

**Atividade do óleo de copaíba sobre radicais livres formados durante a resposta inflamatória****Copaíba oil's activity on free radicals during the inflammatory response**

DOI:10.34117/bjdv6n7-845

Recebimento dos originais: 27/06/2020

Aceitação para publicação: 31/07/2020

**Larissa Carolina Ramos de Araújo**

Aluna de Graduação

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas -UFAM

Endereço: Av. Ministro Waldemar Pedrosa, 1539 -Praça 14 de Janeiro, Manaus -AM, Brasil

E-mail: larissaraujo98@hotmail.com

**Márcia Arruda Lins**

Mestranda em Odontologia

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas -UFAM

Endereço: Av. Ministro Waldemar Pedrosa, 1539 -Praça 14 de Janeiro, Manaus -AM, Brasil

E-mail: linsmarcia95@gmail.com

**Geisy Rebouças de Lima**

Doutoranda em Inovação Farmacêutica

Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas-UFAM

Endereço: Av. General Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 1200, Campus da UFAM, setor Sul - prédio da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Coroado I, Manaus -AM, Brasil

E-mail: geisylima@hotmail.com

**Ana Regina Casaroto Moreschi**

Pós-doutora em Odontologia (Áreas de Estomatologia e Fitoterapia) pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas-UFAM

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas-UFAM

Endereço: Av. Ministro Waldemar Pedrosa, 1539 -Praça 14 de Janeiro, Manaus -AM, Brasil

E-mail: anacasarotom@gmail.com

**Emerson Silva Lima**

Doutor em Farmácia pela Universidade de São Paulo

Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas-UFAM

Endereço: Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200, Campus da UFAM, setor Sul - prédio da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Coroado I, Manaus -AM, Brasil

E-mail: eslima@ufam.edu.br

**Simone Assayag Hanan**

Doutora em Odontopediatria pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho / Faculdade de Odontologia de Araraquara

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas-UFAM

Endereço: Av. Ministro Waldemar Pedrosa, 1539 -Praça 14 de Janeiro, Manaus -AM, Brasil

E-mail: simonehanan@yahoo.com.br

**Carina Toda**

Doutora em Reabilitação Oral pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho /  
Faculdade de Odontologia de Araraquara

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas- UFAM

Endereço: Av. Ministro Waldemar Pedrosa, 1539 -Praça 14 de Janeiro, Manaus -AM, Brasil

E-mail: carinatoda@yahoo.com.br

**Maria Fulgência Costa Lima Bandeira**

Doutora em Dentística pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho/ Faculdade de  
Odontologia de Araraquara

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas-UFAM

Endereço: Av. Ministro Waldemar Pedrosa, 1539 -Praça 14 de Janeiro, Manaus -AM, Brasil

E-mail: fulgencia@ufam.edu.br

**RESUMO**

Nas últimas décadas, houve um aumento no interesse dos profissionais de saúde acerca do uso e do conhecimento de medicamentos fitoterápicos. Entre estes, destaca-se o óleo de copaíba, por suas atividades antimicrobiana, analgésica e anti-inflamatória. Para analisar *in vitro* a atividade anti-inflamatória das emulsões de Copaífera em macrófagos, quantificando a produção de radicais livres, utilizou-se uma cultura de macrófagos da cepa 264,7, cultivada no Meio Eagle Dulbecco Modificado completo, suplementada com 10% soro fetal bovino inativado e penicilina/estreptomicina (100 UI / mL/100 µg/mL), sendo mantidos em forno úmido a 37°C. Após a tripsinização, os macrófagos foram contados em câmara de Neubauer e submetidos à emulsão de fitoterápicos. O anti-inflamatório dexametasona (20 µg /mL) foi utilizado como padrão-ouro para comparar os resultados. A liberação de óxido nítrico foi quantificada pela produção de nitrito na reação colorimétrica de Griess. Para cada volume de 100 µL dos sobrenadantes previamente coletados dos desafios celulares, foram adicionados 100 µL de reagente Griess (Sigma Aldrich), que foram incubados em temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, a absorbância (540nm) foi determinada em um espectrofotômetro. Os resultados foram analisados por médias ± desvios-padrão e submetidos aos testes de Kolmogorov-Smirnov, Tukey e Dunnett. Os autores concluíram que o óleo de copaíba e suas emulsões reduzem significativamente a quantidade de óxido nítrico produzido pelos macrófagos durante o processo inflamatório.

**Palavras-chave:** fitoterapia, macrófago, radicais livres, inflamação.

**ABSTRACT**

Over the past decades, there has been an increase in the interest of health's professionals about the use and knowledge of plant-based medications. Among these, copaiba oil stands out, due to its antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities. In order to analyze *in vitro* the anti-inflammatory activity of Copaífera emulsions' on macrophages, by quantifying the production of free radicals, a culture of macrophages of the 264.7 strain, grown in the complete Modified Eagle Dulbecco Medium was used, supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum and penicillin / streptomycin (100 IU / mL / 100 µg / mL), being kept in a humid oven at 37°C. After trypsinization, the macrophages were counted, in a Neubauer chamber, and subjected to the herbal medicine emulsion. The dexamethasone anti-inflammatory (20 µg / mL) was used as a gold standard to compare the results. The release of nitric oxide was quantified by the production of nitrite in the Griess colorimetric reaction. For each volume of 100 µL of the supernatants previously collected from the cell challenges, 100 µL of Griess reagent (Sigma Aldrich) were added, which were incubated at room temperature for 30 minutes. Then, the absorbance (540nm) was determined in a spectrophotometer. The results were analyzed using means ± standard deviations and submitted to

Kolmogorov-Smirnov, Tukey and Dunnett tests. The authors concluded that copaiba oil and its emulsions significantly reduce the amount of nitric oxide produced by macrophages during the inflammatory process.

**Keywords:** phytotherapy, macrophage, free radicals, inflammation.

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, houve um aumento no interesse dos profissionais da área da saúde no uso e conhecimento de medicamentos fitoterápicos (Lopes et al., 2019; Souza et al., 2020). O Brasil se destaca por possuir um terço da flora mundial, além de ter em seu território a Amazônia que apresenta a maior reserva de produtos naturais com ação fitoterápica (Santos et al., 2011). Esta diversidade vegetal faz com que estudos para o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos ganhem destaque no cenário científico mundial (França et al., 2008).

A *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae) é uma árvore tropical comumente encontrada no Brasil, especificamente na região central e ocidental da Amazônia. O óleo de Copaíba (CO) é um óleo-resina que consiste num exsudato de resinas ácidas e compostos voláteis (Veiga Jr. et al., 2007). Tem sido amplamente utilizado como medicina tradicional em regiões neotropicais há milhares de anos e continua a ser um tratamento popular para uma variedade de doenças (Trindade et al., 2018). Pode ser formulado em emulsão (De Bari et al., 2016; Bandeira et al., 2020), gel de limpeza de cavidade (Simões et al., 2016), cimento odontológico (Vasconcelos et al., 2008) e cimento endodôntico experimental (Garrido et al., 2015).

O gênero *Copaifera* L. tem sido estudado devido às suas várias atividades biológicas, onde o efeito anti-inflamatório, decorrente do sinergismo entre os constituintes do óleo-resina, é um dos mais investigados (Izuma et al., 2012). Possui também atividades antimicrobiana, germicida, analgésica, antineoplásica, com potencial aplicabilidade na Odontologia (Bandeira et al., 1999; Vasconcelos et al., 2008; Veiga Jr. et al., 2007; Yamagushi e Garcia, 2012; De Bari et al., 2016; Bandeira et al., 2016) e, mais recentemente, antiproteolítica, agindo sobre as metaloproteinases MMP2 e MMP9, presentes no tecido dentinário (Bandeira et al., 2016; Bandeira et al., 2020).

A reação inflamatória é uma das principais respostas de defesa do hospedeiro contra agressões teciduais, desencadeada a partir de uma série de estímulos como os agentes infecciosos, além de trauma físico e produtos químicos (Dong et al., 2016). Durante a resposta inflamatória, ocorre a formação e a liberação de diversos radicais livres, dentre eles o óxido nítrico (NO), os quais podem causar danos celulares e, para prevenir a exacerbação dos processos inflamatórios, são utilizados agentes terapêuticos a fim de prevenir patologias, dentre elas as bucais.

Estudos anteriores já demonstraram a eficácia anti-inflamatória do CO *in vitro* e também em sua capacidade de inibir a inflamação aguda em ratos e camundongos (Kobayashi et al., 2011;

Destryana et al., 2014; Teixeira et al., 2017). No entanto, até agora, pouquíssimos estudos avaliaram a atividade anti-inflamatória das emulsões do CO.

Considerando as supracitadas propriedades da copaíba, parece razoável hipotetizar que sua emulsão, além de favorecer a adesão do material restaurador à estrutura dentária (Bandeira et al., 2020) devido a sua ação biomodificadora do tecido dentinário, possua atividade anti-inflamatória e seja capaz de atenuar a possível inflamação pulpar, objetivando-se futuramente sua ação terapêutica em cavidades profundas em substituição ao material disponível no mercado brasileiro (clorexidina), que não apresenta tal propriedade.

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade anti-inflamatória do óleo e da emulsão de *C. multijuga*.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 COLETA DO ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera multijuga* Hayne)**

A *Copaifera multijuga* Hayne selecionada para a coleta, depositada no herbário do INPA sob o nº 270709 e cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN/MMA), localiza-se na Reserva Ducke, no Km 17 da Rodovia Manaus-Itacoatiara/ Amazonas – Brasil. Um furo foi realizado com auxílio de um trado de 7/8 polegada de diâmetro e 1 metro de comprimento ao centro do caule para coletar o óleo através de escoamento. O óleo foi armazenado em vidro âmbar previamente esterilizado (Bandeira et al., 1999; Barbosa et al., 2013).

### **2.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO ÓLEO DA *Copaifera multijuga* Hayne**

A análise cromatográfica do óleo de Copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) foi em fase gasosa acoplada a um detector de ionização de chama (CG\_DIC) e um detector de espectrometria de massas (CG-EM), para que houvesse a identificação dos constituintes do óleo de copaíba (Vasconcelos et.al., 2008).

### **2.3 PREPARO DAS EMULSÕES DE ÓLEO DE COPAÍBA**

As emulsões (A e B) a base de óleo da *Copaifera multijuga* Hayne foram formuladas obedecendo às orientações da Farmacopeia Brasileira (2010). No preparo das emulsões foram utilizados água destilada, Tween<sup>®</sup> 80 (Merck, Alemanha) e óleo de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) (De Bari et al., 2016). A emulsão A é ácida e a B é básica.

**2.4 CULTURA DAS CÉLULAS INFLAMATÓRIAS MACRÓFAGOS**

Os macrófagos RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™), foram mantidos em meio de cultura DMEM (Dulbecco's *Modified Eagle's Medium*) completo e em estufa úmida (5%CO<sub>2</sub>/95% ar, 37°C), sendo subcultivados a cada 2 dias. Quando atingiram subconfluência, foi realizado o tratamento enzimático com a solução de tripsina 0,05% / EDTA 0,02%, a contagem e exclusão das células mortas pelo método azul de Tripán.

Para adesão das células na placa, suspensões celulares na concentração de 10<sup>6</sup> células/mL (200 µL/poço) em meio de cultura DMEM completo, foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas em estufa úmida (5%CO<sub>2</sub>/95% ar, 37°C) por 24 h. Após este período, o sobrenadante foi descartado e os macrófagos foram tratados com as amostras testes (Tabela 1) de óleo de copaíba e suas emulsões A e B, diluídas em meio de cultura DMEM contendo a endotoxina lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (1 µg/mL), (200 µL/poço). Em seguida, foram novamente incubadas em estufa úmida (5%CO<sub>2</sub>/95% ar, 37°C) por 24 h (Oliveira et al., 2014; Dong et al., 2016) . Os grupos experimentais seguiram a diluição seriada do óleo e emulsões, partindo da concentração inicial de 100 µg/mL.

Os macrófagos, na presença somente de LPS e do meio DMEM completo, foram considerados controles positivo e negativo, respectivamente (Tabela 1). O anti-inflamatório dexametasona (20 µM/mL) foi utilizado como substância padrão para comparação dos resultados. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

**Tabela 1:** Grupos experimentais com suas respectivas substâncias-testes utilizadas nos ensaios de Citotoxicidade celular e de Liberação de Óxido Nítrico.

	<b>Grupos experimentais</b>	<b>Ensaio de Citotoxicidade Celular</b>	<b>Ensaio de Liberação de Óxido Nítrico</b>
1	Óleo de Copaíba <i>in natura</i>	X	X
2	Emulsão A a base de óleo de copaíba	X	X
3	Emulsão B a base de óleo de copaíba	X	X
4	LPS (Controle positivo)	X	X
5	DMEM (Controle Negativo)		X
6	Dexametasona (padrão)		X

**2.5 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE CELULAR (MTT)**

A citotoxicidade celular foi determinada pelo ensaio colorimétrico MTT (3-[4,5-dimethylthiazolyl-2]-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Após o tempo experimental de 24 h, o

sobrenadante foi removido e acrescentada a asolução de MTT (5 mg/mL) diluída em meio DMEM (50 µL/poço), e incubadas em estufa úmida (5% CO<sub>2</sub>/95% ar, 37°C) por 3 h. Em seguida 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados para dissolução dos cristais de formazan liberados pelas células. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro (560nm), representando a viabilidade das células metabolicamente ativas.

## 2.6 ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

A liberação de NO foi quantificada pela produção de nitrito (NO<sub>2</sub>) na reação colorimétrica de Griess. Para cada volume de 100 µL dos sobrenadantes previamente coletados dos desafios celulares foram adicionados 100 µL de reagente de Griess (Sigma Aldrich), os quais foram incubados a temperatura ambiente por 30 min. Em seguida, foi determinada a absorbância (540nm) em espectrofotômetro. Os resultados expressos em µmoles foram determinados pela comparação com a curva padrão (realizada com nitrito de sódio nas seguintes concentrações: 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 e 1.5 µM).

## 2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados iniciais foram analisados por meio da média ± desvio padrão (SD), e expressos de acordo com o padrão de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) apresentado. De acordo com a análise de variância dos dados, a comparação entre os grupos foi determinada pela Análise de Variância (ANOVA) a dois critérios (Two-Way), seguida do teste *post-hoc* de Tukey HSD e o teste Dunnett. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$ .

# 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

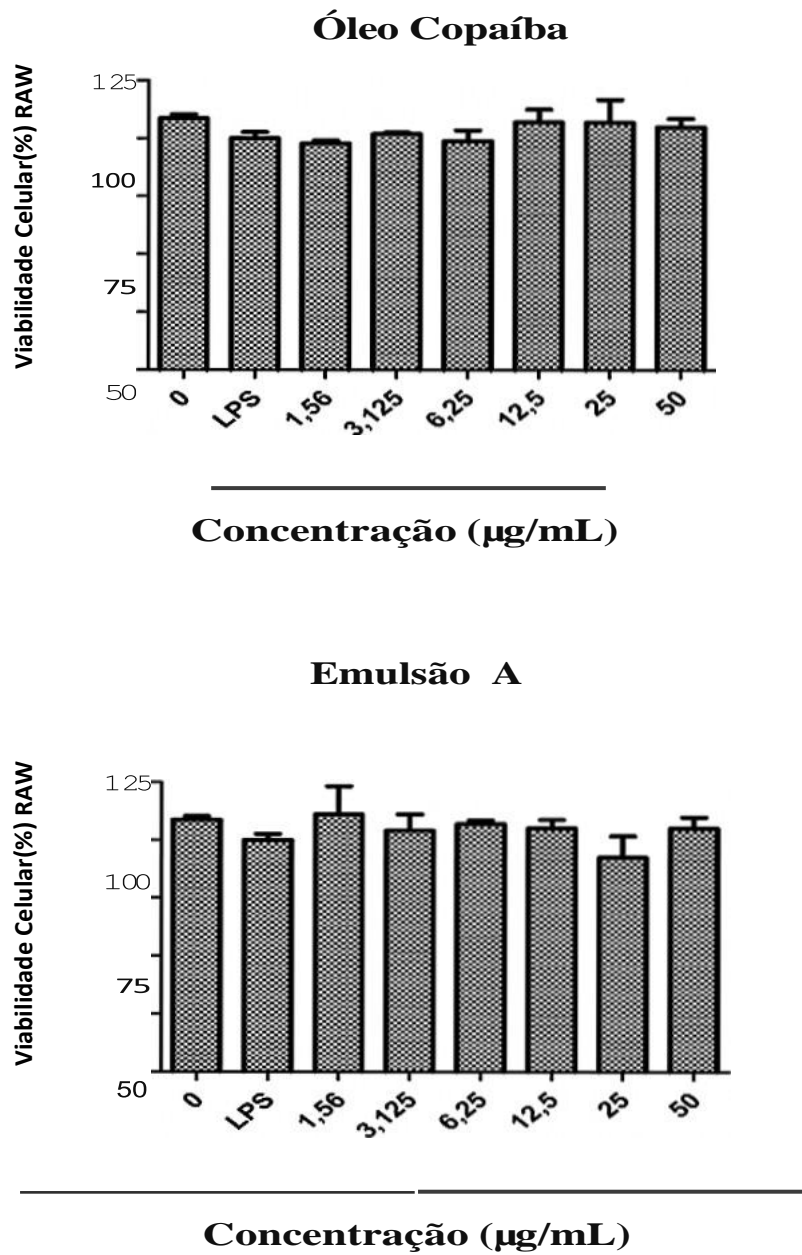
## 3.1 O EFEITO DO CO NA VIABILIDADE CELULAR

O teste MTT detecta a capacidade de um agente em produzir efeitos letais ou subletais sobre sistemas biológicos, demonstrando também a viabilidade celular frente a este agente. Desidrogenases mitocondriais, presentes apenas em células metabolicamente viáveis, clivam o anel de tetrazólio, resultando nos cristais azulados de formazan. Assim, a produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória celular, identificando as células metabolicamente ativas (Mosmann, 1983).

No presente estudo, o CO, bem como suas emulsões A e B, usadas sobre macrófagos, demonstraram a manutenção da viabilidade celular para todas as concentrações testadas. A viabilidade celular se manteve próxima de 100% para todas as concentrações, semelhante ao controle



positivo, mostrando que a copaíba e suas emulsões não são citotóxicas para as células humanas (Figura 1).



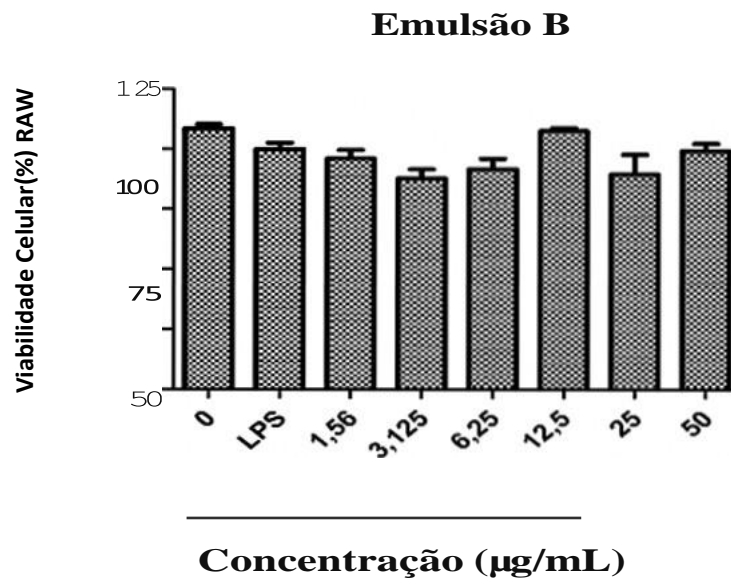


Figura 1. Percentual das células macrófagos viáveis após desafio *in vitro* com diferentes concentrações do CO e suas emulsões ácida (A) e básica (B) durante o período de 24 h.

Estes resultados estão em discordância com o estudo de De Bari et al. (2016), onde todas as emulsões testadas e o CO, em concentrações variando de 0,234 a 30 µg/mL, foram tóxicos frente às células NHI3T3, fibroblastos antineoplásicos de murinos, causando uma diminuição na viabilidade celular, quando comparados ao controle positivo, mesmo sendo usado o Tween 80 nas emulsões, veículo capaz de alterar a morfologia da superfície e a parede celular devido a sua ação detergente. Da mesma forma, ao avaliar a citotoxicidade *in vitro* e *in vivo* de cinco espécies de Copaífera (*C. duckei*, *C. multijuga*, *C. paupera*, *C. pubiflora* e *C. reticulata*) sobre os fibroblastos do fígado de hamsters chineses, Tavares et al. (2017) constataram que os óleos-resinas das cinco espécies mostraram-se citotóxicos *in vitro* (IC50 entre 9,8 a 60,8 µg/mL), embora não o fossem *in vivo*, sendo considerados seguros para o uso humano.

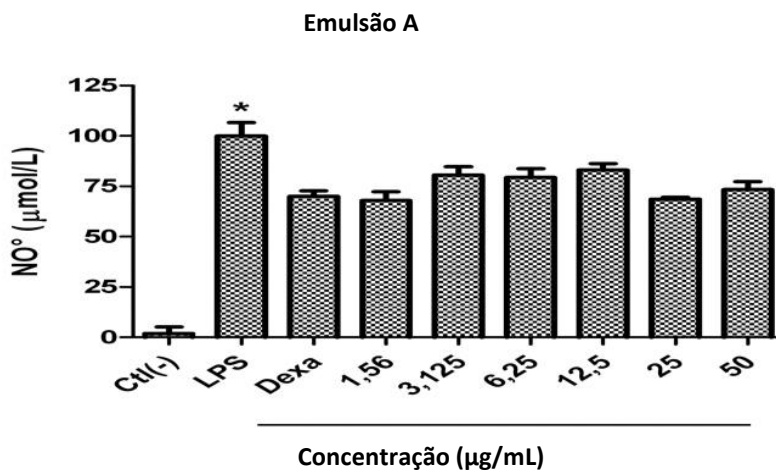
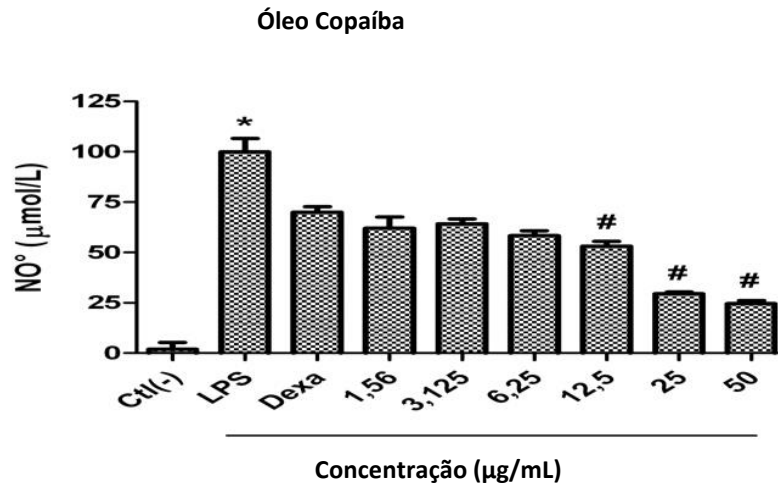
Ao avaliar a citotoxicidade, por meio do MTT, do CO na viabilidade celular e na adesão de células-tronco mesenquimais, Lund et al. (2019) observaram um aumento na adesão celular e constataram que a concentração usada (0,5 µg/mL) facilitou a proliferação celular, bem como a viabilidade das células, indicando que tal óleo não se mostrou citotóxico.

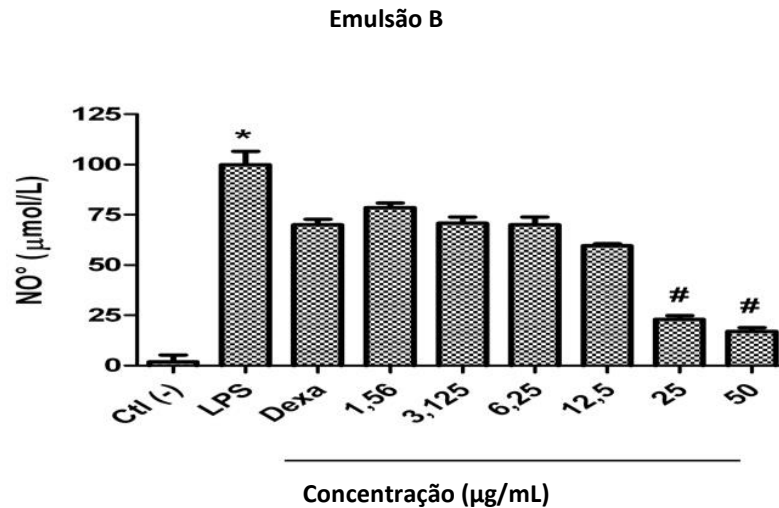
### 3.2 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO ÓLEO DE COPAÍBA

Uma vez que o CO e ambas as emulsões A e B não apresentaram efeito citotóxico celular, os mesmos foram avaliados quanto a sua propriedade anti-inflamatória. Com base na liberação do radical inflamatório NO pelos macrófagos, observou-se que as concentrações do CO 12,5 µg/mL, 25 µg/mL e 50 µg/mL, bem como as concentrações da emulsão B 25 µg/mL e 50 µg/mL, produziram



redução significativa de NO, caracterizando as concentrações anti-inflamatórias mínimas da copaíba. Destaca-se, ainda, que este perfil anti-inflamatório superou o corticosteróide dexametasona, considerado o padrão ouro dentro da classe dos anti-inflamatórios esteroidais (Figura 2). No entanto, todas as concentrações testadas do óleo e de ambas as emulsões determinaram menor liberação de NO, quando comparadas às do controle LPS.





**Figura 2.** Liberação de óxido nítrico (NO) *in vitro* pelos macrófagos após desafio com diferentes concentrações da Copaíba, LPS e dexametasona durante o período de 24 h. (\*)  $p < 0,05$  quando comparado com todos os demais grupos. (#)  $p < 0,05$  quando comparado com a dexametasona. Três experimentos independentes. ANOVA, Teste de Tukey e Dunnett.

O NO é um radical livre de gás permeável a membranas biológicas, que funciona como um mensageiro inter e intracelular, desempenhando papel-chave em uma série de processos, incluindo o metabolismo, a morte e a sobrevivência celular. Durante o processo inflamatório, vários mediadores, incluindo o NO, são liberados em resposta ao dano causado. É um potente vasodilatador, envolvido no processo inflamatório, já que possui capacidade de aumentar a permeabilidade vascular e causar edema (Hasnat et al., 2015). Uma grande quantidade de NO é produzida em resposta a diferentes estímulos tais como citocinas endógenas e endotoxinas lipopolissacarídicas microbianas (LPS) (Lamoke et al., 2015).

Na Odontologia, a busca por recursos naturais com capacidade de minimizar a resposta inflamatória aumentou com o passar dos anos. O CO é um recurso natural que apresenta atividade antibacteriana, antitumoral e anti-inflamatória, podendo ter grande aplicabilidade na Odontologia (Bandeira et al, 1999; Vasconcelos et al., 2008; Veiga Júnior et al., 2007; Yamagushi e Garcia, 2012; De Bari et al., 2016; Bandeira et al., 2016).

Em estudos recentes, os efeitos da indução anti-inflamatória e cicatricial promovidos pela copaíba nas lesões da mucosa oral foram confirmados (Teixeira et al., 2017; Wagner et al., 2017; Alvarenga et al., 2020).

A atividade anti-inflamatória pode estar relacionada aos constituintes do CO, como evidenciado no estudo de Veiga Júnior (2007), o qual verificou que os óleos-resina das espécies *Copaifera cearenses* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke e *Copaifera multijuga* Hayne reduziram o acúmulo de neutrófilos e leucócitos, em diferentes concentrações. O óleo-resina da *Copaifera multijuga* (100mg/kg) foi considerado o mais potente na atividade anti-inflamatória

induzida, por apresentar maior concentração de  $\beta$ -cariofileno (57,5%). O CO possui ácidos resinosos e compostos voláteis na sua composição química como os diversos sesquiterpenos, incluindo-se o  $\beta$ -cariofileno (bactericida e anti-inflamatório), o  $\beta$ -bisaboleno (anti-inflamatório) e o  $\alpha$ -humuleno (anti-inflamatório), além de diterpenos. O ácido caurenóico (AC) é um princípio ativo encontrado no CO, sendo classificado como um diterpeno, responsável também pela ação anti-inflamatória e cicatrizante do óleo (Carvalho et al., 2014). Lucca et al. (2018) atribuíram a ação anti-inflamatória do CO ao  $\beta$ -cariofileno, um componente do óleo, que se liga seletivamente aos receptores canabinoides, como o CB2, sendo um agonista do mesmo. Quando isso ocorre, há uma inibição da adenilato ciclase, desencadeando uma cascata de reações bioquímicas, que contribuem para a atividade anti-inflamatória sistêmica (Bento et al., 2011).

A literatura aponta que a copaíba possui excelentes propriedades farmacológicas anti-inflamatórias e atua regulando o excesso de inflamação patológica, o que leva à preservação do tecido e facilita o processo regenerativo (Wagner et al., 2017; Alvarenga et al., 2020).

A terapia com CO modula a resposta inflamatória, diminuindo o infiltrado inflamatório crônico, o edema e, especificamente, o número de macrófagos (Teixeira et al., 2017).

Nos últimos anos, na busca por novas substâncias com potencial farmacológico e biocompatíveis, aumentou o número de estudos sobre o uso de produtos naturais na Odontologia e alternativas para o manejo de doenças bucais, especialmente a cárie dentária (Abrão et al., 2018).

A cárie dentária é atualmente considerada uma disbiose envolvendo interações entre estrutura dentária e biofilme microbiano (Pitts et al., 2017). Embora não seja o único agente etiológico, um aumento no número de *Streptococcus mutans* pode ser considerado um fator de risco para o início da lesão de cárie, o que torna esse grupo de bactérias ácidas e acidofílicas, associado ao desenvolvimento da lesão cariosa (Eriksson et al., 2017). A lesão cariosa profunda pode se estender próxima à câmara pulpar, levando a uma resposta inflamatória da polpa dentária, resultando em grande incômodo e sensibilidade ao paciente.

A copaíba potencializa a resposta das células da polpa dental humana a materiais comumente usados para capeamento direto em Odontologia restauradora, pelo aumento da proliferação celular e regulação positiva da expressão de genes relacionados à biomineralização, além de melhorias na migração celular e na formação de nódulos mineralizados. Logo, quando usada *in vitro* associada a materiais, como o hidróxido de cálcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) e o MTA, melhorou as atividades celulares relacionadas ao reparo pulpar (isto é, citocompatibilidade, diferenciação, mineralização e migração), incluindo um efeito protetor contra a citotoxicidade do  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (Couto et al., 2020).

Altos valores de pH favorecem a estabilidade das emulsões, assegurando sua vida útil (Oloro, 2018). O pH alcalino também encontra-se fortemente associado à interferência da proliferação

bacteriana (Simões et al., 2016) e, sobretudo, favorece o processo de reparo pulpar (Poggio et al., 2015).

Além disso, o efeito biomodificador da copaíba sobre o tecido dentinário tem sido estudado. Emulsões à base de óleo de copaíba usadas antes da aplicação do adesivo provocaram a inibição de MMPs, contribuindo de forma significativa na estabilidade da camada híbrida, impedindo a hidrólise do colágeno e melhorando a durabilidade da ligação resina- dentina (Bandeira et al., 2016; Bandeira et al., 2020).

O uso oral do CO tem ganhado atenção nos últimos anos devido a sua baixa toxicidade e seus poderes antimicrobiano e anti-inflamatório, constituindo-se numa alternativa interessante para tratamentos em patologias como inflamações crônicas, processos infecciosos, vários tipos de câncer, doenças autoimunes e como veículo para a absorção de outras drogas (Ferro et al., 2018).

Portanto, os resultados indicam que a emulsão de CO oferece resultados promissores como uma alternativa para atenuar a inflamação decorrente da remoção de tecido cariado em preparos cavitários profundos, melhorando a resposta pulpar. Uma limitação dessa análise foi a falta de evidências científicas na literatura sobre o uso clínico de emulsões à base de copaíba, dificultando a comparação com outros estudos.

#### **4 CONCLUSÃO**

O estudo evidenciou que o CO e as suas emulsões conseguiram diminuir os danos causados pelos radicais livres às células humanas durante o processo inflamatório, reduzindo de forma significativa a quantidade de NO produzida pelos macrófagos. Também notou-se que este óleo não apresentou efeito citotóxico, garantindo viabilidade celular em torno de 100% das células humanas, havendo, portanto, a possibilidade de uso terapêutico em cavidades profundas durante o procedimento restaurador, agindo na diminuição da inflamação decorrente de lesões cariosas profundas, constituindo-se numa terapia alternativa promissora em Odontologia.

**REFERÊNCIAS**

- Abrão F., Alves J.A., Andrade G., de Oliveira P.F., Ambrósio S.R., Veneziani R.C.S., Tavares D.C., Bastos J.K., Martins C.H.G., 2018. Antibacterial effect of *copaifera duckei* dwyer oleoresin and its main diterpenes against oral pathogens and their cytotoxic effect. *Front. Microbiol.* 9, 201-231. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00201>.
- Alvarenga M.O.P., Bittencourt L.O., Mendes P.F.S., Ribeiro J.T., Lameira O.A., Monteiro M.C., Barboza C.A.G., Martins M.D., Lima R.R., 2020. Safety and effectiveness of copaiba oleoresin (*C.reticulata* Ducke) on inflammation and tissue repair of oral wounds in rats. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 3568-3581. <https://doi.org/10.3390/ijms21103568www.mdpi.com/journal/ijms>.
- Bandeira M.F.C.L., Oliveira M.R.B., Pizzolitto A.C., Benatti Neto C., Jorge Neto, J., 1999. Estudo farmacológico preliminar de *Copaifera multijuga* (óleo de copaíba). *J. Bras. Clin. Estet. Odont.* 3, 39-41.
- Bandeira M.F.C.L., Lima G.R., Lopes P.P., Toda C., Venancio G.N., Lima G.A., Vasconcellos M.C., Martins L.M., Sampaio F.C., Conde N.C.O., 2016. Dentin cleaning ability of an amazon bioactive: evaluation by scanning electron microscopy. *Open Dent. J.* 10, 182-187. <https://doi.org/10.2174/1874210601610010182>.
- 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. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2020.vol34.0001>.
- Barbosa P.C.S., Wiedemann L.S.M., Medeiros R.S., Sampaio P.T.B., Vieira G., Veiga-Junior V.F., 2013. Phytochemical fingerprints of copaiba oils (*Copaifera multijuga* Hayne) determined by multivariate analysis. *Chem. Biodiv.* 10, 1350-1360. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201200356>.
- Bento A.F., Marcon R., Dutra R.C., Claudino R.F., Cola, M., Leite, D. F., Calixto, J.B., 2011.  $\beta$ -Caryophyllene inhibits dextran sulfate sodium-induced colitis in mice through CB2 receptor activation and PPAR $\gamma$  pathway. *Am. J. Pathol.* 178,1153–1166. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.11.052> 2011.
- Carvalho L.O., Milke L.T., 2014. Importância terapêutica do óleo-resina de copaíba: enfoque para ação antiinflamatória e cicatrizante. *Rev. Eletrônica Farm.* 11, 25-36. <https://doi.org/10.5216/ref.v11i2.27852>.
- Couto R.S.D., Rodrigues M.F.S.D., Ferreira L.S.F., Diniz I.M.A. Silva F.S., Lopez T.C.C., Lima R.R., Marques M.M., 2020. Evaluation of resin-based material containing copaiba oleoresin (*Copaifera Reticulata* Ducke): biological effects on the human dental pulp stem cells. *Biomolecules.*10, 972-984. <https://doi.org/10.3390/biom10070972>.
- 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. *Rev. Bras. Farmacogn.*26, 497-501. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.03.010>.

Destryana R.A., Young D.G., Wooley C.L., Huang T.C., Wu H.Y., Shih, W.L., 2014. Antioxidant and anti-inflammation activities of Ocotea, copaiba and blue cypress essential oils *in vitro* and *in vivo*. J.A.O.B.S. 91, 1531-1542. <https://doi.org/10.1007/s11746-014-2504-4>.

Dong L., Zhang Y., Wang X., Dong Y., Zheng L., Yong-jun L., Jing-man N., 2016. In vivo and in vitro anti-inflammatory effects of ethanol fraction from *Periploca forrestii* Schltr. Chin. J. Integr. Med. 23, 528-534 <https://doi.org/10.1007/s11655-017-2803-3>.

Eriksson, L., Holgerson P.L., Johansson I., 2017. Saliva and tooth biofilm bacterial microbiota in adolescents in a low caries community. Sci. Rep. 7, 5861-5872. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06221-z>.

Ferro M., Masso S., Souza R.R., Moreno M., Moreira E., 2018. Meta-analysis on copaiba oil: its functions in metabolism and its properties as an anti-inflammatory agent. J. Morphol. Sci. 35, 161-166. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1669390>.

França I.S.X., Souza J.A., Baptista R.S., Britto V.R.S., 2008. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. Rev. Bras. Enferm. 61, 201-8. <https://doi.org/10.1590/S0034-71672008000200009>.

Garrido A.D.B., Cara S.P.H.M, Marques M.M., Sponchiado 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, 121-126.

Hasnat M.A., Pervin M., Cha K.M., Kim S.K., Lim B.O., 2015. Anti-inflammatory activity on mice of extract of Ganoderma lucidum grown on rice via modulation of MAPK and NF- $\kappa$ B pathways. Phytochemistry. 114, 125–136. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.10.019>.

Izumi E., Ueda-Nakamura T., Veiga Junior V.F., Pinto A.C., Nakamura C.V., 2012. Terpenes from copaifera demonstrated in vitro antiparasitic and synergic activity. J. Med. Chem. 55, 2994–3001. <https://doi.org/10.1021/jm201451h>.

Kobayashi C., Fontanive T.O., Enzweiler B.G., Bona L.R., Massoni T., Apel M.A., Henriques A.T. Richter M.F., Ardenghi P., Suyenaga E.S., 2011. Pharmacological evaluation of *Copaifera multijuga* oil in rats. Pharm. Biol. 49, 306-313. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.515595>.

Lamoke, F., Mazzone V., Persichini I., Maraschi A., Harris M.B., Venema R.C., Colasanti M., Gliozzi M., Muscoli C., Bartoli M., Mollace V., 2015. Amyloid  $\beta$  peptide-induced inhibition of endothelial nitric oxide production involves oxidative stress-mediated constitutive eNOS/HSP90 interaction and disruption of agonist-mediated Akt activation. J. Neuroinflammation. 12, 84-97. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0304-x>.

Lopes C.M.C, Lima S.M.R.S., Veiga E.C.A., Soares-Jr, J.M., Baracat E.C., 2019. Medicamentos fitoterápicos: realidade ou mito? Rev. Assoc. Med. Bras. 65, 2932-294 . <http://dx.doi.org/10.1590/1806-9282.65.3.292>.

Lucca L.G., de Matos S.P., Kreutz T., Teixeira H.F., Veiga Júnior V.F., de Araújo B.V., Limberger R.P., Koester L.S., 2018. Anti-inflammatory effect from a hydrogel containing nanoemulsified copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne). AAPS Pharm. Sci. Tech. 19, 522–530. <https://doi.org/10.1208/s12249-017-0862-6>.



Lund, D.G., Braghirolli D.I, Adrião Y.B., Apel M.A., Konrath E.L., Pranke P.H.L., 2019. Efeito do óleo de copaíba na adesão de células e viabilidade de células-tronco mesenquimais. *Rev Thema*. 16, 233-241. <http://dx.doi.org/10.15536/thema.16.2019.233-241.1189>.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. 65, 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

Oliveira R.G., Mahon C.P., Ascêncio P.G., Ascêncio S.D., Balogun S. O., de Oliveira Martins D.T., 2014. Evaluation of anti-inflammatory activity of hydroethanolic extract of *Dilodendron bipinnatum* Radlk. *J. Ethnopharmacol.*155, 387 – 395. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.05.041>.

Oloro J, 2018. Effect of pH and API gravity on the water-in-oil emulsion stability. *J. Appl. Sci. Environ. Manage.*22, 925-928. <https://dx.doi.org/10.4314/jasem.v22i6.14>.

Pitts N.B., Zero D.T., Marsh P.D., Ekstrand E., Weintraub J.A., Ramos-Gomez F., Tagami J., Twetman S., Tsakos G., Ismail A., 2017. Dental caries. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 3, 1-16. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.30>.

Poggio C., Lombardini M., Colombo M., Beltrami R., Rindi S., 2015. Solubility and pH of direct pulp capping materials: a comparative study. *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* 13,181–5. <https://doi.org/10.5301/jabfm.5000230>.

Santos R.L., Guimarães G.P., Nobre M.S.C., Portela A.S., 2011. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. *Rev. Bras. Plantas Med.* 13, 486-491. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722011000400014>.

Simões C.A.C.G., Conde N.C.O., Venâncio G.N., Milério P.S.L.L., Bandeira M.F.C.L., Veiga Júnior, V.F., 2016. Antibacterial activity of copaiba oil gel on dental biofilm. *Open Dent. J.* 10, 188–195. <https://doi.org/10.2174/1874210601610010188>.

Souza L.A.L., Melo, K.S., Gomes L.S.S., Souza T.P., Bandeira M.F.C.L., Toda C., Conde N.C.O., 2020. Controle de qualidade de uma formulação de enxaguatório bucal à base de *Libidibia Ferrea L.* *Braz. J. of Develop.* 6, 47236-47246. <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/13254/11145>

Tavares D.C., Furtado R.A., Oliveira P.F., Senedese J.M., Ozelin S.D., Souza L.D.R., Leandro L.F., Oliveira W.L., Silva J.J.M., Oliveira L.C., Rogez H.L.G., Ambrósio S.R., Veneziani R.C.S. Bastos J.K., 2017. Assessment of toxicogenetic activity of oleoresins of five *Copaifera* species for prediction of potential human risks. *J. Clin. Toxicol.* 7, 81. <https://doi.org/10.4172/2161-0495-C1-025>.

Teixeira F.B., Silva R.B., Lameira O.A., Webber L.P., Couto R.S.D., Martins M.D., Lima R.R., 2107. Copaiba oil-resin (*Copaifera reticulata Ducke*) modulates the inflammation in a model of injury to rats' tongues. *BMC Complement. Altern. Med.*17, 313-321. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1820-2>.

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*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 18, 733-38. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000500017>.

Weiga Júnior V.F., Rosas E.C., Carvalho M.V., Henriques M.G.M.O., Pinto A.C., 2007. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne: a comparative study. J. Ethnopharmacol. 112, 248 - 254. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.03.005>.

Yamaguchi M.H., Garcia R.F., 2012. Óleo de copaíba e suas propriedades medicinais: revisão bibliográfica. Saúde e Pesquisa. 5, 137-146.

Wagner K.M., McReynolds C.B., Schmidt W.K., Hammock B.D., 2017. Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for pain, inflammatory and neurodegenerative diseases. Pharmacol. Ther. 180, 62–76. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.06.006>.

#### Financiamento

Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq no Projeto MCT/CNPq/CT-Amazônia n° 406457/2013-1.