

Atividade antimicrobiana do óleo de *copaifera officinalis* sobre bactérias do biofilme oral

Antimicrobial activity of copaifera officinalis oil on oral biofilm bacteria

Camila Lima de Oliveira¹, Letícia Targino Campos¹, Hemilliany Alencar Duarte¹, Louise Morais Dornelas Bezerra², Lorenna Mendes Temóteo Brandt³, Andreia Medeiros Rodrigues Cardoso^{3*}, Ricardo Dias de Castro⁴, Alessandro Leite Cavalcanti⁵

¹ Acadêmica de Odontologia. UEPB. ² Mestranda em Clínica Odontológica. UNICAMP ³ Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Odontologia. UEPB; ⁴ Mestre em Odontologia Preventiva e Social. UFRGN. Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. UEPB. Professor do Departamento de Fonoaudiologia. UFPB. ⁵ Mestre em Odontologia. USP. Doutor em Odontologia. UFPB. Pós Doutorado em Odontopediatria. UFMG. Professor do Departamento de Odontologia. UEPB

Resumo

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas como alternativa no tratamento de várias doenças, o óleo da *Copaifera officinalis* é indicado para diversos fins farmacológicos, sendo sua ação antimicrobiana o alvo do presente estudo. **Objetivo:** Analisar a atividade inibitória e bactericida do óleo frente aos *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). **Metodologia:** A atividade antimicrobiana do óleo sobre os microrganismos foi realizada a partir da técnica de microdiluição em caldo, por meio da execução das seguintes etapas: preparação do inóculo, das substâncias (óleo da *Copaifera officinalis*, digluconato de clorexidina e tween 80), determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) e da CBM (Concentração Bactericida Mínima). Para determinação da CIM (considerada a menor concentração do óleo capaz de inibir o crescimento bacteriano), foram utilizadas placas de 96 poços e inseriu-se 100µL de caldo, 100µL da diluição dos óleos essenciais no primeiro poço e 10µL da suspensão bacteriana (1,5x10⁶ microrganismos/ mL). A CBM foi considerada a menor concentração do óleo capaz de matar as bactérias. **Resultados:** A CIM do óleo da *Copaifera officinalis* diante do *S. mutans* foi 30.000 µg/mL, não apresentando sobre esse microrganismo ação bactericida, verificada através da CBM. A CIM e a CBM do *S. aureus* foram 15.000 µg/mL. **Conclusão:** O óleo da *Copaifera officinalis* demonstrou atividade bacteriostática sobre o *S. mutans* e *S. aureus*.

Palavras-chave: Cárie dentária. Medicamentos Fitoterápicos. *Streptococcus mutans*. *Staphylococcus aureus*.

Abstract

Medicinal plants have been used as alternative for the treatment of various diseases, and *Copaifera officinalis* oil has been indicated for various pharmacological purposes, which antimicrobial action is the target of the present study. **Objective:** To evaluate the inhibitory and bactericidal activity of *Copaifera officinalis* oil on *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). **Methodology:** The antimicrobial activity of this oil on microorganisms was evaluated from the technique of microdilution in broth through the following steps: preparation of inoculums and substances (*Copaifera officinalis* oil, chlorhexidine gluconate and tween 80), determination of MIC (Minimum Inhibitory Concentration) and MBC (Minimal Bactericidal Concentration). To determine MIC (the lowest oil concentration able to inhibit bacterial growth), 96-well plates were used and added of 100µL of broth, 100µL of essential oil dilution in the first well and 10µL of bacterial suspension (1.5x10⁶ microorganisms / mL). MBC was regarded as the lowest oil concentration able to kill bacteria. **Results:** The MIC of *Copaifera officinalis* oil on *S. mutans* was 30,000 µg/ML and has no bactericidal action on this microorganism, verified by MBC. MIC and MBC of *S. aureus* were 15,000 µg/ML. **Conclusion:** *Copaifera officinalis* oil showed bacteriostatic activity on *S. mutans* and *S. aureus*.

Keywords: Dental caries. Phytotherapeutics Drugs. *Streptococcus mutans*. *Staphylococcus aureus*.

INTRODUÇÃO

O uso de plantas com fins medicinais é uma prática milenar que permanece até os dias atuais. Esse costume está inserido na realidade de algumas sociedades, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento,

em que além de serem usadas em procedimentos alternativos, também são empregadas em procedimentos clínicos, motivo pela qual muitas são comercializadas como medicamentos (COSTA et al., 2009; VEIGA JÚNIOR, PINTO, 2002)

As copaibeiras são árvores pertencentes à família *Leguminosae*, subfamília *Caesalpinoideae* e gênero *Copaifera*, possui um total de 72 espécies, onde 16 delas encontram-se distribuídas exclusivamente nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Amazônica do Brasil, país na qual são popularmente conhecidas como copaíba, pau-

Correspondente/Corresponding: *Andreia Medeiros Rodrigues Cardoso – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Odontologia, Avenida das Baraúnas, S/N, Bodocongó, Campina Grande, Paraíba, Brasil. CEP: 58109-753. – Tel: (83) 3315-3326. – E-mail: andreiamedeiros29@yahoo.com.br

-de-óleo, copaúva e copa. Na América Latina e África Ocidental essas plantas também estão presentes, porém com denominações diferentes (CASCON, 2004).

A maior concentração de princípios ativos e uma maior permeabilidade em relação às membranas das bactérias (em virtude da afinidade lipídica) consistem em características dos óleos essenciais responsáveis por intensificar a sua capacidade antimicrobiana, de forma a desempenhar tal função de maneira eficaz. Após terem sua entrada facilitada nas células bacterianas, os óleos essenciais promovem um desequilíbrio eletrolítico e morte celular (NASCIMENTO et al., 2007)

Atividade antimicrobiana é citada com uma dentre as várias propriedades terapêuticas atribuídas ao óleo de *Copaifera officinalis* (VEIGA JÚNIOR, PINTO, 2002). O *Food and Drug Administration*, órgão governamental dos Estados Unidos responsável pelo controle dos alimentos, suplementos alimentares e medicamentos, realizou em 1972 testes com voluntários que permitiu constatar que o óleo de *Copaifera officinalis* não causa sensibilidade nem irritação nos indivíduos, fato que levou a aprovação de sua utilização (VEIGA JÚNIOR, PINTO, 2002).

A cárie constitui um dos mais prevalentes agravos bucais, onde microrganismos que atuam conjuntamente no processo de desgaste do esmalte dentário são apontados como principais responsáveis por esse agravo. Os *Streptococcus*, principalmente, do grupo *mutans* são considerados seus principais agentes etiológicos (CARRETTO et al., 2007). Substâncias existentes na saliva aliadas as partículas que penetram na cavidade bucal dos indivíduos, oriundos da alimentação, como polímeros bacterianos, leva a formação de uma matriz orgânica que será habitada por vários microrganismos que juntos, levam à formação do biofilme dentário (SOUZA, GIL, 2001).

O uso de substâncias que apresentem como característica tanto a possibilidade de ser administrada pelos indivíduos por via oral quanto à presença de ação inibitória ao crescimento de microrganismos responsáveis pela formação do biofilme dentário, constitui uma estratégia terapêutica no combate a cárie dentária (CLARCKE, 2001). O presente estudo buscou analisar a atuação do óleo de *Copaifera officinalis* frente ao *S. mutans*, *S. aureus*, microrganismos que habitam a cavidade bucal e que podem ser patogênicos quando associados a uma dieta cariogênica, uma higienização bucal inadequada, além de fatores locais ou sistêmicos que promovam certa susceptibilidade do organismo hospedeiro quanto a colonização por bactérias (SOUZA, GIL, 2001).

A base científica utilizada para fundamentar o estudo permite acreditar que o óleo de *Copaifera officinalis* realmente possui uma ação antimicrobiana, bactericida e bacteriostático, diante de alguns microrganismos presentes na cavidade bucal, o que, conseqüentemente, pode interferir no processo da cárie dentária. Diante do exposto, o estudo buscou avaliar a ação bacteriostática e bactericida do óleo de *Copaifera officinalis* sobre as bactérias *S. mutans* e *S. aureus*, através da Concentra-

ção Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).

METODOLOGIA

Realizou-se um estudo de abordagem indutiva com procedimento comparativo estatístico e técnica de documentação direta em laboratório (LAKATOS, MARCONI, 2009).

A atividade antimicrobiana do óleo da *Copaifera officinalis* (obtido através de compra em farmácia, na cidade de Manaus-AM) sob os microrganismos *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Os microrganismos foram obtidos do Laboratório de Materiais de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro – RJ, Brasil). A análise foi realizada através da técnica de microdiluição em caldo, por meio da execução das seguintes etapas: preparação do inóculo, preparo das substâncias (óleo de *Copaifera officinalis*, clorexidina e tween), determinação da CIM (concentração inibitória mínima) bem como da CBM (concentração bactericida mínima). A preparação dos inóculos foi realizada a partir da técnica proposta pelo Comitê Nacional de Normas Clínicas Laboratoriais (NCCLS) em 2005 e os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Oral, situado no Núcleo de Medicina Tropical do Centro de Ciências e da Saúde da Universidade Federal da Paraíba e no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos, também situada no Centro de Ciências da Saúde na Universidade Federal da Paraíba. Em virtude de o óleo obtido ser desprovido de um laudo técnico específico, foi realizada a pesagem de 1 ml da substância para obtenção da densidade, informado pelo espectrofotômetro o valor de 0,9 g/ml.

Os microrganismos que estavam congelados com glicerol 20%, em *ependorfs*, foram semeados (através de uma alça de inoculação) sobre placas Petri contendo meio de cultura MHA (Ágar Müller Hinton HIMEDIA®, São Paulo, Brasil), sendo logo depois de incubadas em estufa bacteriológica a 37°C/24hs. Após as 24h, cerca de 5-10 colônias isoladas de cada cepa bacteriana em 10 ml de BHI (Brain Heart Infusion- HIMEDIA®, São Paulo) e incubou-se novamente em estufa bacteriológica a 37°C/18hs (overnight). O *S. mutans* foi mantido em microaerofilia, uma vez que são microrganismos anaeróbios facultativos. O espectrofotômetro foi responsável pela determinação das concentrações das espécies, trazidas em cubetas contendo 2 ml do meio de cultura bacteriano. O estado de absorvância apresentado determina necessidade ou não de realizar diluições nos inóculo, devendo sofrer ajustes quando o estado de absorvância não se encontra no intervalo de 0,08-0,1, o que corresponde a uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. A partir da solução com concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, foram feitas diluições para que no poço houvesse uma concentração de 5×10^5 UFC/mL.

Foram preparadas soluções das seguintes substâncias: óleo de *Copaifera officinalis*, digluconato de

clorexidina 2% e Tween 80. Para determinação da CIM (concentração inibitória mínima) dessas substâncias frente o *S. mutans* e o *S. aureus* foi necessário diluí-la para que chegássemos a uma solução concentração de 30.000 µg/mL. O óleo de *Copaifera officinalis* apresentava-se antes da etapa de diluição a concentração de 550 µg/mL e o digluconato de clorexidina 2% de 300 µg/mL. O Tween 80 foi preparado para verificação de possível atividade antimicrobiana do mesmo (visto que foi utilizado como espessante para promover a união do óleo com o meio), e o Digluconato de Clorexidina 2% como controle positivo.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada a partir da técnica de microdiluição em caldo, proposta pelo Comitê Nacional de Clínicas Laboratoriais (INCCCL) em 2005, para tanto, foi utilizando microplacas de diluição contendo 96 poços, dispostos em 12 linhas (1 a 12) e 8 colunas (A a H). Foram utilizadas no experimento duas placas, uma para cada respectivo microrganismo a ser analisado. As três primeiras colunas (1, 2 e 3) foram destinadas ao óleo de *Copaifera officinalis*; as 4, 5 e 6 ao Dicluconato de Clorexidina; a 7 ao Tween 80 e a 8 para o controle de crescimento e o controle de esterilidade. Em cada poço foram adicionados 100 µL de BHI, seguida da inserção de 100 µL dos produtos avaliados, apresentando no poço inicial uma concentração de 30.000 µg/mL. A diluição seriada em caldo consistiu na retirada de uma alíquota de 100 µL da cavidade mais concentrada para a cavidade sucessora, seguindo sucessivamente até o último poço, de modo que a concentração fosse reduzida pela metade em cada poço. Possuindo o óleo de *Copaifera officinalis* uma concentração de 30.000 µg/ml no poço inicial (linha 1), 14,6 µg/ml (linha 12) corresponde a concentração expressa pelo óleo no último poço (Quadro 1).

Quadro 1 – Diluições Seriadas do Óleo para a técnica de avaliação antimicrobiana por microdiluições.

Poços	Concentração (µg/MI)
1 – (A, B, C)	30.000 µg/MI
2 – (A, B, C)	15.000 µg/MI
3 – (A, B, C)	7500 µg/MI
4 – (A, B, C)	3750 µg/MI
5 – (A, B, C)	1875 µg/MI
6 – (A, B, C)	937.5 µg/MI
7 – (A, B, C)	468.7 µg/MI
8 – (A, B, C)	234.4 µg/MI
9 – (A, B, C)	117.2 µg/MI
10 – (A, B, C)	58.6 µg/MI
11 – (A, B, C)	29.3 µg/MI
12 – (A, B, C)	14.6 µg/MI

Por fim, foram adicionados a cada poço 100 µL do inóculo bacteriano a 1×10^6 UFC/mL. Este, quanto colocado no poço caía pela metade (diluição 1:1), ou seja, sua concentração era de 5×10^5 UFC/mL e por consequência, as concentrações das substâncias também caíram

pela metade. Após 18h de incubação, determinou-se a CIM (menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano), tanto para o óleo da *Copaifera officinalis* quanto para a clorexidina. O resultado da CIM foi obtido visualmente, havendo a aplicação do corante Trifenil Cloreto de Tetrazólio TCT 0,5% para que tal resultado fosse confirmado. A não formação de aglomerados de células (“botão”) no fundo de cada poço das placas de microdiluição demonstrava atividade inibitória do óleo da *Copaifera officinalis* sob os microrganismos.

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi determinada a partir do resultado da CIM, onde subcultivou-se 10 µL do poço correspondente à CIM e todos os poços de concentrações acima desta em placas de MHA. Após 24 horas de incubação à 37°C, foi realizado a leitura das CBMs, estas foram consideradas as menores concentrações das drogas e misturas, que impediram o crescimento visível do subcultivo (POZZATTI, 2007). Os ensaios foram realizados em triplicata.

RESULTADOS

A atividade antimicrobiana do óleo de *Copaifera officinalis* sob os microrganismos *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*, obtidas através da microdiluição em caldo, foram expressas através da CIM e CBM, cujos resultados estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), em µg/mL, do Óleo de *Copaifera officinalis* testado sob as cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Cepas	CIM	CBM
<i>S. mutans</i>	30.000	Não houve
<i>S. aureus</i>	15.000	15.000

Em relação ao *S. aureus*, o óleo de *Copaifera officinalis* obteve capacidade antimicrobiana quando apresentado a uma concentração de 30.000 µg/mL e 15.000 µg/mL, demonstrando também potencial inibitório sob o *S. mutans*, na concentração de 30.000 µg/mL.

Além da ação inibitória, o óleo de *Copaifera officinalis* também demonstrou apresentar capacidade bactericida, condição que foi possível de ser verificado através da sua ação diante do *S. aureus*, sob as concentrações de 30.000 µg/mL e 15.000 µg/mL, correspondendo a CBM, o último valor. Diferente do ocorrido com a *S. aureus*, o óleo de *Copaifera officinalis* não apresentou efeito bactericida sob o *S. mutans*.

Em relação ao digluconato de Clorexidina 2%, obteve-se valores semelhantes para CIM e CBM sobre o *S. mutans* com valores de 234,4 µg/ml e o *S. aureus*, com 117,9 µg/ml. Nos poços de Tween 80 foi verificado crescimento bacteriano.

DISCUSSÃO

Os dados da pesquisa demonstraram a eficácia antimicrobiana do óleo de *Copaifera officinalis* frente às duas bactérias patogênicas analisadas, atividade que variou mediante as diferentes concentrações do óleo, obtendo valores distintos da CIM (concentração inibitória mínima), bem como resultados antagônicos quanto à efetividade bactericida do óleo de *Copaifera officinalis* sob os dois microrganismos estudados.

Apesar de ter sido verificado valores distintos das CIM para os microrganismos em questão, tanto para o *S. mutans* quanto para o *S. aureus*, o óleo de *Copaifera officinalis* apresentou positividade quanto à capacidade inibitória, resultado que diferiu durante a análise da outra variável do estudo (atividade bactericida), mostrando-se atuante apenas sob uma das bactérias, a *S. aureus*. O óleo de *Copaifera officinalis* apresenta em sua composição princípios ativos que ao atuar sobre a bactéria é capaz de promover efeito antimicrobiano. Sesquiterpenos e diterpenos ácidos são citados como possíveis substâncias capazes de desempenhar função bactericida e bacteriostática, no entanto, a literatura ainda não fornece uma posição definitiva quanto os princípios ativos responsáveis por produzir tal papel (RODRIGUES et al., 2013). Em um estudo realizado por Souza et al. (2011), o ácido copálico é apontado como uma substância constituinte do óleo que promove efeito bacteriostático.

A atividade antimicrobiana do óleo de *Copaifera officinalis* sobre o *S. aureus* foi realizada no estudo de Mendonça e Onofre (2009), embora tenha sido utilizada uma metodologia distinta a do presente estudo (por meio da técnica de difusão em ágar em meio Müller Hinton), ambas as pesquisas demonstraram eficácia inibitória do óleo de *Copaifera officinalis* sob a bactéria analisada. A CIM do óleo de *Copaifera officinalis* sobre o *S. aureus* foi de 3,12%. Packer e Luz (2007) ao utilizar a metodologia de placa em ágar com orifício MAPO (Fio Cruz/INCQS, 1992) para verificação da ação bacteriostática e fungicida de vários óleos (dentre eles o de *Copaifera officinalis*) sobre as cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Candida albicans* (ATCC 10231), obteve resultado negativo quanto à atividade inibitória (bacteriostática) do óleo de *Copaifera officinalis* sob *S. aureus*, porém o método foi diferente do abordado nessa pesquisa, a qual utilizou o da microdiluição em caldo.

Pieri et al. (2012) ao analisar a atividade antimicrobiana do óleo de *Copaifera officinalis* sob o *S. mutans*, por meio da técnica de diluição em caldo, oferece resultados que podem ser comparados com os encontrados no presente estudo (o qual utilizou a mesma metodologia). Em ambas as pesquisas o óleo de *Copaifera officinalis* não demonstrou ação bactericida sobre o microrganismo em questão. A cepa padrão de *S. mutans* ATCC 25175 apresentou no estudo de Pierri et al. (2012) uma CIM de 0,78 µL/mL.

A ausência de um método padronizado que permita mensurar a atividade antimicrobiana dos óleos essen-

ciais dificulta uma comparação direta entre os achados da literatura. Mencionar a padronização da linhagem, a utilização de controle positivo, o uso de emulsificador, o tempo de exposição do microrganismo ao óleo, meio de cultura utilizado, densidade do óleo e do emulsificador são fatores frequentemente negligenciados, contribuindo tanto para intensificar o obstáculo em confrontar resultados dos estudos, como proporcionar a ocorrência de desvio nos resultados (NASCIMENTO et al., 2007). O presente estudo utilizou-se de técnicas baseadas na literatura, agindo de forma a evitar o surgimento de viés.

Oferecer resultados quantitativos além de não ser influenciado pela velocidade de crescimento dos microrganismos são vantagens apresentadas pelo método de microdiluição seriada em caldo frente à metodologia de difusão de disco. Em busca de obter resultados mais seguros, utilizou-se a técnica de microdiluição em caldo (orientado pelo NCCLS), oferecendo uma maior confiabilidade ao estudo em virtude do método apresentar vantagens como sensibilidade e quantidade mínima de reagentes, o que facilita um maior número de réplicas. No método da microdiluição as substâncias são solubilizadas, ocorrendo um maior contato do óleo com as células bacterianas, o que torna o método mais sensível para a determinação da CIM, minimizando a inconsistência dos resultados (SCORZONI et al., 2007). A utilização do controle positivo (dicluginato de clorexidina), controle de crescimento e de controle de esterilidade colabora para redução do viés metodológico, proporcionando uma maior confiabilidade nos resultados apresentados (CASTRO, LIMA, 2010).

Apesar de poucos relatos encontrados, os resultados obtidos nessa pesquisa corroboram com os achados na literatura, demonstrando a atividade inibitória do óleo de *Copaifera officinalis* sob o crescimento de microrganismos cariogênicos. O presente estudo contribui tanto para a ampliação do número de documentos referentes à atuação benéfica do óleo frente ao organismo humano, como serve de embasamento para pesquisas que visam à criação de um produto odontológico a base de substâncias naturais que ofereçam uma estratégia terapêutica com aplicabilidade na almejada prevenção da cárie dentária.

Diante das limitações dessa pesquisa, novos estudos e testes devem ser realizados, tanto com biofilmes de cepas de *S. mutans* e do *S. aureus*, como também sob outras bactérias cariogênicas, a fim de promover uma melhor avaliação. Verificar os possíveis efeitos colaterais do uso do óleo de *Copaifera officinalis* em longo prazo é uma informação crucial para que possa desenvolver um produto odontológico, constituindo esse fator juntamente com o teste da concentração ideal do óleo, em perspectivas dos futuros estudos.

CONCLUSÃO

Sob as condições deste estudo *in vitro*, pode-se concluir que o óleo de *Copaifera officinalis* apresentou ação

antimicrobiana diante de todas as bactérias empregadas nessa pesquisa, sendo bacteriostático tanto sobre o *S. mutans* quanto sobre o *S. aureus*, porém com ação bactericida apenas sobre o *S. aureus*.

Tais resultados permitiram mostrar a importância de desenvolver avaliações de produtos com extratos vegetais que podem vir a servir como alternativa para a criação de produtos de uso odontológico com boa efetividade e menor custo.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal da Paraíba por ceder o Laboratório de Microbiologia Oral, situado no Núcleo de Medicina Tropical e o Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos, ambos situados no Centro de Ciências da Saúde, para a realização do presente estudo.

REFERÊNCIAS

- CARRETTO, C. F. P. et al. Efeitos do chá de tomilho sobre a aderência in vitro de *Streptococcus mutans* ao esmalte dentário e *Candida albicans* à resina acrílica. **Rev. odontol. UNESP**, Araraquara, v. 36, n. 3, p. 281-286, 2007.
- CASCON, V. Copaíba: *Copaifera spp.*. In: CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos antiinflamatórios**: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto. São Paulo: Tecmed, 2004. p. 221-256.
- CASTRO, R. D. ; LIMA, E.O. Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus L.* sobre *Candida spp.* **Rev. Odontol. UNESP**, Araraquara, v. 39, n. 3, p.179-184, 2010.
- CLARCKE, D. E. Clinical and microbiological effects of oral zinc ascorbate gel in dogs. **J. Vet. Dent.**, Boise, v. 18, p. 177-183, 2001.
- COSTA, C. M. G. R. et al. Efeito inibitório do óleo essencial de manjerição sobre o crescimento invitro de *Erwinia carotovora*. **Rev. Tecnol. Ciên. Agropec.**, João Pessoa, v. 3, n. 3, p. 35-38, 2009.
- MENDONÇA, D. E.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaíba – *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). **Rev. bras. Farmacogn.**, João Pessoa, v. 19, n. 2B, p. 577-581, 2009.
- NASCIMENTO, P. F. C. et al. Atividade anti-microbiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Rev. Bras. Farmacogn.**, João Pessoa, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.
- PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Rev. bras. Farmacogn.**, João Pessoa, v. 17, n. 1, p. 102-107, 2007.
- PIERI, F. A. et al. Bacteriostatic effect of copaiba oil (*Copaifera officinalis*) against *Streptococcus mutans*. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 1, p. 36-38, 2012.
- RODRIGUES, F. G. et al. Atividade bactericida da copaifera sp. frente a *Staphylococcus spp.* isolados de mastite bovina. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 9, n. 17, p. 293-301, 2013.
- SCORZONI, L. et al. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida spp* and *Cryptococcus sp.* **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, Araraquara, v. 28, n. 1, p. 25-34, 2007.
- SOUZA, A. B. et al. Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. against cariogenic bacteria. **Phytother Res.**, London, v. 25, p. 215-220, 2011.
- SOUZA, F. B.; GIL, J. N. Doença cárie: nem infecciosa, transmissível. **RGO.**, Porto Alegre, v. 49, n. 3, p.139-144, 2001.
- VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O Gênero *Copaifera L.* **Quim. Nova.**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

Submetido em: 20/10/2016

Aceito em: 02/03/2016