

UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES
CHIMBOTE

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA**

“ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO DEL
ACEITE ESENCIAL DE COPAIFERA OFFICINALIS
(COPAIBA) SOBRE *STREPTOCOCCUS MUTANS*,
CHIMBOTE, 2017”

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
CIRUJANO DENTISTA

AUTOR(A):

JESSUSAN LOREN GODOY VASQUEZ

ASESOR(A):

Mgtr. WILFREDO RAMOS TORRES

CHIMBOTE-PERÚ

2018

TÍTULO

**“ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO DEL ACEITE
ESENCIAL DE COPAIFERA OFFICINALIS (COPAIBA) SOBRE
STREPTOCOCCUS MUTANS, CHIMBOTE, 2017”**

JURADO EVALUADOR

Dr. ELIAS AGUIRRE SIANCAS
PRESIDENTE

Mgtr. ADOLFO SAN MIGUEL ARCE
SECRETARIO

Mgtr. SALLY CASTILLO BLAZ
MIEMBRO

Mgtr. WILFREDO RAMOS TORRES
ASESOR

AGRADECIMIENTO

A mi asesor Wilfredo Ramos Torres, por apoyarme durante el proceso de elaboración de mi tesis y el tiempo que se dio para el desarrollo de este trabajo.

A mi Universidad Católica los Ángeles de Chimbote por permitirme ser un profesional competente y de calidad.

A mis docentes que aportaron en mis sus conocimientos y lograron formarme para ser un buen profesional.

A las doctoras Elva Mejía y Marilú Vasquez Soto de la UNT por apoyarme en la elaboración de este trabajo.

DEDICATORIA

A dios que me da las fortalezas, sabiduría y paciencia para seguir adelante pese algunos por menores en el camino.

A mi madre Luz Vasquez Lozano, que me da su apoyo incondicionalmente, me da aliento, su ejemplo de mujer luchadora y me motiva para conseguir mis objetivos.

A mi padre Rolando Godoy Lopez que siempre me da su mano para seguir adelante y su sabiduría que son para mi ejemplo en la vida.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue conocer el efecto antimicrobiano del acetite de *Copaifera officinalis* en tres diferentes concentraciones de 15%, 10%, 5% sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans*. Los materiales y métodos fueron el aceite de *Copaifera officinalis* que se obtuvieron de la casa naturista “Santa Natura” al 100 %. Se prepararon en 3 concentraciones diferentes siendo al 15% 10% y 5% utilizando como diluyente el dimetilsulfoxido y las cepas que se obtuvieron del laboratorio de la sección de Microbiología de la Facultad de Medicina Universidad Nacional de Trujillo. Se prepararon colonias jóvenes en agar Mueller Hinton- sangre (*S. mutans*), se prepararon suspensiones ajustadas a la turbidez del estándar 0.5 de MC Farland (1.5×10^8 UFC/ml). Para determinar el efecto antimicrobiano se empleó el método de difusión de Kirby y Bauer utilizando como control clorhexidina. Los resultados que se encontraron fueron la diferencia significativa entre las diferentes concentraciones del aceite de corteza de *Copaifera officinalis* y el fármaco de control, sobre el crecimiento del *Streptococcus mutans*, dado que el valor de P de la tabla de análisis de varianza es menos que 0.05. Conclusión, existe actividad antimicrobiana in vitro del aceite del *Copaifera officinalis* sobre el crecimiento microbiano, siendo la concentración al 15% la que obtuvo mayor actividad antimicrobiana.

PALABRAS CLAVE: *Copaifera Officinalis*, *Streptococcus mutans*, Clorhexidina.

ABSTRACT

The objective of the work was to know the antimicrobial effect of the acetyl of *Copaifera officinalis* in three different concentrations of 15%, 10%, 5% on the growth of *Streptococcus mutans*. The materials and methods were the *Copaifera officinalis* oil that was obtained from the naturist house "Santa Natura" at 100%. Three different frequencies were prepared at 15%, 10% and 5%, as a diluent of dimethylsulfoxide and the strains that were obtained from the Microbiology laboratory of the Faculty of Medicine of the National University of Trujillo. Young colonies were prepared on Mueller Hinton-blood agar (*S. mutans*), suspensions adjusted for the turbidity of MC Farland standard 0.5 (1.5×10^8 CFU / ml) were prepared. To determine the antimicrobial effect, the Kirby and Bauer diffusion method was used using chlorhexidine as a control. The results that obtained the difference between the different levels of *Copaifera* oil and the control drug, on the growth of *Streptococcus mutans*, resulted in the P value of the analysis of variance table being less than 0.05. Conclusion, there is in vitro antimicrobial activity of the oil of *Copaifera officinalis* oil on microbial growth, with the concentration at 15% being the highest antimicrobial activity.

KEY WORDS: *Copaifera Officinalis*, *Streptococcus mutans*, Chlorhexidine.

CONTENIDO

1.-Título de la tesis (Carátula).....	ii
2.-Hoja de firma del jurado y asesor.....	iii
3.-Hoja de agradecimiento y/o dedicatoria (opcional).....	iv
4.-Resumen y abstract.....	vi
5.-Contenido (Índice).....	viii
6.-Índice de gráficos, tablas y cuadros.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
III. HIPOTESIS.....	17
IV.METODOLOGÍA.....	18
4.1 Diseño de la investigación.....	18
4.2 Población y muestra.....	18
4.3Técnicas e instrumentos.....	18
4.4 Definición y operacionalización de variables y los indicadores.....	21
4.5 Plan de análisis.....	21
4.6 Matriz de consistencia.....	22
4.7 Principios éticos.....	23
V. RESULTADOS.....	24

5.1 Resultados.....	24
5.2 Análisis de resultados.....	28
VI. CONCLUSIONES.....	30
Referencias bibliográficas.....	31
Anexos.....	35

ÍNDICE DE TABLAS Y CUADROS

TABLA N° 1:

Análisis para tamaño promedio de los halos de inhibición según concentración del aceite de copaiba en comparación con clorhexidina 2% sobre *Streptococcus mutans*.....25

TABLA N° 2:

Comparación múltiple de Duncan para tamaño promedio de los halos de inhibición según concentración del aceite de copaiba en comparación con clorhexidina 2% sobre *Streptococcus mutans*.....26

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRAFICO N°1:

Promedio de los halos de inhibición según concentración del aceite esencial de copaiba
vs clorhexidina.....27

I. INTRODUCCIÓN

Existen al menos alrededor más de 500 especies bacterianas dentro de la cavidad oral, muchas de las cuales se encuentran tanto en la saliva como en la placa dental. La placa dental está íntimamente ligado a la caries dental, de manera que el *Streptococcus mutans*, el microorganismo más importante seguido por el *Actinomyces* y *Lactobacillus* en su mayoría. Siendo la caries dental una enfermedad infectocontagiosa más prevalente, aun es un problema que asecha a la población en muchas partes del mundo, ya que se ve afectada la calidad de vida y sociabilidad de muchos individuos afectados, entonces es necesaria una inversión personal y gubernamental muy importante para su prevención. (1)

Esta caries dental actúa desmineralizando y remineralizando la superficie dentaria que con el pasar del tiempo produce una pérdida de minerales considerables y así a su vez dará como resultado la presencia de una cavidad. Esta cavidad es la resultante de los ácidos láctico, propionico, acético y fórmico producidos por el *Streptococcus mutans* cuando metaboliza carbohidratos fermentables como la sacarosa, glucosa y fructosa. Entonces estos ácidos viajan a través de la placa dental hacia el esmalte poroso, disgregándose y liberando hidrogeniones, los cuales disuelven rápidamente el mineral del esmalte, produciendo calcio y fosfato, estos, a su vez, se irradian fuera del esmalte. Este proceso se conoce como desmineralización. (2)

La medicina natural ha sido usada hace muchos años a tras a partir de plantas medicinales gracias a que presenta sus propiedades curativas ante distintas enfermedades. Es un uso tradicional puesto que este conocimiento de tratar enfermedades a partir de plantas medicinales pasa de generación en generación.

Una de las propiedades de las plantas medicinales son: antimicrobiano, analgésico, cicatrizante, etc. (3)

La población mundial utiliza la medicina popular principalmente a través del uso de plantas medicinales para sus necesidades de asistencia médica primaria. De esta manera, más que el clásico estudio farmacológico, la etnofarmacología, permite obtener información de un producto determinado, siendo esta forma un importante método de estudio de fitoterapéuticos. (3)

Copaifera Officinalis es uno de los géneros de plantas de mayor importancia económica en la región amazónica, ya que exuda una resina de aceite de copaiba con varias propiedades farmacológicas confirmadas. (3)

Este aceite es espeso y claro, el cual cambia de un color amarillo claro a marrón dorado claro. Su olor es característico, de sabor amargo. Es soluble en compuestos orgánicos tales como: Alcohol, bencina, éter, cloroformo. (3)

Esta oleorresina se ha utilizado desde el momento de la llegada de los portugueses en Brasil en la medicina popular tradicional y la silvicultura para una variedad de propósitos, presentando antimicrobiano, antiséptico, cicatrizante, diurético, expectorante, tónico, antiinflamatorios y antibióticos; estos gracias a sus principios activos como triterpenos, esteroides, aldehídos y cetonas. Hoy en día es uno de los productos naturales de la Amazonía que más se comercializan también se exportan a los Estados Unidos, Francia, Alemania e Inglaterra. En el presente trabajo se busca comprobar la efectividad antimicrobiana. (3)

La utilización del aceite de copaiba es por tanto antiquísima y muy difundida y es en la última década que ha tenido mayor difusión en la población urbana debido principalmente a la industrialización del mismo por parte de empresas locales. (3)

La Copaiba es propio de climas tropicales húmedos y secos, de crecimiento lento, que puede alcanzar los 40 metros de altura y vivir alrededor de 400 años, en el Perú se encuentra principalmente en las regiones de Loreto, Madre de Dios y Ucayali. (3)

El tronco es áspero de color oscuro. Las hojas pecioladas y alternas. Las flores hermafroditas y dispuestas en panículas axilares dan un fruto que contienen una sola semilla. La semilla es de forma ovoide, cubierta dura y color negro. La floración y fructificación del Copaiba ocurre alrededor de los 5 años 8. (3)

La madera es unas de las partes más aprovechables y extraídas en la amazonia. Es considerada una madera de gran calidad, resistente al ataque de hongos y fácil de trabajar. Sus principales usos son: la construcción de canoas, ebanistería, parquet, laminado, paneles y muebles. (4)

En el presente trabajo se busca comprobar el efecto antimicrobiano de un producto natural como es el aceite de copaiba en diferentes concentraciones tales son al 15%, 10% y al 5%. Actualmente el uso de los productos naturales como es el caso de las plantas medicinales se ha hecho una opción prometedora en cuanto a sus propiedades que posee e incluso pueden usarse para contribuir a la mejora en ciencias médicas y también puede darse un uso en el ámbito de la odontología, es por eso que se analiza la posibilidad que un producto natural como aceite esencial de la copaiba pueda cumplir un rol importante y esté al alcance de muchas personas.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

Antecedentes

Ramos D. Castro A. (Perú,2014). En su estudio “Actividad antibacteriana de *Copaifera reticulata* “Copaiba” sobre *Phorphyromonas gingivalis* aisladas de pacientes con periodontitis” Metodología. De un total de 43 muestras de biopelícula subgingival de pacientes con periodontitis, se pudo aislar 20 cepas clínicas de *Phorphyromonas 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. Su identificación definitiva se llevó acabo 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 *Phorphyromonas 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 oleorresina de copaiba en esta patología. (5)

Jose F. (Perú,2013). Actividad antimicrobiana -in vitro del aceite de Copaiba frente a bacterias patógenas, Instituto de Medicina Tropical Daniel Alcides Carrión -Facultad de Medicina. La presente tesis evalúa y determina “in vitro la actividad antimicrobiana del aceite de Copaiba (*Copaifera paupera*) obtenido del árbol del mismo nombre, frente a las bacterias patógenas: *Escherichia coli*(ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa*(ATCC 27853), *Staphylococcus aureus*(ATCC 25923).La actividad antimicrobiana in vitro del aceite de copaiba se determinó usando la metodología de difusión en disco de Kirby-Bauer, método recomendado por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos y estandarizado para el estudio. Se logró establecer el volumen óptimo (5 microlitros) de aceite de Copaiba a impregnarse en los discos problemas para un adecuado efecto antimicrobiano y estandarización del método. La actividad antimicrobiana fue comparada utilizando los siguientes discos patrones: Ceftriaxona (30ug), Ciprofloxacino (5ug) y Gentamicina (10ug). Se logró obtener un efecto antimicrobiano adecuado con la cepa de *Phorphyromonas aeuroginosa*. El presente estudio es de tipo descriptivo, observacional y de corte transversal. (6)

Souza A. Souza M. et al. (Brasil,2011). Evaluación antimicrobiana de diterpenos de *Copaifera langsdorffii* oleorresina contra bacterias anaeróbicas periodontales, Se investigó la actividad antimicrobiana de cuatro diterpenos tipo labdano aislados de la oleorresina de *Copaifera langsdorffii*, así como de dos diterpenos comercialmente disponibles (sclareol y manool) contra un panel representativo de microorganismos responsables de la periodontitis. Entre todos los compuestos evaluados, (-) - el ácido copálico (CA) fue el más activo, mostrando un valor de MIC muy prometedor ($3.1 \mu\text{g mL}^{-1}$; $10.2 \mu\text{M}$) contra el patógeno clave (*Phorphyromonas gingivalis*) involucrado en

esta enfermedad infecciosa. Además, AC no mostró citotoxicidad cuando se probó en fibroblastos humanos. Ensayos de curva de tiempo-muerte realizados con AC contra *P. gingivalis* reveló que este compuesto solo inhibía el crecimiento de los inóculos en las primeras 12 h (efecto bacteriostático). Sin embargo, su efecto bactericida se notó claramente a partir de entonces (entre 12 y 24 h). También fue posible verificar un efecto aditivo cuando AC y clorhexidina dihidrocloruro (CHD, control positivo) se asociaron a sus valores MBC. El perfil de curva de tiempo resultante de esta combinación mostró que esta asociación necesitaba solo seis horas para que se notara el efecto bactericida. En resumen, AC ha demostrado ser un metabolito importante para el control de enfermedades periodontales. Además, el uso de extractos estandarizados basados en oleoresina de copaiba con altos contenidos de AC puede ser una estrategia importante en el desarrollo de nuevos productos para el cuidado bucal. (7)

Pieri F. Mussi M. Fiorini J. Schneedorf J(Brasil,2010). En su estudio “Los efectos clínicos y microbiológicos de aceite de copaiba (*Copaifera officinalis*) sobre las bacterias formadoras de placas dentales en perros” El potencial de uso de aceite de copaiba (*Copaifera officinalis*) en la prevención de la enfermedad periodontal, la eliminación de su agente etiológico se evaluó en 18 perros mestizos, distribuido uniformemente en tres grupos: de ensayo (que contiene aceite de copaiba) control positivo y control negativo. Los tratamientos ocurrieron tres veces al día durante ocho días. Al noveno día, los animales recibieron aplicación tópica de fucsina básica 0,5% para evidencia del biofilm. Los cambios en la halitosis y la gingivitis fueron evaluados diariamente por inspección visual. En adición, se realizaron pruebas de laboratorio inhibición de la adhesión de *Streptococcus mutans* y ensayo antimicrobiano de difusión en agar, sobre bacterias formadoras de placa dental. Los resultados de la placa

evidenciada señalaron áreas de cobertura microbiana en los dientes de $53,4 \pm 8,8\%$, $28,5 \pm 5,4\%$, y $22,3 \pm 5,3\%$ para los grupos negativo, positivo y test, respectivamente, indicando diferencia entre el control negativo y los demás grupos ($P < 0,05$). En cuanto a la mejora en los aspectos clínicos, la halitosis y la gingivitis, el grupo de pruebas respondió mejor cuando se compara al grupo control negativo ($P < 0,05$). El análisis de los ensayos de difusión e inhibición de adherencia mostró superioridad del grupo de la copaiba (prueba) en relación a los otros grupos ($P < 0,05$). Los resultados sugieren el uso del aceite de copaiba en la prevención de la enfermedad periodontal y como un posible sustituto de la clorhexidina en la terapia antimicrobiana oral. (8)

Mendonça E. et al. (Brasil,2009). En su estudio “La actividad antimicrobiana de oleorresina producida por copaiba - *Copaifera multijuga* Hayne (*Leguminosae*)” La investigación de plantas con fines medicinales tiene gran importancia para la comunidad médica, una de ellas es la resina oleosa extraída de copaiba, *Copaifera multijuga* Hayne, que es natural de la región amazónica donde se encuentra una gran diversidad de esta especie. Su uso medicinal, por su amplia difusión, se convierte en los fitofármacos más utilizados y conocidos por las poblaciones pobres de la región norte de Brasil, siendo utilizado como diurético, laxante, antitetánico, antialérgico, antirreumático, antiséptico para sistema urinario, antiinflamatorio, antitusivo, cicatrizante y medicinal para combatir el cáncer. El presente trabajo muestra los resultados de la evaluación de esta actividad antimicrobiana del aceite mediante la técnica de difusión en agar en ambiente Muller-Hinton. Las cepas evaluadas fueron: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027). Las placas se incubaron en casas calientes durante 24 horas a una temperatura de 35 °C. Los antibióticos de amoxicilina (AMO-10 mg / disco), cloranfenicol (CLO-30 mg / disco) y

tetraciclina utilizados (TET-30 mg / disco) como estándar. Los resultados mostraron que el aceite tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de tres bacterias evaluadas, presentando una concentración inhibitoria mínima de 1,56, 3,12 y 12,5% para *Escherichia coli*, *S. aureus* y *Phorphyromonas aeruginosa*, respectivamente. (9)

Pieri F. et al. (Brasil, 2007). En su estudio "Efecto bacteriostático de aceite de copaiba (*Copaifera officinalis*) contra *Streptococcus mutans*" Este estudio evaluó la actividad inhibitoria de aceite de copaiba (*Copaifera officinalis* contra microorganismos cariogénicos *Streptococcus mutans*. Para esto, se realizó una prueba de concentración mínima inhibitoria contra el aceite de copaiba *S. mutans*, utilizando la técnica de dilución seriada en caldo, con un control negativo, un control positivo (clorhexidina a 0,12%) y una solución de aceite de copaiba 10% como prueba. También se llevó a cabo una prueba de concentración mínima bactericida con los tubos que presentaron inhibición microbiana. En el ensayo de concentración inhibitoria mínima, el aceite de copaiba mostró inhibición del crecimiento bacteriano en todas las concentraciones probadas hasta 0,78 μL / mL de la solución al 10% del aceite de copaiba en el caldo. Además, el control negativo no tuvo ninguna inhibición, y la solución de clorhexidina 0,12% fue eficaz hasta 6,25 μL / mL en el caldo. El aceite copaiba mostró una actividad bacteriostática contra *S. mutans* en bajas concentraciones, presentándose, así como una opción de fitoterápico a ser utilizado contra bacterias cariogénicas en la prevención de caries. (10)

Pacheco T. (2006) En su estudio "Actividad antimicrobiana de bálsamos de copaiba (*Copaifera spp*)" describe las pruebas antimicrobianas realizadas con 11 oleorresinas de diferentes árboles recolectados en los estados de Amazonas y Pará. Los la actividad fue probada contra Gram-positivos (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*) y Gram-

negativos (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) bacterias. Cultivos bacterianos se cultivaron en agar nutriente, y los inóculos se prepararon mediante dilución de cultivos durante la noche con el medio líquido Muller-Hinton. En la evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana se realizó mediante el método de microdilución. Los resultados se expresaron como concentración mínima inhibitoria (MIC). Cloranfenicol se usó como control positivo. Los resultados revelaron la inactividad de todas las muestras contra bacterias Gram-negativas hasta 1000 µg / ml. Sin embargo, los aceites 2, 5 y 10 se muestran significativa actividad contra *B. subtilis* y *S. aureus*. La mayoría de los aceites mostraron diferentes niveles de inhibición, lo que confirma la importancia de la estandarización, una vez que Copaiba Balsam se usa libremente en la medicina popular. (11)

Bases teóricas relacionadas con el estudio

Aspectos generales de la copaiba

REINO: *Plantae*

PHYLUM: *Magnoliophyta*

CLASE: *Magnoliopsida*

ORDEN: *Fabales*

FAMILIA: Leguminosae

GÉNERO: *Copaifera*

ESPECIE: *Copaifera officinalis*

Historia

El nombre copaiba tiene origen de los tupí "cupa-YBA", que significa "árbol del tanque", en referencia al aceite que tiene en su parte interna. El árbol de copaiba es común en América Latina y África Occidental, también en Brasil, en el sudeste, medio oeste y en Amazonas. (6,12,13,14)

Tales plantas viven unos 400 años y alcanzan una altura entre 25 y 40 metros, un diámetro de entre 0,4 y 4 metros, su corteza es aromática, de denso follaje, sus flores y frutos secos son pequeños. Las semillas son ovaladas con un arillo negro y amarillo rico en lípidos. Del árbol de Copaiba se extrae aceite de resina que varía el color de oro amarillo a marrón, dependiendo de la especie. (6,12,13,14)

La madera de algunas especies de copaiba se caracteriza por su superficie lisa, brillante, duradera y de alta resistencia al ataque de descomposición de la madera y baja

permeabilidad, que son características deseables para su uso en la fabricación de piezas torneadas y la carpintería en general. (6,12,13,14)

Entre las especies más abundantes en Brasil y América del Sur son *Copaifera officinalis* L., *Copaifera guianensis*, *Copaifera reticulata* Ducke, *Copaifera multijuga* Hayne, *Copaifera confertiflora*, *Copaifera officinalis*, *Copaifera cariacea* y *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke. (6,12,13)

Se supone que tal conocimiento proviene de la observación del comportamiento de algunos animales heridos, que se sobaban en la corteza de los árboles de copaiba, en busca de la curación de las heridas. Es pues que, de esta manera, a partir de los primeros años del descubrimiento, con las observaciones, frailes jesuitas y las historias de los viajeros, ha sido recomendado para diversos fines curativos. (6,12,14). La primera vez que fue citado el aceite de copaiba fue probablemente en el año 1534. Al mismo tiempo, fue publicado por el jesuita José Acosta, "De Natura Novi Orbi", fue llamado "Historia natural y moral de las Indias. En 1821, la Desfontaines francés añadió dos nuevas especies al género *Copaifera*: la *C. guianensis* y *C. langsdorffii*. (6,12,13)

Extracción de oleorresina

El aceite de resina se puede obtener mediante la perforación. Existieron numerosas formas de extracción que causaron graves daños a los árboles o incluso causaron su muerte. Sin embargo, una técnica ha sido considerado como la única no agresiva y que hoy es el más utilizado, que consiste en el tronco con una barrena de perforación de aproximadamente 2 metros de diámetro en dos agujeros. El primero se debe hacer 1 metro por encima de la base de la planta y la segunda de 1 a 1,5 metros por encima de la primera. Entonces se inserta en un tubo de 3/4 pulgada PVC en los agujeros, a través

del cual fluye el aceite, y las reservas de petróleo. Después de la terminación de la extracción, sellando el agujero para la protección contra los hongos y termitas el uso de la arcilla para sellar y para ser retirado fácilmente para más cultivos de aceite con mayor facilidad de manipulación. Se observó una sustancia que se llama ácido copaibico, cuando el aceite de resina se mantuvo demasiado tiempo en reposo. Desde allí otras sustancias como el ácido oxycopaívico, en ácido metacopaívico, también ácido paracopaívico y ácido homocopaívico. (6,12,13)

La resina de bálsamo de copaiba es una sustancia natural compuesto de una parte sólida la resina, no volátil formado por ácidos diterpeno representa el 55-60% del aceite que se utiliza como ungüentos, se diluyó en la otra parte, un aceite esencial compuesto de sesquiterpenos. Estos se pueden dividir en sesquiterpenos oxigenados (alcoholes) e hidrocarburos de sesquiterpeno, tienen mayor actividad antiinflamatoria en comparación con los otros dos grupos presentes. El aceite extraído puede variar de la concentración y naturaleza de la presente diterpenos y sesquiterpenos de acuerdo con las variaciones de las especies, factores biológicos tales como insectos y hongos. (6,12,13)

De acuerdo a algunos autores, se describe como procedente de un poco de aceite de copaiba, 72 sesquiterpenos y 27 o 28 diterpenos. Los principales sesquiterpenos que se encuentran en la oleorresina de la copaiba son β -cariophileno, Que ha demostrado acción antiinflamatoria, antibacteriana, antifúngica y antiedémica, β -bisaboleno como se describe como propiedades antiinflamatorias y analgésicas.

El aceite esencial extraído de las hojas copaiba destaca tiene una composición similar a la de la resina de sesquiterpeno aceite volátil con sustancias tales como β -cariofileno, cadinol, germacreno D y B y γ -cadineno. (6,12,13)

Uso Médico de aceite de copaiba

El aceite-resina que se extrae de los stands de copaiba recibe indicación de la medicina tradicional. Sus principales propiedades terapéuticas mencionadas son la actividad anti-inflamatoria (15), cuyos componentes hidrocarburos son los responsables principales, sesquiterpeno, especialmente. β -bisaboleno y β -cariofileno la acción curativa antiséptica, antitumoral, antibacteriano, germicida, expectorante, diuréticos y analgésicos. Otras indicaciones también son conocidas como acción antiviral, antidiarreico, contra el reumatismo, psoriasis, hemorragia, enfermedades de la piel, urticaria la neumonía, la parálisis, dolor de cabeza, anti-ulcerogénicos, afrodisíaco, antiinflamatorio, efecto citoprotector y antisecretor, cicatrizante. (15,16,17)

El extracto de hojas de copaiba se encuentra ha sido nombrada como una de sus funciones, la actividad antioxidante, la función no probada en el aceite de resina.

Se han descubierto otras acciones, como vasodilatador. (6,12,13,15,16,17,18,19,20)

Streptococcus mutans

Flora microbiana oral

La cavidad oral es habitada por muchos microorganismos, es sino antes de la erupción de los dientes, que se dice que el ser humano cuando nace está libre de bacterias en la cavidad oral, es entonces que cuando brotan las primeras piezas dentales, va a traer consigo la formación de la placa dental la placa dental desarrollándose en las superficies dentales expuestas. La placa dental está cubierta por una capa sin forma, quizá invisible formada especialmente por glicoproteínas salivales. Por ende, al no tomar medidas

adecuadas en la higiene oral, las superficies de las piezas dentarias acumulan grandes cantidades de microorganismos perjudiciales. Por otro lado, en la superficie de la mucosa no ocurre esto puesto ya que gracias a la descamación de células epiteliales no permite la acumulación de placa dentaria en las superficies de la mucosa oral. (21)

La boca es un ecosistema donde coexiste un aproximado de 1010 microorganismos, siendo el 60% cultivable. Las cuales entre 500 y 700 especies son aquellas que colonizan las mucosas y dientes las que a su vez forman la placa bacteriana o biofilm, es en este grupo que están presentes las del género *Streptococcus*. Las especies microbianas predominantes son notablemente diferentes en los sitios de localización. A pesar de ello los estreptococos conforman el mayor porcentaje del total de la población bacteriana en la placa bacteriana. Los estreptococos pueden ser identificados como una de las siguientes especies: *S. sanguis*, *S. mutans*, *S. salivarius*, y *S. milleri*. (21)

Parece que ciertas especies estreptocócicas orales tienen preferencia por colonizar sitios específicos de la cavidad oral, por ejemplo, el *S. sanguis* y *S. mutans* optan por colonizar las superficies de dientes y aparatos prostéticos. Las especies más significativas en el ser humano son *Streptococcus sobrinus* y *Streptococcus mutans*, ya que estos se han distinguido por ser colonizadores secundarios del biofilm que rodea a las piezas dentarias y su patogenicidad se ha demostrado en relación a la producción de caries en el esmalte, esto gracias a su capacidad de producir ácidos desde de la sacarosa. (21)

Streptococcus mutans

Es un coco Gram positivo, puesto en cadenas largas y cortas, no móvil, anaerobios o aerobios facultativos, ausencia de capsulas, también poseen glucotransferasas de alto y bajo peso molecular, es un productor de ácido láctico con disposición de cambiar un

medio de pH 7 a pH 4.2, en alrededor de, 24 horas. Fermentador de glucosa, lactosa, rafinosa, manitol, inulina y salicina con la producción de ácido. (21)

El hábitat natural de *S. mutans* es la cavidad oral, es decir, las colonias se adhieren muy cerca de la superficie del diente y a la par se puede recuperar en lesiones cariosas. Todas las patologías infectocontagiosas que afectan a la población humana, la caries dental es seguramente la más incidente puesto que a los microorganismos que producen la caries tal es el caso del *Streptococcus mutans*, que se viene implicado como el principal agente etiológico de la caries dental. Ya que este viene a producir ácido láctico, ácido propiónico, ácido acético y ácido fórmico los cuales metabolizan carbohidratos fermentables como la sacarosa, glucosa y fructosa. (21)

Estos ácidos van a transitar a través de la placa bacteriana a el esmalte poroso entonces así van a disolver el mineral del esmalte, dando calcio y fosfato, que, a su vez, propagan fuera del esmalte. Por ende, esta serie de sucesos se le denomina desmineralización. (21)

Clasificación de *Streptococcus mutans*

De acuerdo con la estructura y los enlaces de los polisacáridos de la pared celular, estreptococos del grupo mutans se pueden clasificar en 8 serotipos: *Streptococcus mutans* su serotipos *c*, *e*, *f* y *k*, *Streptococcus macacae* su serotipo *c*, *Streptococcus cricetus* su serotipo *a*, *Streptococcus rattus* su serotipo *b*,, *Streptococcus ferus* su serotipo *c*, *Streptococcus downei* su serotipo *h* y *Streptococcus sobrinus* su serotipos *d* y *g*. Por lo cual se dice que el serotipo *c* de *Streptococcus mutans* es el tipo sobresaliente en boca. Los polisacáridos de la pared celular juegan un rol importante en la colonización de sus nichos ecológicos. *Streptococcus mutans* habitualmente es destacado como patógeno dental e igualmente se supone que causa bacteriemia y endocarditis infecciosa.

Un factor biológico común del serotipo k es su bajo nivel de cariogenicidad, respectivamente a la virulencia en sangre. (22)

Medios de cultivo

Afortunadamente, muchas de las especies de estreptococos orales pueden aislarse usando distintos medios:

Medios selectivos para *Streptococcus* orales: Agar Mitis Salivarius, su uso ha prevalecido sobre otros medios de cultivo para el aislamiento de estreptococos orales, conteniendo al *Streptococcus mutans*, los estreptococos orales pueden distinguir por su habilidad para fermentar algunos azúcares (especialmente manitol y sorbitol) y por adherirse a superficies lisas en presencia de sacarosa. (22)

El cultivo en agar es considerado como el estándar de oro ya que permite realizar recuentos bacterianos para establecer proporciones relativas, mediante métodos cuantitativos en medios no selectivos. (22)

Al presente tenemos 5 medios de cultivo distintos para el aislamiento de *Streptococcus mutans*, tales como: Agar glucosa-sacarosa-telurito bacitracina, Agar Trypticase de soya con sacarosa, Agar Mitis Salivarius con bacitracina y kanamicina, Agar Mitis salivarius con bacitracina, bacitracina y Agar triptona extracto de levadura cisteína con sacarosa y bacitracina. (22)

III. HIPÓTESIS

El aceite de *copaifera officinalis* es un efectivo antimicrobiano contra las bacterias de *Streptococcus mutans*.

IV. METODOLOGÍA

4.1 Diseño de la investigación

El diseño es de tipo cuantitativo, de nivel explicativo, de diseño longitudinal, experimental.

4.2 Universo y muestra:

Universo y Muestra

Universo: Cepas de Streptococcus mutans extraídas del laboratorio de microbiología de la Facultad de Medicina de la UNT.

Muestra: Las 12 placas Petri que contienen las bacterias.

4.2.3 Criterios y control de balance

Fueron excluidos, aquellos cultivos en los que se observó deficiencias de manipulación.

4.3 Técnica e instrumentos de recolección de datos

Los datos fueron registrados en una ficha (anexo 01), que contiene los diámetros de los halos de inhibición de los cultivos de Streptococcus mutans y clorhexidina.

4.3.1 Materiales biológicos y químicos

Material biológico y químico

Material botánico

La obtención del aceite esencial de copaiba se realizará a través de la compra en una casa naturista “Santa Natura”.

Cepas bacterianas

Las cepas de Streptococcus mutans fueron obtenidas del laboratorio de la sección de microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo.

Fármacos utilizados como control

Clorhexidina: discos de sensibilidad de clorhexidina.

4.3.2 Diseño procedimental

Elaboración del aceite de *Copaifera officinalis*

La obtención del aceite esencial de copaiba se realizó a través de la compra en una casa naturista “Santa Natura”

Preparación de diferentes concentraciones del aceite de copaiba

La obtención del aceite esencial de copaiba se realizó a través de la compra en una casa naturista “Santa Natura”. Preparación de las diferentes concentraciones del aceite de copaiba. Las concentraciones se prepararon según el siguiente cuadro:

Volumen de aceite de copaiba	Volumen de Dimetilsulfóxido (DMSO)	Volumen final	Concentración (%)	Concentración (mg/mL)
0.5mL	9.5 mL	10 mL	5	47.2 mg/mL
1 mL	9.0 mL	10 mL	10	94.0 mg/mL
1.5mL	8.5 mL	10 mL	15	141.6 mg/mL

Volumen de aceite de copaiba Volumen de Dimetilsulfóxido (DMSO) Volumen final
Concentración (%) Concentración (mg/mL), Luego, se colocaron cada una de las concentraciones en frascos de vidrio color ámbar para protegerlos de la luz. Posteriormente fueron colocados a refrigeración a 4 °C, hasta la realización del análisis microbiológico.

Preparación de la cepa

Las cepas fueron reactivadas utilizando agar Mueller hinton para *Streptococcus mutans*, para obtener varias colonias jóvenes. Todas las cepas se incubaron a 37° entre 18 a 24 horas.

Determinación del efecto antimicrobiano:

Luego de haber obtenido colonias jóvenes de cada una de las cepas, se tomó una muestra del cada cultivo con el asa bacteriológica y se preparó una suspensión con solución salina estéril a partir de las colonias jóvenes hasta alcanzar una turbidez semejante estándar 0.5 de Mc Farland (1.5×10^8 UFC/ml), esta comparación se llevó a cabo visualmente utilizando un fondo blanco con líneas negras contrastantes y fuentes de luz adecuada. Los tubos, conteniendo las bacterias, fueron girados entre las manos durante 30 segundos, antes de proceder al sembrado. Se utilizó esta suspensión para inocular las placas que contenían 15 ml de Agar Mueller Hinton sangre para *Streptococcus mutans*. La siembra se realizó utilizando un hisopo estéril, el cual fue embebido en el tubo de la cepa diluida, a una distancia de 10 cm de la llama de mechero.

Prueba de susceptibilidad

Para la prueba de susceptibilidad se utilizó el método de Kirby y Bauer (difusión de discos), para lo cual se utilizaron las 3 concentraciones de 15%, 10% y 5%. Se utilizaron discos de papel de filtro Whatman N°4 de 6 mm de diámetro, los cuales fueron embebidos en las diferentes concentraciones del aceite, luego con una aguja estéril se colocaron sobre las placas Petri previamente preparadas con los cultivos de *Streptococcus mutans*. Además, colocaron los discos con solución de control. Posteriormente las placas se incubaron a 37°C en la estufa por 24 horas. La lectura se llevó inmediatamente después de retirar las placas de la estufa, y se midieron los halos de inhibición de cada disco, incluyendo el área del disco de papel filtro, con una regla milimetrada.

4.4. Definición y operacionalización de variables y los indicadores

Variable	Definición Conceptual	Indicador	Escala	Tipo	valor
Aceite esencial de copaiba	Sustancia extraída de la planta <i>Copaifera officinalis</i>	Aceite en diferentes concentraciones	Nominal	Cualitativa	5% 10% 15 %
Microorganismo	Ser vivo que solo puede visualizarse al microscopio, que presenta una organización biológica elemental	halo de inhibición	Razón	Cuantitativa	Número

4.5. Plan de Análisis e interpretación de la información

Para analizar la información se construirán tablas de frecuencias de una entrada con sus valores absolutos, se calculó el promedio y desviación estándar de las observaciones de cada grupo. Para determinar la efectividad antimicrobiana del aceite de copaiba sobre *Streptococcus mutans* se hizo el análisis de varianza de un diseño completamente aleatorizado y para las comparaciones múltiples se empleó la prueba de Duncan, ambas pruebas con un nivel de significancia del 5% ($p < 0.05$), para procesar la información se hará uso de los paquetes estadísticos Excel y SPSS.

4.6 Matriz de consistencia

PROBLEMA	OBJETIVOS	METODOLOGIA	POBLACION
¿Cuál es el efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de Copaifera officinalis(Copaiba)sobre Streptococcus mutans” (ATCC 25175).	Determinar la efectividad como antimicrobiano in vitro del aceite esencial de Copaifera officinalis (copaiba) sobre Streptococcus mutans” (ATCC 25175).	<p>Tipo de investigación</p> <ul style="list-style-type: none"> •Tipo cuantitativo <p>Nivel de la investigación</p> <ul style="list-style-type: none"> •Nivel explicativo <p>Diseño de la investigación</p> <ul style="list-style-type: none"> •Según el n° de observación: longitudinal •Según la Manipulación de variables: experimental 	<p>Universo y Muestra</p> <p>Universo: Cepas de Streptococcus mutans extraídas del laboratorio de microbiología de la Facultad de Medicina de la UNT.</p> <p>Muestra: Las 12 placas Petri que contienen las bacterias.</p>
	<p>Objetivos específicos</p> <ul style="list-style-type: none"> •Determinar la efectividad como antimicrobiano in vitro del aceite esencial de Copaifera officinalis (copaiba) al 15 % sobre Streptococcus mutans” (ATCC 25175). •Determinar la efectividad como antimicrobiano in vitro del aceite esencial de Copaifera officinalis (copaiba) al 10 % sobre Streptococcus mutans” (ATCC 25175). •Determinar la efectividad como antimicrobiano in vitro del aceite esencial de Copaifera officinalis (copaiba) al 5 % Sobre Streptococcus mutans” (ATCC 25175). 		

4.7 Principios éticos

El presente estudio contó con la autorización de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo, en concordancia con las recomendaciones establecidas en la declaración de Helsinki, adoptado por la 18ª Asamblea Médica Mundial en Helsinki, Finlandia, junio 1964 y modificada por la Asamblea Médica Mundial en Tokio, enero 2004. (23)

V. RESULTADOS

5.1 Resultados

En el presente estudio se ha evaluado la susceptibilidad antimicrobiana in vitro del aceite esencial de copaiba en diferentes concentraciones sobre el *Streptococcus mutans*, teniendo como disco de control a la clorhexidina al 2%.

En la Tabla N°1, Se presentaron los valores del promedio y desviación estándar del halo de inhibición del efecto antimicrobiana del aceite esencial de copaiba en diferentes concentraciones sobre el *Streptococcus mutans*. Los resultados indican que el valor más alto corresponde al del aceite de *copaifera officinalis* al 15%.

En la Tabla N°2 indica que el aceite de *copaifera officinalis* al 15% difiere significativamente de los demás grupos. En cambio, no hay diferencia significativa entre el aceite de *copaifera officinalis* al 10% y 5%. También se encontró diferencia altamente significativa del aceite de *copaifera officinalis* al 15% y la clorhexidina al 2%

TABLA N°1: TAMAÑO PROMEDIO DE LOS HALOS DE INHIBICION SEGÚN CONCENTRACION DEL ACEITE DE COPAIBA EN COMPARACION CON CLORHEXIDINA 2% SOBRE ESTREPTOCOCCUS MUTANS.

Concentraciones de aceites y clorhexidina	N	Promedio	Desviación estándar
Clorhexidina 2%	12	19.00	0.603
5%	12	8.08	0.793
10%	12	9.58	0.996
15%	12	10.08	1.240

GRAFICA N°1: PROMEDIO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN SEGÚN CONCENTRACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE COPAIBA VS CLORHEXIDINA.

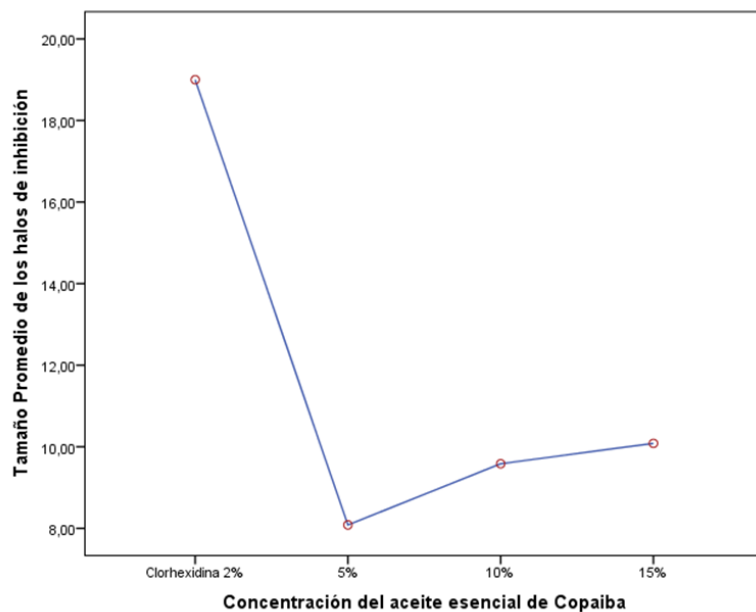


TABLA N°2: COMPARACION MULTIPLE DE DUNCAN PARA TAMAÑO PROMEDIO DE LOS HALOS DE INHIBICION SEGÚN CONCENTRACION DEL ACEITE DE COPAIBA EN COMPARACION CON CLORHEXIDINA 2% SOBRE ESTREPTOCOCCUS MUTANS

Comparación del Tamaño de los halos de inhibición según grupos de tratamiento				
Concentración del aceite esencial de Copaiba vs Clorhexidina 2%	n	sub grupos para alfa = 0.05		
		1	2	3
5%	12	8.08		
10%	12		9.58	
15%	12		10.08	
Clorhexidina 2%	12			19.00

Primero se aplicó la prueba de Anova ($p=0,00$), después se hizo a la prueba de Duncan con la significancia y se observó que hay efecto microbiano y varía según la concentración por ejemplo en el porcentaje de 5% comparado con el 10% hay una diferencia significativa mientras que la concentración del 10% y el 15% no tuvieron mucha diferencia significativa.

5.2 Análisis de resultados

En el estudio actividad antimicrobiana del aceite esencial de copaiba sobre el *Streptococcus mutans*. In vitro. Se obtuvieron resultados reproducibles favorables que demostraron una actividad antimicrobiana por el método de Kirby-Bauer, Utilizando 3 concentraciones y un disco control como es el caso de la clorhexidina al 2%.

Los resultados obtenidos confirman a lo encontrado por otros autores; tal es el caso del estudio de **Ramos P.** que afirma la actividad antibacteriana de Copaiba sobre *Phorphyromonas gingivalis* aisladas de pacientes con periodontitis. (14)

Además, **Mendonça D** nos dice en su trabajo que es de importancia saber que la capacidad antibacteriana de la oleoresina de Copaiba está comprobada por su acción sobre bacterias Gram positivas como *Stafilococcus aureus*, *bacillus subtilis* y gram negativas como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. (15)

Así también en el estudio de **Pieri F.** en su estudio que se denomina como “Clinical and microbiological effects of copaiba oil (*Copaifera officinalis*) on dental plaque forming bacteria in dogs”, mostró estos hallazgos sugieren que el aceite de copaiba puede reemplazar eficazmente la clorhexidina para la terapia antimicrobiana oral y prevención de la enfermedad periodontal. (16)

Por otro lado, según el trabajo de **Pieri F.** sobre el efecto antimicrobiano el aceite de copaiba sobre el *Streptococcus mutans*, mostro que el aceite de copaiba tiene efecto bacteriostático, las cuales determinan un efecto bacteriostático del aceite de copaiba in vitro, y esta acción puede determinarse según por el ácido copálico. (18)

Mendonça E. En su estudio “La actividad antimicrobiana de oleoresina producida por copaiba - *Copaifera multijuga* Hayne (*Leguminosae*)”, Los resultados mostraron que el

aceite de copaiba tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de tres bacterias evaluadas, presentando una concentración inhibitoria mínima para *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, respectivamente. (9)

Por último, **José F.** en su estudio, Actividad antimicrobiana -in vitro del aceite de Copaiba frente a bacterias patógenas, Instituto de Medicina Tropical Daniel Alcides Carrión -Facultad de Medicina, se mostró que sólo en el caso de *Pseudomonas aeruginosa* se obtuvo un halo de inhibición significativo. En el caso de *Escherichia coli*, se determinó resistencia para el aceite de copaiba. En el caso *Staphylococcus aureus* los volúmenes utilizados de 7 y 8 uL evidencian cierto halo de sensibilidad, entonces el efecto antimicrobiano se da en el aceite de copaiba sobre patógenos, este va a depender del tipo de copaiba que utilicemos y a qué tipo de bacterias utilicemos, la concentración que le demos para su efectividad. (6)

Así podemos concluir que existe efectividad antimicrobiana del aceite esencial del aceite de *copaifera officinalis* y que de acuerdo a nuestro estudio este efecto variará dependiendo a la concentración que apliquemos y a que bacterias utilicemos.

VI. CONCLUSIONES

*El aceite de *Copaifera officinalis* tiene un efecto positivo como antimicrobiano sobre el *Streptococcus mutans*, por ende, se realizaron 3 muestras de 5%, 10% y 15% con el fin de comprobar su efecto antimicrobiano.

*Con la muestra con concentración de copaiba al 5% este tuvo una variación de 7-9 milímetros en la placa, así mismo con la concentración de copaiba al 10% este tuvo una variación 10-9 mm, por último, la concentración de copaiba al 15% se obtuvo el mayor efecto antimicrobiano a diferencia de los dos porcentajes del aceite, esta tuvo una variación 12-8 mm. Por lo que se quiere decir que a mayor concentración aumentara el efecto sobre el *Streptococcus mutans*.

*El aceite de *Copaifera officinalis* tiene menor efecto antimicrobiano comparado con la clorhexidina al 2%.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moromi H, Martinez Cadillo E, Ramos Perfecto D. Antibacterianos naturales orales: Estudios en la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. *Odontol. Sanmarquina* 2009; 12(1): 25-28
2. Castro Arqueros V. Inhibición del crecimiento in vitro de *Streptococcus mutans* por Papaina y Sanitrend.[Tesis Titular]. Santiago: De Universidad de Chile; 2005.
3. Bocanegra Arista R. Sensibilidad bacteriana in vitro del *Enterococcus faecalis* frente a diferentes concentraciones de aceite esencial de *Copaifera officinalis* (copaiba) en comparación con hipoclorito de sodio al 2,5 % [tesis magistral] Perú: biblioteca digital- dirección de sistemas de informática y comunicación, Universidad Nacional de Trujillo; 2009. 47 p.
4. Ministerio de economía y finanzas: “Ficha estándar n° 90 familia 20720018 madera copaiba” Disponible en:
https://www.mef.gob.pe/contenidos/doc_siga/catalogo/ctlogo_familias_madera_copaiba.pdf.
5. Ramos PD, Castro A. Actividad antibacteriana de *Copaifera reticulata* “copaiba” sobre *Porphyromonas gingivalis* aisladas de pacientes con periodontitis. *Odontol. Sanmarquina*. 2014; 17(1):7-11. Disponible en:
<http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/odont/article/view/972>
6. Francia J. Actividad antimicrobiana -in vitro- del aceite de Copaiba frente a bacterias patógenas. [Tesis titular] Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2013. 60 p.

7. Souza A, Souza M, Moreira M, Moreira M, Furtado N, Martins C. Bastos J. Dos Santos R. Heleno V. Ambrosio S. Veneziani R. Antimicrobial Evaluation of Diterpenes from *Copaifera langsdorffii* Oleoresin Against Periodontal Anaerobic Bacteria. [internet] *Molecules* 2011, 16, 9611-9619. Disponible en: [file:///C:/Users/jessus/Downloads/molecules-16-09611%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/jessus/Downloads/molecules-16-09611%20(2).pdf)
8. Pieri F.A, Mussi M.C, Fiorini J.E, Moreira MA, Schneedorf JM. Bacteriostatic effects of copaiba oil (*Copaifera officinalis*) against *Streptococcus mutans*. *Braz. Dent. J.* [online]. 2012, vol.23, n.1, pp.36-38. ISSN 0103-6440. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-64402012000100006>.
9. Mendonça D, Onofre S. Atividade antimicrobiana hacer óleo-resina de copaiba Produzido pela - *Copaifera multijuga* Hayne(Leguminosae). *Braz J Pharmacogn*,v.19,p.577-581,2009.Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2009000400012.
10. Pieri F.A. Mussi M.C. Fiorini J.E. Schneedorf J.M. Efeitos clínicos e microbiológico do óleo de copaiba (*Copaifera officinalis*) sobre bactérias formadoras de placa dental em cães. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* [online]. 2010,vol.62,n.3,pp.578-585.ISSN1678 4162. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352010000300012>
11. Pacheco TARC, Barata LES, Duarte MCT. Antinimicrobial activity of copaiba (*Copaifera* spp) balsams. *Rev Bras Pl. Med. Botucatu.* 2006; 8:123-4.
12. Veiga J, Valdir F, Pinto A. C. O gênero *copaifera* L. *Quím. Nova* [online]. 2002,vol.25,n.2,pp.273-286.ISSN0100-4042. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000200016>.

13. Veiga J, Valdir F. et al. Constituintes das sementes de *Copaifera officinalis* L. Acta Amaz. [online]. 2007, vol.37, n.1, pp.123-126. ISSN 0044-5967. <http://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672007000100015>.
14. PIERI, F.A. MUSSI, M.C. MOREIRA, M.A.S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. Rev. bras. plantas med. [online]. 2009, vol.11, n.4, pp.465-472. ISSN 1516-0572. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722009000400016>.
15. Arenas CF, Arévalo LA, Contreras C. Estudio experimental comparativo del efecto analgésico y antiinflamatorio de copaiba frente a morfina e indometacina. Vol 14, No 1 (2014)
16. Arroyo AJ, Quino-FM, Martínez HJ, Almora PY, Alba GA, Condorhuamán FM, Flores M, Bonilla P. Efecto citoprotector y antisecretor del aceite de *Copaifera officinalis* en lesiones gástricas inducidas en ratas An. Fac. med. v.70 n.2 Lima jun. 2009 Estudio experimental comparativo del efecto analgésico y antiinflamatorio de copaiba frente a morfina e indometacina. Vol. 14, No 1 (2014)
17. 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.
18. Luis PA. Efecto antimicrobiano in vitro de tres concentraciones de aceite de la corteza de *Copaifera officinalis* sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*. [Tesis] Biblioteca digital. Oficina de sistemas e informática. Universidad Nacional de Trujillo. 2013.

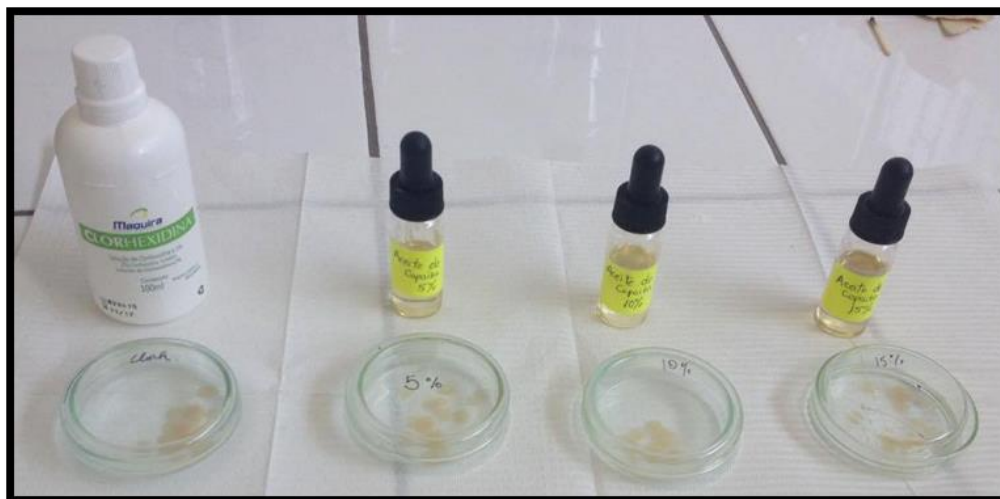
19. Rigamonte O. Wadt P. Wadt L. *Copaiba*: ecología y oleorresina de producción. Rio Branco Acre Embrapa, 2004. 28p.
20. Maia L. Sousa V. Souza B. Oliveira NJ. Da Silva J. Veiga J. Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) Oleoresins. *Moléculas* 2012, 17 (4), 3.866-3.889; doi: 10.3390 / molecules17043866
21. Liébana, J., Castillo, A.M. & Rodríguez-Avial, C. 2002, "Género *Streptococcus* y Bacteria relacionadas." in *Microbiología Oral*. 112 ed. J. Liébana, 2a. Edición edn, McGraw-Hill-Interamericana de España, Madrid, pp. 325-344.<https://es.slideshare.net/hector8484/microbiologia-oral-53402954>
22. Ojeda GJ, Oviedo GE, Salas LA. *Streptococcus mutans* y caries dental. *CES Odontol.* vol.26 no.1 Medellín Jan. /June 2013
23. Mazzani M. Declaración de Helsinki. *Revista colombiana de bioética.* 2001; 6:1.

ANEXO N° 1

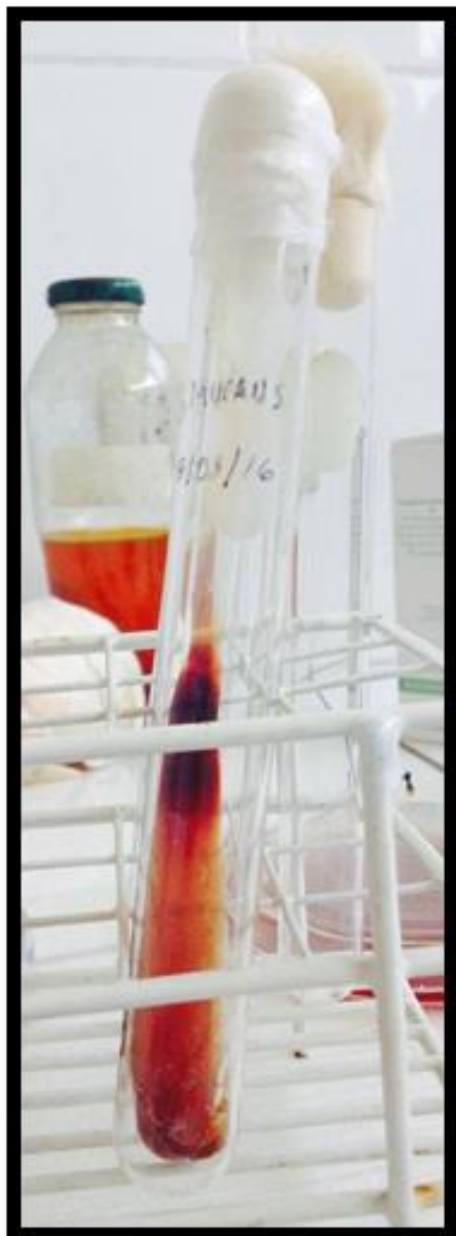
Aceite de *Copaifera officinalis* en tres diferentes concentraciones.



Preparacion de discos de papel los cuales son embebidos con las diferentes concentraciones (15%, 10%, 5%) de aceite de copaifera officinalis y tambien con el disco control con clorhexidina.



Obtención de las cepas de Streptococcus mutans.



Preparación de la solución salina estéril a partir de las colonias jóvenes, utilizando Diagtest.



Realizamos el sembrado de las cepas en el correspondiente agar (sangre).



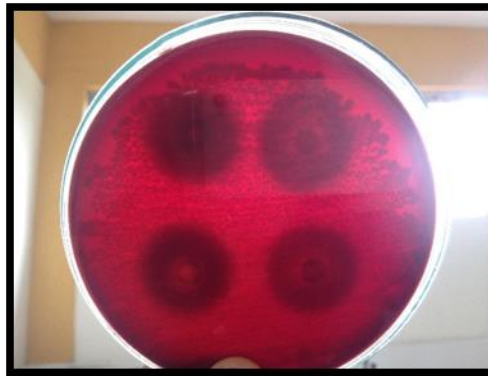
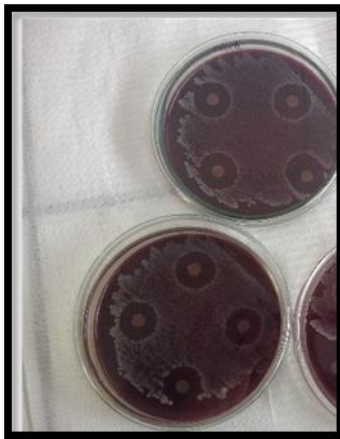
Colocación de los discos de papel en los discos cultivados de *Streptococcus mutans*.

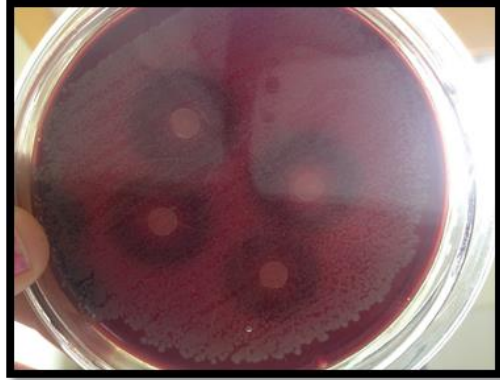


Colocación de las placas Petri con los discos embebidos en diferentes concentraciones dentro de jarra Gask-par y luego a la incubadora.



Placas Petri con halos de inhibición, después de la incubación





ANEXO N°2

Tabla de recolección de datos

“ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE COPAIFERA OFFICINALIS (COPAIBA) SOBRE STREPTOCOCCUS MUTANS”.

<i>Cepa utilizada: Streptococcus mutans</i>															
<i>Aceite de Copaifera officinalis al 15 %</i>				<i>Aceite de Copaifera officinalis al 10 %</i>				<i>Aceite de Copaifera officinalis al 5 %</i>				<i>Disco de utilizado De Control: Clorhexidina al 2%</i>			
<i>12 mm</i>	<i>9mm</i>	<i>8mm</i>	<i>10mm</i>	<i>10mm</i>	<i>8mm</i>	<i>8mm</i>	<i>10mm</i>	<i>7mm</i>	<i>9mm</i>	<i>8mm</i>	<i>7mm</i>	<i>20mm</i>	<i>20mm</i>	<i>9mm</i>	<i>19mm</i>
<i>12 mm</i>	<i>10mm</i>	<i>9mm</i>	<i>8mm</i>	<i>8mm</i>	<i>9mm</i>	<i>10mm</i>	<i>8mm</i>	<i>7mm</i>	<i>8mm</i>	<i>8mm</i>	<i>7mm</i>	<i>19mm</i>	<i>19mm</i>	<i>19mm</i>	<i>19mm</i>
<i>8 mm</i>	<i>9mm</i>	<i>8mm</i>	<i>12mm</i>	<i>9mm</i>	<i>9mm</i>	<i>8mm</i>	<i>9mm</i>	<i>10mm</i>	<i>9mm</i>	<i>8mm</i>	<i>9mm</i>	<i>18mm</i>	<i>19mm</i>	<i>18mm</i>	<i>19mm</i>

ANEXO N° 3

TABLA N°: ANALISIS DE VARIANZA PARA COMPARAR LOS HALOS DE INHIBICION SEGÚN CONCENTRACION DEL ACEITE DE COPAIBA EN COMPARACION CON CLORHEXIDINA 2% SOBRE ESTREPTOCOCCUS MUTANS.

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADO DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	SIGNIFICANCIA (p)
ENTRE GRUPOS	881.563	3	293.854	0.0000
DENTRO DE LOS GRUPOS	38.750	44	0.881	
TOTAL	920.313	47		

ANEXO N° 4

Por tratarse de un trabajo experimental se empleó la formula estadística para hallar el número de repeticiones necesarias que validen el diseño experimental se aplicó la siguiente formula estadística para hallar la cantidad de muestra necesaria para pruebas bilaterales de 2 muestras

$$N = \frac{\left(\frac{Z}{\alpha} + \frac{Z}{\beta}\right)^2 \times 2 \times s^2}{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2} \qquad Nf = n \left(\frac{g^{l'+3}}{g^{l+1}}\right)$$

n=muestra preliminar

nf= muestra reajustada

$$\frac{Z}{\alpha} = 1.96 \text{ para confianza del 95\%}$$

$$\frac{Z}{\beta} = 0.84 \text{ para una potencia del 80\%}$$

S=0.8($\bar{X}_1 - \bar{X}_2$) valor asumido por no haber estudios similares.

Reemplazando...

$$N = \frac{(1.96 + 0.84)^2 \times 2 \times (0.64) (\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2}{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2}$$

$$N = (2.8)^2 \times 2 \times 0.64 = \mathbf{10}$$

$$\mathbf{NF = 10 \left(\frac{21}{19}\right) = 12 \text{ REPETICIONES}}$$