



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

**EMULSÃO DE *Copaifera multijuga* Hayne PARA LIMPEZA DE
PREPARO CAVITÁRIO: CONTROLE DE QUALIDADE
FÍSICO-QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA**

PATRÍCIA SÂMEA LÊDO LIMA MILÉRIO

MANAUS – AM

2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

PATRÍCIA SÂMEA LÊDO LIMA MILÉRIO

**EMULSÃO DE *Copaifera multijuga* Hayne PARA LIMPEZA DE
PREPARO CAVITÁRIO: CONTROLE DE QUALIDADE
FÍSICO-QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Fulgência Costa Lima Bandeira

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Nikeila Chacon de Oliveira Conde

MANAUS – AM

2015

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Milério, Patrícia Sâmea Lêdo Lima
M642e Emulsão de Copaifera multijuga Hayne para limpeza de preparo
cavitário: controle de qualidade físico-químico e avaliação da
atividade antibacteriana / Patrícia Sâmea Lêdo Lima Milerio. 2015
93 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Maria Fulgência Costa Lima Bandeira
Coorientadora: Nikeila Chacon de Oliveira Conde
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal
do Amazonas.

1. Medicamentos fitoterápicos. 2. controle de qualidade. 3. dentística
operatória. 4. atividade antibacteriana. I. Bandeira, MariaFulgência
Costa Lima II. Universidade Federal do Amazonas III.Título

PATRÍCIA SÂMEA LÊDO LIMA MILÉRIO

**EMULSÃO DE *Copaifera multijuga* Hayne PARA LIMPEZA DE
PREPARO CAVITÁRIO: CONTROLE DE QUALIDADE
FÍSICO-QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovada em 20 de janeiro de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Fulgência Costa Lima Bandeira, Presidente
Universidade Federal do Amazonas

Prof^a. Dr^a Fábio Correa Sampaio, Membro
Universidade Federal da Paraíba

Prof^a. Dr^a. Carina Toda, Membro
Universidade Federal do Amazonas

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a **DEUS**, pela minha vida, por estar comigo em todos os momentos, pela realização desse trabalho, pelo aprendizado que adquiri e por ter mostrado o caminho, nos momentos difíceis, e o prazer do ensinar e aprender, nos momentos de felicidade.

A minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. **Maria Fulgência Bandeira** (e toda família), pelo exemplo de profissional, de dedicação, pelo amor à docência, pela amizade construída, pelo carinho maternal, pelos conselhos de vida, pela tranquilidade e serenidade na construção deste trabalho, por desvendar e estimular os caminhos a seguir. É admirável tamanha generosidade e humildade. Resta-me o enorme orgulho e satisfação em ter sido sua orientanda em mais essa etapa.

Agradeço ao meu pai e meu herói, **Jorge da Silva Lima**, pelo exemplo de pai, que sempre me incentivou nas minhas ousadias, mostrando-me que somos capazes de tudo quando sabemos o que queremos e que acreditou em mim, quando eu mesma não acreditava.

Agradeço à minha mãe e melhor amiga, **Maria Auxiliadôra Lêdo Lima**, pelo amor incondicional de MÃE, pela força e incentivo, pelas inúmeras renúncias, estando sempre ao meu lado nos instantes de glória e nas dificuldades, orientando-me a seguir no melhor caminho.

Agradeço ao meu irmão, **Pedro Lêdo Lima**, por estarmos sempre unidos, um apoiando o outro em todos os momentos de nossas vidas, o que nos torna mais fortes e realmente irmãos.

Agradeço à minha sogra e segunda mãe, **Kátia Cíntia de Vasconcelos**, pelo apoio, dedicação, incentivando-me a lograr o prazeroso e infinito caminho do saber, do conhecer, do estudar.

Agradecimento especial ao meu marido, **Thiego Lucianno de Vasconcelos Milério**, pela aceitação e compreensão, estando ao meu lado nas minhas batalhas, renunciando lazes, entendendo a minha ausência e, sobretudo, apoiando as minhas decisões de ir à busca de novas experiências, novos saberes, novos conhecimentos.

Agradeço à **Universidade Federal do Amazonas**, pela contribuição em minha formação acadêmica e por ser esta Instituição de Ensino renomada e envolvida com a educação, pesquisa, extensão e inovação tecnológica.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFAM, Prof. **Dr. Emílio Carlos Sponchiado Júnior**, pela dedicação e esmero frente à coordenação, sempre em busca de melhorias e parceiras que colaborem no avanço científico e qualidade do Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Agradeço aos **Docentes do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFAM**, pelo apoio e orientações nas constantes dúvidas, e sempre com toda a disposição a ajudar e mostrar a visão de educador.

À minha coorientadora Prof^a Dr^a. **Nikeila Conde**, pelo companheirismo, ajuda, atenção, conforto em momentos de ansiedade e compartilhamento de seus saberes, mostrando que a generosidade é virtude de poucos e de bons profissionais.

Às professoras Dr^a **Carina Toda** e Msc. **Cristiane Nagai Coelho**, por toda ajuda, dedicação, amor à pesquisa, companheirismo, por serem profissionais muito competentes, muito solidárias e, a qualquer momento, dispostas a contribuir com a pesquisa.

Ao **grupo de Fitoterapia da FAO**, pelo calor humano, amizade, ajuda, sobretudo, pelas experiências, pelos conhecimentos compartilhados e aprendidos.

A querida **Luisa Rissoni Santos Machado**, por ter sido um verdadeiro anjo que Deus colocou na minha vida. Muito obrigada pela parceira e pela disponibilidade em me ajudar no laboratório e em tudo o que precisei, sendo sempre muito prestativa, atenciosa e meiga.

A grande amiga de graduação Msc. **Gisely Naura Venâncio**, sempre muito prestativa, compartilhando de suas experiências, desafios e incentivando nos momentos de ansiedade.

À professora Dr^a. **Maria Francisca Simas Teixeira** e a querida **Taciana de Amorim Silva**, por terem me recebido tão bem no laboratório de Micologia da UFAM, dando todo o suporte e apoio necessários.

Aos professores Dr^a. **Marne Carvalho de Vasconcellos** e Dr. **Ádley Lima** por toda a generosidade e atenção.

Aos **amigos de mestrado, Antônio Jorge, Guilherme Carvalho, João Relvas, Nara Munik, Juliana Maria, Cristiano Pires, Raissa da Costa e Julie Marie** por juntos trocarmos expectativas, compartilharmos, vivências, aflições.

Aos **funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e da Faculdade de Odontologia da UFAM**, desde a equipe da limpeza, administrativo (**Rose, Benigno, Paulo, Seu Pedro**), técnicos (**Lilian, Ronaldo**) e equipe da segurança, até os professores e alunos (**Fabrício**), por toda a atenção e ajuda nos momentos que precisei.

À **FAPEAM** pela concessão da bolsa de estudos que contribuiu para a realização da pesquisa.

Aos **Professores Titulares e Suplentes da Banca Examinadora de qualificação e de defesa**, por sempre estarem dispostos a contribuir com o engrandecimento científico deste trabalho.

A **todos os amigos do trabalho**, em especial ao diretor da UBS, Luiz Urrutia, as dentistas Leoneide Feijão, Rosiclei Lourenço e a ACD Diana Matos que me ajudaram em todos os momentos e incentivaram a seguir em frente para alcançar meus objetivos.

A cada pessoa que contribuiu direta ou indiretamente para a realização de mais esta etapa da minha vida.

"A vida nos mostra, ao longo das vivências, que temos grandes desafios na nossa trajetória, sejam elas no âmbito profissional ou pessoal. Mostra que cada experiência, coloca-nos frente a novas descobertas e novas lutas. E acima de tudo nos põe fortes para vivermos novos momentos, travar e vencer novas batalhas que nos levarão ao sucesso nesse espaço chamado VIDA."

Autor desconhecido

RESUMO

Este estudo analisou a estabilidade e atividade antibacteriana de uma emulsão à base de óleo de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) a 10% para limpeza de cavidade, segundo as propriedades físico-químicas de controle de qualidade e atividade antibacteriana, obedecendo às orientações de padronização e normas das boas práticas de fabricação da Farmacopeia Brasileira e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Para o controle de qualidade, a emulsão-teste foi armazenada em diferentes ambientes (estufa, temperatura ambiente, temperatura ambiente ao abrigo da luz, local com ar condicionado, geladeira e freezer) e avaliada em diferentes períodos experimentais (0,3 e 6 meses). Realizaram-se, com essa emulsão, testes de centrifugação, determinação de pH, densidade, avaliação microbiológica e organoléptica. A atividade antibacteriana das formulações sobre os microrganismos *Streptococcus mutans* (ATCC25175), *Streptococcus oralis* (ATCC10557), *Streptococcus salivarius* (ATCC7073) e *Lactobacillus paracasei* (ATCC335) foi analisada através dos testes de concentração inibitória mínima e bactericida mínima. Os resultados do teste de pH e determinação da densidade foram analisados pelo teste ANOVA e teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Os demais testes receberam análise descritiva. Na centrifugação, não foi observado separação de fases no tempo 0, no tempo de 3 meses, armazenados em freezer, geladeira e ar-condicionado e no tempo de 6 meses, armazenados em freezer, geladeira, enquanto que nos outros ambientes nos diferentes tempos houve separação de fases; no teste de pH, o ambiente de armazenamento estufa, temperatura ambiente ao abrigo da luz, temperatura ambiente e ar-condicionado apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (tempo 0), geladeira e freezer nos períodos experimentais; na densidade, o ambiente de armazenamento estufa apresentou os menores valores de densidade e mostrou diferença estatisticamente significativa em relação ao: grupo controle (tempo zero), tempo 3 meses (geladeira, freezer e ar-condicionado) e tempo 6 meses (geladeira e freezer); na avaliação microbiológica não houve crescimento bacteriano; na avaliação organoléptica, no tempo 0 não houve qualquer alteração, no tempo de 3 meses, houve apenas alteração da coloração da emulsão armazenada em estufa e no tempo de 6 meses, houve alteração da coloração da emulsão armazenada em estufa, temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A emulsão-teste apresentou atividade bacteriostática e bactericida, respectivamente, nas concentrações de 13,33 μ L/mL e 15 μ L/mL para o *S. mutans*; 20 μ L/mL e 23,33 μ L/mL para *S. salivarius* e 13,33 μ L/mL e 15 μ L/mL para o *L. paracasei*. A menor concentração da emulsão-teste (8,33 μ L/mL) demonstrou atividade bactericida contra *S. oralis*. Conclui-se que, a emulsão-teste demonstrou atividade antibacteriana frente a todos os microrganismos ensaiados; apresentou condições de estabilidade e qualidade, sem contaminantes, nos ambientes de armazenamento freezer e geladeira. Considerando a clínica diária o melhor ambiente de armazenamento é a geladeira.

Palavras-chaves: Medicamentos fitoterápicos; controle de qualidade; dentística operatória.

ABSTRACT

This study analyzed the stability and antibacterial activity of an emulsion based on copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne) in 10% for cavity cleaning, according to the physicochemical properties of quality control and antibacterial activity, following the standardization of guidelines and standards good manufacturing practices of the Brazilian Pharmacopoeia and the National Health Surveillance Agency. For quality control, the emulsion test was stored in different environments (greenhouse, room temperature, room temperature protected from light, a place with air conditioning, fridge and freezer) and evaluated in different periods (from 0.3 to 6 months). There were, with this emulsion, centrifuge tests, determination of pH, density, microbiological evaluation and organoleptic. The antibacterial activity of the formulations on the microorganisms *Streptococcus mutans* (ATCC25175), *Streptococcus oralis* (ATCC10557), *Streptococcus salivarius* (ATCC7073) and *Lactobacillus paracasei* (ATCC335) was analyzed by using the minimum inhibitory concentration tests and minimum bactericidal. The results of the pH test and density determination were analyzed by ANOVA and Bonferroni's test ($p < 0.05$). The other tests were given descriptive analysis. In the centrifugation test, there was no phase separation at time 0 in the time of three months, stored in freezer, fridge and air conditioning and time of six months, stored in freezer, fridge, while in other environments in different times there was phase separation; in the pH test, the greenhouse storage environment, room temperature protected from light, room temperature and air conditioning had statistically significant difference from the control group (time 0), fridge and freezer in experimental periods; in the density test, the greenhouse had the lowest density values and showed a statistically significant difference in relation to: control group (zero time), time 3 months (fridge, freezer and air conditioning) and time 6 months (fridge and freezer); in microbiological evaluation there was no bacterial growth; in organoleptic evaluation at time 0 no change, in time of 3 months, there was only change in color of the emulsion stored in glass and in time of 6 months, a change in color of the emulsion stored in room temperature and in room temperature protected of light. The emulsion test showed bacteriostatic and bactericidal activity, respectively, in concentrations of 13,33 $\mu\text{L}/\text{ml}$ and 15 $\mu\text{L}/\text{ml}$ for *S. mutans*; 20 $\mu\text{L}/\text{ml}$ and 23,33 $\mu\text{L}/\text{mL}$ for *S. salivarius* and 13,33 $\mu\text{L}/\text{ml}$ and 15 $\mu\text{L}/\text{ml}$ for *L. paracasei*. The lowest concentration of the test emulsion (8,33 $\mu\text{L}/\text{ml}$) demonstrated bactericidal activity against *S. oralis*. In conclusion, the emulsion showed antibacterial activity against all tested microorganisms; presented conditions of stability and quality without contaminants in freezer and in fridge. Considering, for the daily clinic, the best environment is the refrigerator.

Keywords: phytotherapeutic drugs, quality control; operative dentistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Desenho esquemático do processo de perfuração do tronco da copaibeira e coleta do óleo de copaíba	49
Figura 02 – Figura 02 – a) Preparo da emulsão à base de <i>Copaifera multijuga</i> Hayne a 10%; b) Aspecto final da emulsão-teste	50
Figura 03 – Figura 03 – a) Centrífuga programada; b) Disposição dos tubos de Falcon com emulsão-teste	51
Figura 04 – Figura 04 – Esquema geral do equipamento para determinação do pH	52
Figura 05 – Figura 05 – a) Picnômetro com emulsão-teste; b) Balança analítica aferindo picnômetro com emulsão-teste	52
Figura 06 – Figura 06 – a) Alíquota de 10 µL da emulsão-teste; b) Semeadura em triplicata em Ágar Sabouraud-dextrose	53
Figura 07 – Esquema para a pesquisa do número total de microrganismos	54
Figura 08 – Esquema para a pesquisa de <i>Escherichia coli</i>	55
Figura 09 – Esquema para a pesquisa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	55
Figura 10 – Esquema para a pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i>	56
Figura 11 – Avaliação dos caracteres organolépticos	57
Figura 12 – Representação esquemática da distribuição em microplacas das substâncias testes	59
Figura 13 – Emulsão após centrifugação no tempo 0 (grupo controle)	61
Figura 14 – Emulsão após centrifugação no tempo de 3 meses: a) freezer, b) geladeira, c) ar-condicionado, d) temperatura ambiente, e) ambiente escuro e f) estufa	61
Figura 15 – Emulsão após centrifugação no tempo de 6 meses: a) freezer, b) geladeira, c) ar-condicionado, d) temperatura ambiente, e) ambiente escuro e f) estufa	62
Figura 16 – Avaliação microbiológica nos meios: a) Ágar Caseína-soja, b) Ágar Sabouraud-dextrose, c) Ágar MacConkey, d) Ágar Cetrimida e e) Ágar Sal manitol	66
Figura 17 – Comparação do caractere organoléptico “cor”, em relação ao controle, tempo 0 (a). Ausência de mudanças de cor nos ambientes: b) freezer, c)	67

geladeira, d) ar-condicionado. Presença de variação de cor nos ambientes:
e) temperatura ambiente, f) escuro e g) estufa, no período experimental de
6 meses

- Figura 18** – Microdiluição em caldo da emulsão de copaíba a 10% - *Streptococcus mutans* 68
- Figura 19** – CBM da emulsão da copaíba a 10% frente ao *S.mutans* 68
- Figura 20** – CBM da emulsão da copaíba a 10% frente ao *S.salivarius* 69
- Figura 21** – CBM da emulsão da copaíba a 10% frente ao *L.paracasei* 69
- Figura 22** – CBM da emulsão da copaíba a 10% frente ao *S.oralis* 69

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01 – Teste de pH, de acordo com local de armazenamento e período analisados	63
Gráfico 02 – Média do pH da emulsão-teste em relação ao tempo	64
Gráfico 03 – Médias de densidade referentes às condições experimentais	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Volume dos poços em μL na placa de microdiluição	59
Tabela 02 – Valores médios do pH da emulsão de óleo de copaíba a 10% nos diferentes locais de armazenamento	62
Tabela 03 – Valores médios do pH da emulsão de óleo de copaíba a 10% nos diferentes tempos	63
Tabela 04 – Médias (dp) dos valores de densidade, expressos em g/cm^3 obtidas nas quatorze condições experimentais estabelecidas pelas variáveis: tipo de ambiente e tempo	65
Tabela 05 – Avaliação dos caracteres organolépticos “cor” das amostras da emulsão à base de óleo de copaíba a 10% para limpeza de cavidade, de acordo com o local de armazenamento e período analisado (N – não houve alteração; S – houve alteração)	67

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
g	Grama
INPA	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
<i>L. paracasei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
µg	Micrograma
µL	Microlitro
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
OMS	Organização Mundial de Saúde
pH	Potencial de hidrogênio
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RE	Resolução Específica
rpm	Rotação por minuto
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>S. oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
<i>S. salivarius</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
UFC	Unidade Formadora de Colônia

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
δ	Gama
®	Marca Registrada
±	Mais ou menos
#	Número
%	Percentual
°C	Graus Celcius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	20
2.1	Geral	20
2.2	Específicos	20
3	REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1	Fitoterapia	21
3.2	Marco Regulatório dos fitoterápicos	22
3.3	Controle de qualidade dos produtos fitoterápicos	28
3.4	Óleo-resina de copaíba	36
3.4.1	Composição química	38
3.4.2	Propriedades medicinais	40
3.4.2.1	Atividade antimicrobiana e anti-inflamatória	41
3.5	Soluções de limpeza de cavidade	45
4	MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1	Desenho do estudo	49
4.2	Método de coleta do óleo-resina da copaíba (<i>Copaifera multijuga</i> Hayne)	49
4.3	Preparo da emulsão de óleo de copaíba (<i>Copaifera multijuga</i> Hayne) a 10%	50
4.4	Caracterização da emulsão	50
4.4.1	Testes físico-químicos de controle de qualidade	51
4.4.1.1	Teste de centrifugação	51
4.4.1.2	Determinação de pH	51
4.4.1.3	Determinação da densidade	52
4.4.1.4	Avaliação microbiológica para pesquisa de contaminantes – Controle microbiológico da emulsão de <i>Copaifera multijuga</i> Hayne a 10%	53
4.4.2	Avaliação dos caracteres organolépticos	56
4.4.3	Avaliação da atividade antimicrobiana da emulsão de óleo de copaíba a 10%	57
4.5	Análise estatística	60
5	RESULTADOS	61
5.1	Testes físico-químicos de controle de qualidade	61
5.1.1	Teste de centrifugação	61
5.1.2	Determinação de pH	62
5.1.3	Determinação da densidade	64
5.1.4	Avaliação microbiológica para pesquisa de contaminantes	65
5.1.5	Avaliação dos caracteres organolépticos	66
5.1.6	Avaliação da atividade antimicrobiana	68
6	DISCUSSÃO	70
7	CONCLUSÃO	77
	REFERÊNCIAS	78
	APÊNDICE	87
	ANEXOS	89

1 INTRODUÇÃO

O preparo cavitário, do ponto de vista terapêutico, é o tratamento biomecânico da doença cárie e de outras lesões dos tecidos duros do dente de forma que as estruturas remanescentes possam receber uma restauração que seja resistente, proteja e previna a reincidência de cárie (MONDELLI, 2006). Toda vez que se abrasiona ou corta a estrutura dentária, forma-se na superfície uma camada denominada de *smear-layer* (ARAÚJO *et al*, 1998), composta de matéria orgânica e inorgânica, sangue, saliva, óleos provenientes de aparelhos rotatórios, microrganismos e seus produtos (BUSATO, 2005).

O último princípio a ser observado em um preparo cavitário segundo Black é a limpeza da cavidade (MONDELLI, 2006), que visa remover, com eficácia, a maioria dos resíduos que podem prejudicar a adaptação, o vedamento marginal e ao mesmo tempo reduzir a quantidade de microrganismos e seus produtos, 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 (RODE; SANTOS, 1990).

A escolha do agente de limpeza de cavidades dependerá do conhecimento do clínico, porém deve-se considerar a ação de biocompatibilidade do material. Não deve ser irritante aos tecidos bucais, deve apresentar uma concentração não-tóxica, atividade tensiométrica, eletrolítica e pH aceitáveis ao meio bucal (FRAZÃO *et al*, 2011).

Existem, basicamente, dois grupos de agentes para limpeza: os desmineralizantes (ácidos) e os não-desmineralizantes. Esses últimos, podendo ser enquadrados o digluconato de clorexidina a 2% e a água de hidróxido de cálcio, que removem os detritos pela força do impacto ou por esfregação (MONDELLI, 1998).

A fitoterapia é um recurso terapêutico caracterizado pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal. Tal abordagem incentiva o desenvolvimento comunitário, a solidariedade e a participação social (BRASIL, 2006a).

Como opção terapêutica para tratamentos tradicionais, a fitoterapia e as plantas medicinais tem sido utilizada com maior frequência pela população. Cerca de 82% da população brasileira utiliza produtos à base de plantas medicinais nos seus cuidados com a saúde, seja pelo conhecimentos transmitidos na medicina indígena, quilombola, entre outros povos e comunidades, seja pelo uso na medicina popular, de transmissão oral entre gerações, ou nos sistemas oficiais de saúde, como prática de cunho científico, orientada pelos princípios e diretrizes do Sistema Único de Saúde (RODRIGUES; DE SIMONI, 2010).

As principais vantagens de se trabalhar com produtos naturais são a grande aceitabilidade da população local e o possível menor custo, em relação aos produtos, atualmente, existentes no mercado (CALIXTO, 2005; FRANCISCO, 2010).

No Brasil, o mercado que utiliza os fitoterápicos está em contínuo crescimento, porém o grande mercado ainda é o informal. No intuito de inibir a comercialização de fitoterápicos produzidos sem critérios e sem padronizações, foram criadas políticas públicas e formuladas resoluções visando o aprimoramento do controle de qualidade dos fitoterápicos, desde a coleta da matéria-prima, produção até o produto final, garantindo qualidade, eficácia e segurança no uso, além de incentivar estudos nessa área, tecnologias de produção e a incorporação destes tipos de medicamentos no Sistema Único de Saúde (BRASIL, 2011).

No aprimoramento dos estudos das riquezas da biodiversidade amazônica, pesquisas na área odontológica têm sido desenvolvidas com o propósito de buscar novos princípios bioativos para a formulação de medicamentos com diferentes aplicabilidades, agindo tanto como curativos como preventivos (CUNHA *et al*, 2011). A aceitação popular da fitoterapia

leva a boas perspectivas no mercado de produtos odontológicos fitoterápicos (AGRA *et al*, 2007; FRANCISCO, 2010).

Assim, existe em andamento pesquisa de uma emulsão à base de óleo de *Copaifera multijuga* Hayne para limpeza de cavidade no grupo dos agentes de limpeza não-desmineralizantes. A copaíba é uma árvore originária da América Latina e da África Ocidental, o óleo produzido por em seu tronco tem ação desintoxicante, protegendo-a contra animais, fungos e bactérias. Nos seres humanos, este óleo apresenta propriedades anti-inflamatórias, cicatrizantes, antibacterianas, antifúngicas e anticancerígenas (GOMES *et al*, 2010; LEANDRO *et al*, 2012; PIERI *et al*, 2012; DIAS *et al*, 2014). Devido à 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 *et al*, 2008).

No entanto, para o aprimoramento de novos produtos utilizados em Odontologia e para a comprovação de sua eficácia, os mesmos necessitam ser submetidos a diversos testes, procurando visualizar o seu desempenho clínico quando da utilização na cavidade bucal, para viabilizar o uso do produto na clínica diária, pois compostos das plantas podem ser tóxicos, alterar a rugosidade da superfície dentária, bem como causar manchamentos (DONASSOLO *et al*, 2007; EVANGELISTA *et al*, 2013).

Desta forma, o presente trabalho justifica-se como forma de utilizar a Fitoterapia na prática terapêutica em Odontologia, sendo necessário analisar as características físico-químicas de uma emulsão formulada à base de óleo de copaíba para limpeza de cavidade, visando cumprir os requisitos de controle de qualidade e atividade antibacteriana, obedecendo às orientações de padronização e normas das boas práticas de fabricação de emulsões da Farmacopeia Brasileira e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária para futura aplicação na Odontologia.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Avaliar *in vitro* a estabilidade farmacológica e a atividade antibacteriana de emulsão de óleo de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) a 10% para limpeza de cavidade dentária.

2.2 ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização físico-química, organoléptica e microbiológica da emulsão de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) a 10%, obedecendo às orientações de padronização e normas das boas práticas de fabricação das emulsões da Farmacopeia Brasileira e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária;

- Analisar a atividade antibacteriana da emulsão de *Copaifera multijuga* Hayne a 10% frente aos microrganismos orais, *Streptococcus mutans* (ATCC 25175); *Streptococcus salivarius* (ATCC 7073); *Streptococcus oralis* (ATCC 10557) e *Lactobacillus paracasei* (ATCC 335).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Fitoterapia

Os medicamentos fitoterápicos, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), “são considerados os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas. São caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que incluem, em sua composição, substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais, nem as associações dessas com extratos vegetais” (BRASIL, 2013).

O objetivo principal dos fitoterápicos é prevenir, curar e amenizar os sintomas da doença de forma mais acessível para a população e para os serviços de saúde. Tendo como meta superar as mazelas dos atendimentos públicos, escassez de recursos e necessidade aumentada de medicamentos que se tornam mais dispendiosos, fazendo-se necessário o estímulo ao uso de medicamentos fitoterápicos (WIJESEKERA, 1986; TOLEDO *et al*, 2003).

O uso de plantas medicinais na arte de curar é uma forma de tratamento de origem muito antiga, relacionada aos primórdios da medicina e fundamentada no acúmulo de informações por sucessivas gerações. Ao longo dos séculos, produtos de origem vegetal constituíram as bases para tratamento de diferentes doenças (BRASIL, 2006b).

Vários são os relatos da utilização de plantas medicinais na antiguidade. Civilizações como China, Índia, Egito e Grécia já registravam o uso terapêutico de plantas medicinais. Propriedades calmantes, sedativas, vermífugas, diuréticas e antissépticas de origem natural eram conhecidas e preparadas por egípcios há mais de 4000 anos. Os indianos descreveram as plantas medicinais, criando um tratado médico intitulado Caraka. Gregos e romanos ampliaram os conhecimentos da utilização de plantas medicinais. E na China foi relatado pela

primeira vez, nas ‘52 Prescrições’ escritas durante a Dinastia Mawangdui Han, o uso da *Artemisia annua* contra a malária (ALVES, 2013).

No Brasil, o índio já era o grande conhecedor da fitoterapia, baseados nas suas tradições. Porém, no período da chegada de Pedro Álvares Cabral até o século XIX, os estudos sobre biodiversidade foram realizados pelos portugueses ou pessoas designadas por eles. As descrições feitas eram de espanto e admiração, o que resultou em diversos relatos sobre a fauna e flora brasileira. Dentre os naturalistas, destaca-se Gabriel Soares de Souza, naturalista que escreveu, em riqueza de detalhes, o Tratado Descritivo do Brasil. Entre seus relatos, chamou as plantas medicinais utilizadas pelos índios como “árvores de virtude” e citou diversas plantas, entre elas a copaíba (*Copaifera* spp). No século XVIII, Piso, holandês que escreveu o primeiro tratado de medicina tropical, cita em um de seus relatos que “os índios precedem de laboratórios, ademais, sempre tem à mão sucos verdes e frescos de ervas. Enjeitam os remédios compostos de vários ingredientes, preferem os mais simples, em qualquer caso de cura, visto que por estes medicamentos os corpos não ficam tão irritados” (ALVES, 2013).

Da cultura popular aos cultivares, controlados por profissionais conhecedores do assunto, colocam o Brasil na linha de frente no estudo e aplicação da medicina não convencional ou alternativa e conhecimento tradicional associado (BRASIL, 2011).

A grande maioria dos medicamentos, hoje disponíveis no mundo, é ou foi originado de estudos desenvolvidos a partir da cultura popular que fazem da rica biodiversidade brasileira um vasto campo de pesquisa científica (BRASIL, 2011).

3.2 Marco regulatório dos fitoterápicos

A partir da Conferência Internacional sobre Atenção Primária em Saúde em Alma-Ata, em Genebra, 1978, promovida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Fundo das Nações Unidas para Infância (UNICEF), com a necessidade de proteção e promoção de saúde

dos povos, foi recomendado que os estados-membros procedessem à formulação de políticas e regulamentações nacionais referentes à utilização de remédios tradicionais de eficácia comprovada e exploração das possibilidades de se incorporar os detentores de conhecimento tradicional às atividades de atenção primária em saúde, fornecendo-lhes treinamento correspondente (BRASIL, 2006b).

Na década de 70, a OMS criou o Programa de Medicina Tradicional, o qual recomendava aos estados-membros o desenvolvimento de políticas públicas para facilitar a integração da medicina tradicional e da medicina complementar alternativa nos sistemas nacionais de atenção à saúde, assim como promover o uso racional dessa integração, já que grande parte da população de países em desenvolvimento utilizava a medicina tradicional para sua atenção primária (BRASIL, 2006b).

Em 1987, através da Assembleia Mundial de Saúde, foram reiteradas as recomendações feitas pela Alma-Ata, enfatizando aos estados-membros, o início de programas amplos relativos à identificação, avaliação, preparo, cultivo e conservação de plantas usadas em medicina tradicional, bem como, assegurar a qualidade das drogas derivadas de medicamentos tradicionais extraídas de plantas, pelo uso de técnicas modernas e aplicação de padrões apropriados e de boas práticas de fabricação (BRASIL, 2006b).

No Brasil, com a criação do Sistema Único de Saúde (SUS), houve uma maior intensificação na abordagem da prática de Medicina Tradicional e criação de uma política para o setor. De certa forma, no país, a oferta de Práticas Integrativas e Complementares no sistema de saúde foi recomendada através da 8ª Conferência Nacional de Saúde (CNS) de 1986. Com vistas na viabilização dessa recomendação, foi realizada uma regulamentação da implantação da fitoterapia nos serviços de saúde nas unidades federadas, por meio da Resolução da Comissão Interministerial de Planejamento e Coordenação (BRASIL, 1988).

Em 1990, a partir da Lei nº 8080 ficou instituído que o dever do Estado de garantir a saúde consistiria na formulação e execução de políticas econômicas e sociais que propusessem a redução de riscos de doenças e de outros agravos e ainda no estabelecimento de condições que assegurassem acesso universal e igualitário às ações e aos serviços para a sua promoção, proteção e recuperação (BRASIL, 1990). Neste âmbito de ação do SUS, a formulação de uma política de medicamentos como propósito de garantir a necessária segurança, eficácia e qualidade dos medicamentos, a promoção do uso racional e o acesso da população àqueles eram considerados essenciais. Com a inclusão de produtos fitoterápicos no SUS, em 1995, a Secretária de Vigilância Sanitária instituiu e normatizou o registro de produtos fitoterápicos (BRASIL, 2006a).

Na 10ª Conferência Nacional de Saúde, realizada em 1996, foi recomendada a incorporação no SUS, em todo o país, das práticas de saúde como a fitoterapia, acupuntura e homeopatia, contemplando as terapias alternativas e práticas populares, foi reiterado o dever do Ministério da Saúde de incentivar a fitoterapia na assistência farmacêutica pública como também elaborar normas para sua utilização (BRASIL, 2006a).

Com a previsão de expandir e dar continuidade ao apoio e pesquisa para aproveitamento do potencial terapêutico da flora e fauna nacional, em 1998, foi aprovada a Política Nacional de Medicamentos, enfatizando a certificação de suas propriedades medicamentosas (BRITO, 2010).

No intuito de normatizar e subsidiar as diretrizes propostas foram realizados seminários e conferências, em 2003, como o Seminário Nacional de Plantas Medicinais, Fitoterápicos e Assistência Farmacêutica, que em seu relatório recomendavam a integração no SUS do uso de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos. Na 1ª Conferência Nacional de Assistência Farmacêutica e a 12ª Conferência Nacional de Saúde, também realizada em 2003, apontavam a necessidade de investimentos em pesquisa e desenvolvimento em

tecnologia de produção de medicamentos a partir da flora brasileira, favorecendo a produção nacional e implementando a utilização de medicamentos fitoterápicos nos serviços de saúde (BRASIL, 2013).

A partir da Resolução nº 338/04, do Conselho Nacional de Saúde foi aprovada a Política Nacional de Assistência Farmacêutica, a qual define e pactua as ações intersetoriais que visam à utilização de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos no processo de atenção em saúde, com respeito aos conhecimentos tradicionais incorporados, com embasamento científico e com adoção de políticas de emprego e renda (BRASIL, 2013).

Em 2006, foi publicada a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares, com a proposta de incluir plantas medicinais e fitoterapia, homeopatia, medicina tradicional chinesa/acupuntura e termalismo social/crenoterapia como opções terapêuticas no sistema público de saúde, além da elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais e de Fitoterápicos e o provimento do acesso às plantas medicinais e fitoterápicas aos usuários do SUS (BRASIL, 2006b).

Diante do exposto, através do Decreto nº 5.813 de 2006, aprova-se a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, com objetivo de “garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional” (BRASIL, 2006b; BRITO, 2010).

Com a aprovação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, foram formuladas diversas diretrizes que estão intimamente ligadas à garantia de qualidade, acesso seguro e uso racional. Cabendo, dessa forma, a ANVISA regular, regulamentar, monitorar e fiscalizar a comercialização, manipulação e distribuição de insumos de origem vegetal e fitoterápicos, como também conceder o registro de novos medicamentos fitoterápicos. (CARVALHO, 2011).

Neste âmbito, com a finalidade de verificar a qualidade de cada lote de medicamentos e demais produtos abrangidos, satisfazendo às normas de atividade, pureza, eficácia e inocuidade, resoluções foram estabelecidas pela ANVISA para se obter um controle de qualidade.

Reforçando a publicação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (2006) e da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (2006), a Resolução nº 82/2008 do Conselho Federal de Odontologia dispôs sobre o reconhecimento e regulamentação do uso, pelo cirurgião-dentista, de práticas integrativas e complementares à saúde bucal, validando o exercício pelo cirurgião-dentista das seguintes práticas integrativas e complementares à saúde bucal: Acupuntura, Fitoterapia, Terapia Floral, Hipnose, Homeopatia e Laserterapia.

De acordo com a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 14/2010, a produção dos medicamentos fitoterápicos deve seguir a Resolução Específica (RE) nº 17/2010, a qual estabelece os requisitos mínimos na fabricação de medicamentos para padronizar a verificação dos cumprimentos das Boas Práticas de Fabricação (BRASIL, 2010a). Dentre esses requisitos mínimos encontram-se, elementos como infraestrutura apropriada, incluindo procedimentos, instalações, processos e recursos organizacionais, como também ações sistematizadas que assegurem confiança nas exigências de qualidade do produto. Estes requisitos podem ser obtidos por um gerenciamento de qualidade que no cumprimento de todos formam a chamada “Garantia de Qualidade” (BRASIL, 2010a; BRASIL, 2013).

Como parte da “Garantia de Qualidade”, as Boas Práticas de Fabricação asseguram que os produtos sejam produzidos e controlados com padrões de qualidade apropriados para uso pretendido e requerido pelo registro, bem como, os processos de fabricação sejam definidos e revisados, qualificados e validados.

A validação, de acordo com a RE n° 899/2003, tem como objetivo demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, devendo garantir por meio de estudos experimentais, a especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e exatidão, cumprindo com as exigências das aplicações analíticas, proporcionando resultados confiáveis. Na validação da metodologia analítica, devem-se utilizar substâncias de referência oficializadas pela Farmacopeia Brasileira, no caso da inexistência dessas substâncias, será admitido o uso de padrões de trabalho, desde que a identidade e o teor sejam comprovados. Para fitoterápicos, além das substâncias químicas de referência, também podem ser utilizados os extratos padrões oficializados, desde que acompanhados de certificado de análise e do perfil cromatográfico do fornecedor (BRASIL, 2013).

Outro requisito a se buscar dentro do controle de qualidade é a estabilidade, já que esta depende de fatores ambientais, temperatura, propriedades químicas e físicas, processo de fabricação, entre outros. Dessa forma, elaborou-se a RE n° 01/2005, a qual guia os testes de estabilidade prevendo, determinando ou acompanhando o prazo de validade (BRASIL, 2005). O estudo de estabilidade é composto pelo estudo acelerado, de longa duração e de acompanhamento (BRASIL, 2013).

Como forma de garantir a segurança e eficácia, devido à presença no mercado de diversos produtos registrados com base no mesmo derivado de droga vegetal com diferentes indicações farmacêuticas permitidas, diferente posologia e restrições de uso, foi realizada uma padronização das informações disponíveis na bula dos medicamentos. Esta ação foi regulamentada através da RDC n° 47/2009, a qual padronizou informações disponíveis nas bulas de medicamentos fitoterápicos obtidos de 18 espécies vegetais, selecionadas entre as mais registradas e constantes do registro simplificado. Os outros medicamentos sem

padronização de bula devem seguir as recomendações desta mesma resolução em forma e conteúdo (BRASIL, 2009).

A mais nova regulamentação, RDC n° 13/2013, dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos. Estas Boas Práticas fazem parte da “Garantia da Qualidade” que assegura que o Produto Tradicional Fitoterápico é consistentemente produzido e controlado, com padrões de qualidade apropriados para o uso pretendido e requerido pela notificação ou registro. Dentro das Boas Práticas incluem-se higienização, rotulagem e o armazenamento correto, além de medidas para diminuir riscos de contaminação. Importante destacar, que para que os produtos sejam registrados como Produtos Tradicionais Fitoterápicos, estes devem garantir segurança e eficácia comprovadas, com base na indicação de uso episódico ou para curtos períodos de tempo; indicação para doenças de baixa gravidade; coerência das indicações terapêuticas propostas com as comprovadas pelo uso tradicional; ausência de risco tóxico ao usuário; ausência de grupos ou substâncias químicas tóxicas, ou presentes dentro de limites comprovadamente seguros e comprovação de continuidade de uso seguro por período igual ou superior a 20 anos (BRASIL, 2013).

3.3 Controle de qualidade dos produtos fitoterápicos

Atualmente, tem sido verificado um aumento progressivo da demanda de plantas e preparações de origem vegetal como recurso terapêutico. Porém, esse aumento do consumo torna-se preocupante considerando que a fiscalização do comércio de tais produtos é precária; representando, assim, vários riscos ao consumidor, podendo-se enumerar como principais: a identificação errada da espécie vegetal, indicações errôneas de utilização, posologia inadequada, uso de plantas de má qualidade e tóxicas (ESPÍNOLA, 1997; BRANDÃO *et al.*, 1998; MATOS, 2000).

A fitoterapia existe principalmente no mercado informal, o que representa grande perigo à saúde da população, pois neste caso, sua comercialização ocorre desconsiderando os aspectos relativos ao controle de identidade e/ou pureza. É indiscutível a necessidade de um maior e melhor controle nesse ramo cosmético e farmacêutico, pois os fitoterápicos representam uma alternativa economicamente viável à população (BENDAZZOLI, 2000).

Dependendo da disponibilidade regional e sazonal das espécies, há ocorrência de falsificações, levando ao comércio de espécies parecidas na substituição de outra rara ou mesmo não disponível naquele local ou período do ano (BOCHNER *et al*, 2012) . Como é o caso da espinheira-santa *Maytenus* spp. (ALMEIDA; ALBUQUERQUE, 2002; RODRIGUES; CARLINI, 2002), que devido ao excesso de exploração no Rio de Janeiro (RJ) vem sendo substituída pela *Sorocea bomplandii*, sobre a qual não há estudos farmacológicos que comprovem o uso eficaz e seguro (STEENBOCK *et al*, 2003; COULAUD-CUNHA *et al*, 2004; RUSCHEL; NODARI, 2008; SILVA; PEIXOTO, 2009; LEITÃO *et al*, 2009; BOCHNER *et al*, 2012).

Segundo Bochner *et al* (2012), em estudo realizado no Mercado de Madureira- RJ, apenas 11 das 20 plantas mais vendidas no mercadão estavam incluídas na listagem de plantas medicinais constantes na RDC-ANVISA nº 10/2010 (BRASIL, 2010b). Cinco das espécies mais comercializadas no período estudado não estão contempladas por nenhuma das listagens da ANVISA e da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. O boldo (*Plectranthus barbatus*), amplamente cultivado em todo o Brasil, faz parte das duas listagens, entretanto, a espécie comercializada no Mercado de Madureira no período observado trata-se do boldo-do-Chile (*Peumus boldus*). Das 20 plantas medicinais mais comercializadas, seis apresentam propriedades tóxicas comprovadas dependendo do tipo de preparo e uso.

O mercado de produtos fitoterápicos continua em expansão no mundo inteiro. No Brasil, em 2001, a venda de fitomedicamentos atingiu US\$ 270 milhões, representando 5,9%

do mercado de 30 medicamentos. Entretanto, o aumento no número de medicamentos disponíveis à população não é proporcional à qualidade dos mesmos (CALIXTO, 2005).

Evangelista *et al* (2013) realizaram um levantamento da comercialização de plantas medicinais e um estudo etnobotânico para identificação das principais plantas medicinais indicadas e utilizadas nas patologias orais nos atendimentos odontológicos ambulatoriais na cidade de Manaus e concluíram que as plantas medicinais são utilizadas de maneira empírica.

Segundo a Lei nº 6.360/76, o controle de qualidade é um conjunto de medidas destinadas a garantir, a qualquer momento, a produção de lotes de medicamentos e demais produtos abrangidos por essa Lei, que satisfaçam às normas de atividade, pureza, eficácia e inocuidade, envolvendo várias etapas que vão desde a obtenção da matéria-prima, passando por todo o processo de produção, culminando com a análise do produto final (BRASIL, 1976).

A “garantia da qualidade” é um conceito muito amplo e deve cobrir todos os aspectos que influenciam individual ou coletivamente a qualidade de um produto. Abrange a totalidade das providências adotadas com o objetivo de garantir que os medicamentos estejam dentro dos padrões de qualidade exigidos, para que possam ser utilizados para os fins propostos (BRASIL, 2010c).

A Garantia da Qualidade incorpora as boas práticas de fabricação e outros fatores, incluindo o projeto e o desenvolvimento de um produto (BRASIL, 2010a).

Boas práticas de fabricação de medicamentos fitoterápicos é a parte da garantia da qualidade que assegura que os medicamentos fitoterápicos são consistentemente produzidos e controlados, com padrões de qualidade apropriados para o uso pretendido e requerido pelo registro. O cumprimento desses requisitos proporcionará diminuição dos riscos inerentes a qualquer produção farmacêutica, os quais não podem ser detectados somente pela realização de ensaios nos produtos terminados (BRASIL, 2010a).

A eficácia e a segurança devem ser validadas através de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas em bibliografia e/ou publicações indexadas e/ou estudos farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos.

A qualidade da matéria-prima não garante a eficácia do produto, mas é fator determinante da mesma, devendo ser alcançada mediante o controle das matérias-primas, do produto acabado, materiais de embalagem e estudos de estabilidade (BACCHI, 1999; FARIAS, 2001).

Devido à sua origem, os materiais vegetais podem conter contaminantes microbiológicos, para evitar alterações e reduzir qualquer tipo de contaminação, é necessário um nível adequado de sanitização e higiene em todas as etapas do processo de fabricação (BRASIL, 2010a).

Os parâmetros de controle de qualidade variam de espécie para espécie e podem ser encontrados nas monografias contidas nas farmacopeias. O que dificulta o trabalho é a ausência de padrões para muitas plantas e de monografias farmacopéicas (FARIAS, 2001). Na inexistência de monografia contendo descrição da droga vegetal em farmacopeias reconhecidas pela ANVISA, pode ser utilizado como referência, o laudo de identificação emitido por profissional habilitado ou a descrição em publicação tecnocientífica indexada e perfil cromatográfico ou prospecção fitoquímica (BRASIL, 2010a).

As especificações para medicamentos fitoterápicos têm o objetivo de definir a qualidade, e garantir a segurança e eficácia. Segundo a RDC 17/2010, as especificações devem incluir, ao menos, as seguintes informações:

- a) testes para determinação de contaminação microbiológica;
- b) uniformidade de peso, tempo de desintegração, dureza e friabilidade, viscosidade, consistência e tempo de dissolução, quando aplicável;

c) aparência física tais como, cor, odor, forma, tamanho e textura; perda por secagem ou conteúdo de água;

d) testes de identificação, determinação qualitativa de substâncias relevantes das plantas (por exemplo, cromatogramas fingerprint);

e) quantificação dos marcadores, e métodos analíticos disponíveis;

f) testes limite para solventes residuais.

Os testes de controle de qualidade e especificações para medicamentos fitoterápicos devem contemplar a determinação qualitativa e quantitativa dos principais componentes ativos (BRASIL, 2010a).

Com relação à estabilidade de produtos farmacêuticos, esta depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem, visando definir seu prazo de validade e período de utilização em embalagem e condições de armazenamento especificadas (BRASIL, 2005).

Segundo a RE nº1/05, o relatório de estudo da estabilidade para líquidos deve conter os itens abaixo ou justificativa técnica da ausência destes:

- descrição do produto com respectiva especificação da embalagem primária;
- número do lote para cada lote envolvido no estudo;
- descrição do fabricante dos princípios ativos utilizados;
- aparência;
- plano de estudo: material, métodos (desenho) e cronograma;
- data de início do estudo;
- teor do princípio ativo e método analítico correspondente;
- quantificação de produtos de degradação e método analítico correspondente;

- limites microbianos;
- pH;
- claridade em soluções (limpidez da solução);
- perda de peso em líquidos de base aquosa.

Com relação, a frequência dos testes e estabilidade tem-se: estudo acelerado, estudo de longa duração e estudo de acompanhamento. O estudo de estabilidade acelerado é arquitetado para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas em condições de armazenamento forçadas, este é realizado acondicionando amostras do medicamento em sua embalagem primária durante seis meses. O estudo acelerado é realizado em três análises (0, 3 e 6 meses) para doseamento, quantificação de produtos de degradação, dissolução (quando aplicável) e pH (quando aplicável). Outras análises, tais como esterilidade e pirogênio, dureza podem ser realizadas apenas no primeiro e no último mês do estudo acelerado.

O estudo de estabilidade de longa duração é utilizado para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar condições de armazenamento. Este estudo verifica as características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas durante e, opcionalmente, após o prazo de validade, durante o número de meses que se deseja atribuir como prazo de validade. O estudo de longa duração é realizado em 7 análises (0,3,6,9,12,18 e 24 meses), realizando os mesmos testes do estudo acelerado. Como obrigatoriamente este estudo deve ser apresentado para a ANVISA após 24 meses de estudo, estas análises devem ser realizadas no momento zero e no 24º mês.

O estudo de acompanhamento é realizado a cada 12 meses, devendo ser realizados todos os testes de um relatório de estudo de estabilidade. Este estudo tem por objetivo verificar se as características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas mantiveram-se, conforme o estudo de longa duração. Este estudo deve ser realizado a cada doze meses.

Conforme os dados obtidos pelo estudo de estabilidade acelerada e dados preliminares do estudo de longa duração e de acompanhamento, é possível avaliar o impacto que os efeitos químicos e físicos causarão em um produto farmacêutico quando este é exposto a condições fora das estabelecidas pela rotulagem por curto período de tempo.

Os produtos odontológicos que contém substâncias naturais apresentam boas perspectivas no mercado, devido à aceitação popular da fitoterapia, porém só devem ser introduzidos após a comprovação científica de sua eficácia, por meio de estudos laboratoriais e clínicos específicos (FRANCISCO, 2010).

Nascimento *et al* (2000) avaliaram a qualidade de produtos comercializados na cidade do Recife, em farmácias comerciais, à base de erva-doce (*Pimpinella anisum* L), quebra-pedra (*Phyllanthus niruri* L), espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss) e camomila (*Matricaria recutita*), observando-se a embalagem, comparando os resultados frente a RDC nº 48 de 16 de março de 2004. Foram observados caracteres sensoriais, botânicos macroscópicos e microscópicos, percentual de matéria estranha, teor de umidade e composição fitoquímica dos extratos de cada uma das amostras. Os resultados obtidos demonstraram a falta de cuidado na fabricação dos produtos e a necessidade de intensificação da vigilância.

Zaroni *et al* (2004) verificaram a qualidade microbiológica (contagem de microrganismos aeróbios viáveis, contagem de bolores e leveduras, pesquisa de enterobactérias, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*) de 72 amostras de plantas medicinais, enviadas por produtores de sete regiões do Estado do Paraná, seguindo a metodologia preconizada pela OMS. Os resultados das análises microbiológicas realizadas indicaram que a maioria das amostras (79%) não atendia os parâmetros estabelecidos pela OMS, tanto para utilização da planta medicinal na forma de chá ou para uso tópico quanto para uso interno.

Zhang *et al* (2012) detalharam fatores externos e internos que afetam a qualidade dos fitoterápicos e elucidaram algumas soluções para estes fatores, tais como, para fatores externos: a aplicação rigorosa das Boas Práticas Agrícolas e de Coleta e Boas Práticas de Fabricação que podem minimizar o risco de contaminação e adulteração. Para fatores internos, a fabricação de produtos à base de plantas padronizadas, com qualidade controlável, através de métodos analíticos modernos e técnicas farmacêuticas. Assim, para que a qualidade dos fitoterápicos seja alcançada em âmbito global, é necessário o aprofundamento em pesquisas metodológicas, a melhora na regulamentação dos medicamentos fitoterápicos e o engajamento das organizações governamentais para orientação e fiscalização.

Kunle; Egharevba; Ahmadu (2012) esclareceram a necessidade de estabelecer parâmetros de qualidade para coleta, manuseio, processamento e produção de fitoterápicos. Estes vêm representando uma porção substancial do mercado de medicamentos mundial, sendo principalmente utilizados como medicamentos caseiros e como matéria-prima para a indústria farmacêutica. Porém, têm sido evidenciados os perigos do uso indiscriminado de algumas plantas, destacando-se, assim, a necessidade de padronização das plantas, implantação de ferramentas analíticas para testar parâmetros de qualidade, a monitorização da qualidade do produto para garantir segurança e eficácia desde a coleta até o produto final. Além disso, recomendou-se que as agências do governo sigam uma abordagem mais universal sobre a qualidade dos medicamentos à base de plantas, adotando diretrizes da Organização Mundial da Saúde e o desenvolvimento de monografias, visando fortalecer o processo de regulamentação, minimizando a quebra da qualidade.

Machado (2014) analisou as características físico-químicas de uma emulsão à base de óleo de copaíba para limpeza de cavidade dentinária através do controle de qualidade, obedecendo às legislações vigentes, avaliadas em diferentes ambientes e em diferentes períodos experimentais. Os resultados encontrados indicaram que, conforme o local de

armazenamento e o período experimental, pode ocorrer mudanças nas características físico-químicas da emulsão, evidenciando a importância da realização de testes que assegurem a eficácia, qualidade e segurança dos medicamentos fitoterápicos.

É necessário que tenham sido realizados estudos de desenvolvimento anteriores para a produção de fitoterápicos, estando devidamente estabelecidos os procedimentos e etapas de processamento. Os conhecimentos e habilidades devem estar relacionados, objetivando a produção de produtos farmacêuticos adequados, de acordo com os conceitos atuais de qualidade, que são o nível de satisfação do produtor e usuário do medicamento e o cumprimento de requisitos prefixados que conduzam à sua total adequabilidade ao fim a que se destinam. Portanto, o conhecimento do que se pretende fazer deve ser aliado às normas que permitam alcançar o objetivo traçado, para alcançar a qualidade total (TOLEDO *et al*, 2003).

3.4 Óleo-resina de copaíba

A origem do nome copaíba relaciona-se ao tupi "cupa-yba": a árvore de depósito, ou que tem jazida, em alusão clara ao óleo que guarda em seu interior (BIAVATTI *et al*, 2006).

Entre os produtos naturais utilizados no país, o óleo da copaíba tem uma grande representação social e econômica, especialmente na região amazônica, onde é nativo e largamente empregado (RAMOS, 2006).

As copaibeiras são árvores nativas da região tropical da América Latina e da África Ocidental. No Brasil são encontradas facilmente na região Amazônica e Centro-Oeste, sendo as espécies mais abundantes: *Copaifera officinalis* L., *C. guianensis* Desf., *C. reticulada* Ducke, *C. multijuga* Hayne, *C. confertiflora* Bth, *C. langsdorffii* Desf., *C. coriacea* Mart., e *C. cearensis* Huber ex Ducke (VEIGA JR; PINTO, 2002).

De acordo com Alencar (1982), a *Copaifera multijuga* pertence à família Leguminosae-Caesalpinioideae, uma árvore de grande porte que atinge na reserva Ducke até 36 m de altura com diâmetro de até 80 cm, sendo, mais frequentes, os diâmetros de 40-50 cm.

Esta espécie tem habitat em floresta de terra firme, encontrada com maior frequência em solos argilosos, podendo ocorrer em solos arenosos.

O óleo-resina da *Copaifera multijuga* é um líquido transparente, viscoso e fluido, com cheiro forte e odor de cumarina, sabor acre e amargo. Pode ser armazenado por até 2 anos sem alterar as suas propriedades podendo transformar-se em resina se exposto ao ar e à luz. (Mendonça; Onofre, 2009).

Segundo relato de literatura acredita-se que o óleo da copaíba seja um produto de excreção ou desintoxicação que funciona como defesa da árvore contra animais, fungos e bactérias. Este óleo é encontrado em canais secretores localizados em todas as partes da árvore, tendo no tronco seu compartilhamento mais saliente (ALENCAR, 1982).

A extração do óleo é feita por uma técnica considerada não agressiva a árvore, consistindo em duas perfurações no tronco com o trado, a primeira deve ser feita um metro acima da base da planta e a segunda de um metro a um metro e meio acima da primeira. Um cano de PVC de $\frac{3}{4}$ de polegada é inserido nos orifícios. Após a extração, o orifício é vedado com uma tampa vedante de plástico para impedir a infestação da árvore por fungos e cupins (OLIVEIRA; LAMEIRA; ZOGHBI, 2006). Esta prática garante também que, de um mesmo espécime, possa ser coletado óleo várias vezes ao ano, sem danos à espécie vegetal (ALENCAR, 1982).

Alguns fatores podem interferir na qualidade do óleo, entre eles estão: espécie da árvore, idade e época do ano (OLIVEIRA; LAMEIRA; ZOGHBI, 2006). O melhor período de coleta para a espécie *C. multijuga* são os meses de estiagem (julho a novembro), pois neste período ocorre largo rendimento do óleo (ALENCAR, 1982).

No entanto, Tappin *et al* (2004) relataram que os óleos da copaíba apresentam mais variabilidade nos seus componentes, devido a fatores bióticos, como fungos e insetos, do que a luminosidade e nutrientes do solo.

O produto popularmente denominado de óleo da copaíba é constituído de 40 a 50% de essência e 40 a 60% de resina. Quando pura, a essência é um líquido de aspecto incolor, límpido, transparente com odor e sabor de copaíba.

3.4.1 Composição química

Observa-se que existe uma variação na composição química dentro de gênero *Copaifera* e até mesmo entre uma mesma espécie (GOMES *et al*, 2007). A composição da resina varia de acordo com a sua procedência, no Brasil é composta pelos ácidos paracopaíbico e ilusônico (BANDEIRA *et al*, 1999a). Porém pouco se sabe da relação entre as estruturas e a atividade dos componentes; atividade essas que incluem: ação bactericida, analgésica, anti-helmíntica, anti-inflamatória, gastroprotetora, antitumoral e tripanocida (CASCON; GILBERT, 2000).

Bandeira *et al* (1999a) realizaram análise fitoquímica através de cromatografia gasosa da *Copaifera multijuga*, visando identificar seus principais componentes e ainda obtiveram as frações deste óleo através de destilação, com o intuito de utilizá-las como veículo ao hidróxido de cálcio. Esses autores concluíram que o óleo de *C. multijuga* apresentou vários sesquiterpenos, principalmente β -cariofileno, α -humuleno, bisobolen, cedreno e cadieno.

Cascon e Gilbert (2000) analisaram a composição química quantitativa e qualitativamente dos óleos-resinas da copaíba das espécies *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer e *Copaifera multijuga* Hayne através da cromatografia gasosa e espectrometria de massa. Os autores observaram que a *Copaifera multijuga* foi a espécie que as frações de sesquiterpenos predominaram, enquanto que nas outras espécies analisadas, *C. guianensis* e *C. duckei*, predominaram os ácidos diterpenos. Todas as amostras utilizadas neste estudo apresentaram em comum apenas os sesquiterpenos β -cariofileno e α -bergamoteno que não estão restritos apenas ao gênero *Copaifera*. Relataram ainda, que o óleo-resina da *C. multijuga* das amostras estudadas foi caracterizado pela grande

predominância de β -cariofileno e δ -cadineno. Os autores concluíram que ocorre uma significativa variação química não somente entre as espécies, mas também, dentro de uma mesma espécie, o que pode ocasionar diferentes ações farmacológicas e citotoxicidades.

Veiga Jr *et al* (2001) analisaram a composição química de amostras comerciais de óleo da copaíba e atividade antiedema das mesmas. A composição química das amostras foi muito similar, com a predominância dos sesquiterpenos β -cariofileno e α -bergamoteno, com exceção de uma amostra.

Lima *et al* (2003) descreveram que o óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne e suas frações reduziram a atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*. O β -cariofileno e α -humuleno eram os componentes majoritários, representando 57% e 8,28% (teor relativo) da composição química do óleo-resina. Os resultados deste estudo sugeriram que óleo-resina da copaíba pode ser um agente antitumoral e antineoplásico seguro e útil, podendo ser usado como um quimioterápico oral.

Veiga Jr *et al* (2007) compararam a composição química e a atividade anti-inflamatória do óleo-resina da *Copaifera cearenses* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke e *Copaifera multijuga* Hayne. Na análise química os principais sesquiterpenos foram β -cariofileno, seguido do α -humuleno, α -copaeno, α -bergamoteno, δ -cadieno, com diferentes concentrações em cada óleo-resina. Quanto aos diterpenos, os óleos-resinas não apresentaram um consenso em relação aos compostos químicos, como apresentados nos sesquiterpenos.

Vasconcelos *et al* (2008), em um estudo para avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de um cimento odontológico à base de óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne, realizaram análise cromatográfica do óleo-resina da copaíba e revelaram que entre os seus componentes estão vários sesquiterpenos, principalmente β -cariofileno (9,2%), α -humuleno (1,8%), germacreno D (3,5%), óxido de cariofileno (11,5%), cubenol (16,7%) e

bisabolol (7,2%) e também diterpenos de esqueleto labdano, como os ácidos copálico (2,1%), 3 β -hidróxi-copálico (1,7%) e pinifólico (1,3%).

Barbosa *et al* (2013) analisaram a composição química de 22 amostras coletadas de óleo de *Copaifera multijuga* Hayne. No total, 35 componentes químicos das amostras foram identificados, sendo os sesquiterpenos β -cariofileno e óxido cariofileno os mais comuns. Estes sesquiterpenos foram detectados em todas as amostras em diferentes concentrações.

3.4.2 Propriedades medicinais

O óleo-resina da copaíba tem sido usado pelas populações amazônicas desde muito tempo, devido suas propriedades medicinais. O óleo-resina de copaíba é um produto extraído de várias espécies do gênero *Copaifera* (Veiga Jr; Pinto, 2002) e utilizado há muito tempo pelos índios para tratamento de feridas, devido aos seus efeitos anti-inflamatórios (Veiga Jr *et al*, 2001; Veiga Jr *et al*, 2006; Veiga Jr *et al*, 2007; Agra *et al*, 2007; 2008), antitumorais (Lima *et al*, 2003), antissépticos (Bruneton, 1987), ação germicida (Bloise, 2003; Biavatti *et al*, 2006), antibacterianos (Opdyke, 1976; Bandeira, 1998; Miranda *et al*, 2000; Santos *et al*, 2008), antifúngico (Abinader, 2005; Bandeira *et al*, 2006), antileishmanial (Soares *et al*, 2013).

Veiga Jr; Pinto (2002) em revisão de literatura sobre o gênero *Copaifera l.* revelaram que vários dos compostos já isolados ou detectados nos óleos de copaíba tiveram suas propriedades farmacológicas descritas em vários estudos. Entre eles, destaca-se o cariofileno ao qual se atribui as seguintes ações: antiedêmica, fagorrepelente, anti-inflamatória, anti-tumoral, antialérgica e bactericida.

Costa-Lotufo *et al* (2002) demonstraram em ensaios *in vitro* que o ácido kaurenóico isolado da óleo-resina da *Copaifera langsdorffi* interferiu no desenvolvimento de embriões de ouriço-do-mar, proporcionou hemólise de eritrócitos humanos e de ratos e inibiu em 95% a

proliferação de células leucêmicas humanas e em 45% as células de câncer de mama e cólon, indicando o potencial citotóxico do ácido kaurenóico.

Gomes *et al* (2007) compararam a atividade antinociceptiva entre as espécies da *Copaifera multijuga* e *Copaifera reticulata*, através de modelos de indução da dor periférica, espinhal e supra-espinhal. A ação antinociceptiva entre as diferentes espécies não teve diferença estatística significativa, e as mesmas apresentaram efeitos antinociceptivos periféricos e centrais, o que indica o uso do óleo-resina da copaíba testados no tratamentos de desordens álgicas.

3.4.2.1 Atividade antimicrobiana e anti-inflamatória

Bandeira *et al* (1999b) avaliaram a atividade antibacteriana e a compatibilidade biológica do óleo essencial e da resina da *Copaifera multijuga*. Pastas foram formuladas com hidróxido de cálcio ou óxido de zinco associados ao óleo essencial ou a resina. Os resultados destes estudos demonstraram que as pastas experimentais de hidróxido de cálcio e óxido de zinco associadas ao óleo essencial ou a resina apresentaram atividade antibacteriana frente ao *Streptococcus mutans*. O óleo da copaíba expressou efeito bacteriostático e bactericida, e a resina bacteriostática frente ao *Streptococcus mutans*.

Simões (2004) formulou um gel à base de óleo-resina da copaíba (*Copaifera multijuga*), realizou seu controle de qualidade e analisou a atividade antibacteriana do referido gel frente a cepas isoladas do biofilme dental (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus constellatus*) e cepas padrão (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus oralis*). Foi observado que todos os microrganismos testados foram suscetíveis à ação antibacteriana do gel experimental no teste de difusão em ágar.

Abinader (2005) avaliou *in vitro* a atividade antimicrobiana da pasta de hidróxido de cálcio associada aos diferentes veículos: oleoso (óleo-resina *in natura* e óleo essencial da

Copaifera multijuga e *Copaifera reticulada*), aquoso (soro fisiológico) e viscoso (Polietilenoglicol 400) frente a *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*, conclui que todas as pastas experimentais apresentaram atividade antimicrobiana frente à *Candida albicans* e ao *E.faecalis* e observou que as pastas formuladas com os óleos essenciais da *C.multijuga* e *C.reticulata* apresentaram maior halo de inibição.

Valdevite (2007) avaliou a ação do extrato bruto hidroetanólico das folhas, do óleo-resina e de suas frações, a fração volátil e a fração resinosa, de Copaíba (*Copaifera langsdorffii*) sobre os fatores de virulência de *S. mutans*, que tanto o extrato hidroetanólico das folhas e as frações não apresentaram nenhum efeito bactericida nas concentrações testadas, sugerindo que eles exercem um efeito bacteriostático. Por outro lado o óleo-resina exibiu um efeito bacteriostático em baixa concentração (concentração inibitória mínima CIM=0,4mg/mL) e um efeito bactericida em concentrações maiores (0,8 mg/mL).

Santos *et al* (2008) compararam a atividade antimicrobiana entre *Copaifera martii*, *Copaifera officinalis* e *Copaifera reticulata* frente à bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos dermatófitos. Todas as espécies da *Copaifera* estudadas apresentaram atividade antibacteriana frente a microrganismos Gram-positivos, mostrando atividade bactericida, diminuindo a viabilidade das bactérias. Foi observado uma atividade moderada frente aos fungos dermatófitos e não apresentaram atividade frente às bactérias Gram-negativas.

Vasconcelos *et al* (2008) formularam um cimento odontológico obtido da associação do hidróxido de cálcio, óxido de zinco e óleo-resina *in natura* da copaíba (*Copaifera multijuga*). Avaliaram as propriedades físico-químicas de solubilidade e desintegração e a atividade antibacteriana através do teste de diluição em meio líquido frente às cepas padrão de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e *Streptococcus sanguinis* ATCC 15300. Nesse ensaio foram utilizados os seguintes grupos experimentais: o cimento contendo óxido de zinco

(ZnO), hidróxido de cálcio Ca(OH)_2 e óleo-resina da copaíba (G1), e cada um dos componentes isoladamente ZnO (G2), Ca(OH)_2 (G3) e óleo-resina da copaíba (G4). Os resultados obtidos das propriedades físico-químicas de solubilidade e desintegração demonstraram dentro dos padrões preconizados pela Associação Dental Americana. Todos os grupos analisados demonstraram atividade antibacteriana, o G4 apresentou os melhores resultados e o G1 mostrou-se um cimento promissor a ser utilizado na odontologia.

Garrido *et al* (2009) avaliaram *in vitro* cimentos endodônticos à base de óleo-resina de *Copaifera multijuga*, comparando-os com outros cimentos endodônticos (Sealer 26®, Endofill® e AH plus®) usados no mercado, realizando os testes físico-químicos e de biocompatibilidade biológica preconizados pela Associação Dentária Americana. O experimento demonstrou resultados físico-químicos e propriedades antisséptica, anti-inflamatória e cicatrizante satisfatórios para o cimento à base de *Copaifera multijuga*.

Souza *et al* (2011) realizaram um estudo da atividade antibacteriana através do concentração inibitória mínima com método de coloração de resazurina (0,025%) de terpenoides isolados da *Copaifera langsdorffii* e derivados semi-sintéticos desses componentes isolados frente a *S. salivarius*, *S. sobrinus*, *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis* e *Lactobacillus casei*. O ácido copálico foi o diterpeno que melhor apresentou atividade antibacteriana (CIM 2,0 a 60µg/mL). O estudo concluiu que o ácido copálico é um importante metabólito na pesquisa de um novo agente antibacteriano contra patógenos responsáveis pela cárie dental.

A atividade anti-inflamatória do óleo-resina da copaíba tem sido a mais difundida na medicina popular e investigada no meio científico (RAMOS, 2006).

Veiga Jr *et al* (2001) analisaram a composição química de amostras comerciais de óleo da copaíba e atividade antiedema das mesmas. Os autores relataram ainda que algumas amostras apresentaram a atividade antiedema e estas divergiram quanto ao agente indutor, bradicinina ou carragenina. Porém se obteve melhores resultados contra o edema de pata nos

ratos quando se aplicou somente frações de hidrocarbonetos, em relação as frações de álcoois sesquiterpenos e ácidos diterpenos.

Paiva *et al* (2004) observaram que aplicação tópica do óleo-resina da *Copaifera langsdorffi* acelerou a cicatrização quando comparada com o controle no período experimental de nove dias. Nos demais períodos experimentais não houve diferença estatística. Os autores concluíram que o óleo-resina testado apresenta atividade cicatricial em feridas induzidas nos ratos.

Cavalcanti Neto *et al* (2005) compararam histologicamente o processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos após a aplicação tópica do óleo-resina da *Copaifera reticulata*, adquirida na feira do produtor, solução aquosa de digluconato de clorexidina a 0,12% e soro fisiológico a 0,9%, como controle, nos períodos experimentais de 1, 7 e 15 dias. As feridas cutâneas tratadas com clorexidina a 0,12% apresentaram melhor cicatrização quando comparadas com os outros grupos. Os autores deste trabalho não descreveram a composição química do óleo-resina, o que nos leva a crer que os resultados conflitantes possam ser atribuídos às diferenças químicas dos óleos-resinas relatados.

Ramos (2006) avaliou a atividade anti-inflamatória e farmacológica de uma fração volátil do óleo-resina da copaíba. A fração microencapsulada inibiu a resposta inflamatória na mesma magnitude que fração volátil livre, mostrando que o processo de microencapsulação não alterou a atividade, possibilitando o seu uso como forma farmacêutica ou intermediária na preparação de outras. O β -cariofileno inibiu a resposta inflamatória na dose de 32 mg/kg, na mesma magnitude que a fração volátil, o que nos permite atribuir a este, a atividade anti-inflamatória observada.

Veiga Jr *et al* (2007) compararam a composição química e a atividade anti-inflamatória do óleo-resina da *Copaifera cearenses* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke e *Copaifera multijuga* Hayne. Na avaliação da atividade anti-inflamatória os óleos

testados reduziram o acúmulo de leucócitos e neutrófilos, em diferentes concentrações. O óleo-resina da *Copaifera multijuga* (100mg/kg) foi considerado o mais potente na atividade anti-inflamatória induzida, os autores correlataram que este óleo foi o que apresentou maior concentração de β -cariofileno (57,5%), e que este composto pode ser descrito como um importante agente anti-inflamatório.

Gomes *et al* (2007) avaliaram ações anti-inflamatórias e antinoceptivas de frações obtidas do óleo-resina da *Copaifera multijuga*, que representam as três principais classes de compostos do gênero *Copaifera*, hidrocarbonetos sesquiterpenos, álcoois sesquiterpenos e ácidos diterpenos. Os resultados demonstraram atividade anti-inflamatória e antinoceptiva, que pode ter sido atribuída aos efeitos de vários constituintes presentes, atuando de forma similar a um anti-inflamatório não esteroideal ou drogas opióides.

No estudo realizado por Pereira *et al* (2012) utilizaram o óleo essencial obtido do pericarpo da *Copaifera langsdorffii* por hidrodestilações sucessivas para verificar sua ação anti-inflamatória através do modelo de edema de pata de rato. Os autores observaram a ação anti-inflamatória do óleo hidrodestilado do pericarpo e ressaltaram que deve haver uma padronização dos constituintes do óleo para que a ação seja mesmo eficaz.

3.5 Soluções de limpeza de cavidade

A limpeza cavitária é baseada na remoção de detritos oriundos do preparo cavitário, tais como, raspas de dentina e esmalte, bactérias, pequenos fragmentos ou partículas abrasivas dos instrumentos rotatórios, óleos provenientes dos aparelhos de alta e baixa velocidade, formando uma película sobre o dente denominada *smear layer* (FRANCO *et al*, 2007).

Anderson; Loesche; Charneneneu (1985) detectaram através de estudos bacteriológicos, a permanência de bactérias no interior dos túbulos dentinários em cerca de 15 a 40% das lesões de cáries examinadas após o término do preparo cavitário e a aplicação de evidenciadores de cárie. Brännström (1986) afirmou ainda que a presença de bactérias após

realizado o processo restaurador permite a difusão de toxinas para a polpa resultando em irritação e inflamação do tecido pulpar.

Quando se realiza a remoção da lesão de cárie, quanto mais profundo o preparo da cavidade maior será o número de túbulos dentinários expostos, maior o seu diâmetro e maior a área de canalículos por superfície. Através do corte da estrutura dentária forma a *smear layer*, que se deposita de maneira homogênea sobre os tecidos duros dentais, por isto pode ter uma espessura variável de 0,5 a 15 μm (NAKABAYASHI, 1992).

Essa camada representa uma proteção natural ao complexo dentino-pulpar contra a invasão de bactérias, produtos tóxicos, toxinas bacterianas e ácidos. Porém, a presença desta camada também apresenta desvantagens como a interferência direta nos mecanismos de adesão de alguns sistemas adesivos e a manutenção de bactérias no interior da camada. 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 e combater e eliminar microrganismos patogênicos existentes nas paredes cavitárias (FRANCO *et al*, 2007).

Mondelli (1998) classificou os agentes de limpeza de cavidade restauradora em dois grupos: os desmineralizantes, que são os ácidos, e os não-desmineralizantes, que são os germicidas e alcalinizantes. Encontram-se no mercado vários produtos que podem ser utilizados como agentes de limpeza cavitária, cuja ação e indicação variam de acordo com a sua natureza química e com a indicação clínica do dente. Além da efetividade em termos de limpeza, é imprescindível observar a biocompatibilidade do agente diante do complexo dentino-pulpar. Por isso, em cavidades profundas, não é aconselhável a utilização de agentes desmineralizantes, que apesar de sua eficiência na ação de limpeza de cavidade pode causar efeitos deletérios ao complexo dentinopulpar .

Os principais agentes não-desmineralizantes utilizados na prática diária são os germicidas, à base de clorexidina, e os alcalinizantes, à base de hidróxido de cálcio (BUSATO, 2002).

A clorexidina é um componente catiônico, pois se liga imediatamente a superfície bacteriana carregada negativamente, sendo uma bis-biguanida não tóxica que é preparada sob a forma de sais, dentre eles o acetato, hidrocloreto e o gluconato de clorexidina, apresenta propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas. É considerado um agente antimicrobiano de amplo espectro que atua sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas aeróbicas e anaeróbicas, fungos e leveduras. Possui estabilidade, é segura e efetiva. Suas propriedades catiônicas favorecem a adsorção seletiva pela hidroxiapatita do esmalte dos dentes. Em altas concentrações, ela é bactericida e faz com que o citoplasma da célula se precipite, o que resulta em morte celular (HIGIOKA; BARSOTTO, 2013).

As soluções à base de hidróxido de cálcio são úteis para qualquer tipo de profundidade do preparo cavitário, pois além de limparem mecanicamente a cavidade, neutralizam a acidez bacteriana através de sua alcalinidade e ainda agem como estimuladores na formação de dentina reparadora, em menor tempo que outros materiais (BUSATO, 2002).

Coelho (2011) avaliou a atividade antimicrobiana e a compatibilidade biológica das emulsões de limpeza de cavidade formulada à base do óleo-resina da copaíba (*Copaifera multijuga*) em molares de rato, nas seguintes concentrações: copaíba a 10%, copaíba a 10% com amirina, copaíba a 30% e copaíba a 30% com amirina. A atividade antibacteriana destas emulsões foi analisada pelos testes da concentração inibitória mínima, concentração bactericida mínima e análise da viabilidade celular por técnica de fluorescência, frente aos *Streptococcus mutans* ATCC 25175; *Streptococcus oralis* ATCC 10557; *Streptococcus salivarius* ATCC 7073 e *Lactobacillus paracasei* ATCC 335. A atividade citotóxica das emulsões foi avaliada através dos testes de hemólise e de cultura de células, frente a

fibroblastos murinos NHI3T3, através do ensaio de Alamar Blue. Os resultados demonstraram que as emulsões e as pastas testes à base do óleo-resina da copaíba são promissores como soluções de limpeza para aplicação na odontologia.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo básico; quantitativo e qualitativo; descritivo; experimental *in vitro* controlado (LAKATOS; MARCONI, 2003).

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

O óleo-resina da *Copaifera multijuga* foi extraído da reserva Ducke, no quilômetro 17 da Rodovia Manaus-Itacoatiara, catalogada sob o nº69 pelo Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA (BARBOSA *et al*, 2013).

A coleta foi realizada pelo método racional e de preservação da árvore pelo mateiro da reserva, consistindo na confecção de um furo por meio de um trado 7/8 polegada de diâmetro e 1,00 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 (Figura 01). Após esse procedimento, o óleo-resina foi coletado em um recipiente esterilizado previamente preparado para esse fim. Após a coleta, o orifício foi vedado com argila, procedimento de rotina realizado na reserva (BANDEIRA *et al*, 1999b).

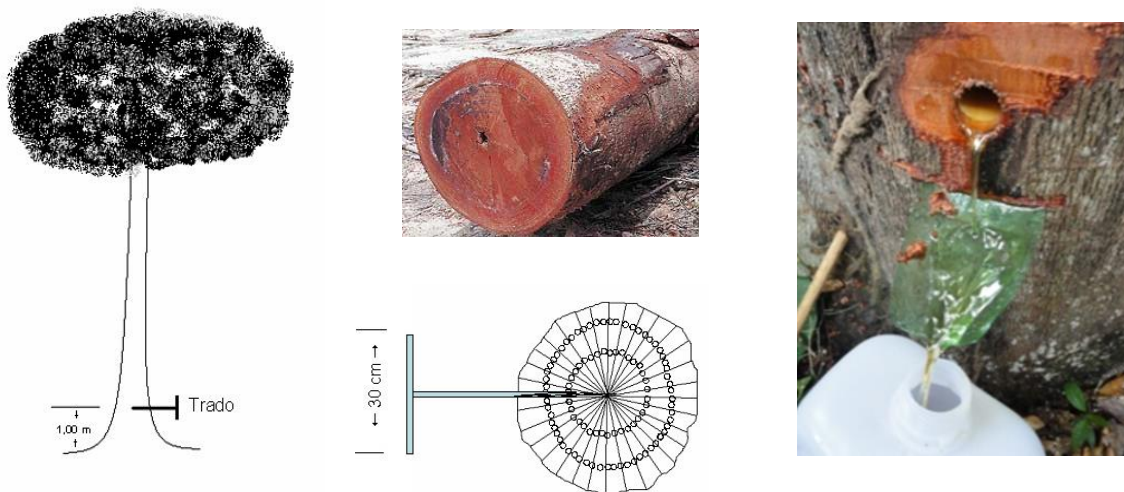


Figura 01 – Desenho esquemático do processo de perfuração do tronco da copaibeira e coleta do óleo de copaíba

Fonte: www.oleo-copaiba.com

4.3 Preparo da emulsão do óleo de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) a 10%

Emulsões de limpeza de cavidade contendo óleo-resina da *Copaifera multijuga* Hayne a 10%, emulsificante, conservante e veículo aquoso foram formuladas obedecendo às orientações da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010c) (Figura 02).



Figura 02 – a) Preparo da emulsão à base de *Copaifera multijuga* Hayne a 10%; b) Aspecto final da emulsão-teste

As emulsões formuladas foram acondicionadas em vidros cor âmbar com capacidade de 30 mL e mantidas em locais com diferentes temperaturas e em diferentes períodos. Conforme a padronização descrita na Farmacopeia Brasileira (1988), os locais escolhidos para os testes foram: estufa (37°C), freezer (-12°C), geladeira ($\pm 4-8^\circ\text{C}$), temperatura ambiente ($\pm 25,9^\circ\text{C}$), temperatura ambiente ao abrigo da luz ($\pm 28,2^\circ\text{C}$) e local com ar-condicionado ($\pm 24-26^\circ\text{C}$). Os períodos experimentais analisados foram 0, 3 e 6 meses (BRASIL, 2013).

4.4 Caracterização da emulsão

O controle de qualidade da emulsão à base de óleo de copaíba a 10% para limpeza de cavidade dentinária foi formulado segundo as especificações da Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2010c) e resoluções RE n° 899/2003, RE n° 01/2005, RDC n° 17/2010 e RDC n° 13/2013 da ANVISA (BRASIL, 2010a; BRASIL, 2011; BRASIL, 2013), para definição da estabilidade química e física desta emulsão, além da sua esterilidade, determinando assim o melhor local para armazenamento do produto. A atividade antibacteriana das emulsões foi

realizada seguindo as metodologias da concentração inibitória mínima e da concentração bactericida mínima em microdiluição proposta por Andrews (2001), adaptação de Sampaio *et al* (2009).

4.4.1 Testes físico-químicos de controle de qualidade

4.4.1.1 Teste de centrifugação

Neste teste preliminar de estabilidade, 5 mL de cada formulação à base de óleo de copaíba elaborada foram acondicionadas em tubos de Falcon previamente esterilizados e, posteriormente, centrifugados (5804R, EPPENDORF, Alemanha) a 3000 rpm por 30 minutos, à temperatura ambiente, para observação de uma possível cremeação ou separação das fases da emulsão. O teste foi realizado em triplicata (BRASIL, 2010c) (Figura 03).

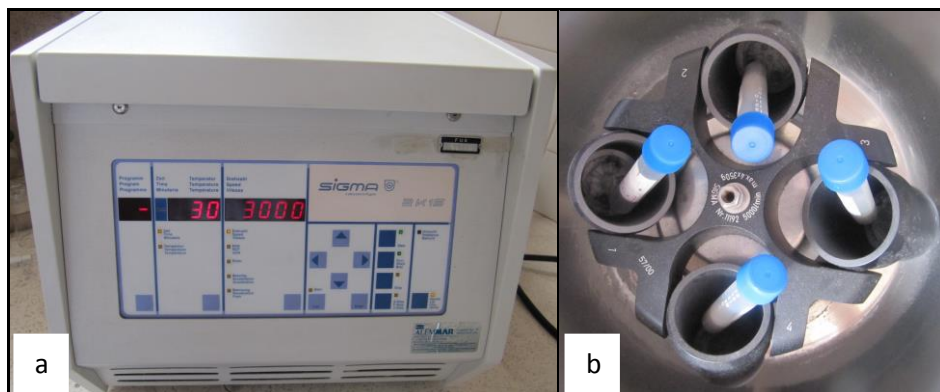


Figura 03 – a) Centrífuga programada; b) Disposição dos tubos de Falcon com emulsão-teste

4.4.1.2 Determinação do pH

O pH foi determinado por potenciômetro (TEC 2,TECNAL,SP,Brasil). Os eletrodos foram acoplados ao potenciômetro e calibrados com soluções-padrão pH 7,0 e 4,0 (Dinâmica®, Brasil) a 25°C, permitindo linearidade nas respostas em relação às alterações de potencial observadas. Os resultados corresponderam à média de três determinações sucessivas (BRASIL, 2010c) (Figura 04).

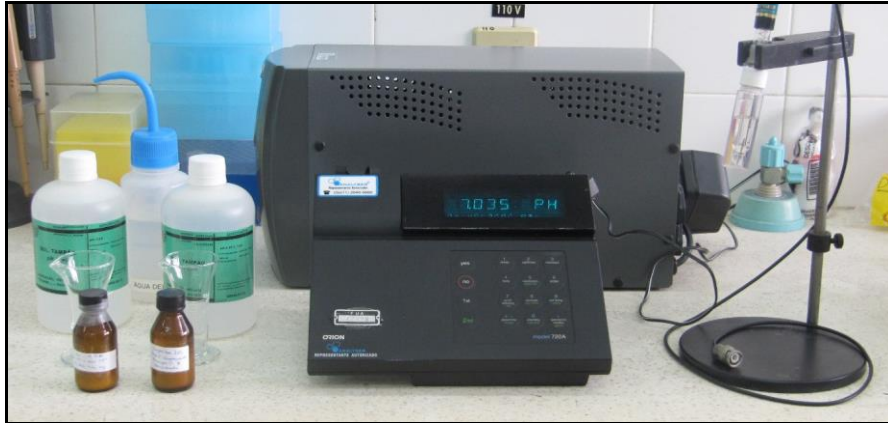


Figura 04 – Esquema geral do equipamento para determinação do pH

4.4.1.3 Determinação da densidade

A densidade foi obtida através da utilização de balança analítica (Shimadzu®, Brasil) e um picnômetro limpo e seco, com capacidade de 5 mL e previamente calibrado, através da determinação da massa do picnômetro vazio e da massa de seu conteúdo com água destilada (Figura 05).

A amostra foi transferida para o picnômetro e pesada. O peso da amostra foi determinado através da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio. Calculou-se a densidade pela razão entre a massa da amostra líquida e massa da água. O resultado foi obtido através da média de três determinações sucessivas (BRASIL, 2010c).

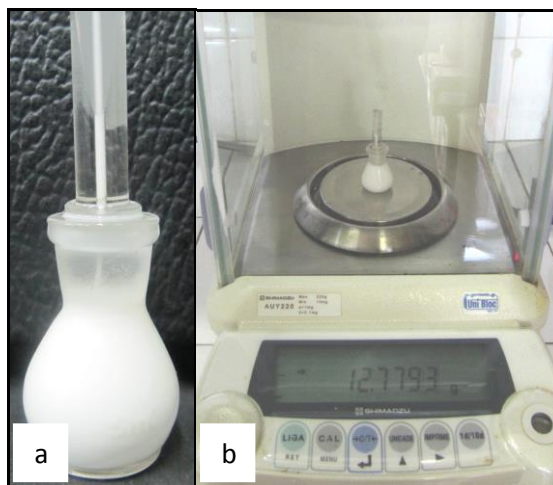


Figura 05 – a) Picnômetro com emulsão-teste; b) Balança analítica aferindo picnômetro com emulsão-teste

4.4.1.4 Avaliação microbiológica para pesquisa de contaminantes – Controle microbiológico da emulsão de *Copaifera multijuga* Hayne a 10%

O controle microbiológico da emulsão da *Copaifera multijuga* Hayne a 10% foi constituído pela determinação do número total de microrganismos aeróbios e pesquisa de levedura, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, conforme preconizado na Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2010c).

Para a pesquisa do número total de microrganismos, as emulsões foram preparadas na proporção 1:10, onde foram utilizados 100 µL da emulsão e 900 µL de água peptonada (Acumedia®, Estados Unidos). Em seguida as emulsões foram diluídas e homogeneizadas nas proporções 1:100; 1:1000 e 1:10000.

Para a contagem em placa dos microrganismos, uma alíquota de 10 µL de cada diluição seriada foi semeada, em triplicata, em placas de Petri contendo meios de cultura ágar Caseína-soja (Acumedia®, Estados Unidos) e ágar Sabouraud-dextrose (Difco®, França), separadamente (Figura 06).

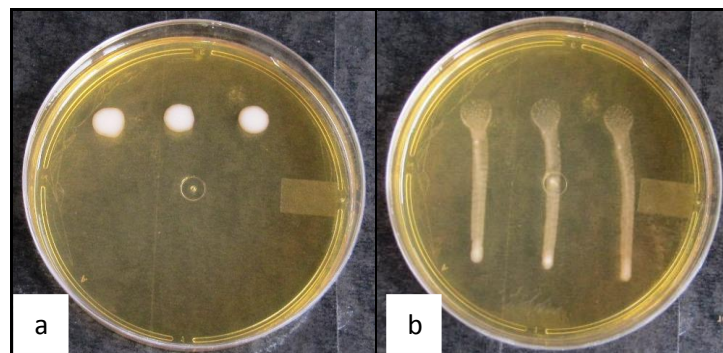


Figura 06 – a) Alíquota de 10 µL da emulsão-teste; b) Semeadura em triplicata em Ágar Sabouraud-dextrose

As placas foram incubadas a 35°C durante 24 e 48 horas para determinação de microrganismos aeróbios totais, no meio de cultura com ágar Caseína-soja (Acumedia®, Estados Unidos) e a 25°C durante 5 a 7 dias para determinação de fungos filamentosos e

leveduras, no meio de cultura com ágar Sabouraud-dextrose. Após este período, caso houvesse colônias suspeitas, seria determinada as unidades formadoras de colônia (UFC/mL) (Figura 07).

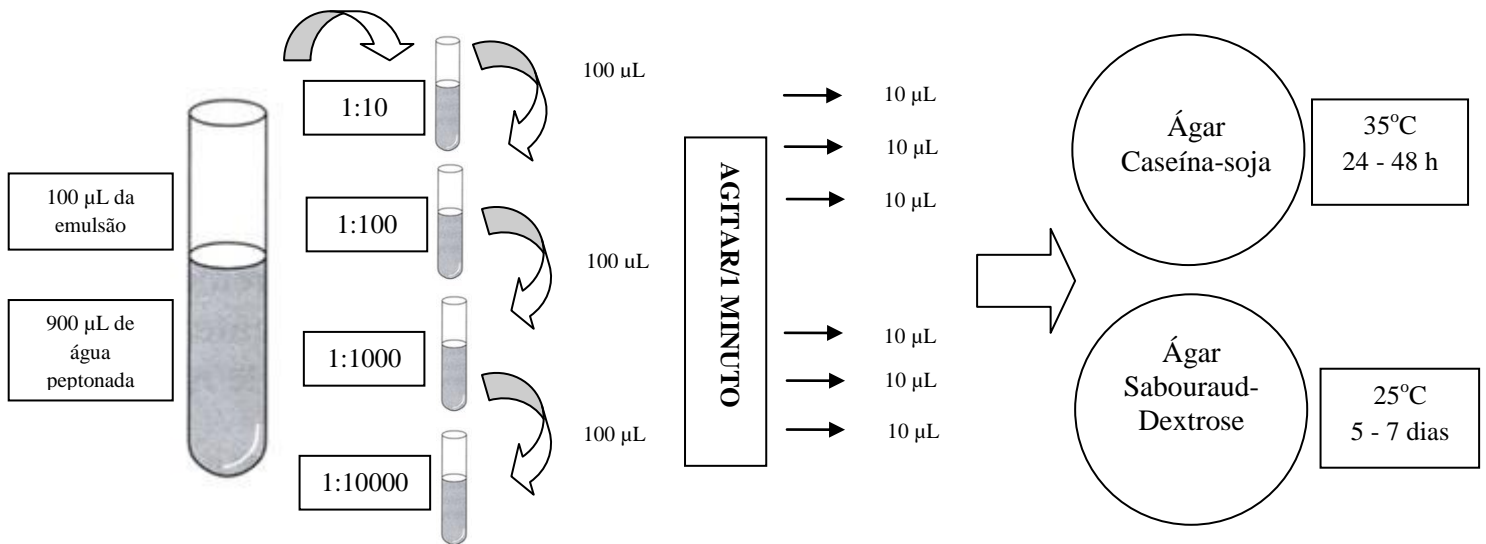


Figura 07 – Esquema para a pesquisa do número total de microrganismos

Fonte: VENÂNCIO, 2014

Para pesquisa de *Escherichia coli*, foram utilizados 100 µL da emulsão de *Copaifera multijuga* a 10% para 900 µL de caldo caseína-soja (Acumedia®, Estados Unidos). Em seguida, foi homogeneizado e incubado a 35°C durante 18 - 24 horas. Após esse período, 100 µL do caldo caseína-soja e emulsão foram transferidos para tubos contendo 900 µL de caldo MacConkey (Acumedia®, Estados Unidos) e incubado a 43 °C ± 1 °C durante 24 - 48 horas. Uma alíquota de 10 µL da subcultura foi semeada, em triplicata, em ágar MacConkey (Acumedia®, Estados Unidos) e incubada a 35°C durante 18-72 horas. O crescimento e características das colônias foram observados. Após este período, caso houvesse colônias suspeitas, seria determinado o número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) (Figura 08).

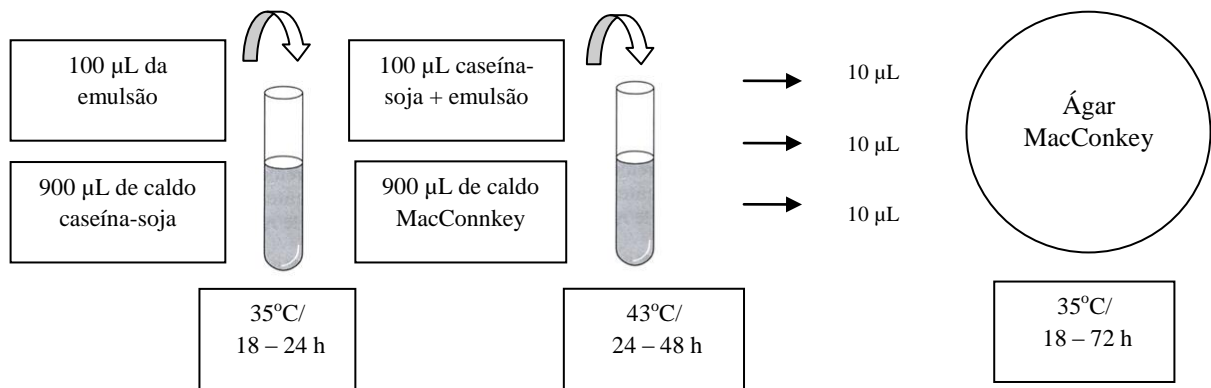


Figura 08 – Esquema para a pesquisa de *Escherichia coli*

Fonte: VENÂNCIO, 2014

Para pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa*, foram utilizados 100 µL da emulsão de *Copaifera multijuga* a 10% para 900 µL de caldo caseína-soja (Acumedia®, Estados Unidos). Em seguida, foi homogeneizada e incubada a 35°C durante 18-24 horas. Após esse período, uma alíquota de 10 µL da subcultura foi semeada, em triplicata, em ágar Cetrimida (Acumedia®, Estados Unidos) incubada a 35°C durante 18-72 horas. O crescimento e características das colônias foram observados. Após este período, caso houvesse colônias suspeitas, seria determinado o número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) (Figura 09).

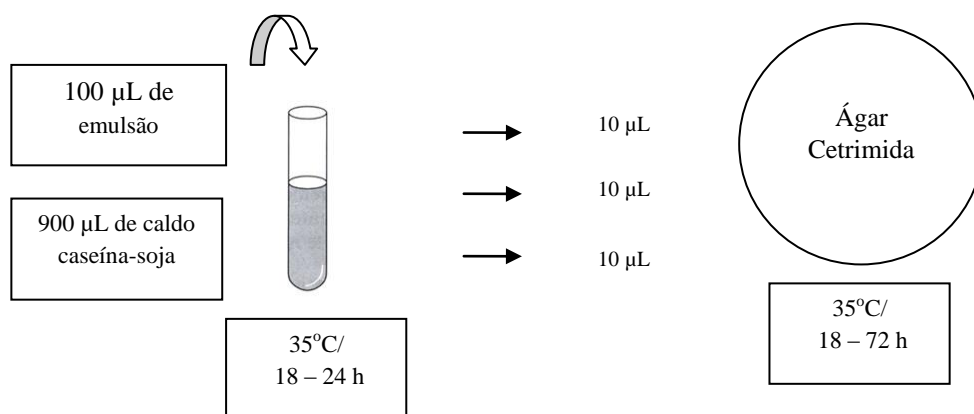


Figura 09 – Esquema para a pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa*

Fonte: VENÂNCIO, 2014

Para pesquisa do *Staphylococcus aureus*, foi utilizado 100 µL da emulsão de *Copaifera multijuga* a 10% para 900 µL de caldo de caseína-soja (Acumedia®, Estados

Unidos). Em seguida, foi homogeneizado e incubado a 35°C durante 18 a 24 horas. Após esse período, uma alíquota de 10 µL da subcultura foi semeada, em triplicata, em ágar Sal Manitol (Himedia®, Índia), que foi incubado a 35°C durante 18-72 horas. O crescimento e características das colônias foram observados. Após este período, caso houvesse colônias suspeitas, seria determinado o número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) (Figura 10).

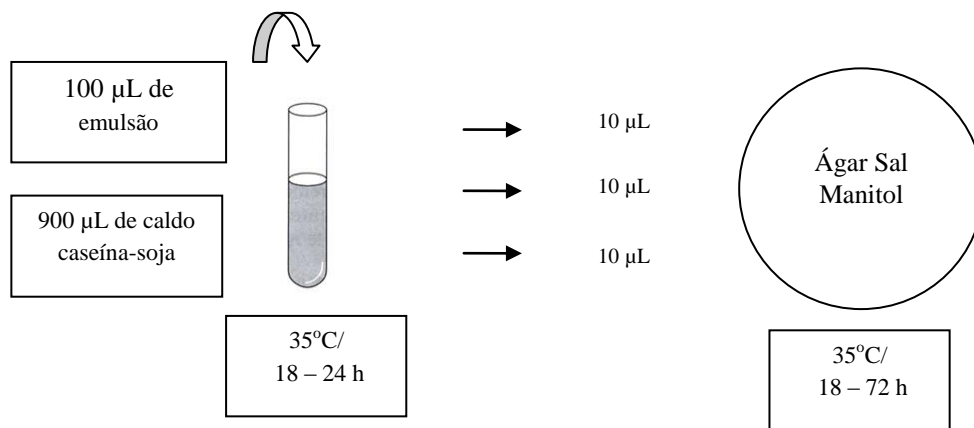


Figura 10 – Esquema para a pesquisa de *Staphylococcus aureus*

Fonte: VENÂNCIO, 2014

4.4.2 Avaliação dos caracteres organolépticos

A avaliação dos caracteres organolépticos foi baseada na alteração de cor, odor, brilho e consistência, verificando-se qual o local mais adequado para o armazenamento da emulsão-teste de copaíba sem alteração de suas características (BRASIL, 2013). A cor e o brilho foram analisados à luz do dia. A consistência foi avaliada através do toque, observando presença ou ausência de grânulos.

O odor da emulsão foi verificado com uma pequena amostra, colocada na palma da mão, que foi inalada devagar e repetidamente. Assim, determinou-se primeiramente, a intensidade do odor: nenhum; fraco; distinto ou forte e, a seguir, a sensação causada pelo odor: aromático; frutoso; mofado; rançoso ou amadeirado (Figura 11).



Figura 11 – Avaliação dos caracteres organolépticos: a) Avaliação da consistência; b) Avaliação do odor

4.4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana das emulsões do óleo-resina da copaíba a 10%

Os microrganismos foram fornecidos pelo laboratório do Instituto Nacional de Controle de Qualidade de Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro) e foram reativados seguindo às orientações do próprio instituto (Anexo A).

Os microrganismos utilizados foram: *Streptococcus mutans* (ATCC25175), *Streptococcus oralis* (ATCC10557), *Streptococcus salivarius* (ATCC7073) e *Lactobacillus paracasei* (ATCC335) (Anexos B – D).

Para preparação do inóculo, os microrganismos foram reativados em ágar MRS (Sigma-Aldrich®, Suíça) com 10% de sacarose (Synth®, SP, Brasil) em tubos de ensaio 10x150mm, incubados a 37°C por 24 horas em aerofilia para *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius* e *Lactobacillus paracasei*, e em microaerofilia para *Streptococcus mutans*.

Em condições assépticas, foram retiradas alíquotas do inóculo com o auxílio de uma alça de platina esterilizada de 5 mm de diâmetro e inoculadas em 5mL de solução salina

estéril (Nuclear®, SP) em tubos de ensaio 10x150mm. As suspensões foram turbilhonadas em vortex (MARCONI®, MA 162, SP, Brasil) até se tornarem homogênea. O inóculo foi padronizado pela escala #0,5 de McFarland (PROBAC do Brasil®, SP, Brasil).

- Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A atividade antibacteriana das emulsões óleo-resina da *Copaifera multijuga* a 10% foram determinadas segundo metodologia da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em microdiluição proposta por Andrews (2001), adaptação de Sampaio *et al* (2009).

As emulsões testes foram diluídas na concentração de 1:1, com Dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec®, Alemanha), polissorbato 80 (Vetec®, Brasil) e emulsão de copaíba a 10%, formando a solução-mãe. O controle positivo foi o digluconato de clorexidina a 2% (Biodinâmica®, PR, Brasil) e o controle negativo foi o veículo da emulsão (polissorbato 80 a 1%, diazolidinil ureia a 0,5% e água triesterilizada).

Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar (Marconi®, SP, Brasil), com vidrarias, ponteiros e meios de cultura previamente esterilizados. Foram utilizadas microplacas de 96 orifícios (em forma de “U”), de forma que cada poço possuísse um volume final de 100 µL. Na microplaca, as colunas foram distribuídas nos números de 1 a 12 e as linhas nas letras “A” até o “E”. Nos poços foram distribuídas as emulsões de forma a conter as diferentes concentrações da emulsão-teste. O sistema de diluição foi controlado pelo volume da solução-mãe utilizada, ocupando os poços 1 a 11 (Tabela 01).

Nos mesmos poços, foi um volume padrão de inóculo (20µL) acrescentado e para alcançar o volume final de 100µL, os mesmos foram preenchidos com diferentes volumes de meio (Tabela 02).

Volume dos poços (μL)												
Poço	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Emulsão (μL)	80	80	70	60	55	50	45	40	35	30	25	-
Meio (μL)	20	-	10	20	25	30	35	40	45	50	55	80
Inóculo (μL)	-	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Concentração final da emulsão-teste ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	26,66	26,66	23,33	20	18,33	16,66	15	13,33	11,66	10	8,33	0

Tabela 01 – Volume dos poços em μL na placa de microdiluição

Fonte: COELHO, 2011

A coluna 01 representou a esterilidade da substância teste, emulsão+meio sem bactérias. A coluna 12 representou a viabilidade das bactérias, meio + inóculo sem emulsão teste. A linha D representou o veículo (controle negativo) e linha E o digluconato de clorexidina a 2% (controle positivo) (Biodinâmica®, PR, Brasil) (Figura 12).

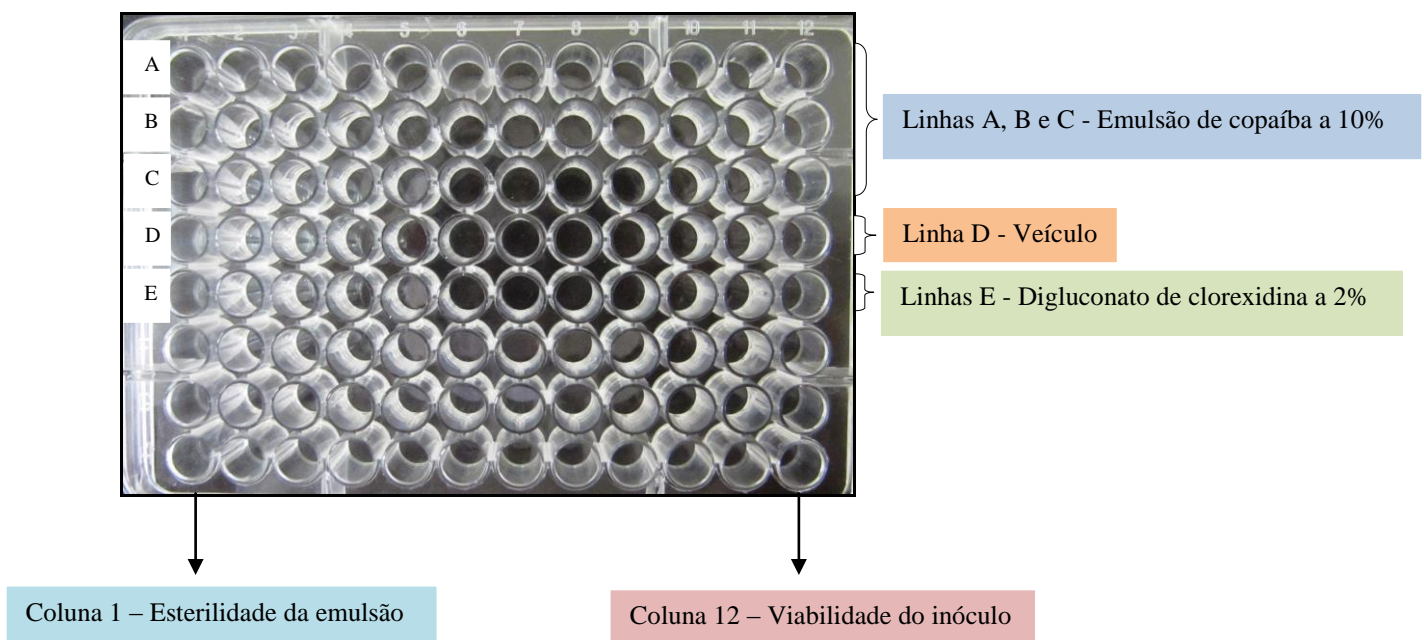


Figura 12 – Representação esquemática da distribuição em microplaca das substâncias testes

Para cada bactéria foi utilizada uma microplaca testando as emulsões do óleo-resina da copaíba a 10%. A atividade antibacteriana de cada emulsão foi testada em triplicata.

Após o preenchimento de todos os poços, as microplacas foram seladas com papel parafilme e incubadas a 37° C por 24 horas, em aerofilia para o *Streptococcus oralis*, *Lactobacillus paracasei*, *Streptococcus salivarius* e em microaerofilia o *Streptococcus mutans*.

Após o período de incubação, foram adicionadas nos poços 30 µL do reagente resazurina (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos) preparado em solução aquosa (0,01%, 10 mg diluída em 100 mL). As placas foram novamente incubadas por 4 horas.

A ausência de mudança de cor nos orifícios foi interpretada como microrganismo sensível à emulsão testada.

Para a confirmação da concentração bactericida mínima (CBM) foram retiradas alíquotas dos poços das emulsões da copaíba, semeadas em meio Ágar BHI (Himedia®, Índia) e incubadas a 37°C em aerofilia e microaerofilia de acordo com o microrganismo testado durante 24 horas para confirmar a presença de bactérias viáveis, determinando assim a menor concentração capaz de impedir o crescimento dos microrganismos.

4.5 Análise estatística

Os dados quantitativos foram apresentados por meio de gráficos e tabelas, onde se calculou a média e o desvio-padrão (DP) para os testes físico-químicos de determinação do pH e densidade. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para definir a normalidade entre as variáveis dependentes nos diferentes grupos pelo cruzamento dos fatores “ambiente” e “tempo”. Na análise dos dados utilizou-se a análise de variância (ANOVA). O software utilizado na análise foi o programa PAWS Statistics (v. 19, SPSS Inc, Chicado, IL), sendo que o nível de significância utilizado nos testes foi de 5% (CALLEGARI-JACQUES, 2007).

Os demais resultados obtidos pelo teste de centrifugação, avaliações microbiológica de contaminantes, organoléptica e atividade antimicrobiana foram tabulados e analisados pela estatística descritiva.

5 RESULTADOS

5.1 Testes físico-químicos de controle de qualidade

5.1.1 Teste de centrifugação

No teste de centrifugação, não foi observado separação de fases nos tempos de 0, 3 meses em freezer, geladeira e ar-condicionado; no tempo de 6 meses em freezer e geladeira. Nos demais ambientes armazenados por 3 e 6 meses, observou-se separação de fases (Figuras 13 - 15).



Figura 13 – Emulsão após centrifugação no tempo 0 (grupo controle)

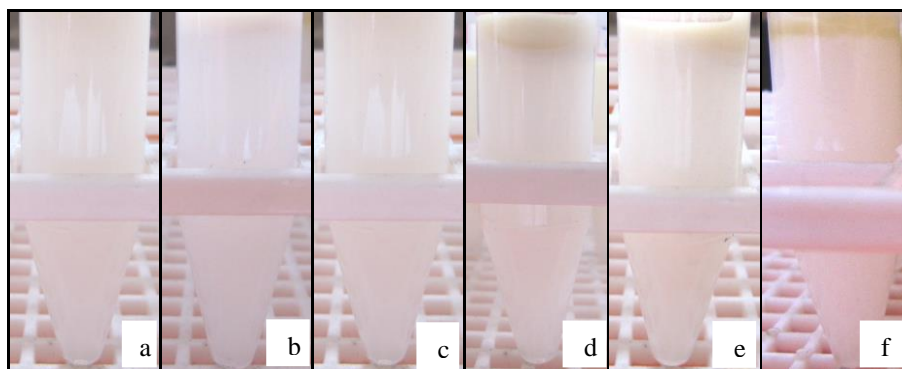


Figura 14 – Emulsão após centrifugação no tempo de 3 meses: a) freezer, b) geladeira, c) ar-condicionado, d) temperatura ambiente, e) ambiente escuro e f) estufa

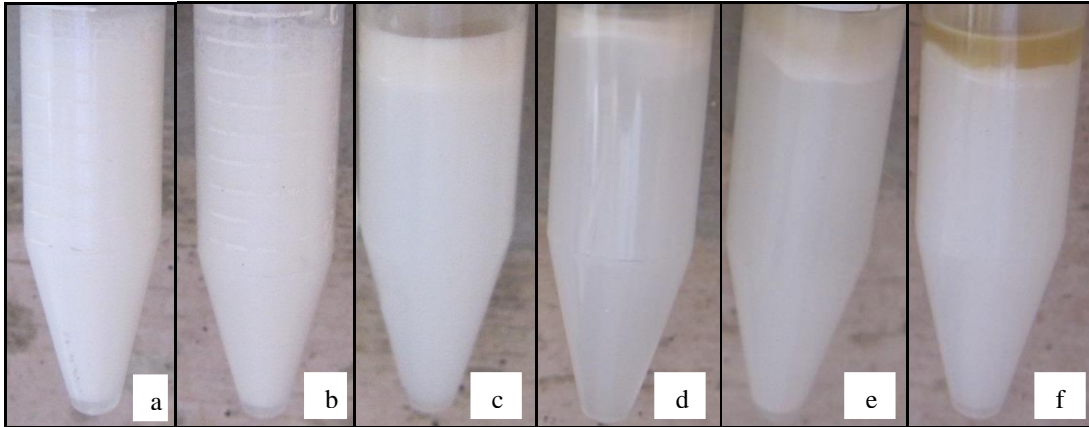


Figura 15 – Emulsão após centrifugação no tempo de 6 meses: a) freezer, b) geladeira, c) ar-condicionado, d) temperatura ambiente, e) ambiente escuro e f) estufa

5.1.2 Determinação do pH

O resultado do pH da emulsão do óleo de copaíba a 10% em relação ao local de armazenamento e o período experimental está descrito nas tabelas 02 e 03 e nos gráficos 01 e 02 (Apêndice A).

Estimativas					
Variável dependente: pH					
Ambientes	Média	Desvio Padrão	Intervalo de confiança 95%		
			Limite inferior	Limite superior	
Controle	4,270 ^a	,050	4,187	4,353	
Geladeira	4,598 ^b	,160	4,515	4,682	
Freezer	5,387 ^c	,050	5,303	5,470	
Ar-condicionado	3,975 ^d	,081	3,892	4,058	
Temperatura Ambiente	4,040 ^d	,170	3,957	4,123	
Ambiente escuro	3,887 ^d	,084	3,803	3,970	
Estufa	3,968 ^d	,057	3,885	4,052	

Tabela 02 – Valores médios do pH da emulsão óleo de copaíba a 10% nos diferentes locais de armazenamento

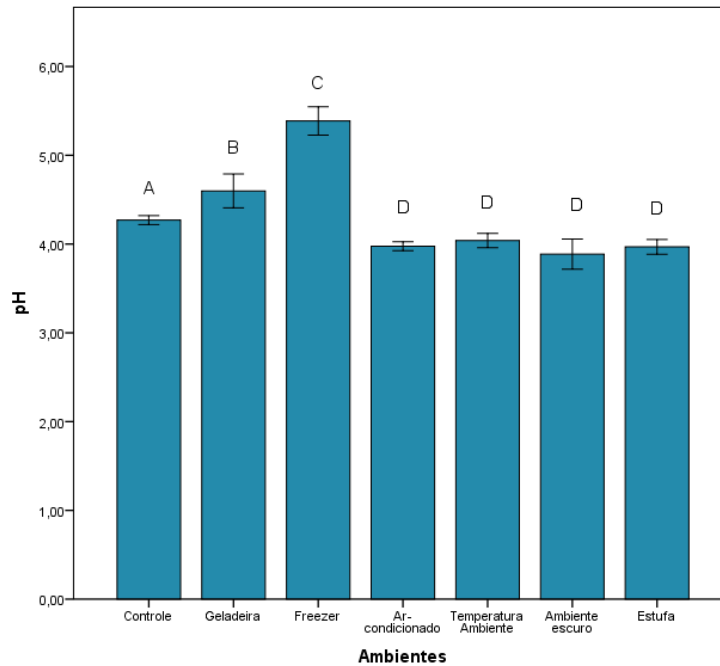


Gráfico 01 – Teste de pH, conforme local de armazenamento e período analisados

A tabela 04 e o gráfico 01 demonstraram que houve diferença estatística entre os locais de armazenamento nos grupos controle, geladeira e freezer ($5,38 \pm 0,19$), independente do tempo de armazenamento, sendo o último com maior valor de pH, seguido da geladeira ($4,59 \pm 0,01$). Os locais de armazenamento ar-condicionado, temperatura ambiente, ambiente escuro e estufa apresentaram os menores valores de pH, apresentando diferença significativa em relação aos demais locais, porém sendo estatisticamente iguais entre si.

Estimativas				
Variável dependente: pH				
Tempo	Média	Desvio padrão	Intervalo de confiança 95%	
			Limite inferior	Limite superior
3 meses	4,360	0,53	4,316	4,405
6 meses	4,247	0,50	4,202	4,291

Tabela 03 – Valores médios do pH da emulsão óleo de copaíba A 10% nos diferentes tempos

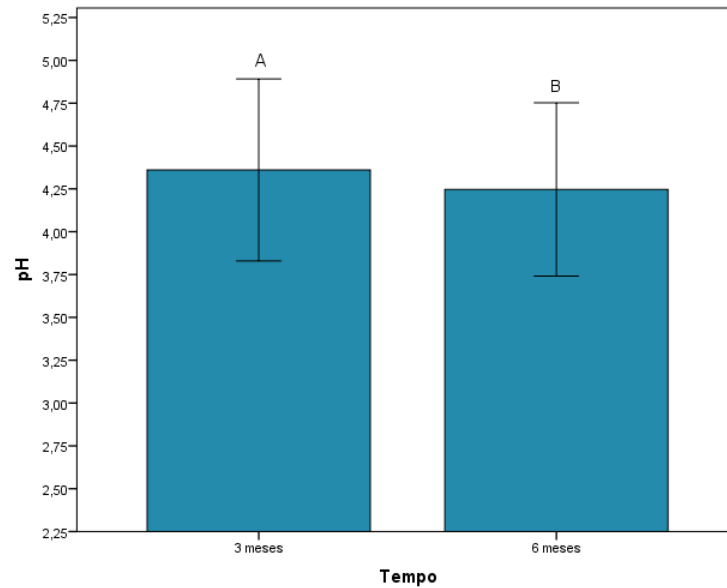


Gráfico 02 – Média do pH da emulsão-teste em relação ao tempo

A tabela 05 e o gráfico 02 demonstraram que, após 6 meses de armazenamento, existe uma diminuição do pH o qual mostrou uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,001$) quando comparado a 3 meses.

5.1.3 Determinação da densidade

O resultado da densidade da emulsão do óleo de copaíba a 10% em relação ao local de armazenamento e período experimental está descrito no gráfico 03 e tabela 04 (Apêndice B).

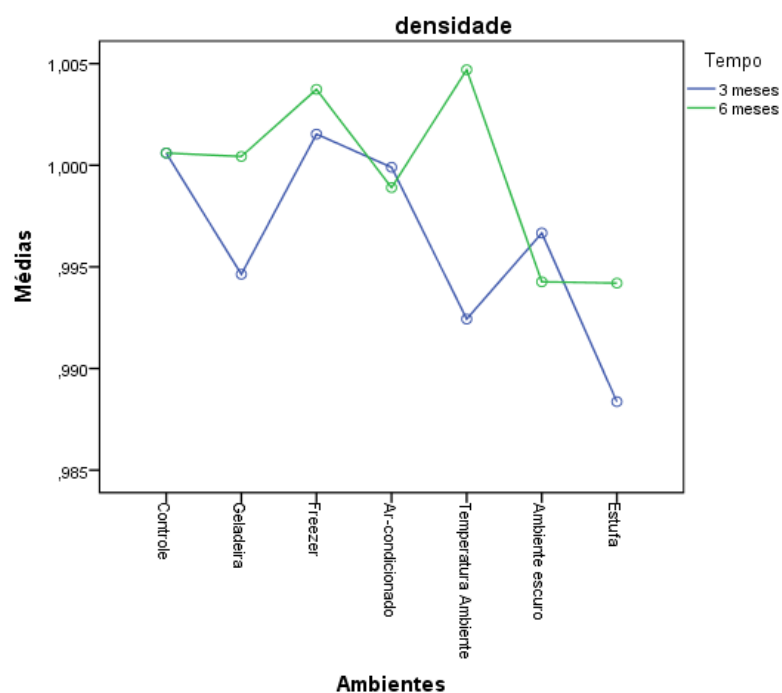


Gráfico 03 – Médias de densidade referentes às condições experimentais

Tipo de Ambiente	Densidade (g/cm ³)			Média
	0 meses	3 meses	6 meses	
Controle	1,0006 (0,0002)	1,0006 (0,0002)	1,0006 (0,0002)	1,0006 ^a
Geladeira	1,0006 (0,0002)	0,9946 (0,0015)	1,0004 (0,0007)	0,9975 ^{ab}
Freezer	1,0006 (0,0002)	1,0015 (0,0015)	1,0037 (0,0009)	1,0026 ^a
Ar-condicionado	1,0006 (0,0002)	0,9999 (0,0024)	0,9989 (0,0019)	0,9994 ^{ab}
Temperatura Ambiente	1,0006 (0,0002)	0,9924 (0,0007)	1,0047 (0,0008)	0,9985 ^c
Ambiente Escuro	1,0006 (0,0002)	0,9967 (0,0021)	0,9943 (0,0116)	0,9955 ^b
Estufa	1,0006 (0,0002)	0,9884 (0,0004)	0,9942 (0,0008)	0,9913 ^d
Colunas	1,0006	0,9963	0,999542857	

Tabela 04 – Médias (dp) dos valores de densidade, expressos em g/cm³ obtidas nas quatorze condições experimentais estabelecidas pelas variáveis: tipo de ambiente e tempo

O gráfico 03 e tabela 06 demonstraram que, após 6 meses de armazenamento, houve aumento da densidade quando comparado a 3 meses. Os locais de armazenamento grupo controle, geladeira, freezer e ar-condicionado foram estatisticamente iguais entre si. Os locais de armazenamento temperatura ambiente, ambiente escuro e estufa apresentaram diferença estatística significativa, sendo o último com menores valores de densidade ($0,9884 \pm 0,0004$).

5.1.4 Avaliação microbiológica para pesquisa de contaminantes

O teste microbiológico empregado visou verificar a presença de contaminantes na emulsão formulada. Nas condições e meios de culturas testados, não houve indicação de contaminação por bactérias, fungos ou leveduras em nenhum dos tempos ou condições de armazenamento (Figura 16).

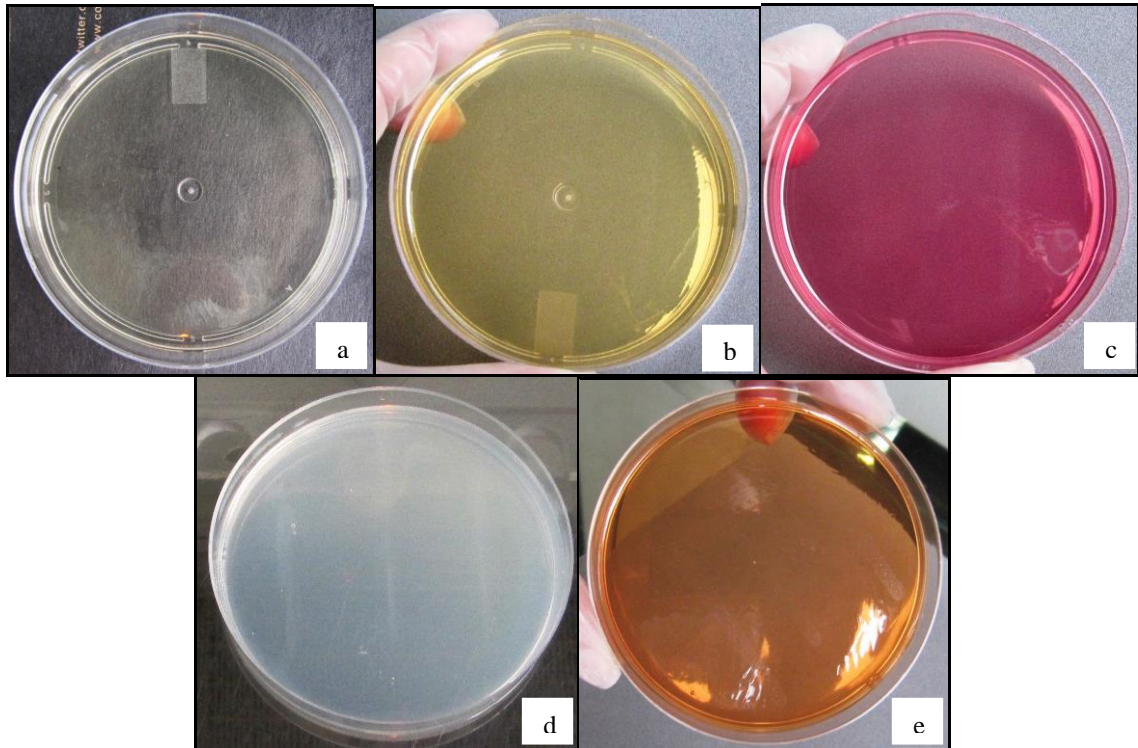


Figura 16 – Avaliação microbiológica nos meios: a) Ágar Caseína-soja, b) Ágar Sabouraud-dextrose, c) Ágar MacConkey, d) Ágar Cetrimida e e) Ágar Sal manitol

5.1.5 Avaliação dos caracteres organolépticos

Nos caracteres organolépticos, observou-se a cor, o odor, brilho e consistência. Dessa forma, os resultados quanto à mudança de cor estão expressos na tabela 5 e figura 17. A partir dos resultados, observou-se que nas amostras não houve alteração dos demais caracteres organolépticos, quando comparados tempo 0, 3 e 6 meses. A emulsão caracterizou-se por possuir cor branca, odor fraco e amadeirado, com presença de brilho e consistência fluida, em todos os períodos experimentais e locais de armazenamento.

Tempo (meses) \ Local	0	3	6
Freezer	N	N	N
Geladeira	N	N	N
Ar-condicionado	N	N	N
Temp. Ambiente	N	N	S
Escuro	N	N	S
Estufa	N	S	S

Tabela 05 – Avaliação dos caracteres organolépticos “cor” das amostras da emulsão à base de óleo de copaíba A 10% para limpeza de cavidade, de acordo com o local de armazenamento e período analisado (N – não houve alteração; S – houve alteração)

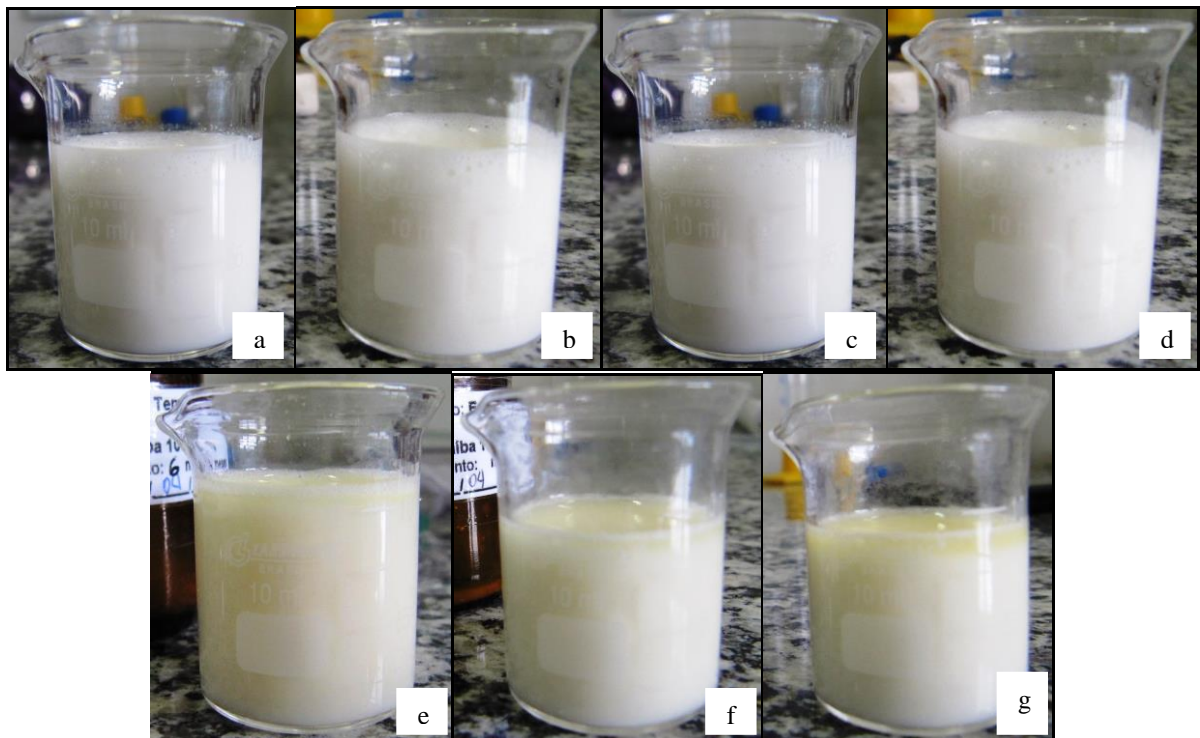


Figura 17 – Comparação do caractere organoléptico “cor”, em relação ao controle, tempo 0 (a). Ausência de mudanças de cor nos ambientes: b) freezer, c) geladeira, d) ar-condicionado. Presença de variação de cor nos ambientes: e) temperatura ambiente, f) escuro e g) estufa, no período experimental de 6 meses

5.1.6 Avaliação da atividade antimicrobiana

Para avaliação da atividade antimicrobiana da emulsão de *Copaifera multjuga* frente a cepas de *S. mutans*, *S. oralis*, *S. salivarius*, *L. paracasei*, utilizou-se o método de microdiluição em microplaca (Figura 18). A emulsão-teste apresentou atividade bacteriostática e bactericida, respectivamente, nas concentrações de 13,33 $\mu\text{L/mL}$ e 15 $\mu\text{L/mL}$ para o *S. mutans* (Figura 19); 20 $\mu\text{L/mL}$ e 23,33 $\mu\text{L/mL}$ para *S. salivarius* (Figuras 20) e 13,33 $\mu\text{L/mL}$ e 15 $\mu\text{L/mL}$ para o *L. paracasei* (Figuras 21). A menor concentração da emulsão-teste (8,33 $\mu\text{L/mL}$) demonstrou atividade bactericida contra *S. oralis* (Figuras 22).

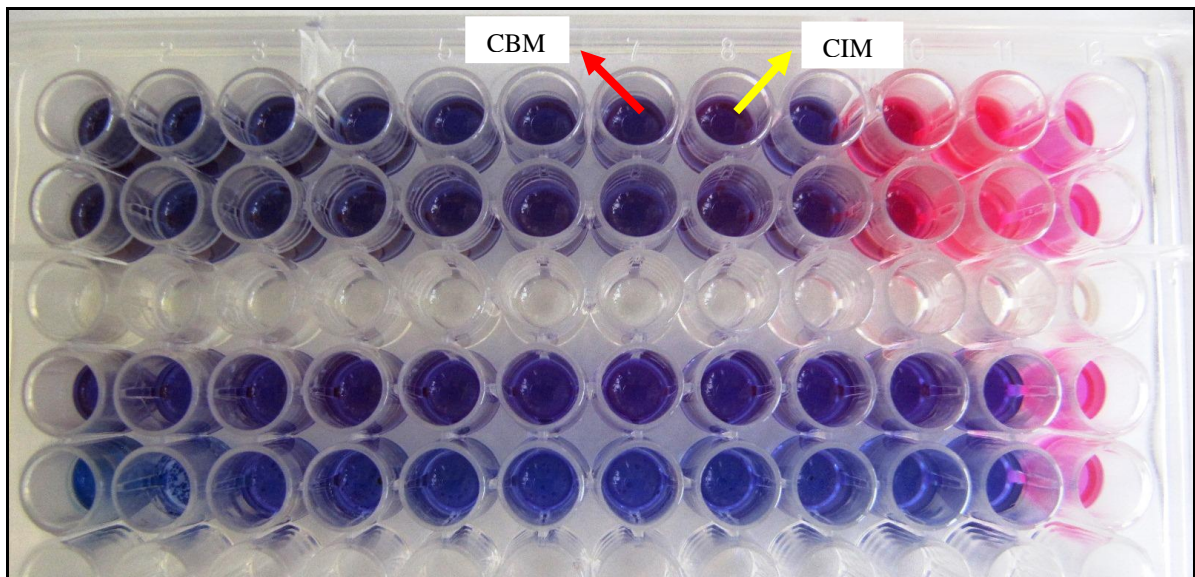


Figura 18 – Microdiluição em caldo da emulsão de copaíba a 10% - *Streptococcus mutans*

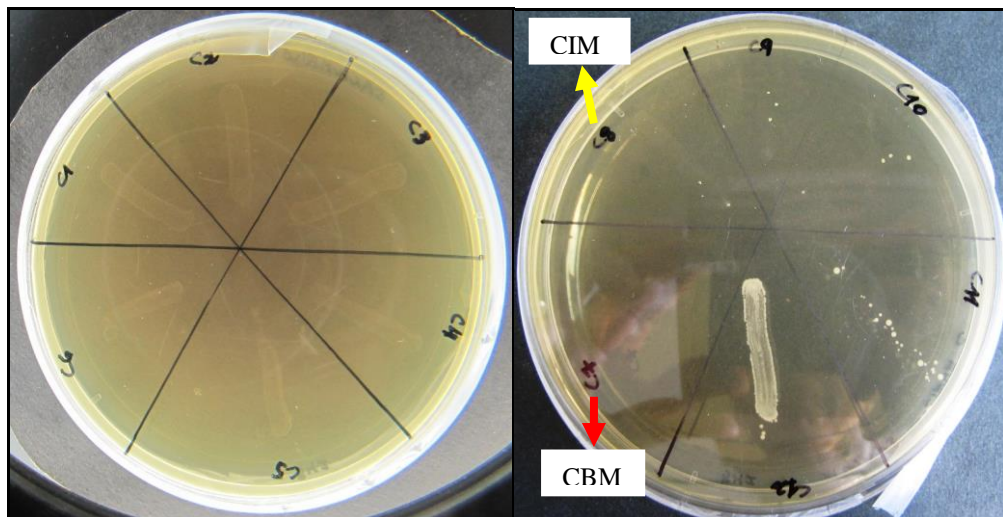


Figura 19 – CBM da emulsão da copaíba a 10% frente ao *S.mutans*

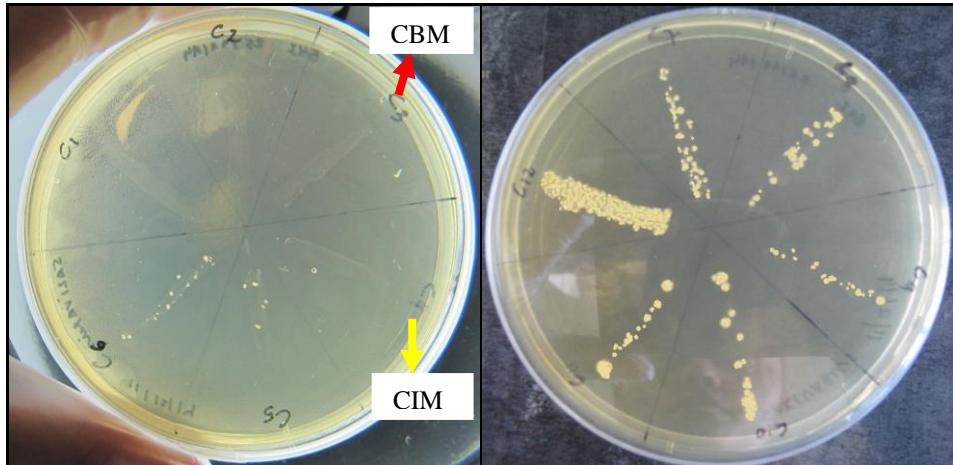


Figura 20 – CBM da emulsão da copaíba a 10% frente ao *S.salivarius*

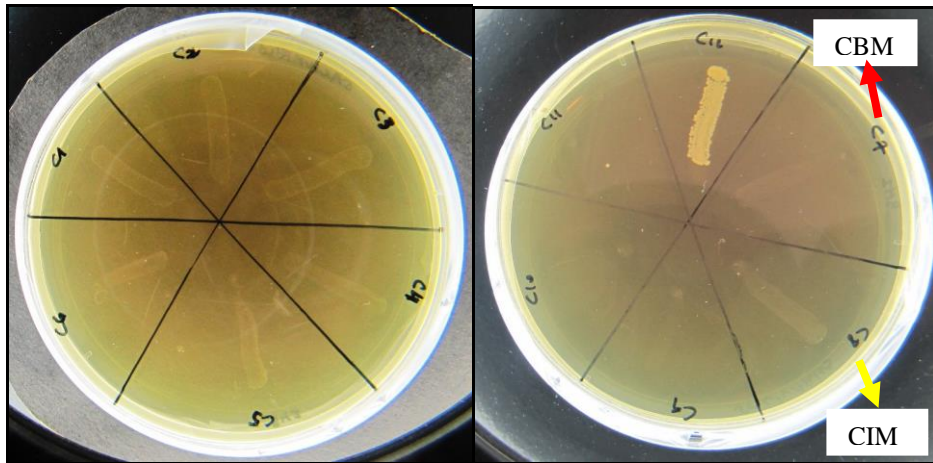


Figura 21 – CBM da emulsão da copaíba a 10% frente ao *L. paracasei*

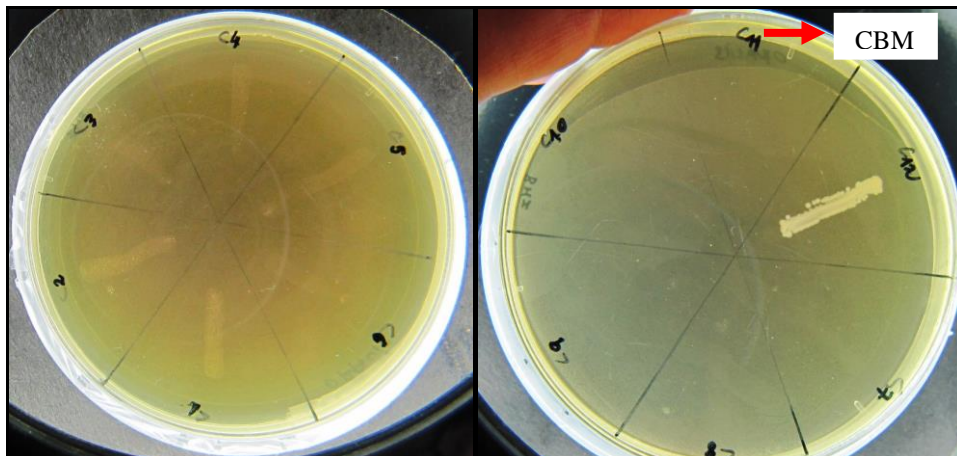


Figura 22 – CBM da emulsão da copaíba a 10% frente ao *S.oralis*

6 DISCUSSÃO

A abrangência da utilização de fitoterápicos é vasta e engloba diversos fins na medicina. Em relação à saúde bucal, trabalhos vêm demonstrando que o óleo-resina da copaíba apresenta atividade biológica para uso na odontologia: na atividade antibacteriana frente ao *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis*, *Lactobacillus casei*, como pasta para capeamento pulpar, no controle microbiológico do biofilme dental em forma de gel a base de copaíba, como cimento obturador provisório, como cimento endodôntico e ainda na forma de solução de limpeza cavitária (BANDEIRA *et al*, 1999; SIMÕES, 2004; ABINADER, 2005; VASCONCELOS *et al*, 2008; GARRIDO *et al*, 2009; SOUZA *et al*, 2011; COELHO, 2011; MENEZES, 2013; MACHADO, 2014).

Os testes realizados neste estudo seguiram às orientações de padronização e normas de boas práticas de fabricação da Farmacopeia Brasileira e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e os resultados indicaram o (s) melhor (es) ambiente (s) para armazenamento, assim como, o perfil físico-químico e avaliação da atividade antibacteriana da emulsão de *Copaifera multijuga* Hayne, no estudo acelerado.

Neste estudo, corroborando com estas afirmações, Gebara *et al* (1996), Torres *et al* (2000), Pereira (2001) relataram que os produtos odontológicos contendo produtos naturais apresentam boas perspectivas no mercado devido a aceitação popular da fitoterapia e poderiam ser introduzidos desde que amplamente amparados por estudos laboratoriais e clínicos específicos. Sobre este aspecto, Bandeira (1998), concluiu que esses estudos preliminares abrem uma ampla linha de pesquisa da utilização de produtos naturais.

Entretanto, apesar do mercado de produtos fitoterápicos continuar em expansão no mundo inteiro, o aumento no número de medicamentos disponíveis à população não é proporcional à qualidade dos mesmos (NASCIMENTO *et al*, 2005). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária, baseada nas diretrizes das políticas nacionais, promoveu ampla revisão

das legislações para o setor de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos, elaborou novas normas, que dispõe sobre os requisitos mínimos de qualidade para fármacos, insumos, drogas vegetais, medicamentos e produtos para a saúde, incluindo parâmetros para controle de qualidade das plantas medicinais e/ou seus derivados, como a verificação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico na validade esperada (BRASIL, 2013).

Desta forma, visando atender às regulamentações vigentes em relação à estabilidade farmacológica da emulsão de óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*) a 10% para limpeza de cavidade dentária, o teste de centrifugação demonstrou, no período de 6 meses, que nos locais de armazenamento: ar-condicionado, temperatura ambiente, temperatura ambiente ao abrigo de luz houve separação dos componentes da emulsão. Na estufa, a separação foi ressaltada pela nítida presença de óleo, localizado acima dos outros componentes. Esses resultados foram corroborados por Machado (2014) em seu estudo sobre controle de qualidade de emulsão de copaíba a 10% formulada com diazolidinil ureia a 0,6%.

Xavier-Júnior *et al* (2012), em seu estudo sobre estabilidade físico-química de emulsões à base de copaíba, demonstraram instabilidade, com separação de fases, nas emulsões armazenadas em temperaturas a partir de 25°C. Essa instabilidade ocorre devido ao aumento da energia cinética do sistema e ao aumento da motilidade das moléculas de água, que em muitos casos, é o solvente responsável pelas reações químicas instáveis, situação possivelmente encontrada nesse estudo.

De acordo com Oliveira (2008), além do local de armazenamento, a separação de fases pode estar associada à quantidade e tipo do tensoativo utilizado, pois a maioria das referências relata que uma maior estabilidade é obtida utilizando dois tensoativos: um hidrofílico e outro lipofílico, por estes favorecerem a formação de um filme mais coeso, o que difere deste trabalho. Entretanto esta mesma autora relatou que utilizando tween 80, um tensoativo

hidrofílico, o óleo de copaíba se mostrou apto na formação de nanoemulsão, apresentando estabilidade.

A influência do pH sobre a estabilidade física de um sistema bifásico, especialmente emulsões, é muito importante (BRASIL, 2012). A condutividade é um parâmetro utilizado em estudos de estabilidade de emulsões porque é sensível a mínimas mudanças no sistema (Xavier-Júnior *et al*, 2012). Na determinação dos valores de pH deste estudo, os resultados demonstraram que entre os grupos ar-condicionado, temperatura ambiente, temperatura ambiente ao abrigo da luz e estufa foram semelhantes entre si, apresentando diferença estatisticamente significativa quando comparados ao grupo controle (tempo 0), freezer e geladeira, corroborando com os estudos de Simões (2004), Xavier-Júnior *et al* (2012) e Machado (2014). O decréscimo do valor do pH nas emulsões ao longo do período experimental, segundo Oliveira (2008), pode ser decorrente de processos oxidativos dos componentes da formulação, como os óleos vegetais, que podem sofrer auto oxidação quando expostos ao oxigênio atmosférico ou altas temperaturas.

A quantidade de massa existente num dado volume é chamada de massa volúmica ou densidade. No teste de densidade, os resultados obtidos foram semelhantes a Almeida *et al* (2011) e Machado (2014), demonstrando que o local de armazenamento estufa apresentou os menores valores de densidade com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Almeida *et al* (2011) explica que o aumento da temperatura de um determinado fragmento de matéria ocasiona um aumento do volume fixo desta, pois haverá a dilatação ocasionada pela separação dos átomos e moléculas. Ao contrário, ao se diminuir a temperatura, tem-se uma diminuição deste volume fixo. Quando a matéria se expande, a densidade diminui e quando a matéria se contrai, sua densidade aumenta. Desta forma, a densidade é inversamente proporcional à temperatura. Ou seja, à medida que aumenta a temperatura, a densidade diminui.

A contaminação microbiana de um produto pode acarretar alterações em suas propriedades físicas e químicas e ainda caracteriza risco de infecção para o usuário. Assim, produtos farmacêuticos de uso oral e tópico (cápsulas, comprimidos, suspensões, cremes, adesivos, etc) que não têm como requerimento serem estéreis devem estar sujeitos ao controle de contaminação microbiana (BRASIL, 2010c).

A garantia da qualidade e o controle de fabricação previstos nas boas práticas devem garantir que o produto cumpra as especificações determinadas, isto é, que atendam além de outros parâmetros, aos limites aceitáveis para microrganismos (BRASIL, 2010c).

Condições de armazenamento e de processamento são cruciais para determinar a qualidade dos produtos finais à base de plantas. Os problemas são mais comuns em regiões tropicais e subtropicais, porque a temperatura elevada e teor de umidade são favoráveis ao crescimento de fungos e produção de toxina (Zhang *et al*, 2012).

O teste microbiológico empregado neste estudo visou verificar a presença de contaminantes na emulsão de copaíba a 10%. Nas condições e meios de culturas testados, não houve indicação da presença de microrganismos (bactérias, fungos ou leveduras). Tais resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Simões (2004) e Machado (2014), não havendo contaminação para nenhum dos microrganismos testados, respeitando, portanto as preconizações da ANVISA.

Pelissari (2008) afirmou que a pesquisa de contaminantes (controle microbiológico) ao determinar o número total de microrganismos presentes em preparações não estéreis, cosméticos e drogas vegetais, torna-se de suma importância, pois microrganismos patogênicos não devem estar presentes, assegurando a utilização de produtos de boa qualidade, seja ele de qualquer origem.

A avaliação das características organolépticas indicou que não ocorreram modificações nos caracteres odor, brilho e consistência da emulsão de *Copaifera multijuga*

nos tempos testados (0, 3 e 6 meses), apresentando coloração branca (aparência de “leite”), odor fraco e amadeirado, com presença de brilho e consistência fluida. A cor e consistência corroboram com trabalho de Oliveira (2008), Coelho (2011), Xavier-Júnior *et al* (2012) e Machado (2014), e a sensação causada pelo odor corrobora com Nascimento *et al* (2011) e Machado (2014).

Quanto ao caractere organoléptico cor, as alterações observadas nos tempo 3 meses (estufa) e 6 meses (estufa, temperatura ambiente ao abrigo da luz e temperatura ambiente), estavam relacionadas ao ambiente de armazenamento. Tais resultados foram semelhante aos estudos de Machado (2014), na análise de 3 meses e de Xavier-Júnior *et al* (2012), que em seu estudo, por mais de um ano, as emulsões que apresentaram estabilidade de cor foram àquelas armazenadas em baixa temperatura em consequente da baixa colisão entre as partículas. Ferreira; Souza (2007), acrescentaram, também que a estabilidade de um fármaco pode ser afetada por fatores como temperatura, pH, luminosidade e ar.

As emulsões do óleo-resina da copaíba testadas apresentaram atividade antibacteriana frente a microrganismos da cavidade oral, resultados semelhantes analisando o óleo de copaíba em várias apresentações foram encontrados por Bandeira *et al* (1999), Simões (2004), Abinader (2005), Vasconcelos *et al* (2008) e Souza *et al* (2011).

A emulsão teste apresentou CIM de 13,33 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para o *Streptococcus mutans*, 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para *Streptococcus salivarius* e 13,33 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para o *L. paracasei*. A CBM da emulsão do óleo-resina da copaíba a 10% foram 15 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para o *Streptococcus mutans*, 23,33 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para *Streptococcus salivarius* e 15 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para o *L. paracasei*. A menor concentração da emulsão-teste (8,33 $\mu\text{L}/\text{mL}$) demonstrou atividade bactericida contra *S. oralis*.

Coelho (2011), utilizando a mesma metodologia desse estudo, demonstrou que a emulsão do óleo-resina da copaíba a 10% apresentou atividade bacteriostática nas concentrações de 12,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para todos os microrganismos testados e atividade bactericida

nas concentrações de: 17,5µL/mL frente ao *Streptococcus mutans*, 12,5µL/mL frente ao *Streptococcus oralis*; 35µL/mL frente ao *Lactobacillus casei*. As emulsões testadas frente ao *Streptococcus salivarius* não apresentaram atividade bactericida, divergindo dos resultados desta pesquisa, podendo relacionar a melhora da atividade antibacteriana à inclusão de polissorbato 80 a 1% na solução-mãe.

Souza *et al* (2011) utilizando a mesma metodologia empregada neste estudo, verificou que o ácido copálico, um sesquiterpeno do óleo-resina da *Copaifera langsdorffi*, apresentou atividade antibacteriana na CIM de 2 a 6µL/mL frente *Streptococcus mutans*. Tal resultado confirmou, também, a ação inibitória microbiana, levantada pelo trabalho de Bloise (2003), que cita a ação germicida de um dos componentes do óleo de copaíba, sesquiterpeno, β-cariofileno. Pieri *et al* (2012), em seu estudo sobre o efeito bactericida do óleo de copaíba frente ao *Streptococcus mutans*, obteve uma concentração inibitória mínima de 0.78 µL/mL da solução de óleo em meio de cultura, acrescentando que o óleo de copaíba tem vantagens sobre a clorexidina, pois é composto por várias substâncias diferentes que podem ter diferentes interações com a célula bacteriana, reduzindo o desenvolvimento de estirpes resistentes de *S. mutans*. Este estudo sugere que nos constituintes do óleo de copaíba existem substâncias que, possivelmente, são responsáveis pela atividade antibacteriana, como sugerido por Bandeira *et al* (1999a).

A resazurina é comercialmente chamada de Alamar Blue®, usada para monitorar a proliferação e a viabilidade das células bacterianas eucarióticas, baseada na detecção do metabolismo celular, que induz a um processo de oxi-redução, convertendo a resazurina, que detecta a atividade metabólica indicada pela cor azul, não fluorescente, em resofurina, que tem a cor rosa e fluorescente, indicando a presença de células vivas, sendo um procedimento simples, rápido e de baixo custo (SCHIRMER *et al*, 1998; O'BRIEN *et al*, 2000).

Analisando as propriedades da resazurina em identificar o metabolismo celular, é possível que as concentrações das emulsões de copaíba não interferiram a tal ponto que provocasse a alteração no metabolismo bacteriano. Cantrell *et al* (1996) afirmaram ainda que este corante não é citotóxico, pois não é necessária a morte celular para se obter resultados dos testes aplicados.

Esta pesquisa demonstrou que a emulsão à base de *Copaifera multijuga* Hayne, como solução de limpeza cavitária, ainda tem um longo caminho a percorrer. Há necessidade de realização de estudos clínicos de análise da estabilidade físico-química ao longo do período de 24 meses (estudo de longa duração), criando assim, perspectivas futuras para a obtenção do certificado de validade de uso exigido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Considerando que a Amazônia possui a maior biodiversidade mundial surge o paradigma de não utilizarmos a fitoterapia na Odontologia, com o custo mais acessível à população comparativamente àqueles obtidos por produtos isolados que, geralmente, envolve patentes tecnológicas.

Assim, a realização desta pesquisa vislumbra a possível introdução de uma emulsão à base de *Copaifera multijuga* Hayne, na odontologia, como solução de limpeza de cavidade. Esta sugestão está baseada nos resultados encontrados nesta pesquisa, onde as emulsões testes apresentaram atividade antibacteriana em maior ou menor potencialidade frente a microrganismos de interesse odontológico; apresentando assim um dos requisitos para esta função, além de apresentar resultados promissores quanto à estabilidade físico-química do produto final.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados das metodologias empregadas, pode-se concluir que a emulsão de *Copaifera multijuga* Hayne a 10%:

- Apresentou condições de estabilidade (centrifugação, densidade e características organolépticas) e ausência de contaminantes nos ambientes de armazenamento freezer e geladeira, em todos os períodos experimentais analisados;

- Demonstrou atividade antimicrobiana frente ao *S. mutans*, *S. oralis*, *S. salivarius*, *L. paracasei*, podendo ser utilizado como solução limpeza de cavidades;

- Considerando a utilização na prática clínica diária, sugere-se a geladeira como melhor ambiente.

REFERÊNCIAS

- ABINADER, C.D. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana da pasta de hidróxido de cálcio associada a diferentes veículos frente à *Candida albicans* e ao *Enterococcus faecalis*. 2005. 143p. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amazonas.
- AGRA, M.F.; FRANÇA, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn*, v.17: p.114-140, 2007.
- AGRA, M.F.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; FRANÇA, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* v.18, p.472-508, 2008.
- ALENCAR, J.C. Estudos Silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne - Leguminosae, na Amazônia Central. 1- Germinação. *Acta Amazônica*, v. 11, n. 1, p. 3-11. 1982.
- ALMEIDA, C.F.C.B.R.; ALBUQUERQUE, U.P. Uso e conservação de plantas e animais medicinais no estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil): um estudo de caso. *Interciência*, v.27, n.6, p.276-85, 2002.
- ALMEIDA, J.K.P. et al. Caracterizações físico-químicas de óleos vegetais utilizados para a produção de biodiesel com metodologias alternativas simples. In: ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, 31, 2011, Belo Horizonte. Anais...Belo Horizonte: Enegep, 2011, p. 1-14.
- ALVES, L.F. Produção de Fitoterápicos no Brasil: História, Problemas e Perspectivas. *Rev. Virtual Quim.*,v. 5 n. 3, p. 450-513, 2013.
- ANDERSON, M.H.; LOESCHE, W.J.; CHARBENEAU, G.T. Bacteriologic Study of a basic fuchsin caries disclosing dye. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, v. 54, n. 1, p. 51-55, 1985.
- ANDREWS, J.M. Determination of minimum inhibitory concentration. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 48, Suppl. S1, p. 5-16, 2001.
- ARAÚJO, M.A.J. et al. Avaliação qualitativa do efeito de agentes de limpeza na camada de lama dentinária: estudo ultra-estrutural em microscopia eletrônica de varredura. *Rev Odontol Univ*, v. 12, n. 02, p. 99 -104, 1998.
- BACCHI, S.A. et al. A new Alamar Blue viability assay to rapidly quantify oligodendrocyte death. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 91, p. 47-54, 1999.
- BANDEIRA, M.F.C.L. Estudo comparativa da compatibilidade biológica do óleo essencial e da resina da *Copaifera multijuga*, associados ao óxido de zinco e ao hidróxido de cálcio, em diferentes níveis de pesquisa: farmacológico, microbiológico e tecido conjuntivo subcutâneo de rato. 1998. 226f. Universidade estadual Paulista (Júlio de Mesquita Filho), Araraquara.
- BANDEIRA, M.F.C.L.; OLIVEIRA, M.R.B.; PIZZOLITTO, A.C.; BENATTI NETO, C.; JORGE NETO, J. Estudo farmacológico preliminar de *Copaifera multijuga* (óleo de copaíba). *Bras. Clin. Estet. Odont.*, v. 3, n. 16, p. 39-41. 1999a.

BANDEIRA, M. F. C. L.; OLIVEIRA, M. R. B.; BENATTI-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. JBC, v. 3, n. 16, p. 42-49, 1999b.

BANDEIRA, M.F.C.L.; TEXEIRA, M.F.S.; ABINADER, C.D.; PARENTE, R.C.; LIMA, P.S.L. Avaliação *in vitro* da sensibilidade da *Candida albicans* ao hidróxido de cálcio associado ao óleo de copaíba. Rev Dentística on line, n.13, p.12-22, 2006.

BARBOSA, P.C.S.; WIEDEMANN, L.S.M.; MEDEIROS, R.S.; SAMPAIO, P.T.B.; VIEIRA,G.; VEIGA Jr, V.F. Phytochemical Fingerprints of Copaiba Oils (*Copaifera multijuga* Hayne) Determined by Multivariate Analysis. Chemistry & Biodiversity, v.10, n.7, p.1350–1360, july, 2013.

BENDAZZOLI, W.S. Fitomedicamentos: perspectivas de resgate de uma terapia histórica. Mundo saúde, São Paulo, v.24, n.2, p.123-126, 2000.

BIAVATTI M.W. et al. Análise de óleos-resinas de copaíba: contribuição para o seu controle de qualidade. Rev. bras. farmacogn. v.16, n.2, 2006.

BLOISE, M. I. Óleos vegetais e especialidades da floresta Amazônica. Cosmetics e Toiletries n.15, p.46-49, 2003.

BOCHNER, R.; FISZON, J.T.; ASSIS, M.A.; AVELAR, K.E.S. Problemas associados ao uso de plantas medicinais comercializadas no Mercado de Madureira, município do Rio de Janeiro, Brasil. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.14, n.3, p.537-547, 2012.

BRANDÃO, M. G. L.; FREIRE, N.; VIANNA-SOARES, C. D. Vigilância de fitoterápicos em Minas Gerais. Verificação da qualidade de diferentes amostras comerciais de camomila. Cadernos de Saúde Pública, v.14, n.2, p.693-700, 1998.

BRASIL. Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. Brasília: Ministério da Saúde, 1976.

BRASIL. Resolução Ciplan nº08, de 08 de março de 1988. Regulamenta a prática de Fitoterapia nos serviços de saúde, assim como criou procedimentos e rotinas relativas à prática da Fitoterapia nas Unidades Assistenciais Médicas. Brasília, 1988.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lei nº 8080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. Brasília: Ministério da Saúde, 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 1 de 29 de julho de 2005. Brasília: ANVISA, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política nacional de plantas medicinais e

fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. - Brasília : Ministério da Saúde, 2006b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 47, de 8 de setembro de 2009. Estabelece regras para elaboração, harmonização, atualização, publicação e disponibilização de bulas de medicamentos para pacientes e para profissionais de saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Brasília: Ministério da Saúde, 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 10, de 9 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Ministério da Saúde, 2010b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, v. 2. Brasília: ANVISA, 2010c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. Brasília: ANVISA, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira. Brasília: ANVISA, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consolidado de Normas da Coordenação de Fitoterápicos, Dinamizados e Notificados. Brasília, 2013.

BRITO, S. Os efeitos do marco regulatório sobre a competitividade da cadeia produtiva de medicamentos fitoterápicos no Brasil. 27 agosto de 2010. 98 f. Mestrado. Fundação Universidade Federal do Tocantins, Tocantins.

BRUNETON, J. *Eléments de phytochimie et de Pharmacognosie*. Paris: Lavoisier, 1987.

BUSATO, A.L.S. *Dentística: Restaurações estéticas*. 1 ed. São Paulo: Artes Médicas, 2002.

BUSATO, A.L.S. *Dentística: filosofia, conceitos e prática clínica*. São Paulo: Artes Médicas, v.1, 2005.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. *J. Ethnofarmacol*, 2005.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. *Bioestatística: princípios e aplicações*. Porto Alegre: Artmed, 2007.

CANTRELL, C.L. et al. Antimycobacterial cycloartanes from *Borrchia frutescens*. *J. Nat.Prod.*, v. 59, p. 1131-1136, 1996.

- CARVALHO, A. C. B. Plantas medicinais e fitoterápicos: regulamentação sanitária e proposta de modelo de monografia para espécies vegetais oficializadas no Brasil. 2011. 318 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília.
- CASCON, V.; GILBERT, G. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. *Phytochemistry*. v. 55, n. 7, p. 683-862, dec. 2000.
- COELHO, C. N. Emulsões amazônicas bioativas para limpeza do preparo cavitário: atividade antibacteriana, compatibilidade biológica e alteração de cor. 2011. 147f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Amazonas.
- COSTA-LOTUFO, L.V. et al. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* óleo-resin. *Toxicon*, v. 40, n. 8, p. 1231-1234, 2002.
- CUNHA, M.G. et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* da geoprópolis de *Melipona scutellaris* contra *Streptococcus mutans*. *Brazilian Oral Research*, v. 25, 2011.
- DIAS, S.D.; FONTES, L.B.A.; CROTTI, A.E.M.; AARESTRUP, B.J.V.; AARESTRUP, F.M.; FILHO, A.A.S.; CORRÊA, J.O.A. Copaiba Oil Suppresses Inflammatory Cytokines in Splenocytes of C57Bl/6 Mice Induced with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). *Molecules*, v.19, 2014.
- DONASSOLO, T.A. et al. Avaliação da microdureza superficial do esmalte e da dentina de dentes bovinos e humanos (permanentes e decíduos), *Rev Odonto Ciênc*, v.22, n.58, p.311-3316, 2007.
- ESPÍNOLA, E. B. Uso seguro e racional de produtos fitoterápicos. *Revista Racine*, p. 52-53, maio/jun., 1997.
- EVANGELISTA, S.S.; SAMPAIO, F.C.; PARENTE, R.C.; BANDEIRA, M.F.C.L. Fitoterápicos na odontologia: estudo etnobotânico na cidade de Manaus. *Rev. bras. plantas med*, v.15, n.4, 2013.
- FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de matérias primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G. et al. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Santa Catarina: Editora da UFSC, 2001.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4 ed. Parte 1. São Paulo: Atheneu, 1988.
- FERREIRA A.O.; SOUZA, G.F. *Preparações orais líquidas*. 2ed. São Paulo: Pharmabooks, 2007.
- FRANCISCO, K.S. Fitoterapia: uma opção para o tratamento odontológico. *Revista Saúde*, v.4, n.1, p.18-24, 2010.
- FRANCO, A.P.G.O. et al. Desinfecção de cavidades com clorexidina. *Publication UEPG. Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 13, n. 1-2, p. 53-58, 2007.
- FRAZÃO, A.R. et al. Análise por MEV do grau de limpeza dentinária após a utilização de diferentes técnicas de aplicação e substâncias. *Brazilian Oral Research*, v. 25, 2011.

- GARRIDO, A.D.; LIA, R.C.; FRANÇA, S.C.; DA SILVA, J.F.; ASTOLFI-FILHO, S.; SOUSA-NETO, M.D. Laboratory evaluation of the physicochemical properties of a new root canal sealer based on *Copaifera multijuga* oil-resin. *Int Endod J*, n.4, p.283-291, 2009.
- GEBARA, E.C.E.; ZARDETTO, C.G.D.C.; MAYER, M.P.A. Estudo *in vitro* da Ação Antimicrobiana de Substâncias Naturais sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*. *Rev. Odontol. Univ. São Paulo*, São Paulo, v.10, n.4, p.251-256, 1996.
- GOMES, N.M. et al. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba Oils. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 109, p. 486-492, 2007.
- GOMES, N.M.; REZENDE, C.M.; FONTES, S.P.; MATHEUS, M.E.; PINTO, A.C.; FERNANDES, P.D. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne. *J Ethnopharmacol*, v. 128, p. 177-183, 2010.
- HIGIOKA, A.S.; BARZOTTO, I.L.M. Desenvolvimento e controle físico-químico de sabonete líquido com digluconato de clorexidina. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*, v.34, n.4, p.537-543, 2013.
- KUNLE, O.F.; EGHAREVBA, H.O.; AHMADU, P.O. Standardization of herbal medicines - A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, v. 4, n.3, p. 101-112, 2012.
- LAKATOS, E.M; MARCONI, M.A. Fundamentos de metodologia científica. 5. ed, São Paulo: Atlas 2003.
- LEANDRO, L.M.; VARGAS, F.S.; BARBOSA, P.C.; NEVES, J.K.; SILVA, J.A.; VEIGA, V.F. Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. *Molecule*, v.17, p. 3866-3889, 2012.
- LEITÃO, F. et al. Urban ethnobotany in Petrópolis and Nova Friburgo (Rio de Janeiro, Brazil). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.19, n.1B, p. 333-42, 2009.
- LIMA, L.S.; TORKASKY, R.M.; PSICIOTTANO, N.C.; SANTOS, A.M.; SCHUMACKER, I.E. Plantas medicinais. *Cosmetics & Toiletries*, n.7, p. 39, 2003.
- MACHADO, L.R.S. Controle de qualidade e avaliação morfológica da homogeneidade da camada híbrida da dentina em MEV de soluções contendo bioativos amazônicos para limpeza de cavidade dentinária. 2014. Programa Institucional de Iniciação Científica. Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
- MATOS, F. J. A. Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil. 2ª ed. Fortaleza: Imprensa Universitária-UFC, 2000, 344p.
- MARINHO, B.V.S.; ARAÚJO, A.C.S. O uso de enxaguatórios bucais sobre a gengivite e o biofilme dental. *Int J Dent*, v.6, n.4, p.124-131, 2007.
- MENDONÇA, D.E.; ONOFRE, S.B. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaiba – *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.19, n.2, p.577-581, 2009.

MENEZES, M.S.C. Agentes de limpeza cavitária: estudo comparativo da microinfiltração marginal e microtração em restaurações adesivas. 2013. Programa Institucional de Iniciação Científica. Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

MIRANDA, R.C.M.; WANDERLEY, T.K.V.; MOURA, W.; ARAÚJO, J.M. Atividade antimicrobiana do óleo de copaíba (*Copaifera* spp.) de diferentes procedências. XVI Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil. Recife, Brasil, 2000.

MONDELLI, J. Proteção do Complexo Dentinopulpar. São Paulo: Artes Médicas, 1998.

MONDELLI, J. Fundamentos de dentística operatória. São Paulo: Santos, 2006.

NAKABAYASHI, N. The hybrid layer: A resin-dentin composite. Proc Finn Dent Soc, v.88, Suppl. 1, p.322- 329, 1992.

NASCIMENTO, V.T.; LACERDA, E.U.; MELO, J.G.; LIMA, C.S.A.; AMORIM, E.L.C.; ALBUQUERQUE, U.P. Controle de qualidade de produtos à base de plantas medicinais comercializados na cidade do Recife-PE: erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), quebra-pedra (*Phyllanthusspp.*), espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.) e camomila (*Matricaria recutita* L.). Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v.7, n.3, p.56-64, 2005.

NASCIMENTO, L.S.; MELO FILHO, A.A.; NASCIMENTO, F. C.; SOUSA, R. C. P.; OLIVEIRA, J. M. F.; SMIRDELE, O. J. Caracterização físico-química do óleo de *Copaifera Publifora* (Copaíba) cultivada em Boa Vista – RR. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA. 34, 2011, Florianópolis. Anais...Florianópolis. SBQ, 2011, p.1.

O'BRIEN, J. et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. Enr. J. Biochem., v. 267, p. 5421-5426, 2000.

OLIVEIRA, E. C. P.; LAMEIRA, O. A.; ZOGHBI, M. G. B. Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp.) no município de Moju, PA. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 8, n. 3, p. 14-23, 2006.

OLIVEIRA, B.R. Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com óleos de *Carapa guianensis* e *Copaifera* sp. e estudo da ação repelente frente a *Aedes Aegypti*. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

PAIVA, L.A.F.; GURGEL, L.A.; CAMPOS, A.R.; SILVEIRA, E.R.; RAO, V.S.N. Attenuation of ischemia/reperfusion-induced intestinal injury by oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. Life Sciences, v. 75, 1979–1987. 2004.

PELLISSARI GP. Estudo farmacognóstico e avaliação das atividades antibacteriana e imunomoduladora de *Melanpodium divaricatum* (Rich. In Pers.) DC (Asteraceae). 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, São Paulo.

PEREIRA, J.V.; SILVA, S.C.; SANTOS FILHO, L.; HIGINO J.S. Atividade antibacteriana do Extrato Hidroalcoólico da *Punica granatum* Linn. sobre microrganismos formadores de placa bacteriana. Periodontia Revista. v. 12, n. 4, out. 2001.

- PEREIRA, L.P. et al. Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: Potential anti-inflammatory usage. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012.
- PIERI, F.A.; MUSSI, M.C.; FIORINI, J.E.; MOREIRA, M.A.; SCHNEEDORF, J.M. Bacteriostatic effect of copaiba oil (*Copaifera officinalis*) against *Streptococcus mutans*. *Braz Dent J*, v.23, p.36-38, 2012.
- RAMOS, M.F.S. Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por spray-drying: estudo de estabilidade e avaliação farmacológica. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- RODE, S.M; SANTOS, J.F.F. Limpeza cavitária - remoção da camada de "smear layer". *Revista Brasileira de Odontologia*, v. 47, n. 5, p. 46-51, 1990.
- RODRIGUES, E.; CARLINI, E.A. A importância dos levantamentos etnofarmacológicos no desenvolvimento de fitomedicamentos. *Revista Racine*, v.70, p.30-5, 2002.
- RODRIGUES, A. G.; DE SIMONI, C. Plantas medicinais no contexto de políticas públicas. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 31, n. 255, p. 7-12, mar./abr. 2010.
- RUSCHEL, A.R.; NODARI, R.O. Colheita foliar da cancorosa [*Sorocea bonplandii* (Baill.) Burg., Lanj. & W. Boer]: uma espinheira-santa da Mata Atlântica. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v.10, n. 4, p.43-50, 2008.
- SAMPAIO, F.C.; PEREIRA, M.S.V.; DIAS, C.S.; COSTA, V.C.O.; CONDE, N.C.O.; BUZALAF, M.A.R. *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia férrea* Martius fruits against oral pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*, v.124, p.289-294, 2009.
- SANTOS, A.O; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; VEIGA JUNIOR, V.F.; Pinto, A.C.; NAKAMURA, C.V. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, n.103, p. 227-281, 2008.
- SCHIRMER, K. et al. Ability of 16 priority PAHs to be directly cytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill. *Toxicology, Limerick*, v. 127, p. 129-141, 1998.
- SILVA, I.M.; PEIXOTO, A.L. O abajurú (*Chrysobalanus icaco* L. e *Eugenia rotundifolia* Casar). Comercializado na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.19, n.1B, p.325-32, 2009.
- SIMÕES, C.A.C.G. Formulação de um gel de óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*) e avaliação de sua atividade antibacteriana sobre cepas de *Streptococcus* sp. isoladas da placa dental. 2004. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
- SOARES, D.C.; PORTELLA, N.A.; RAMOS, M.F.S.; SIANI, A.C.; SARAIVA, E.M. Trans- β -Caryophyllene: An Effective Antileishmanial Compound Found in Commercial Copaiba Oil (*Copaifera* spp.). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2013, 2013.
- SOUZA, A.B. et al. Antimicrobial Activity of Terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf.

- Against Cariogenic Bacteria. *Phytother Res*, v. 25, p. 215-220, 2011.
- STEENBOCK, W. et al. Avaliação de características fenotípicas para determinação do rendimento foliar em espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Martius). *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, v.14, n.3, p.537-547, 2003.
- TAPPIN, M.R.R. et al. Análise química quantitativa para padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. *Química Nova*, v. 27, n. 2, p. 236-240, 2004.
- TOLEDO, A.C.O. et al. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. *Revista Lecta, Bragança Paulista*, v. 21, p. 7-13, 2003.
- TORRES, C.R.G.; KUBO, C.H.; ANIDO, A.A.; RODRIGUES, J.R. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na Odontologia. *Pós-Grad. Rev. Fac. Odontol.* v. 3, n. 2, jul./dez. 2000.
- 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 à cárie dental. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Instituto de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- VASCONCELOS, K.R.F.; VEIGA Jr, V. F.; ROCHA, W. C.; BANDEIRA, M. F. C. L. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de um cimento odontológico à base de óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, n.18, p. 733-738, 2008.
- VEIGA Jr, V.F. et al. Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaíba oils available in Brazil. *Phytotherapy Research*, n. 15, p. 476-480, 2001.
- VEIGA Jr, V.F.; PINTO, A.C. O Gênero *Copaifera* L. *Química Nova*, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.
- VEIGA Jr, V.F.; ZUNINO, L.; PATITUCCI, M.L.; PINTO, A.C.; CALIXTO, J.B. The Inhibition of paw edema formation caused by the oil of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *J Pharm Pharmacol*, n.58, p.1405-1410, 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 reticulate* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne – A comparative study. *J Ethnopharmacol*, n.112, p.248-254, 2007.
- VENÂNCIO, G.N. Formulação de enxaguatório bucal à base de extrato de *Libidibia ferrea*. 2014. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
- WIJESKERA, R. O. B. Plant-derived medicines and their role in global health. *The medicinal Plant Industry*.1986.
- XAVIER-JÚNIOR, F.H.; SILVA, K.G.H.; FARIAS, I.E.G.; MORAIS, A.R.V.; ALENCAR, E.N.; ARAÚJO, I.B.; OLIVEIRA, A.G.; EGITO, E.S.T. Prospective study for the development of emulsion systems containing natural oil products. *J.Drug.Del.Sci.Tech*, v.22, n 4, p. 273-373, 2012.

ZARONI, M., et al. Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no Estado do Paraná. Curitiba, PR. Rev. Bras. Farmacognosia, v14, n.1, 2004.

ZHANG, J. et al. Quality of herbal medicines: Challenges and solutions. Complementary Therapies in Medicine v.20, n.1-2, p. 100-106, 2012.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Tabela de ANOVA two-way para variável dependente pH

Testes de efeitos entre assuntos							
Variável dependente: pH							
Fonte	Tipo III Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	F	Sig.	Eta parcial quadrado	Potência observada ^b
Ambientes	10,348	6	1,725	174,257	,000	,974	1,000
Tempo	,136	1	,136	13,741	,001	,329	,947
Ambientes * tempo	,133	6	,022	2,244	,068	,325	,686
Erro	,277	28	,010				
Total	788,765	42					
Total corrigido	10,895	41					

a. R ao quadrado = ,975 (R ao quadrado ajustado = ,963)

b. Computado usando alfa = ,05

APÊNDICE B – Tabela de ANOVA two-way para variável dependente densidade

Testes de efeitos entre assuntos							
Variável dependente: densidade							
Fonte	Tipo III Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	F	Sig.	Eta parcial quadrado	Potência observada ^b
Ambientes	,000	6	8,222E-005	7,221	,000	,607	,998
Tempo	,000	1	,000	9,698	,004	,257	,852
Ambientes * tempo	,000	6	3,903E-005	3,428	,012	,423	,881
Erro	,000	28	1,139E-005				
Total	41,827	42					
Total corrigido	,001	41					

a. R ao quadrado = ,724 (R ao quadrado ajustado = ,596)

b. Computado usando alfa = ,05

ANEXOS

ANEXO A – Reativação das cepas liofilizadas

LABORATÓRIO DE MICRO-ORGANISMOS DE REFERÊNCIA
INSTRUÇÕES PARA REIDRATAÇÃO DAS CULTURAS

Em condições assépticas realizar o seguinte procedimento:

- Fazer a desinfecção da ampola com gaze embebida em álcool a 70% e deixar secar;
- Serrar a base da parte superior da ampola, conforme o desenho a baixo;
- Fazer nova desinfecção da ampola com gaze embebida em álcool a 70% e deixar secar;
- Envolver as partes, superior e inferior, da ampola com gaze estéril, forçar a parte superior para o lado oposto ao local serrado a fim de quebrar a mesma;

NOTA: caso não possua serra específica para vidro, proceder da seguinte maneira:

- Aquecer a parte superior da ampola na chama do bico de Bunsen;
- Adicionar algumas gotas da salina estéril (NaCl 0,85%) na parte aquecida da ampola para que o vidro quebre por choque térmico;
- Retirar a parte superior fragmentada com o auxílio de uma pinça estéril;

- Adicionar com uma pipeta Pasteur estéril, 0,3 a 0,5ml do meio recomendado na forma líquida ao interior da ampola;

NOTA: no caso de fungo usar água purificada estéril deixando em repouso para reidratação por 15 a 30 minutos, antes de transferir para o meio recomendado.



- Ressuspender o sedimento homogeneizando-o;
- Transferir a suspensão para tubos ou placas contendo o meio recomendado nas formas líquido e/ou sólida;
- Incubar na temperatura e tempo indicados.

Observações:

- no caso de micro-organismos anaeróbicos, os procedimentos descritos acima devem ser realizados ambiente de anaerobiose;
- caso o micro-organismo não apresente crescimento durante o período de tempo indicado, prolongar incubação por mais 24 horas, antes de ser descartado como inviável.

NaCl
0,85
%



ANEXO B – Informe de bactéria de referência – *Streptococcus mutans*

	Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde	 INCQS
Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária-CMRVS		
Informe de bactéria de referência 31-jul-14		
<hr/>		
MICRO-ORGANISMO:	<i>Streptococcus mutans (CT)</i>	
INCQS:	00504	
ORIGEM:	CCT 3440 (ATCC 25175)	
LOTE:	0512504	
HISTÓRICO:	JCM 5705; DSM 20523; NCTC 10449; W. Sims; ATCC 25175; IFO 13955	
ISOLAMENTO:	Cárie	
MEIO DE CULTURA:	Trypticase soy agar (BBL 11043) com 5% de sangue de carneiro desfibrinado estéril.	
TEMPERATURA (Graus Celsius):	37	
TEMPO DE INCUBAÇÃO (horas):	24	
RESPIRAÇÃO:	5% CO ₂	
APLICAÇÃO:	Cepa Tipo	
SOROLOGIA:	Sorogrupo C	
PRODUÇÃO DE ENZIMAS:	-	
PRODUÇÃO DE TOXINAS:	-	
VALIDADE:	A ampola selada à vácuo tem validade Indeterminada se mantida entre -10°C e -20°C	
RASTREABILIDADE:	Os testes de pureza, viabilidade, morfologia e identidade realizados no lote, apresentaram resultado satisfatório. Os resultados do Controle de Qualidade fenotípico e molecular das cepas estão disponíveis, caso o cliente queira solicitar.	
NÚMERO DE PASSAGENS:	02	
REFERÊNCIAS:	Clarke, J. K. (1924) Br. J. exp. Path. 5, 141; Abercrombie, G. F. & Scott, W. M. (1928) Lancet ii, 697	
CLASSE DE RISCO:	2 A classe de risco pode mudar dependendo do volume manipulado.	
Observações	O lote é constituído de sete dígitos distribuídos da seguinte forma: os dois primeiros dígitos indicam o mês, os dois seguintes o ano de produção e os três últimos dígitos o número da cepa INCQS.	
Responsável pelo Setor:	Maysa Mandetta Clementino	



Brasil, 4365 Manguinhos CEP 21040-900 Rio de Janeiro RJ Brasil
(21) 3865-5151 Fax (21) 2290-0915
w.incqs.fiocruz.br

POP 65.3230.006 – Anexo F – Rev.03
CLASSIFICAÇÃO: 544.1



ANEXO C – Informe de bactéria de referência – *Streptococcus oralis*

 <p>Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde</p>	 <p>INCQS</p>
<p>Coletânea de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária-CMRVS Informe de bactéria de referência 31-jul-14</p>	
<p>MICRO-ORGANISMO: <i>Streptococcus oralis (Streptococcus sanguis)</i></p>	
INCQS:	00470
ORIGEM:	ATCC 10557
LOTE:	0312470
HISTÓRICO:	JM Sherman <-- NCTC 7864 <-- SK-2
ISOLAMENTO:	Endocardite bacteriana
MEIO DE CULTURA:	Agar Sangue com Blood Agar Base (Difco 0045) e 5% de sangue desfibrinado de ovelha
TEMPERATURA (Graus Celsius):	37
TEMPO DE INCUBAÇÃO (horas):	24
RESPIRAÇÃO:	Aerobiose
APLICAÇÃO:	—
SOROLOGIA:	Tipo II
PRODUÇÃO DE ENZIMAS:	—
PRODUÇÃO DE TOXINAS:	—
VALIDADE:	A ampola selada à vácuo tem validade Indeterminada se mantida entre -10°C e -20°C
RASTREABILIDADE:	Os testes de pureza, viabilidade, morfologia e identidade realizados no lote, apresentaram resultado satisfatório. Os resultados do Controle de Qualidade fenotípico e molecular das cepas estão disponíveis, caso o cliente queira solicitar.
NÚMERO DE PASSAGENS:	02
REFERÊNCIAS:	J. Bacteriol. 51: 723-729, 1946; Kilian M, et al. Taxonomic study of viridans streptococci: description of <i>Streptococcus gordonii</i> sp. nov. and emended descriptions of <i>Streptococcus sanguis</i> (White and Niven 1946), <i>Streptococcus oralis</i> (Bridge and Sneath 1982), and <i>Streptococcus mitis</i> (Andrewes and Horder 1906). Int. J. Syst. Bacteriol. 39: 471-484, 1989.
CLASSE DE RISCO:	2 A classe de risco pode mudar dependendo do volume manipulado.
Observações	O lote é constituído de sete dígitos distribuídos da seguinte forma: os dois primeiros dígitos indicam o mês, os dois seguintes o ano de produção e os três últimos dígitos o número da cepa INCQS.
<p>Brasil, 4365 Manguinhos CEP 21040-900 Rio de Janeiro RJ Brasil (21) 3865-5151 Fax (21) 2290-0915 www.incqs.fiocruz.br</p>	
<p>POP 65 3230.006 – Anexo F – Rev.03 CLASSIFICAÇÃO: 544.1</p>	

ANEXO D – Informe de bactéria de referência – *Streptococcus salivarius*

	Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde	 INCQS
Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária-CMRVS		
Informe de bactéria de referência 31-jul-14		
<hr/>		
MICRO-ORGANISMO: <i>Streptococcus salivarius</i>		
INCQS: 00457		
ORIGEM: NCTC 8618 (ATCC 7073)		
LOTE: 1010457		
HISTÓRICO: ATCC <-- New York State Department of Health <-- J.C. Small cepa 275		
ISOLAMENTO: Sangue de paciente com reumatismo		
MEIO DE CULTURA: Brain Heart Infusion Agar (BD 241830) ou Brain Heart Infusion (BD 237500)		
TEMPERATURA (Graus Celsius): 37		
TEMPO DE INCUBAÇÃO (horas): 24		
RESPIRAÇÃO: Aerobiose		
APLICAÇÃO: -----		
SOROLOGIA: -----		
PRODUÇÃO DE ENZIMAS: -----		
PRODUÇÃO DE TOXINAS: -----		
VALIDADE: A ampola selada à vácuo tem validade Indeterminada se mantida entre -10°C e -20°C		
RASTREABILIDADE: Os testes de pureza, viabilidade, morfologia e identidade realizados no lote, apresentaram resultado satisfatório. Os resultados do Controle de Qualidade fenotípico e molecular das cepas estão disponíveis, caso o cliente queira solicitar.		
NÚMERO DE PASSAGENS: 02		
REFERÊNCIAS: -----		
CLASSE DE RISCO: 1 A classe de risco pode mudar dependendo do volume manipulado.		
Observações O lote é constituído de sete dígitos distribuídos da seguinte forma: os dois primeiros dígitos indicam o mês, os dois seguintes o ano de produção e os três últimos dígitos o número da cepa INCQS.		
Responsável pelo Setor: Maysa Mandetta Clementino		
Av. Brasil, 4365 Manguinhos CEP 21040-900 Rio de Janeiro RJ Brasil Tel (21) 3865-5151 Fax (21) 2290-0915 www.incqs.fiocruz.br		
POP 65.3230.006 – Anexo F – Rev.03 CLASSIFICAÇÃO: 544.1		

ANEXO E – Informe de bactéria de referência – *Lactobacillus paracasei*

	Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde	 INCQS
Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária-CMRVS		
Informe de bactéria de referência 31-jul-14		
<hr/>		
MICRO-ORGANISMO:	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp <i>paracasei</i>	
INCQS:	00222	
ORIGEM:	ATCC 335	
LOTE:	0509222	
HISTÓRICO:	ATCC <<--LA Rogers<<--Fender	
ISOLAMENTO:	-----	
MEIO DE CULTURA:	Lactobacilli MRS broth (BD 288130)	
TEMPERATURA (Graus Celsius):	37	
TEMPO DE INCUBAÇÃO (horas):	24	
RESPIRAÇÃO:	Aerobiose	
APLICAÇÃO:	Ensaio de Timina	
SOROLOGIA:	-----	
PRODUÇÃO DE ENZIMAS:	-----	
PRODUÇÃO DE TOXINAS:	-----	
VALIDADE:	A ampola selada à vácuo tem validade Indeterminada se mantida entre -10°C e -20°C	
RASTREABILIDADE:	Os testes de pureza, viabilidade, morfologia e identidade realizados no lote, apresentaram resultado satisfatório. Os resultados do Controle de Qualidade fenotípico e molecular das cepas estão disponíveis, caso o cliente queira solicitar.	
NÚMERO DE PASSAGENS:	02	
REFERÊNCIAS:	Merrifield RB, Dunn MS. Microbiological determination of cytosine, uracil and thymine. Arch. Biochem. 16: 339-341, 1948.	
CLASSE DE RISCO:	1 A classe de risco pode mudar dependendo do volume manipulado.	
Observações	O lote é constituído de sete dígitos distribuídos da seguinte forma: os dois primeiros dígitos indicam o mês, os dois seguintes o ano de produção e os três últimos dígitos o número da cepa INCQS.	
Responsável pelo Setor:	Maysa Mandetta Clementino	
<p>Av. Brasil, 4365 Manguinhos CEP 21040-900 Rio de Janeiro RJ Brasil Tel (21) 3865-5151 Fax (21) 2290-0915 www.incqs.fiocruz.br</p> <p style="text-align: right;">POP 65.3230.006 – Anexo F – Rev.03 CLASSIFICAÇÃO: 544.1</p>		