

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

**CITOTOXICIDADE DE EMULSÃO DE LIMPEZA DE CAVIDADE À BASE DE
ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera Multijuga*)**

Bolsista: Juliette Salazar dos Santos - CNPq

MANAUS
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL
PIB – S/0074/2012
CITOTOXICIDADE DE EMULSÃO DE LIMPEZA DE CAVIDADE À BASE DE
ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera Multijuga*)

Bolsista: Juliette Salazar dos Santos - CNPq.
Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Fulgência Costa Lima Bandeira
Colaboradoras: Prof^a Dr^a Marne Carvalho de Vasconcellos
Prof^a MSc Cristiane Nagai Coelho

MANAUS
2013

RESUMO

A cárie é uma doença infecto-contagiosa de caráter multifatorial sendo necessária a intervenção do cirurgião-dentista para remoção de sua lesão, quando não ocorre o processo de remineralização. No tratamento, é necessário a realização do preparo cavitário, onde haverá a formação da *smear layer*. Após o preparo, são utilizados agentes de limpeza que diminuem a incidência de microrganismos, facilitando a retenção de materiais às estruturas dentárias, prevenindo a ocorrência de microinfiltração nas restaurações e, conseqüentemente, diminuindo a possibilidade de sensibilidade pós-operatória, manchamento marginal, fraturas marginais e injúrias ao complexo dentino-pulpar. A exigência do mercado na procura de produtos menos agressivos e naturais levou este trabalho a propor a avaliar a citotoxicidade de emulsão de limpeza de cavidade à base do óleo da copaíba *Copaífera multijuga*. O método de análise utilizado foi o teste de hemólise e o teste de cultura de células para avaliação da citotoxicidade das substâncias formuladas. Os resultados sugerem que a viabilidade celular, nas formulações a base do óleo de copaíba, se apresentou alta nas concentrações testadas, pois as substâncias não induziram a morte em percentual inferior a 66,6%, nos impossibilitando de calcular a concentração inibitória a 50%. Entretanto, os resultados mostram que, nas concentrações testadas, as formulações de Copaíba 10% + 1% de Tween e Copaíba 10% + 1,0% de Tween + 1% de DMSO são menos citotóxicas que a formulação Copaíba 10% + 1,5% de Tween. Os Autores concluíram que houve uma viabilidade celular alta nas concentrações testadas, sugerindo assim uma baixa citotoxicidade *in vitro* das amostras.

Palavras-chave: Agentes de Limpeza. Citotoxicidade. Óleo-Resina da Copaíba. *Copaífera multijuga*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	05
2. OBJETIVOS	06
2.1 Objetivo Geral	06
2.2 Objetivos Específicos	06
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	07
4. MATERIAIS E MÉTODOS	10
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
6. CONCLUSÕES	15
7. REFERÊNCIAS	16

1. INTRODUÇÃO

A cárie é uma doença infecto-contagiosa, de caráter crônico, causada pelo processo de desmineralização da superfície dental por ácidos orgânicos provenientes da fermentação dos carboidratos da dieta, pelas bactérias e influência de alguns fatores sociais e comportamentais. É assim, uma doença multifatorial, infecciosa, transmissível (LEITES *et al*, 2006; LIMA, 2007).

A doença cárie está relacionada a um processo de desmineralização e remineralização dos tecidos dentários (esmalte, dentina e cemento). Lesões de cárie que não permitem a realização de procedimentos de remineralização necessitam da intervenção invasiva do cirurgião-dentista. Essa intervenção preconiza a remoção da cárie previamente à confecção da reconstrução das estruturas perdidas, protegendo os remanescentes de novas agressões (FERREIRA, 2008; FRANCO *et al*, 2007).

Durante o preparo cavitário o procedimento de corte com instrumentos rotatórios sobre a dentina, há a formação de uma camada constituída de resíduos do substrato seccionado, sangue, saliva, bactérias, fragmentos do abrasivo e óleos dos instrumentos rotatórios denominada lama dentinária ou *smear layer* (REIS; LOGUERCIO, 2007).

A importância do uso de um agente de limpeza cavitária é para diminuir incidência dos microrganismos cariogênicos e assim prevenir a recorrência de cárie, facilitar a retenção de materiais às estruturas dentárias, prevenir a ocorrência de microinfiltração nas restaurações e, conseqüentemente, diminuir a possibilidade de sensibilidade pós-operatória, manchamento marginal, fraturas marginais e injúrias ao complexo dentino-pulpar.

Com base nas características do potencial anticariogênico do óleo da copaíba, a proposta desse trabalho foi obter uma solução de limpeza da cavidade a base do óleo da copaíba e avaliar a citotoxicidade das substâncias formuladas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a citotoxicidade *in vitro* de emulsão de limpeza de cavidade restauradora formulada a base do óleo da copaíba (*Copaifera multijuga*) na linhagem normal de fibroblasto humano MRC-5 através do teste do Alamar blue.

2.2 Objetivos Específicos

- Formular emulsão de óleo da copaíba na concentração 10%.
- Verificar a citotoxicidade das emulsões testes.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

É aceito e estabelecido universalmente que a cárie dentária é uma doença multifatorial, infecciosa, transmissível e dieta dependente, que produz uma desmineralização das estruturas dentárias. Com essa definição, por sua complexidade, torna-se muito difícil compreendê-la completamente (LIMA, 2007).

Antigamente, apesar de todos os elementos necessários para desenvolver a cárie estarem presentes, havia uma condição de desequilíbrio e reequilíbrio, representados pelo fenômeno da desmineralização e remineralização, mediadas pela saliva, que mantinha a estrutura do esmalte dentário intacta. Essa biodiversidade determinada pela presença de todos os elementos que influenciavam a fisiologia da cavidade bucal em condições naturais, como alimentação, microrganismos e secreção salivar, mantinha o equilíbrio homeostático (LIMA, 2007).

A manipulação dos alimentos naturais pelo ser humano fez com que muitas dessas propriedades ficassem prejudicadas, produzindo um desequilíbrio da biodiversidade da cavidade bucal, tornando-os cariogênicos (LIMA, 2007).

Deve-se definir cárie dentária como uma desmineralização irreversível do esmalte provocada pelo desequilíbrio frequente do fenômeno de des-re, durante um período de tempo, produzida pela ação de ácidos provenientes do metabolismo de carboidratos no biofilme dental, e que traz algum prejuízo ao indivíduo, caracterizado por sinais (LIMA, 2007).

Quanto maior o desequilíbrio, isto é, quanto maior a frequência de dieta cariogênica e maior o intervalo de tempo sem controle do biofilme, a lesão de mancha branca será mais intensa, chegando à cavitação do esmalte, determinando assim, uma lesão de cárie avançada (LIMA, 2007).

Lesões de cárie que não permitem a realização de procedimentos de remineralização necessitam da intervenção invasiva do cirurgião-dentista. O tratamento da cárie dentária consiste na sua remoção mecânica, pelo preparo cavitário, e posteriormente restauração do elemento dentário, protegendo as estruturas de novas agressões. Estudos evidenciam a permanência de resíduos e bactérias após o preparo cavitário, observando-se a importância do uso de um agente de limpeza cavitária para prevenir a recorrência de cárie, facilitar e retenção de materiais às

estruturas dentárias, assim prevenindo a ocorrência de microinfiltração nas restaurações. (FRANCO *et al*, 2007; MACHADO *et al*, 2012).

A limpeza cavitária é baseada na remoção de detritos oriundos do preparo, tais como raspas de dentina e esmalte, bactérias, pequenos fragmentos ou partículas abrasivas dos instrumentos rotatórios, e óleos provenientes dos aparelhos de alta e baixa velocidade. Assim, a limpeza tem a finalidade de dificultar a invasão bacteriana e desinfetar a cavidade, porém, não deve afetar a estrutura dos túbulos dentinários, para não modificar a permeabilidade dentinária (FRANCO *et al*, 2007; CAMILOTTI *et al*, 2013).

Esta contaminação pode interferir na qualidade de união entre materiais adesivos e o dente, com relação às propriedades físicas, aumentando a microinfiltração nas margens de restaurações adesivas. Em função dessa possibilidade, tem sido recomendado o uso de um agente antimicrobiano, na desinfecção das cavidades contaminadas, ou o uso de materiais restauradores capazes de inativar estas bactérias. Tal procedimento evitaria a recorrência de cáries, danos pulpares, hipersensibilidade e melhoraria a retenção dos materiais restauradores às estruturas dentais, diminuindo a microinfiltração nas restaurações (CAMILOTTI *et al*, 2013; BENGTON, 2008).

Uma solução de grande valor seria aquela que pudesse ser utilizada após a preparação cavitária e que desinfetasse a dentina, reduzindo o potencial de cáries residuais e a sensibilidade associada a elas. Os agentes mais comuns utilizados para limpeza de cavidades são a clorexidina 2%, o EDTA e a água destilada. A clorexidina tem sido a substância que apresenta melhores características para este fim, devido as suas propriedades (CAMILOTTI *et al*, 2013; FRANCO, 2007).

O uso da clorexidina na desinfecção de cavidade previamente à aplicação de materiais restauradores ou associada aos mesmos tem potencial antibacteriano no sentido de contribuir para a redução das bactérias residuais na cavidade e a diminuição da incidência da cárie secundária já foi comprovada. Contudo, tal benefício pode ser anulado caso a solução promova microinfiltração por interferir no mecanismo de adesão dos materiais aos tecidos dentais, como comprovado em outros estudos (Castro *et al*, 2010)

A utilização de plantas medicinais no Brasil remonta desde as antigas civilizações indígenas, muito antes da chegada dos primeiros europeus. Com o passar do tempo, o conhecimento empírico indígena sobre plantas medicinais foi se mesclando com o europeu e o

africano, constituindo dessa forma a baseada tradição no uso de plantas medicinais no Brasil (LORENZI; MATOS, 2002). As copaibas 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 (CARVALHO 2010). Os trabalhos realizados sobre o Gênero da *Copaifera*, em sua maioria, estão relacionados com as suas propriedades químicas e farmacológicas do óleo-resina secretado do tronco dessas árvores (VALDEVITE, 2007).

Este óleo é utilizado há muito tempo pelos índios para o tratamento de feridas, por sua ação anti-inflamatória, antisépticas, antibacterianas e antifúngicas. Devido a atividade biológica do óleo da copaíba especialmente a ação antibacteriana aos microrganismos da doença cárie, associou-se a utilização do óleo da copaíba com o processo restaurador (VASCONCELOS, 2006).

O Alamar Blue® é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedade redox, ou seja, de oxirredução, que muda de cor de azul a cor de rosa fluorescente na presença de organismos metabolicamente ativos crescentes. A forma oxidada é azul (não fluorescente/ célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável) (RIBEIRO *et al*, 2004; TIBALLI *et al*, 1995).

O teste de hemólise *in vitro* já foi empregado por diversos autores para a avaliação toxicológica de diferentes plantas (PEQUENO; SOTO BLANCO, 2006). Na investigação da ação de extratos vegetais, é importante determinar qualquer atividade hemolítica, pois é um indicador de citotoxicidade geral e de bioatividade. O ensaio de hemólise *in vitro* também tem sido empregada por muitos grupos diferentes para a avaliação toxicológica de diferentes plantas (OLIVEIRA *et al*, 2009)

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Método de coleta do óleo-resina da copaíba (*Copaifera multijuga*)

O óleo-resina da *Copaifera multijuga* foi extraído da reserva Ducke, no Km 17 da Rodovia Manaus-Itacoatiara, catalogada sob o n°.69 pelo Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA).

A coleta foi realizada pelo mateiro da reserva, consistindo na confecção de um furo por meio de um trado 7/8 polegada diâmetro e 1 metro de comprimento, à altura de aproximadamente 1 metro do chão, até o centro do caule onde se encontram os reservatórios do óleo-resina, com um pequeno declive para escoamento. Após esse procedimento, o óleo-resina foi coletado em um recipiente estéril previamente preparado para esse fim. Após a coleta, o orifício foi vedado com argila, procedimento de rotina realizado na reserva (BANDEIRA *et al*,1999).

4.2 Preparo das emulsões do óleo-resina da copaíba (*Copaifera multijuga*)

Emulsões de limpeza de cavidade a base do óleo-resina da *Copaifera multijuga* foram formuladas obedecendo às orientações do Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira (2012) nas concentrações 10%. Foram realizados três diferentes emulsões a base do óleo de Copaíba a 10% com diferentes associações.

4.3 Avaliação da citotoxicidade de emulsões do óleo-resina da *Copaifera multijuga*

4.3.1 Teste de hemólise

A citotoxicidade das emulsões da *Copaifera multijuga*, nas concentrações de 10% do óleo-resina da copaíba foram determinadas segundo Costa-Lotufo *et al* (2002), que permite avaliar o potencial das substâncias-teste em causar lesões na membrana plasmática da célula, seja pela formação de poros ou pela ruptura total.

O sangue foi coletado de um camundongo Swiss (*Mus musculus*) por via do plexo orbital (altamente vascularizado), sendo diluído em 30 volumes de solução salina (NaCl 0,85% + CaCl₂ 10mM). Os eritrócitos foram lavados duas vezes em solução salina por centrifugação (1500rpm/

3min.) para redução da contaminação plasmática, e ressuspensos em solução salina para obtenção de uma suspensão de eritrócitos (SE) a 2%. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços. Cada poço da 1ª coluna recebeu 100µL da solução salina. Na 2ª, os poços receberam 50µL da solução salina e 50µL do veículo de diluição da substância teste, neste caso, DMSO 10%. Aos poços da 3ª coluna, foram adicionados 100 µL de solução salina e 100 µL das substâncias teste em solução. Da 4ª coluna em diante os poços receberam 100 µL da solução salina, excetuando-se os da última coluna, que receberam 80µL de solução salina e 20 µL de Triton X – 100 1% (controle positivo). As diluições foram feitas dos poços da 3ª à 11ª coluna, retirando-se 100 µL da solução da cavidade anterior e transferindo para a seguinte de modo que as concentrações foram sempre diluídas pela metade, variando de 15,6 a 2000 µg/mL. Em seguida, 100 µL da SE 2% foram plaqueados em todos os poços. Após incubação de 1h, sob agitação constante à temperatura ambiente ($26 \pm 2^{\circ}\text{C}$), as amostras foram centrifugadas (3000rpm/ 10min.) e o sobrenadante transferido para outra placa para a leitura da absorbância no espectrofotômetro de placas a 540nm.

4.3.2 Teste de cultura de células

A citotoxicidade dos produtos foram testados frente a linhagem normal de MRC-5 (fibroblasto humano), através do teste de Alamar Blue™ (AHMED *et al*, 1994). A linhagem MRC-5 foi cultivada em meio DEMEN, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico, e mantida em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂. As amostras foram dissolvidas em dimetil-sulfóxido (DMSO) e testadas a partir de 50µg/mL.

O Alamar Blue é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox. Em células em proliferação o Alamar Blue é reduzido. A forma oxidada é azul e não-fluorescente (indicando célula não viável) e a forma reduzida é rósea e fluorescente (indicando célula viável).

O teste do Alamar Blue foi realizado conforme metodologia descrita por Ahmed *et al* (1994) com o intuito de se analisar a viabilidade celular da célula testada (MRC-5 – fibroblasto humano) na presença de diferentes concentrações das substâncias testadas.

As células foram cultivadas em garrafa de cultura com meio DMEM completo. Elas foram contados em câmara de Neubauer e plaqueados em placas de 96 poços, cada poço contendo 1×10^4 células em 200 µL de meio de cultura. A placa foi então incubada em estufa por 24 h,

período necessário para que ocorra a adesão das células na placa, a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Após este tempo, as células foram tratadas, por setenta e duas horas. A Doxorrubicina foi usada como controle positivo. O grupo controle recebeu no poço a mesma quantidade de DMSO da maior concentração do extrato. Passadas 24 h de tratamento, 10 µL da solução de uso de Alamar Blue (solução estoque 0,4 % 1:5 em meio de cultura sem soro fetal bovino) foi adicionada em cada poço da placa. Após 3 h de exposição ao Alamar Blue, retirando da estufa meia hora antes do término, a fluorescência foi medida usando-se um leitor de placas de Elisa (marca Beckman e Coulter). Os dados foram analisados em relação ao controle negativo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um agente de limpeza ideal deve remover a smear layer, não ser tóxico à polpa e aos tecidos adjacentes ao dente, facilitar a remoção dos agentes protetores, combater e eliminar microrganismos patogênicos existentes nas paredes cavitárias (FRANCO *et al.* 2007) e ainda não interferir na adesão dos materiais restauradores à estrutura dental.

A tabela 1 demonstra viabilidade celular das formulações a base do óleo de copaíba no teste de cultura de células, sendo considerada alta nas concentrações testadas, pois as substâncias não induziram a morte em percentual inferior a 66,6%, nos impossibilitando de calcular a concentração inibitória a 50%. Entretanto, os resultados mostraram que, nas concentrações testadas, as formulações de Copaíba 10% + 1% de Tween e Copaíba 10% + 1,0% de Tween + 1% de DMSO são menos citotóxicas que a formulação Copaíba 10% + 1,5% de Tween.

Concentração	Copaíba 10% + 1% de Tween	Copaíba 10% + 1,5% de Tween	Copaíba 10% + 1,0% de Tween + 1% de DMSO
DMSO	100	100	100
0,781	100	98,922	100
1,562	100	98,435	99,619
3,125	100	97,193	99,991
6,25	100	96,530	97,164
12,5	100	94,950	100
25	100	88,270	93,587
50	81,357	66,636	73,612

Tabela 1. Valores da viabilidade celular calculada a partir do resultado do controle negativo e expressa em porcentagem.

A tabela 2 sugere que as formulações com conservante B e C não causaram citotoxicidade e com conservante A, no maior volume testado, encontra-se mais de 50% de citotoxicidade em células normais.

Concentração	Copaíba 10% + Tween 1,5% + Conservante A	Copaíba 10% + Tween 1,5% + Conservante B	Copaíba 10% + Tween 1,5% + Conservante C
DMSO	100	100	100
0,781	100	100	100
1,562	100	100	100
3,125	100	100	100
6,25	100	100	100
12,5	100	100	100
25	96,4	100	100
50	41	100	98

Tabela 2. Valores da viabilidade celular calculada a partir do resultado do controle negativo e expressa em porcentagem.

A ausência de trabalhos na literatura sobre solução de limpeza a base de óleo de copaíba restringe a discussão, entretanto GOMES *et al* (2007) compararam a atividade antinoceptiva de dois óleos amazônicos (*Copaifera multijuga* Hayne e *Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae), onde avaliaram camundongos que receberam por via oral 500 mg/kg de óleo de *Copaifera multijuga* e constataram que não houve efeitos tóxicos. Isso colabora com os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a emulsão de limpeza de cavidade restauradora formulada a base do óleo da copaíba (*Copaifera multijuga*) nas concentrações testadas não produziram efeito citotóxico.

O teste de hemólise foi observado indução de hemólise por todas as substâncias testadas, entretanto, por se tratar de uma formulação que contém o detergente Tween, é esperado que o rompimento de membrana de eritrócitos possa ocorrer. Estes resultados foram divergentes aos trabalhos Costa-Lotufo *et al* (2002), que avaliaram um isolado do óleo-resina da *Copaifera langsdorffii*, ácido karenóico, que proporcionou lise celular em 50% dos eritrócitos humanos

Coelho 2011 demonstrou atividade hemolítica da emulsão do óleo de copaíba nas diferentes concentrações, 10%, 10% com PB, 30% e 30% com PB, semelhante à pesquisa de

Costa-Lotufo *et al* (2002), que avaliaram um isolado do óleo-resina da *Copaifera langsdorffii*, ácido karenóico, que proporcionou lise celular em 50% dos eritrócitos humanos com 54,6µM.

O óleo-resina da copaíba in natura testado por Coelho (2011) não apresentou atividade hemolítica significativa, discordando da pesquisa de Costa-Lutufo *et al* (2002). Este fato pode estar relacionado a ausência de um detergente para quebrar as macromoléculas do óleo de copaíba em micromoléculas, possibilitando o contato do óleo de copaíba com a solução de eritrócitos e assim proporcionar lise celular.

O trabalho de Pequeno; Soto-blanco (2006) avaliaram a ação hemolítica de plantas consideradas tóxicas, e as mesmas não apresentaram atividade de lise celular, considerando que o teste não pode ser aplicado com segurança na avaliação preliminar de plantas tóxicas, sendo ainda necessário a utilização de animais.

O Tween 80 foi o veículo utilizado na formulação das emulsões e é um surfactante não-iônico, tóxico para as membranas biológicas, constituído por ésteres de ácidos graxos de polioxietileno sorbitol. Segundo Domingues *et al* (2000), o Tween 80 utilizado como veículo é tóxico na cultura de células, isto possivelmente está relacionado a sua capacidade de alterar a morfologia e a superfície da parede celular devido a sua ação detergente. O que corrobora com os resultados do presente estudo, onde a emulsão com veículo Tween a 1,5 % foi mais citotóxica que a emulsão que utilizou Tween a 1%.

Em exposições pulpares, estudos *in vivo* confirmaram que as soluções salina e de hidróxido de cálcio são menos citotóxicas, ou seja, menos agressivas à polpa, sendo as mais utilizadas na maioria dos estudos, entretanto não possuem atividade antibacteriana, em contrapartida a clorexidina é antibacteriana, mas não é tão eficaz no controle da hemorragia (CARVALHO *et al*, 2012).

Correlacionando os resultados de vários estudos realizados com óleo de copaíba, principalmente a atividade antibacteriana (BANDEIRA *et al*, 1999; VEIGA *et al*, 2007 e GOMES *et al*, 2007) e a baixa citotoxicidade apresentada na cultura de células das emulsões do óleo-resina da copaíba do presente estudo, principalmente as associadas a Tween a 1%, é possível sugerir que existe a viabilidade de utilizar as mesmas concentrações das emulsões testes para aplicação clínica, necessitando, ainda, de maiores investigações principalmente para ser utilizado em cavidades com exposição pulpar sem causar hemólise.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados pode-se concluir por meio dos testes de cultura de célula e de hemólise que, as emulsões a base do óleo de copaíba a 10% apresentaram viabilidade celular alta nas concentrações testadas, principalmente nas formulações associadas ao Tween a 1%. Contudo, por mais que tenha ocorrido hemólise em todas as formulações testadas, os resultados obtidos sugerem um avanço na busca da formulação de uma emulsão de limpeza cavitária a base do óleo de copaíba, principalmente se não houver exposição pulpar.

REFERÊNCIAS

- AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple nonradioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternativeto [3H]thymidine incorporation assay. *Journal of immunological methods*, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.
- BANDEIRA, M.F.C.L.; OLIVEIRA, M.R.B.; BENALTTI-NETO C.; CAMELLI Lia, R.C. Estudo comparativo da compatibilidade biológica em molares de rato do óleo essencial e da resina da *Copaifera multijuga* (óleo de copaíba) associados ao hidróxido de cálcio. *J Bras Clin Estet Odontol*, v.3, n.16, p. 42-49, 1999.
- BENGTON, C. R. G.; BENGTON, A. L.; BENGTON, N. G.; TURBINO, M. L. Efeito da Clorexidina 2% na Resistência de União à Dentina Humana. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr, João Pessoa*, v. 8, n. 1, p. 51-56, 2008.
- CAMILOTTI, V.; IORIS, M. D.; BUSATO, P. M. R.; UEDA, J. K.; MENDONÇA, M. J. Avaliação da influencia da solução de irrigação na resistência adesiva de um cimento resinoso. *Rev Odontol UNESP*, v. 42, n. 2, p. 83-88, 2013.
- CARVALHO, A. C. M; FREITAS, M. L. M.; MORAES, S. M. B.; MORAES, M. L. T.; Stranghetti, V.; Alzate-Marin, A. L.; Sebbenn, A. M. Diversidade genética, endogamia e fluxo gênico em pequena população fragmentada de *Copaifera langsdorffii*. *Revista Brasil Bot.*, v. 33, n. 4, p. 599-606, 2010.
- CARVALHO, CN; FREIRE, LG; NAKAMURA, V; GAVINI, G. Portadores de polpa viva: uma revisão da literatura. *Rev. Ciênc. Saúde, São Luís*, v.14, n.1, p. 40-52, 2012.
- CASTRO, MFS; COSTA, JF; COSTA. EL; PADILHA, LN; LOPES, FF. Efeito da clorexidina na adesão do cimento de ionômero de vidro utilizado em restaurações atraumáticas através de teste de microinfiltração. *RGO - Rev Gaúcha Odontol.*, Porto Alegre, v. 58, n. 2, p. 167-171, 2010.
- COELHO, C. N. E mulsões amazônicas bioativas para limpeza do preparo cavitário: atividade antibacteriana, citotoxicidade, alteração de cor e compatibilidade biológica. 2011. Dissertação (Universidade Federal do Amazonas. Mestrado em Ciências da Saúde). 146p
- COSTA-LOTUFO, L. V; CUNHA, G. M. A; FARIAS, P. A. M.; VIANA, G. S. B; CUNHA, K. M. A.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; GRAMOSA, N. V.; RAO, V. S. N. The Cytotoxic

and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleoresin. *Toxicon*, n. 40, p. 1231-1234, 2002.

DOMINGUES, F. C. et al. The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme and Microbial Technology*., v. 26, p. 394-401, 2000.

Formulário nacional da farmacopeia brasileira /Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2ª edição, Brasília: ANVISA, 2012.

FERREIRA, D. C. Relação entre questões nutricionais e cárie dentária. Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial para obtenção do Certificado de Especialização em Saúde Pública, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Lume - Repositório Digital, 2008.

FRANCO, A. P. G; SANTOS, F. A; MARTINS, G. C.; PILATTI, G.; GOMES, O. M. M.; GOMES, J. C. Desinfecção de cavidades com clorexidina. *Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde*, Ponta Grossa, v. 13, n. 1-2, p 53-58, 2007.

GOMES, N. M. et al. Antinociceptive activity of Amazonian Copaíba oils. *J. Ethnopharmacol.*, v. 109, n. 3, p. 486–492, 2007.

LEITES, A. C. B. R.; PINTO, M. B; SOUZA, E. R. Aspectos microbiológicos da cárie dental. *Salusvita*, Bauru, v. 25, n.2, p. 239-252, 2006.

LIMA, J. E. O. Cárie dentária: um novo conceito. *Rev Dental Press Ortodon Ortop Facial*. Maringá, v. 12, n. 6, p. 119-130, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2ª edição, Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

MACHADO, M. S.; OLIVEIRA, S. S.; CERETTA, R. A. Prevalência e Prevenção da Cárie Dental: Um relato de Experiência, p. 122-128, 2012.

OLIVEIRA, V. M. A.; CARNEIRO, A. L. B.; CAUPER, G. S. B.; POHLIT, A. M. *In vitro* screening of Amazonian plants for hemolytic activity and inhibition of platelet aggregation in human blood. *Acta Amaz.*, vol.39, n.4, p. 973-980, 2009.

PEQUENO N. F.; SOTO-BLANCO B. Toxicidade in vitro de plantas tóxicas: avaliação do teste de ação hemolítica. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 34, n.1, p. 45-48, 2006.

REIS, A.; LOGUERCIO, A.D. Materiais Dentários Diretos: dos Fundamentos à Aplicação Clínica. 1ª edição, São Paulo: Santos, 2007.

RIBEIRO, M. O.; GOMES, M. S.; SENNA, S. G.; ROSSETTI, M. L. R.; FONSECA, L. S. Avaliação de testes rápidos em microplacas usando indicadores de viabilidade celular para determinação da susceptibilidade de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* à isoniazida e rifampicina. *Journal Bras. Pneumol.*, v. 30, n. 4, p. 455-460, 2004.

TIBALLI, R. N.; HE, X.; ZARINS, L. T.; REVANKAR, S. G.; KAUFFMAN, C. A. Use of a Colorimetric System for Yeast Susceptibility Testing. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 3, n. 4, p. 915-917, 1995.

VALDEVITE, L.M. Estudo do efeito in vitro de extrato das folhas e do óleo-resina de copaíba sobre fatores de virulência de *Streptococcus mutans*, relacionado a cárie dental. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Instituto de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

VASCONCELOS, K.R.F. Avaliação in vitro da atividade antibacteriana de um cimento obtido da associação do óleo-resina in natura da *Copaifera multijuga* ao óxido de zinco e ao hidróxido de cálcio frente aos *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguinis*. Dissertação de Mestrado em Patologia Tropical - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2006.

VEIGA JR, 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 Ethnopharm*, v. 112, n. 2, p. 248-254, 2007.