

EFFECTO ANTIBACTERIANO DE LA COPAIFERA OFFICINALIS PERUANA SOBRE BACTERIAS ORALES RESPONSABLES DEL FRACASO EN TRATAMIENTOS DE CONDUCTO

Rocío del Pilar Bocanegra-Arista

Pablo Alejandro Millones-Gómez

Facultad de Odontología, Universidad Nacional de San Marcos, Lima, Perú

Autor correspondiente: Pablo Alejandro Millones-Gómez

E-mail: pablodent@hotmail.com

Recibido: 15/3/2020

Aceptado: 24/5/2020

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar la susceptibilidad microbiana *in vitro* del *Enterococcus faecalis* frente a diferentes concentraciones de aceite esencial de *Copaifera officinalis* (copaiba) peruana en comparación con hipoclorito de sodio al 2.5%. Se realizó 90 repeticiones en placaspetri con cepa de *Enterococcus faecalis*, los cuales se dividieron en 5 grupos: aceite esencial de *Copaifera officinalis* al 100%, 75%, 50% y 25%; e hipoclorito de sodio al 2.5%. Se encontró que la susceptibilidad microbiana del *Enterococcus faecalis* al aceite esencial de *Copaifera officinalis* al 100%, 75% y 50% fue mayor en comparación con hipoclorito de sodio al 2.5%.

Palabras clave: pruebas de sensibilidad microbiana, *Enterococcus faecalis*, bálsamos.

ANTIBACTERIAL EFFECT OF PERUVIAN COPAIFERA OFFICINALIS ON ORAL BACTERIA LINKED TO FAILURE IN ROOT CANAL TREATMENTS

ABSTRACT

The objective of the study was to determine the *in vitro* microbial susceptibility of *Enterococcus faecalis* against different concentrations of Peruvian *Copaifera officinalis* (copaiba) essential oil compared to 2.5% sodium hypochlorite. 90 repetitions were performed in petri dishes with *Enterococcus faecalis* strain, which were divided into 5 groups: 100%, 75%, 50% and 25% *Copaifera officinalis* essential oil; and 2.5% sodium hypochlorite. The microbial susceptibility of *Enterococcus faecalis* against 100%, 75% and 75% *Copaifera officinalis* essential oil was found to be higher compared to 2.5% sodium hypochlorite.

Keywords: microbial sensitivity tests, *Enterococcus faecalis*, balsams.

INTRODUCCIÓN

El *Enterococcus faecalis* es una especie del género *Enterococcus*. Son microorganismos anaerobios facultativos, cocos gram-positivos y no forman endosporas (1). En odontología es importante su control, pues es el microorganismo frecuentemente aislado en casos de fracasos

endodónticos (1,2,3). Este microorganismo tiene la capacidad de adaptarse para sobrevivir en ambientes hostiles, invade los túbulos dentinarios y forma biopelículas (4). Además, el *E. faecalis* es resistente al hidróxido de calcio, medicamento frecuentemente usado en tratamientos endodónticos por su capacidad de vivir en pH alcalino extremo (4,5). Debido a estas características particula-

res, la eliminación completa del *E. faecalis* representa un desafío para el éxito del tratamiento endodóntico.

El *E. faecalis* se asocia con diferentes formas de enfermedad perirradicular, incluidas las infecciones endodónticas primarias y las infecciones persistentes. Dentro de las infecciones endodónticas primarias, el *E. faecalis* se encuentra en lesiones perirradiculares crónicas asintomáticas significativamente más a menudo que en periodontitis perirradicular aguda o abscesos perirradiculares agudos (1). Su prevalencia varía de 4 al 40% en las infecciones endodónticas primarias, y en lesiones perirradiculares persistentes en piezas dentarias con conductos radiculares con tratamiento endodóntico previo por periodontitis apical es mucho mayor, varía de 24 al 77% (1,2,3). El objetivo principal del tratamiento endodóntico es la eliminación de los microorganismos en los conductos radiculares infectados, y evitar la reinfección posterior. Por tal motivo, una terapia exitosa del conducto radicular se basa en la combinación de una instrumentación, desinfección y obturación adecuadas del conducto radicular (6,7). Para lograr una desinfección adecuada, la instrumentación biomecánica se complementa con la irrigación intraconducto; idealmente con soluciones con un amplio espectro de actividad antimicrobiana, no tóxica y biocompatible, capaz de disolver tejido necrótico pulpar remanente y con buena acción lubricante junto con baja tensión superficial para poder llegar a zonas inaccesibles (6,8,9,10).

Actualmente el irrigante intraconducto de primera elección es el hipoclorito de sodio (NaOCl), debido a su acción antimicrobiana y capacidad de disolución de residuos de tejido necrótico. Las concentraciones usadas para el tratamiento endodóntico varían desde 0.5 a 5.25% (8,10,11,12).

El NaOCl es eficaz contra el *E. faecalis*, especialmente en las concentraciones más altas y mayor tiempo de contacto (5). Sin embargo, presenta ciertos inconvenientes importantes: irritante para los tejidos periapicales, sabor desagradable, alta toxicidad, corrosión de los instrumentos, incapacidad para eliminar la capa residual, quemaduras de los tejidos circundantes y reducción del módulo de elasticidad y la resistencia a la flexión de la dentina (10,13).

En la actualidad se está investigando el uso de alternativas terapéuticas, las cuales incluyen sustancias químicas sintetizadas en laboratorios y productos que provienen de la naturaleza. El uso de varios productos fitoterapéuticos ha aumentado debido a su eficiencia, baja toxicidad, biocompatibilidad y bajo costo (14,22-26). La Organización Mundial de la Salud avala el uso de la medicina tradicional y alternativas terapéuticas si han demostrado su utilidad para el paciente y representan un riesgo mínimo (15). En la búsqueda de nuevos antimicrobianos, especialmente aquellos que utilizan productos naturales con gran efi-

ca, nos encontramos con el aceite de copaiba; esta oleorresina produce por exudación de los troncos de los árboles que pertenecen al género *Copaifera* (16).

El árbol de *Copaifera* tiene más de 70 especies distribuidas en América Central y del Sur; entre ellas la *Copaifera officinalis* (17,18).

El aceite de copaiba es uno de los remedios naturales más importantes para la población indígena de la región amazónica y su uso está ampliamente difundido debido a sus diversas propiedades farmacológicas (18): antibacteriano,



antiinflamatorio, antifúngico, antitumoral y cicatrizantes de heridas (19). La oleorresina es un líquido transparente, desde amarillo a amarillo pardo con viscosidad variable, y está constituido por una fracción no volátil compuesta de diterpenos y una fracción volátil compuesta de sesquiterpenos (18).

Las propiedades antimicrobianas de las oleorresinas, como el aceite de copaiba, se deben a sus propiedades lipofílicas. La hidrofobicidad de la oleorresina permite una interacción entre el aceite y los lípidos de la membrana celular, lo que interfiere en su permeabilidad y provoca cambios en su estructura (20).

Se ha demostrado que el aceite esencial de *Copaifera officinalis* es efectivo contra varios microorganismos ora-

les, como *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus pyogenes* (14,16,18,21).

Debido a sus propiedades antimicrobianas y biocompatibilidad, el aceite esencial de *Copaifera officinalis* podría ser un buen irrigante/medicamento antimicrobiano alternativo en los tratamientos de endodoncia. Sin embargo, existe información limitada sobre la actividad antibacteriana del aceite de copaiba contra el *E. faecalis*. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es determinar la susceptibilidad microbiana *in vitro* del *Enterococcus faecalis* frente a diferentes concentraciones de aceite esencial de *Copaifera officinalis* en comparación con hipoclorito de sodio al 2.5%.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra

Se realizaron 90 repeticiones de la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, los cuales se distribuyeron en 5 grupos: aceite esencial de *Copaifera officinalis* al 100%, 75%, 50%, 25% e hipoclorito de sodio al 2.5%, considerando 18 repeticiones por cada grupo.

Procedimiento

A) De la obtención del aceite esencial

El aceite esencial de *Copaifera officinalis* fue obtenido de la Empresa Santa Natura con certificación 100% natural. Se prepararon 3 diluciones con etanol a partir del aceite esencial de *Copaifera officinalis* al 100%: 75%, 50% y 25%, las cuales se guardaron a 4 °C para el estudio bacteriológico.

B) De la obtención del hipoclorito de sodio

El hipoclorito de sodio al 2.5% fue obtenido del hipoclorito de sodio "Zonident" al 5% elaborado por la empresa Proquident S.A. diluido con agua destilada.

C) De la obtención de la cepa bacteriana

La cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 fue obtenida del cepario de la Sección de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo.

D) De la preparación de la cepa bacteriana

Fueron cultivadas en frascos de penicilina conteniendo el medio Agar Soya Trypticasa, incubándose a 37 °C para obtener colonias jóvenes. Luego de 24 horas de cultivadas se les agregó solución salina estéril, de tal manera

que se obtuvo una turbidez semejante al tubo número 1 de la escala de Mac Farland.

Los tubos conteniendo la bacteria estudiada fueron girados entre las manos durante 30 segundos, antes de proceder al sembrado, para distribuir los microorganismos adecuadamente.

E) Del sembrado

Con un hisopo estéril, el cual fue embebido en la solución preparada de *E. faecalis* y a una distancia de 10 cm de la llama del mechero, se hizo el sembrado en placas petri, conteniendo Agar Müeller Hinton, hisopando uniformemente sobre toda la superficie del agar y girando cada placa 30 grados por 10 veces aproximadamente.

F) De la prueba de susceptibilidad

Se prepararon discos de papel de filtro estériles, los cuales fueron sumergidos dentro de cada concentración de aceite esencial de *Copaifera officinalis*, y luego, con una aguja estéril, fueron colocados sobre el cultivo de *E. faecalis*. En las placas destinadas al grupo control se utilizó hipoclorito de sodio al 2.5%, las cuales fueron selladas herméticamente utilizando parafilm. Unavez colocados los discos, las placas fueron colocadas en una jarra Gaspak, con una vela encendida a fin de obtener una atmósfera de 5% de CO₂.

La lectura se llevó a cabo a las 24 horas. Se midieron los halos de inhibición de cada concentración de aceite esencial, incluyendo el área del aceite esencial, con una regla milimetrada; y se procedió de igual manera con el hipoclorito de sodio al 2.5%.

ANÁLISIS DE DATOS

Para el análisis estadístico se empleó el test múltiple de comparación de medias conocido como ANOVA. En el caso de rechazar la hipótesis nula se continuará con la aplicación del test de Tuckey para la comparación 2 a 2. La significación estadística será considerada a partir del nivel de 5% de probabilidad.

RESULTADOS

Los valores obtenidos en el presente estudio demostraron que las cepas del *E. faecalis* fueron susceptibles a las diferentes concentraciones de aceite esencial de *Copaifera officinalis* y mayores en comparación con NaOCl al 2.5%, excepto el aceite esencial al 25%.

Se obtuvieron los promedios del diámetro de los halos de inhibición en mm del *E. faecalis* para todas las concentraciones de aceite esencial de *Copaifera officinalis*

hipoclorito de sodio, de tal manera que el aceite esencial al 100% obtuvo un promedio de 15.44 mm de inhibición; al 75% un promedio de 9.11 mm; al 50% un promedio de 8.28 mm; al 25% un promedio de 4.28 mm y el NaOCl al 2.5% un promedio de 4.61 mm (Tabla 1).

El Análisis de Varianza (ANOVA) indica que existen diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) entre el aceite esencial de *Copaifera officinalis* al 100%, 75%, 50%, 25% e hipoclorito de sodio al 2.5% (Tabla 2).

El Test de medias indica que el aceite esencial de *Copaifera officinalis* al 100% difiere significativamente de los demás grupos. En cambio no hay diferencia significativa entre el aceite esencial de *Copaifera officinalis* al 75% y 50%. Tampoco se encontró diferencia significativa entre el aceite esencial de *Copaifera officinalis* al 25% y el hipoclorito de sodio al 2.5% (Tabla 3).

DISCUSIÓN

Es casi una tradición para los dentistas brindar terapias antibióticas en tratamientos odontológicos de rutina, sin embargo, estos no siempre están justificados. Y cuando lo están, los efectos secundarios que acompañan a su uso son mayores que los beneficios que traen consumirlos (26,27). Una opción importante son los productos naturales que pueden tener un efecto localizado y evitar las consecuencias sistémicas no deseada.

Los resultados encontrados de la copaiba peruana indican que su aceite esencial muestra actividad antimicrobiana sobre el *E. faecalis* (16,17,20). Estos efectos parecen estar relacionados con la combinación de sesquiterpenos y diterpenos, que afecta la integridad de la pared celular bacteriana, provocando liberación de los componentes citoplasmáticos, alteración en la morfología y disminución del volumen celular (14,16,20).

En este estudio se demostró que todas las concentraciones de aceite esencial de *Copaifera officinalis* tuvieron efecto sobre los patógenos orales. Esto confirma lo demostrado por Santos et al. (16), que evaluaron la actividad antimicrobiana de los aceites de copaiba obtenidos de varias especies de *Copaifera* (*C. martii*, *C. officinalis* y *C. reticulata*), donde demostraron actividad bactericida in vitro contra un amplio espectro de microorganismos Gram-positivos (*E. faecalis*, *S. aureus*, *B. subtilis* y *S. epidermidis*). Al contrario de Silva et al. (18), que solo encontraron actividad bacteriostática del aceite esencial de *Copaifera officinalis* contra el *E. faecalis*.

Los promedios del halo de inhibición del *E. faecalis* en el presente trabajo, mostraron un aumento creciente a medida que la concentración del aceite esencial de *Copaifera officinalis* iba en aumento. Estos resultados, demuestran

TABLA 1: Promedio de los halos de inhibición del *E. faecalis* a diferentes concentraciones de aceite esencial de *Copaifera officinalis* y NaOCl al 2.5%.

	TRATAMIENTO				
	Copaiba 100%	Copaiba 75%	Copaiba 50%	Copaiba 25%	NaOCl 2.5%
	100%	a 75%	a 50%	a 25%	a 2.5%
Promedio en mm.	15.44	9.11	8.28	4.28	4.61
DE ^a	3.55	4.01	5.18	2.05	2.03

^aDE: Desviación estándar

TABLA 2: Análisis de varianza de la susceptibilidad microbiana del *E. faecalis* a diferentes concentraciones de aceite de copaiba y NaOCl al 2.5%

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	Razón F	*Valor p
Entre grupos	1466.6	4	366.65	28.705	$p < 0.01$
Dentro de grupos	1085.722	85	12.77		
TOTAL	2552.32	89			

*Prueba de ANOVA ($p < 0.05$)

TABLA 3: Test de medias 2 a 2 de la susceptibilidad microbiana del *E. faecalis* a diferentes concentraciones de aceite de copaiba y NaOCl al 2.5%.

Test Tuckey	Copaiba 100%	Copaiba 75%	Copaiba 50%	Copaiba 25%	NaOCl 2.5%
	15.44	9.11	8.28	4.28	4.61

que el aceite esencial de *Copaifera officinalis*, además de tener acción antimicrobiana, tiene relación directa con la concentración utilizada del aceite esencial; es decir, que a mayor concentración del aceite de *Copaifera officinalis* se tiene mayor efecto antimicrobiano.

Se demuestra también, que la susceptibilidad microbiana in vitro del *Enterococcus faecalis* frente al aceite esencial de *Copaifera officinalis* al 100%, 75% y 50% fue mayor que frente al hipoclorito de sodio al 2.5%, y este fue semejante al obtenido por el aceite de copaiba al 25%. Según el Test de Tuckey, no hay diferencia signifi-

ficativa entre el resultado obtenido por el aceite esencial de *Copaifera officinalis* y el hipoclorito de sodio al 2.5%. Estos resultados pueden deberse a la inestabilidad química que presenta el hipoclorito de sodio.

El aceite esencial de *Copaifera officinalis* puede ser un agente antimicrobiano eficaz que puede usarse como medicamento intracanal, irrigante o agente de enjuague final. Sin embargo, se recomiendan más estudios, antes de su uso, con respecto a su efectividad en los conductos radiculares contra las biopelículas, su biocompatibilidad y su capacidad para erradicar la capa residual dental.

CONCLUSIONES

La cepa de estudio de *Enterococcus faecalis* es susceptible a las diferentes concentraciones de aceite esencial de *Copaifera officinalis* al 100%, 75%, 50%, 25% y esta susceptibilidad aumenta de forma directamente proporcional con la concentración utilizada.

Las concentraciones de aceite esencial de *Copaifera officinalis* al 100%, 75% y 50% fueron superiores al hipoclorito de sodio al 2.5%. Esta tuvo susceptibilidad semejante con el aceite esencial de *Copaifera officinalis* al 25%.

BIBLIOGRAFÍA

1. Zhang C, Du J, Peng Z. Correlation between *Enterococcus faecalis* and Persistent Intraradicular Infection Compared with Primary Intraradicular Infection: A Systematic Review. J Endod. 2015 Aug;41(8):1207-13.
2. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. J Endod. 2006 Feb;32(2):93-8.
3. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. J Endod. 2004 May;30(5):315-20.
4. Millones-Gómez P, Bacilio-Amaranto E, Mautua Torres D, et al. Identification and localization of proteins associated with the formation of *Streptococcus gordonii* and *Fusobacterium nucleatum* biofilms, 20 January 2020, PREPRINT (Version 1) available at Research Square [+<https://doi.org/10.21203/rs.2.21373/v1>]
5. Supotngarmkul A, Panichuttra A, Ratisoontorn C, Nawachinda M, Matangkasombut O. Antibacterial property of chitosan against *E. faecalis* standard strain and clinical isolates. Dent Mater J. 2020 Feb 7.
6. Borzini L, Condò R, De Dominicis P, Casaglia A, Ceroni L. Root Canal Irrigation: Chemical Agents and Plant Extracts Against *Enterococcus faecalis*. Open Dent J. 2016 Dec 19;10:692-703.

7. Al-Shwaimi E, Bogari D, Ajaj R, Al-Shahrani S, Almas K, Majeed A. In Vitro Antimicrobial Effectiveness of Root Canal Sealers against *Enterococcus faecalis*: A Systematic Review. J Endod. 2016 Nov;42(11):1588-97.
8. Gölöbek H, Borys KM, Kohli MR, Brus-Sawczuk K, Strułycka I. Chemical aspect of sodium hypochlorite activation in obtaining favorable outcomes of endodontic treatment: An in-vitro study. Adv Clin Exp Med. 2019 Oct;28(10):1311-1319. doi:10.17219/acem/104523.
9. Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. Int Dent J. 2008 Dec;58(6):329-41.
10. Jena A, Sahoo SK, Govind S. Root canal irrigants: a review of their interactions, benefits, and limitations. Compend Contin Educ Dent. 2015 Apr;36(4):256-61; quiz 262, 264.
11. Zehnder M. Root canal irrigants. J Endod. 2006 May;32(5):389-98.
12. Al-Madi EM, Almohamede AA, Al-Obaida MI, Awaad AS. Comparison of the Antibacterial Efficacy of *Commiphora molmol* and Sodium Hypochlorite as Root Canal Irrigants against *Enterococcus faecalis* and *Fusobacterium nucleatum*. Evid Based Complement Alternat Med. 2019 Jul 4;2019:6916795.
13. Jaiswal N, Sinha DJ, Singh UP, Singh K, Jandial UA, Goel S. Evaluation of antibacterial efficacy of Chitosan, Chlorhexidine, Propolis and Sodium hypochlorite on *Enterococcus faecalis* biofilm : An in vitro study. J Clin Exp Dent. 2017 Sep 1;9(9):e1066-e1074.
14. Tobouti PL, de Andrade Martins TC, Pereira TJ, Mussi MCM. Antimicrobial activity of copaiba oil: A review and a call for further research. BiomedPharmacother. 2017 Oct;94:93-99. doi: 10.1016/j.biopha.2017.07.092.
15. Organización Mundial de la Salud. Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales[Internet]. [Consultado 25 Mar 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es/>
16. Santos AO, Ueda-Nakamura T, DiasFilho BP, Veiga Junior VF, Pinto AC, Nakamura CV. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008 May;103(3):277-81.
17. Dalenogare DP, Ferro PR, De Prá SDT, Rigo FK, de David-Antoniuzzi CT, de Almeida AS, Damiani AP, Strapazzon G, de Oliveira-Sardinha TT, Galvani NC, Boligon AA, de Andrade VM, da Silva-Brum E, Oliveira SM, Trevisan G. Antinociceptive activity of *Copaifera officinalis* Jacq. L oil and kaurenoic acid in mice. Inflammopharmacology. 2019 Aug;27(4):829-44.
18. da Trindade R, da Silva JK, Setzer WN. *Copaifera* of the Neotropics: A Review of the Phytochemistry and Pharmacology. Int J Mol Sci. 2018 May 18;19(5).

19. Silva S, Alves N, Silva P, Vieira T, Maciel P, Castellano LR, Bonan P, Vellozo C, Albuquerque D. Antibacterial Activity of *Rosmarinus officinalis*, *Zingiber officinale*, *Citrus aurantiumbergamia*, and *Copaifera officinalis* Alone and in Combination with Calcium Hydroxide against *Enterococcus faecalis*. *Biomed Res Int*. 2019 Dec 12;2019:8129439. doi: 10.1155/2019/8129439.
20. Diefenbach AL, Muniz FWMG, Oballe HJR, Rösing CK. Antimicrobial activity of copaiba oil (*Copaifera* spp.) on oral pathogens: Systematic review. *Phytother Res*. 2018 Apr;32(4):586-596. doi:10.1002/ptr.5992.
21. Guimarães AL, Cunha EA, Matias FO, Garcia PG, Danopoulos P, Swikidisa R, Pinheiro VA, Nogueira RJ. Antimicrobial Activity of Copaiba (*Copaifera officinalis*) and Pracaxi (*Pentaclethra macroloba*) Oils against *Staphylococcus aureus*: Importance in Compounding for Wound Care. *Int J Pharm Compd*. 2016 Jan-Feb;20(1):58-62.
22. Blanco-Olano J, Millones-Gómez PA. Cicatrizing effect of *Aloe vera* gel with *Erythroxy coca* in animal model. *Med. Nat*. 2020; 14 (1):65-74.
23. Joana L Rodriguez-Perez, Pablo A Millones-Gomez. Antibacterial Effect of *Annona muricata* L. Leaves on *Streptococcus mutans* ATCC 25175 Strains 13(10):ZC13-ZC16.
24. Becerra TB, Calla-Poma RD, Requena-Mendizabal MF, Millones-Gómez PA. Antibacterial Effect of Peruvian Propolis Collected During Different Seasons on the Growth of *Streptococcus mutans*. *The Open Dent J* 2019; (13): 327-31.
25. Alvarado-Saavedra SL, Herrera-Plasencia P, Enoki-Miñano E, Ruiz-Barrueto M, Millones-Gómez PA. In vitro antibacterial activity of an ethanolic extract of *Prosopis pallida* against *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. *Rev Cubana Med Trop*. 2018;70(2): 1-12.
26. Millones-Gómez P, Aguirre A. Efficacy of azithromycin associated with RAR in chronic periodontitis: clinical trial, randomized, controlled, triple blind parallel groups. *Rev EspCirug Oral y Maxilofac* 2018; 40(3): 129-34.
27. Millones-Gómez P, Huamani-Muñoz W. Efficacy of antibiotic therapy in reducing the frequency of dry socket single post exodontia. Randomized, controlled, single-blind clinical trial. *Rev Esp Cirug Oral y Maxilofac*;2016, 38 (4): 181-7.