

Actividad antibacteriana de *Copaifera reticulata* “Copaiba” sobre *Porphyromonas gingivalis* aisladas de pacientes con periodontitis

Donald Ramos Perfecto¹, Américo Castro Luna².

Antibacterial activity of *Copaifera reticulata* “Copaiba” on *Porphyromonas gingivalis* isolated from patients with periodontitis.

Resumen

Objetivo. Evaluar la actividad antibacteriana de la oleoresina de *Copaifera reticulata* (C. reticulata), sobre la bacteria periodontopatógena *Porphyromonas gingivalis* (P. gingivalis) **Metodología.** De un total de 43 muestras de biopelícula subgingival de pacientes con periodontitis, se pudo aislar 20 cepas clínicas de *P. gingivalis*, su identificación preliminar se dio por un crecimiento en el medio de agar sangre con hemina y vitamina K, de colonias negro pigmentadas, estas colonias se purificaron para hacer pruebas de catalasa, oxidasa y en medios de TSI, Citrato, Urea, Sim. Su identificación definitiva se llevó a cabo por medio de la prueba automatizada de Api 20 A. Una vez aisladas en condición de cepa se realizó el test de difusión en placa, con discos cargados, en las concentraciones de 100 %, 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,12 %, 1,56 %, 0,78 %, 0,39 %, 0,19 %, teniendo como control positivo a la clorhexidina al 0,12 % y como control negativo al dimetilsulfoxido (DMSO). **Resultados.** Se determinó una sensibilidad inicial y media de la copaiba al 100 % sobre *P. gingivalis*, siendo su concentración mínima inhibitoria media de 3,43 %. La estadística no paramétrica de Kruskal Wallis, indica diferencias significativas (P < 5 %), entre las diferentes concentraciones de la *Copaifera reticulata* y el control positivo. **Conclusión.** Basado en la experimentación, se concluye que la *Copaifera reticulata* presenta actividad antibacteriana sobre *P. gingivalis*, siendo la concentración del 100 % la que presenta mayor actividad, superando a la clorhexidina al 0,12 %, producto muy usado como complemento en el tratamiento de la periodontitis. Proponiendo un posible uso de la oleoresina de copaiba en esta patología.

Palabras clave: Oleoresina de *Copaifera reticulata*, *Porphyromonas gingivalis*, actividad antibacteriana, periodontitis.

Abstract

Objective: the objective of this study was to evaluate the antibacterial activity of oleoresin *Copaifera reticulata* (C. reticulata) on Periodontopathogenic bacteria *Porphyromonas gingivalis* (P. gingivalis) **Methodology:** From a total of 43 samples of subgingival plaques of patients with periodontitis, it was isolated 20 clinical strains of *P. gingivalis*, the preliminary identification occurred by growth of black pigmented colonies on blood agar with hemin and vitamin K, these colonies were purified to test for catalase, oxidase and TSI, Citrate, Urea, Sim means. Definitive identification was held by means of the automated testing of Api 20 A. Once the strain were isolated the diffusion test was performed on plate, with discs loaded with the oleoresin at concentrations of 100 %, 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,12 %, 1,56 %, 0,78%, 0,39 %, 0,19 %, taking 0,12 % chlorhexidine as a positive control, and copaiba dimethylsulfoxide (DMSO) as a negative control. **Results:** The Initial-media sensitivity was determined at 100% copaiba for *P. gingivalis*, being the average minimum inhibitory concentration at 3.43%. The differences between other concentrations of *Copaifera reticulata* and positive control were statistically significant for Kruskal Wallis test (P < 5 %). **Conclusion:** Based on experimentation, we conclude that the *Copaifera reticulata* has antibacterial activity on *P. gingivalis*, being the major activity at 100% concentration, beating the 0,12 % chlorhexidine, product widely used as a complement of periodontitis treatment. Proposing a possible use of copaiba oleoresin in this pathology.

Keywords: *Copaifera reticulata* oleoresin, *Porphyromonas gingivalis*, antibacterial activity, periodontitis.

1 Laboratorio de Microbiología, Departamento Académico de Ciencias Básicas, Facultad de Odontología, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.

2 Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.

Correspondencia:

CD. Donald Ramos Perfecto

Facultad de Odontología, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Av. Germán Amézcaga s/n, Lima 1, Perú.

Correo electrónico: dramos_37@hotmail.com

Fecha de recepción: 28-02-14

Fecha de aceptación: 19-06-14

Introducción

La flora peruana es en la actualidad un libro abierto, para descubrir una diversidad de plantas, que presentan diversos principios activos que pueden curar o reducir nuestras enfermedades. Se tiene conocimiento de plantas como la *Caesalpinia spinosa*¹ (tara), *Minthosta-*

*chys mollis*² (muña), *Erythroxylum novogranatense*³ (coca), presentan una actividad antibacteriana sobre una diversidad de microorganismos, causante de enfermedades como faringitis, bronquitis, neumonía, infecciones urinarias, etc. Así también la oleoresina de *Copaifera reticulata* (copaiba) es utilizada para

una diversidad de enfermedades, por sus propiedades curativas, siendo su uso básicamente tradicional, conocimiento ancestral que va pasando de generación en generación. Se tiene reporte que el origen de su uso fue iniciado por un acto de observación, al ver a los animales afrontarse a dicho árbol y frotar sus

heridas en él⁴. En la actualidad muchas tiendas naturistas ofrecen la oleorresina de Copaiba para una diversidad de enfermedades, pero su aplicación a enfermedades de la cavidad bucal no está documentada.

En la cavidad bucal las patologías más resaltantes son la caries dental, cuyo mayor agente etiológico microbiano es el *Streptococcus mutans*^{3,5} y las enfermedades periodontales, cuya mayor lesión destructiva es la periodontitis crónica, cuyo agente etiológico microbiano más relevante es la *Porphyromonas gingivalis*⁶.

La *Copaifera reticulata* es un árbol que puede llegar a medir 40 m de altura, con 120 cm de diámetro aproximadamente, de fuste alto, recto y cilíndrico, sin aletas, copa globosa y amplia, corteza externa de color amarillo olivo a castaño, de apariencia lisa, con desprendimiento papiraceo^{7,8}.

En el Perú se halla de forma natural en los bosques amazónicos de los departamentos de Loreto, Ucayali, Huánuco, San Martín y Madre de Dios⁹.

La oleorresina que se obtiene de este árbol es sintetizada por células parenquimáticas que lo secretan a canales formados por esquizoigénia (dilatación de los espacios intercelulares) localizados en todas las partes del árbol. Estos canales se intercomunican en fajas concéntricas en los anillos de crecimiento del tronco, formando un anillo ininterrumpido, por lo que supuestamente al hacer una perforación en el tronco, el aceite de todo el árbol fluye hacia el orificio¹⁰. Este es un líquido transparente con viscosidad y color variable, con una mixtura de sesquiterpenos y diterpenos⁴, siendo los principales sesquiterpenos; β -Cariofileno, β -Bisaboleno, α -humuleno^{7,11} y entre los diterpenos; ácido copaiferico, colavenol, ácido Hardwickico, ácido copálico¹².

El mecanismo de acción antibacteriana de la oleorresina de Copaiba, postula en la disrupción de la membrana celular y lisis bacteriana, generalmente por diterpenos o sesquiterpenos, la cual se da por su estructura lipofílica, con capacidad de insertarse, en el interior de la membrana celular, unirse en una posición estratégica e interactuar con los grupos fosforilados de la membrana¹³.

En la medicina tradicional la oleorresina de copaiba es utilizado como antiinflamatorio¹⁴, antimicrobiano¹⁵, antileishmaniasico¹⁶, cicatrizante¹⁷ y antitumoral¹⁸, reportes de su posible uso en la cavidad bucal no se tiene documentado.

Materiales y método

La obtención de la oleorresina de *C. reticulata* se hizo de las reservas naturales de nuestra amazonia, ubicado en la provincia de Maynas, Iquitos-Perú, su confirmación taxonómica fue hecha por el Herbario Amazonense de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP). Su estudio físico-químico como la cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas se realizó para evidenciar sus componentes más resaltantes.

Para el aislamiento de las Cepas clínicas de *P. gingivalis*, se recolectaron 43 muestras de biopelícula subgingival de pacientes con periodontitis. Las muestras fueron recogidas con conos de papel N° 30 ó 40, dejados por 30 a 60 segundos dentro del surco periodontal, luego retirado y colocado en el medio de transporte BHI (infusión cerebro corazón). Se preparan diluciones de la muestra en BHI en proporciones de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , para luego tomar 100 μ L de las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} y ser sembrados en agar sangre suplementado, se incubó en condiciones de anaerobiosis a 37 °C por un periodo de 10 a 14 días. Pasado el tiempo de incubación se observa el crecimiento de colonias circulares con un diámetro de 1 a 2 mm, convexa, de un color marrón oscuro a negro, se resiembró la colonia y se realizan pruebas preliminares de coloración Gram, catalasa, oxidasa, Sim, Citrato, TSI, Urea. La identificación definitiva se realizó por medio del test de Api 20 anaerobios.

La determinación de la actividad antibacteriana de *C. reticulata* sobre *P. gingivalis*, se realizó por medio de la prueba de difusión en placa, para lo cual, la oleorresina fue diluida en 10 diferentes concentraciones, utilizando como diluyente al dimetilsulfóxido (DMSO), siendo la primera concentración del 100 % de la oleorresina, luego 50 % v/v, 25 % v/v, 12,5 % v/v, 6,25 % v/v, 3,12 % v/v, 1,56 % v/v, 0,78 % v/v, 0,39 %

v/v, y 0,19 % v/v. Se prepara un patrón de turbidez de 1 de Mac Farland (3×10^8 UFC/mL) de la bacteria *P. gingivalis*, para ser sembrada por diseminación en agar sangre suplementado, paso siguiente fue colocar los discos de 6 mm de diámetro cargados con 10 μ L de las diferentes concentraciones sobre la placa de agar, se colocó un disco cargado con clorhexidina al 0,12 % como control positivo y otro cargado con DMSO como control negativo.

El nivel de la actividad antibacteriana se hizo mediante la medición de los halos de inhibición y comparación de rangos de sensibilidad según Oromatograma de Duraffourd, el cual determina una sensibilidad nula a halos inferiores o iguales a 8 mm, sensibilidad límite a halos de 9 a 14 mm, sensibilidad media a halos de 15 a 19 mm y sumamente sensible a halos mayores de 20 mm.

Resultados

De un total de 43 muestras de biopelícula subgingival, se obtuvieron 20 cepas clínicas de *P. gingivalis*, cuyas características de colonia y pruebas preliminares se mencionan en la Tabla 1.

En relación a la sensibilidad generada por la oleorresina de *C. reticulata* sobre *P. gingivalis*, esta tiene una sensibilidad de límite a media, generando una mayor sensibilidad la concentración del 100 %, siendo esta sensibilidad mejor que el control positivo que es la clorhexidina al 0,12 %. Tabla 2.

La determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria CMI fue identificada como la menor concentración de la oleorresina de *C. reticulata*, que genera un halo, obteniéndose una media de la CMI de 3,43 %. Fig. 1.

Aplicando la prueba de Kruskal-Wallis, obtenemos diferencias significativas ($P < 5$ %) entre las concentraciones consideradas en el estudio y el control positivo. El diagrama de cajas describe la variación de la mediana en las distintas concentraciones en cada grupo de estudio, la mayor variación se observa en las concentraciones de 100 %, 50 %, y 25 %, con respecto a la variación del control positivo. Las menores concentraciones presentan una menor variación. Fig. 2.

Tabla 1. Características de crecimiento en cultivo y pruebas preliminares de *p. gingivalis*

N° muestras	Medio Agar Sangre suplementado (descripción de colonias)					Pruebas preliminares	
	Tamaño	Elevación	Borde	Forma	Color	Catalasa	Oxidasa
20	1.2 – 2.0	presente	regular	redonda	negro	negativo	negativo

Tabla 2. Determinación de la sensibilidad según tamaño de los halos (Duraffourd)

Concentraciones	S. Nula		S. Limite		S. Media		Sumamente Sensible ≥ 20mm	Total	
	n	%	n	%	n	%		n	%
C. reticulata									
100	---		11	55%	09	45%	---	20	100%
50	---		19	95%	01	5%	---	20	100%
25	01	5%	19	95%	---		---	20	100%
12.5	03	15%	17	85%	---		---	20	100%
6.25	14	70%	06	30%	---		---	20	100%
3.12	20	100%	---		---		---	20	100%
1.56	20	100%	---		---		---	20	100%
0.78	20	100%	---		---		---	20	100%
0.39	20	100%	---		---		---	20	100%
0.19	20	100%	---		---		---	20	100%
Clorhexidina 0.12%	---		20	100%	---		---	20	100%
Control positivo									
DMSO	20	100%	---		---		---	20	100%
Control negativo									

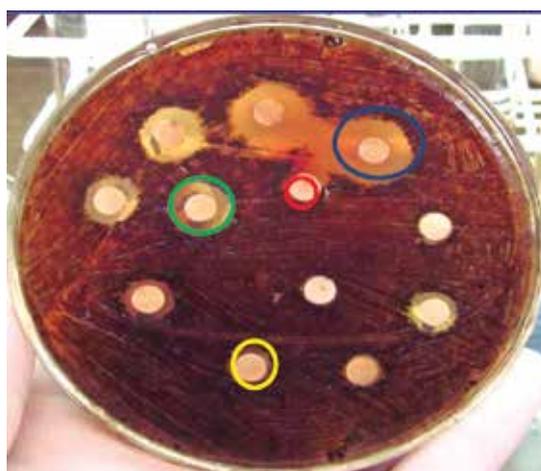


Fig. 1. Obsérvese los halos de inhibición según concentración, copaiba al 100 % mayor halo de inhibición círculo de color azul, Control positivo Clorhexidina al 0,12 % círculo de color verde, Control negativo DMSO círculo de color rojo y copaiba al 3,12 % menor halo de inhibición círculo color amarillo.

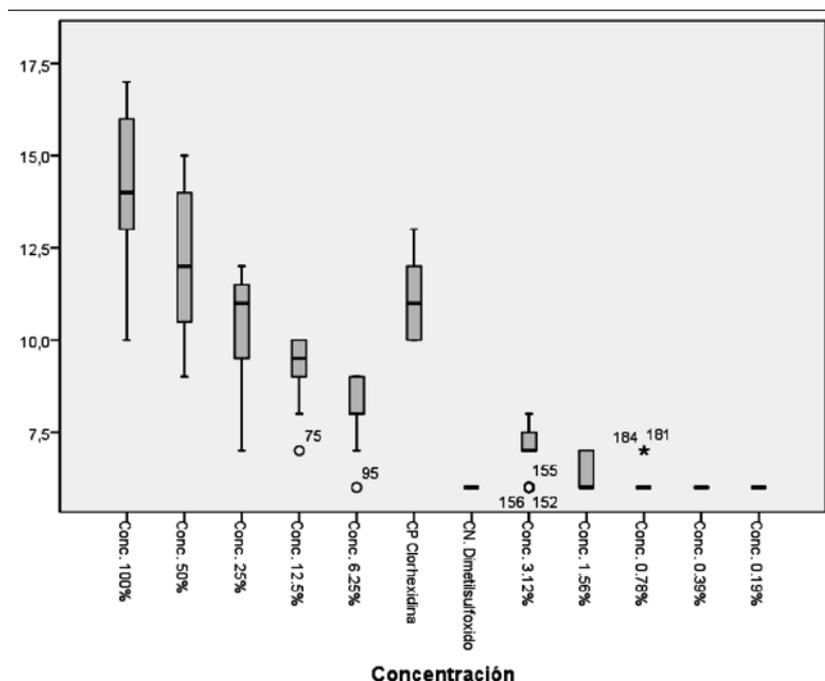


Fig. 2. Diagrama de cajas que describe variaciones de las distintas concentraciones en el estudio.

Discusión

En relación al aislamiento de *P. gingivalis*, autores como Tanner¹⁹, Kornman²⁰ y Dahlen²¹ han determinado su presencia en lesiones periodontales, desarrollando técnicas y medios para su aislamiento con resultados bastante similares. En nuestro estudio conociendo las características exigentes de la bacteria, hemos utilizado un medio enriquecido como el agar sangre suplementado con hemina y vitamina K, para un aislamiento preliminar. Slots²² utiliza para la recuperación de este microorganismo un medio selectivo a base de agar Columbia complementado con agentes inhibidores como colistín sulfato, ácido nalidixico y bacitracina, con lo cual mejora la recuperación de este microorganismo. Para la recuperación de esta bacteria se toman muestras de biopelícula subgingival que son recogidas con conos de papel, para luego ser llevados al medio BHI, luego diluidos en proporciones de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , siendo sembradas las dos últimas diluciones. Este procedimiento es una variación de lo que otros investigadores hacen como Slots²² o Tanner¹⁹, ya que a mayores diluciones podemos recuperar a la bacteria en colonias separadas y diferenciadas.

De los estudios físico-químicos de la oleorresina de *C. reticulata*, se han podido identificar compuestos como sesquiterpenos y diterpenos por diferentes autores como Valdir⁴, Pieri⁷, Herrero¹⁰,

mencionado que las sustancias con mayor concentración son los sesquiterpenos, destacando la presencia de β -cariofileno, como el producto de mayor concentración. Entre los diterpenos de mayor consideración se menciona al ácido copalico, el cual por su presencia en todas las especies del género *Copaifera* es considerado por algunos investigadores como producto marcador de la oleorresina. En nuestro estudio se determinó la presencia de algunos compuestos de la oleorresina de *Copaifera reticulata*, por cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas, el cual identifico de forma cualitativa la presencia de β -cariofileno, el cual es indicado como un posible generador del efecto antibacteriano de la oleorresina.

La capacidad antibacteriana de la oleorresina de Copaiba está comprobada por su acción sobre bacterias Gram positivas como *Stafilococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococos faecalis*, *Streptococcus mutans*, mencionados por Pacheco¹⁵, Oliveira dos Santos²³, Pieri²⁴. Aunque ensayos de Gonçalves²⁵, demuestran acción inhibitoria contra *Proteus mirabilis*, *Shiguelia sonnei*, así como Mendonça²⁶ sobre *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Estudios recientes de Souza comprueban la actividad antibacteriana de diterpenos de *Copaifera langdorffii* contra bacterias anaerobias periodontales predominantes en la enfermedad periodontal. Sobre *P. gingivalis* no se tiene reporte si es sensible a la oleorresina de

Copaifera reticulata. En nuestro país, según reportes, el uso de la oleorresina de copaiba es variada, desde antimicótico, antiinflamatorio, cicatrizante, no habiendo reportes de su uso en la cavidad bucal en procesos de periodontitis, donde la *P. gingivalis* es la bacteria más relevante. Por lo que nuestros resultados son bastante prometedores, ya que al enfrentamiento de la oleorresina de *Copaifera reticulata* frente a *P. gingivalis*, esta presenta una sensibilidad límite a media según Oromatograma de Durraffourd²⁷, repitiéndose lo mismo en todas las cepas clínicas aisladas, demostrando así su capacidad antibacteriana.

Conclusiones

La oleorresina de *Copaifera reticulata* "Copaiba" presenta actividad antibacteriana sobre *Porphyromonas gingivalis*, aislada de muestras de biopelícula subgingival de pacientes con periodontitis, presentando una Concentración Mínima Inhibitoria de 3,43 %, así como una mayor actividad que la clorhexidina al 0,12 %. Proponiéndose un posible uso como antiséptico que complementaría el tratamiento odontológico de la periodontitis.

Agradecimientos

A la Srta. Mary Yuli Ramos P. por su colaboración en la búsqueda bibliográfica y tipo del artículo

Referencias Bibliográficas

- Huarino AM, Ramos PD. Efecto antibacteriano de *Caesalpinia spinosa* (Tara) sobre flora salival mixta. *Odontol Sanmarquina*. 2012;15(1):27-30.
- Diaz LK, Moromi NH. Determinación antibacteriana *in vitro* de *Menthostachys mollis* (Muña) frente a bacterias orales de importancia estomatológica. *Odontol Sanmarquina*. 2005;8(2):3-5
- Moromi NH, Martínez CE, Ramos PD. Antibacterianos naturales orales: Estudios en la Facultad de Odontología de la Universidad Mayor de San Marcos. *Odontol Sanmarquina*. 2009;12(1):25-28
- Veiga JV, Pinto AC. O Genero *Copaifera* L. *Quim Nova*. 2002;25(2):273-86.
- Moromi NH, Martínez CE. Efecto del Té verde en la formación de la placa bacteriana por *Streptococcus mutans*. *Odontol Sanmarquina*. 2006;9(2):23-24
- Ramos PD, Moromi NH, Martínez CE. *Porphyromonas gingivalis*: Patógeno predominante en la periodontitis crónica. *Odontol Sanmarquina*. 2011;14(1):34-38.
- Pieri FA, Messi MC, Moreira MAS. Histórico, extracción, aplicaciones industriales e propiedades medicinales. *Rev Bras Pl Med Botucatu*. 2009;11(4):465-472.
- Rigamonte-Azevedo OC, Salvador WPG, Oliveira WLH. *Copaiba*: Ecología e producción de oleo-resina. *Embrapa*. 2004;91:1-22.
- Flores BY. Cultivo de la copaiba (*Copaifera reticulata* ducke). [En línea] Consultado 10-01-2012. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos43/cultivo-copaiba/cultivo-copaiba.shtml>.
- Herrero JC. Gestión integrada de los recursos forestales en la amazonia oriental: ecología de dos especies de uso múltiple. [Tesis doctoral para optar al grado de Doctor en Ciencias biológicas]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2010. 120p.
- Herrero JC, Casado MA, Das Gracias BZM, Martins Da-Silva RG. Chemical variability of *Copaifera reticulata* Ducke oleoresin. *Chem Biodevers*. 2011;8(4):674-85.
- Veiga JVF, Patitucci ML, Pinto AC. Controle de autenticidade de oleos de copaiba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolucao. *Quim Nova*. 1997;20(6):612-5.
- Souza AB, De Souza MGM, Moreira MA, Moreira MR, Furtado NA, Martins CHG, Bastos JK. Antimicrobial evaluation of diterpenes from *Copaifera langsdorffii* oleoresin against periodontal anaerobic bacteria. *Molecules*. 2011;16:9611-9.
- Veiga JV, Rosas Ec, Carvalho MV, Henriques MGMO, Pinto AC. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oil from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* ducke and *Copaifera multijuga* Hayne A comparative study. *J ethnopharmacol*. 2007;12(2):248-52.
- Pacheco TARC, Barata LES, Duarte MCT. Antimicrobial activity of copaiba (*Copaifera spp*) balsams. *Rev Bras Pl Med Botucatu*. 2006;8:123-4.
- Oliveira dos Santos A, Ueda NT, Prado DFB, Veiga JV, Vataru NC. *Copaiba* Oil: An alternative to development of new drugs against leishmaniasis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012;9(1):1-7.
- Arroyo AJ, Quino FM, Martínez HJ, Almora PY, Alba GA, Condorhuaman FM. Efecto cicatrizante del aceite de *Copaiba officinalis* (copaiba) en pacientes con ulcera péptica. *An Fac med*. 2011;72(2):113-7.
- Lima SR, Junior VF, Christo HB, Pinto AC, Fernandes PD. *In vivo* and *in vitro* studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *Phytother Res*. 2003;17(9):1048-53.
- Tanner ACR, Goodson JM. Sampling of microorganisms associated with periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol*. 1986;1:15-20.
- Kornman KS. Sampling of microorganisms associated with periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol*. 1986;1:21-22.
- Dahlen G. Role of suspected periodontopathogens in microbiological monitoring of periodontitis. *Adv Dent Res*. 1993;7(2):163-74.
- Slots J. Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. *Oral Microbiol Immunol*. 1986;1:48-55.
- Oliveira Dos santos A, Ueda NT, Prado DFB, Veiga JVF, Pinto AC, Vataru NC. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103(3):277-281.
- Pieri FA, Mussi MC, Fiorini JE, Schneedorf JM. Efeitos clínicos e microbiológicos do óleo de copaiba (*Copaifera officinalis*) sobre bacterias formadoras de placa dental em caes. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2010;62(3):578-585.
- Gonçalves AL, Alves FA, Menezes H. Estudio comparativo da actividade antimicrobiana de extractos de algumas arvores nativas. *Arq Inst Biol Sao Paulo*. 2005;72(3):353-8.
- Mendonça DE, Becker OS. Actividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela *Copaiba* – *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). *Rev Bras Farmacogn*. 2009;19(2B):577-581.
- Alzamora L, Morales L, Armas L, Fernández G. Medicina tradicional en el Perú: Actividad antimicrobiana *in vitro* de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. *An Fac med*. 2001;62(2):156-61.