

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA
COMITÊ CIENTÍFICO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DA EMULSÃO DE
LIMPEZA CAVITÁRIA À BASE DE ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA**

BOLSISTA: JULIANA PINTO DE SOUZA

**MANAUS
2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA
COMITÊ CIENTÍFICO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

RELATÓRIO FINAL

PIB-S/0111/2014

**CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DA EMULSÃO DE
LIMPEZA CAVITÁRIA À BASE DE ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA**

BOLSISTA: JULIANA PINTO DE SOUZA

ORIENTADORA: MARIA FULGÊNCIA COSTA LIMA BANDEIRA

**MANAUS
2015**

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar *in vitro* a citotoxicidade e as alterações do DNA celular de uma emulsão à base do óleo da copaíba (*Copaifera multijuga Hayne*) com o propósito de ser utilizada como coadjuvante na adesão dentinária. As substâncias testadas foram: Emulsão de Copaíba a 10%; Veículo da Emulsão; Clorexidina 2% e Óleo de copaíba *in natura*. A citotoxicidade das substâncias foi testada frente à linhagem normal de MRC-5 (fibroblasto humano), através do teste de citotoxicidade para avaliação da viabilidade celular com o uso da solução de Alamar Blue™. A avaliação do dano ao DNA foi realizada através do teste do Cometa em pH alcalino. Como controles positivos utilizou-se a Clorexidina 2% e a doxorrubicina. Os valores de viabilidade celular foram: emulsão de copaíba a 10% apresentou 8,22%, o veículo da emulsão apresentou 39,90%, clorexidina 2% apresentou 5,92% e o óleo de copaíba *in natura* apresentou 10,24% de viabilidade celular. No teste do Cometa, as emulsões testadas em 25, 50 e 75 µL/mL não causaram dano significativo no DNA do fibroblasto humano em relação a doxorrubicina e clorexidina 2%, entretanto, a copaíba apresentou índice de dano estatisticamente significativo em relação a doxorrubicina ($p < 0,05$). Pode-se concluir que as preparações que contêm copaíba, apesar de induzirem citotoxicidade, não têm como alvo o DNA das células de fibroblasto humano nas concentrações testadas, o mesmo não ocorrendo para o óleo de copaíba *in natura*, o que nos leva a inferir que as preparações podem estar diminuindo o potencial genotóxico em relação ao óleo de copaíba. E ao teste de hemólise o veículo e a clorexidina não hemolisaram os eritrócitos, entretanto o óleo de copaíba *in natura* e as emulsões testes apresentaram atividade hemolítica causando dano à membrana celular.

Descritores: Medicamentos fitoterápicos, sobrevivência celular, dano ao DNA.

Apoio Financeiro: CNPq (Processo 406457/2013-1)

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 5 |
| 2. OBJETIVOS..... | 6 |
| 2.1. OBJETIVO GERAL | 6 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 6 |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA | 6 |
| 3.1. A COPAÍBA | 6 |
| 3.2. PROPRIEDADES GERAIS DO ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA..... | 7 |
| 3.3. CLOREXIDINA..... | 9 |
| 3.4. TESTES DE CITOTOXICIDADE | 10 |
| 3.5. TESTES DE GENOTOXICIDADE | 12 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 13 |
| 4.1. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE EMULSÕES DO ÓLEO-RESINA DA COPAIFERA MULTIJUGA..... | 13 |
| 4.1.1. TESTE DE HEMÓLISE | 13 |
| 4.1.2. TESTE DE CULTURA..... | 15 |
| 4.2. AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DE EMULSÕES DO ÓLEO-RESINA DA <i>COPAIFERA MULTIJUGA HAYNE</i> | 17 |
| 4.2.1. TESTE DO COMETA EM PH ALCALINO..... | 17 |
| 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 18 |
| 6. DISCUSSÃO E RESULTADOS | 18 |
| 7. CONCLUSÃO..... | 22 |
| REFERÊNCIAS..... | 23 |

1. INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença de caráter crônico, multifatorial, incluindo fatores como higiene, hábitos alimentares, colonização bacteriana, composição da saliva, entre outros, que influenciam no metabolismo das bactérias sobre o substrato, modulando a atividade da doença (KIDD, 2011). Além dos fatores biológicos relatados, os fatores sócio-econômicos e comportamentais interferem diretamente na progressão da doença (FEJERSKOV; KIDD, 2005).

Clinicamente, para que os tratamentos restauradores sejam mais conservadores e menos complexos, o ideal é que durante o preparo cavitário, ocorra apenas a remoção da dentina infectada e amolecida, não passível de remineralização (MOTA; LEITE; TARGINO, 2013).

Estudos têm revelado a presença de remanescentes bacterianos nas paredes de preparos cavitários, mesmo após a remoção total do tecido cariado (DAMO et al, 2010). As bactérias persistentes em cavidades preparadas e aquelas que infiltram pela interface entre material e parede da cavidade podem induzir lesões de cárie recorrentes, danos pulpares e hipersensibilidade (LULA et al., 2009).

Assim, tem sido utilizado soluções antimicrobianas após o preparo da cavidade ou uso de materiais restauradores que possam inibir o crescimento bacteriano (RODE; SANTOS, 1990). Uma solução ideal para limpeza e desinfecção da dentina de um preparo cavitário deveria possuir alguns quesitos, tais como: ser bactericida ou pelo menos bacteriostática, ser biocompatível e não apresentar atividade genotóxica.

O óleo de copaíba, extraído de uma árvore nativa do Brasil, a *Copaifera sp.*, apresenta múltiplas propriedades biológicas comprovadas cientificamente (YAMAGUCHI; GARCIA, 2012), incluindo atividade antimicrobiana frente a bactérias cariogênicas e com vantagens em suas propriedades por ser um produto natural e de menor custo (VASCONCELOS et al., 2008).

Diante de trabalhos apresentados que confirmaram que o óleo de copaíba apresentou atividade antibacteriana frente aos microrganismos da cavidade oral e por ser um fitoterápico com propriedades medicinais e com possível aplicabilidade na odontologia, propõe-se avaliar in vitro a citotoxicidade e as alterações do DNA celular da emulsão à base do óleo de copaíba com o propósito de ser utilizada

como limpeza cavitária e na viabilidade de uso em cavidades profundas e com exposição pulpar.

2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GERAL

Avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade *in vitro* da emulsão de óleo de copaíba (*Copaifera multijuga Hayne*).

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Formular emulsão à base de óleo de copaíba a 10%;
- Verificar a citotoxicidade da emulsão através do teste de cultura de células e teste de hemólise;
- Verificar a genotoxicidade da emulsão através do teste do cometa em pH alcalino.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1.A COPAÍBA

Em uma revisão de literatura, Yamaguchi e Garcia (2012) ressaltaram o uso de plantas medicinais como uma tradição que se sustenta até os dias de hoje, o óleo de copaíba extraído de uma árvore nativa do Brasil, a *Copaifera sp.*, é um exemplo de extrato muito utilizado pela população brasileira, sendo facilmente comercializado. Quimicamente é uma solução de ácidos diterpênicos, em um óleo essencial constituído por sesquiterpenos e de acordo com cada espécie, apresenta variações entre os óleos, distinguindo-se os compostos predominantes nos sesquiterpenos e diterpenos, apresentando múltiplas aplicações de grande interesse medicinal, sendo as etnofarmacológicas as mais comuns: para as vias urinárias, atuando como antiblenorrágico, anti-inflamatório, antisséptico, no tratamento de cistite, incontinência urinária e sífilis; para as vias respiratórias, como antiasmático, expectorante no tratamento de bronquite, faringite, hemoptise, pneumonia e sinusite; para as infecções da derme e mucosa, em dermatites,

eczemas, psoríases e ferimentos; para úlceras e feridas no útero. Ainda é empregado como analgésico, antidiarreico, cicatrizante, afrodisíaco, antioxidante, antitetânico, anti-herpético, bactericida, anticancerígeno, antitumoral, no tratamento de leishmaniose, reumatismo, hemorragias, paralisia, dores de cabeça e picadas de cobra. Portanto, o óleo de copaíba mostra-se como uma alternativa em potencial para os tratamentos de importantes doenças, muitos já comprovados cientificamente. A literatura encontrada sobre o óleo é extensa, porém muitas vezes não é mencionada a identificação botânica da espécie de *Copaifera* utilizada nas pesquisas. Considerando que há diferenças de resultado de acordo com a espécie ou metodologia aplicada, é necessário que sejam realizados estudos para melhor compreensão dos mecanismos de ação do óleo e sua toxicidade.

3.2. PROPRIEDADES GERAIS DO ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA

Leandro et al., (2012) destacaram que apesar dos muitos trabalhos publicados que confirmam várias propriedades do óleo de copaíba, alguns dos dados sobre a composição química e a atividade farmacológica do óleo resina de copaíba permanece contraditória. Muitas das espécies de *Copaifera sp.* foram descritas, mas apenas nove delas têm algum estudo biológico na literatura que avalia o seu uso. Em alguns casos, estes estudos não discriminam entre as espécies *Copaifera sp.* Das várias indicações etnofarmacológicas do óleo resina de copaíba, algumas como anti-inflamatório, a cicatrização de feridas, antimicrobianos, leishmanicida, larvicida, atividades antineoplásicos e antinoceptivas foram confirmados por estudos farmacológicos. Quanto à composição química foram identificados pelo menos 38 tipos de ácidos sesquiterpenos. Destes, 35 foram encontrados em óleo resinas de *C. duckei*, *C. paupera*, *C. piresii*, *C. pubiflora* e *C. Reticulata* no qual esses ácidos são diferentes para cada espécie *Copaifera sp.*, sendo estes associados a diversas atividades biológicas relatadas. Embora muitos trabalhos têm sido publicados sobre a composição química do óleo resina de copaíba, continuam por resolver várias questões, tais como a impressão da composição química das diferentes espécies e a presença de biomarcadores. Estudos indicam muitas atividades etnofarmacológicas que ainda não são totalmente compreendidas. Além disso, as atividades dos compostos isolados não explicam as fortes atividades do óleo resina de copaíba bruto. No entanto, várias substâncias têm sido descritas, e novos estudos biológicos foram publicados que

de alguma forma desvendam o mecanismo de ação dos sesquiterpenos e diterpenos isoladamente. Todos estes temas continuam a exigir uma investigação mais aprofundada do óleo de copaíba que é um recurso em que ainda há muito a ser feito.

Bandeira et al., (1999), descreveram a compatibilidade biológica do óleo essencial e da resina da *Copaifera multijuga*, associados ao hidróxido de cálcio, tendo em vista às propriedades medicinais desse óleo. Então foram testadas pastas experimentais de hidróxido de cálcio associadas ao óleo essencial ou à resina e pasta de hidróxido de cálcio mais polietileno glicol 400 (controle). Na avaliação da biocompatibilidade foram utilizados 60 primeiros molares superiores de 30 ratos, avaliando a reação pulpar das pastas experimentais utilizadas como agente de capeamento nos períodos 7, 15, 30, 45 e 60 dias. Os resultados descreveram que em todos os períodos, a pasta de hidróxido de cálcio mais óleo essencial apresentou melhor desempenho histopatológico, seguida das pastas de hidróxido de cálcio mais polietilenoglicol 400 e hidróxido de cálcio mais resina da *Copaifera multijuga*.

Garcia et al., (2011) avaliaram a biocompatibilidade de duas pastas endodônticas à base de hidróxido de cálcio e de própolis utilizando veículos oleosos constituídos de óleo resina de copaíba e distribuídos em dois grupos experimentais: (G1) óleo resina de copaíba não fracionada; (G2) óleo resina de copaíba de fração volátil. As diferentes frações de óleo de copaíba foram extraídas da *Copaifera ssp.* e o extrato de própolis foi obtido por maceração no qual o sobrenadante foi evaporado e o resíduo foi utilizado para a preparação da pasta. Cada animal recebeu quatro tubos de polietileno representando cada par de tubos um grupo distinto. A face lateral do tubo foi considerada o grupo de controle. Após 7, 21 e 42 dias, os ratos foram sacrificados e os tubos removidos onde o tecido conjuntivo adjacente à extremidade aberta de cada tubo foi segmentado para análise histológica convencional. Os eventos avaliados foram: infiltrado inflamatório, celularidade, vascularização e atividade macrofágica. Para quantificar os eventos, uma classificação de I a IV foi utilizada para diferenciar a reação inflamatória: Grau I –células inflamatórias crônicas (sem inflamação); Grau II - infiltração de células inflamatórias e depósitos de fibras colágenas e fibrose (leve); Grau III - densa infiltração de células inflamatórias, edema de tecido e congestão vascular (moderada); Grau IV - infiltração densa de células inflamatórias agudas e

crônicas, áreas edematosas e congestão vascular com depósitos de fibrina (grave). Uma vez que os vários componentes dos eventos foram quantificados, os valores obtidos foram submetidos a uma análise estatística. A reação inflamatória foi moderada em sete dias para (G1) e grave para (G2). Aos 21 dias, foi leve e moderada para (G1) e (G2), respectivamente; e aos 42 dias, era leve para (G1) e (G2). A reação tecidual variou de leve (7/21 dias) a ausência de inflamação (42 dias) para o grupo controle. A análise estatística não demonstrou nenhuma diferença significativa entre as pastas e o grupo controle ($p > 0,01$). Os autores concluíram que embora o tecido subcutâneo de ratos não reproduza fielmente às condições de celulose e os tecidos periapicais, ambas as pastas testadas foram biocompatíveis para o tecido subcutâneo de ratos.

Morgan et al., (2009) realizaram um estudo que teve por objetivo avaliar a eficácia antimicrobiana dos óleos de copaíba e de girassol ozonizados sobre o *S. mutans* em amostras de dentes bovinos. Quarenta blocos de esmalte/dentina de incisivos foram preparados e imersos em tubos de ensaio contendo caldo BHI contaminado. Em seguida foram aleatoriamente divididos em quatro grupos de acordo com as terapias antimicrobianas a serem avaliadas: G1- óleo de copaíba ozonizado (1000 ppm); G2- óleo de girassol ozonizado (1000 ppm); G3- solução de hipoclorito a 5% (controle positivo); e G4- água destilada estéril (controle negativo). O G-2 (óleo de girassol ozonizado) mostrou capacidade de eliminação total no número de microrganismos viáveis (100%) e o G-1 (óleo de copaíba ozonizado) reduziu em 99,3%, (G4) o número de colônias foi considerado incontável. No G-3 (hipoclorito de sódio a 5%, controle negativo), não houve crescimento bacteriano. Estes resultados indicam que os óleos de copaíba e de girassol ozonizados foram efetivos na redução do *S. mutans* nas condições utilizadas no experimento, sugerindo uma possível aplicação destes materiais no tratamento clínico de lesões de cárie.

3.3.CLOREXIDINA

Franco et al., (2007) objetivou realizar uma revisão de literatura abordando o uso da clorexidina como agente desinfetante de cavidades e sua influência na união resina/dentina. A análise de alguns trabalhos permitiu concluir que é importante realizar a limpeza cavitária com clorexidina, pois sua ação desinfetante protege a estrutura dentária de sensibilidade pós operatória e de cáries

recorrentes. Sendo considerado um agente antimicrobiano de amplo espectro que atua sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas aeróbicos e anaeróbicos, fungos e leveduras. Possuindo estabilidade, sendo segura e efetiva. Suas propriedades catiônicas favorecem a adsorção seletiva pela hidroxiapatita do esmalte dos dentes. Além disso, observou-se que os agentes de limpeza em geral não influenciam no processo de adesão.

3.4. TESTES DE CITOTOXICIDADE

Costa-Lotufo et al., (2008) analisando o diterpeno ácido caurenóico, presente no óleo de copaíba, verificaram que ele apresenta potencial citotóxico, reprime o desenvolvimento embrionário de ouriços do mar, inibe o crescimento tumoral e a hemólise em ratos. Já em eritrócitos humanos reflete uma natureza não específica de citotoxicidade.

Masson-Meyers et al., (2013) avaliaram a citotoxicidade *in vitro* do óleo-resina *Copaifera langsdorffii* em fibroblastos (3T3) e seu efeito sobre a cicatrização de feridas em orelha de coelho, através da viabilidade celular por meio de ensaios *in vitro* de cultura de células em 3T3 e proliferação celular pelo método H3-Timidina. Os fibroblastos 3T3 foram cultivados por 3 dias a 37°C em uma incubadora com 5% de CO₂ em meio Iscove suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS), 100µ/mL penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Em seguida foram tripsinizadas, centrifugadas e o “*pellet*” foi suspenso em meio Iscove. A cultura de células e tripsinização foram repetidas e antes dos ensaios foram contadas na câmara de Neubauer. Para obter concentração final de 10mg/mL, foram adicionados 900µL de meio Iscove após a solubilização de 10mg de óleo-resina de copaíba em 100µL de dimetilo sulfóxido (DMSO). A solução-mãe foi diluída em diferentes concentrações, variando de 1µg/mL a 1000µg/mL. Na proliferação celular, os 3T3 foram cultivados e na presença de diferentes concentrações de óleo-resina de copaíba o seu efeito foi avaliado pela radioatividade incorporada pelas células, medida por um contador de cintilação. Os estudos *in vivo* foram realizados em dez coelhos e induzidas feridas em suas orelhas que foram tratadas topicamente durante 21 dias com as respectivas soluções testes: solução salina (S), creme padrão de base farmacêutica como controle (Cr) e creme à base de óleo-resina de copaíba a 10% (C10) e a 25% (C25). Quanto à taxa de cicatrização, foram avaliados nos dias 2, 7, 14 e 21 e os

estudos histológicos realizados no mesmo período, após o ferimento. O tratamento com até 100µg/mL de copaíba apresentaram viabilidade e proliferação maiores que 80% em relação ao controle, diminuindo significativamente a 500 e 1000 µg/mL. As feridas foram re-epitelizadas no 21º dia, tratadas com C10 e C25 mostrando evidência de inflamação sustentada no dia 7 e melhores resultados, confirmado na histologia com evidência de atividade fibroblástica no 7º dia e organização de fibras colágenas observadas a partir do 14º dia. Esses achados sugeriram que o óleo-resina de *Copaifera langsdorffii* não apresenta citotoxicidade a 100 µg/mL e em doses adequadas contribui para a cicatrização de feridas.

Com o objetivo de avaliar o efeito citotóxico de um novo cimento endodôntico à base de óleo de copaíba, Garrido et al., (2015) realizaram um estudo experimental utilizando células semelhantes a osteoblastos (Osteo-1) que foram cultivadas a 37 °C, com 10% de soro bovino fetal e 1% de solução antibiótica e antimicótica. Os cinco grupos foram delineados, de acordo com cimento associado ao meio de cultura em: Grupo Controle (GC): meio de cultura sem cimento; S26: meio de cultura + Sealer 26 (Dentsply, EUA); EF: meio de cultura + Endofill (Dentsply, EUA); AHP: meio de cultura + AH Plus (Dentsply, EUA) e BS - meio de cultura + cimento experimental à base de óleo de copaíba. Os tubos de ensaios contendo as suspensões foram identificados de acordo com o grupo e incubados a 37°C por 24 horas em anaerobiose. Em seguida, as suspensões de Osteo-1 foram semeadas em placas de Petri e após três dias da formação das placas, quando as culturas tornaram-se confluentes, o meio de cultura foi substituído pelo meio fresco do GC e induzidos por meio dos cimentos testados. Após incubação em anaerobiose a 37°C por mais 24 horas, as células foram coradas utilizando azul de Tripán. Posteriormente procederam a contagem por hemocítômetro para avaliar a viabilidade celular. A distribuição normal dos dados foi submetida ao teste de Kolmogorov-Smirnov e os valores obtidos foram analisados estatisticamente ($p < 0,05$). Os grupos S26, EF e AHP apresentaram uma considerável diminuição estatisticamente significativa na viabilidade celular em comparação com CG. Já o grupo BS manteve sua viabilidade celular semelhante ao GC. Os autores evidenciaram que o cimento endodôntico à base de óleo de copaíba apresentou uma favorável biocompatibilidade na indicação como um cimento endodôntico em comparação aos outros testados.

3.5. TESTES DE GENOTOXICIDADE

Cavalcanti et al., (2005) avaliou o potencial genotóxico contra fibroblastos (V79), às células *in vitro*, usando ensaios do teste do cometa e ensaios de micronúcleos. O ácido caurenóico foi testado nas seguintes concentrações de 2,5, 5, 10, 30 e 60 µg/mL. O controle positivo foi o metilmetanosulfonato (MMS). A duração do tratamento de células V79 com os determinados agentes foi de 3h. Os resultados demonstraram que ao contrário do MMS, o ácido caurenóico nas concentrações (2,5, 5, e 10 µg/ml) não induziram danos no DNA à célula, significativamente elevado. Entretanto, a exposição de células V79 à altas concentrações de ácido caurenóico (30 e 60 µg/mL), já se observaram aumentos significativos no índice de danos. Os dados obtidos oferecem suporte à visão de que o ácido caurenóico diterpeno induz genotoxicidade em concentrações elevadas.

Com objetivo de avaliar o potencial citotóxico e genotóxico do óleo de copaíba e suas respectivas frações voláteis e resinosas, Almeida et al., (2012) realizaram um estudo experimental em células do fígado, sangue e medula óssea de camundongos suíços por meio de ensaio cometa e teste de micronúcleos (MN). Os animais foram divididos em 11 grupos de seis animais por tratamento no qual receberam as doses de óleo de copaíba e as frações voláteis e resinosas comerciais de óleo-resina de copaíba de 500, 1000 e 2000 mg/kg de peso corporal, sendo administrados em dose única por sonda esofágica. O controle negativo foi a água, o controle de solvente, o monolaurato de polioxietilenossorbitano - Tween® 20 e os controles positivos foram 16 mg/kg de DXR (doxorubicina) para os testes de micronúcleos e 50 mg/kg de MMS (metilmetanosulfonato) para os ensaios cometa. Após 24h do tratamento, os camundongos foram anestesiados, o sangue periférico foi recolhido para realizar os testes MN, sendo imediatamente após, sacrificados e seus fêmures e fígado foram dissecados. Quanto ao teste MN, foram utilizados tanto a medula óssea dos fêmures quanto o sangue periférico para análise de eritrócitos policromáticos (PCES, eritrócitos imaturos), micronucleados (MNPCE) e eritrócitos normocromáticos (NCE) de modo a avaliar o efeito citotóxico de qualquer dos tratamentos. Já o ensaio cometa foi realizado em pH alcalino em célula única da amostra do fígado, onde foram avaliados apenas 50 cometas (nucleóides) por lâmina, sendo classificados de acordo com a porcentagem de

DNA na cauda, indicando o grau de quebra do DNA. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n = 6 / grupo). De acordo com o ensaio cometa, o tratamento com óleo de copaíba e suas respectivas frações voláteis e resinosas não aumentou os danos ao DNA e quanto ao teste de MN, não houve alteração na incidência de eritrócitos policromáticos e micronucleados. Além disso, não houve diferença significativa entre os solventes e o controle negativo. Assim, pode-se assumir que a resina de óleo e as frações voláteis e resinosas a partir do produto comercial não são genotóxicas ou mutagênicas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi submetido no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas, com o número CAAE 35573914.0.0000.5020.

A emulsão de limpeza de cavidade a base do óleo-resina da *Copaifera multijuga* Hayne foi formulada obedecendo às orientações do Formulário Nacional da Farmacopéia Brasileira (2010) na concentração 10%.

4.1. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE EMULSÕES DO ÓLEO-RESINA DA COPAIFERA MULTIJUGA

4.1.1. TESTE DE HEMÓLISE

Na citotoxicidade da emulsão da *Copaifera multijuga* foram determinadas segundo Costa-Lotufo et al., (2002) que permite avaliar o potencial das substâncias-teste em causar lesões na membrana plasmática da célula, seja pela formação de poros ou pela ruptura total. O sangue foi coletado de um camundongo Swiss (*Mus musculus*) por via do plexo orbital (altamente vascularizado), sendo diluído em 30 volumes de solução salina (Fig. 01).

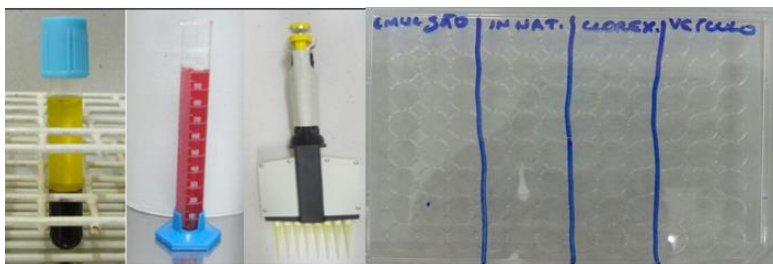


Fig. 01 – Material utilizado para realização do teste de hemólise

Os eritrócitos foram lavados duas vezes em solução salina por centrifugação (1500rpm/ 3min) para redução da contaminação plasmática e ressuspensos em solução salina para obtenção de uma suspensão de eritrócitos (SE) a 2%. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços. Cada poço da 1ª coluna recebeu 100µL da solução salina. Na 2ª, os poços receberam 50µL da solução salina e 50µL do veículo de diluição da substância teste, neste caso, DMSO 10%. Aos poços da 3ª coluna, foram adicionados 100 µL de solução salina e 100 µL das substâncias teste em solução. Da 4ª coluna em diante os poços receberam 100 µL da solução salina, excetuando-se os da última coluna, que receberam 80µL de solução salina e 20 µL de Triton X – 100 1% (controle positivo). As diluições foram feitas dos poços da 3ª à 11ª coluna, retirando-se 100 µL da solução da cavidade anterior e transferindo para a seguinte de modo que as concentrações foram sempre diluídas pela metade, variando de 15,6 a 2000 µg/mL.

Em seguida, 100 µL da SE 2% foram plaqueados em todos os poços. Após incubação de 1h, sob agitação constante à temperatura ambiente ($26 \pm 2^\circ\text{C}$), as amostras foram centrifugadas (3000rpm/ 10min.) e o sobrenadante transferido para outra placa para a leitura da absorbância no espectrofotômetro de placas a 540nm. As substâncias testes utilizadas foram: Emulsão de Copaíba a 100%; Veículo da emulsão; Clorexidina 2%; Óleo de Copaíba *in natura* e DMSO. (Fig. 2)

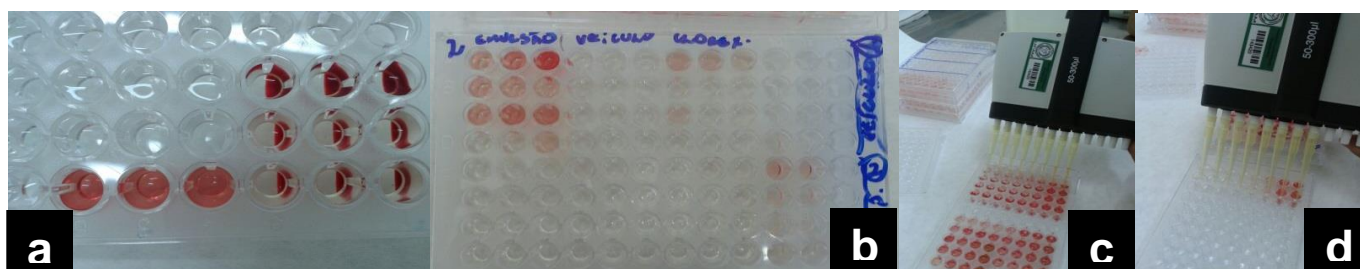


Fig. 2. a) Controle positivo a esquerda- sobrenadante em vermelho; b) Placa após a centrifugação; c) Retirada do sobrenadante; d) Transferência do sobrenadante para leitura no espectrofotômetro.

4.1.2. TESTE DE CULTURA

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

As células foram cultivadas em garrafa de cultura com meio DMEM completo. Elas foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas em placas de 96 poços, cada poço contendo 1×10^4 células em 200 µL de meio de cultura. (Fig. 03).

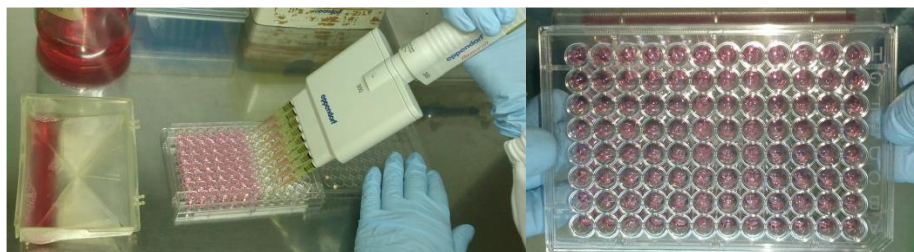


Fig. 03 - Plaqueamento das células em 96 poços.

A placa foi então incubada em estufa por 24 h a 37°C, período necessário para que ocorra a adesão das células na placa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. As células foram tratadas, por 72 horas. (Fig. 04).



Fig. 04 – Tratamento das células com as substâncias testes;

A Doxorrubicina foi usada como controle positivo. O grupo controle recebeu no poço a mesma quantidade de DMSO das substâncias testes. Passadas 24 h de tratamento, 10 µL da solução de uso de Alamar Blue (solução estoque 0,4 % 1:5

em meio de cultura sem soro fetal bovino) foi adicionada em cada poço da placa. (Fig. 05).

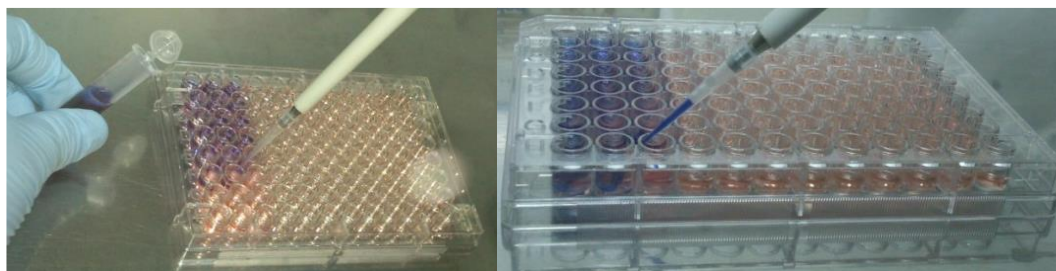


Fig. 05 – Aplicação de 10 μ L da solução de uso de Alamar Blue em cada poço.

Após 3h de exposição ao Alamar Blue, retirando da estufa meia hora antes do término, a fluorescência foi medida usando-se um leitor de placas de Elisa (marca Beckman e Coulter). (Fig. 06)

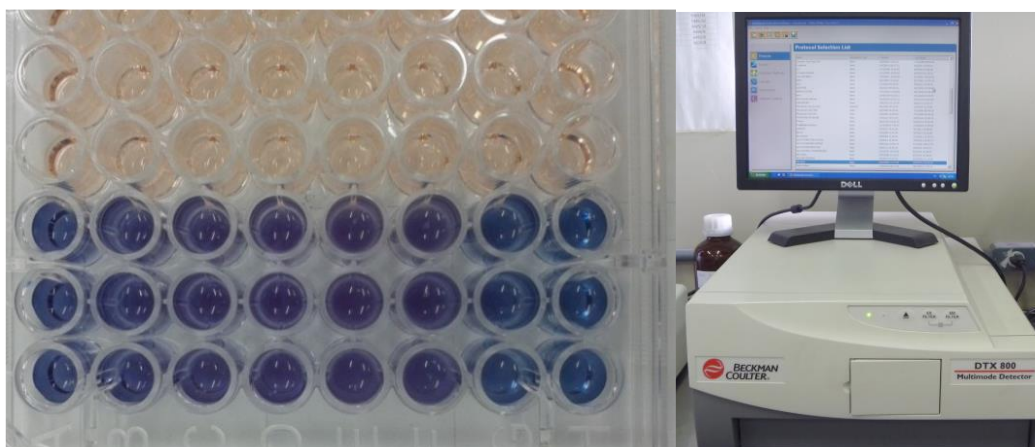


Fig. 06 - Microplacas com os sobrenadantes, já podendo observar os produtos que obtiveram hemólise pela coloração; Espectrofotômetro para a leitura das microplacas.

Os dados foram analisados em relação ao controle negativo. As substâncias testes utilizadas foram: Emulsão de Copaíba a 10%; Emulsão de Copaíba a 10% básica; Adjuvantes farmacotécnicos da Emulsão; Água de hidróxido de cálcio a 10%; Clorexidina 2% e Óleo de Copaíba.

O teste foi realizado em triplicata e concentração única testada das substâncias testes, devido o produto já ser a formulação a ser usada como agente de limpeza, foi de 50 μ L/mL.

4.2.AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DE EMULSÕES DO ÓLEO-RESINA DA *COPAIFERA MULTIJUGA HAYNE*

4.2.1. TESTE DO COMETA EM PH ALCALINO

O ensaio do teste do cometa de célula única em pH alcalino foi feito conforme metodologia descrita por Singh (1988) modificada. As células MRC5 (fibroblato humano) foram contadas em câmara de Neubauer e 5×10^5 células foram colocadas em cada poço de uma placa de 24 poços com 2 mL de meio DMEN completo. A placa foi incubada em atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C por 24 h. Após esse período, as células foram tratadas com as substâncias teste, veículo e doxorubicina durante 3h. Em seguida, foram produzidas lâminas de microscopia pré-cobertas com agarose. Após a solidificação, as lâminas ficaram em uma solução de lise por 1 h, para que ocorra a desnaturação da parede celular e nuclear, restando o DNA ocupando o espaço que antes seria o núcleo da célula. As lâminas foram removidas da solução de lise e dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese a qual será preenchida com solução de eletroforese por 20 minutos para permitir o desempacotamento do DNA. A eletroforese foi conduzida na ausência de luz por 15 min, a 20 V e com corrente de 300 mA. Após eletroforese, as lâminas foram retiradas e submetidas a lavagem de 5 min com solução de neutralização para retirar a alcalinidade das lâminas. Em seguida, elas foram fixadas em etanol P.A. Posteriormente, 40µL da solução de Cyber Green 1:10.000 foram aplicadas sobre as lâminas cobrindo-as com lamínula, sendo analisadas em microscópio de fluorescência usando o filtro azul.

Foram contados 50 cometas por lâmina, sendo classificados de acordo com a porcentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de quebra do DNA. A análise dos cometas foi realizada de acordo com o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda.

Os parâmetros para a classificação de acordo com o grau de dano ao DNA na contagem dos cometas foram: Grau 0 – sem dano, sem a cauda; Grau 1 – cauda menor que o diâmetro da cabeça (nucleóide); Grau 2 – comprimento da cauda 1-2x o diâmetro da cabeça (nucleóide); Grau 3 – cauda maior que 2x o diâmetro da cabeça (nucleóide); Grau 4 – desintegrado, sem cabeça (nucleóide) definido. (Fig 07).

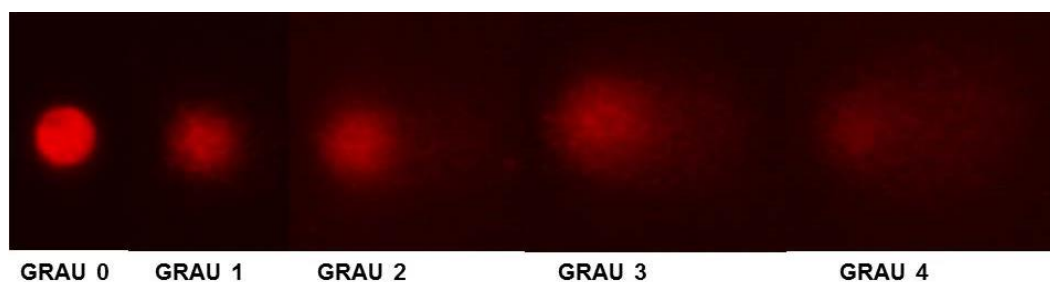


Fig 07 - Classificação de acordo com o grau de dano ao DNA na contagem dos cometas

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de hemólise foi demonstrado pela média percentual com desvio padrão, e uma regressão linear sigmoidal, para o cálculo da EC50.

O teste de cultura de células e alteração do DNA foram avaliados através da análise de variância 1 way com pós teste de comparação múltipla de Dunnett, valores de (*) $p < 0,05$ $n=3$.

6. DISCUSSÃO E RESULTADOS

Substâncias antimicrobianas são importantes para agentes de limpeza cavitária após a remoção da cárie, mas além desta propriedade a substância deve ser biocompatível com o tecido pulpar. A biocompatibilidade equivale à ausência de interação entre um material e os tecidos, sendo a capacidade de atuação do material com uma resposta apropriada do hospedeiro, em uma aplicação específica (WATAHA, 2001).

A toxicidade das substâncias sobre os tecidos tem sido constatada por meio de estudos *in vitro* nos testes de toxicidade geral como cultura de células e hemólise e em estudos *in vivo* em animais, ensaios e observações clínicas.

O teste de cultura de Alamar Blue visa avaliar a citotoxicidade e mensurar a proliferação de diferentes tipos celulares. O teste é baseado na detecção de atividades metabólicas pelo corante Alamar Blue que é um indicador de oxidação-redução. O metabolismo celular induz a uma redução química do meio de Alamar Blue, ou seja, este ensaio se baseia sobre a conversão quantitativa metabólica da

cor azul, resazurina e não fluorescente, para resorufina que tem cor rosa e é fluorescente, o que indica a presença de células viáveis. Assim o teste exige membranas mitocondriais intactas, para que o transporte de elétrons reduza o corante para uma forma mais fluorescente (SCHIRMER et al, 1998).

Os resultados da citotoxicidade das substâncias testes estão expressos na Tabela 1 e Gráfico 1.

| <i>Substâncias Testes</i> | <i>Viabilidade Celular</i> |
|--|----------------------------|
| Emulsão de Copaíba a 10% | 8,22% |
| Emulsão de Copaíba a 10% Básica | 8,46% |
| Adjuvantes farmacotécnicos da Emulsão | 39,90% |
| Adjuvantes farmacotécnicos da Emulsão Básica | 52,83% |
| Água de hidróxido de cálcio a 10% | 80,38% |
| Clorexidina 2% | 5,92% |
| Óleo de Copaíba <i>in natura</i> | 10,24% |
| Controle | 99,99% |

Tabela 1- Valores da viabilidade celular calculada a partir de resultados do controle negativo e expresso em porcentagem.

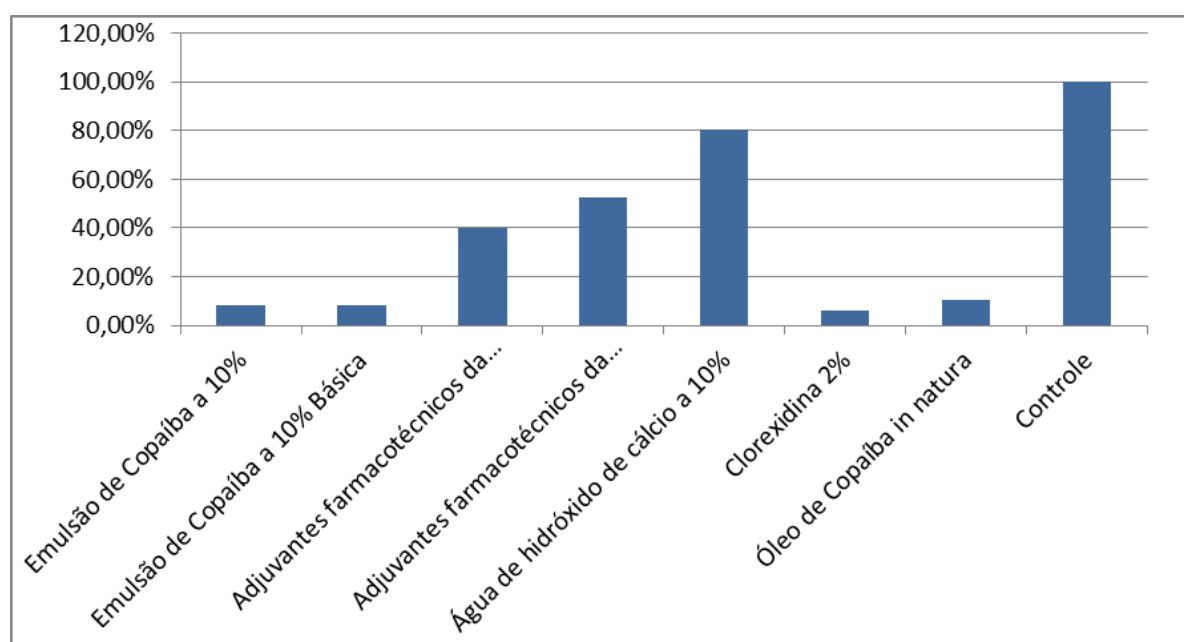


Gráfico 1 - Viabilidade celular das substâncias teste através do teste de cultura de células.

A Tabela 1 e o Gráfico 1 demonstraram que as emulsões testes de óleo de copaíba, clorexidina a 2% apresentaram baixa viabilidade celular comparado com o grupo controle (DMSO). Segundo Vasconcellos et al., (2005) a cultura de células é

uma importante ferramenta para estudo da citotoxicidade de compostos com potencial terapêutico, pois define, o processo de degeneração ou morte celular provocado por material a ser utilizado no tecido dental. Assim, resultados positivos no ensaio de citotoxicidade descaracterizam a condição de inocuidade, sendo possível causar processos de irritabilidade nos usuários (CHORILLI et al., 2005). Entretanto, observou-se que as emulsões testes apresentaram maior viabilidade celular em relação a clorexidina a 2% e a água de hidróxido de cálcio não foi citotóxica, fato que justifica seu uso em exposição pulpar (MOTA; LEITE; TARGINO, 2012). Entretanto, Masson-Meyers et al. (2013) demonstraram a citotoxicidade em cultura de células utilizando óleo de copaíba da espécie (*Copaifera langsdorffii*) em fibroblastos (3T3) e seu efeito sobre a cicatrização de feridas em orelha de coelho, através da viabilidade celular, relatando que o tratamento com até 100µg/mL de copaíba apresentaram viabilidade e proliferação maiores que 80% em relação ao controle, diminuindo significativamente a 500 e 1000 µg/mL, sugerindo que o óleo-resina de *Copaifera langsdorffii* não apresenta citotoxicidade a 100 µg/mL e em doses adequadas contribui para a cicatrização de feridas relatando que a concentração é dose dependente para a toxicidade.

| Grau de Hemólise | | | |
|------------------|---------------|---------|-------------|
| Óleo | Emulsão | Veículo | Clorexidina |
| 57,74 | 266,4 | <1000 | <1000 |
| 41,65 – 80,03 | 212,3 – 334,2 | | |

Tabela 2 - Valores de EC50 e intervalo de 95% de confiança do teste de hemólise.

A Tabela 2 revela que o veículo e o clorexidina não hemolisaram os eritrócitos, entretanto o óleo de copaíba *in natura* e as emulsões testes apresentaram atividade hemolítica causando dano à membrana. A avaliação da estabilidade mecânica da membrana eritrocitária é um bom indicador de danos provocados por vários compostos como triagem de citotoxicidade (Sharma, 2001). Os resultados de Vargas et al., (2015) corroboraram com este estudo após isolarem e detectarem ácidos diterpênicos do óleo de *Copaifera spp.* e avaliarem *in vitro* a hemólise em células normais e tumorais em um modelo de macrófagos J774, evidenciando que dos diterpenos testados, apenas os ácidos caurenóico e copálico apresentaram atividades hemolíticas significativas com 61,7% e 38,4% em

100 μM , respectivamente e neste ensaio, os diterpenos não inibiram a produção de fator de necrose tumoral.

Estes e outros resultados encontrados por este grupo de pesquisa (Fitoterapia) e por outros achados científicos reforçam a hipótese de que o óleo de copaíba possa ser utilizada de modo terapêutico para aplicação tópica, fortalecendo, assim, a proposta como coadjuvante na odontologia.

O teste de genotoxicidade demonstrou que somente a clorexidina a 2% e a doxorrubicina (controle positivo) foram estatisticamente genotóxicas, ou seja, apresentaram dano ao DNA celular (Gráfico 2).

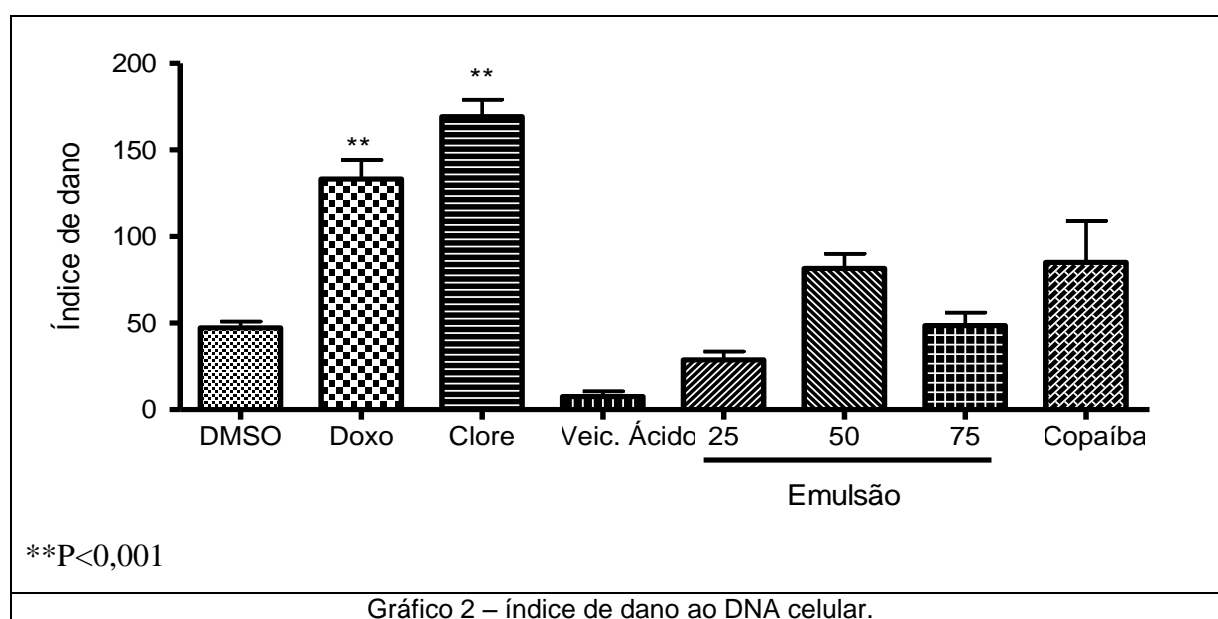


Gráfico 2 – índice de dano ao DNA celular.

Colaborando com estes resultados CAVALCANTI et al., (2005), avaliou o potencial genotóxico contra fibroblastos (V79) usando o teste do cometa, os resultados demonstraram que o ácido caurenóico nas concentrações (2,5; 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) não induziram significativamente danos no DNA da célula, entretanto, a exposição a altas concentrações de ácido caurenóico (30 e 60 $\mu\text{g/mL}$) foram observadas aumentos significativos no índice de danos no DNA celular.

Na mesma linha de resultado Almeida et al. (2012) ao realizar o mesmo ensaio em células do fígado, sangue e medula óssea de camundongos suíços utilizando óleo de copaíba observaram que não houve aumento do dano ao DNA, assumindo que a resina de óleo de copaíba a partir do produto comercial não são genotóxicas ou mutagênicas.

7. CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada, pode-se concluir que a emulsão à base de óleo de copaíba a 10% demonstrou resultados promissores para a utilização na odontologia no que diz respeito às avaliações de citotoxicidade, evidenciando maior viabilidade celular da emulsão em relação a clorexidina a 2%. Entretanto as emulsões testes já apresentaram atividade hemolítica causando dano à membrana. E ao ensaio do cometa a emulsão teste não apresentou dano ao DNS celular.

Portanto diante de trabalhos apresentados que confirmam que o óleo-resina da copaíba apresenta diversas propriedades, a inclusão de emulsões à base de copaíba para fins de limpeza de cavidades parece promissor.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, Maria Ribeiro. et al. Genotoxicity assessment of Copaiba oil and its fractions in swiss mice. **Genet Mol Biol**, v. 35, n. 3, p. 664-72, 2012.

AHMED S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E., A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to, [3H]thymidine incorporation assay. *Journal of immunological methods*, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.

BANDEIRA, M.F.C.L. et al. 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. *Jornal Brasileiro de Clínica Estética Em Odontologia*, v. 3, n. 16, p. 42-49, 1999.

Chorilli, M.; Tamascia, P.; Rossim, C.; Salgado, H. R. N.; *J. Basic Applied Pharm. Sci.* **2009**, 30, 19

CAVALCANTI, B. C., et al., Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. Oil, Elsevier Ltd. All rights reserved. doi:10.1016/j.fct.2005.

COSTA-LOTUFO, L.V. et al. The Cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffi* oleo-resin. *Toxicon*, 40: 1231-1234, 2002.

DAMO, Alessandra Cristina. et al. **Análise em microscopia confocal da viabilidade bacteriana após a remoção total de tecido cariado**. 2010. 16 f. Monografia apresentada como pré-requisito para conclusão do curso de Graduação em Odontologia, Faculdade de odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010

FEJERSKOV, O; KIDD, E., Cárie dentária - A doença e seu tratamento clínico, São Paulo: Santos, 2005.

FRANCO, A.P.G.O. et al. Desinfecção de cavidades com clorexidina. *Publicatio UEPG Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 13, n. 1-2, p. 53-58, 2007.

GARCIA, Lucas. et al. Biocompatibility assessment of pastes containing Copaiba oilresin, propolis, and calcium hydroxide in the subcutaneous tissue of rats. **J Conserv Dent**, v. 14, n. 2, p. 108–12, 2011.

GARRIDO, Angela Delfina. et al. Cytotoxicity evaluation of a copaiba oil-based root canal sealer compared to three commonly used sealers in endodontics. **Den Res J**, v. 12, n. 2, p. 121-6. 2015.

KIDD, Edwina. The implications of the new paradigm of dental caries. **J Dent**, v. 39 suppl. 2. 2011.

LEANDRO, Lidiam Maia. et al. Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from Copaíba (*Copaifera spp.*) Oleoresins. **Molecules**, v. 17, p. 3866-89, 2012.

LULA, E.C. et al. Microbiological analysis after complete or partial removal of carious dentin in primary teeth: a randomized clinical trial. *Caries Res*, v. 43; n. 5; p. 354-8. 2009.

MASSON-MEYERS, Daniela. et al. Cytotoxicity and wound healing properties of *Copaifera langsdorffii* oleoresin in rabbits. **International Journal of Natural Product Science**, v. 3, n. 3, p.10-20, 2013.

MORGAN, L.F.S.A. et al. Eficácia antimicrobiana de óleos de copaíba e girassol ozonizados sobre *S. mutans* – estudo in vitro. In: ENCONTRO GBPD, 18., Foz do Iguaçu, 2009

MOTA, Luciane de Queiroz; LEITE, Jayanne Michelly de Sousa; TARGINO, Andréa Gadelha Ribeiro. Dentística minimamente Invasiva Através da Remoção Parcial de Dentina Cariada em Cavidades Profundas. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*, v. 15; n.2, p. 145-52. 2013.

RODE, S.M; SANTOS, J.F.F. Limpeza cavitária - Remoção da camada de "smear". *Revista Brasileira de Odontologia*, v. 47, n. 5, p. 46-51, 1990.

SCHIRMER et al., Ability of 16 priority PAHs to be photocytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill. **Toxicology**, n.127; p. 143–55, 1998.

SHARMA, P.; SHARMA J. D.; **J. Ethnopharmacol.** 2001, 74, 239.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, v.175: 184-191, 1988.

VARGAS, Fabiano de S. et al. Biological Activities and Cytotoxicity of diterpenes from *Copaifera spp.* Oleoresins. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6194-210, 2015.

VASCONCELLOS, M. C.; MONTENEGRO, R. C.; Militão, G. C.; FONSECA, A. M.; Pessoa, O. D.; Lemos, T. L.; Pessoa, C.; Moraes, M. O.; Costa-Lotufo, L. V.; *Z. Naturf.* 2005, 60, 394.

VASCONCELOS, K. et al., Avaliação in vitro da atividade antibacteriana de um cimento odontológico à base de óleo-resina de Copaifera multijuga Hayne. Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy 18 (Supl.): 733-738, 2008.

YAMAGUCHI, M. H.; GARCIA, R. F., Óleo de copaíba e suas propriedades medicinais: Revisão bibliográfica; Revista Saúde e Pesquisa, v. 5, n. 1, p. 137-146, - ISSN 1983-1870, 2012.

WATAHA, JC; LOOCKWOOD, PE; NELSON SK, Initial versus subsequent release of elements from dental casting alloys. **J Oral Rehabil**, v. 26; n. 10; p. 798-803.2001.