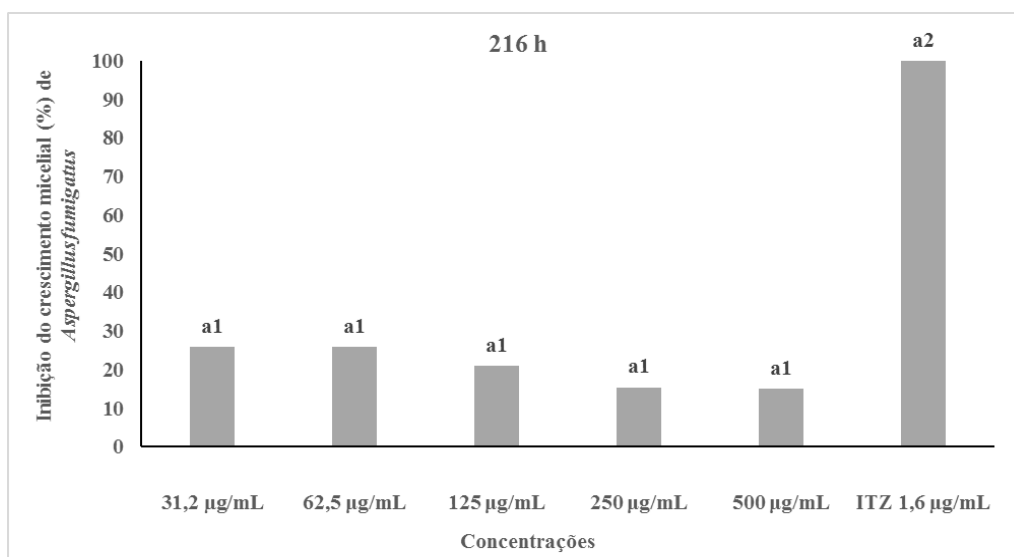


Figura 28. Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo resina de *Copaifera* sp. sobre *A. fumigatus*, após 216 h de inoculação.

Diferenças entre números expressam a diferença significativa entre as médias a nível de 5% pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6) (FERREIRA, 2014)

4. DISCUSSÃO

Neste estudo, o potencial fungitóxico do óleo de copaíba, foi demonstrado através da porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC %) em 60 % sobre *A. nomius*, nas concentrações de (0,1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1,0 µg/mL, 1,5 µg/mL, 2,0 µg/mL, 4,0 µg/mL, 6,0 µg/mL) durante todo o período de desenvolvimento do experimento (72h), assim como o efeito inibitório foi maior sobre *A. nomius*, quando comparado ao antifúngico comercial Itraconazol (concentração 1,6 µg/mL). Enquanto que, o óleo causou 100% de inibição sobre o crescimento micelial de *A. fumigatus*, nas primeiras 24h, reduzindo este efeito para 80% com 48h e 60% com 72h.

Diversas atividades biológicas/farmacológicas foram reportadas em estudos experimentais com óleo de copaíba, entre elas atividades antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória, antileishmanial, antinoceptiva, gastroprotetora, antioxidante (DIEFENBACH et al., 2018; VEIGA-JÚNIOR et al., 2007). A atividade antimicrobiana foi demonstrada em diversas bactérias patogênicas, gram-negativas e principalmente gram-positivas. Santos et al. (2008) utilizando o óleo de copaíba, demonstraram o rompimento da parede celular de *S. aureus* e a remoção da camada-S e proteínas da parede celular em *Bacillus cereus*. Enquanto que, sobre espécies fúngicas, o óleo foi reportado por exercer atividade fungistática, apresentando um MIC entre 0,3-0,6 mg/mL, sobre espécies dos gêneros *Candida*, como *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *Trichophyton* e *Aspergillus*; sendo que dentro do gênero *Aspergillus*, a atividade fungistática foi reportada sobre as espécies *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* (SANTOS et al. 2008; DEUS et al 2011) e especificamente sobre *A. fumigatus* (TOBOUTI et al., 2017).

Embora Tobouti et al. (2017) e Selestino et al. (2017), tenham atribuído à atividade fungistática, do óleo resina de copaíba, como inibidor do fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus*, ao sesquiterpeno β-cariofileno, principal componente deste óleo, Diefenbach et al (2018), atribuiu esta atividade, à natureza lipofílica deste óleo, lipofilicidade essa que favorece uma interação entre os componentes do óleo e os lipídios da parede e membrana celular fúngica, interferindo na sua permeabilidade e causando mudanças estruturais, o que provavelmente possa ter acontecido com *A. nomius* e *A. fumigatus*, neste estudo.

De acordo com Tobouti et al. (2017), o mecanismo de ação da copaíba, é um campo que deveria ser amplamente estudado, visto que ela é ainda mal explorada e suas propriedades fisicoquímicas e biológicas, desconhecidas. O óleo de copaíba é composto predominantemente dos sesquiterpenos, β-bisaboleno, Z-αbergamoteno e β-cariofileno, segundo Fonseca et al. (2015) e dos diterpenos, ácidos copálico, polialtico, hardwickic,

kaurenóico e ent-kaurenóico, com atividade antimicrobiana sobre fungos e bactérias, de acordo com Leandro et al. (2012); Souza et al. (2011); Goren et al. (2011) e Souza et al. (2010). Embora, Tobouti et al. (2017) e Selestino et al. (2017), citem como seu maior componente, o β -cariofileno, apresentando atividade antifúngica sobre *A. fumigatus*.

É importante notar que nem todos os testes antimicrobianos foram desenvolvidos com o composto isolado do óleo de copaíba. Muitos estudos, usam estas substâncias isoladas de outras plantas ou compostos adquiridos comercialmente. O que reforça a necessidade de mais estudos usando os componentes do óleo de copaíba para esclarecer o mecanismo de ação em microrganismos, bem como a necessidade de se estudar a combinação entre os compostos os quais poderiam explicar a forte atividade do óleo cru (TOBOUTI et al., 2017).

Outro estudo realizado neste trabalho, utilizou uma nanoemulsão formada em água, misturada em surfactante hidrofílico Tween 80 e o óleo resina de *Copaifera* sp., obtendo-se uma nanoemulsão (O/A) azulada e transparente com tamanhos de gotículas variando entre $132,9 \pm 0,8544$ e $144,5 \pm 1,852$, entre 0 dias e 7 dias. Sendo que no primeiro dia, apresentou um tamanho de gotícula de $137,0 \pm 0,8622$ e polidispersão de $0,298 \pm 0,003$. O tamanho da gota de nanoemulsão foi medido pela dinâmica de dispersão de luz. A nanoemulsão preparada, apresentou alta estabilidade cinética por 7 dias, sem separação de fases, sedimentação ou cremação, encontrando-se assim, dentro dos parâmetros estabelecidos por Rodrigues et al. (2014). Este autor, obteve 31 nanoemulsões com tamanho de gotículas variando de $11,5 \pm 0,2$ nm a $257,3 \pm 4,107$ nm após um dia de preparação, delineando uma região de nanoemulsão. A qual, foi importante para subsidiar estudos com o óleo resina de copaíba, desde que os tipos de formulações pudessem ser obtidos com composições dentro desta zona.

Nanoemulsões são referidas como miniemulsões ou ultra emulsões (FORGUIARINI et al., 2000; SOLÉ et al., 2006) e tem tamanho médio de gotículas variando de 20 a 200 nm (SOLÉ et al., 2012). Apesar do fato de nanoemulsões não serem termodinamicamente estáveis (FORGIARINI et al., 2000; OSTERTAG et al., 2002), elas são cineticamente estáveis (BRUXEL et al., 2012) e apresentam por longo tempo estabilidade física (SOLÉ et al., 2006). Além disso, pequenas gotas podem ser alcançadas mesmo em concentrações relativamente baixas de surfactante (SOLÉ et al., 2012). Possuem uma gama de vantagens, tais como o aumento da solubilidade de substâncias pouco solúeis em água, incluindo produtos naturais fungicidas (ALENCAR et al., 2015).

Neste estudo, verificou-se que a melhor ação inibitória da nanoemulsão do óleo de copaíba, sobre *A. nomius*, foi na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$, o que pode ser demonstrado através de fotomicrografia utilizando-se a microscopia de varredura (Figura 19). Enquanto

que, sobre *A. fumigatus*, esta ação ocorreu quando da aplicação das concentrações de 31,2 µg/mL e 62,5 µg/mL.

De acordo com Alencar et al. (2015), emulsões nanoestruturadas baseadas no óleo resina e essencial de copaíba melhoraram a atividade antimicrobiana de óleos puros, especialmente sobre *Staphylococcus* e *Candida*, resistentes a azoles. Em seu estudo, o autor conseguiu através da análise de CG-MS, identificar os componentes do óleo resina e essencial de copaíba. O ensaio de MIC, associado com a autobiografia revelou que alguns ésteres dos ácidos oleico e palmítico, α -curcumene, α -himachalene, isothujol e α -fenchene, provavelmente tenham inibido algumas destas linhagens, o que poderia ter acontecido, sobre *A. nomius* e *A. fumigatus*, avaliados neste estudo.

Nanoencapsulações têm melhorado também, a atividade antifúngica do óleo de copaíba, reforçadas pela presença de alantoína. Onde as MICs obtidas, foram comparáveis às dos produtos comerciais e apresentaram-se promissoras na terapêutica de infecções cutâneas causadas por leveduras e dermatófitos, como *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *T. rubrum* e *M. canis* (SVETLICHNY et al., 2015).

O desenvolvimento de uma nanoemulsão com o óleo resina de copaíba é também importante, para a estabilidade de β -cariofileno. Uma reduzida degradação de cariofileno proveniente de uma nanoemulsão, foi observada no óleo resina de copaíba, disperso através de uma fase interna após a hidrólise ácida, exposição a condições de irradiação UV-A, oxidativa (H₂O₂) e termolítica (60°C), quando comparada ao conteúdo de β -cariofileno, após a exposição nas mesmas condições (DIAS et al., 2012).

Diferente de outros óleos medicinais tais como o óleo de Melaleuca para o qual, os componentes estão presentes em uma proporção definida e bem estabelecida pelo Comitê Científico sobre Produtos Consumidos (2004) (TOBOUTI et al., 2017), o óleo de copaíba não apresenta um parâmetro para sua composição aprovado por este comitê. Assim, a falta de padronização para cada espécie de copaíba e entre as mesmas espécies, impede o agrupamento de trabalhos desenvolvidos e de resultados apropriados das atividades deste óleo (SILVA et al., 2016)

5. CONCLUSÃO

Verificou-se que tanto o óleo quanto a nanoemulsão do óleo de *Copaifera* sp., foram potencialmente inibidores do crescimento micelial dos fungos *Aspergillus nomius* e *A. fumigatus*. Embora, o óleo de *Copaifera* sp. adicionado de Tween 20, tenha apresenta maior

efeito inibitório sobre o crescimento micelial destas espécies fúngicas, provavelmente pelo fato das concentrações utilizadas nas emulsões preparadas com o óleo, tenham sido muito menores do que as concentrações utilizadas no preparo das nanoemulsões com o mesmo óleo.

6.REFERÊNCIAS

- ALENCAR, E. N. XAVIER-JÚNIOR, F, H. MORAIS, A. R. DANTAS, T. R. VERISSIMO, L. M. REHDER, V. L. CHAVES, G. M. OLIVEIRA, A. G. EGITOL, E. S. Chemical Characterization and Antimicrobial Activity Evaluation of Natural Oil Nanostructured Emulsions. *J Nanosci Nanotechnol*. 2015 jan; 15 (1): 880-8.
- ARRUS, K.; BLANK, G.; CLEAR, R.; HOLLEY, R.A.; ABRAMSON, D. Microbiological and aflatoxin evaluation of Brazil nut pods and the effects of unit processing operations. *J. Food Prot.* 2005, 68:1060-1065.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., LIPMAN, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- BAQUIÃO, A.C.; ZORZETE, P.; REIS, T.A.; ASSUNÇÃO, E.; VERGUEIRO, S.; CORREA, B. Mycoflora and mycotoxins in field samples of Brazil nuts. *Food Control* 2012, 28: 224-229. 2012
- BAQUIÃO, A.C.; OLIVEIRA, M.M.M.; REIS, T.A.; ZORZETE, P.; ATAYDE, D.D.; CORREA, B. Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. *Food Chem.*, 139:1127-1132. 2013.
- BAYMAN, P.; BAKER, J.; MAHONEY, N. *Aspergillus* on tree nuts. *Mycopathologia*, 2002, 155: 161-169.
- BRAGA, W.F.; RESENDE, C.M.; ANTUNES, O.A.C.; PINTO, A.C. - Terpenoids from *Copaiba cearensis*. **Phytochemistry**, 1998, 49: 263-264.
- BRUXEL, F.; LAUX, M.; WILD, L.B.; FRAGA, M.; KOESTER, L.S.; TEIXEIRA, H.F. Nanoemulsões como sistemas de liberação parental de fármacos. *Química Nova*. 35, 1827-1840. 2012.
- CALDERARI, T.O.; IAMANAKA, B.T.; FRISVAD, J.C.; PITT, J.I.; SARTORI, D.; PEREIRA, J.L.; FUNGARO, M.H.P.; TANIWAKI, M.H., 2013. The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in Brazil nuts: from rainforest to consumer. *Int. J. Food Microbiol.* 2013, 160:267-272.
- CAMARGO, M.F.P. Desenvolvimento de nanoemulsão à base de óleo de maracujá (*Passiflora edulis*) e óleo essencial de lavanda (*Lavandula officinalis*) e avaliação da atividade antiinflamatória tópica, Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008,
- CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. *Phytochemistry* 2000., 55, 773-778.
- DENNING, D.W.; STEVENS, D.A., 1990. Antifungal and surgical treatment of invasive aspergillosis: review of 2121 published cases. *Rev. Infect. Dis.* 12, 1147–1201.

- DEUS, R.; ALVES, C.; ARRUDA, M. Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). Rev. Bras. Pl. Med. 13 (1) (2011) 1-7.
- DIAS, J. S. A.; BACELAR, H. C. S.; FERREIRA, S. B.; VASCONCELOS, C. C. Incidência de Hyphomycetes (Fungos anamorfos) associados à castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Humbl & Bompl.) em área de floresta na reserva extrativista do Rio Cajari, AP. 2º Congresso Amapaense de Iniciação Científica da UEAP, UNIFAP, IEPA e Embrapa Amapá, 6º Mostra de TCC's, Macapá, AP. 22 a 25/11/2011.
- DIAS, D. O.; COLOMBO, M.; KELMANN, R. G.; SOUSA, T. P.; BASSIANI, V. L.; TEIXEIRA, H. F.; VEIGA-JÚNIOR, V. F.; LIMBERGER, R. P.; KOESTER, L. S. optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of β -cayophyllene in a nanoemulsion dosage form prepared with copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil. Anal. Chim. Acta. 721, 79-84. 2012.
- DIEFENBACH, A. L. *et al.* Antimicrobial activity of copaiba oil (*Copaifera* spp.) on oral pathogens: Systematic review. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 4, p. 586–596, 2018.
- FARNSWORTH, N.R. Biological and phytochemical screening of plants. Journal of Pharmaceutical Science, v.55, n.3, p.225-76, 1996.
- FERNANDEZ, P.; ANDRÉ, V.; RIEGER, J.; KUHNLE, A. Nanoemulsions formation by emulsions phase inversion. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, Amsterdam, v. 251, p. 53-58. 2004.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiples comparisons. Ciênc. Agrotec. [on line]. 2014, v. 38, n. 2, pp. 109-112. Disponível em: ISSN 1413-7054. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>.
- FREIRE, F.C.O.; KOZAKIEWICZ, Z.; PATERSON, R.M. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. Mycopathologia, 149: 13-19. 2000.
- FONSECA, R.G; BARROS, F.M.; APEL, M.A; POSER, G.L; ANDRIOLLI, J.O; FILHO, P.C; SOUZA, D.F; LOBO, I.P; O.A. Conceic, Physicochemical and antimicrobial properties of copaiba oil: implications on product quality control, Acta Sci. Pol. Technol. Aliment. 14 (3): 215-225. 2015.
- FORGIARINI, A.; ESQUEMA, J.; GONZALEZ, C.; SOLANS, C. 2000. Studies of the relation between phase behavior and emulsification methods with nanoemulsion formation. Prog. Coll. Pol. Sci. S. 115, 36-39.
- GONÇALVES, S. S; STCHIGEL, A. M.; CANO, J. F.; GODOY-MARTINEZ, P. C, Colombo, A. L.; Guarro, J: *Aspergillus novoparasiticus*: a new clinical species of the section Flavi. Med Mycol., 50:152–160. 2012.
- GOREN A.C; PIOZZI F; AKCICEK E; KLHÇ T; ÇANKÇL S; MOZIO _GLU E; SETZER W.N. Essential Oil composition of twenty-two Stachys species (mountain tea) and their biological activities, Phytochem. Lett. 4(4): 448-453. 2011.
- HONG, S. B., CHO, H. S., SHIN, H. D., FRISVAD, J. C., SAMSON, R. A. Novel Neosartorya species isolated from soil in Korea. International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology 56: 477–486. 2006.
- IAMANAKA, B. T.; NAKANO, F.; LEMES, D. P.; FERRANTI, L. S.; TANIWAKI, M. H. Aflatoxin evaluation in ready-to-eat Brazil nuts using reversed phase liquid chromatography and post column derivatisation. Food Addit. Contam. A. 2014, 31: 917-923. 2014.

- KOSHI, G.; CHERIAN, K. M. 1995. *Aspergillus terreus*, na uncomon fungus causing aortic root abcess and pseudoaneurysm. Indian Heart Journal, v. 47, p. 265-7. 1995.
- LEANDRO LM.; VARGAS F. DE S.; BARBOSA P.C; NEVES J.K; DA SILVA J.A; DA VEIGA JUNIOR V.F. Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins, Molecules 17(4):3866—3889. 2012.
- LOPES, A. J; JANSEN, U.; CAPONE, D.; JANSEN, J. M. Aspergiloses pulmonares. Pulmão RJ, 13(1): 257-67. 2004.
- MASSI, F. P.; VIEIRA, M. L. C.; SARTORI, D.; PENHA, R. E. S.; MUNHOZ, C. F.; FERREIRA, J. M.; IAMANAKA, B.T.; TANIWAKI, M.H.; FRISVAD, J.C.; FUNGARO, M.H.P. Brazil nuts are subject to infection with B and G aflatoxin-producing fungus, *Aspergillus pseudonomius*. Int. J. Food Microbiol. 186:14-21. 2014.
- MENESALVAS, A.; BOUZA, E. Infective endocarditis caused by unusual microorganisms. Revista Especializada em Cardiologia, v.51, n.2, p.79-85, 1998.
- MYLONAKIS, E.; CALDERWOOD, S. B. Infective endocarditis in adults. The New England Journal of Medicine, 345:1318-30, 2001.
- OHSAKI, A; YANA, L.T; ITO, A .S; EDATSUGIB, H; IWATAB, D; KOMODA, A. Y. The Isolation and in vivo Potent Antitumor Activity of Clerodane Diterpenoid from the Oleoresin of the Brazilian Medicinal Plant, *Copaifera Langsdorffii* Desfon. Biorganic & Medicinal Chemimy Letters, 24(4):889-2892, 1994.
- OLIVEIRA, J.M; NUNES, C. P.; OLIVEIRA, P. C. Aspergilose. In: Siqueira-Bastista R, Gomes, A.P; Santos, S.S; Almeida, L.C; Figueiredo, C.E.S. Pacheco, S.J.B. Manual de infectologia. Rio de Janeiro: Revinter; p.461-4. 2002.
- OLSEN, M.; JOHNSON, P.; MOLLER, T.; PALADINO, R.; LINDBLAD, M.: *Aspergillus nomius*, an important aflatoxin producer in Brazil nuts? World Mycotoxin J., 1:123-126. 2008.
- OSTERTAG, F.; WEISS, J.; McCLEMENTS, D. J. Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. J. Colloid Interf. Sci. 388: 95-102. 2012.
- PAIVA, L.A.F.; RAO, V.S.N.; GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimetal gastric ulcer models in rats. J. Ethnopharmacol., 62:73-78. 1998.
- PAIVA, P. M; GUEDES, M C ; FUNI, C. Forest Ecology and Management, 261:508-514. 2011. journal homepage: www.elsevier.com/locate/foreco
- PIERI, F.A; MUSSI, M.C.; MOREIRA, M.A.S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.11, n.4, p.465-472. 2009.
- PINTO, A.C.; BRAGA, W.F.; REZENDE, C.M.; GARRIDO, F.M.S.; VEIGA, V.F. JR.; BERGTER, L.; PATITUCCI, M.L.; ANTUNES, O.A.C. Separation of Acid Diterpenes of *Copaifera cearenses* Huber ex Ducke by flash chromatography using potassium hydroxide impregnated silics gel. J. Braz. Chem. Soc. 11:355-360. 2000.
- PITT, J. L; HOCKING, A. D. FUNGI AND SPOILAGE. EDITION. NEW YORK, SPRINGER, 2009.

RECIO, M.C.; RIOS, J.L.; VILLAR, A. A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988. *Phytotherapy Research*, 4(3):117-25. 1989.

REIS, T. A.; OLIVEIRA, T. D.; BAQUIÃO, A. C.; GONÇALVES, S. S.; ZORZETE, P.; CORRÊA, B.: Mycobiota and mycotoxins in Brazil nut samples from different states of the Brazilian Amazon region. *Int J Food Microbiol.* 2012, 159:61–68.

RODRIGUES, E. A. C. Infecções hospitalares: prevenção e controle. São Paulo: Sarvier. 28p. 1997.

SAJJADI, S.; ZERFA, M.; BROOKS, B.W. 2003. Phase inversion in p-xylene/water emulsions with the non-ionic surfactant pair. Sorbitano monolaurate/ polyoxyethylene sorbitano monolaurate (Span 20/tween 20). *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 252, p.27-32, 2003.

SANTOS A.O; UEDA-NAKAMURA T; DIAS FILHO T; VEIGA JUNIOR V.F; PINTO A.C; NAKAMURA C.V. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus, *Mem. J.* 103(3):277-281. 2008.

SCHMIDT-HEYDT, M., HÄCKEL, S., RÜFER, C.E. ET AL. *MYCOTOX. RES.* 25: 141. 2009. <https://doi.org/10.1007/s12550-009-0019-x>

SELESTINO NETA, M.C; VITTORAZZI, C; GUIMARÃES, A.C; MARTINS, J.D.L.; FRONZA, M; ENDRINGER, D.C; SCHERER, R. Effects of β -caryophyllene and *Murraya paniculata* essential Oil in the murine hepatoma cells and in the bacteria and fungi 24-h time-kill curve studies, *Pharm. Biol.* 55(1):190-197. 2017.

SILVA, M.T.D. Physicochemical Characterization of *Copaifera Multijuga* Hayne Oil Resins and Evaluation of the Chemical Variability of Their Volatile Fraction, *Pharmacology, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brazil*, pp. 75. 2016.

SOLANS, C. Nanoemulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, n. 10, p. 102-110, 2005.

SOLE, I.; MAESTRO, A.; PEY, C.M.; GONZALEZ, C.; SOLANS, C.; GUTIERREZ, J.M. 2006. Nano-emulsions preparation by low energy methods in an ionic surfactant system. *Colloid. Surface. A* 288, 138-143.

SOLE, I.; SOLANS, C.; MAESTRO, A., GONZALEZ, C.; GUTIERREZ, J.M. Study of nano-emulsion formation by dilution of microemulsions. *J. Colloid Interf. Sci.* 376, 133-139. 2012.

SOUZA A.B; DE SOUZA M.G.; MOREIRA MA; MOREIRA M.R; FURTADO N.A; MARTINS C.H; BASTOS J.K; R.A. DOS SANTOS, V.C. HELENO, SR. AMBROSIO, R.C. VENEZIANI, Antimicrobial evaluation of diterpenes from *Copaifera langsdorffii* oleoresin against periodontal anaerobic bacteria, *Molecules* 16(11):9611-9619. 2011.

SOUZA, P.A; RANGEL, LP; OIGMAN, S.S.; ELIAS, M.M; FERREIRA-PEREIRA, EA.; DE LUCAS, N.C.; LEITÃO, G.G. Isolation of two bioactive diterpenic acids from *Copaifera glycyarpa* oleoresin by high-speed counter-current chromatography, *Phytochem. Anal.* 21(6):539-543. 2010.

STEVENS D. A. Aspergilose In: Goldmam, L.; Bennett, J.C.; Drazen, J.M.; Gill, G.N.; Kokko, J. P; Mandell, G.L; Porruel, D. W; Schafer, A.I. *Cecil tratado de medicina interna.* 21a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 2092-94. 2001.

SVETLICHNY G, KÜLKAMP-GUERREIRO IC, CUNHA SL SILVA FE BUENO K, POHLMANN AR, FUENTEFRIA AM GUTERRES SS. Pharmazie. Solid lipid nanoparticles containing copaiba Oil and allantoin: development and role of nanoencapsulation on the antifungal activity. Mar. 70(3):155-64. 2015.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. Advances in Colloid and Interface Science, Oxford, v. 108-109, p. 303-318. 2004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.023>

THOMIDIS, T.; FILOTHEOU, A. Evaluation of five essential oils as bio-fungicides on controlo f *Pilidiella granati* rot in pomegranate. Crop Protection. 89:66-71. 2016.

TOBOUTI, P. L.; DE ANDRADE MARTINS, T. C.; PEREIRA, T. J.; MUSSI, M. C. M. Antimicrobial activity of copaiba oil: A review and a call for further research. Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 94, p. 93–99, out. 2017.

VEIGA-JUNIOR, V. F; ROSAS, E.C; CARVALHO, M.V; HENRIQUES, M.G; PINTO, A.C; chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *copaifera cearensis* huber ex ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne-a comparative study, J. Ethnopharmacol. 112(2):248-254. 2007.

VEIGA JÚNIOR, V.F.; PINTO, A.C. O gênero *Copaifera* L. Quím. Nova, 25:273-286. 2002.

VERGHESE, S.; MULLASARI, A.; PADMAJA, P. Fungal endocarditis cardiac surgery. Indian Heart Journal, v.50, p.418-22. 1998.

WHITE, T. J; BRUNS, T. ; LEE, S.; TAYLOR, J. Application and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetc. In PCR protocols: A Guide to methods and applications. Edited by Innis M A; Gelgard DH; Sninsky J J; White T J. New York: Academic Press; p.315-322. 1990.

CAPÍTULO 4

Potencial anti-fúngico do óleo fixo de *Carapa guianensis* Aubl. sobre *Aspergillus nomius* Kurtzman, Horn & Hesseltine e *Aspergillus fumigatus* Fresenius isolados de *Bertholletia excelsa* Humbl. & Bompland

Potencial anti-fúngico do óleo fixo de *Carapa guianensis* Aubl. sobre *Aspergillus nomius* Kurtzman, Horn & Hesseltine e *Aspergillus fumigatus* Fresenius isolados de *Bertholletia excelsa* Humbl. & Bonpland

Jurema do Socorro Azevedo Dias¹, Gláucia E. O. Midorikawa², Maria de L. M. de Sousa³, Brenda Lorena Sanchez-Ortiz⁴, Raphaelle Sousa Borges⁵, Gisele Custódio de Souza⁵, Irlon Maciel Ferreira⁶, Matheus Mercês Ramos⁶, Pedro Henrique da Silva Barata⁶, Adriana Bariani⁷, José Carlos Tavares Carvalho^{1,5}

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Bionorte; Embrapa Amapá, Rodovia J.K., Km 05, 2600, 68.903-419, Macapá, AP, Brasil

²Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, Av. W3 Norte, Ed. Sede 70770-901, Brasília, DF.

³Embrapa Agroindústria de Alimentos – CTAA, Av. das Américas, Guaratiba, RJ, Brasil.

⁴Universidad Nacional do México - UNAM

⁵Laboratório de Pesquisa em Fármacos, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Amapá, Rodovia Juscelino Kubitschek, Km 02, 68902-280 Macapá, AP, Brazil

⁶Laboratório de Biocatálise, Universidade Federal do Amapá, Rodovia Juscelino Kubitschek, Km 02, 68902-280 Macapá, AP, Brasil

⁷Embrapa Amapá, Rodovia J.K., Km 05, 2600, 68.903-419, Macapá, AP, Brasil

RESUMO

A andirobeira (*Carapa guianensis* Aubl.) pertence à família Meliaceae. Conhecida como Andiroba, andiroba-saruba, iandirova, iandiroba, carapá, carapa, nandiroba, é classificada como *C. guianensis* Aublet e pertencente à família Meliaceae. Além de sua atividade antioxidante, outras propriedades importantes são conhecidas. Na medicina tradicional, o óleo é usado para contusões, inflamações, como agente cicatrizante e em casos de infecções por muitos agentes patogênicos, entretanto, a ação antifúngica de *Carapa guianensis* sobre *Aspergillus nomius* e *A. fumigatus* não foi explorada. Assim sendo, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antifúngica do óleo fixo de *Carapa guianensis* Aubl. sobre *Aspergillus nomius* e *Aspergillus fumigatus* isolados de Castanha-da-Amazônia. Neste estudo, foi possível verificar nas condições desenvolvidas, que o óleo fixo de *Carapa guianensis*, causou elevado potencial inibitório sobre o crescimento micelial de *A. nomius* e *A. fumigatus*, nas primeiras 24 h de aplicação (com 4,0 µg/mL e 6,0 µg/mL), não persistindo este resultado nas próximas

48 h e 72 h. Este resultado pode ser comparado também ao antifúngico Itraconazol, o qual inibiu em 40% o crescimento do fungo *A. nomius*, persistindo até as 72 h de avaliação do crescimento fúngico, através da técnica de Poison Food, em meio CYA.

Palavras-chave: Castanha-da amazônia, atividade antifúngica, fungos filamentosos

ABSTRACT

The Andirobeira (*Carapa guianensis* Aubl.) belongs to the family Meliaceae. Known as Andiroba, andiroba-saruba, iandirova, iandiroba, carapá, carapa, nandiroba, it is classified as *C. guianensis* Aublet and belongs to the family Meliaceae. In addition to its antioxidant activity, other important properties are known. In traditional medicine, oil is used for contusions, inflammations, as a healing agent and in cases of infections by many pathogens, however, the antifungal action of *Carapa guianensis* on *Aspergillus nomius* and *A. fumigatus* has not been explored. Therefore, the objective of this study was to evaluate the antifungal activity of the fixed oil of *Carapa guianensis* Aubl. on *Aspergillus nomius* and *Aspergillus fumigatus* isolated from Chestnut-of-Amazonia. In this study, it was possible to verify in the developed conditions that the fixed oil of *Carapa guianensis* caused a high inhibitory potential on the mycelial growth of *A. nomius* and *A. fumigatus* in the first 24 h of application (with 4.0 µg/mL and 6.0 µg/mL), and this result did not persist in the next 48 h and 72 h. This result can also be compared to the antifungal Itraconazole, which inhibited by 40% the growth of the fungus *A. nomius*, persisting until the 72 hours of fungal growth evaluation, using the Poison Food technique in CYA medium.

Key words: Castanha-da-Amazônia, antifungal activity, filamentous fungi.

1. INTRODUÇÃO

A andirobeira, conhecida como Andiroba, andiroba-saruba, iandirova, iandiroba, carapá, carapa, nandiroba, é classificada como *C. guianensis* Aublet e pertencente à família Meliaceae (LORENZI; MATOS, 2002; SOUZA et al., 2006). Em média, essa árvore atinge entre 25 e 35 metros de altura, embora possam chegar a 55 metros; a copa é média e densa, composta por ramos eretos (FERRAZ et al. 2003). Os recursos da andirobeira são suas cascas, madeira e principalmente seu óleo, exportado para a Europa e Estados Unidos. O chá de sua casca é usado na medicina tradicional contra a febre, vermes e bactérias; moída, é usada como

agente cicatrizante. A madeira, resistente ao ataque de insetos, é de excelente qualidade para a construção civil (SHANLEY et al., 2011).

C. guianensis, é encontrada em toda a região da Amazônia brasileira, na América do Sul e no sul da América Central, na Colômbia, Venezuela, Suriname, Guiana Francesa, Peru, Paraguai e nas ilhas do Caribe. É uma espécie bastante plástica, adaptada a diferentes ambientes. No Brasil, é encontrada em toda a bacia amazônica, preferencialmente nas várzeas e áreas alagáveis ao longo dos cursos de água e em terra firme, atingindo menor porte (BOUFLEUER, 2004; SOUZA et al., 2006).

Além de sua atividade antioxidante, outras propriedades importantes são conhecidas. Na medicina tradicional, o óleo é usado para contusões, inflamações, como agente cicatrizante, entre outros (SHANLEY et al., 2011). Experimentalmente, o óleo já apresentou atividade antileishmanial (OLIVEIRA et al., 2018), hepatoprotetiva (NINOMIYA et al., 2016), anti-inflamatória (PENIDO et al., 2005; INOUE et al., 2018), antimalárica (MIRANDA JÚNIOR et al., 2012; PEREIRA et al., 2014), e cicatrizante (ALVES DE SOUZA et al., 2017; SILVA et al., 2015); essa atividade cicatrizante parece ser devido a indução da síntese de colágeno por seus limonóides (MORIKAWA et al., 2018). Não foi encontrado na literatura ensaios sobre sua atividade antibacteriana ou antifúngica. Porém, a atividade antimicrobiana do óleo essencial, bem como os extratos brutos das folhas, obtidos por refluxo das folhas secas com n-hexano, diclorometano e metanol, foi determinado utilizando o ensaio de difusão em disco. A atividade sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 29923 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 foi somente encontrada pelo óleo essencial e o extrato metanólico, a uma concentração mínima inibitória (MIC) de 400 µg/mL e 50 µg/mL (MECCIA et al., 2013).

A toxicidade do óleo (hematotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade) já foi testada em ensaios de micronúcleo e *comet* (MILHOMEM-PAIXÃO et al., 2016). Porém, os resultados mostraram que o óleo não exibiu nenhuma das toxicidades avaliadas, pelo contrário, sua atividade antioxidante tendeu a proteger o DNA de danos moleculares causados por oxidação. Não existe na literatura registros da atividade antifúngica de *Carapa guianensis* sobre *Aspergillus nomius* e *Aspergillus fumigatus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta das amostras de castanha-do-Brasil

As sementes de castanha-da-Amazônia, foram coletadas na Reserva Extrativista do Rio Cajari, Amapá, Amazônia Oriental, Brasil, nas localidades Martins (52°17'30"W; 0°34'36"S), Marinho (52°13'25"W; 0°34'40"S) e Pedra Preta, no município de Laranjal do Jari. O clima da região é do tipo AM, segundo Köppen, apresentando temperatura média anual de 25 °C e precipitação média de 2300 mm, concentrada entre os meses de dezembro e junho. O relevo é muito acidentado e o solo predominante é do tipo latossolo profundo de origem Terciária (PAIVA; GUEDES; FUNI, 2011).

2.2. Isolamento das espécies fúngicas

Os isolados fúngicos 4K7 e 26 Nat, foram obtidos por isolamento indireto em meio DG18 (Peptona, 5g; Glicose, 10g; Fosfato Monobásico de Potássio, 1g; Sulfato de Magnésio, 0,5g; Sulfato de Zinco, 0,01g; Sulfato de Cobre, 0,005g; Dicloran, 0,002g; Cloranfenicol, 0,05g; Clorotetraciclina, 0,05g; Agar, 15g, suplementado com Glicerol, 220g). Após desinfestação em etanol (70% por 5 min.), NaOCl (12500 ppm por 5 min.) e em água destilada esterilizada, inoculou-se quatro fragmentos de amêndoas e cascas de castanha-do-Brasil por placa. Incubando-os por sete dias a 25°C, em fotoperíodo de 12 h no escuro e 12 h no claro (DIAS et al., 2011). Após obtenção dos isolados monospóricos, estes foram enviados ao Laboratório de Fitopatologia da Universidade Nacional de Brasília - UNB, para a realização da taxonomia molecular (SISGEN A5331F0).

2.3. Extração do DNA genômico fúngico

A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com o método de extração descrito por Raeder e Broda (1985) a partir de cultivos líquidos em meio Czapek Yeast Extract medium (CYA) (PITT; HOCKING, 2009) incubados a 28°C, 180 rpm por 3 dias.

2.4. Identidade taxonômica dos fungos

A identidade taxonômica dos isolados fúngicos, foi realizada a partir da análise de sequência da região nuclear ITS1-5, 8S-ITS2 do DNA ribossomal e gene parcial da calmodulina. Cada reação de PCR foi realizada com 10ng de DNA genômico, 2,5 mmol⁻¹ de cada primer, 1 mmol⁻¹ dNTPs, 4mmol⁻¹ MgCl₂, 1 U de Taq Platinum® polymerase (Invitrogen) e 1X Taq Platinum® polymerase buffer (Invitrogen). A região ITS do DNA ribossomal foi amplificada usando os primers ITS5 e ITS4 (White et al., 1990) e a região da

calmodulina amplificada com os primers Cmd5 e Cmd6 (Hong et al., 2006). Os ciclos da PCR foram realizados de acordo com o programa: desnaturação inicial a 94°C por 4 min, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento do primer por 1 min, a 50°C para os primers ITS5 e ITS4, e a 60°C para os primers Cmd5 e Cmd6, extensão a 72°C por 1 min, e uma extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos de PCR foram purificados com ExoSAP-IT® (USB, Cleveland, Ohio, USA) e sequenciados usando Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing chemistry (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) no ABI 3700 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A identificação molecular foi realizada por meio de comparação das sequências no banco de dados NCBI usando o algoritmo BLASTn (ALTSCHUL et al., 1990).

2.5. Caracterização dos isolados fúngicos quanto à produção de aflatoxinas.

A caracterização dos isolados fúngicos quanto à capacidade de produção de aflatoxinas, foi realizada de acordo com Schmidt-Heydt et al. (2009). As amostras foram cultivadas em meio semi-sólido indutor para a produção de aflatoxinas, Yeast Extract Sucrose (YES) (20g/L de extrato de levedura; 0,5g/L de MgSO₄.5H₂O; 150g/L de sacarose; 0,1g de ZnSO₄; 0,05g CuSO₄; 15g/L de agar, pH 7,0. A atividade da água (Wa) do meio de cultura foi ajustada com glicerol usando uma mistura de glicerol/água (glicerol/ Wa 10,8 ml/ 0,99 Wa). Os isolados de *A. nomius* e *A. fumigatus*, foram cultivados por 7 dias a 25°C. Após o tempo de cultivo, todo o conteúdo micotoxigênico foi extraído de cada placa colonizada sob agitação constante, em 10 mL de metanol à temperatura ambiente durante 60 minutos.

2.6. Material Botânico de *Carapa guianensis* Aubl.

2.6.1. Coleta e obtenção do óleo de *Carapa guianensis*

O material botânico de *Carapa guianensis* Aubl., foi coletado na APA da Fazendinha, uma UC criada pela Lei nº 0873, em 31 de dezembro de 2004, com uma área de 136,59 ha. Localizada na zona periurbana do município de Macapá, sob as coordenadas 00°03' 10,39" e 051°07'41,78" W (NARDI-SANTOS, 2013). O material encontra-se registrado junto ao Herbário do Instituto Estadual de Pesquisa e Tecnologia do Estado do Amapá – IEPA.

A obtenção do óleo de andiroba, foi realizada por meio do processo artesanal. As sementes foram cozidas e colocadas para repouso penduradas, por 20 a 30 dias, em local coberto e arejado. Em seguida, as sementes foram quebradas à mão e separadas as cascas das amêndoas. As amêndoas foram amassadas até obter-se uma massa rosada e oleosa, de 1 Kg,

colocadas em recipiente de alumínio de maneira inclinada, para escorrimento do óleo (LIRA-GUEDES; NARDI, 2015).

2.7. Atividade antifúngica *in vitro* do óleo fixo de *Carapa guianensis* no controle de *Aspergillus nomius* e *Aspergillus fumigatus*

O teste de fungitoxicidade foi determinado pela técnica de Poison Food (THOMIDIS; FILOTHEOU, 2016) adaptado, utilizando-se o óleo de copaíba, cuja densidade foi de 0,912 g/ml. Preparou-se uma emulsão numa concentração de 20 mg de copaíba para 5 µL de Tween 20, em 1 mL de água destilada, a qual foi adicionada ao meio de cultura Czapeck Yeast Autolysate Agar - CYA (Saccharose, 30 g; Power Yeast Extract, 5 g; K₂HPO₄, 1 g; NaNO₃, 2 g; KCl, 0,5 g; MgSO₄.7H₂O, 0,5 g; FeSO₄.7H₂O, 0,01 g; ZnSO₄.7H₂O, 0,01 g; CuSO₄.5H₂O, 0,005; Cloranfenicol, 0,1 g; agar, 20 g; água destilada, 1 L), (PITT; HOCKING, 2009) adaptado, autoclavado por 20 minutos a 121 °C. Assim que o meio de cultura atingiu aproximadamente 45°C, adicionou-se a emulsão, homogeneizando-a ao meio com a ajuda de um bastão de vidro. Em seguida, o meio foi vertido nas placas de Petri (20 mL) e após a sua solidificação, realizou-se a inoculação do fungo, retirando-se uma porção do micélio da borda de uma colônia de 3 dias de idade, colocando-a no centro de uma Placa de Petri. Utilizou-se o antifúngico comercial, Itraconazol (marca: Prati; Lote: 16A43N) na concentração de 1,6 µg/mL, como controle positivo e o Tween 20 na concentração de 1,6 µg/ml, como controle negativo. Os tratamentos foram realizados em triplicata e as concentrações utilizadas nos tratamentos foram: T1 (0, 1 µg/ml); T2 (0,5 µg/ml); T3 (1,0 µg/ml); T4 (1,5 µg/ml); T5 (2,0 µg/ml); T6 (4,0 µg/ml); T7 (6,0 µg/ml). O registro do crescimento micelial foi avaliado a cada 24h, 48h e 72h, medindo-se os diâmetros transversal e longitudinal, para a análise do crescimento micelial e do cálculo d Percentagem de Inibição do Crescimento Micelial (% PIC), de acordo com Thomidis e Filotheou (2016).

$$\text{PIC (\%)} = \{(\text{diâmetro da test.} - \text{diâmetro do trat.})/\text{diâm. da test.}\} \times 100$$

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado e a análise estatística, foi realizada através da análise de variância e comparação de médias pelo teste de tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa SISVAR (5.6) (FERREIRA, 2014).

3. RESULTADOS

3.1 Taxonomia molecular das espécies *Aspergillus nomius* e *Aspergillus fumigatus*

As espécies fúngicas, após a identificação e a caracterização por meio da taxonomia morfológica e da biologia molecular, seguidas de sequenciamento, tiveram seus registros efetuados na Coleção micológica do Laboratório de Interação Planta-Praga do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Em relação ao isolado 4K7, a região do BLASTn mostrou 100% identidade com *A. fumigatus*, amostra tipo, ATCC MYA4609 e 99% de identidade com NRRL 6113, isto sendo confirmado através do marcador secundário Calmodulina. Enquanto que o isolado 26NAT, de acordo com o marcador secundário, região da calmodulina e o BLASTn, demonstraram 100% de identidade com *A. nomius*, quando comparado à amostra tipo, NRRL 6552; e de acordo com a região ITS, demonstrou 100% de identidade com *A. nomius*, ao ser comparado à amostra NRRL 6552.

Na tabela 1, a identificação molecular foi realizada por meio de comparação das sequências no banco de dados NCBI usando o algoritmo BLASTn (ALTSCHUL et al., 1990).

Tabela 1. Identificação, origem, taxonomia morfológica e molecular de *A. nomius* e *A. fumigatus* quanto à Análise BLASTn (rDNA ITS), cobertura, E valor, Máxima de identidade, Acesso ao NCBI, usando o algoritmo BLASTn, segundo Altschul et al. (1990).

Identificação Isolado UnB	Origem geográfica	Taxonomia morfológica	BLASTn (rDNA ITS)	Cobertura	E valor	Máxima de Identidade	Acesso ao NCBI
4K7	Lar. do Jari	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	97%	0.0	99%	JX092088.1
26NAT	Lar. do Jari	<i>A. nomius</i>	<i>A. nomius</i>	95%	0.0	99%	AF338647.1

Na Tabela 2, estão citadas as aflatoxinas produzidas por *A. nomius* e *A. fumigatus*, de acordo com a metodologia de Schmidt-Heydt et al. (2009).

Tabela 2. Caracterização dos isolados fúngicos *A. nomius* e *A. fumigatus* quanto à produção de aflatoxinas, de acordo com a metodologia de Schmidt-Heydt et al. (2009).

Área Natanael					Produção de AFLs			
					AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
2	DG18	I2C5PI5	<i>A. nomius</i>	35°C Foto	++	+++	++	++
Área K7					Produção de AFLs			
					AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
26	DG18	I2C4PI4	<i>A. fumigatus</i>	35°C Esc.	+++	+++	+++	++

Legenda: - não produziu; + e ++ houve produção, +++ muito produção. 26NAT e 4K7, isolados utilizados nos testes biológicos.

3.2. Avaliação do potencial fungitóxico *in vitro* do óleo fixo de *Carapa guianensis* no controle de *Aspergillus nomius* e *Aspergillus fumigatus*

3.2.1. Experimento 1. Avaliação do potencial fungitóxico *in vitro* de *C. guianensis* no controle de *Aspergillus nomius*

Considerando-se a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC %) em relação às diferentes concentrações do óleo de *C. guianensis* sobre *A. nomius*, observa-se que a curva de desempenho na avaliação, indica que o maior potencial de inibição ocorreu nas primeiras 24 horas de avaliação, em todas as concentrações. Porém, havendo uma tendência no aumento deste potencial, à medida em que se aumenta a concentração do óleo. Observa-se também que, o tempo de incubação de 48 horas demonstra aparente desempenho, inferior em relação às 24 e 72 horas em todas as concentrações (Figura 1).

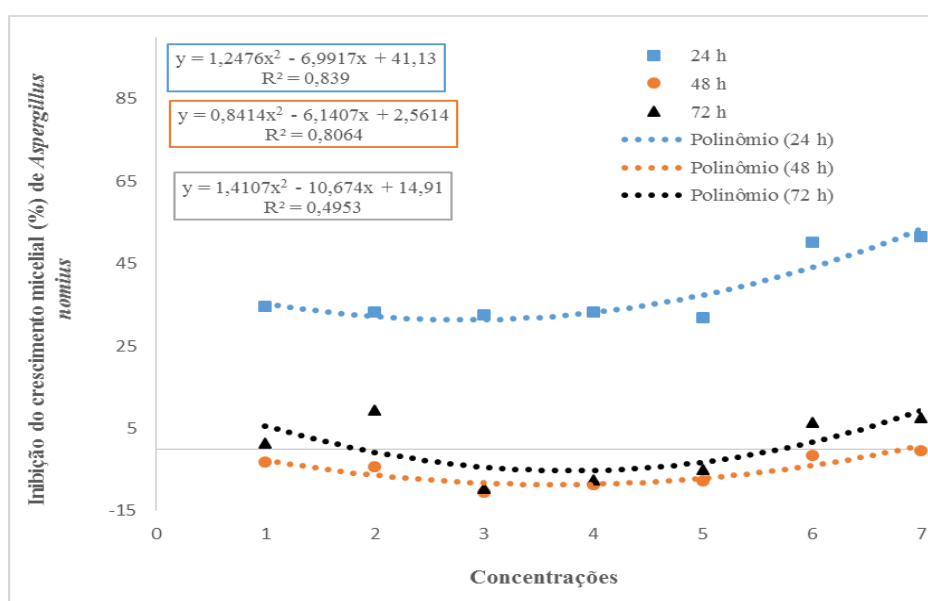


Figura 1. Efeito inibitório do óleo fixo de *C. guianensis* sp. sobre *A. nomius*, nas concentrações de 1 = 0,1 µg/mL; 2 = 0,5 µg/mL; 3 = 1,0 µg/mL; 4 = 1,5 µg/mL; 5 = 2,0 µg/mL; 6 = 4,0 µg/mL; 7 = 6,0 µg/L.

Considerando-se as porcentagens de inibição de crescimento (PIC %) e horas, observa-se que ocorre a diminuição da capacidade de inibição do crescimento micelial de *A. nomius* em todas as concentrações de óleo de andiroba avaliados. Constituindo-se como aspecto importante a ser ressaltado, a eficiência nas primeiras 24 horas das concentrações de 4,0 $\mu\text{g/mL}$ e 6,0 $\mu\text{g/mL}$, reduzindo em maiores proporções o desenvolvimento do fungo; seguido por 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$, contudo todos aparentemente com desempenho inferior a ITZ+DMSO neste intervalo de tempo. As 72 horas de incubação, as concentrações de melhor desempenho foram 0,5; 4,0 e 6,0 $\mu\text{g/mL}$, ressaltando-se que nesta situação todas as concentrações se mostraram mais eficientes que ITZ+DMSO.

Verifica-se a eficiência nas primeiras 24 horas das concentrações de 4,0 $\mu\text{g/mL}$ e 6,0 $\mu\text{g/mL}$, inibindo o crescimento micelial de *A. nomius* em 45%, apresentando-se levemente superior ao efeito do Itraconazol (40%); seguido por 0,1 $\mu\text{g/mL}$ e 0,5 $\mu\text{g/mL}$, contudo todos aparentemente com desempenho inferior a ITZ+DMSO neste intervalo de tempo (Figura 2).

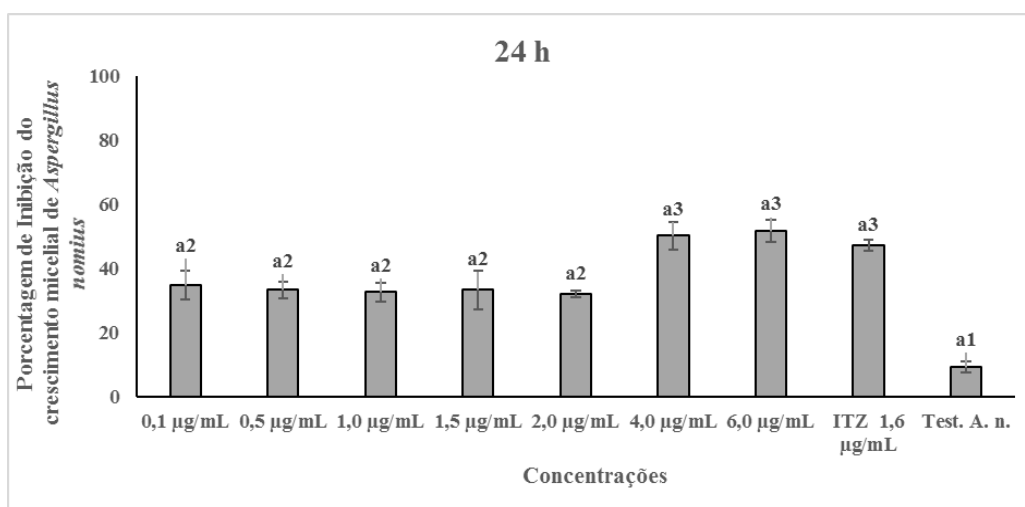


Figura 2. Efeito inibitório do óleo fixo de *C. guianensis* sobre *A. nomius* após 24h de inoculação nas diferentes concentrações.

Diferenças entre números expressam a diferença significativa entre as médias a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6)

A partir das 48 h de incubação, verifica-se um decréscimo demasiado da eficiência do óleo de *C. guianensis* sobre *A. nomius*, em todas as concentrações. Enquanto que, o Itraconazol permaneceu com eficiência de 40%, sobre *A. nomius* (Figura 3).

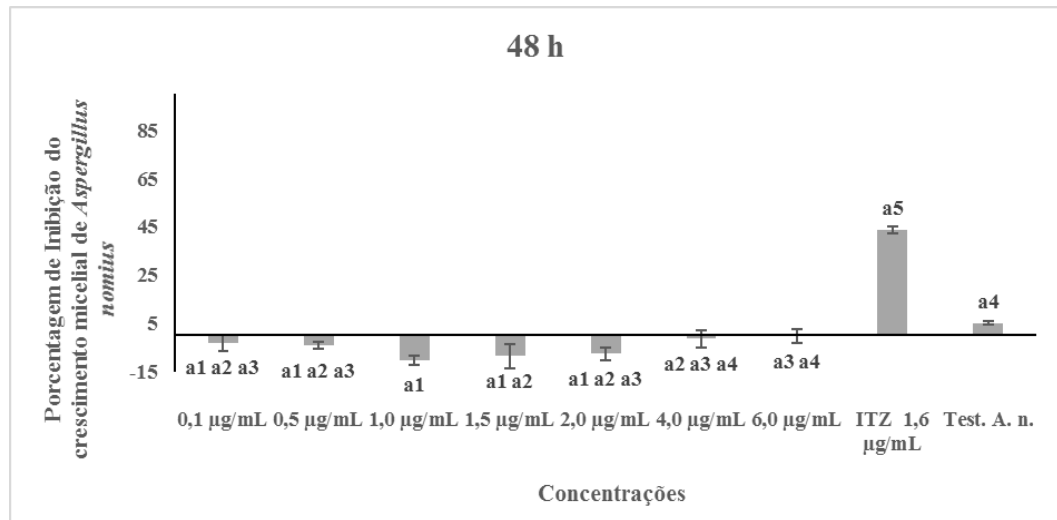


Figura 3. Efeito inibitório das diferentes concentrações do óleo fixo de *C. guianensis* sobre *A. nomius* após 48 horas de inoculação.

Diferenças entre números expressam a diferença significativa entre as médias a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6) (FERREIRA, 2014)

Assim como a partir das 48, às 72 horas de incubação, a eficiência do óleo de *Carapa guianensis*, permaneceu reduzida, não apresentando qualquer ação antifúngica sobre *A. nomius*. Enquanto que, a ação do Itraconazol permaneceu em 40% de eficiência, sobre o fungo em estudo (Figura 4).

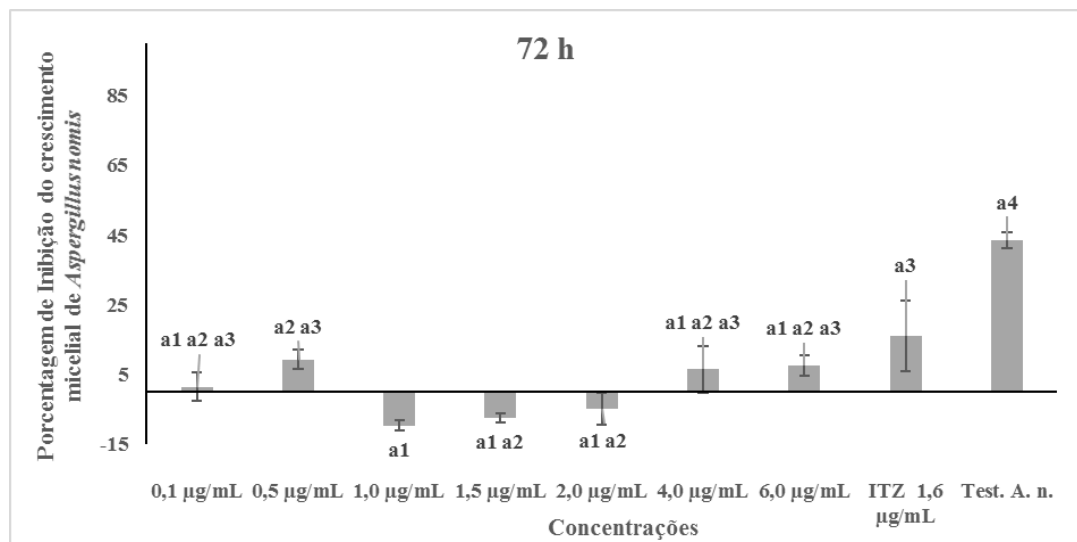


Figura 4. Efeito inibitório do óleo fixo de *Carapa guianensis* sobre *A. nomius* após 72h de inoculação, nas diferentes concentrações.

Diferenças entre números expressam a diferença significativa entre as médias a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6) (FERREIRA, 2014)

3.2.2. Experimento 2: Avaliação do potencial fungitóxico *in vitro* do óleo de andiroba no controle de *Aspergillus fumigatus*

Considerando-se as porcentagens de inibição do crescimento micelial de *A. fumigatus* sob as diferentes concentrações do óleo, verifica-se que a curva de desempenho da avaliação nas primeiras 24 horas de incubação, é superior às demais horas, havendo a tendência de inibição de crescimento de incremento exponencial, enquanto que às 48 e 72 h o incremento apresenta tendência linear, conforme haja aumento da concentração do óleo de andiroba (Figura 5).

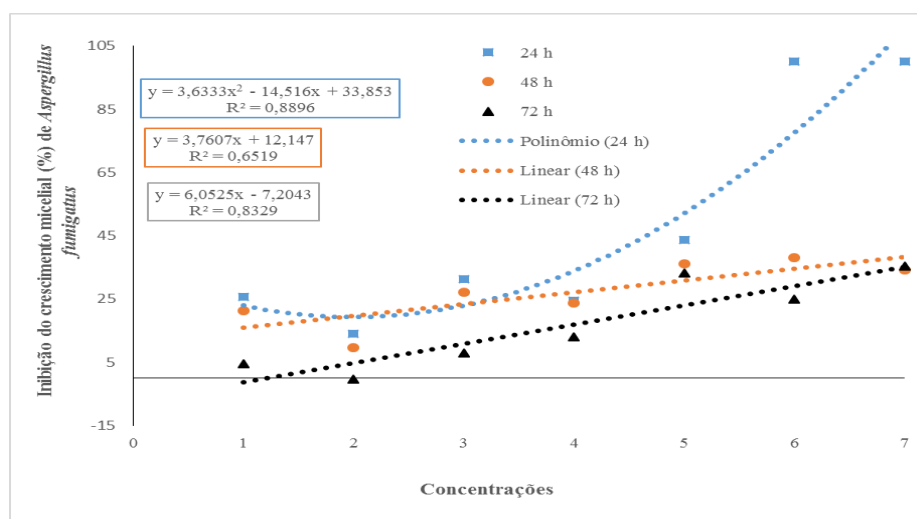


Figura 5. Efeito inibitório do óleo fixo de *Carapa guianensis* sobre *A. fumigatus*, nas diferentes concentrações 1 = 0,1 µg/mL; 2 = 0,5 µg/mL; 3 = 1,0 µg/mL; 4 = 1,5 µg/mL; 5 = 2,0 µg/mL; 6 = 4,0 µg/mL; 7 = 6,0 µg/mL.

Considerando-se as porcentagens de inibição e horas, observa-se a tendência de perda da capacidade de inibição do crescimento micelial de *A. fumigatus* em todas as concentrações de óleo de andiroba avaliados das 24, 48 e 72 horas sucessivamente. Ressaltando-se que a eficiência nas primeiras 48 horas foi superior nas concentrações de 4,0 e 6,0 µg/mL, com maiores porcentagens de inibição, superior inclusive em relação a ITZ+DMSO; seguido por 1,0 e 2,0 µg/mL, mas inferior ao desempenho de ITZ+DMSO neste intervalo de tempo. As concentrações de 0,1; 1,0 e 1,5 µg/mL parentemente não conseguiram inibir de forma efetiva o desenvolvimento do fungo *A. fumigatus*, com desempenhos próximos a testemunha, enquanto que a concentração de 500 µL inexplicavelmente apresentou o pior resultado. Nas 72 horas de incubação, o comportamento de manteve, contudo deve-se ressaltar a concentração de 2,0 e 6,0 µg/mL com tendência a ser mais efetiva que ITZ+DMSO.

A eficiência (95%) do óleo de *Carapa guianensis*, nas primeiras 24 h de incubação, é observada por meio das concentrações de 4,0 µg/mL e 6,0 µg/mL, as quais permitiram se obter maiores porcentagens de inibição sobre o crescimento micelial de *A. fumigatus*, sendo superior inclusive em relação ao Itraconazol (70%). As concentrações de 1,0 µg/mL (30%) e 2,0 µg/mL (45%), também apresentaram eficiência sobre o crescimento micelial do fungo, embora inferiores ao desempenho do antifúngico comercial Itraconazol. As concentrações de 0,1 µg/mL; 1,0 µg/mL e 1,5 µg/mL aparentemente não conseguiram inibir de forma efetiva o desenvolvimento do fungo *A. fumigatus*, com desempenhos próximos à testemunha, enquanto que a concentração de 0,5 µg/mL apresentou o pior resultado (Figura 6).

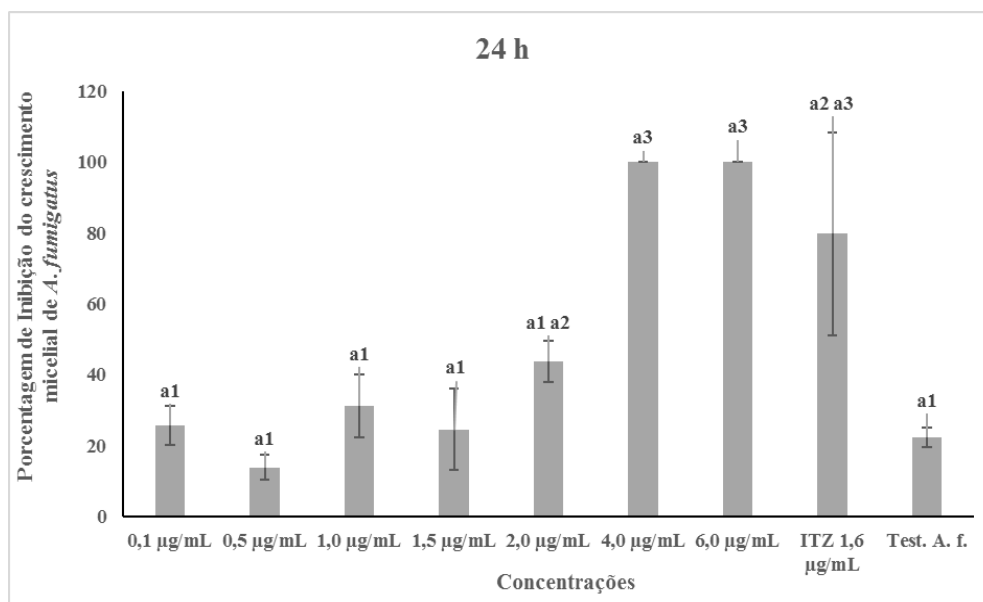


Figura 6. Efeito inibitório do óleo fixo de *Carapa guianensis* (95%) sobre *A. fumigatus*, após 24h de incubação nas diferentes concentrações.

Diferenças entre números expressam a diferença significativa entre as médias a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6)

Observa-se que a partir das 48 horas de incubação do fungo em meio de cultura CYA, ocorre uma tendência em diminuir a capacidade inibitória do óleo de *Carapa guianensis* sobre o crescimento micelial de *A. fumigatus*, inclusive nas concentrações de 4,0 µg/mL e 6,0 µg/mL, antes apresentando maiores eficiências inibitórias sobre este fungo. Verifica-se porém, que a eficiência do Itraconazol também diminui para 40% (Figura 7).

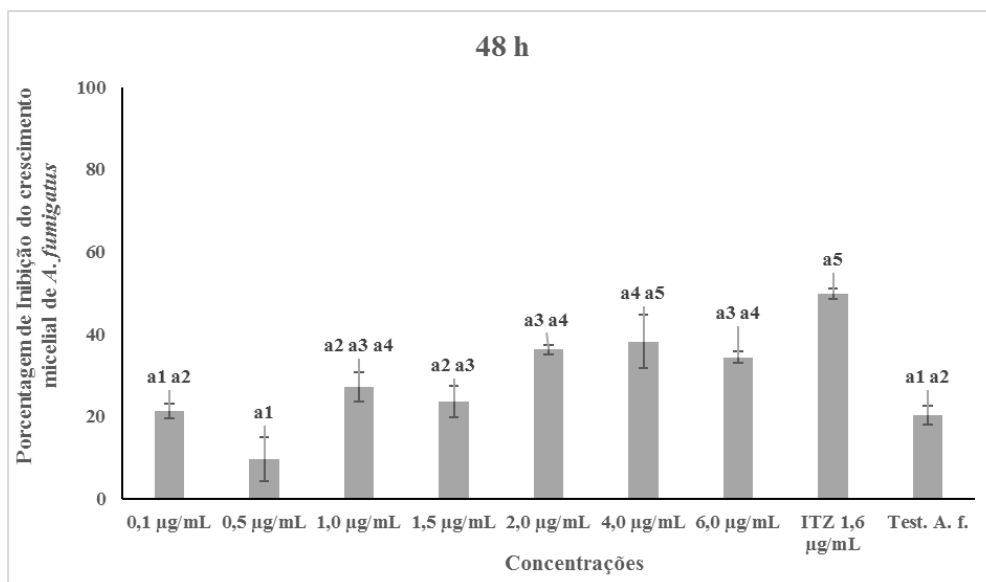


Figura 7. Efeito inibitório do óleo fixo de *Carapa guianensis* sobre *A. fumigatus*, após 48h de inculbação, sob as diferentes concentrações.

Diferenças entre números expressam a diferença significativa entre as médias a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6)

A eficiência do óleo fixo de *Carapa guianensis*, quanto à inibição do crescimento micelial de *A. fumigatus*, a partir das 72 horas de incubação, nas concentrações de 0,1 µg/mL, 1,0 µg/mL, 1,5 µg/mL e 4,0 µg/mL diminuem e com 0,5 µg/mL o óleo deixa de fazer efeito. Enquanto que, nas concentrações de 2,0 µg/mL e 6,0 µg/mL, aparentemente permanecem inalteradas. O Itraconazol também tem seu efeito inibitório reduzido de 45% para 30%. Embora a testemunha, o fungo sem o óleo de *Carapa guianensis*, também tenha seu crescimento micelial afetado por algum fator inerente à ação do óleo de *Carapa guianensis* (Figura 8).

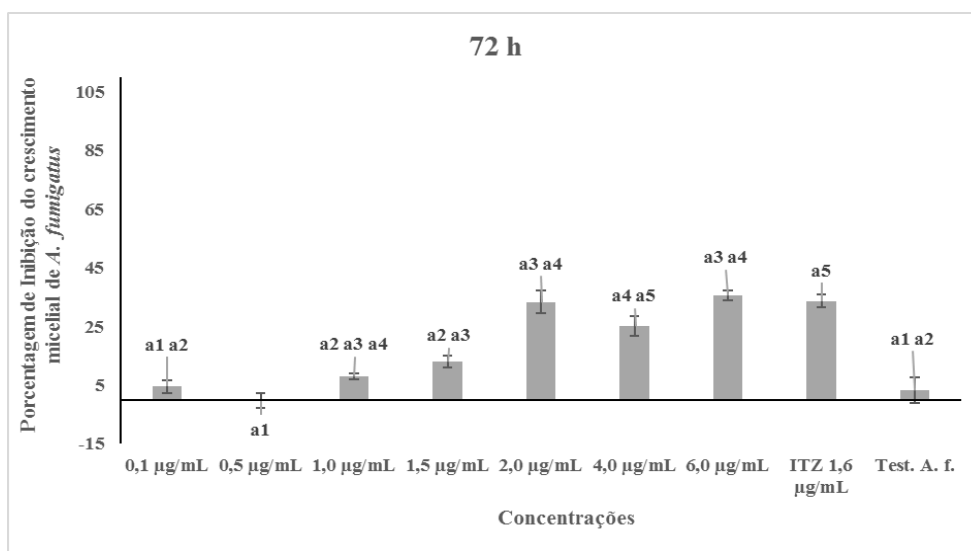


Figura 8. Efeito inibitório do óleo fixo de *Carapa guianensis* sobre *A. fumigatus*, após 72h de inoculação, nas diferentes concentrações.

Diferenças entre números expressam a diferença significativa entre as médias a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6) (FERREIRA, 2014).

4. DISCUSSÃO

Carapa guianensis pertence à família Meliaceae, que é quimicamente diferenciada por sua produção de limonóides, compostos tetranor-triterpenóides altamente oxigenados com uma ampla gama de atividades biológicas (ROY; SARAF, 2006). Compostos desse tipo são encontrados em apenas quatro outras famílias do reino vegetal: Rutaceae, Cneoraceae, Simaroubaceae e Ptaeroxylaceae, onde 1.300 limonóides já foram descritos, com mais de 35 diferentes estruturas de carbono (FANG; HAO, 2011; TAYLOR, 1984). O óleo de semente de *C. guianensis* é composto também de ácido palmítico, oléico e linoleico, além de uma fração insaponificável composta principalmente por limonóides, os quais provavelmente são responsáveis por sua atividade biológica (AMBROZIN; LEITE; BUENO, 2006).

De acordo com Geisson et al. (2019), os óleos de espécies do gênero *Carapa* são amplamente utilizados para o controle de doenças e a produção de cosméticos. Os perfis lipidômicos do óleo das sementes de *Carapa guianensis* e *C. vasquezii* foram caracterizados com ênfase nos principais compostos e suas implicações sinérgicas para a inibição de fungos fitopatogênicos (*Aspergillus flavus*, *A. niger* e *Fusarium oxysporum*). O óleo de *C. guianensis* continha 42,3% de oleato de metilo, 26,0% de palmitato de metilo e 12,5% de ácido oleico como seus principais compostos. O óleo de *C. vasquezii* continha 38,6% de oleato de metilo, 20,5% de palmitato de metilo e 14,5% de ácido oleico. A presença de compostos de ácido mirístico (0,1%), 11-eicosanoato de metila (0,1%), escaleno (0,1%) e β -sitosterol (0,1%) foi a característica especial do óleo de *C. guianensis*. Por outro lado, o ácido araquídico (0,15%) foi encontrado especificamente em *C. vasquezii*. Os óleos de *C. vasquezii* e *C. guianensis* apresentaram efeito deletério sobre os três fungos fitopatogênicos, com valores de IC₅₀ variando de 6,5 a 47,8 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e 19,7 a 71,2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, respectivamente. Os óleos das sementes de *Carapa* tiveram efeitos inibitórios sobre a germinação de conídios de *A. flavus*, *A. niger* e *F. oxysporum*. Os óleos de *C. guianensis* e *C. vasquezii* apresentaram perfis lipidômicos similares para os principais compostos, mas o óleo de *C. vasquezii* apresentou maior porcentagem de ácidos graxos saturados quando comparado a *C. guianensis* e sua inibição sobre *A. flavus*, *A. niger* e *F. oxysporum* sugeriram ações sinérgicas das substâncias no controle de fungos fitopatogênicos.

Neste estudo foi possível verificar, nas condições desenvolvidas, que o óleo fixo de *Carapa guianensis*, causou inibição do crescimento micelial, nas primeiras 24 horas de aplicação (com 4,0 $\mu\text{g/mL}$ e 6,0 $\mu\text{g/mL}$), não persistindo este resultado nas 48 horas e 72 horas seguintes. Este resultado pode ser comparado também ao antifúngico Itraconazol, o qual

inibiu em 40% o crescimento do fungo *A. nomius*, persistindo até as 72 horas de avaliação do crescimento fúngico.

Este óleo fixo também foi aplicado sobre o fungo filamentosos, *A. fumigatus*, alcançando uma eficiência de 95%, nas concentrações de 4,0 µg/mL e 6,0 µg/mL, porém a partir das 48 horas de avaliação, a eficiência deste óleo reduziu para 30%, permanecendo até as 72 horas.

De acordo com Sousa et al. (2017), após realizar a análise física e a avaliação do efeito antifúngico dos óleos de andiroba, copaíba e pinhão-manso, observou que o enriquecimento dos óleos com iodo (I₂) proporcionou aumento da viscosidade. Foi constatada menor densidade para o óleo puro de andiroba e copaíba do que para o enriquecido com 5% de I₂. O incremento de iodo nas soluções propiciou a diminuição de pH nos óleos de andiroba e copaíba, além do aumento do índice de acidez do óleo de andiroba. Para a avaliação da eficiência, os óleos foram enriquecidos com iodo sublimado. No ensaio de toxidez em meio de cultura, para o fungo *Trametes versicolor*, a maior inibição em 20 dias foi para o tratamento com o óleo de andiroba com 1% I₂. Para o fungo *Postia placenta*, a maior inibição foi constatada para o tratamento com óleo de andiroba com 5% de I₂. Foram verificadas menores densidades nos óleos puros de andiroba e copaíba do que nos enriquecidos com 5% de iodo. Verificou-se que houve aumento da viscosidade dos óleos com a adição do iodo, sendo constatado valor de até 385,30 Mpa.s⁻¹ para o óleo de copaíba enriquecido com 5% de I₂. Foi observado também, que quanto maior a concentração de iodo, mais ácida a solução se tornou para o óleo de andiroba. A diminuição do pH das soluções enriquecidas pode ser explicada pelo valor do pH do óleo puro (o I₂, utilizado para o enriquecimento e que também possui caráter ácido). Os valores encontrados para as medidas de pH indicaram que todos os óleos utilizados foram ácidos (pH < 7), com variação de 3,3 a 4,8 para os óleos puros, sendo o óleo de andiroba o mais ácido. Com relação ao índice de acidez dos óleos puros, encontrou-se o menor valor para o óleo de andiroba (68,36 mg KOH.g⁻¹) e o maior para o óleo de copaíba (111,66 mg KOH.g⁻¹). De acordo com alguns autores, o óleo de andiroba quando extraído na forma tradicional, apresenta seu pH mais ácido do que quando extraído por outros mecanismos, a exemplo da prensa. Neste estudo, utilizou-se o óleo de andiroba, extraído de forma artesanal.

Além da atividade antioxidante, do óleo de andiroba, outras propriedades importantes são conhecidas. Na medicina tradicional, o óleo é usado para contusões, inflamações, como agente cicatrizante, entre outros (SHANLEY et al., 2011). Experimentalmente, o óleo já apresentou atividade antileishmanial (OLIVEIRA et al., 2018), hepatoprotetiva (NINOMIYA et al., 2016), anti-inflamatória (PENIDO et al., 2005; INOUE et

al., 2018), antimalárica (MIRANDA-JÚNIOR et al., 2012; PEREIRA et al., 2014), e cicatrizante (ALVES DE SOUZA et al., 2017; SILVA et al., 2015); essa atividade cicatrizante parece ser devido a indução da síntese de colágeno por seus limonóides (MORIKAWA et al., 2018). Não foi encontrado na literatura ensaios sobre sua atividade antibacteriana ou antifúngica. Porém, a atividade antimicrobiana do óleo essencial, bem como os extratos brutos das folhas, obtidos por refluxo das folhas secas com n-hexano, diclorometano e metanol, foi determinado utilizando o ensaio de difusão em disco. A atividade sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 29923 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 foi somente encontrada pelo óleo essencial e o extrato metanólico, a uma concentração mínima inibitória (MIC) de 400 µg/mL e 50 µg/mL (MECCIA et al., 2013).

5. CONCLUSÃO

O óleo de andiroba obtido de forma artesanal, testado neste estudo, apresentou elevado potencial inibitório sobre o crescimento micelial dos fungos *A. nomius* e *A. fumigatus*, porém não foi possível confirmar sua bioatividade sobre as espécies fúngicas, uma vez que apresentou alterações em sua características, perdendo a sua atividade.

6. REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410. 1990.

ALVES DE SOUZA, B. A. et al. Effects of Andiroba oil (*Carapa guianensis*) on wound healing in alloxan-diabetic rats. *International Archives of Medicine*, v. 10, n. October, 28 out. 2017.

AMBROZIN, A. R. P.; LEITE, A. C.; BUENO, F.C. Limonóides do óleo de andiroba e *Cedrela fissilis* e sua atividade inseticida. *Revista da Sociedade Brasileira de Química* . 17 (3): 542-547. 2006.

BOUFLEUER, N. T. Aspectos ecológicos da Andiroba (*Carapa guianensis* Aublet., Meliaceae), visando o seu manejo e conservação. 2004. 86f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Manejo dos Recursos Naturais) – Universidade Federal do Acre-Rio Branco, 2004.

DIAS, J. S. A.; BACELAR, H. C. S.; FERREIRA, S. B.; VASCONCELOS, C. C. Incidência de Hyphomycetes (Fungos anamorfos) associados à castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Humbl & Bompl.) em área de floresta na reserva extrativista do Rio Cajari, AP. 2º Congresso Amapaense de Iniciação Científica da UEAP, UNIFAP, IEPA e Embrapa Amapá, 6º Mostra de TCC's, Macapá, AP. 22 a 25/11/2011.

FANG X., YT DI, HAO XJ Os avanços na química limonoid da família meliaceae. *Química Orgânica Atual* . 2011; 15 (9): 1363-1391. doi: 10.2174 / 138527211795378254. [[CrossRef](#)

- FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiples comparisons. Ciênc. Agrotec. [on line]. 2014, v. 38, n. 2, pp. 109-112. Disponível em: ISSN 1413-7054. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>.
- FERRAZ, I.; CAMARGO, J. L.; SAMPAIO, P. DE T. B. Andiroba – *Carapa guianensis* Aubl. *Carapa procera* D. C. Meliaceae. In: FERRAZ, I.; CAMARGO, J. L.; SAMPAIO, P. DE T. B. (Eds). Manual de sementes da Amazônia. Manaus: INPA, 2003. V. 1, p. 1-2.
- GEISSON, O. N.; DIEGO, P. S.; SANTOS, A. S.; BATISTA, J. F.; RATHINASAPATHI, B.; GAGLIARDI, P.R.; GONÇALVES, J.F.C. Perfis lipídômicos do óleo de semente de *Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa vasquezii* Kenfack e implicações para o controle de fungos fitogênicos. Colheitas Industriais e Produtos. Volume 129 , março de 2019, páginas 67-73.
- INOUE, T. *et al.* Carapanosins D—F from the Seeds of Andiroba (*Carapa guianensis*, Meliaceae) and Their Effects on LPS-Activated NO Production. *Molecules*, 7(23):1778, 19 jul. 2018.
- LIRA-GUEDES, A. C; NARDI M. Guia prático para o manejo sustentável de andirobeiras de várzea e para a extração do óleo de suas sementes. - Brasília, DF:Embrapa, 2015. 24 p.: il.; 21 cm x 23 cm. ISBN: 978-85-7035-500-3
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais na Amazônia. Nova Odessa, (SP): Instituto Plantarum, 2002. 512p.
- MECCIA, G. QUINTERO, P. ROJAS, L. B. *et al.* Chemical composition of the essential oil from the leaves of *Carapa guianensis* collected from Venezuelan Guayana and the antimicrobial activity of the oil and crude extracts. *Natural product communications*, 11(8):1641-1642, 2013.
- MILHOMEM-PAIXÃO, S. S. R. *et al.* The lipidome, genotoxicity, hematotoxicity and antioxidant properties of andiroba oil from the Brazilian Amazon. *Genetics and Molecular Biology*, 2(39):248-256. 2016.
- MIRANDA-JÚNIOR, R. N. C. *et al.* Antiplasmodial activity of the andiroba (*Carapa guianensis* Aubl., Meliaceae) oil and its limonoid-rich fraction. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 142, n. 3, p. 679-683, ago. 2012.
- MORIKAWA, T. *et al.* Collagen synthesis-promoting effects of Andiroba oil and its Limonoid constituents in normal human dermal fibroblasts. *Journal of Oil Science*, v. 67, n. 10, p. 1271-1277, 2018.
- NARDI-SANTOS, M. Conhecimento ecológico local sobre as andirobeiras e a extração artesanal do óleo de andiroba em uma área de proteção ambiental, floresta de várzea periurbana. / Mariane Nardi-Santos; orientadora Helenilza F. Albuquerque Cunha. Macapá, 2013. 107 f. Dissertação (mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical.
- NINOMIYA, K. *et al.* Hepatoprotective limonoids from andiroba (*Carapa guianensis*). *International Journal of Molecular Sciences*, 4(17). 2016.
- OLIVEIRA, R. V. M.; OHARA, M. T.; VILA, M. M. D. C.; GONÇALVES, M. M. *In vitro* evaluation of copaiba oil as a kojic acid skin enhancer. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2010. 46, 363-370.
- PAIVA, P. M.; GUEDES, M. C.; FUNI, C. Brazil nut conservation through shifting cultivation. *Forest Ecology and Management* 261 (2011) 508–514. journal homepage: www.elsevier.com/locate/foreco.

- PEREIRA, T. B. et al. In vitro and *in vivo* anti-malarial activity of limonoids isolated from the residual seed biomass from *Carapa guianensis* (andiroba) oil production. *Malaria Journal*, 1(13): 4-11. 2014.
- PENIDO, C. et al. Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on allergen-induced vascular permeability and hyperalgesia. *Inflammation Research*, v. 54, n. 7, p. 295–303. 2005.
- SHANLEY, P. et al. (Eds.) *Fruit trees and useful plants in Amazonian life*. English ed. [s.l.] Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2011.
- SILVA, T. M. JARDIM, F. C. S. SILVA, M. S. SHANLEY, P. O MERCADO DE AMÊNDOAS DE *Dipteryx odorata* (CUMARU) NO ESTADO DO PARÁ. *FLORESTA*, Curitiba, PR, 3(40):603-614, jul./set. 2015.
- SOLÈ, I; MAISTRO, A; PERY, C.M; GONZÁLEZ, C; SOLANS, C; GUTIÉRREZ, J. M. Nano-emulsions preparation by low energy methods in ionic surfactante system. *Colloid. Surface. A* 288, 138-143. 2006.
- SOLÈ, I; SOLANS, C; MAISTRO, A; GONZÁLEZ, C; GUTIÉRREZ, J. M. Study of nano-emulsion formation by dilution of microemulsions. *J. Colloid Interf. Sci.* 376, 133-139. 2012.
- SOUSA, F. S.; PAES, J. B.; ARANTES, M. D. C.; LOPEZ, Y. M. ; BROCCO, V. F. Análise física e avaliação do efeito antifúngico dos óleos de andiroba, copaíba e pinhão-manso. *FLORESTA*, Curitiba, PR, v. 48, n.2, p. 153-162, abr/jun. 2017.
- SOUZA, C. R. De et al. *Andiroba - Carapa guianensis* Aubl. ManausEmbrapa. 2006. Disponível em: <http://rsa.ufam.edu.br:8080/sementes/especies/especies.jsp>
- ROY, A.; SARAF, S. Limonoids: visão geral de triterpenos bioativos significativos distribuídos no reino das plantas. *Boletim Biológico e Farmacêutico* . 2006; 29 (2): 191-201. doi: 10.1248 / bpb.29.191. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)]
- TAYLOR, D. *A Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe / Progresso na Química dos Produtos Naturais Orgânicos* . Vol. 45. Nova Iorque, NY, EUA: Springer; 1984. A química dos limonóides de Meliaceae; pp. 1-102. [[CrossRef](#)]

CAPÍTULO 5

***Copaifera* sp. e *Carapa guianensis* Aubl.: fitoterápicos anti-inflamatórios
para uso tópico**

***Copaifera* sp. e *Carapa guianensis* Aubl.: fitoterápicos anti-inflamatórios para uso tópico**

**Jurema do Socorro Azevedo Dias,
Brenda Lorena Sanchez-Ortiz
José Carlos Tavares Carvalho**

Entre as plantas medicinais usadas na medicina popular para o tratamento de distúrbios inflamatórios, *Copaifera* sp. e *Carapa guianensis* Aubl. têm sido amplamente estudadas devido ao seu grande teor de compostos com atividades terapêuticas (PASCOAL et al., 2017). Produtos vegetais são uma fonte importante de agentes bioativos contra muitas doenças dentre estes, os óleos vegetais ganharam terreno na área farmacêutica (MORAES et al., 2018)

***Copaifera* sp.**

Copaifera sp. é uma espécie nativa amazônica, encontrada no Brasil, conhecida popularmente como "copaibeira" ou "copaíba", usada pelos povos, principalmente na forma de óleo resina, o qual é obtido diretamente do tronco de sua árvore. As espécies do gênero *Copaifera* estão entre as mais estudadas no mundo, devido à sua importância econômica, ecológica e farmacológica (VARGAS et al., 2015).

O óleo resina de Copaíba é obtido de mais de 20 espécies de árvores, sendo as mais estudadas, *Copaifera officinalis*, *Copaifera reticulata*, *Copaifera duckei*, *Copaifera multijuga*, *Copaifera langsdorffii*, *Copaifera hayn*, *Copaifera epunctata*, *Copaifera guyanensis* e *Copaifera panamensis* (ARRUDA et al., 2019).

A bioatividade do óleo resina de Copaíba tem sido confirmada pela presença de sesquiterpenos, diterpenos e flavonoides (VARGAS et al., 2015; SOUSA et al., 2011; ARRUDA et al., 2019; GELMINI et al., 2013). Tem sido obtido por diversas metodologias incluindo extração, isolamento e partição com solventes (PASCOAL et al., 2017).

O óleo resina e os compostos de *Copaifera* sp. têm sido usados em administração oral e tópica. As principais aplicações medicinais deste óleo e destes compostos, são na forma de antioxidante (BATISTA et al., 2016), no tratamento da leishmaniose (SANTOS et al., 2008), antimicrobiano (TOBOUTI et al., 2017), anticancerígeno (SENEDESE et al., 2018) e várias doenças inflamatórias envolvendo o trato respiratório, as vias aéreas (tais

como asma, dor de garganta, bronquite), melanoma genital-urinário, doenças de pele, como feridas, eczema e herpes (ARRUDA et al., 2019; SANTIAGO et al., 2015; DIAS et al., 2014; GUSHIKEN et al., 2017; BRANCALION et al., 2012; GELMINI et al., 2013).

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E MECANISMOS DE AÇÃO DO ÓLEO DE COPAÍBA E COMPOSTOS ISOLADOS

Administrado por via oral, o óleo resina de *C. officinalis* exibiu um expressivo efeito inibitório sobre o edema de pata induzido por carragenina e diminuiu novas formações de granuloma em um efeito similar em comparação com fenilbutazona. Ele também exibiu uma atividade inibitória da 5-lipoxigenase *in vitro* (ARRUDA et al., 2019). Assim como o ácido kolavíc-15-éster metílico (**1**) exibiu uma inibição significativa de Lipoxigenase (LOX) com IC₅₀ de 157,8 ± 17,7 µM (VARGAS et al., 2015).

A Lipoxigenase é uma enzima chave que catalisa as regiões específicas oxigenadas por ácidos graxos poliinsaturados. Pela adição de moléculas de oxigênio, ela transforma os ácidos linoleico e araquidônico em compostos de hidroperóxido. Este metabolismo do ácido araquidônico por lipoxigenase, gera vários lipídios biologicamente ativos que desempenham papéis importantes no processo de inflamação. Pesquisa sobre novos inibidores de LOX, portanto, tem potenciais benefícios não só para o tratamento de inflamação, mas também para o tratamento de uma variedade de outras doenças, tais como acidentes vasculares cerebrais, artrite, asma e inibição de tumores (VARGAS et al., 2015).

O ácido-3-hidroxi-copálico (**2**) isolado de espécies de *Copaifera*, mostrou uma maior capacidade para inibição enzimática da tirosinase com IC₅₀ de 255,5 µM, muito perto do efeito que mostrou o ácido kójico (controle positivo) com IC₅₀ de 211,2 µM (ARRUDA et al., 2019). A Tirosinase é uma enzima que desencadeia a melanogênese, iniciando uma cascata de reações que convertem a tirosina em melanina, do biopolímero para os mecanismos de oxidação enzimática. Assim, os compostos capazes de inibir a enzima tirosinase, são considerados excelentes candidatos para tratarem a hiperpigmentação, como melasma e melanoderma ou condições médicas pós-inflamatória (VARGAS et al., 2015).

O óxido nítrico (NO•) produzido por óxido nítrico sintase (iNOS) é um importante mediador da inflamação, mas a produção excessiva de NO• está altamente associada com doenças graves como choque séptico, artrite, derrame cerebral e doenças inflamatórias crônicas e auto-imunes (VARGAS et al., 2015).

A determinação da taxa de produção de NO• e iNOS expressão em modelos de célula estimulada por LPS, tem sido uma ferramenta muito útil na busca de compostos com

propriedades anti-inflamatórias. Existem muitos estudos publicados sobre o uso de óleo resina de Copaíba bruto para avaliar atividades anti-inflamatórias. Por exemplo, o óleo resina de *C. multijuga* Hayne e *C. cearensis* ex Huber Ducke, inibiram significativamente a produção do NO• em macrófagos peritoniais de ratos, estimulados por LPS por cerca de 30%, na concentração de 5 mg/mL e 50 mg/mL, respectivamente. O óleo resina de *C. reticulata*, foi capaz de inibir a produção de NO• em 85%, em uma concentração de 500 mg/mL. De forma similar, frações de sesquiterpenos e diterpenos, obtidas de óleo resina de Copaíba inibiu a produção de NO• em macrófagos peritoniais em murinos estimulados por LPS, numa concentração de 10 mg/mL (ARRUDA et al., 2019).

Os diterpenos ácido copálico (**3**), ácido kaurenico (**4**), ácido hardwickico (**5**), ácido kolavíc-15-éster metílico (**1**), inibiram a produção de NO• (medidos pelo método Greiss) em linhagem celular de macrófago murino J774, estimulada com LPS, com uma IC₅₀ = 57,4 ± 0,2 μM, 67,4 ± 1,3 μM, 61,2 ± 4,2 μM, 81,6 ± 2,8 μM respectivamente e em comparação com a indometacina (IC₅₀ = 32,0 ± 3,5 μM), usada como padrão.

Na avaliação da atividade anti-inflamatória do óleo resina de *C. cearensis*, *C. reticulata* e *C. multijuga*, medindo-se a produção *in vitro* de NO• em macrófagos murino e *in vivo*, usando-se o modelo de pleurisia induzida ZnPPiX, em camundongos, verificou-se que *C. multijuga* inibiu, significativamente a produção *in vitro* de NO• em 30% numa concentração de 50 μg/mL. *In vivo*, a inibição do acúmulo de leucócitos totais foi de 45% e o acúmulo de neutrófilos diminuiu em 73%, após a administração oral de 100 mg/kg. *C. cearensis* também inibiu aproximadamente em 30% a produção *in vitro* de NO•, numa concentração de 50 μg/mL, resultado semelhante ao obtido após a aplicação de *C. multijuga*, bem como o acúmulo total de leucócitos e neutrófilos e extravasamentos de azul de Evans em 100, 200 e 400 mg/kg. Porém, *C. reticulata*, apresentou maior potencial de inibição de produção do NO• em macrófagos murinos, dentre os três óleos testados, alcançando-se 85% de inibição, utilizando-se uma concentração de 500 μg/mL e acúmulo total de leucócitos e neutrófilos em 400 mg/kg, em uma resposta diferente ao diclofenaco em 100 mg/kg. Verificou-se também que, o beta cariofileno (**6**), mostrou importante efeito, como anti-inflamatório neste estudo (ARRUDA et al., 2019).

Atividade anti-edematogênica do óleo resina de *C. multijuga* e respectivas frações, foram avaliados no modelo de edema de pata de rato: as frações metanólicas, administradas intraperitonealmente em 30 mg/Kg causaram uma significativa inibição do edema de pata produzido por carragenina com inibição de 49% e 64%, respectivamente, após 2 h. A fração hexânica também inibiu significativamente a formação de edema de pata induzida por bradicinina em 50% após 30 min (VARGAS et al., 2015).

Os macrófagos são uma importante fonte de citocinas muito envolvidas na resposta imune, hematopoiese, inflamação e outros processos homeostáticos. Após estímulo, os macrófagos sintetizam e liberam uma variedade de citocinas: IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, TNF- α , IFN- α , IFN- γ , TGF- β , M-CSF, G-CSF, GM-CSF, 1-MCP, MCP-3, MCP-5, MIP-1, MIP-2, RANTES, MIF e KC. Além disso, estas citocinas podem modular a maioria das funções dos macrófagos, pela expressão de marcadores de superfície celular e outros mecanismos (VARGAS et al. 2015).

Óleo resina de *C. reticula*, *C. duckei* e *C. multijuga*) foram capazes de agir em monócitos humanos e citocinas, modulando o sistema imunológico. Os óleos resina destas espécies, foram capazes de induzir LPS, preservar os níveis de TNF- α e inibir a produção de IL-10. Da mesma forma, as frações hexânica, clorofórmica e metanólica do óleo resina em doses variando de 1 a 150 mg/Kg, inibiram o número de contorções induzidas pelo ácido acético e dor inflamatória. Doses de 50 e 100 mg/kg das frações hexânica e clorofórmica exibiram maior efeito antinociceptivo em comparação com a morfina (1 mg/kg), indicando sua ação nos receptores opióides (VARGAS et al. 2015).

O extrato hidroalcoólico das folhas de *C. langsdorffii* reduziu a formação de edema em dois modelos diferentes em doses de 100, 200 e 400 mg/kg, com uma máxima inibição de 52,3%. No entanto, o estudo mostrou que este efeito não estava associado à inibição da migração de células ou regulamento de citocinas. Uma fração purificada de *C. langsdorffii* foi capaz de promover a inibição da produção de IL-6 aproximadamente de 28% a 37% usando concentrações variando de 0,1 mM a 1 mM. Assim como, os ácidos diterpênicos ácido 3-hidroxi-copálico (**7**) (23,8% \pm 8,2%), ácido hardwickico (**5**) (11,2% \pm 5,7%), ácido kaurenóico (**8**) (17,3% \pm 4,2%), ácido copálico (**3**) (4,2% \pm 1,9%) em uma concentração de 50mM inibiram a produção de Interleucina 6 (IL-6), que desempenha um papel fundamental na transição entre a inflamação aguda e inflamação crônica, alterando a natureza da infiltração de leucócitos (neutrófilos polimorfonucleares por monócitos/macrófagos). A expressão de IL-6 é reforçada no local da inflamação e o bloqueio da sinalização de IL-6, tem demonstrado ser eficaz na prevenção e tratamento de doenças inflamatórias (incluindo artrite e úlceras) (VARGAS et al., 2015).

Por outro lado os diterpenos ácido kaurenóico (**8**) e 3-hidroxi-copálico (**7**) induziu a produção de IL-10 em concentrações de 12,5 μ M e 25 μ M. Isto é importante, por que a Interleucina-10 (IL-10) é produzida por macrófagos ativados e linfócitos T e desempenha um importante papel nas respostas anti-inflamatórias, por inibir a produção de citocinas em

macrófagos, induzidas pelo lipopolissacarídeo, incluindo fator de necrose tumoral- α , IL-6 e IL-12 (VARGAS et al. 2015).

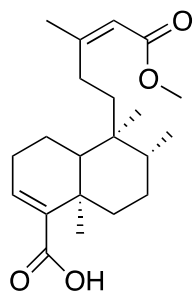
A fração volátil do óleo resina de *C. multijuga* na dose de 100 mg/kg, na concentração de 200 $\mu\text{l/mL}$, reduziu *in vitro* a migração de leucócitos para a cavidade pleural de ratos e o 3-hidroxi-copálico (**7**) inibiu a enzima tirosinase em 64% em 250 μM , enquanto o ácido copálico (**3**) mostrou uma significativa inibição em 98,5% a 100 mM, ativado pelo lipopolissacarídeo (ARRUDA et al., 2019).

O tratamento do THP-1 estimulou monócitos com o óleo resina de *C. langsdorffi*, reduzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL6, TNFa) em intervalos de 0,1 – 10 μM . Também, o óleo resina inibiu a secreção de citocinas, uma consequência da interação com a via de sinalização do NF- κB . O Diterpeno ácido kaurenóico, exibiu um IC 50 = $61,2 \pm 4,2 \mu\text{M}$ e inibiu a produção de IL-6 em 11,2% a 50 μM . Embora, tenha aumentado a produção de IL10, um anti-inflamatório interleucina, em 12,5 μM , diminuiu sua produção em 50 μM (VARGAS et al., 2015). Assim, pode-se concluir que os diterpenos podem atenuar a inibição das vias inflamatórias, mediada pelo fator de transcrição NF- κB , que em resposta, pode inibir a produção de IL-6 e aumentar a produção de IL-10.

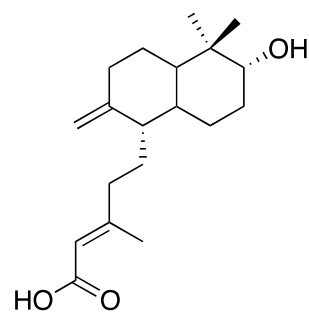
FORMULAÇÕES E APLICAÇÕES TÓPICAS

O óleo resina de Copaíba tem muitas propriedades farmacológicas, tais como anti-inflamatória, anti-séptico e cicatrizante, além de ajudar a tratar doenças de pele, entre outras aplicações (REÁTEGUI et al., 2017) . Mas, apresenta dois grandes problemas: i) baixa absorção e biodisponibilidade e ii) um sabor desagradável e para melhorar a sua atividade, se faz diversas formulações como cremes, emulsões e nanoemulsões (XAVIER-JÚNIOR et al., 2012; MARANGON et al., 2017; MORAES et al., 2018; LIMA et al., 2011).

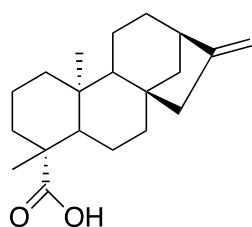
O estudo feito por Marangon et al. (2017) demonstrou que emulsões formuladas pela combinação de quitosana/gelatina/óleo de copaíba, têm potencial como novos agentes seletivos para o controle de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, apresentando MICs de 31,2 g.mL^{-1} , 62,5 g.mL^{-1} e 31,2 g.mL^{-1} respectivamente, usando a técnica de diluição de microcaldo. Além disso, mostraram-se sem efeito citotóxico em linhagens de células Vero.



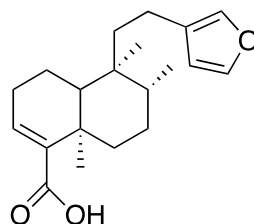
Ácido kolavíc-15-éster metílico (1)



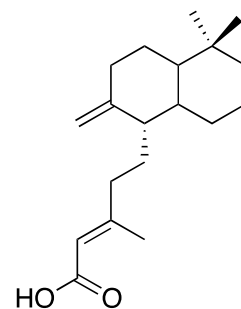
Ácido-3-hidroxi-copalico (2)



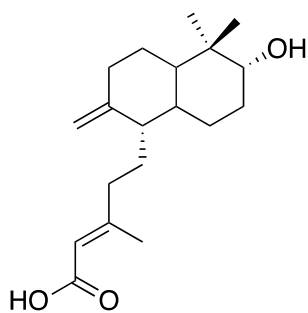
ácido kaurenico (4)



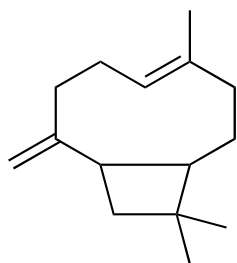
ácido hardwickico (5)



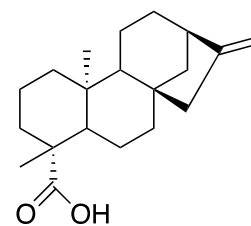
ácido copalico (3)



ácido 3-hidroxi-copalico (7)



β-cariofileno (6)



ácido kaurenico (8)

Figura 1. Compostos com atividades anti-inflamatórias isolados de *Copaifera* sp.

O tratamento com Nanoemulsão de Copaíba (nanocopa), com tamanho de partícula médio de 76, índice de polidispersão de 0.14 e potencial zeta à 2,54, conduziu uma redução em níveis de infecção por *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis* em culturas de

macrófagos, assim como atividade tóxica contra promastigotas, pela indução de forma oval de célula. Além disso, o tratamento com nanocopa apresentou efeitos benéficos significativos em ratos infectados com *L. Infantum*, reduzindo a carga parasitária no baço e no fígado e melhora nas características histopatológicas (MORAES et al., 2018).

No trabalho feito por Lima et al. (2011) ficou demonstrado que o creme vaginal do óleo resina de *Copaifera duckei* Dwyer, na dose de 28,6 mg/kg, administrada em ratas (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, por via intravaginal, por 30 dias antes da gravidez e do dia zero para o dia 20, durante a gravidez, é um produto seguro já que apresentou ausência de embriofetotoxicidade e toxicidade materna, por tanto o creme vaginal contendo 2,5% do óleo resina de Copaíba é seguro durante a gestação. Neste óleo a presença do sesquiterpeno *trans*-cariofileno foi um marcador fitoquímico.

Com base nos resultados obtidos por Oliveira et al. (2010) foi observado que o óleo de copaíba, pode ser adicionado a formulações tópicas como um promotor de penetração para substâncias hidrofílicas, visto que tem a propriedade de agir como agente promotor de penetração cutânea do ácido kójico (despigmentante), apresentando fatores de promoção de 4,1 e 3,7 para 25% e 50% v/v de soluções de óleo de Copaíba, utilizando-se o sistema de difusão *in vitro* com fluxo estático, na membrana da pele de serpente cascavel - *Crotalus durissus terrificus*.

Estes resultados indicaram que, as diversas formulações podem melhorar a atividade do óleo resina de Copaíba, o qual também pode ser um veículo promissor, para a entrega tópica de drogas e ingredientes cosméticos ativos.

***Carapa guianensis* Aubl.**

A andirobeira (*Carapa guianensis* Aubl.) pertence à família Meliaceae; é encontrada em toda a região da Amazônia brasileira, em outros países da América do Sul e no sul da América Central. Habitam preferencialmente em áreas de várzea e faixas alagáveis ao longo de cursos d'água, embora sejam também cultivadas em terra firme, atingindo menor porte (SOUZA et al., 2006).

Em média, essa árvore atinge entre 25 e 35 metros de altura, embora possa chegar a 55 metros; a copa é média e densa, composta por ramos eretos (FERRAZ; CAMARGO; SAMPAIO, 2003). Os recursos da andirobeira são suas cascas, madeira e principalmente seu óleo. Da casca é feito chá, usado na medicina tradicional contra a febre, vermes e bactérias; moída, a casca é usada como agente cicatrizante. A madeira, resistente ao ataque de insetos, é

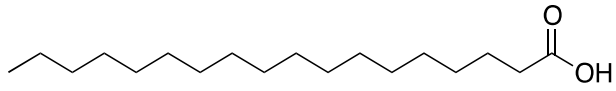
de excelente qualidade para a construção civil. O óleo, que tem diversas aplicações na medicina tradicional, é exportado para a Europa e Estados Unidos (SHANLEY et al., 2011).

ATIVIDADE BIOLÓGICA E MECANISMOS DE AÇÃO DO ÓLEO DE *Carapa guianensis* E COMPOSTOS ISOLADOS.

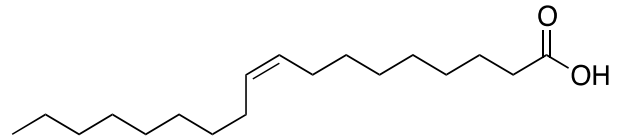
O óleo de andiroba é extraído das amêndoas, é amarelo-claro e tem gosto fortemente amargo. Em temperaturas abaixo de 25 °C o óleo solidifica-se, ficando com a consistência semelhante à da vaselina (FERRAZ; CAMARGO; SAMPAIO, 2003).

Em sua composição fitoquímica (Figura 2) são identificados ácidos graxos, principalmente o ácido oleico (9) e ácido palmítico (10), além de ácido esteárico (11), ácido linoleico (12) e ácido araquídico (13). Além de ácidos graxos, há fitoesteróis como o β -sitosterol (14), e limonóides como a andirobina (15), gedunina (16) entre outros (JESUS et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2018; NINOMIYA et al., 2016) Figura 2.

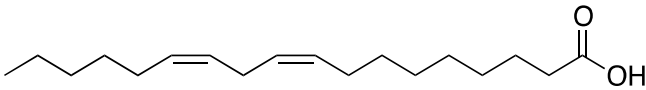
A toxicidade do óleo (hematotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade) já foi testada em ensaios de micronúcleo e *comet* (MILHOMEM-PAIXÃO et al., 2016). Os resultados mostraram que o óleo não exibiu nenhuma das toxicidades avaliadas, pelo contrário, sua atividade antioxidante tendeu a proteger o DNA de danos moleculares causados por oxidação. Além de sua atividade antioxidante, outras propriedades importantes são conhecidas. Na medicina tradicional, o óleo é usado para contusões, inflamações, como agente cicatrizante, entre outros (SHANLEY et al., 2011). Experimentalmente, o óleo já apresentou atividade antileishmanial (OLIVEIRA et al., 2018), hepatoprotetiva (NINOMIYA et al., 2016), anti-inflamatória (PENIDO et al., 2005; INOUE et al., 2018), antimalárica (MIRANDA JÚNIOR, 2012; PEREIRA et al., 2014) e cicatrizante (SOUZA et al., 2017; SILVA et al., 2015) essa atividade cicatrizante parece ser devido à indução da síntese de colágeno por seus limonóides (MORIKAWA et al., 2018). Não foi encontrado na literatura ensaios sobre sua atividade antibacteriana ou antifúngica.



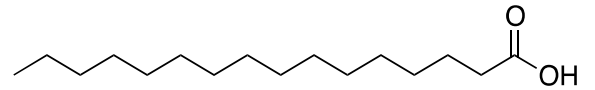
ácido esteárico (11)



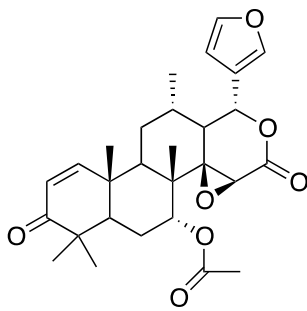
ácido oleico (9)



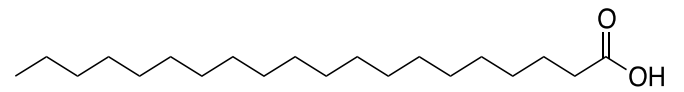
ácido linoleico (12)



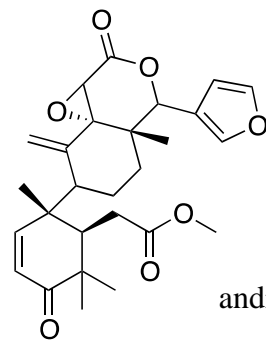
ácido palmítico (10)



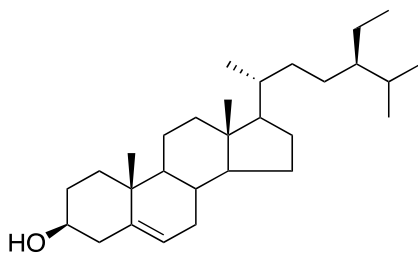
gedunina



ácido araquídico (13)



andirobina (15)



β -sitosterol

Figura 2. Compostos com atividades biológicas isolados de *Carapa guianensis* Aubl.

REFERÊNCIAS

- ARRUDA, C.; MEJÍA, J. A. A.; RIBEIRO, V. P.; BORGES, C. H. G.; MARTINS, C. H. G.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBRÓSIO, S. R.; BASTOS, J. K. (2019). "Occurrence, chemical composition, biological activities and analytical methods on *Copaifera* genus - A review." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 109: 1-20.
- BATISTA, A. G.; FERRARI, A. S.; CUNHA, D. C. da; SILVA, J. K.; CAZARIN, C. B.; CORREA, L. C.; PRADO, M. A.; CARVALHO-SILVA, L. B.; ESTEVES, E. A.; MAROSTICA JÚNIOR, M.R. (2016). "Polyphenols, antioxidants, and antimutagenic effects of *Copaifera langsdorffii* fruit." *Food Chem* 197 Pt B: 1153-1159.
- BRANCALION, A. P.; OLIVEIRA, R. B.; SOUSA, J. P.; GROPPA, M.; BERRETTA, A. A.; BARROS, M. E.; BOIM, M. A.; BASTOS, J. K. (2012). "Effect of hydroalcoholic extract from *Copaifera langsdorffii* leaves on urolithiasis induced in rats." *Urol Res* 40(5): 475-481.
- DIAS, D. S.; FONTES, L. B.; CROTTI, A. E.; AARESTRUP, B. J.; AARESTRUP, F. M.; SILVA FILHO, A. A. da; CORREA, J. O. (2014). "Copaiba oil suppresses inflammatory cytokines in splenocytes of C57Bl/6 mice induced with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)." *Molecules* 19(8): 12814-12826.
- FERRAZ, I.; CAMARGO, J. L.; SAMPAIO, P. de T. B. (2003). "Andiroba - *Carapa guianensis* Aubl. *Cararapa procera*" D. C. Meliaceae. In: Ferraz, I.; Camargo, J. L.; Sampaio, P. DE T. B. (Eds.). *Manual de Sementes da Amazônia*. Manaus: INPA. v. 1p. 1-2.
- GELMINI, F.; BERETTA, G.; ANSELMINI, C.; CENTINI, M.; MAGNI, P.; RUSCICA, M.; CAVALCHINI, A.; FACINO, R. M. (2013). "GC-MS profiling of the phytochemical constituents of the oleoresin from *Copaifera langsdorffii* Desf. and a preliminary in vivo evaluation of its antipsoriatic effect." *Int J Pharm* 440(2): 170-178.
- GUSHIKEN, L. F. S.; HUSSNI, C. A.; BASTOS, J. K.; ROZZA, A. L.; BESERRA, F. P.; VIEIRA, A. J.; PADOVANI, C. R.; LEMOS, M.; POLIZELLO JÚNIOR, M.; SILVA, J. J. M. da; NOBREGA, R. H. MARTINEZ, E. R. M.; PELLIZZON, C. H. (2017). "Skin Wound Healing Potential and Mechanisms of the Hydroalcoholic Extract of Leaves and Oleoresin of *Copaifera langsdorffii* Desf. Kuntze in Rats." *Evid Based Complement Alternat Med* 2017: 6589270.

INOUE, T. (2018). "Carapanosins D-F from the Seeds of Andiroba (*Carapa guianensis*, Meliaceae) and Their Effects on LPS-Activated NO Production". *Molecules*, v. **23**, n. 7, p. 1778, 19 jul..

JESUS, F. L. M. (2017). "Preparation of a Nanoemulsion with *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) Oil by a Low-Energy/Solvent-Free Method and Evaluation of Its Preliminary Residual Larvicidal Activity". *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*.

LIMA, C. S.; MEDEIROS, B. J. de; FAVACHO, H. A.; SANTOS, K. C. dos; OLIVEIRA, B. R. de; TAGLIALEGNA, J. C.; COSTA, E. V. da; CAMPOS, K. J. de; CARVALHO, J. C. (2011). "Pre-clinical validation of a vaginal cream containing copaiba oil (reproductive toxicology study)." *Phytomedicine* 18(12): 1013-1023.

MARANGON, C. A.; MARTINS, V. C. A.; LEITE, P. M. F.; SANTOS, D. A.; NITSCHKE, M.; PLEPIS, A. M. G. (2017). "Chitosan/gelatin/copaiba oil emulsion formulation and its potential on controlling the growth of pathogenic bacteria." *Industrial Crops and Products* 99: 163-171.

MILHOMEM-PAIXÃO, S. S. R. (2016). The lipidome, genotoxicity, hematotoxicity and antioxidant properties of andiroba oil from the Brazilian Amazon". *Genetics and Molecular Biology*, v. 39, n. 2, p. 248–256.

MIRANDA JÚNIOR, R. N. C. (2012). "Antiplasmodial activity of the andiroba (*Carapa guianensis* Aubl., Meliaceae) oil and its limonoid-rich fraction". *Journal of Ethnopharmacology*, v. **142**, n. 3, p. 679–683, ago.

MORAES, D. P. de; TAVARES, G. D.; ROCHA, F. J. S.; PAULA, E. de; GIORGIO, S. (2018). "Effects of nanoemulsions prepared with essential oils of copaiba- and andiroba against *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* infections." *Exp Parasitol* **187**: 12-21.

MORIKAWA, T. (2018). "Collagen Synthesis-Promoting Effects of Andiroba Oil and its Limonoid Constituents in Normal Human Dermal Fibroblasts". *Journal of Oleo Science*, v. **67**, n. 10, p. 1271–1277.

NINOMIYA, K. (2016). "Hepatoprotective limonoids from andiroba (*Carapa guianensis*)". *International Journal of Molecular Sciences*, v. **17**, n. 4.

OLIVEIRA, I. D. S. D. S. (2018). "*Carapa guianensis* Aublet (Andiroba) Seed Oil: Chemical Composition and Antileishmanial Activity of Limonoid-Rich Fractions". *BioMed Research International*, v. 2018.

OLIVEIRA, R. V. M. de; OHARA, M. T.; VILA, M. D. C. GONÇALVES, M. M. (2010). "*In vitro* evaluation of copaiba oil as a kojic acid skin enhancer." *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 46: 363-370.

PASCOAL, D. R. C.; ALBUQUERQUE, E. C. M. C.; VELOZO, E. S.; SOUSA, H. C. de; MELO, S. A. B. V. de; BRAGA, E. M. (2017). "Copaiba oil-loaded commercial wound dressings using supercritical CO₂: A potential alternative topical antileishmanial treatment." *The Journal of Supercritical Fluids* 129: 106-115.

REÁTEGUI, P. J. L.; BARRALES, F. M.; REZENDE, C. A.; QUEIROGA, C. L.; MARTINEZ, J. (2017). "Production of Copaiba oleoresin particles from emulsions stabilized with modified starches." *Industrial Crops and Products* 108: 128-139.

PENIDO, C. (2005). "Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on allergen-induced vascular permeability and hyperalgesia". *Inflammation Research*, v. 54, n. 7, p. 295–303.

PEREIRA, T. B. "In vitro and in vivo anti-malarial activity of limonoids isolated from the residual seed biomass from *Carapa guianensis* (andiroba) oil production. *Malaria Journal*, v. **13**, n. 1, p. 4–11. 2014.

SHANLEY, P. et al. (EDS.). *Fruit trees and useful plants in Amazonian life*. English ed ed. [s.l.] Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2011.

SANTIAGO, K. B.; CONTI, B. J.; ANDRADE, B. F. M. T.; SILVA, J. J. M. da; ROGEZ, H. L.; CREVELIN, E. J.; MORAES, L. A. B. de; VENEZIANI, R.; AMBROSIO, S. R.; BASTOS, J. K.; SFORCIN, J. M. "Immunomodulatory action of *Copaifera* spp oleoresins on cytokine production by human monocytes." *Biomed Pharmacother* **70**: 12-18. 2015.

SANTOS, A. O.; NAKAMURA, T. U.; DIAS FILHO, B. P.; VEIGAR JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C. NAKAMURA, C. V. "Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*." *J Ethnopharmacol* **120**(2): 204-208. 2008.

SENEDESE, J. M.; RINALDI NETO, F.; FURTADO, R. A.; NICOLLELA, H. D.; SOUZA, L. D. R. de; RIBEIRO, A. B.; FERREIRA, L. S.; MAGALHAES, G. M.; CARLOS, I. Z.;

SILVA, J. J. M. da; BASTOS, J. K. (2018). "Chemopreventive role of *Copaifera reticulata* Ducke oleoresin in colon carcinogenesis." *Biomed Pharmacother* **111**: 331-337.

SILVA, C. E. S. et al. Effect of *Carapa guianensis* Aublet (Andiroba) and *Orbignya phalerata* (Babassu) in colonic healing in rats. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v. 42, n. 6, p. 399–406, dez. 2015.

SOUSA, J. P.; BRANCALION, A. P.; SOUZA, A. B.; TURATTI, I. C.; AMBROSIO, S. R.; FURTADO, N. A.; LOPES, N. P.; BASTOS, J. K. (2011). "Validation of a gas chromatographic method to quantify sesquiterpenes in copaiba oils." *J Pharm Biomed Anal* **54**(4): 653-659.

SOUZA, C. R.. (2006). "Andiroba - *Carapa guianensis* Aubl." Manaus Embrapa, Disponível em: <<http://rsa.ufam.edu.br:8080/sementes/especies/especies.jsp>>

TOBOUTI, P. L.; MARTINS, T. C. de A.; PEREIRA, T. J. MUSSI, C. M. (2017). "Antimicrobial activity of copaiba oil: A review and a call for further research." *Biomed Pharmacother* **94**: 93-99.

VARGAS, F. de S.; ALMEIDA, P. D. O.; ARANHA, E. S. P.; BOLETI, A. P. de; NEWTON, P.; VASCONCELLOS, M. C. de; VEIGA-JÚNIOR, F. V.; LIMA, E. S. Biological Activities and Cytotoxicity of Diterpenes from *Copaifera* spp. Oleoresins. *Molecules* **20** (4): 6194-6210. 2015. doi:10.3390/molecules20046194.

XAVIER-JÚNIOR, F. H.; SILVA, K. G. H.; FARIAS, I. E. G.; MORAIS, A. R. V.; ALENCAR, E. N.; ARAÚJO, I. B.; OLIVEIRA, A. G.; EGITO, E. S. T. "Prospective study for the development of emulsion systems containing natural oil products." *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **22**(4): 367-372. 2012.

CONCLUSÃO

O presente estudo revelou uma nova fonte de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados de valor significativo. Os ácidos graxos são ricos em ácidos palmítico, linoléico e linolênico, são benéficos para reduzir o colesterol do corpo se tomado diariamente como suplementos dietéticos. A presença dos ácidos palmítico, oleico e esteárico também aumenta o valor nutricional e contribui para os benefícios gerais para a saúde.

Além disso, nosso estudo indubitavelmente confirma que os óleos de *Dipteryx odorata*, *Copaifera sp.* e *Carapa guianensis* Aubl., contêm uma percentagem relativamente elevada de ácidos graxos, com potencial atividade anti-fúngico, que poderiam ser úteis na aplicação clínica.

Verificou-se que a técnica de Poison Food e o meio de CYA, permitiram a comprovação do potencial anti-fúngico, nos testes com os óleos fixos de *Copaifera sp.*, *Carapa guianensis* Aubl. e *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd sobre as espécies fúngicas *Aspergillus nomius* e *A. fumigatus*. Sendo possível indicar suas aplicações, em testes anti-fúngicos *in vitro*, sobre as espécies fúngicas filamentosas em estudo.

Assim como, foi possível verificar-se as alterações histopatológicas causadas no fígado, intestino e rins de *Danio rerio*. Sendo possível a recomendação deste modelo, para a realização de testes de toxicidade aguda, após a validação desta técnica.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A castanha-do-Brasil, também conhecida como castanha-do-pará, é largamente utilizada na alimentação humana, sendo produzida por uma planta da família Lecythidaceae, espécie *Bertholletia excelsa*. Esta árvore é frondosa, podendo atingir 60 metros de altura e diâmetro de até 2 metros. As sementes da castanha-da-Amazônia, estão contidas em um ouriço. Os ouriços caem das castanheiras geralmente no período de janeiro a junho, dependendo também das condições climáticas de cada área, quando maduros. Porém, o mercado de castanha-da-Amazônia tem experimentado, desde o início desta década, um processo de instabilidade devido, principalmente, a mudanças na legislação sobre a presença de micotoxinas.

Apesar da melhoria alcançada na qualidade do produto pelo uso de boas práticas recomendadas, os problemas com contaminação por aflatoxinas não foram resolvidos. Todas as etapas no beneficiamento da castanha-da-Amazônia (queda dos ouriços, coleta dos mesmos, transporte para as fábricas, armazenamento e processamento) estão sujeitas à contaminação por fungos produtores de aflatoxinas, podendo causar sérios danos à saúde humana e animal.

Este trabalho teve como objetivos realizar o estudo sobre o potencial anti-fúngico dos óleos de *Copaifera sp.*, *Carapa guianensis* e *Dipteryx odorata*, como forma alternativa de controle das espécies fúngicas filamentosas e oportunistas, *Aspergillus nomius* e *A. fumigatus*. Visto que, a utilização constante e duradoura de antifúngicos sintéticos, tem causado como consequência a variabilidade genética destes fungos, resultando no aparecimento de cepas resistentes ao tratamento de doenças ocasionadas por estas espécies fúngicas em humanos e animais.

Assim sendo, observou-se com base em nossos estudos que os óleos de *Copaifera sp.*, *Carapa guianensis* e *Dipteryx odorata*, apresentaram diferentes potenciais no controle *in vitro*, das espécies fúngicas *A. nomius* e *A. fumigatus*, estudo este que pode ser utilizado como subsídio e complementado com a realização de avaliações *in vivo*, de forma a concluir-se que realmente estes óleos e seus compostos e ainda a sua forma de aplicação, a exemplo da nanoemulsão de *Copaifera sp.*, possam ser utilizados no tratamento de doenças ocasionadas por espécies fúngicas em pessoas e animais.

Assim como, observou-se que o óleo de *Dipteryx odorata*, demonstrou toxicidade aguda, quando testado em *Danio rerio*. Embora não tenha causado a morte dos peixes, mas alterações histopatológicas no fígado, rins e intestino. Ainda se faz necessário que este óleo seja testado quanto à toxicidade crônica, testando-se as doses de forma contínua e prolongada, por um certo período, para que se comprove que realmente este óleo causa ou não a morte destes peixes.

Verificou-se que a técnica de Poison Food e o meio de CYA, permitiram a comprovação do potencial anti-fúngico, nos testes com os óleos fixos de *Copaifera* sp., *Carapa guianensis* Aubl. e *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd sobre as espécies fúngicas *Aspergillus nomius* e *A. fumigatus*. Sendo possível indicar suas aplicações, em testes anti-fúngicos *in vitro*, sobre as espécies fúngicas filamentosas em estudo.

Assim como, foi possível verificar-se as alterações histopatológicas causadas no fígado, intestino e rins de *Danio rerio*. Sendo possível a recomendação deste modelo, para a realização de testes de toxicidade aguda, após a validação desta técnica.