

Avaliação da atividade antibacteriana de um biomodificador dentinário à base de óleo de *Copaifera multijulga* Hayne

Evaluation of the antibacterial activity of a dentin biomodifier based on *Copaifera multijulga* Hayne oil

Evaluación de la actividad antibacteriana de un biomodificador de dentina a base de aceite de *Copaifera multijulga* Hayne

Recebido: 18/06/2022 | Revisado: 01/07/2022 | Aceito: 03/07/2022 | Publicado: 12/07/2022

Geisy Rebouças Lima Brasil

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9200-6375>
Universidade Federal do Amazonas, Brasil
E-mail: geisylima@hotmail.com

Laryssa da Silva Cavalcante

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5543-0038>
Universidade Federal do Amazonas, Brasil
E-mail: laryssadsc@gmail.com

Cristiane Nagai de Bari

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5718-2138>
Universidade Federal do Amazonas, Brasil
E-mail: cristianenagai@yahoo.com.br

Marne Carvalho de Vasconcellos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7785-4029>
Universidade Federal do Amazonas, Brasil
E-mail: marne@ufam.edu.br

Nikeila Chacon de Oliveira Conde

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3756-2085>
Universidade Federal do Amazonas, Brasil
E-mail: nikeilaconde@gmail.com

Carina Toda

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1709-0877>
Universidade Federal do Amazonas, Brasil
E-mail: carinatoda@yahoo.com.br

Simone Assayag Hanan

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3415-8557>
Universidade Federal do Amazonas, Brasil
E-mail: simonehanan@yahoo.com.br

Maria Fulgência Costa Lima Bandeira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9847-5578>
Universidade Federal do Amazonas, Brasil
E-mail: fulgencia@ufam.edu.br

Resumo

Objetivos: Avaliar *in vitro* a atividade antibacteriana de um biomodificador dentinário à base do óleo de copaíba. **Metodologia:** O teste de atividade antibacteriana foi realizado no período de 12 meses, onde a emulsão foi armazenada em diferentes ambientes e analisada em 0, 3 e 12 meses. Para tanto, foram utilizados os microrganismos *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus paracasei*. O controle positivo foi o digluconato de clorexidina a 2% e o controle negativo os veículos da emulsão: água destilada, diazolidinil uréa a 0,5% e polisorbato 80 a 1%. Foram utilizadas microplacas de 96 orifícios, 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 “G”. Nos poços, a emulsão foi distribuída nas diferentes concentrações, além do controle negativo e do controle positivo. **Resultados:** A emulsão apresentou atividade bactericida ou bacteriostática frente a todos os microrganismos testados em todas as concentrações para os microrganismos *S. mutans* e *L. paracasei* no tempo zero. Após 12 meses, a formulação da emulsão à base do óleo de copaíba permaneceu exercendo atividade bactericida e bacteriostática nas concentrações 26,66 µL/mL e 15 µL/mL, respectivamente, frente ao microrganismo *S. mutans*. O ambiente geladeira apresentou-se com atividade bacteriostática, enquanto o ambiente ar condicionado mostrou-se com atividade bactericida frente ao *S. mutans* no período de 12 meses. **Conclusão:** O biomodificador apresentou atividade bactericida e/ou bacteriostática em diferentes ambientes por 12 meses, podendo ser armazenada em geladeira.

Palavras-chave: Copaifera; Microbiologia; Fitoterapia; Materiais dentários.

Abstract

Objectives: To evaluate in vitro the antibacterial activity of a dentin biomodifier based on copaiba oil. **Methodology:** The antibacterial activity test was carried out over a period of 12 months, where the emulsion was stored in different environments and analysed at 0, 3 and 12 months. For that, the microorganisms *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus paracasei* were used. The positive control was 2% chlorhexidine digluconate and the negative control was the emulsion vehicles: distilled water, 0.5% diazolidinyl urea and 1% polysorbate 80. 96-well microplates were used, so that each well had a final volume of 100 μ L. On the microplate, the columns were distributed in the numbers from 1 to 12 and the lines in the letters "A" to "G". In the wells, the emulsion was distributed at different concentrations, in addition to the negative control and positive control. **Results:** The emulsion showed bactericidal or bacteriostatic activity against all microorganisms tested at all concentrations for the microorganisms *S. mutans* and *L. paracasei* at time zero. After 12 months, the emulsion formulation based on copaiba oil continued to exert bactericidal and bacteriostatic activity at concentrations of 26.66 μ L/mL and 15 μ L/mL, respectively, against the microorganism *S. mutans*. The refrigerator environment showed bacteriostatic activity, while the air conditioning environment showed bactericidal activity against *S. mutans* in the period of 12 months. **Conclusion:** The biomodifier showed bactericidal and/or bacteriostatic activity in different environments for 12 months, and can be stored in a refrigerator.

Keywords: Copaifera; Microbiology; Phytotherapy; Dental materials.

Resumen

Objetivos: Evaluar in vitro la actividad antibacteriana de un biomodificador de dentina a base de aceite de copaiba. **Metodología:** La prueba de actividad antibacteriana se realizó durante 12 meses, donde la emulsión se almacenó en diferentes ambientes y se analizó a los 0, 3 y 12 meses. Para ello se utilizaron los microorganismos *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus paracasei*. El control positivo fue digluconato de clorhexidina al 2% y el control negativo fueron los vehículos de la emulsión: agua destilada, diazolidinilurea al 0,5% y polisorbato 80 al 1%. Se utilizaron microplacas de 96 pocillos, de forma que cada pocillo tuviera un volumen final de 100 μ L. En la microplaca, las columnas se distribuyeron en los números del 1 al 12 y las líneas en las letras "A" a la "G". En los pocillos se distribuyó la emulsión a diferentes concentraciones, además del control negativo y el control positivo. **Resultados:** La emulsión mostró actividad bactericida o bacteriostática contra todos los microorganismos probados a todas las concentraciones para los microorganismos *S. mutans* y *L. paracasei* en el tiempo cero. Después de 12 meses, la formulación de la emulsión a base de aceite de copaiba continuó ejerciendo actividad bactericida y bacteriostática a concentraciones de 26,66 μ L/mL y 15 μ L/mL, respectivamente, contra el microorganismo *S. mutans*. El ambiente de refrigerador mostró actividad bacteriostática, mientras que el ambiente de aire acondicionado mostró actividad bactericida contra *S. mutans* en el periodo de 12 meses. **Conclusión:** El biomodificador mostró actividad bactericida y/o bacteriostática en diferentes ambientes durante 12 meses, pudiendo almacenarse en refrigeración.

Palabras clave: Copaifera; Microbiología; Fitoterapia; Materiales dentales.

1. Introdução

O óleo de Copaifera multijulga Hayne possui diversas propriedades biológicas como atividade anti-inflamatória, cicatrizante, antibacteriana, antifúngica, antinoceptiva e anticancerígena (Veiga-Junior e Pinto, 2002; Leandro et al., 2012; Bandeira et al., 2016, Tobouti et al., 2017). Esse óleo é alvo de diversos estudos e possui diversas formas de apresentação e utilização no uso de formulações na medicina, perfumaria e cosméticos (Trindade et al., 2018; Diefenbach et al., 2017).

Na Odontologia, há estudos de sua utilização como gel de limpeza cavitária (Simões et al., 2016), cimento odontológico (Vasconcelos et al., 2008; Garrido et al., 2015) e como biomodificador dentinário, desenvolvido para ser utilizado no processo restaurador, podendo auxiliar na adesão dos materiais restauradores à estrutura dental, com perspectivas de prevenir a degradação da interface adesiva, reduzir ou eliminar a infiltração marginal (De Bari et al., 2010; Bandeira et al., 2020; Meira et al., 2020; Araújo et al., 2020; Araújo et al., 2021, Moura et al., 2021).

Dentre os diversos estudos existentes sobre a copaíba, muitos demonstram evidência da eficácia da atividade bacteriana de seu óleo (Simões et al., 2016; Diefenbach et al., 2017; Pereira et al., 2018; Moromi et al., 2018; Valadas et al., 2019; Moraes et al., 2020; Almeida-Silva et al., 2020). Entretanto, segundo Tobouti et al. (2017), apesar dos benefícios exercidos, faz-se necessária a obtenção de mais dados por meio de pesquisas in vitro, utilizando uma adequada metodologia de diluição, além da realização de estudos clínicos para se obter um produto antimicrobiano eficaz.

Além disso, a realização de testes de estabilidade ao longo do tempo dos fitoterápicos é de suma importância para verificar sua qualidade, eficácia e segurança. A análise de estabilidade determina o prazo de validade e as condições de

armazenamento (Chen, Hsu e Lee, 2019). O estudo de controle de qualidade de longa duração (2 anos) de emulsões à base do óleo de copaíba realizado por Lima et al. (2022), com armazenamento em diferentes condições de temperatura e umidade, demonstrou que o tempo de prateleira é de 12 meses e o local de armazenamento ideal a geladeira.

Desta forma, tendo em vista a necessidade de estudos adicionais para a avaliação da atividade antibacteriana por meio da diluição do óleo de copaíba, este trabalho se propôs a realizar a diluição do biomodificador à base do óleo de copaíba para avaliar a atividade antibacteriana da emulsão (Copaifera multijuga Hayne) nos tempos 0, 6 e 12 meses, em diferentes ambientes de armazenamento.

2. Metodologia

Este estudo foi realizado no Laboratório de Atividades Biológicas de Fitoterapia- LABFITO da Universidade Federal do Amazonas.

A emulsão à base do óleo de Copaifera multijuga Hayne foi formulada seguindo as proporções propostas por De Bari et al. (2010). Para a realização do estudo de atividade antibacteriana, a emulsão foi analisada aos 0, 6 e 12 meses, sendo armazenada em diferentes condições de temperatura e de umidade, de acordo com os ambientes descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Ambientes de armazenamento da emulsão de óleo de copaíba.

Ambientes	Local de Armazenamento	Temperatura	Umidade
A	Estufa	37°C	58%
B	Freezer	-12°C	10%
C	Geladeira	8°C	67%
D	Temperatura ambiente ao abrigo de luz	28,2°C	49%
E	Ar condicionado	24,2°C	42%
F	Temperatura ambiente com exposição à luz	25,9°C	52%

Fonte: Próprios autores.

Avaliação da atividade antibacteriana das emulsões do óleo de copaíba

Os micro-organismos fornecidos pelo laboratório do Instituto Nacional de Controle de Qualidade de Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS –RJ) foram reativados, seguindo as orientações do INCQS. Os micro-organismos utilizados foram o *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e o *Lactobacillus paracasei* (ATCC 335).

Para a preparação do inóculo, os micro-organismos foram reativados em Ágar De Man Rogosa & Sharpe (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, Estados Unidos) com 10% de sacarose (Synth®, São Paulo, SP, Brasil) em tubos de ensaio 10x150mm, incubados a 37°C por 24 horas em microaerofilia para *Streptococcus mutans* e em aerofilia para o *Lactobacillus paracasei*.

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®, São Paulo, SP, Brasil) em tubos de ensaio 10x150mm de vidro. As suspensões foram turbilhonadas em Vortex (MARCONI®, MA 162, São Paulo, SP, Brasil), até se tornarem homogêneas. O inóculo foi padronizado pela escala #0,5 de McFarland (PROBAC do Brasil®, São Paulo, SP, Brasil) (SANTOS et al.,2021).

Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima

A atividade antibacteriana das emulsões à base de óleo-resina da *Copaifera multijuga* foram determinadas segundo a metodologia em microdiluição proposta por Andrews (2001), adaptada de Sampaio et al. (2009).

As emulsões-testes foram diluídas na concentração de 1:1, com DMSO (Vetec Química Fina®, Duque de Caxias, RJ, Brasil), polisorbato 80 a 1% (Vetec Química Fina®, Duque de Caxias, RJ, Brasil) e emulsão à base de copaíba, formando a solução-mãe. O controle positivo foi o digluconato de clorexidina a 2% (Biodinâmica®, Ibiporã, PR, Brasil) e o controle negativo os veículos da emulsão: água destilada, diazolidinil uréia a 0,5% e polisorbato 80 a 1%.

Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar (Marconi®, São Paulo, SP, Brasil), com vidrarias, ponteiros e meios de cultura previamente esterilizados. Foram utilizadas microplacas de 96 orifícios (Kasvi® São José dos Pinhais, PR, Brasil) (em forma de “U”), de forma que cada poço possuiu 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 “G”. Nos poços, a emulsão foi distribuída de forma a conter as diferentes concentrações da emulsão-teste, controle negativo e controle positivo. O sistema de diluição foi controlado pelo volume da solução-mãe utilizada, ocupando os poços 1 a 11 (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentração da emulsão em microdiluição.

	Concentração da emulsão (µL/mL)										
Poço	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Volume (µL)	80	80	70	60	55	50	45	40	35	30	25
Concentração (µL/mL)	26,66	26,66	23,33	20	18,33	16,66	15	13,33	11,66	10	8,33

Fonte: Próprios autores.

Nos mesmos poços, foi acrescentado um volume padrão de inóculo (20µL) e para alcançar o volume final de 100µL, foram preenchidos com diferentes volumes de meio (Tabela 3).

Tabela 3 – Volume em µL da placa de microdiluição.

	Volume dos poços (µL)											
Poço	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Emulsão	80	80	70	60	55	50	45	40	35	30	25	-
Meio	20	-	10	20	25	30	35	40	45	50	55	80
Inóculo	-	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

Fonte: Próprios autores.

A coluna 1 representa a esterilidade da substância teste (emulsão + meio sem bactérias). A coluna 12 representa a viabilidade das bactérias (meio + inóculo sem emulsão teste). As linhas D, E e F representam os veículos compositores da emulsão (controle negativo) e a linha G, o digluconato de clorexidina a 2% (controle positivo) (Biodinâmica®, Ibiporã, PR, Brasil).

Para cada bactéria, foi utilizada uma microplaca testando as emulsões à base do óleo de copaíba. 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 *Lactobacillus paracasei*, e em microaerofilia para o *Streptococcus mutans*.

Após o período de incubação, foram adicionados aos poços 30 µL do reagente resazurina (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, Estados Unidos), que foi 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 micro-organismo sensível à emulsão testada.

Para a confirmação da concentração bactericida mínima (CBM), retirou-se alíquotas dos poços das emulsões da copaíba, que foram semeadas em meio Ágar Brain-Heart-Infusion (Himedia®, Mumbai, Índia) e incubadas a 37°C em aerofilia e microaerofilia, de acordo com o micro-organismo testado durante 24 horas para confirmar a presença de bactérias viáveis, determinando assim a menor concentração capaz de inibir o crescimento dos micro-organismos.

3. Resultados

Para a avaliação da atividade antibacteriana da emulsão de *Copaifera multijuga* frente às cepas de *S. mutans* e *L. paracasei*, utilizou-se o método de microdiluição em microplaca. O resultado da atividade antibacteriana da emulsão de copaíba frente aos micro-organismos *S. mutans* e *L. paracasei* (Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima) estão expressas nas tabelas 4, 5, 6 e 7.

Tabela 4: Avaliação da atividade antibacteriana (Concentração Bactericida Mínima e Concentração Inibitória Mínima) da emulsão de copaíba no tempo 0 frente ao *S. mutans* e *L. paracasei*.

Concentração (µL/mL)	26,66	23,33	20	18,33	16,66	15	13,33	11,66	10	8,33
Atividade Antibacteriana	BCC	BCC	BCC	BCC	BCC	BCC	BTT	BTT	BTT	BTT

BCC: Bactericida/ BTT: Bacteriostático. Fonte: Próprios autores.

Tabela 5: Avaliação da atividade antibacteriana (Concentração Bactericida Mínima e Concentração Inibitória Mínima) da emulsão de copaíba no tempo 6 meses frente ao *S. mutans* nos diferentes ambientes testados.

Concentração (µL/mL)	26,66	23,33	20	18,33	16,66	15	13,33	11,66	10	8,33
Estufa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Freezer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Geladeira	BTT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Temp. ambiente (escuro)	BCC	BTT	BTT	BTT	-	-	-	-	-	-
Ar condicionado	BCC	BTT	BTT	-	-	-	-	-	-	-
Temp. Ambiente (claro)	BCC	BCC	BCC	BCC	BCC	BTT	BTT	-	-	-

BCC:Bactericida/ BTT: Bacteriostático. Fonte: Próprios autores.

Tabela 6: Avaliação da atividade antibacteriana (Concentração Bactericida Mínima e Concentração Inibitória Mínima) da emulsão de copaíba no tempo 6 meses frente ao *L. paracasei* nos diferentes ambientes testados.

Concentração (µL/mL)	26,66	23,33	20	18,33	16,66	15	13,33	11,66	10	8,33
Estufa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Freezer	BTT	BTT	BTT	BTT	BTT	BTT	BTT	BTT	BTT	BTT
Geladeira	BTT	BTT								
Temp. ambiente (escuro)	BCC	BCC	BCC	BCC	BCC	BCC	BCC	BTT	BTT	BTT
Ar condicionado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Temp. Ambiente (claro)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

BCC: Bactericida/ BTT: Bacteriostático. Fonte: Próprios autores.

Tabela 7: Avaliação da atividade antibacteriana (Concentração Bactericida Mínima e Concentração Inibitória Mínima) da emulsão de copaíba no tempo 12 meses frente ao *S. mutans* nos diferentes ambientes testados.

Concentração (µL/mL)	26,66	23,33	20	18,33	16,66	15	13,33	11,66	10	8,33
Estufa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Freezer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Geladeira	BTT									
Temp. ambiente (escuro)	BTT	BTT	-	-	-	-	-	-	-	-
Ar condicionado	BCC	BCC	BCC	BCC	BCC	BTT	BTT	BTT	BTT	BTT
Temp. Ambiente (claro)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

BCC: Bactericida/ BTT: Bacteriostático. Fonte: Próprios autores.

A emulsão de copaíba no teste de atividade antibacteriana frente ao *L. paracasei* no tempo de 12 meses não apresentou resultado bactericida nem bacteriostático.

4. Discussão

A falta de padronização dos métodos de diluição para as pesquisas de atividade antibacteriana do óleo de copaíba acarreta em resultados incertos; isto ocorre pois o objeto do estudo é um óleo menos denso que a água, não podendo ser diluído diretamente no caldo já que afeta sua homogeneidade. Um dos métodos mais eficaz para a realização do estudo da atividade antibacteriana do óleo de copaíba é através da diluição em poço, pois garante que todos os componentes possuam a mesma solubilidade, assim como realizado no presente estudo (Tobouti et al., 2017).

Diefenbach et al. (2017), em revisão sistemática para avaliar a atividade antimicrobiana do óleo de copaíba contra patógenos orais, demonstraram que entre os 84 artigos encontrados, foram selecionados 11, dos quais 3 fazem parte do atual grupo de pesquisa de fitoterapia da Universidade Federal do Amazonas, confirmando a padronização e a qualidade da metodologia empregada. Além da copaíba, o grupo também realiza a mesma metodologia para outros bioativos, como uma

formulação à base de *Libidibia Ferrea*. O sistema de diluição em poços usado para a determinação da Concentração Inibitória Mínima também foi utilizado no estudo de Souza et al. (2021).

A emulsão de copaíba, no tempo zero, apresentou atividade bacteriostática frente ao *S. mutans* e *L. paracasei* a partir da concentração de 13,33 µL/mL e bactericida até a concentração 15 µL/mL. Ou seja, quanto maior a concentração da emulsão, mais eficaz se torna o efeito bactericida (26,66 µL/mL até 15 µL/mL), e conforme ocorrem as diluições e a redução da concentração da emulsão, observa-se o efeito bacteriostático (13,33 µL/mL até 8,33 µL/mL). O estudo realizado por Moromi et al. (2018), utilizando o óleo de copaíba para verificar sua ação antibacteriana frente ao *S. mutans*, demonstrou que este quando utilizado na concentração de 100% possui uma maior ação quando comparada às outras concentrações testadas, possuindo um maior efeito até mesmo que a clorexidina, e conforme ocorre a diluição do produto há a diminuição da sua ação. Da mesma forma, Valadas et al. (2019) estudaram a resposta de um verniz contendo copaíba frente ao *S. mutans* e verificaram que a concentração de 1% foi mais eficaz na redução da carga bacteriana, e que conforme ocorre a sua diluição, havia a redução do nível de ação bacteriana, corroborando com o observado em nosso estudo.

O trabalho realizado por Simões et al. (2016) avaliou *in vitro* a atividade antibacteriana frente a cepas isoladas do biofilme dental de um gel à base de óleo de copaíba, tendo sido observada atividade antibacteriana contra todas as bactérias analisadas. E De Bari et al. (2016) também demonstraram atividade antibacteriana da emulsão de copaíba contra o *S. mutans* e *L. paracasei*, confirmando os achados desse estudo.

Em todos os períodos de análise, a emulsão à base de copaíba apresentou atividade bactericida e bacteriostática contra os micro-organismos *S. mutans* e *L. casei*. No estudo realizado por Moraes et al. (2020), utilizando o óleo-resina de copaíba contra bactérias causadoras da cárie dentária e infecções endodônticas, os resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) variaram entre 12,5-100 µg/mL e de 12,5 a > 400 µg/mL, respectivamente, demonstrando similaridade entre os valores das concentrações para a maioria das bactérias analisadas, apontando que o oleoresina de copaíba exerceu um efeito bactericida, com exceção das bactérias anaeróbicas, para as quais apresentou efeito bactericida e bacteriostático.

Neste estudo, foi realizada a análise da atividade antibacteriana por 12 meses para verificar se haveria ações bactericida/bacteriostática. Outros testes de controle de qualidade para verificar a estabilidade farmacológica dessa emulsão como pH, densidade, organoléptico e presença de contaminantes no mesmo período de tempo, após o armazenamento em diferentes ambientes (estufa, freezer, geladeira, temperatura ambiente ao abrigo de luz, ar condicionado e temperatura ambiente com exposição a luz), demonstraram que o tempo de prateleira da emulsão de copaíba ideal seria de 12 meses e que o local de armazenamento sugerido seria a geladeira (Lima et al., 2022). O atual estudo demonstrou que, em relação à atividade antibacteriana, o ambiente geladeira apresentou-se como bacteriostática, enquanto o ambiente ar condicionado apresentou-se com atividade bactericida frente ao *S. mutans* no período de 12 meses.

Como a emulsão testada é para uso local, como um biomodificador dentinário em cavidade a ser restaurada, reafirmamos a sugestão do tempo de prateleira de 12 meses em geladeira, como no estudo de Lima et al. (2022). A completa eliminação de micro-organismos dos túbulos dentinários no processo restaurador do dente é extremamente difícil, pois a invasão bacteriana ocorre até em dentina saudável; portanto, basta que a cavidade esteja devidamente selada, impedindo contato com meio externo para que não haja progressão da cárie (Mertz-Fairhurst et al., 1998; Besic, 1943).

A aplicação de substância na interface adesiva ajuda a preservação dessa área (Carrilho et al., 2010), pois no procedimento restaurador dentário, após o condicionamento e a aplicação do sistema adesivo na superfície dentinária, pode ocorrer a ativação das metaloproteínases e este processo afeta diretamente a camada híbrida e a adesão do material (Breschi et al., 2010; Saffarpour et al., 2016). Assim, como a referida emulsão de copaíba possui ação nas metaloproteínases (Araújo et al.,

2020), atuando como biomodificador dentinário, sua ação bacteriostática se torna suficiente para o processo restaurador, além de ser um produto estável físico-quimicamente (Lima et al., 2022).

5. Conclusão

A emulsão à base de óleo de copaíba, como biomodificador dentinário, apresentou ação bactericida e/ou bacteriostática em diferentes ambientes por 12 meses, podendo ser armazenada em geladeira. Mas para outras funções, que necessitem de ação bactericida, o produto precisa ser utilizado no tempo zero.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado por uma bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Ministério da Educação do Brasil, Universidade Federal do Amazonas e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

- Almeida e Silva, J. E., de Andrade Picanço, T., Damasceno Paranatinga, I. L., Vieira de Sousa Júnior, J. J., da Silva Escher, S. K., & Pacheco de Oliveira, E. C. (2020). Avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória. *Rev. UNINGÁ*, 57 (2), 12-22.
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother*, 48(1), 5-16.
- Araújo, E. A. M., Lima, G. R., Melo, L. A. S., Sousa, L. B., Vasconcellos, M. C., Conde, N. C. O., Toda, C., Hanan, S. A., Filho, A. O. A. & Bandeira, M. F. C. L. (2021). Effect of a Copaiba Oil-Based Dental Biomodifier on the Inhibition of Metalloproteinase in Adhesive Restoration. *Adv Pharmacol Pharm Sci*, 2021(3), 1-10.
- Araújo, L. C. R., Lins, M. A., Lima, G. R., Moreschi, A. N. C., Lima, E. S., Hanan, S. A., Toda, C. & Bandeira, M. C. L. (2020). Atividade do óleo de copaíba sobre radicais livres formados durante a resposta inflamatória / copaiba oil's activity on free radicals during the inflammatory response. *Braz J Dev*, 6 (7), 53538-53553.
- Bandeira, M. F. C. L., Freitas, A. L., Menezes, M. S. C., Silva, J. S., Sombra, G. A. D., Araújo, E. A. M., Toda, C., Moreschi, A. C. & Conde, N. C. O. (2020). Adhesive resistance of a copaiba oil-based dentin biomodifier. *Braz Oral Res*, 34, 1-10.
- Bandeira, M. F. C. L. et al. (2016). Dentin Cleaning Ability of an Amazon Bioactive: Evaluation by Scanning Electron Microscopy. *The Open Dent J*, 10(1), 182- 87.
- Besic, F.C. (1943). The Fate of Bacteria Sealed in Dental Cavities. *J Dent. Res*. 22(10), 349-354.
- Breschi, L., Mazonni, A., Nato, F., Carrilho, M., Visintini, E., Tjaderhane, L., Ruggeri Jr, A., Tay, F. R., Dorigo, E. S. & Pashley, D. H. (2010). Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study. *Dent Mater*, 26(4), 320-325.
- Carrilho, M. R., Carvalho, R. M., Sousa, E. N., Nicolau, J., Breschi, L., Mazzoni, A., Tjaderhane, L., Tay, F. R., Agee, K. & Pashley, D. H. (2010). Substantivity of chlorhexidine to human dentin. *Dent Mater*, 26 (8), 779-85.
- Chen, M. C., Hsu, C. L. & Lee, L. H. (2019). Service Quality and Customer Satisfaction in Pharmaceutical Logistics: An Analysis Based on Kano Model and Importance-Satisfaction Model. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 16(21), 4091-4114.
- De Bari, C. N. C., Sampaio, F., Conde, N., Moura, L., Veiga Júnior, V., Barbosa, G., Vasconcellos, M., Toda, C., Venâncio, G. & Bandeira, M. F. (2010). Amazon emulsions as cavity cleansers: antibacterial activity, cytotoxicity and changes in human tooth color. *Rev Bras Farmacogn*, 26(4), 497-501.
- De Bari, C. C., Sampaio, F., Conde, N., Moura, L., Veiga Júnior, V., Barbosa, G., Vasconcellos, M., Toda, C., Venâncio, G. & Bandeira, M. F. (2016). Amazon emulsions as cavity cleansers: antibacterial activity, cytotoxicity and changes in human tooth color. *Rev Bras Farmacogn*, 26(2016), 497-501.
- Diefenbach, A. L., Muniz, F. W. M. G., Oballe, H. J. R. & Rosing, C. K. (2017). Antimicrobial activity of copaiba oil (*Copaifera* spp.) on oral pathogens: Systematic review. *Phytother Res*, 32(4), 586-596.
- Garrido, A. D. B., Cara, S. P. H. M., Marques, M. M., Spionchiado Jr, E. C., Garcia, L. F. R. & Sousa-Neto, M. D. (2015). Cytotoxicity evaluation of a copaiba oil-based root canal sealer compared to three commonly used sealers in endodontics. *Dent Res J (Isfahan)*, 12(2), 121-126.
- Leandro, L. M., Vargas, F.S., Barbosa, P. C. S., Neves, J. K. O., Da Silva, J. A. & Veiga Junior, V. F. (2012). Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) Oleoresins. *Molecules*, 17(4), 3866-3889.
- Lima, G. R., Cavalcante, L. S., Moraes, B. F., Araújo, E. A. M., Milério, P. S. L. L., Conde, N. C. O., Toda, C., Hanan, S. A. & Bandeira, M. C. L. F. (2022). Quality control of dentin biomodifiers based on Copaiba oil. *Conjecturas*. 22(2), 798-812.

- Meira, J. F., Lima, G. R., Libório-Kimura, T. N., Vasconcellos, M. C., Sampaio, F. C., Toda, C., Conde, N. C. O. & Bandeira, M. F. C. L. (2020). Avaliação histomorfométrica do efeito de um biomodificador de dentina à base de óleo de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) na camada híbrida. *Braz J Dev*, 6 (9), 65445-65458.
- Mertz-Fairhurst, E. J., Curtis Jr, J. W., Ergle, J. W., Rueggeberg, F. A. & Adair, S. M. (1988). Ultraconservative and cariostatic sealed restorations: results at year 10. *J Am Dent Assoc*. 129 (1), 55-66.
- Moraes, T. S., Leandro, L. F., Santiago, M. B. et al. (2020). Assessment of the antibacterial, antivirulence, and action mechanism of *Copaifera pubiflora* oleoresin and isolated compounds against oral bacteria. *Biomed Pharmacother*. 129,110467.
- Moromi, H. N., Ramos, D. P., Villavicencio, G. J., Martinez, C. E., Mendoza, A. R., Chavez, E. A., Ortiz, L. F. & Quispe, A. S. (2018). In vitro Study of the Antibacterial Effect of Oleoresin of *Copaifera reticulata* and the Essential Oil of *Origanum majoricum* against *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis* Bacteria of Importance in Oral Pathologies. *Int J Odontostomatol*, 12 (4), 355-361.
- Moura, L. G., Neto, G. P., De Bari, C. N. C., Lima, G. R., Toda, C., Hanan, S. A., Conde, N. C. O. & Bandeira, M. F. C. L. (2021). Dentin surface and hybrid layer morphological analysis after use of a copaiba oil- based dentin biomodifier. *Conjecturas*,21(4),78-97.
- Pereira, N. C. M., Mariscal, A. G., Nepoceno, K. L. P. C., Silva, V. C. C. R., Fernandes, H. M. & Vivi, V. K. (2018). Atividade antimicrobiana do óleo-resina de copaíba natural/comercial contra cepas padrão. *Journal Health NPEPS*, 3(2),527-539.
- Saffarpour, A., Saffarpour, A., Kharazifard, M. J. & Rad, A. E. (2016). Effect of chlorhexidine application protocol on durability of marginal seal of class V restorations. *J Dent (Tehran)*, 13(4),231-37.
- Sampaio, F. C., Pereira, M. S. V., Dias, C. S., Costa, V. C. O., Conde, N. C. O. & Buzalaf, M. A. R. (2009). In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. *J Ethnopharmacol*, 124(2),289-294.
- Simões, C. A. G., Conde, N. C. O., Venâncio, G. N., Milério, P. S. L.L., Bandeira, M. F. L. & Veiga-Júnior, V. F. (2016). Antibacterial Activity of Copaiba Oil Gel on Dental Biofilm. *Open Dent J*, 11(10), 188-195.
- Souza, A. L. M., Matos, A. J. P., Souza, W. M., Souza, T. P., Venâncio, G. N., Bandeira, M. F. C. L., Toda, C., Moreschi, A. R. C. & Conde, N. C. O. (2021). Antimicrobial activity and quality control of a formulation based on *Libidibia ferrea* after aging. *Res Soc Dev*, 10(10), e487101018996.
- Tobouti, P. L., De Andrade, T. M, Pereira, T. & Mussi, M. C. (2017). Antimicrobial activity of copaiba oil: A review and a call for further research. *Biomed Pharmacother*, 94,93- 99.
- Trindade, R., Silva, J. K. & Setzer, W. N. *Copaifera* of the Neotropics: A Review of the Phytochemistry and Pharmacology. *Int J Mol Sci*, 19(5), 1511.
- Valadas, L. A. R., Gurgel, M. F., Mororó, J. M., et al. (2019). Dose-response evaluation of a copaiba-containing varnish against *Streptococcus mutans* in vivo. *Saudi Pharm J*, 27(3),363-67.
- Vasconcelos, K. R. F., Veiga Júnior, V. F., Rocha, W. C. & Bandeira, M. F. C. L. (2008). Avaliação in vitro da atividade antibacteriana de um cimento odontológico à base de óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne. *Rev Bras Farmacogn*, 18(suppl), 733-738.
- Veiga Júnior V. F.; & Pinto, A. C. (2002). O gênero *Copaifera* L. *Quím Nova*, 25, 273-286.