

**Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica do óleo resina da copaibeira (*Copaifera reticulata* Ducke) e da sua nanoemulsão sobre uma cepa selvagem de *Aspergillus fumigatus* Fresenius isolada da castanheira-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Bompl.)**

**In vitro evaluation of the antifungal activity of copaib tree resin oil (*Copaifera reticulata* Ducke) and its nanoemulsion on a wild strain of *Aspergillus fumigatus* Fresenius isolated from the Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa* Bompl.)**

**Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica del aceite de resina de árbol de copaib (*Copaifera reticulata* Ducke) y su nanoemulsión en una cepa silvestre de *Aspergillus fumigatus* Fresenius aislada del árbol de castaña (*Bertholletia excelsa* Bompl.)**

Recebido: 03/03/2023 | Revisado: 23/03/2023 | Aceitado: 25/03/2023 | Publicado: 31/03/2023

**Jurema do Socorro Azevedo Dias**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7483-9819>

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Amapá, Brasil

E-mail: [jurema.dias@embrapa.br](mailto:jurema.dias@embrapa.br)

**Ana Cláudia Lira Guedes**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7483-9819>

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Amapá, Brasil

E-mail: [ana-lira.guedes@embrapa.br](mailto:ana-lira.guedes@embrapa.br)

**Irlon Maciel Ferreira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4517-0105>

Universidade Federal do Amapá, Brasil

E-mail: [irlon.ferreira@unifap.br](mailto:irlon.ferreira@unifap.br)

**Anna Eliza Maciel de Faria Mota Oliveira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9337-4519>

Universidade Federal do Amapá, Brasil

E-mail: [annaeliza.maciел@gmail.com](mailto:annaeliza.maciел@gmail.com)

**José Carlos Tavares de Carvalho**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3662-9794>

Universidade Federal do Amapá, Brasil

E-mail: [jctcarvalho@gmail.com](mailto:jctcarvalho@gmail.com)

**Resumo**

As espécies de copaibeiras são amplamente distribuídas nas regiões Amazônica e Centro-Oeste do Brasil. Seu óleo é utilizado como anti-inflamatório das vias urinárias, em afecções pulmonares, antiúlcera, antiastmático, expectorante, pneumonia, sinusite, disenteria, incontinência urinária, cistite e leucorréia e como antitumoral. O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antifúngica do óleo resina de *Copaifera reticulata* Ducke e de sua nanoemulsão comparados ao já conhecido antifúngico de origem sintética Itraconazol sobre a cepa selvagem de *Aspergillus fumigatus* Fresenius isolada de amêndoas da castanheira-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Bompl.). A fungitoxicidade, tanto do óleo quanto da nanoemulsão, foram determinadas pela técnica de Poison Food. Utilizando-se o Itraconazol (marca: Prati; Lote: 16A43N) na concentração de 1,6 µg.mL<sup>-1</sup>, como controle positivo e o Tween 20 na concentração de 1,6 µg.mL<sup>-1</sup>, como controle negativo e o fungo em meio de cultura sem o óleo, como testemunha. Os tratamentos foram realizados em triplicata e o registro do crescimento micelial foi avaliado a cada 24 h, 48 h e 72 h, medindo-se os diâmetros transversal e longitudinal, para a análise da Porcentagem de Inibição do Crescimento Micelial (% PIC) e crescimento radial diário da colônia fúngica. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial, 7 x 1 x 3 x 3 (concentrações x fungo x controle x repetições). Verificou-se que tanto o óleo resina de copaiba quanto a sua nanoemulsão são potenciais candidatos no controle de *A. fumigatus*. Além de não ser observado qualquer tipo de resistência de *A. fumigatus* quanto à ação do Itraconazol.

**Palavras-chave:** Amazônia; *Copaifera reticulata*; Controle alternativo; Planta medicinal.

**Abstract**

Copaiba tree species are widely distributed in the Amazon and Midwest regions of Brazil. Its oil is used as an anti-inflammatory of the urinary tract, in pulmonary disorders, anti-ulcer, anti-asthmatic, expectorant, pneumonia,

sinusitis, dysentery, urinary incontinence, cystitis and leukorrhoea and as an antitumor. The objective of this work was to evaluate the antifungal activity of *Copaifera reticulata* Ducke oilresin and its nanoemulsion compared to the already known antifungal of synthetic origin itraconazole on the wild strain of *Aspergillus Fumigatus* Fresen. isolated from *Bertholletia excelsa* Bonpl. The fungitoxicity of both the oil and the nanoemulsion were determined by the Poison Food technique. Using Itraconazole (brand: Prati; Batch: 16A43N) at a concentration of 1.6 µg/mL, as a positive control and Tween 20 at a concentration of 1.6 µg/ml, as a negative control and the fungus in a culture medium without the oil, as a control. The treatments were carried out in triplicate and the mycelial growth record was evaluated every 24h, 48h and 72h, measuring the transversal and longitudinal diameters, for the analysis of the Mycelial Growth Inhibition Percentage (% PIC) and daily radial growth of the fungal colony. The experimental design was completely randomized, in a factorial scheme, 7 x 1 x 3 x 3 (concentrations x fungus x control x repetitions). It was verified that both the copaiba oilresin and its nanoemulsion are potential candidates in the control of *A. fumigatus*. Besides not being observed any type of resistance of *A. fumigatus* regarding the action of Itraconazole.

**Keywords:** Amazonia; *Copaifera reticulata*; Alternate control; Medicinal plant.

### Resumen

Las especies de copaiba árbol están ampliamente distribuidas en las regiones del Amazonas y el Medio Oeste de Brasil. Su aceite se utiliza como antiinflamatorio de las vías urinarias, en afecciones pulmonares, antiulceroso, antiasmático, expectorante, neumonía, sinusitis, disentería, incontinencia urinaria, cistitis y leucorrea y como antitumoral. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antifúngica del aceite de resina de *Copaifera reticulata* Ducke y su nanoemulsión en comparación con el conocido antifúngico de origen sintético itraconazol sobre la cepa silvestre de *Aspergillus fumigatus* Fresen aislada de almendras de nuez amazónica (*Bertholletia excelsa* Bonpl.). La fungitoxicidad tanto del aceite como de la nanoemulsión se determinó mediante la técnica Poison Food. Utilizando Itraconazol (marca: Prati; Lote: 16A43N) a una concentración de 1,6 µg.mL<sup>-1</sup>, como control positivo y Tween 20 a una concentración de 1,6 µg.mL<sup>-1</sup>, como control negativo y el hongo en medio de cultivo sin aceite, como control. Los tratamientos se realizaron por triplicado y se evaluó el registro de crecimiento micelial cada 24 h, 48 h y 72 h, midiendo los diámetros transversal y longitudinal, para el análisis del Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Micelial (%PIC) y diario de colonias fúngicas de crecimiento radial. El diseño experimental fue completamente al azar, en esquema factorial, 7 x 1 x 3 x 3 (concentraciones x hongo x testigo x repeticiones). Se verificó que tanto el aceite de resina de copaiba como su nanoemulsión son candidatos potenciales en el control de *A. fumigatus*. Además de no observarse ningún tipo de resistencia de *A. fumigatus* respecto a la acción de Itraconazol.

**Palabras clave:** Amazonía; *Copaifera reticulata*, Control alternativo; Planta medicinal.

## 1. Introdução

As amêndoas da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) é um dos produtos mais importantes, extraídos da floresta da região úmida amazônica. Porém, o clima equatorial quente e úmido, apresentando médias de temperatura de 26°C e umidades relativas do ar entre 80 e 95%, favorece a ocorrência de patógenos que infectam as amêndoas, causando podridão e contaminando-as com aflatoxinas tóxicas ao homem e aos animais, como os fungos *Aspergillus flavus*, *A. nomius*, *A. pseudonomius*, *A. niger*; *A. tamarrii* e *A. fumigatus* (Baquião et al., 2012; Calderari et al., 2013; Gonçalves et al., 2012; Iamanaka et al., 2014; Midorikawa et al., 2014).

O gênero *Aspergillus* P.Micheli, é constituído por espécies fúngicas filamentosas encontradas em todas as estações do ano, no solo, em vegetais e em matéria em decomposição (GBIF, 2023; 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). Destacam-se *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger*, espécies determinantes da aspergilose pulmonar, condição infecciosa, não contagiosa (Rapper & Fennell, 1973; Stevens, 2001). O principal tratamento para esse tipo de doença é a antibioticoterapia e a endovenosa prolongada (Verghese et al., 1998). Porém, *A. fumigatus* cada vez mais aumenta sua resistência aos antifúngicos polienos, azóis e equinocandinos, por formar um biofilme, ao final de sua diferenciação morfológica, dificultando o seu controle (Kaur & Singh, 2014).

Deste modo, a busca de antimicrobianos de origem vegetal apresenta-se com grande potencial, em função das células vegetais reagirem contra espécies fúngicas (Recio et al., 1989; Farnsworth, 1996); pois as plantas possuem alta capacidade em sintetizar substâncias químicas, utilizadas no sistema de defesa contra agentes patogênicos (Rodrigues et al., 1997).

Popularmente, o óleo de copaibeira (*Copaifera* spp.) é utilizado como anti-inflamatório das vias urinárias, em afecções pulmonares (tosses e bronquites, gripes e resfriados), antiúlcera (Braga et al., 1998; Cascon & Gilbert, 2000; Pinto et al., 2000; Paiva et al., 1998; Rodrigues, 1989); antiasmático, expectorante, pneumonia, sinusite, disenteria, incontinência urinária, cistite, leucorréia (Veiga-Júnior & Pinto, 2002), antitumoral (Ohsaki et al., 1994) e até como herbicida natural (Gurgel et al., 2019).

As emulsões são amplamente empregadas nas indústrias cosmética e farmacêutica por apresentarem vantagens quanto à veiculação de fármacos ou ativos hidrofílicos e lipofílicos, 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, água e óleo, que com a adição de um tensoativo, as tornam estáveis (Fernandez et al., 2004). Embora dependendo de sua propriedade físico-química, este possa afetar o comportamento do sistema (Sajjadi et al., 2003).

O óleo de *Copaifera* spp. tem sido usado há mais de 500 anos na medicina tradicional popular, com grande diversidade de aplicações, porém, estudos desenvolvidos sobre este óleo, são restritos e escassos (Pieri et al., 2009).

Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi testar a atividade antifúngica do óleo resina de *C. reticulata* e de sua nanoemulsão, comparados ao Itraconazol, contra uma cepa selvagem do fungo *A. fumigatus*.

## 2. Metodologia

### 2.1 Coleta das amêndoas da castanheira-do-Brasil

As amêndoas da castanheira-do-Brasil, foram coletadas na Reserva Extrativista do Rio Cajari, Laranjal do Jari, Amapá, nas localidades Martins (52°17'30"W; 00°34'36"S), Marinho (52°13'25"W; 00°34'40"S) e Pedra Preta (Coordenadas aproximadas 0°20'18.39"S; 51°53'38.97"O). 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 et al., 2011).

### 2.2 Isolamento fúngico

O isolado fúngico 4K7 (SISGEN A5331F0), foi obtido por isolamento indireto em meio DG18 (peptona 5 g, glicose 10 g, fosfato monobásico de potássio 1 g, sulfato de magnésio 0,5 g, sulfato de zinco 10 mg, sulfato de cobre 5 mg, dicloran 2 mg, cloranfenicol 50 mg, clorotetraciclina 50 mg e ágar, 15 g, suplementado com glicerol 220 g). Após desinfestação em álcool 70% (1 min.), hipoclorito de sódio (1 min.) e água destilada esterilizada (2 min.), foram inoculados quatro fragmentos de amêndoas e cascas de castanheira-do-Brasil por placa, incubando-os por sete dias a 25°C, em fotoperíodo de 12 h no escuro e 12 h no claro (Costa, 2009) adaptado. Após a obtenção dos isolados monospóricos, estes foram enviados ao Laboratório de Fitopatologia da Universidade Nacional de Brasília para identificação através da taxonomia molecular.

### 2.3 Identidade taxonômica do fungo

Para a identidade taxonômica do fungo foi utilizada a metodologia preconizada por Midorikawa et al. (2014), bem como os dados foram posteriormente confirmados através de consulta em bases nacionais (Flora e Funga do Brasil, 2023) e internacionais (GBIF, 2023).

## 2.4 Coleta e caracterização do óleo de copaíba

O material botânico foi coletado segundo técnicas consolidadas em taxonomia vegetal (Martins-da-Silva et al., 2014), de população nativa de copaibeiras do bioma amazônico, proveniente de uma área de assentamento, Nova Canaã, situada no município de Porto Grande, AP sob registro na plataforma SISBIO (SISGEN A0EC357).

## 2.5 Potencial antifúngico do óleo de copaíba sobre a cepa selvagem de *A. fumigatus*

O teste de fungitoxicidade foi determinado pela técnica de Poison Food (Thomidis & Filotheou, 2016) adaptado, utilizando-se o óleo de copaibeira cuja densidade foi de 0,965 g.mL<sup>-1</sup>. Preparou-se uma emulsão na concentração de 20 mg de óleo de copaibeira 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; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g; NaNO<sub>3</sub>, 2 g; KCl, 0,5 g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,5 g; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,01 g; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,01 g; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 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<sup>-1</sup>); T2 (0,5 µg mL<sup>-1</sup>); T3 (1,0 µg mL<sup>-1</sup>); T4 (1,5 µg mL<sup>-1</sup>); T5 (2,0 µg mL<sup>-1</sup>); T6 (4,0 µg mL<sup>-1</sup>); T7 (6,0 µg mL<sup>-1</sup>). Utilizou-se o antifúngico comercial, Itraconazol (marca: Prati; Lote: 16A43N; cápsula com 100 mg) na concentração de 1,6 µg mL<sup>-1</sup>, na dose comercial para aspergilose de 200 mg (2 cápsulas) uma vez ao dia, com duração média de 2-5 meses (controle positivo) e o Tween 20 na concentração de 1,6 µg mL<sup>-1</sup> (controle negativo). E, o fungo em meio de cultura sem o óleo, para fins de comparação com os demais tratamentos. 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 de micélio da borda de uma colônia de 3 dias de idade, colocando-a no centro de uma placa de Petri com o meio CYA.

## 2.6 Avaliação dos tratamentos e análise dos dados

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

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

E, para o cálculo do Crescimento Radial Diário (CRd), utilizando-se a fórmula proposta por Forti (1997);

$$\text{CRd} = \frac{\text{CR}}{n}$$

Onde,

CR: Crescimento radial do patógeno

$$\text{CR} = \frac{(\text{DM} - 0,5)}{2}$$

DM: Média dos diâmetros longitudinal e transversal do crescimento micelial do patógeno;

$$\text{DM} = \frac{D1 + D2}{2}$$

0,5: Diâmetro do disco da cepa do patógeno, inoculado na placa de Petri com o meio CYA;

n: Número de dias necessários para que o crescimento micelial do patógeno ocupasse toda a placa de Petri.

## 2.7 Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial, 7 x 1 x 3 x 3 (concentrações x fungo x controle x repetições) realizando-se a análise de variância e a comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa SISVAR (5.6) (Ferreira, 2014)

## 2.8 Potencial antifúngico da nanoemulsão à base de óleo de copaibeira sobre *A. fumigatus*.

### 2.8.1 Obtenção da nanoemulsão do óleo resina da copaibeira

A nanoemulsão foi formulada à base de óleo resina de *C. reticulata* no Laboratório NanoFitofarmacêutico da Universidade Federal do Amapá.

### 2.8.2 Preparo da Nanoemulsão de copaibeira.

A nanoemulsão de copaibeira, foi formulada por um método de baixo aporte de energia. A massa final foi de 4 g; composta de 5% (p/p) de óleo resina de copaibeira; 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. A seguir, adicionou-se o volume de água destilada gota a gota, sob agitação. Agitando-se por mais 2 minutos. Durante 3 dias, a nanoemulsão preparada foi mantida em repouso, sob temperatura ambiente, em local arejado e livre de impacto, inicialmente para caracterização.

### 2.8.3 Avaliação da estabilidade da nanoemulsão do óleo de copaibeira.

A estabilidade da nanoemulsão foi avaliada durante 0, 1 e 7 dias de manipulação, pela análise macroscópica da formulação, avaliando-se o 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.

### 2.8.4 Tamanho da gotícula e polidispersão.

O tamanho da gotícula e a polidispersão da nanoemulsão foram determinadas pela espectroscopia de correlação de fótons, utilizando-se o equipamento tipo Zetasizer ZS, Malvern, UK com 10 mW “red” laser ( $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ ). O tamanho das gotículas foi medido com um detector, tomando-se um ângulo de dispersão de  $90^\circ$ . 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  $25^\circ\text{C}$  a  $80^\circ\text{C}$  a intervalos de  $5^\circ\text{C}$  e os resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

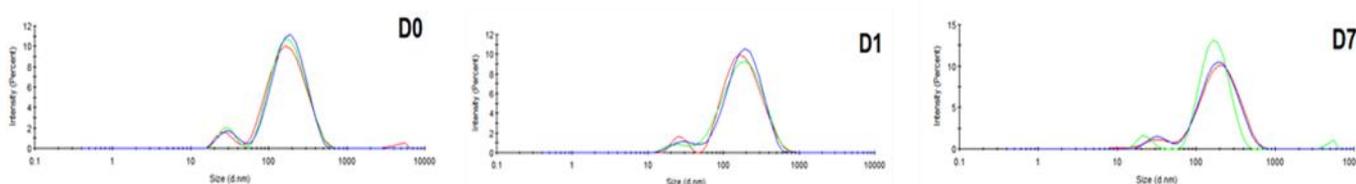
A nanoemulsão foi formulada em água, misturada em surfactante hidrofílico Tween 80 e o óleo resina de copaibeira. Obteve-se uma nanoemulsão (O/A) azulada e transparente com tamanhos de gotículas variando entre  $132,9 \pm 0,8544$  e  $144,5 \pm 1,852 \text{ nm}$ . O tamanho da gota de nanoemulsão foi 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 copaibeira e surfactante hidrofílico (Polisorbato 80, HLB = 15). Cada dado 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

Fonte: Autores (2023).

**Figura 1.** Distribuição do tamanho da partícula da nanoemulsão constituída de 5% (w/w) de óleo de copaibeira, 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)



Fonte: Autores (2023).

### 2.8.5 Potencial fungitóxico da nanoemulsão de copaibeira sobre *A. fumigatus*.

A atividade fungitóxica da nanoemulsão de óleo de copaibeira foi testada sobre *A. fumigatus*, por meio da técnica de Poison Food (Thomidis & Filotheou, 2016). O meio de cultura utilizado foi o Czapeck Yeast Autolysate Agar (CYA) adaptado (Saccharose, 30 g; Power Yeast Extract, 5 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g; NaNO<sub>3</sub>, 2 g; KCl, 0,5 g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,5 g; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,01 g; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,01 g; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 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, exceto a nanoemulsão, colocados sob luz ultravioleta, em câmara de fluxo laminar vertical. Após o esfriamento à 45°C, cada concentração (500 µg mL<sup>-1</sup>, 250 µg mL<sup>-1</sup>, 125 µg mL<sup>-1</sup>, 62,5 µg mL<sup>-1</sup> e 31,2 µg mL<sup>-1</sup>) da nanoemulsão, foi adicionada separadamente a um erlenmeyer 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 *A. fumigatus*, 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<sup>-1</sup>, como controle positivo e o Tween 80 na concentração de 1,6 µg mL<sup>-1</sup>, 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 24 h, 48 h e 72 h, medindo-se os diâmetros transversal e longitudinal, para a análise do crescimento micelial e da Percentagem de Inibição do Crescimento Micelial (% PIC).

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

## 2.9 Análise estatística

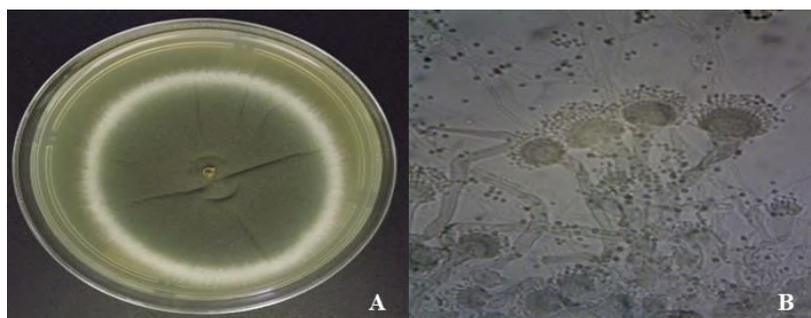
O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial, 5 x 1 x 3 x 3 (concentrações x fungos x controles x repetições). A análise estatística, foi realizada através da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa SISVAR (6.0) (Ferreira, 2014).

## 3. Resultados

### 3.1 Taxonomia morfológica e molecular do fungo *A. fumigatus*

*A. fumigatus*, após identificado e caracterizado por meio da taxonomia morfológica e molecular, foi registrado 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 (rDNA ITS) mostrou 100% identidade com *A. fumigatus*, amostra tipo, ATCC MYA4609 e 99% de identidade com NRRL 6113, Acesso ao NCBI, JX092088.1, sendo confirmado através do marcador secundário Calmodulina (Figura 2).

**Figura 2** - Colônia pulverulenta de *A. fumigatus* em meio CYA (A); conídios e conidióforos com 48 h (B) (SISGEN A 5331F0)



Fonte: Autores (2023).

### 3.2 Avaliação *in vitro* do potencial fungitóxico do óleo resina de copaibeira sobre *A. fumigatus*.

Os resultados mostraram efeito significativo ( $p \leq 0,01$ ), tanto das concentrações do óleo resina da copaibeira sobre o crescimento micelial de *A. fumigatus*, quanto em relação aos diferentes tempos ( $p \leq 0,01$ ) de inoculação do fungo no meio CYA.

Quanto ao efeito das diferentes concentrações do óleo de copaibeira comparadas ao Itraconazole sobre *A. fumigatus* (Tabela 2), verificou-se ação fungicida efetiva do Itraconazol a  $1,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  (0,00). Foram evidenciados os maiores efeitos inibitórios do óleo nas concentrações  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$  (1,32778 d) e  $6 \mu\text{g mL}^{-1}$  (1,35556 d), respectivamente. Não houve diferença significativa entre estas duas concentrações.

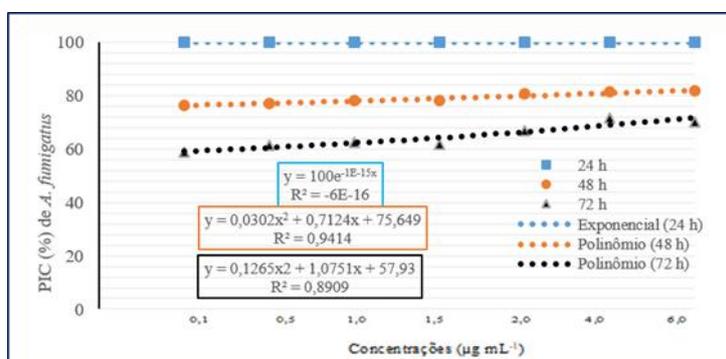
**Tabela 2.** Efeito de diferentes concentrações do óleo de copaibeira comparadas ao Itraconazole sobre o crescimento micelial de *Aspergillus fumigatus*.

Concentrações ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Crescimento micelial (cm)
0,1	1,82222 b
0,5	1,73333 bc
1,0	1,67778 bc
1,4	1,69444 bc
2,0	1,48333 cd
4,0	1,32778 d
6,0	1,35556 d
ITZ	0,00000 e
DMSO	7,46111 a
Tween 20	7,65000 a

Dms = 0,26184. Fonte: Autores (2023)

Considerando-se as porcentagens de inibição de crescimento de *A. fumigatus* em relação às diferentes concentrações do óleo de copaibeira, observa-se que a curva indica que o melhor tempo em todas as concentrações foi de 24 h, pois manteve a eficácia de inibição de crescimento do fungo. Houve tendência de maiores porcentagens de inibição nas maiores concentrações do óleo para 48 h e 72 h. No período de incubação de 72 h o desempenho foi inferior nas menores concentrações, com 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 h. Também aparenta tendência de melhor capacidade de inibição em concentrações acima das estudadas (Figura 3).

**Figura 3** - Efeito inibitório do óleo resina de copaibeira sobre o crescimento micelial de *Aspergillus fumigatus* ao longo de 72 h de inoculação em meio CYA.

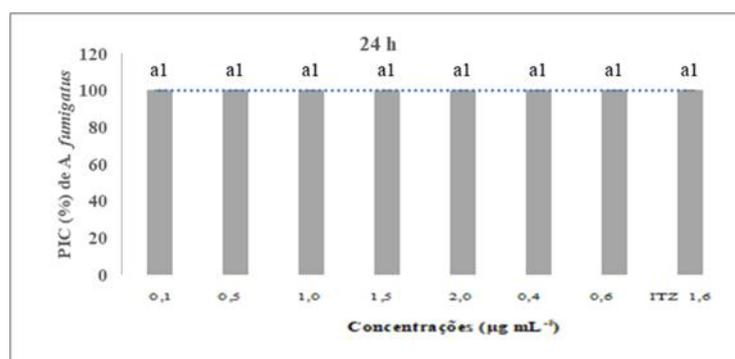


Fonte: Autores (2023).

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 avaliadas do óleo de copaibeira, ressaltando-se que o controle ITZ manteve-se eficiente em todas as avaliações com total inibição. Ressaltando-se que a eficiência nas primeiras 24 h foi semelhante e total entre todas as concentrações, atingindo o PIC de 100% (Figuras 4; 5). Nas 48 horas, as concentrações de 4,0

$\mu\text{g mL}^{-1}$  e  $6,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  comparativamente com as demais concentrações foram as mais efetivas. Houve diminuição da eficiência da inibição de crescimento no sentido 24 h para 72 h em todas as concentrações do óleo de copaibeira avaliadas. Nas 72 horas de incubação, a efetividade de inibição está diretamente associada à concentração do óleo de copaiba utilizado, em que quanto maiores as concentrações, melhores foram as capacidades de inibição de crescimento do fungo, demonstrando assim o efeito dose-dependente.

**Figura 4** - Efeito inibitório do óleo resina de copaibeira 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 1% de probabilidade pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6) (Ferreira, 2014).



Fonte: Autores (2023).

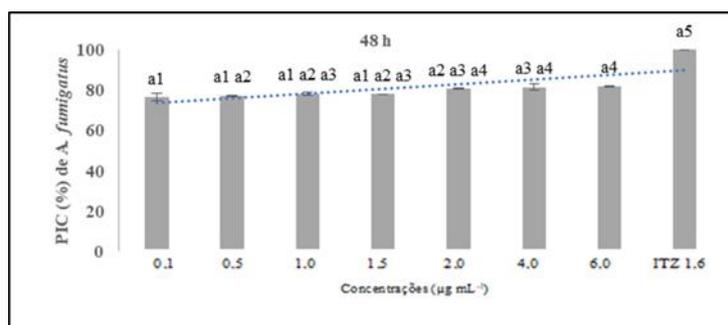
**Figura 5** - Efeito de diferentes concentrações do óleo resina de copaibeira sobre o crescimento micelial de *A. fumigatus in vitro*, após 24 h de avaliação, em meio Czapeck (CYA).



Fonte: Autores (2023).

No período de 48 horas, a concentração de  $6,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , foi a mais efetiva em comparação às demais concentrações, apresentando um PIC (%) de 81,79% (Figuras 6 e 7).

**Figura 6** - Efeito inibitório do óleo resina de copaibeira sobre *A. fumigatus*, após 48h de inoculação, entre diferentes concentrações. Diferenças entre números expressam a diferença significativa entre as médias a nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6) (Ferreira, 2014).



Fonte: Autores (2023).

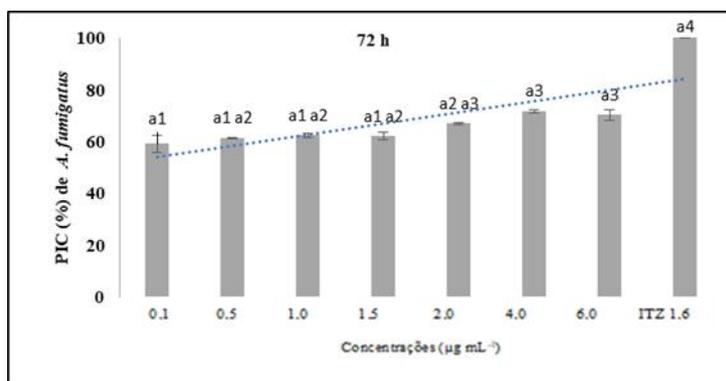
**Figura 7** - Efeito de diferentes concentrações do óleo resina de copaibeira sobre o crescimento micelial de *A. fumigatus in vitro*, após 48 h de avaliação, em meio Czapeck (CYA).



Fonte: Autores (2023).

No período de 72 horas de incubação, as concentrações de  $4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $6,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , foram mais efetivas apresentando um efeito inibitório de 71,57 % e de 70,20% respectivamente. Verificou-se que quanto maiores as concentrações, maior o efeito de inibição de crescimento do fungo (Figuras 8 e 9).

**Figura 8** - Efeito inibitório do óleo resina de copaibeira sobre *A. fumigatus*, após 72h de inoculação, nas diferentes concentrações. Diferenças entre números expressam a diferença significativa entre as médias a nível de 1% pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6) (Ferreira, 2014).



Fonte: Autores (2023).

**Figura 9** - Efeito de diferentes concentrações do óleo resina de copaibeira sobre o crescimento micelial de *A. fumigatus in vitro*, após 72 h de avaliação, em meio Czapeck (CYA).



Fonte: Autores (2023).

Na Tabela 2, são apresentados os valores de crescimento micelial diário (CRd) e a Percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC%) de *A. fumigatus in vitro* sob o efeito das sete concentrações do óleo resina de copaibeira ao longo de 24 h, 48 h e 72 h de avaliação.

**Tabela 2** - Crescimento micelial diário (CRd) e percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC%) *in vitro* de *A. fumigatus* sob o efeito de sete concentrações do óleo resina de copaibeira ao longo de 24h, 48h e 72h de avaliação.

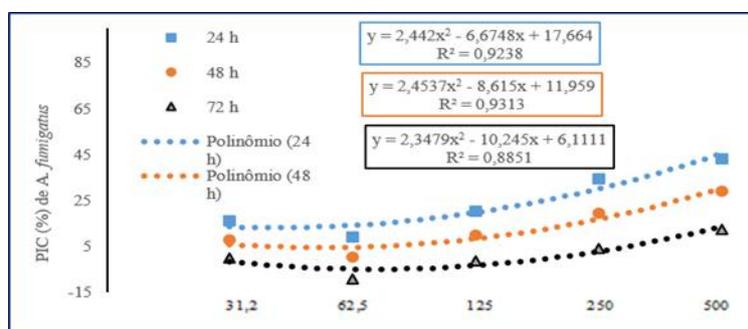
Concen trações (µg/mL)	Tempo (h)					
	24		48		72	
	CRd (cm)	PIC (%)	CRd (cm)	PIC (%)	CRd (cm)	PIC (%)
0,1	0	100	0,25	76,66	0,5	59,06
0,5	0	100	0,24	77,37	0,46	61,41
1,0	0	100	0,22	78,43	0,43	63,76
1,4	0	100	0,23	77,60	0,46	62,00
2,0	0	100	0,19	80,79	0,39	66,82
4,0	0	100	0,18	81,49	0,32	71,53
6,0	0	100	0,19	80,43	0,33	70,59

Fonte: Autores (2023).

### 3.3 Avaliação do potencial antifúngico *in vitro* da nanoemulsão do óleo resina de copaibeira no controle de *A. fumigatus*

No gráfico de porcentagens de inibição em relação às diferentes concentrações da nanoemulsão do óleo resina de copaibeira, considerando-se as 5 concentrações crescentes, verifica-se que sempre a avaliação às 24 horas foi mais eficiente na inibição do crescimento micelial de *A. fumigatus*. Aparentemente as avaliações realizadas às 24 horas apresentam uma tendência, com aumento de concentrações do óleo, conforme as curvas obtidas de sempre serem superiores às demais horas envolvidas na pesquisa (Figura 10).

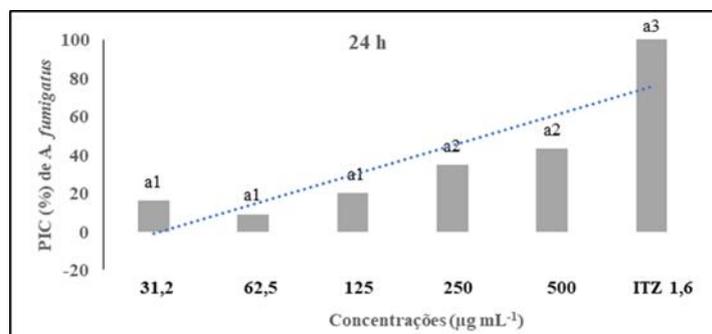
**Figura 10** - Efeito inibitório das diferentes concentrações da nanoemulsão de óleo resina de copaibeira sobre *A. fumigatus*.



Fonte: Autores (2023).

A Figura 11 mostra o efeito inibitório da nanoemulsão do óleo de copaibeira sobre *A. fumigatus* após 24 h de inoculação. Onde as concentrações de 250 µg mL<sup>-1</sup> e 500 µg mL<sup>-1</sup>, mostram-se como as mais efetivas com 34,5 % e 43,0 % de PIC (%) respectivamente em relação às demais. Porém, de acordo com o gráfico, a tendência é aumentar o efeito da nanoemulsão sobre o fungo na medida em que se aumenta a concentração da mesma.

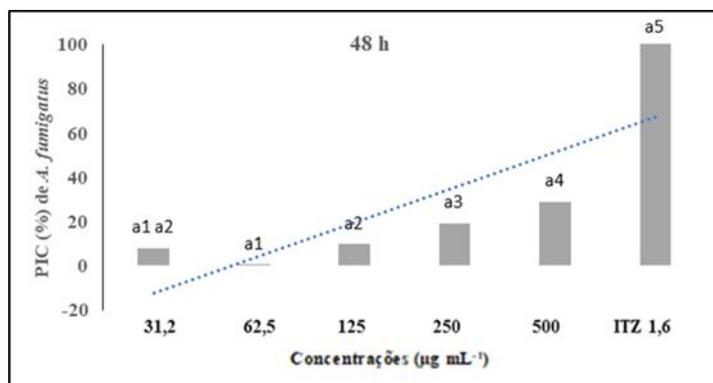
**Figura 11** - Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo de copaibeira sobre *Aspergillus fumigatus*, após 24h de inoculação. Diferenças entre números expressam a diferença significativa entre as médias a nível de 5% pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6) (Ferreira, 2014).



Fonte: Autores (2023).

A Figura 12 mostra o efeito inibitório da nanoemulsão de copaibeira sobre *A. fumigatus* após 48 h de inoculação. Onde já se observa uma diferença significativa entre as concentrações de 250 µg mL<sup>-1</sup> e 500 µg mL<sup>-1</sup>. Havendo destaque para a concentração de 500 µg mL<sup>-1</sup>. E, com tendência também de aumentar o efeito da nanoemulsão sobre o fungo, na medida em que se aumenta a concentração.

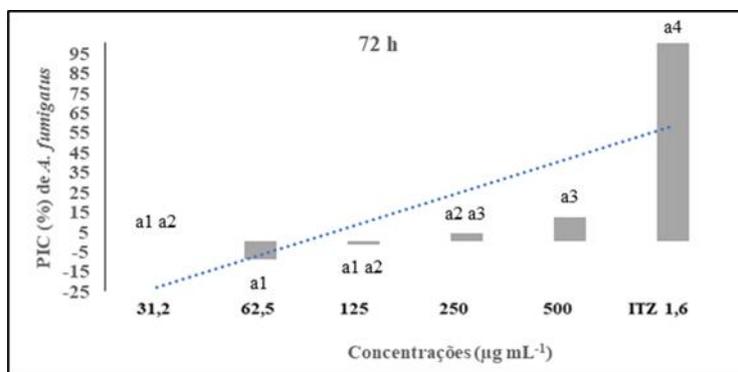
**Figura 12** - Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo de copaibeira sobre *Aspergillus fumigatus*, após 48h de inoculação. Diferenças entre números expressam a diferença significativa entre as médias a nível de 5% pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6) (Ferreira, 2014).



Fonte: Autores (2023).

A Figura 13 mostra o efeito inibitório da nanoemulsão de copaibeira sobre *A. fumigatus* após 72 h de inoculação. Neste momento verifica-se uma diminuição do efeito da nanoemulsão sobre o fungo.

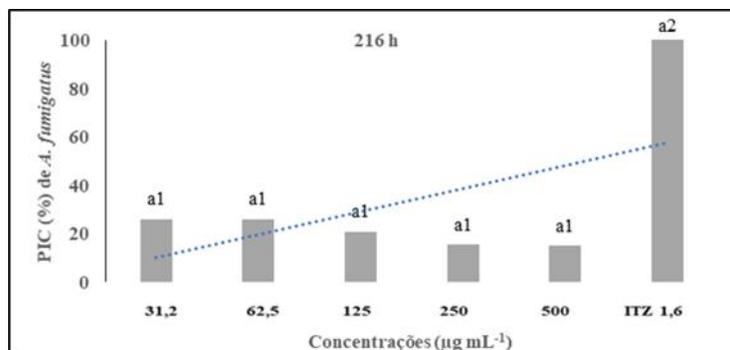
**Figura 13** - Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo de copaibeira sobre *A. fumigatus*, após 72h de inoculação. Diferenças entre números expressam a diferença significativa entre as médias a nível de 5% pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6) (Ferreira, 2014).



Fonte: Autores (2023).

Porém, o efeito torna-se semelhante entre todas as concentrações após 216 h (Figura 14), inclusive com tendência a aumentar na medida em que se aumenta a concentração da nanoemulsão. Não sendo verificadas, diferenças significativas entre as concentrações.

**Figura 14** - Efeito inibitório da nanoemulsão do óleo resina de copaibeira sobre *A. fumigatus*, após 216 h de inoculação. Diferenças entre números expressam a diferença significativa entre as médias ao nível de 5% pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa SISVAR (5.6) (Ferreira, 2014)



Fonte: Autores (2023).

### 3.4 Efeito fungicida do Itraconazol sobre o crescimento micelial de *A. fumigatus*

Observa-se que em todas as atividades o antifúngico do grupo dos azóis, o Itraconazol na concentração de 1,6 µg mL<sup>-1</sup>, causou um efeito fungicida sobre o crescimento micelial do isolado selvagem, *A. fumigatus*, apresentando 100 % de percentagem de inibição de crescimento micelial (PIC%) sobre esta espécie fúngica.

## 4. Discussão

O óleo de copaibeira nas primeiras 24 h, apresentou-se como potencial candidato para o tratamento de infecções causadas por *A. fumigatus*, demonstrando elevada eficácia, 100% de inibição do crescimento micelial (PIC %), em todas as concentrações avaliadas. Após 48 h apresentou maior eficácia na concentração de 6,0 µg mL<sup>-1</sup> e às 72 h, 71,57%, na concentração de 4,0 µg mL<sup>-1</sup> e 70,20% na concentração de 6,0 µg mL<sup>-1</sup>, não havendo diferença significativa entre estas duas concentrações. À medida que aumenta a concentração do óleo, aumenta o efeito inibitório sobre *A. fumigatus*.

Diversas atividades biológicas e farmacológicas foram reportadas em estudos experimentais utilizando-se o óleo de *Copaifera* spp., como 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. Nesses estudos, o óleo de copaíba, causou 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 exerceu atividade fungistática, apresentando um MIC entre 0,3-0,6 mg mL<sup>-1</sup>, sobre espécies do gênero *Candida*, como *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e dos gêneros *Trichophyton* e *Aspergillus*. Sobre o gênero *Aspergillus*, a atividade fungistática foi reportada sobre *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* (Santos et al. 2008; Deus et al., 2011) e *A. fumigatus* (Tobouti et al., 2017).

Embora Tobouti et al. (2017) e Selestino et al. (2017), tenham atribuído a atividade fungistática, ao sesquiterpeno  $\beta$ -cariofileno, principal componente do óleo resina de *Copaifera* spp., como inibidor do fungo filamentoso *A. fumigatus*, Diefenbach et al (2018), atribuiu esta atividade, à natureza lipofílica deste óleo, lipofilicidade essa que favoreceu a interação entre os componentes do óleo e os lipídios da parede e membrana celulares fúngica, interferindo em sua permeabilidade e causando mudanças estruturais, o que provavelmente possa ter ocorrido com *A. fumigatus*, em estudo.

Segundo Fonseca et al. (2015), o óleo de copaibeira é composto predominantemente dos sesquiterpenos,  $\beta$ -bisaboleno, Z- $\alpha$ -bergamoteno e  $\beta$ -cariofileno, e de acordo com Leandro et al. (2012); Souza et al. (2011); Goren et al. (2011) e Souza et al. (2010), os diterpenos, ácidos copálico, polialtico, hardwickico, kaurenóico e ent-kaurenóico apresentam atividade antimicrobiana sobre fungos e bactérias.

É importante ressaltar que nem todos os testes antimicrobianos foram desenvolvidos com o composto isolado do óleo de copaibeira. Muitos estudos, usam estas substâncias isoladas de outras plantas ou compostos adquiridos comercialmente. Esse fato, reforça a necessidade de mais estudos usando-se os componentes do óleo de copaibeira para se esclarecer o mecanismo de ação sobre microrganismos, bem como a necessidade de se estudar a combinação entre os compostos, os quais poderiam explicar a forte atividade de seu óleo fixo (Tobouti et al., 2017). Além do fato, de diversas doenças tidas como negligenciadas, poderem ser tratadas com o óleo resina de copaibeira, considerado um potente candidato na formulação dos mais variados produtos farmacêuticos (Lima et al., 2021). Cardinelli et al. (2023) afirma com base em seu estudo, que ainda exista a necessidade de se realizar novas pesquisas sobre terpenos isoladamente, de forma a conhecer seu mecanismo de ação. Adicionando-se a isso, a necessidade de realização de novos estudos toxicológicos in vivo mais robustos, a fim de se garantir a dose segura do óleo resina de copaíba, principalmente devido à falta de estudos clínicos em humanos.

A avaliação do efeito inibitório da nanoemulsão de *C. reticulata*, formulada em água, surfactante hidrofílico Tween 80 e o óleo resina de copaibeira, obtendo-se uma nanoemulsão em O/A, com característica azulada e transparente com tamanhos de gotículas variando entre  $132,9 \pm 0,8544$  e  $144,5 \pm 1,852$ , durou 7 dias. A ação inibitória desta nanoemulsão sobre *A. fumigatus*, foi maior e significativa nas primeiras 24 h, nas concentrações de 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em relações às demais concentrações. Apesar da concentração de 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , ter sido mais eficaz em relação às demais concentrações na avaliação efetuada às 48 h, a partir das 72 h o efeito inibitório diminuiu e retornou a partir das 216 h, quando todas as concentrações apresentaram o mesmo efeito sobre *A. fumigatus*. De acordo com Alencar et al. (2015), emulsões nanoestruturadas compostas com óleo resina e óleo essencial de *Copaifera* spp., melhoraram a atividade antimicrobiana dos óleos puros, especialmente sobre *Staphylococcus* e *Candida*, resistentes a azoles. Em seu estudo, os autores conseguiram, através da análise de CG-MS, identificar os componentes do óleo resina e essencial de *Copaifera* spp. O ensaio de MIC, associado com a autobiografia, revelou que alguns ésteres dos ácidos oleico e palmítico,  $\alpha$ -curcumene,  $\alpha$ -himachalene, isothujol e  $\alpha$ -fenchene, provavelmente tenham inibido algumas destas linhagens.

Nanoencapsulações têm melhorado também, a atividade antifúngica do óleo de *Copaifera* spp., reforçada pela presença de alantoína, cujas MICs obtidas, foram comparáveis às dos produtos comerciais, apresentando-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). Dias et al. (2012) relatam que o desenvolvimento de uma nanoemulsão com o óleo resina de *Copaifera* spp. foi importante, para a estabilidade de  $\beta$ -cariofileno. Visto que, reduzida degradação de cariofileno proveniente de uma nanoemulsão, foi observada no óleo resina de *Copaifera* spp., disperso através de uma fase interna após a hidrólise ácida, exposta a condições de irradiação UV-A, oxidativa ( $H_2O_2$ ) e termolítica (60°C), quando comparada ao conteúdo de  $\beta$ -cariofileno, após a exposição nas mesmas condições.

Denning e Stevens (1990) afirmam que, os azóis não apresentam boas respostas como antifúngicos, embora alguns autores indiquem o Itraconazol associado à corticoterapia, para reduzir a dosagem de corticoides; pois apresentaram menores efeitos colaterais como vantagens, quando comparado à Anfotericina B (corticoide). Lopes et al. (2004) relatam que o Itraconazol na dose de 200 mg, ministrada duas vezes ao dia, pode substituir a anfotericina B, quando a dose resposta terapêutica inicial não for atingida ou quando houver intolerância à anfotericina B.

De acordo com Mowat et al. (2008), *A. fumigatus* sofre transição morfológica ao longo de seu crescimento e desenvolvimento, implicando diretamente na eficácia do tratamento antifúngico. Estes autores testaram a atividade antifúngica *in vitro* de voriconazol, anfotericina B e caspofungina contra três fases específicas do desenvolvimento multicelular de *A. fumigatus*. A atividade resultante dos três antifúngicos foi efetuada num ensaio de redução de XTT para avaliar os perfis de suscetibilidade de end point e time-kill. O teste de suscetibilidade de ponto final, demonstrou uma diminuição dependente do tempo na eficácia dos três agentes antifúngicos à medida em que a complexidade da estrutura hifálica do *A. fumigatus* se desenvolveu. No geral, a anfotericina B exibiu melhor espectro de atividade em cada fase de crescimento, mas comparável ao voriconazol contra o crescimento de conídios germinados (8 h). Posteriormente, o voriconazol e a caspofungina foram ineficazes contra estruturas miceliais complexas (12 h e 24 h). Nos estudos de time-kill foi demonstrado que a anfotericina B foi significativamente mais eficaz na redução do metabolismo de *A. fumigatus* do que voriconazol e caspofungina para todas as três fases de crescimento examinadas, principalmente após 1 h de exposição à droga (P <0,001). Em geral, os dados apresentados demonstraram que o tratamento de células de *A. fumigatus* em crescimento ativo com agentes antifúngicos é mais eficiente do que o tratamento de estruturas maduras *in vitro*. E que, a anfotericina B foi consistentemente mais eficaz contra cada fase e exibiu efeitos rápidos e, portanto, pode ser uma opção adequada para gerenciar grupos de pacientes em risco de infecções por aspergilose.

Van de Sande et al. (2010) afirmam que o teste de suscetibilidade para *A. fumigatus* geralmente é realizado com suspensão de conídios fúngicos. No entanto, a avaliação da suscetibilidade das hifas fúngicas pode ser mais relevante na tentativa de mimetizar o estado fúngico em tecidos infectados. Porém, em seus estudos utilizando 12 isolados clínicos de *A. fumigatus* e uma cepa ATCC, as suscetibilidades antifúngicas de suspensões de conídios, suspensões de fragmentos de hifas e de aglomerados de hifas, foram determinadas pelo ensaio de suscetibilidade em caldo baseado em XTT medindo a diminuição da atividade metabólica fúngica. A anfotericina B inibiu os conídios e fragmentos de hifas de *A. fumigatus* de maneira dependente da concentração, com concentrações inibitórias (ICs) de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  para ambas as estruturas fúngicas, enquanto os aglomerados de hifas foram inibidos a  $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Os fragmentos de conídios e hifas foram inibidos pelos azólicos itraconazol e voriconazol de forma mais gradual dependente da concentração, com ICs de  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  para ambas as estruturas com ambos os agentes, enquanto que os aglomerados de hifas não foram inibidos pelos azóis. A caspofungina inibiu o *A. fumigatus* de forma moderada, nem abrupta nem gradual, dependente da concentração. Os ICs para conídios foram de  $128 \mu\text{g mL}^{-1}$  e a inibição da atividade metabólica não foi obtida para ambas as formas de crescimento das hifas. A suscetibilidade antifúngica dos conídios também foi determinada utilizando-se este teste. E, no qual foi descoberto que o ensaio XTT deu ICs comparáveis

para anfotericina B, itraconazol e voriconazol, mas não para caspofungina (Van de Sande et al., 2010). Nesse estudo, utilizou-se o Itraconazol na concentração de  $1,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ , com inibição de 100% do crescimento micelial (PIC%) da cepa selvagem de *A. fumigatus*. Assim como, obteve-se também ao final deste estudo eficiência do óleo e de uma nanoemulsão à base de uma planta medicinal, denominada *C. reticulata*, sobre esta espécie fúngica.

Wei (2022) afirma que cepas de *A. fumigatus* resistentes aos azóis representam grande desafio para a quimioterapia contra a aspergilose invasiva, visto que a mutação do gene *cyp51A* é reconhecida como o mecanismo mais dominante para resistência aos azóis. Além disso, a matriz extracelular (MEC) do biofilme resultante de mudanças morfológicas ao longo do desenvolvimento de *A. fumigatus*, contribui para a resistência e proteção das células vivas desta espécie fúngica, aos medicamentos antifúngicos. Wei (2022), realizou um estudo proteômico comparativo da MEC do biofilme de cepas de *A. fumigatus* selvagem e resistente a azóis sob pressão de azóis, identificando 2.377 proteínas, das quais 480 e 604 proteínas com expressões diferenciais, foram obtidas de *A. fumigatus* do tipo selvagem e resistente aos azóis, em exposição ao Itraconazol, respectivamente (variação de dobra  $> 2$  ou  $< 0,5$ , valor  $P < 0,05$ ). Wei (2022) descobriu que alta proporção de proteínas reguladas, estava localizada no citoplasma, núcleo e mitocôndrias. Enquanto isso, as análises GO e KEGG revelaram que o processo metabólico e a via ribossomal foram significativamente enriquecidos. E que, particularmente, as proteínas expressas diferencialmente em resposta à pressão de azóis, tanto do tipo selvagem quanto das cepas resistentes, foram analisadas posteriormente. Indicando que essas alterações nas proteínas da Matriz Extracelular do biofilme, estavam relacionadas à síntese de ergosterol, estresse oxidativo, bombas de efluxo, reparo do DNA, replicação do DNA e transcrição.

Porém, Watanabe et al. (2022) afirmam que, os mecanismos moleculares que induzem a resistência a azóis ainda permanecem obscuros. Visto que, ao realizarem uma análise genômica comparativa entre as cepas com a mesma mutação *cyp51A* isoladas do mesmo paciente, mas com diferentes padrões de resistência a azóis, outra mutação foi encontrada, a INSIG. Concluindo que a mesma, contribui juntamente com a *Cyp51A*, para a resistência de *Aspergillus fumigatus* a este grupo de antifúngicos.

## 5. Conclusão

O óleo resina de copaibeira apresentou potencial inibição do crescimento micelial do *A. fumigatus*, apresentando-se como forte candidato no tratamento de infecções por este fungo.

A nanoemulsão à base de óleo de copaibeira, apresentou-se potencialmente inibidora do crescimento micelial de *A. fumigatus* nas primeiras 24 h, tendendo a diminuir sua eficácia nas 72 h, voltando a demonstrar seu efeito a partir das 216 h, quando todas as concentrações passam a apresentar o mesmo efeito sobre esta espécie fúngica.

## Agradecimentos

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Embrapa Amapá, à Universidade Federal do Amapá, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e ao Laboratório de Microbiologia: Interação Planta-Praga do Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília.

## 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. (2015). Chemical Characterization and Antimicrobial Activity Evaluation of Natural Oil Nanostructured Emulsions. *Journal Nanoscience Nanotechnology*. (1), 880-8.
- Baquião, A. C., Zorzete, P., Reis, T. A., Assunção, E., Vergueiro, S. & Correa, B. (2012). Mycoflora and mycotoxins in field samples of Brazil nuts. *Food Control*, 28, 224-229.
- Braga, W. F., Resende, C. M., Antunes, O. A. C. & Pinto, A. C. (1998). Terpenoids from *Copaiba cearensis*. *Phytochemistry*, 49, 263-264.

- 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. *International Journal Food Microbiology*, 160, 267-272.
- Camargo, M. F. P. (2008). 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 (Mestrado), Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Cardinelli, C. C., Almeida e Silva, J. E., Ribeiro, R., Veiga-Júnior, V. F., Santos, E. P. dos & Freitas, Z. M. F. de. (2023). *Plants*, 12, 1054. <https://doi.org/10.3390/plants12051054>.
- Cascon, V. & Gilbert, B. (2000). Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf. *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. *Phytochemistry*, 55, 773-778.
- Costa, A. K. F., Freire, F. C. O., Vieira, I. G. P., Andrade, J. A. & Mendes, F. N. P. (2009). Fungos associados à castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bompl) e ao amendoim (*Arachis hypogaea* L.) comercializados em Fortaleza (Ceará). *Revista de Ciências Agrônômicas*, Fortaleza, 40(3), 455-460, jul-set.
- Denning, D. W. & Stevens, D. A. (1990). Antifungal and surgical treatment of invasive aspergillosis: review of 2121 published cases. *Rev. Infectology Disease*, 12, 1147-1201.
- Deus, R., Alves, C. & Arruda, M. (2011). Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 13 (1) 1-7.
- 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. (2012). optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of  $\beta$ -cayophyllene in a nanoemulsion dosage form prepared with copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil. *Analytical Chemical Acta*, 721, 79-84.
- Diefenbach, A. L., Muniz, F. W. M. G., Oballe, H. J. R. & Rösing, C. K. (2018). Antimicrobial activity of copaiba oil (*Copaifera* spp.) on oral pathogens: Systematic review. *Phytotherapy Research*, 32(4), 586-596.
- Farnsworth, N. R. (1996). Biological and phytochemical screening of plants. *Journal of Pharmaceutical Science*, 55(3), 225-76.
- Fernandez, P., André, V., Rieger, J. & Kuhnle, A. (2004). Nanoemulsions formation by emulsions phase inversion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Amsterdam, 251, 53-58.
- Ferreira, D. F. (2014). Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiples comparisons. *Ciênc. Agrotec.* 38(2), 109-112. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>.
- Flora e Funga do Brasil. (2023). Base de dados. Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ). Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>.
- Fonseca, R. Y. G., Barros, F. M., Apel, M.vA, Poser, G. L., Andriolli, J. O, Filho, P. C, Souza, D. F. & Lobo, I. P. (2015). Physicochemical and antimicrobial properties of copaiba oil: implications on product quality control, *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 14(3), 215-225.
- Fortí, J. A. (1997). Aspectos patológicos, epidemiológicos y culturales de *Acremonium cucurbitacearum* Alfaro-García, W. Gams et J. García-Jiménez. Tesis (doctoral), Universidad Politécnica de Valencia, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Departamento de Producción Vegetal, Valencia, p. 183.
- Global Biodiversity Information Facility - GBIF. (2023). Base de dados. <http://gbif.org>
- Gonçalves, S. S., Stchigel, A. M., Cano, J. F., Godoy-Martínez, P. C, Colombo, A. L. & Guarro, J. (2012). *Aspergillus novoparasiticus*: a new clinical species of the section *Flavi*. *Medical Mycology*, 50,152-160.
- Goren, A. C, Piozzi, F., Akcicek, E., Kılıç, T., Çankçl, S., Mozio, Glu, E. & Setzer, W. N. (2011). Essential Oil composition of twenty-two *Stachys* species (mountain tea) and their biological activities, *Phytochemical Lettuce*, 4(4), 448-453.
- Gurgel, E. S. C., Oliveira, M. S., Souza, M. C., Silva, S. G., Mendonça, M. S. & Souza Filho, A.P.S. (2019). Chemical compositions and herbicidal (phytotoxic) activity of essential oils of three *Copaifera* species (Leguminosae-Caesalpinioideae) from Amazon-Brazil. *Industrial Crops and Products*, 142, 111850. [10.1016/J.INDCROP.2019.111850](https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2019.111850)
- Iamanaka, B. T., Nakano, F., Lemes, D. P., Ferrati, L. S. & Taniwaki, M. H. (2014). Aflatoxin evaluation in ready-to-eat Brazil nuts using reversed phase liquid chromatography and post column derivatisation. *Food Additional Contam. A*, 31, 917-923.
- Kaur, S. & Singh, S. (2014). Biofilm formation by *Aspergillus fumigatus*. Review Article. The International Society for Human and Animal Mycology 2013. *Medical Mycology*, 52(1), 2-9.
- Koshi, G. & Cherian, K. M. (1995). *Aspergillus terreus*, na uncommon fungus causing aortic root abscess and pseudoaneurysm. *Indian Heart Journal*, 47, 265-7.
- Leandro, L. M., Vargas, F. S., Barbosa, P. C., Neves, J. K, Silva, J. A. & Veiga-Júnior, V. F. (2012). Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins, *Molecules*, 17(4), 3866-3889.
- Lima, C. A. S., Povoas, I. M., Alves, W. K. S., Carvalho, F. T., Dias, N. da S., Anjos, T. R. dos, Andrade, K. R. N. C., Frasson, A. P. Z. de, Santos, M. D. dos & Carvalho, R. C. T. (2021). Atualizações sobre as propriedades medicinais do óleo de Copaíba (*Copaifera* spp.): uma Revisão Bibliográfica. *Uniciencias*, 25(2), 100-106. DOI: <https://doi.org/10.17921/1415-5141.2021v25n2p100-106>.
- Lopes, A. J, Jansen, U., Capone, D. & Jansen, J. M. (2004). Aspergiloses pulmonares. *Pulmão*, RJ, 13(1), 257-67.
- Martins-da-Silva, R. C. V., Silva, A. S. L., Fernandes, M. M. & Margalho, L. F. (2014). Noções morfológicas e taxonômicas para identificação botânica. Embrapa. 111p. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/992543/nocoes-morfologicas-e-taxonomicas-para-identificacao-botanica>

- Midorikawa, G. E. O., Sousa, M. L. M. Silva, O. F., Dias, J. 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. (2014). 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*, 14, 138.
- Mowat, E., Lang, S., Williams, C., McCulloch, E., Jones, B. & Ramage, G. (2008). Phase-dependent antifungal activity against *Aspergillus fumigatus* developing multicellular filamentous biofilms. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 62, 1281–1284. 10.1093/jac/dkn402.
- Mylonakis, E. & Calderwood, S. B. (2001). Infective endocarditis in adults. *The New England Journal of Medicine*, 345, 1318-30.
- Ohsaki, A., Yana, L.T, Ito, A. S, Edatsugib, H., Iwatab, D. & Komoda, A. Y. (1994). The Isolation and in vivo Potent Antitumor Activity of Clerodane Diterpenoid from the Oleoresin of the Brazilian Medicinal Plant, *Copaifera Langsdorfii* Desfon. *Biorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24 (4), 889-2892.
- Oliveira, J. M., Nunes, C. P. & Oliveira, P. C. (2002). 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.
- Paiva, L. A. F., Rao, V. S. N., Gramosa, N. V. & Silveira, E. R. (1998). Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorfii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. *Journal Ethnopharmacology*, 62, 73-78.
- Paiva, P. M, Guedes, M C. & Funi, C. (2011). *Forest Ecology and Management*, 261, 508-514.
- Pieri, F. A., Mussi, M. C. & Moreira, M. A. S. (2009). Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. *Revista Brasileira Plantas Medicinai*, 11(4), 465-472.
- Pinto, A. C., Braga, W. F., Rezende, C. M., Garrido, F. M. S., Veiga-Júnior, V. F., Bergter, L., Patitucci, M. L. & Antunes, O. A. C. (2000). Separation of Acid Diterpenes of *Copaifera cearenses* Huber ex Ducke by flash chromatography using potassium hydroxide impregnated silics gel. *Journal Brazilian Chemical Society*, 11, 355-360.
- Pitt, J. L. & Hocking, A. D. (2009). Fungi and spolage. Edition. New York, Springer.
- Rapper, K. B. & Fennell, D. L. (1973). The genus *Aspergillus*. Robert E. Krieger Publishing Co. Huntington, Nueva York.
- Recio, M.C., Rios, J.L., & Villar, A. (1989). A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988. *Phytotherapy Research*, 4(3), 117-25.
- Rodrigues, E. A. C. (1997). Infecções hospitalares: prevenção e controle. Sarvier. 28p.
- Rodrigues, R. M. (1989). A Flora da Amazônia. Belém-PA: CEJUP. 462p.
- 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*, 252, 27-32.
- Santos, A. O, Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, T., Veiga-Júnior, V. F., Pinto, A. C. & Nakamura, C. V. (2008). Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus, *Memorial Journal*, 103(3), 277-281.
- Selestino Neta, M. C, Vittorazzi, C., Guimarães, A. C, Martins, J. D. L, Fronza, M., Endringer, D. C. & Scherer, R. (2017). Effects of  $\beta$ -caryophyllene and *Murraya paniculata* essential Oil in the murine hepatoma cells and in the bacteria and fungi 24-h time-kill curve studies, *Pharmacology Biology* 55(1), 190-197.
- Souza, A. B., Souza, M. G., Moreira, M. A, Moreira, M. R, Furtado, N. A, Martins, C.H, Bastos, J.K.R.A., dos Santos, V.C., Heleno, S.R., Ambrosio, R.C. & Veneziani, R.C.S. (2011). Antimicrobial evaluation of diterpenes from *Copaifera langsdorfii* oleoresin against periodontal anaerobic bacteria, *Molecules*. 16(11), 9611-9619.
- Souza, P. A, Rangel, L. P., Oigman, S. S., Elias, M. M., Ferreira-Pereira, E. A., Lucas, N. C. & Leitão, G.G. (2010). Isolation of two bioactive diterpenic acids from *Copaifera glycyarpa* oleoresin by high-speed counter-current chromatography, *Phytochemical Analytical*, 21(6), 539-543.
- Stevens, D. A. (2001). 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*. (pp. 2092-94). Guanabara Koogan.
- Svetlichny, G, Küllkamp-Guerreiro, I. C, Cunha, S. L, Silva, Fé Bueno, K., Pohlmann, A. R., Fuentesfria, A. M., & Guterres, S. S. (2015). *Pharmazie*. Solid lipid nanoparticles containing copaiba Oil and allantoin: development and role of nanoencapsulation on the antifungal activity. *Mar*. 70(3), 155-64.
- Van de Sande, W. W. J., Tavakol, M., Van Vianen, W. & Bakker-Woudenberg, I. A. J. M. (2010). The effects of antifungal agents to conidial and hyphal forms of *Aspergillus fumigatus*. *Medical Mycology*. Feb; 48(1), 48-55. 10.3109/13693780802713497.
- Thomidis, T. & Filotheou, A. (2016). Evaluation of five essential oils as bio-fungicides on control of *Pilidiella granati* rot in pomegranate. *Crop Protection*. 89, 66-71. <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. (2017). Antimicrobial activity of copaiba oil: A review and a call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94, 93–99.
- Tropicos. (2023). Base de dados. Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org>.
- Watanabe, A., Arai, T. & Majima, H. (2022). New mechanism and detection methods for azole-resistant *Aspergillus fumigatus*: Emerging antifungal resistant fungi. *Medical Mycology*, 60, S10.

Wei, T., Zheng, N., Zheng, H., Chen, Y., Hong, P., Liu, W. & Liu, M. (2022). Proteomic Perspective of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* Biofilm Extracellular Matrix in Response to Itraconazole. *Medical Mycology*, 60, 10, Oct 16, myac084. 10.1093/mmy/myac084.

Veiga-Júnior, V. F., Rosas, E. C., Carvalho, M. V., Henriques, M. G & Pinto, A.C. (2007). 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, *Journal Ethnopharmacology*, 112 (2), 248-254.

Veiga-Júnior, V. F. & Pinto, A.C. (2002). O gênero *Copaifera* L. *Química Nova*, 25, 273-286.

Verghese, S., Mullasari, A. & Padmaja, P. (1998). Fungal endocarditis cardiac surgery. *Indian Heart Journal*, 50, 418-22.