



**EFFECTO DEL USO DE 3 ACEITES DE CANELA COMO AGENTE
ANTIFÚNGICO SOBRE *CÁNDIDA ALBICANS* Y CAMBIOS EN
LA ESTABILIDAD DE COLOR EN DIENTES ACRÍLICOS DE
TERMOCURADO**

Trabajo de Investigación
Requisito para optar al
Título de Cirujano Dentista

Alumnos: Ignacia Barrera Manríquez
Pilar Belmar González
Daniel Díaz Santis
Docente Guía: Prof. Dr. Rafael Ceballos Olguín
Cátedra de Prótesis Removible

Valparaíso – Chile
2019



**EFFECTO DEL USO DE 3 ACEITES DE CANELA COMO AGENTE
ANTIFÚNGICO SOBRE *CANDIDA ALBICANS* Y CAMBIOS EN
LA ESTABILIDAD DE COLOR EN DIENTES ACRÍLICOS DE
TERMOCURADO**

Trabajo de Investigación
Requisito para optar al
Título de Cirujano Dentista

Alumnos: Ignacia Barrera Manríquez
Pilar Belmar González
Daniel Díaz Santis

Docente Guía: Prof. Dr. Rafael Ceballos Olguín
Cátedra de Prótesis Removible

Valparaíso – Chile
2019

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, queremos agradecer a nuestras familias, que desde el primer momento en que decidimos estudiar esta carrera han estado a nuestro lado brindándonos todo el apoyo posible. Ha sido un proceso largo y sinuoso, donde muchas veces el camino se puso difícil, pero siempre estuvieron presentes, dándonos una palabra de aliento y recordándonos que la perseverancia y constancia son pilares fundamentales para lograr nuestros objetivos.

A todas aquellas personas que nos acompañaron en las aulas, clínicas y en aquellos momentos de dispersión tan necesarios. A esos grandes amigos que hicieron, sin lugar a duda, de esta etapa un momento grato y digno de recordar, quedando por siempre en nuestra memoria y en nuestros corazones.

Agradecemos también a nuestro docente guía Dr. Rafael Ceballos por ofrecernos su ayuda y consejo durante la realización de nuestra investigación.

Al Dr. Rodrigo Cruz y a la T.M. Peggy Vieille, por facilitarnos el laboratorio de micología de la Facultad de medicina de la Universidad de Valparaíso para realizar parte de nuestra experimentación, brindarnos su ayuda y conocimientos.

Esta Tesis nació de la curiosidad de un grupo de amigos por conocer más acerca del uso de productos naturales en el área odontológica, fue una experiencia totalmente diferente de lo que imaginamos con momentos tensos y otros de mucha alegría, sin embargo, logramos hacer un gran trabajo. ¡Gracias Team Canela 2019!

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
MARCO TEÓRICO.....	3
1. CONSIDERACIONES EN PRÓTESIS REMOVIBLE.....	3
I. Generalidades.....	3
II. Clasificación	3
III. Resina Acrílicas	3
IV. Color	4
2. LESIONES PARAPROTETICAS	6
I. Generalidades.....	6
II. Estomatitis subprótesis.....	7
3. HIGIENE DE PROTESIS	9
I. Métodos	9
II. Agentes Desinfectantes.....	11
4. FITOTERAPEUTICOS.....	13
I. Definición	13
II. Aceites esenciales.....	13
III. Mecanismo de acción	13
IV. Canela	14
PREGUNTA DE INVESTIGACION.....	16
OBJETIVOS	16
1. Objetivos generales.....	16
2. Objetivos específicos	16
HIPOTESIS	17
MATERIALES Y METODOS	18
1. Análisis microbiológico	18
2. Análisis Colorimétrico	24
I. Definición de variables.....	24
II. Universo y muestra.....	25
III. Rotulación, división de las muestras y período de inmersión:	25
IV. Medición de las muestras.....	26

V. Soluciones utilizadas.....	28
1. Fase microbiológica	29
I. Análisis Estadístico	34
2. Fase colorimétrica	37
I. Análisis Estadístico	43
DISCUSIÓN.....	48
CONCLUSIONES.....	51
SUGERENCIAS.....	52
RESUMEN.....	53
REFERENCIAS	54

INTRODUCCIÓN

Chile experimenta un envejecimiento demográfico avanzado. Según el Censo 2017, en Chile, los adultos mayores superan los dos millones ochocientos mil personas, el equivalente al 16.7% de los habitantes del país. La región con mayor cantidad de personas sobre los 60 años corresponde a Valparaíso, con un 17%, convirtiéndola en la región más envejecida en el contexto nacional, pues su población menor de 15 años solo alcanza un 19,4% del total regional según el Instituto Nacional de Estadísticas (INE) en el Anuario Nacional de Estadísticas Vitales correspondientes al año 2015.¹

Esta situación concierne en gran medida a nuestra profesión y nos obliga a ampliar los conocimientos acerca de las problemáticas bucodentales que afectan a este grupo etario.

En el grupo etario de adultos entre 65 y 74 años, se ha estimado que la prevalencia de desdentados parciales corresponde a un 69,8% y la de desdentados totales corresponde a un 29.1% de los adultos².

A causa del aumento del edentulismo, se observa un incremento del uso de prótesis dentales removibles, sean estas, totales o parciales. En un estudio descriptivo reciente, que midió la prevalencia de enfermedades bucodentarias en la región metropolitana, en población de 65 a 74 años, el 38.53% de las personas usaban prótesis removibles.³

Se considera la mantención de la prótesis como un paso más dentro del mismo tratamiento rehabilitador, puesto que, si la aparatología no recibe los cuidados necesarios, éste podría fallar, generando incluso un deterioro mayor en el terreno biológico del paciente. Un ejemplo de esto se ve en la aparición de patologías en la mucosa de los pacientes portadores, siendo la más prevalente: la estomatitis subprotésica³⁴.

La estomatitis subprótesis es un trastorno muy común que afecta a los pacientes portadores de prótesis removible, se caracteriza por la inflamación y eritema de áreas de la mucosa oral en contacto con el aparato protético^{1,3}. Según datos epidemiológicos, esta enfermedad afectaría al 14,3% de la población mayor de 60 años y a un 67% del total de personas portadoras de prótesis⁴. La etiología de esta enfermedad es multifactorial, teniendo una gran importancia la mantención e higiene de la prótesis, el trauma que se genera por el constante uso de la aparatología y el potencial patógeno de *Candida albicans* que corresponde a la especie más prevalente en pacientes con estomatitis subprotésica. (71% de los pacientes)⁵.

Como método químico de limpieza de prótesis, la *Asociación Americana de Prosthodontia* establece como gold standard el uso de hipoclorito de sodio al 0,5 %⁵⁴, sin embargo, se ha comprobado que esta solución puede provocar degradación de los

componentes de la resina acrílica, alteraciones en larugosidad, deformación de la prótesis y cambios de color en los dientes acrílico⁵⁸.

El tratamiento de la estomatitis es un desafío para la práctica clínica, dada la alta frecuencia en administración de medicamentos y el aumento de la resistencia por parte de los microorganismos. Debido a estos factores y la gran importancia de prevenir la aparición de tal patología, se ha desarrollado un interés en el estudio de fármacos fitoterapéuticos.

La canela es una especia que últimamente ha sido ampliamente reconocida por sus propiedades biológicas. Diversos estudios realizados en humanos y animales han demostrado sus numerosos efectos como analgésico, antiséptico, insecticida y antimicrobiano. Según el estudio de Oliveira *et al* 2014, donde se evaluaron las propiedades antifúngicas del *C. zeylanicum*, se comprobó que este compuesto tiene una potente actividad contra la *Candida albicans*, patógeno de gran implicancia en el desarrollo de la estomatitis subprotésica⁴⁴.

Dentro de la revisión de la literatura, todos los estudios realizados previamente han sido desarrollados fuera de Chile y dada la variabilidad que existe en el efecto de una misma especia según su origen, resulta interesante evaluar cuál es la actividad antimicótica que tienen los aceites esenciales de canela que se comercializan en nuestro país.

Por otro lado, la adecuada mantención de la estética en los tratamientos de prótesis removible es fundamental y ningún estudio anterior ha investigado si el uso de una solución en base a aceite de canela provoca alteraciones de color en los dientes acrílicos de termocurado.

El objetivo de este estudio es evaluar la efectividad antimicótica *in vitro* de 3 aceites esenciales de canela comercializados en Chile frente a *C. albicans* determinando la concentración inhibitoria mínima (CIM) y analizar la estabilidad del color de los dientes acrílicos debido al uso de este aceite como agente desinfectante.

MARCO TEÓRICO

1. CONSIDERACIONES EN PRÓTESIS REMOVIBLE

I. Generalidades

La prótesis dental removible corresponde a una somatoprótesis extratisular interna, un elemento artificial destinado a restituir, tanto la dentición natural que se ha perdido, como las estructuras periodontales, restaurando también la relación entre los maxilares, aumentando la capacidad masticatoria, mejorando estética, fonética y calidad de vida de los pacientes.^{6, 7, 8, 9.}

II. Clasificación

- i. Prótesis removible parcial: Son aparatos protéticos removibles cuyo fin es restaurar un arco parcialmente desdentado, Tienen como componentes una base metálica o acrílica y elementos de anclaje, los cuales pueden tener como soporte o vía de carga a las piezas dentarias exclusivamente, denominándose prótesis dentosoportadas, o tener una vía de carga mixta, donde el soporte lo brindan tanto las piezas dentarias como los tejidos blandos circundantes^{10, 11.}
- ii. Prótesis removible total: Son aparatos protéticos removibles que tienen por función reemplazar a todos los dientes naturales y estructuras asociadas del maxilar y/o mandíbula.¹⁰ Presentan una superficie interna, la cual está en contacto con la mucosa de la cavidad oral.
- iii. Prótesis implantosoportada y retenida: Rehabilitación protésica que puede ser soportada y retenida de forma parcial o total por implantes óseointegrados, pueden ser fijas o removibles. Consta de una estructura protésica anclada a implantes colocados previamente dentro de los huesos maxilares^{12.}

III. Resina Acrílicas

Las bases de las prótesis removibles pueden confeccionarse con materiales de base orgánica o de base metálica, según el caso, prefiriéndose las primeras en prótesis completas, y una combinación de

ambas para prótesis parciales.¹³ Se pueden obtener a partir de copolímeros de poliestireno vinilo, sin embargo, las más usadas actualmente están compuestas a base de metacrilato de metilo y polimetacrilato de metilo, componentes que al reaccionar se polimerizan, dando como resultado un plástico duro de color similar al de los tejidos orales, representando un 95% de los plásticos usados para fabricar prótesis¹⁴. A continuación, se describen los diferentes tipos de acrílicos utilizados en la industria odontológica:

- i. Acrílico de termocurado: Productos que consisten en la unión de un monómero (líquido) y un polímero (polvo) los cuales deben mezclarse, donde para que produzca la polimerización se debe activar el agente iniciador, peróxido de benzoílo, presente en el polvo mediante activadores físicos, en este caso una fuente de calor externa. Este método de polimerización es uno de los más usados por su alta estética, baja sorción acuosa y solubilidad en agua, además de su relativa baja toxicidad.^{15,16}
- ii. Acrílico de autocurado: Corresponden a resinas acrílicas que presentan un iniciador, peróxido de benzoílo, cuya función es reaccionar con el polvo para producir radicales libres que inician la reacción de polimerización, el curado es iniciado por una amina terciaria (dimetil-ptoluidina o ácido sulfónico). Este método de curado no es tan eficiente como el calor y resulta en un material de peso molecular más bajo lo cual tiene un efecto adverso en las propiedades de resistencia del material y origina una cantidad de monómero residual no curado en la estructura de la resina.^{17,18}

IV. Color

i. Generalidades de color

El fenómeno del color es una respuesta psicofísica a la interacción física de la energía luminosa con un objeto, y la experiencia subjetiva de un observador individual. Tres factores pueden influir en la percepción del color, estos son: la fuente de luz, el objeto en cuestión y el observador del objeto.¹⁹

El color se puede describir según Munsell en términos de matiz, valor y croma. El matiz es el atributo que permite distinguir entre diferentes familias de color, por ejemplo, rojos, azules y verdes. El valor indica la claridad de un color que va del negro puro al blanco puro. Croma es el grado de saturación de color y describe la intensidad de un color.¹⁷

La luz visible se compone de fotones cuyas longitudes de onda se encuentran en el rango entre 360 y 780 nanómetros (nm). La luz en las

longitudes de onda más cortas (400 nm) aparece en azul, mientras que en las longitudes de onda más largas (700 nm) aparece en rojo²⁰.

ii. SISTEMA DE COLOR

En 1976, la Commission Internationale de l'Éclairage (CIE) definió aún más un espacio de color que respalda la teoría aceptada de la percepción del color basada en tres receptores de color separados (rojo, verde y azul) en el ojo y actualmente es uno de los espacios de color más populares. El espacio de color de CIE Lab representa un espacio de color uniforme, con distancias iguales que corresponden a diferencias de color percibidas iguales. En este espacio de color tridimensional los tres ejes son L*, a*, b*¹⁷.

El valor L* es una medida de la luminosidad de un objeto y se cuantifica en una escala tal que un negro perfecto tiene un valor L* de cero y un valor L* difuso reflectante perfecto de 100. El valor a* es una medida de rojo (positivo a*) o verde (negativo a*). El valor b* es una medida de amarillo (b* positivo) o azul (b* negativo). Las coordenadas a* y b* se aproximan a cero para colores neutros (blanco, gris) y aumentan en magnitud para colores más saturados o intensos¹⁷.

Las diferencias de color y las tolerancias se han representado en el espacio de color CIELab como simples distancias euclidianas en el espacio tridimensional L* a* b* llamado DE. En otras palabras, la distancia entre dos estímulos en el espacio de color CIELab es una representación de su diferencia de color percibida aproximada²¹.

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$$

Este esquema está diseñado de tal manera que una diferencia constante en el color, DE, definida por la distancia euclidiana en el espacio CIELab, por lo tanto, debe dar una diferencia de color "percibida" constante, independientemente de la ubicación en el espacio de color. La diferencia perceptible más pequeña para dos partes de colores que se contactan entre sí es de aproximadamente 0.5–1.0 unidades DE.¹⁸

iii. Vita Easyshade compact

Dentro de los sistemas de medición de color, los espectrofotómetros alcanzan una gran relevancia por la precisión que presentan en comparación con la técnica visual, ofreciendo un 33% más de precisión y una coincidencia más objetiva en el 93,3% de los casos. Son los

instrumentos más precisos para la concordancia de color general y la combinación de colores en Odontología.^{22,23}

Los espectrofotómetros miden la cantidad de luz reflejada de un objeto a intervalos de 1–25 nm a lo largo del espectro visible. Dentro de los espectrofotómetros, se encuentra el VITA Easyshade® V que corresponde a un espectrofotómetro de contacto, con un rango de medición 400 – 700 nm.²⁴

Para la utilización del VITA Easyshade se recomienda que la punta de 5 milímetros contacte en un ángulo de 90° la superficie del tercio medio del diente. En ese momento se toma el color y la pantalla muestra el color más cercano en la escala VITA clásica y la VITA 3D, además de esto, se puede acceder a los valores de CIELab.

Este equipo, por tanto, permite estandarizar la determinación y comunicación del color dental, acompañando a lo largo de toda la cadena del proceso, desde la determinación del color dental en el paciente hasta el control de calidad del color deseado en la clínica²⁵.

2. LESIONES PARAPROTETICAS

I. Generalidades

Como solución a la pérdida parcial o total de piezas dentales las prótesis odontológicas constituyen una alternativa eficiente, lo cual ha sido demostrado en estudios realizados, dadas sus características de adaptabilidad, funcionalidad, biocompatibilidad y economía, teniendo influencia directa en la mejora de la salud bucal y, por lo tanto, en la calidad de vida^{26,27}. Sin embargo, no se encuentra exenta de ocasionar daños y molestias, especialmente por la susceptibilidad de los tejidos generada por el proceso de envejecimiento y estilos de vida poco adecuados, los cuales ocasionan que se presenten cambios importantes en las mucosas y huesos de la cavidad bucal²⁸. Provocando así, irritación en las mucosas y, por consiguiente, la aparición de diversas patologías de origen multifactorial²⁹ donde el punto en común entre éstas es la prótesis, por tanto, son denominadas Lesiones Paraprotéticas³⁰.

Diversos estudios demuestran que aproximadamente un 70% de los portadores de prótesis presentan alteraciones en la mucosa bucal³¹. Estas lesiones, constituyen un importante problema de salud, presentando mayor incidencia en la población adulta mayor. Más del 95% de las lesiones se presentan en mayores de 40 años, con un promedio de edad al momento de establecer el diagnóstico, de 60 años³².

La etiopatogenia de estas lesiones es multifactorial, se asocia tanto a factores traumáticos, higiene deficiente, reacción de hipersensibilidad a los materiales de la prótesis, factores dietéticos (incluyendo los que causan deficiencias hematológicas), infección micótica y factores sistémicos²¹.

Para tratar estas lesiones, la acción principal es retirar las prótesis durante períodos prolongados, ya que esto es útil para eliminar el elemento causal y por tanto la inflamación provocada. En ocasiones es necesaria la intervención quirúrgica antes de confeccionar un nuevo aparato protésico. Tras la corrección de la prótesis la lesión disminuye de tamaño e incluso, en ciertas patologías, puede recuperar la coloración normal²⁷.

II. Estomatitis subprótesis

Corresponde a un proceso que se caracteriza por la inflamación y eritema de áreas de la mucosa oral en contacto con el aparato protésico³³.

Se caracteriza por un zona eritematosa, ulcerada o proliferación fibroepitelial provocada por la base protésica. Tiene una etiología multifactorial, pero se encuentra asociada principalmente a procesos infecciosos como candidiasis^{34, 35}.

La prevalencia de esta enfermedad oscila entre un 11 a 67% en los usuarios de prótesis, es más común en las mujeres y suele ocurrir de manera concomitante en estos pacientes el desarrollo de queilitis angular³⁶.

i. Clasificación

El método más utilizado para la clasificación de Estomatitis subprótesis, corresponde al propuesto por Newton en 1962³⁷, el cual identifica la enfermedad en tres tipos dependiendo del aspecto clínico de la mucosa inflamada bajo la prótesis.

Tipo I: Áreas localizadas de inflamación posiblemente causadas por trauma

Tipo II: Eritema generalizado en la mucosa directamente relacionada con la prótesis

Tipo III: Hiperplasia papilar inflamatoria que suele afectar al paladar duro o a las crestas alveolares.

ii. Etiología

No existe evidencia concluyente de la etiología de esta enfermedad, sin embargo, la visión actual es que corresponde a una enfermedad multifactorial³⁸. Una mala higiene con el consiguiente acúmulo de biofilm, el

potencial patógeno de *Candida spp*³⁹, y el trauma ocasionado en la mucosa por el uso continuo de prótesis removible parecen ser los factores preponderantes en la aparición de la enfermedad^{40,41}.

- *Candida*

Las levaduras del género *Candida* corresponden a más de 350 especies, pero solo algunas de ellas están implicadas en infecciones humanas⁴². Son microorganismos comensales en la cavidad oral, encontrándose en el 80% de los individuos sanos⁴³.

Al igual que otros hongos, son organismos no fotosintéticos con una pared celular que se encuentra fuera de la membrana plasmática. La membrana plasmática contiene grandes cantidades de esteroides, generalmente ergosterol. Las características macroscópicas y microscópicas de las diferentes especies de *Cándida* son similares. Pueden metabolizar la glucosa tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. En ciertas especies, la temperatura influye en su crecimiento con temperaturas más altas, como 37 ° C se promueve el crecimiento de las pseudohifas⁴⁴.

Candida es la causa más común de infecciones por hongos, siendo *Candida albicans* la cuarta causa de infecciones micóticas crónicas en la mucosa⁴⁵. Esta levadura coloniza el borde y la superficie de la placa microbiana presente en la prótesis, generando sustancias altamente irritantes que pueden desencadenar la lesión. Es la especie aislada con mayor frecuencia en casos de estomatitis subprotésica a partir de muestras clínicas⁴⁶.

La candidiasis oral no es una entidad clínica única, se presenta como cuatro formas distintas. Estas incluyen dos tipos transitorios a saber, la candidiasis pseudomembranosa y la candidiasis eritematosa aguda y dos formas persistentes, denominadas crónicas, la candidiasis eritematosa y candidiasis hiperplásica crónica⁴⁴.

iii. Diagnóstico

El diagnóstico se realiza principalmente según hallazgos clínicos, donde se observa una mucosa eritematosa y edematosa que puede encontrarse localizada, difusa o de aspecto papilar, subyacente al aparato protésico. En ocasiones puede presentarse con placas blancas que se desprenden fácilmente al raspado. El diagnóstico considera las características propias de cada paciente⁴⁷.

iv. Tratamiento

Debido su etiología multifactorial, es preciso identificar y corregir los factores predisponentes y tratar la infección.

- a. Trauma: el tratamiento consiste en suavizar zonas ásperas de la cara interna de la prótesis, desgastar áreas traumáticas, rebasar la prótesis, llegando incluso a tomar la determinación de realizar una aparatología nueva.⁴⁸
- b. Correcta higiene: La profilaxis y eliminación del acúmulo de placa es primordial para prevenir la aparición de esta enfermedad¹¹, puesto que la prótesis removible es un reservorio de biofilm, se debe procurar la realización de una correcta higiene del aparato protético, mediante la remoción mecánica del biofilm con cepillado acompañado del uso de agentes químicos desinfectantes⁴⁹.
- c. Terapia farmacológica: Frente a la situación de que los tratamientos locales no den resultados satisfactorios, se indica el uso de agentes antifúngicos, dentro de los cuales los más utilizados son la nistatina, el miconazol y fluconazol. Estos pueden ser tópicos o sistémicos, y cumplirán con erradicar el asentamiento de estos microorganismos de la mucosa afectada, reduciendo significativamente la inflamación de ésta¹⁴.

Con respecto al uso de antimicóticos, se indica una alta tasa de recidiva y recolonización de hongos posterior al cese del tratamiento. Además, el uso injustificado de estos medicamentos podría causar efectos adversos a lo largo del tiempo, inclusive la resistencia a antifúngicos⁵⁰.

Por tanto, la evidencia indica que tanto la buena higiene del aparato protético, como de las mucosas en relación a ésta, es la mejor manera de controlar el biofilm causante de la enfermedad.

3. HIGIENE DE PROTESIS

I. Métodos

Existen diversos microorganismos que se alojan en las superficies de la aparatología protésica que podrían causar estomatitis subprótesis, infección de las vías respiratorias o contaminación cruzada⁵¹.

Desafortunadamente, el principal inconveniente de los materiales a base de resina es su afinidad a la absorción en un medio acuoso, que podría afectar negativamente a las propiedades físicas y mecánicas de las prótesis removibles, además de constituir un medio favorable para la colonización y proliferación de los microorganismos debido a la capacidad de adhesión al polimetilmetacrilato por parte de estos, razón por la cual las prótesis deben mantenerse limpias y libres de residuos alimenticios, evitando así posibles colonizaciones, tinciones, halitosis, y por ende, inflamación de la mucosa del portador^{52, 53}.

Los productos de limpieza de prótesis deben ser de fácil manejo, efectivos en la eliminación de materia orgánica, depósitos inorgánicos y manchas; bactericidas y fungicidas, no tóxicos para el paciente, inofensivos para los materiales de prótesis y de bajo costo⁵⁴.

De acuerdo con la literatura, los métodos de desinfección y mantención de prótesis removibles dentales se pueden dividir en dos categorías principales: método mecánico y método químico⁵⁵.

- i. Método mecánico: corresponde a la limpieza de la prótesis en base a un cepillo dental y pasta no abrasiva para prótesis. Si bien este método es sencillo y económico, no es suficiente en la remoción de biofilm.
- ii. Método químico: según la Guía Basada en Evidencia publicada por la *Asociación Americana de Protopodencia*, el método químico indicado por su mayor efectividad es el del sumergir la prótesis en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% un máximo de 10 minutos.⁵⁶ Sin embargo, cuando no se usa adecuadamente puede degradar los componentes de la resina acrílica, provocando alteraciones en rugosidad,⁵⁷ deformación de la prótesis y cambios de color en los dientes acrílicos,⁵⁸ afectando directamente la estética, uno de los objetivos principales de la rehabilitación protésica.

Según la evidencia, el método más efectivo de limpieza de prótesis corresponde al método combinado, que consiste en la limpieza de la aparatología mediante el método mecánico, en conjunto con el método químico⁵⁹.

RECOMENDACIONES MINSAL⁶⁰

- Para el cepillado diario de la prótesis se recomienda utilizar un limpiador no abrasivo como jabón líquido neutro, pastas o cremas especiales para limpieza de prótesis⁶¹. No se recomienda pasta dental porque puede rayar la superficie, debido a las sustancias abrasivas que contienen.

- Para la limpieza semanal de prótesis metálicas y/o acrílicas, se recomienda sumergirlas en agua tibia con tabletas efervescentes, que contienen peróxidos, por al menos 30 minutos (se pueden dejar toda la noche si se desea). Lo importante es enjuagarlas bien en agua fría antes de usarlas⁵⁶.
- Una alternativa para la limpieza semanal de las prótesis acrílicas es sumergirlas en solución de Hipoclorito de Sodio al 0,5% (NaOCl) por 3 minutos. Para la preparación de un volumen de 200 ml, equivalente a una taza de solución, se deben diluir 50 ml de hipoclorito de sodio al 2% en 150 ml de agua. Es necesario controlar bien el tiempo, porque periodos mayores a 10 minutos, pueden dañar la prótesis⁶². El hipoclorito NO debe usarse en prótesis metálicas.
- La limpieza de las prótesis NO debe hacerse nunca con agua hirviendo, porque pueden deformarse.

II. Agentes Desinfectantes

El método químico es un método complementario para la limpieza de prótesis⁶³.

Los desinfectantes químicos se clasifican como peróxidos alcalinos, hipocloritos alcalinos, ácidos, desinfectantes y enzimas. La efectividad depende de la concentración, tiempo de exposición al desinfectante y pH. Por otra parte, la concentración bacteriana y tipo de material expuesto al desinfectante son factores que afectan la desinfección protésica.

Dos de las características más valiosas de los desinfectantes químicos debe ser su bajo costo y facilidad de uso, logrando el mayor acceso a la población⁵⁴.

i. HIPOCLORITO DE SODIO

Producto más utilizado en desinfección. Es un compuesto halogenado altamente alcalino (pH 11 a 11,5), se encuentra en estado líquido, pálido, verde-amarillento y con fuerte olor a clorito e irritante de piel y mucosas⁶⁴. Además de ser un potente antimicrobiano de amplio espectro contra bacterias grampositivas y gramnegativas, esporas, virus lipófilos e hidrófilos y hongos, presenta un efecto de acción rápida pero no prolongada⁶⁵, no disuelve el cálculo, pero sí inhibe la formación de éste sobre las prótesis. Su forma activa es el ácido hipocloroso no disociado

(HOCl)⁶⁶, presenta capacidad oxidativa sobre grupos sulfhídrico (-SH) de aminoácidos y proteínas^{67, 68}, produciendo la inhibición de sistemas enzimáticos bacterianos.

Aunque son limpiadores eficaces presentan diversos inconvenientes como la corrosión del metal, el aumento de la flexibilidad de los retenedores, y degradación de la superficie acrílica, lo que restringe su empleo⁶⁹.

ii. CLORHEXIDINA

La clorhexidina es un biocida de amplio espectro de actividad contra variados organismos, incluyendo la *Cándida albicans*. Su pH se encuentra entre los 5.5 a 7, no es irritante, de baja absorción en piel y mucosas, con baja toxicidad sistémica. Su acción contra biofilms de *Cándida albicans*, es significativamente menor que la acción contra *C. albicans* en suspensión^{70, 71}.

Hoy podemos encontrar en el mercado diversas concentraciones de clorhexidina, estas varían entre 0,2%; 0,12%, y 0,05%. Las primeras dos concentraciones son las más utilizadas para los tratamientos bucales⁷⁰.

Indicado para lasafecciones secundarias a intervenciones odontológicas, lesiones bucofaríngeas bacterianas, micóticas o herpética, prevención de caries y halitosis. Ayuda al control bacteriano asociado con inflamación gingival, sangrado y úlceras⁷².

iii. COREGA® TABS

Los peróxidos alcalinos presentan en su composición agentes oxidantes efervescentes, reductores de la tensión superficial y quelantes, presentan olor agradable y son los más populares en el mercado. Tienen una presentación en forma de polvos o tabletas las cuales en contacto con agua forman una solución de peróxido de hidrógeno⁷².

Estos limpiadores compuestos de perborato y bicarbonato de sodio son comúnmente utilizados en combinación con la limpieza mecánica de prótesis removible para que surjan los efectos deseados sobre la remoción del biofilm en la superficie protésica⁷³.

Presentan una buena actividad antimicrobiana anaerobia en el biofilm protésico, comparado con concentraciones de hipoclorito de sodio. Esta propiedad, sumada a la ausencia de olor y mal sabor, los hace una buena opción para la higiene protésica⁷⁴.

Muchos laboratorios hoy en día están trabajando en la confección de pastillas limpiadoras efervescentes en base a estos componentes. Sin embargo, aún no han mostrado una evidencia significativa en el control de microorganismos en comparación a los productos desinfectantes

conocidos, como la clorhexidina. Ahora bien, sus efectos secundarios son bastante reducidos, por lo que sería una alternativa viable siempre y cuando se estuviera al tanto de sus limitaciones⁷⁴.

4. FITOTERAPEUTICOS

I. Definición

La fitoterapia es un campo de la medicina que utiliza las plantas para tratar enfermedades o como agentes promotores de la salud. El uso tradicional de las fitoterapias generalmente conserva la composición original y la integridad de la planta de origen, de modo que la planta completa, o un porcentaje deseado de sus componentes mínimamente adulterados, se utilizan con fines medicinales⁷⁵.

A lo largo de la historia, se ha reconocido que los antimicrobianos naturales derivados de plantas medicinales tienen beneficios terapéuticos. Los antibióticos y las drogas sintéticas desarrolladas han reemplazado en gran medida el uso de tales agentes en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Sin embargo, con la amenaza mundial de resistencia a los antimicrobianos, la investigación sobre fitoterapéuticos, como los aceites esenciales, para la actividad antimicrobiana ha sido revisada en las últimas décadas. Las ventajas de estos agentes naturales son que tienen múltiples objetivos microbianos que les permiten exhibir una actividad antimicrobiana de amplio espectro con poca o ninguna aparición de resistencia antimicrobiana^{76, 77}.

II. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son una mezcla de sustancias volátiles, producto del metabolismo secundario de las plantas en cuya composición interviene una proporción de hidrocarburos de la serie polimetilénica del grupo de los terpenos junto con otros compuestos casi siempre oxigenados (alcoholes, ésteres, éteres, aldehídos y compuestos fenólicos)⁷⁸.

III. Mecanismo de acción

Los aceites esenciales son mezclas complejas y muy variables de constituyentes que pertenecen, de manera casi exclusiva, a dos grupos caracterizados por orígenes biogénicos distintos: el grupo de los terpenoides por una parte y el grupo de los compuestos aromáticos derivados del fenilpropano, mucho menos frecuentes.⁷⁹

El método de extracción depende del tipo de material a procesar ya sea pétalos, hojas, cortezas, entre otros. Es importante considerar el lugar donde se ubica la

sustancia aromática dentro de la estructura celular. La cual es dependiente del tipo de material vegetal y de la familia botánica de la misma⁸⁰. Los principales métodos son los siguientes:

- Destilación con agua o hidrodestilación.
- Destilación por arrastre con vapor de agua.
- Expresión.

Respecto a su mecanismo de acción sobre los microorganismos, estos aceites no son utilizados en una forma farmacéutica definida y con una dosis precisa, pero por sus aplicaciones podrían ser considerados como un alcaloide, un antibiótico o una enzima⁴⁴. Son muchas las propiedades farmacológicas que se les han atribuido a los aceites esenciales, pero sólo algunas de ellas han sido estudiadas totalmente. Hay que tener en cuenta que algunas esencias pueden ser muy peligrosas si no son manipuladas con un criterio profesional, en la forma, la dosis y circunstancias apropiadas.⁴⁴

IV. Canela

Nombre común: Canela, Canelo, Canelo en rama, Canela de Ceilán

El nombre del género *Cinnamomum* procede del griego "Kinnamomon". El nombre es compartido con la canela de la China (*Cinnamomum cassia*)

La Canela es una especia común usada por diferentes culturas en todo el mundo durante varios siglos. Se obtiene de la corteza interior de los árboles del género *Cinnamomum*, una planta de hoja perenne que abarca cerca de 250 especies y presenta dos variedades principales: *Cinnamomum zeylanicum* (CZ) Y *Cinnamomum Cassia* (CC)^{81, 82},

Árbol procedente del sur de la India y Sri Lanka, su corteza se caracteriza por ser rugosa, gruesa, de una coloración marrón rojiza, la cual es desprendida de la planta en forma de tiras con una longitud de 50 cm de largo, para posteriormente ser desecadas.^{83, 84}

i. Composición del aceite de canela

El aceite de canela es un líquido aromático obtenido de ramas, corteza y hojas de CZ Y CC.

La composición química del aceite varía según la variedad de canela a trabajar y la parte de la planta (hojas, corteza o raíz) de donde es obtenido el aceite, lo cual sugiere que pueden variar en sus efectos farmacológicos⁸⁵.

La literatura coincide en que tres de los principales componentes de los aceites esenciales obtenidos de la canela son: cinamaldehído, eugenol y linalool, que representan el 82.5% de la composición total⁴⁶.

El cinamaldehído representa aproximadamente el 49.9–62.8% de la constitución total del aceite cuando es obtenido de la corteza, constituyendo el componente principal de éste^{86, 87}.

Por otra parte, cuando es analizada la composición de aceites obtenidos de las hojas de la planta, la literatura señala como principal componente al eugenol, el cual representa entre un 70 a 90% de su constitución total⁸¹.

Los análisis cromatográficos con la composición química exacta de cada uno de los aceites que serán utilizados en esta investigación se encuentran adjuntos en el anexo 1.

ii. Principios activos

- Cinamaldehído: Bioactivo principal de la corteza de canela

El cinamaldehído es un líquido oleoso amarillento con un fuerte olor a canela y sabor dulce, obtenido principalmente de la destilación de la corteza de canela⁸⁸.

Cinamaldehído, ya sea, obtenido a partir de extractos naturales o sintetizado en laboratorio, demuestra excelentes actividades biológicas. Se ha informado que muestra actividades antimicrobianas^{89, 90, 91}, antifúngico^{92, 93}, antiinflamatorio⁹⁴, inmunomoduladoras⁹⁵, anticancerígeno⁹⁶ y antiangiogénicas⁹⁷.

Respecto a sus propiedades antimicóticas, la disminución en el contenido de ergosterol y la actividad ATPasa de la membrana plasmática han sido referidos como los mecanismos de su acción antifúngica⁹⁸.

- Eugenol: Constituyente principal de las hojas de canela.

Al consultar en la literatura acerca de los mecanismos por los cuales el eugenol induce la muerte celular de *Cándida albicans*, estos todavía no se conocen completamente, pero no se encuentran relacionados con la degradación de la pared celular de los hongos, sino en otros mecanismos tales como la inactivación de la síntesis de ergosterol y la producción de radicales libres^{99, 100}.

Estudios experimentales *in vitro* e *in vivo* en animales y humanos, realizados en diferentes regiones del mundo, han demostrado numerosos efectos beneficiosos de *C. zeylanicum* y *C. cassiae* en la salud, encontrándose resultados muy favorables en cuanto a su actividad contra el género *Cándida*^{101, 102, 103, 104}.

PREGUNTA DE INVESTIGACION

1. ¿Existe un efecto antimicrobiano sobre el crecimiento de colonias de *Cándida albicans* al utilizar el aceite esencial de canela como agente desinfectante en comparación con Hipoclorito de Sodio al 0,5%?
2. ¿Existe una variación en la estabilidad colorimétrica de los dientes acrílicos de termocurado al utilizar el aceite esencial de canela como agente desinfectante en comparación con Hipoclorito de Sodio al 0,5%?

OBJETIVOS

1. Objetivos generales

- I. Determinar el efecto antimicótico de 3 aceites esenciales de canela comercializados en Chile sobre *Cándida albicans*, mediante el método de microdilución en caldo.
- II. Determinar si existe una variación en la estabilidad de color debido al uso de aceite esencial de canela como agente desinfectante en dientes acrílicos de termocurado en comparación con el uso de Hipoclorito de Sodio al 0,5%.

2. Objetivos específicos

- I. Determinar cuál es la concentración inhibitoria mínima (CIM) de cada aceite esencial de canela frente a *Candidaalbicans* mediante el método de microdilución.
- II. Observar mediante el uso de espectrofotómetro Vita EasyShade V, la variación en el color de dientes acrílicos después de ser sumergidos en aceite esencial de canela como agente desinfectante.
 - I. Comparar la variación del color que existe en los dientes acrílicos luego de ser sumergidos en aceite esencial de canela versus la variación de color que sufre el grupo control (hipoclorito de sodio al 0,5%).

HIPOTESIS

1. Se observa la existencia de un efecto antifúngico sobre el crecimiento de colonias de *Candida albicans* al utilizar aceite esencial de canela como agente desinfectante.
2. No se observa una variación en la estabilidad del color en dientes acrílicos de termocurado al ser sumergidos en aceite esencial de canela como desinfectante en comparación con Hipoclorito de Sodio al 0,5%.

MATERIALES Y METODOS

1. Análisis microbiológico

Estudio de tipo experimental analítico *In vitro* donde se utilizaron 3 aceites esenciales de Canela comercializados en Chile (Figura I), y una cepa de referencia de *Candidaalbicans*(ATCC 90028) proveniente del laboratorio de micología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso.

Los aceites utilizados fueron:

- I. Aceite Esencial de Canela de China 10 ml BIO *Cinnamomumcassia*, del laboratorio Pranarom®
- II. Aceite esencial de canela orgánico- physalis® de la farmacia Knop (*Cinnamomum zeylanicum*), el cual es obtenido por el fabricante mediante el método de destilación a vapor.
- III. Aceite Esencial Canela Hoja (*Cinnamomum zeylanicum*) de la farmacia Katmandú®. Se adjuntan los respectivos análisis cromatográfico en anexo 1.



Figura I: Aceites esenciales de canela comercializados en Chile, utilizados en la fase microbiológica de la investigación.

- I. Determinación de la concentración mínima inhibitoria para cada uno de los aceites de canela.

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales de canela sobre *Cándida albicans*, se realizó una microdilución en caldo (Figura II), adaptando el estándar CLSI para el estudio de sensibilidad a los antifúngicos, propuesto por el comité de estandarización de ensayos in vitro americano¹⁰².

- i. Preparación del medio de cultivo o diluyente (RPMI)

El medio de cultivo indicado por el protocolo CLSI, por dar mejor concordancia tanto intra como interlaboratorio, es el medio sintético RPMI 1640 suplementado con tween80 al 1%, tamponado con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) 0.164 M, ajustado a pH 7 +/- 0.1 y con 0.2% de glucosa¹⁰⁵.

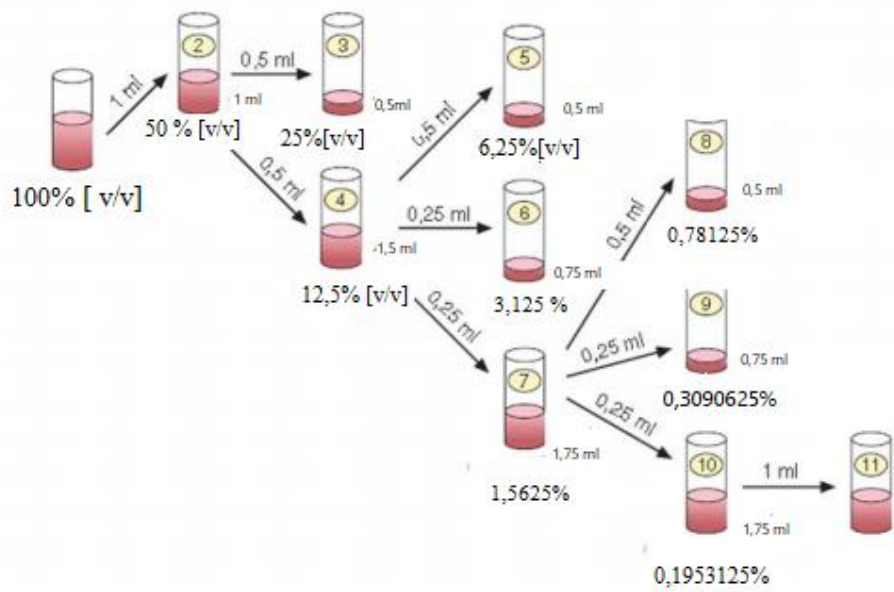
- ii. Preparación del inóculo

Desde un cultivo de *C. albicans* (ATCC90028) en agar Saboraud de 24 horas a 37° C, se preparó una suspensión a una concentración 0.5 McFarland en un tubo con 2 ml de suero fisiológico 0.9%. Posteriormente se realizó una dilución 1:1000 con medio RPMI 1640. Esta dilución es la que se utilizó para inocular las microplacas. La concentración final de las levaduras en la placa fue de 0.5 – 2.5 x 10³.

- iii. Preparación de las diluciones en base a aceite esencial de canela

A partir de una concentración al 100 %, directamente de las botellas comerciales de los aceites, fue extraído 1 ml de aceite de canela y se preparó una serie de diluciones utilizando como diluyente RPMI 1640 (Tabla I).

Al terminar las diluciones todos los tubos contenían 1 ml, exceptuando el tubo N° 11 que tenía 2 ml, motivo por el cual se desechó 1 ml del tubo (Figura III). En los tubos 2 al 10 la concentración del aceite es 10 veces superior a la concentración final deseada.



Figurall: Esquema de diluciones según estándar CSLI

Posteriormente se realizó una dilución 1: 5 agregando 4 ml de diluyente de RPMI a cada tubo, con lo que la concentración del aceite en los tubos es 2 veces mayor a la concentración final deseada (Tabla II).

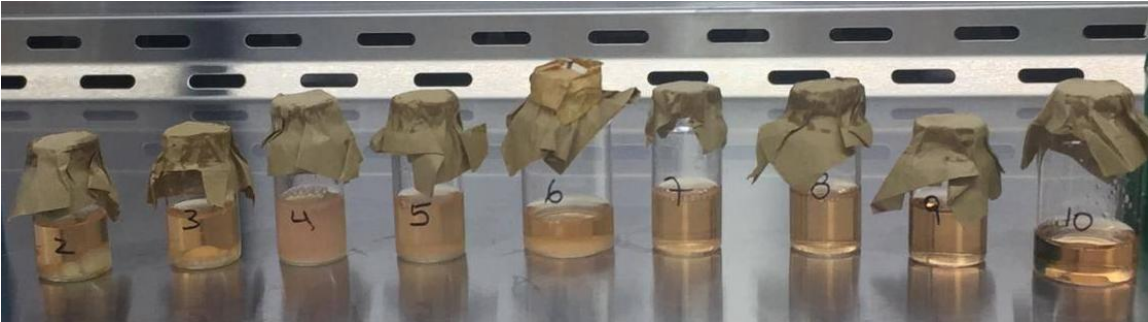


Figura III: Diluciones de antifúngico según protocolo CLSI, de mayor a menor concentración de aceite esencial de canela.

Este proceso fue realizado para cada uno de los 3 aceites de canela.

A. Preparación placas de microdilución

- a. Se colocaron 100 µl de inóculo (0,1 ml) en las placas de microdilución de 96 pocillos de la columna 2 a la 12 (filas a b c - f g h).
- b. Los pocillos de la columna 1 se llenaron con 200 µl de RPMI correspondiendo a control de esterilidad.
- c. Los pocillos de la columna 12 se llenaron con 100 µl de RPMI (control de crecimiento).
- d. Los pocillos de la columna 11 se llenaron con 100 µl NaOCl al 0,5% como control negativo
- e. Los pocillos de la columna 2 a la 10 se llenaron con 100 µl de cada aceite a probar

La situación descrita se ilustra en el Figura 4.

Al momento de agregar el aceite de los diferentes tubos a las microplacas se resuspendió la solución, para lograr una homogenización de ésta. Esta prueba de microdilución fue realizada por triplicado para cada una de las diferentes concentraciones de aceite.

Las placas se incubaron durante 48 horas a 35° C. (Figura V).

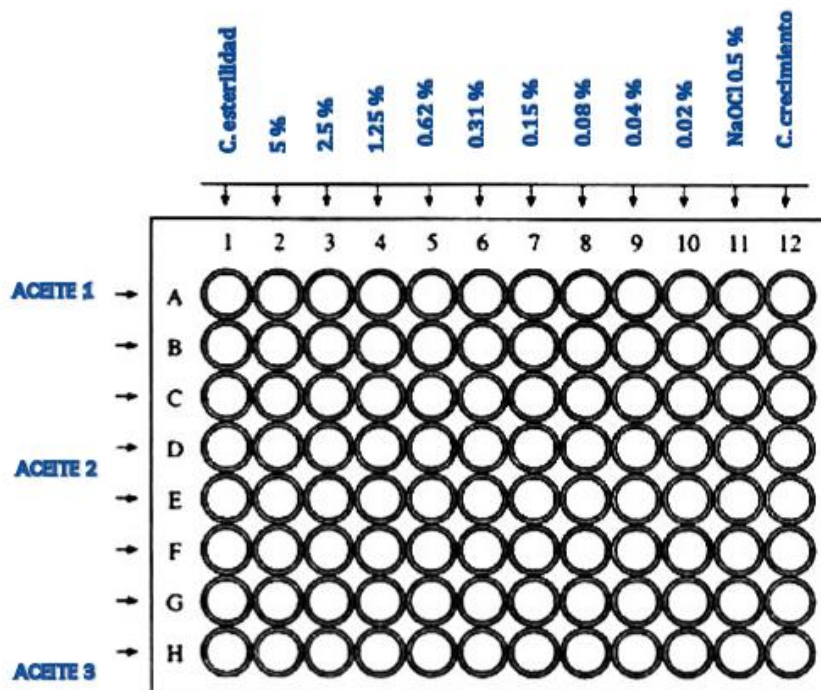


Figura IV: Esquema ilustrativo de placa de microdilución de 96 pocillos

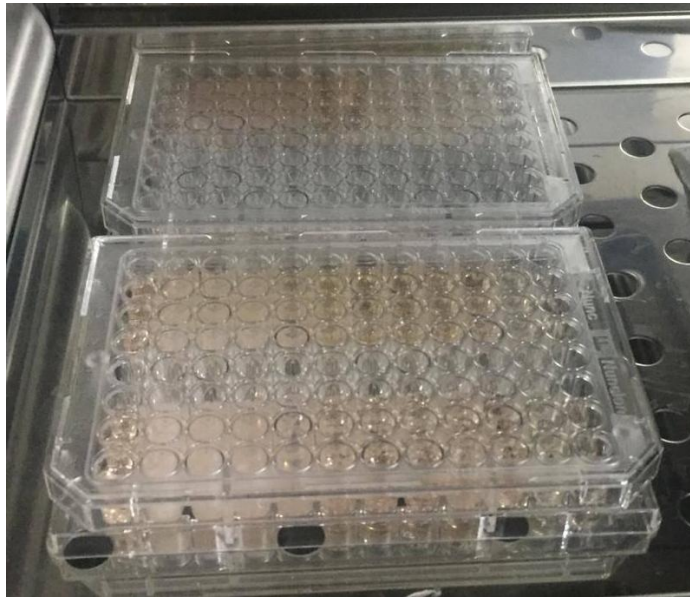


Figura V: Placas de microdilución para los aceites 1, 2 y 3, columnas 1 a 10 contienen diferentes concentraciones para cada uno de los aceites de canela, columna 11 fue control de crecimiento y la columna 12 fue control de esterilidad

Los resultados del crecimiento de *C. albicans* en cada pocillo fueron analizados mediante una lectura visual, con lupa estereoscópica Zeiss Stemi 2000- C a 40X, determinado que la CMI fue la concentración más baja utilizada en la que no se observaba crecimiento de la levadura.

Desde el tubo [n°]	Concentración inicial [%]	Transferir [ml]	A un tubo con	Concentración resultante [%]	Tubo [n°]
1	100	1	1 ml de RPMI	50	2
2	50	0,5	0,5 ml de RPMI	25	3
2	25	0,5	1,5 ml de RPMI	12,5	4
4	12,5	0,5	0,5 ml de RPMI	6,25	5
4	6,25	0,25	0,75 ml de RPMI	3,125	6
4	3,125	0,25	1,75 ml de RPMI	1,5625	7
7	1,5625	0,5	0,5 ml de RPMI	0,78125	8
7	0,78125	0,25	0,75 ml de RPMI	0,390625	9
7	0,390625	0,25	1,75 ml de RPMI	0,1953125	10

Tabla I: Diluciones

Tubo [n°]	Dilución 1/5 (agregando 4ml)	
	Concentración resultante [%]	Concentración final en placa [%]
2	10	5
3	5	2,5
4	2,5	1,25
5	1,25	0,625
6	0,625	0,3125
7	0,3125	0,15625
8	0,15625	0,078125
9	0,078125	0,0390625
10	0,0390625	0,01953125

Tabla II: Segundo paso diluciones

2. Análisis Colorimétrico

Una vez determinado cual es el aceite que presenta una menor CIM y cuál es el valor exacto de ésta, se procedió a realizar la segunda parte del estudio donde se evaluaron los cambios en la estabilidad de color en dientes de acrílico.

I. Definición de variables

Variables Dependientes: Color

- Definición conceptual: Bajo condiciones naturales, la luz que ilumina un objeto es luz blanca, cual es la mezcla de todos los colores del espectro visible. Un objeto presenta un color cuando su superficie es capaz de absorber cierta longitud de onda específica de la luz incidente. Cuando una o más longitudes de ondas son reflejadas, un objeto se reconoce como un color específico.
- Definición operacional: Son las diferencias matemáticas entre los valores de L^* , a^* y b^* de los diferentes productos en cada tono. Se calcula con los promedios de los valores $L^*a^*b^*$ de las muestras mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta E^* = \{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2\}^{1/2}$$

Variables Independientes: Valores CIE $L^*a^*b^*$ correspondientes a cada muestra

- Definición conceptual: Clasificación de color de manera tridimensional, donde el eje L^* es de valor o brillo que va de 0 a 100 donde 0 es negro y 100 es blanco. El eje a^* representa a la variación rojizo verdoso, donde los valores positivos del eje a^* corresponden a coloración rojiza y los valores negativos a coloración verdosa y el eje b^* al amarillento azulado, donde los valores positivos corresponden al color amarillo y los valores negativos al color azul. En el caso que estos ejes sean 0 es porque son acromáticos.
- Definición operacional: valores L^* , a^* y b^* del sistema CIE $L^*a^*b^*$ obtenidos por medio de un colorímetro digital para cada muestra.

II. Universo y muestra

Determinación del tamaño muestral:

El universo de este estudio son todos los dientes de acrílico marché 1.1 de termocurado color 46 (Figura VI).

Según la fórmula de tamaño muestral para estimar una media de población infinita, se utilizó una confianza del 95%, un error del 3% y una desviación estándar de 1,86 obtenida de la literatura. El cálculo da como resultado una muestra de 6 dientes por grupo ($n=6$).



Figura VI: Dientes acrílico marché 1.1 color 46, todas las muestras fueron compradas por los investigadores en el mes de abril directamente en la fábrica marché ubicada en Macul, Región metropolitana, Chile.

III. Rotulación, división de las muestras y período de inmersión:

Una vez determinado esto, los dientes fueron separados al azar, por los operadores 1 y 2 en 5 grupos iguales (Figura VII), según el tratamiento que recibirían.

Grupo 1.a: Solución de aceite esencial de canela, compuesta de aceite esencial de canela a MIC, agua destilada y tween 80(20 minutos al día por 30 días)

Grupo 1.b: Solución de aceite esencial de canela, compuesta de aceite esencial de canela a MIC, agua destilada y tween80. (10 minutos al día por 30 días)

Grupo 2.a: Hipoclorito de sodio al 0.5 % (control positivo) 20 minutos al día por 30 días

Grupo 2.b: Hipoclorito de sodio al 0.5%,10 minutos al día por 30 días

Grupo 3: Suero (control negativo) 20 minutos por día durante 30 días

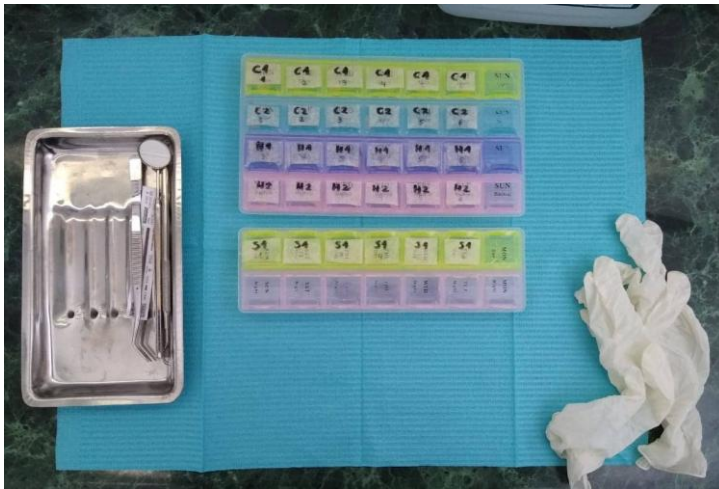


Figura VII: División de la muestra en cinco grupos distintos aleatorios.

Después del período de inmersión, los dientes se fueron lavados con agua corriente y transferido a otro recipiente debidamente rotulado que contenía agua destilada y permanecieron allí durante el resto del día. Todas las soluciones utilizadas para la inmersión fueron cambiadas diariamente.

IV. Medición de las muestras

Finalizando el periodo de inmersión, los dientes al tercer operador encargado de realizar las mediciones de color y registrar los valores en una planilla Excel. Este operador desconocía a qué grupo pertenecían los dientes (ciego simple).

Se encendió el equipo Vita Easyshade V y posteriormente, se ubicó el diente acrílico seleccionado sobre un fondo negro opaco en el interior de una cámara oscura, diseñada especialmente para que no existan fuentes de luz externas que alteren la medición, y que a su vez permita que el procedimiento pueda ser fotografiado.

Los dientes fueron posicionados con la ayuda de una plantilla de yeso sobre el fondo oscuro dentro de la cámara. Este molde fue preparado de modo que se puedan tomar mediciones repetitivas para cada diente en la misma región dental (Figura XVIII).

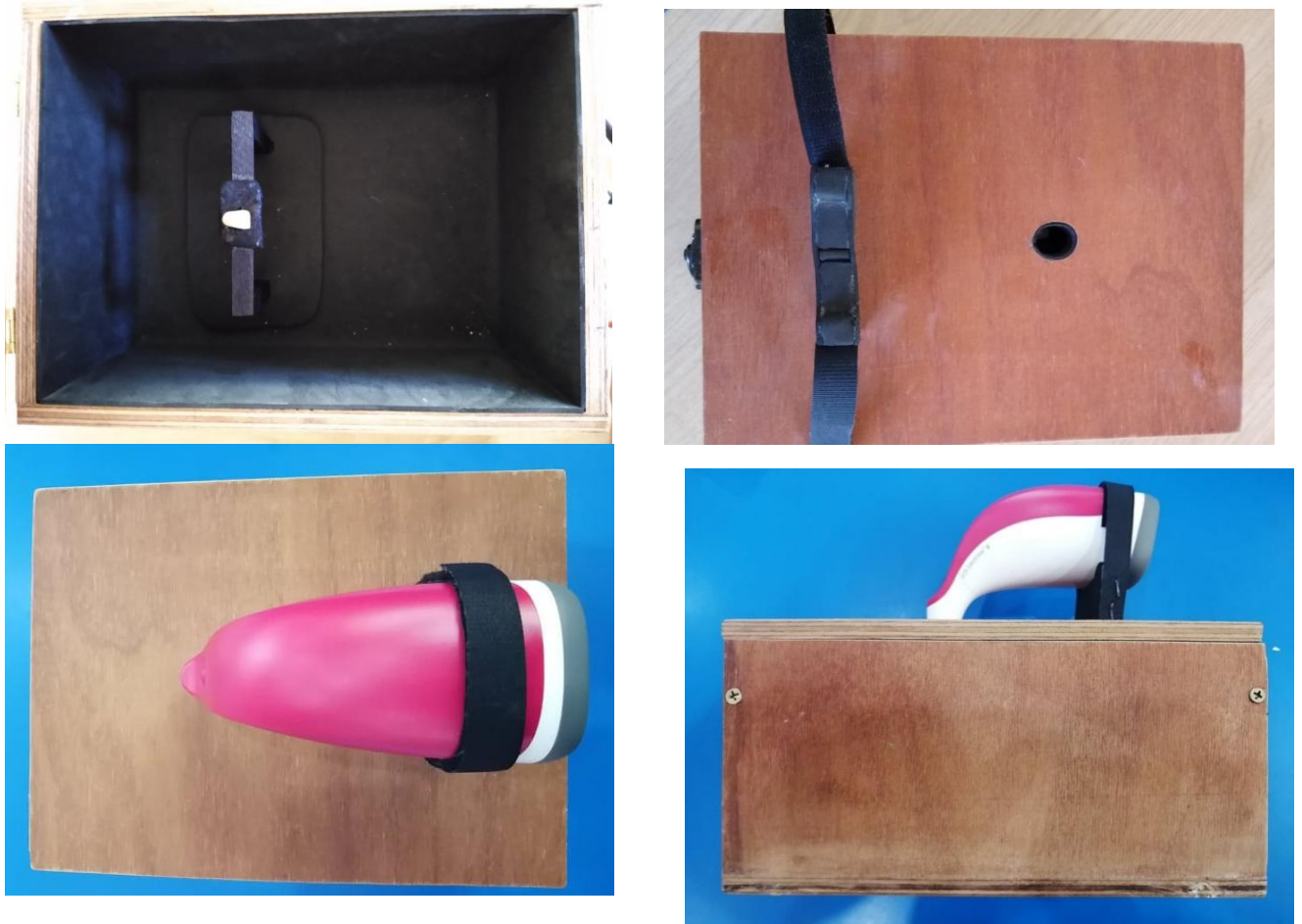


Figura VIII: Fotos de cámara oscura y posicionador en el cual se tomaron las mediciones de color inicial y final mediante el Vita Easyshade V.

Las mediciones fueron realizadas, de acuerdo con las especificaciones del fabricante, luego de calibrar el VITA Easyshade V con su base, para cada medición de promedio color.

Para la medición del programa promedio de color, se realizaron 5 tomas de color por cada muestra, obteniendo los datos desde la pantalla del computador y registrándolos en planillas de Excel® Office 365® versión 2016 de Microsoft™.

Para el cálculo de la diferencia de color de CIE L*a*b (E*) entre los tonos de esmalte, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\Delta E^* = \{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2\}^{1/2}$$

Donde Δ son las diferencias matemáticas entre L^* , a^* y b^* de los diferentes productos en cada tono. Para definir la relación entre las diferencias de rangos colorimétricos y diferencias de percepción visual de color, se consideraron como diferencias perceptibles clínicamente aquellas diferencias colorimétricas mayores a 3.3.

Los dientes fueron sometidos a 2 nuevas lecturas de color, realizadas por el tercer operador, el día 15 de experimentación y el día 30 y final, después de lo cual fue calculada la alteración del color (E) de las muestras.

V. Soluciones utilizadas

Solución de aceite esencial de Canela: Se prepararon 2 litros de una solución desinfectante experimental en base a aceite esencial de canela a CIM + AGUA DESTILADA + TWEEN 80 al 1%, en un matraz. La solución fue almacenada en una botella de vidrio, estéril, protegido de la luz y llevada al laboratorio de la cátedra de Operatoria de la facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso.

Suero: Se adquirieron en farmacia 2 ampollas de 500ml cada una de cloruro de sodio al 9% y se almacenó durante la experimentación en el laboratorio de la cátedra de Operatoria de la facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso.

Hipoclorito de Sodio: Se adquirió en una casa comercial de insumos dentales 1 litro de hipoclorito de sodio al 5% y se almacenó en el laboratorio de la cátedra de Operatoria de la facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso. Cada día que se experimentó, se preparó una dilución de 1:9 de hipoclorito con agua destilada, lográndose una solución de hipoclorito de sodio al 0,5%.



Figura IX: Soluciones utilizadas y procedimiento

Se registró fotográficamente cada etapa de laboratorio realizada con fin de respaldar los procedimientos realizados con la bioseguridad y materiales pertinentes a cada uno de estos. La distribución normal de los datos será probada mediante la prueba de ANOVA 1 factor.

RESULTADOS

1. Fase microbiológica

Los valores de concentración mínima inhibitoria (Tabla III) para los aceites de canela sobre *C. albicans* fueron analizados mediante lectura visual por turbidez a las 48 horas post-incubación.

- Para los aceites 1 y 2: no se observó crecimiento de la levadura ninguno de los pocillos, por ende, se decidió repetir las pruebas bajando las concentraciones de la micro dilución, a partir de la más diluida previamente, correspondiente a la concentración de la columna 10.
- Para el aceite 3 (Katmandú): no se observó crecimiento de la levadura en los pocillos 2 a 7, determinando que la concentración más baja utilizada en la que no se observa crecimiento de la levadura corresponde a la dilución número 7, correspondiente a la concentración al 0,15% v/v.

Crecimiento de *C. albicans*

<u>Pocillo</u>	<u>Concentración [%]</u>	<u>Aceite 1</u>	<u>Aceite 2</u>	<u>Aceite 3</u>
2	5	No	No	No
3	2,5	No	No	No
4	1,25	no	No	No
5	0,625	no	no	No
6	0,3125	no	no	No
7	0,15625	no	no	No
8	0,078125	no	no	Si
9	0,0390625	no	no	Si
10	0,01953125	no	no	Si

Tabla III: Presencia de *C. albicans* para determinación de CMI para cada aceite esencial de canela, primera dilución.

Segunda dilución para los aceites 1 y 2:

A partir de la concentración más diluida de los aceites 1 y 2, correspondiente a 0,01953125%, se preparó una segunda serie de diluciones a una concentración 10 veces superior a esta, es decir 0.2%, utilizando la misma metodología.

Con la fórmula:

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

donde $100\% * V1 = 0,2\% * 2000 \text{ ul}$

$$V1 = \frac{(0,2\% * 2000 \text{ ul})}{100\%}$$

$$V1 = 4 \text{ ul}$$

Entonces para una concentración al 0.2%, que correspondió al tubo 1, fueron utilizados 4 µl de aceite de canela más 1.996 µl de RPMI.

Posteriormente, se realizó una dilución 1:5 agregando 4 ml de diluyente a cada tubo, con lo que la concentración del aceite en los tubos es 2 veces mayor a la concentración final deseada (tabla IV).

Desde el tubo [n°]	Concentración inicial [%]	Transferir [ml]	A un tubo con	Concentración resultante [%]	Tubo [n°]	Concentración final en placa [%]
1	0,2	1	1 ml de RPMI	0,1	2	0,01
2	0,1	0,5	0,5 ml de RPMI	0,05	3	0,005
2	0,05	0,5	1,5 ml de RPMI	0,025	4	0,0025
4	0,025	0,5	0,5 ml de RPMI	0,0125	5	0,00125
4	0,0125	0,25	0,75 ml de RPMI	0,00625	6	0,000625
4	0,00625	0,25	1,75 ml de RPMI	0,003125	7	0,0003125
7	0,003125	0,5	0,5 ml de RPMI	0,0015625	8	0,00015625
7	0,0015625	0,25	0,75 ml de RPMI	0,00078125	9	0,000078125
7	0,00078125	0,25	1,75 ml de RPMI	0,000390625	10	3,90625E-05

Tabla IV: metodología de diluciones seriadas

El llenado de placas fue realizado de manera idéntica que en la primera etapa.

Segundos resultados:

Tras 48 horas de incubación fueron analizadas las muestras a través del mismo método visual por turbidez (con lupa estereoscópica), dando los siguientes resultados:

- i. Aceite 1 (Pranarom): No se observó crecimiento de la levadura en el pocillo 2, determinando que la concentración más baja utilizada en la que no se observa crecimiento de la levadura corresponde a la dilución número 1, con aceite de canela al 0.01% v/v.
- ii. Aceite 2 (Knop): No se observó crecimiento de la levadura en el pocillo 2, determinando que la concentración más baja utilizada en la que no se observa crecimiento de la levadura corresponde a la dilución número 1, con aceite de canela al 0.01% v/v.

Con estos resultados se decide repetir la prueba para los aceites 1 y 2, utilizando las segundas concentraciones que fueron calculadas, de manera de poder comprobar la reproductibilidad del análisis y pasar a la siguiente etapa experimental de evaluación colorimétrica. Respecto al aceite 3, se decidió no seguir experimentando con él ya que su CIM obtenida fue muy alta respecto a los otros dos.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Segunda repetición:

- i. Aceite 1 (Pranarom): A partir de la columna 3 hubo crecimiento, la CMI para este aceite fue de 0,01%.
- ii. Aceite 2 (Knop): A partir de la columna 3 hubo crecimiento, la CMI para este aceite fue de 0,01% (Figura IX).

Tercera repetición:

- i. Aceite 1 (Pranarom): A partir de la columna 3 hubo crecimiento, la CMI para este aceite fue de 0,01%.
- ii. Aceite 2 (Knop): A partir de la columna 3 hubo crecimiento, la CMI para este aceite fue de 0,01% (Figura X).

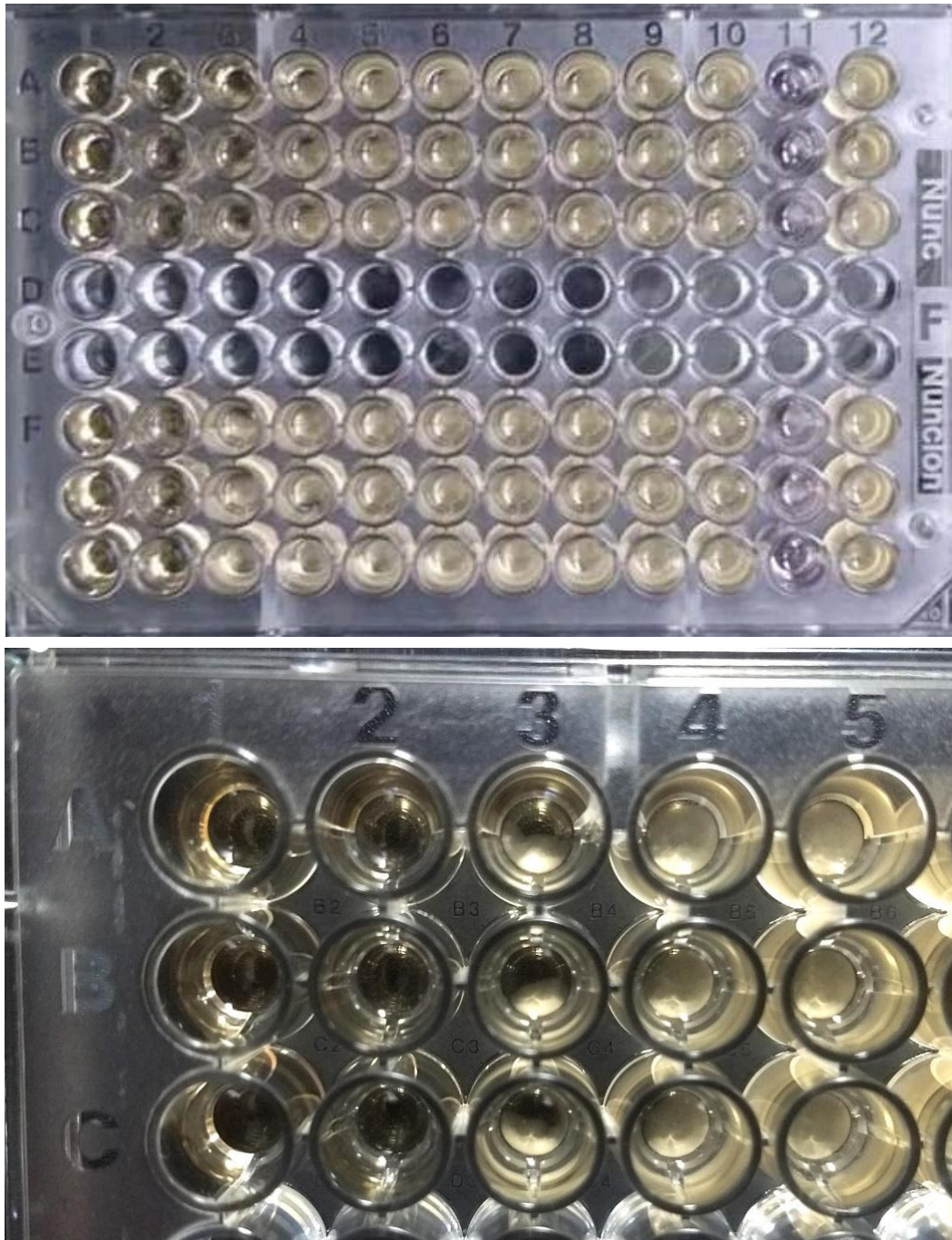


Figura X: Fotos de los crecimientos de *C. albicans* en las microplacas, segunda repetición.

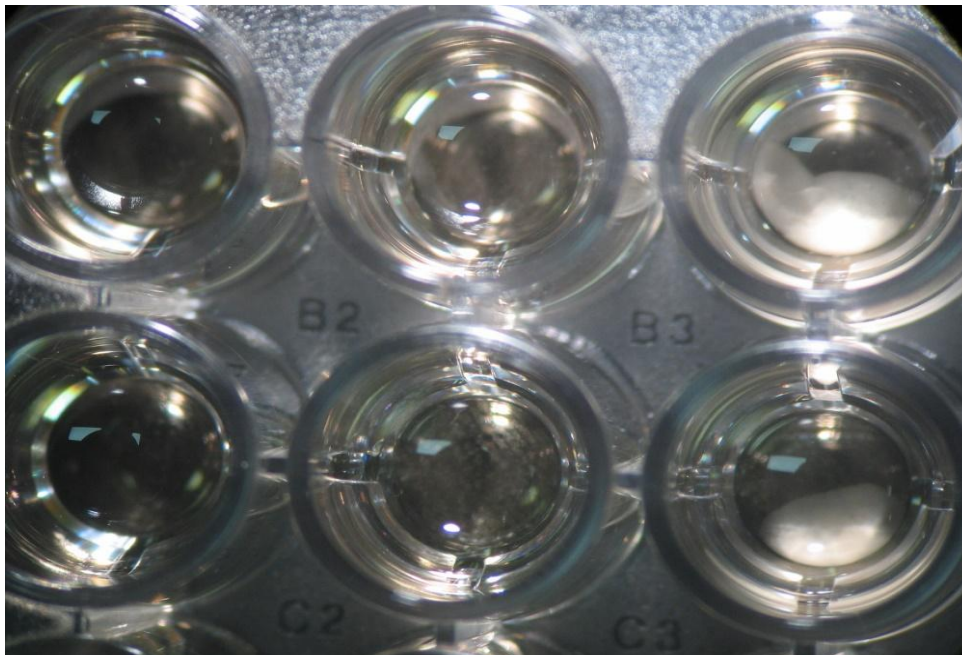
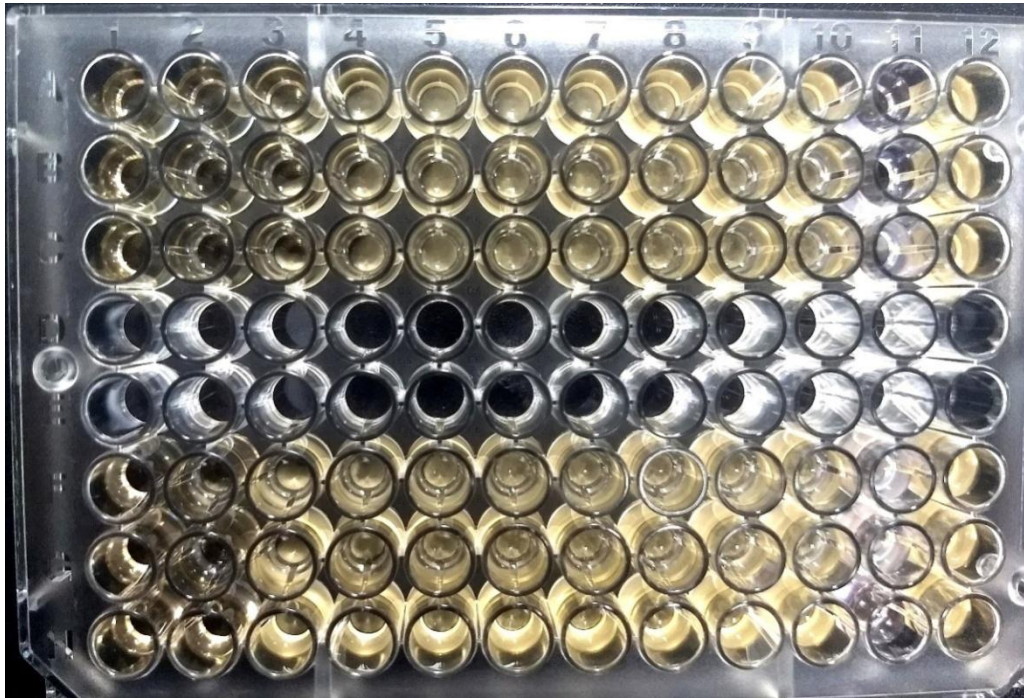


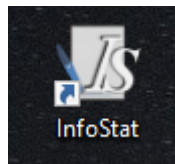
Figura XI: Fotos de los crecimientos de *C. albicans* en las microplacas, tercera repetición.

I. Análisis Estadístico

Para saber si se puede aplicar una prueba estadística, se deben realizar pruebas de bondad de ajuste. Los dos más importantes son:

- Pruebas de normalidad a través de prueba **Shapiro-Wilks**.
- Homocedasticidad.

Estas pruebas se ejecutan a través de un software estadístico. En este caso, se ha utilizado el software "InfoStat/L".



Se espera que el p valor encontrado, sea mayor a 0,05. Ya que, si es mayor, se estará en el lado de la hipótesis nula, por lo tanto, se trata de distribuciones normales, de varianza homogénea, por lo que se estaría cumpliendo con los supuestos necesarios.

Prueba Shapiro-Wilks

Se observa que el valor p es de 0,002 por lo que se trata de una distribución no normal.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Columna2	9	2,2E-03	3,3E-03	0,73	0,0020

Luego se obtienen gráficos Q-Q plop, cuales confirman que la distribución de los datos es no normal. (Figura XI).

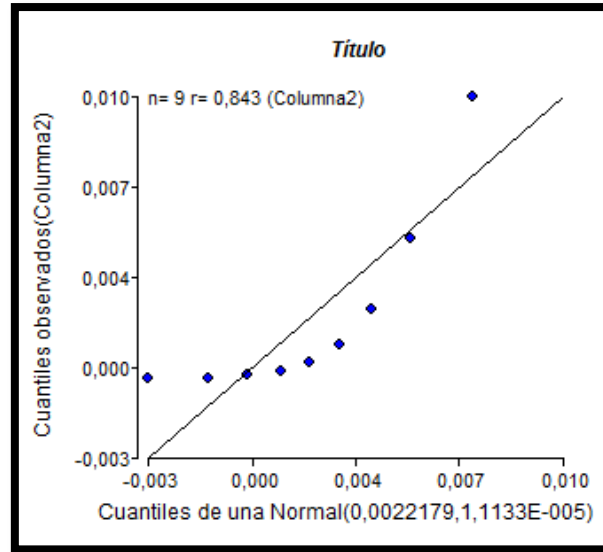


Figura XII: Grafico de distribución no normal.

Por lo tanto, dado que por ambos métodos se ha obtenido una distribución no normal para los datos en cuestión, se deben hacer pruebas no paramétricas.

Se realiza prueba de Kruskal Wallis análisis de la varianza no paramétrica. Nivel de confianza usado 95%.

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Columnal	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Columna2	2	1	0,01	0,00	0,01	8,00	0,4335
Columna2	3	1	0,01	0,00	0,01		
Columna2	4	1	2,5E-03	0,00	2,5E-03		
Columna2	5	1	1,3E-03	0,00	1,3E-03		
Columna2	6	1	6,3E-04	0,00	6,3E-04		
Columna2	7	1	3,1E-04	0,00	3,1E-04		
Columna2	8	1	1,6E-04	0,00	1,6E-04		
Columna2	9	1	7,8E-05	0,00	7,8E-05		
Columna2	10	1	3,9E-05	0,00	3,9E-05		

Tabla V: Análisis de varianza no paramétrica Krushal Wallis

A partir de los resultados estadísticos, se comprueba:

- Para concentraciones inferiores a 0,01% de *Cinnamomum cassia* (Pranarom) se desarrolla *C. albicans*. ($p = 0,4335$).
- Para concentraciones inferiores a 0,01% de *Cinnamomum zeylanicum* (Knop) se desarrolla *C. albicans*. ($p = 0,4335$).
- Para concentraciones inferiores a 0,15% de *Cinnamomum zeylanicum* (Katmandú) se desarrolla *C. albicans*. ($p = 0,4335$).
- Para concentraciones iguales o superiores a 0,01% de *Cinnamomum cassia* (Pranarom) NO se desarrolla *C. albicans*. ($p = 0,4335$).
- Para concentraciones iguales o superiores a 0,01% de *Cinnamomum zeylanicum* (Knop) NO se desarrolla *C. albicans*. ($p = 0,4335$).
- Para concentraciones iguales o superiores a 0,15% de *Cinnamomum zeylanicum* (Katmandú) NO se desarrolla *C. albicans*. ($p = 0,4335$).

CIM Aceites en % v/v

Cepa	<u>Aceite 1</u>	<u>Aceite 2</u>	Aceite 3
<i>C. albicans</i>	<i>Cinnamomum cassia</i>	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>
ATCC 90028	<i>a</i> (Pranarom),	<i>m</i> (knop)	(Katmandú)
(R1)	0,01%	0.01%	0,15%
(R2)	0.01%	0.01%	
(R3)*	0.01%	0.01%	

Tabla VI: Resumen final de resultados etapa microbiológica.
*Resultados repetición de experimentación

2. Fase colorimétrica

Mediante el equipo especializado se toman los siguientes datos iniciales, correspondiente a la colorimetría original de la muestra acrílica.

Inicial						
grupo 1(C1)		L	C	H	A	B
	1	79,6	18,5	87,4	0,9	21,2
	2	79,3	19,9	86,7	1,2	19,8
	3	80,1	17,5	88	0,6	17,5
	4	79,6	16,5	89,1	0,3	16,5
	5	79,7	19	87,5	0,8	19
	6	80,7	17,9	88,7	0,4	17,9
grupo 1(C2)		L	C	H	A	B
	1	79,8	18	88	0,6	18
	2	79,8	19	87,3	0,9	19
	3	73,3	20,8	83,7	2,3	20,7
	4	80	17,8	88,1	0,6	17,8
	5	79,7	15,7	89,6	0,1	15,7
	6	78,7	16,5	88,7	0,4	16,5
grupo 2 (H1)		L	C	H	A	B
	1	80	17,6	88,3	0,5	17,5
	2	79,7	18,9	87,2	0,9	18,9
	3	71,8	18,2	87,5	0,8	18,2
	4	81,9	22,9	88,9	1,1	19,9
	5	80,2	18,2	88	0,6	18,1
	6	79,7	17,5	88,6	0,4	17,5
grupo 2 (H2)		L	C	H	A	B
	1	73,3	19,3	87,1	1	19,3
	2	69,6	17,8	87,2	0,7	25,4
	3	74,9	18	88,3	0,5	18
	4	79,2	17,7	88,3	0,5	17,6
	5	78,7	18,2	87,6	0,8	18,2
	6	80,5	18,5	87,7	1,4	19,3
grupo 3 (S1)		L	C	H	A	B
	1	79,9	18,5	88	0,7	18,4
	2	80,2	18,7	87,6	0,8	18,7
	3	80	19,2	87,2	0,9	19,2
	4	79,5	16,4	89,2	0,2	16,4
	5	79,7	21,1	87,8	0,8	21
	6	80,5	21,4	88	0,7	21,4

Figura XIII: Resultados CIE Lab medición inicial de color. L, luminosidad. A, medida de rojo o verde. B, medida de amarillo azulado. C, color. H, matiz.

Luego de 30 días, se realizan nuevamente mediciones colorimétricas, bajo las condiciones y procedimientos anteriormente mencionados, arrojando los siguientes resultados

Final (30 días)						
grupo 1 (C1)		L	C	H	A	B
	1	80	25	88	1	25
	2	80	22	81	1,5	21
	3	77	20	84	0,8	19
	4	76	25	91	0,5	19
	5	82	28	91	0,6	22
	6	82	20	87	0,7	19
grupo 1 (C2)		L	C	H	A	B
	1	76	20	85	1,3	20
	2	75	28	90	0,7	24
	3	75	25	88	0,9	25
	4	79	26	89	0,7	23
	5	75	20	83	0,5	20
	6	74	21	91	0,4	21
grupo 2 (H1)		L	C	H	A	B
	1	76	18	88	2	20
	2	84	25	87	1,3	25
	3	70	27	87	1,3	25
	4	81	24	89	0,4	24
	5	76	25	91	0,5	21
	6	72	25	86	0,9	18
grupo 2 (H2)		L	C	H	A	B
	1	68	25	87	1,3	25
	2	77	20	85	1,7	20
	3	70	20	88	2,5	20
	4	75	24	88	0,7	24
	5	81	24	87	1,5	24
	6	80	23	83	0,3	24
grupo 3 (S1)		L	C	H	A	B
	1	79	28	91	1,1	20
	2	78	28	88	0,9	19
	3	79	34	91	0,6	20
	4	78	27	89	0,6	19
	5	80	29	91	0,6	20
	6	83	26	91	0,6	22

Figura XIV: Resultados CIE Lab medición final de color día 30.

C1

C2

H1

H2

S

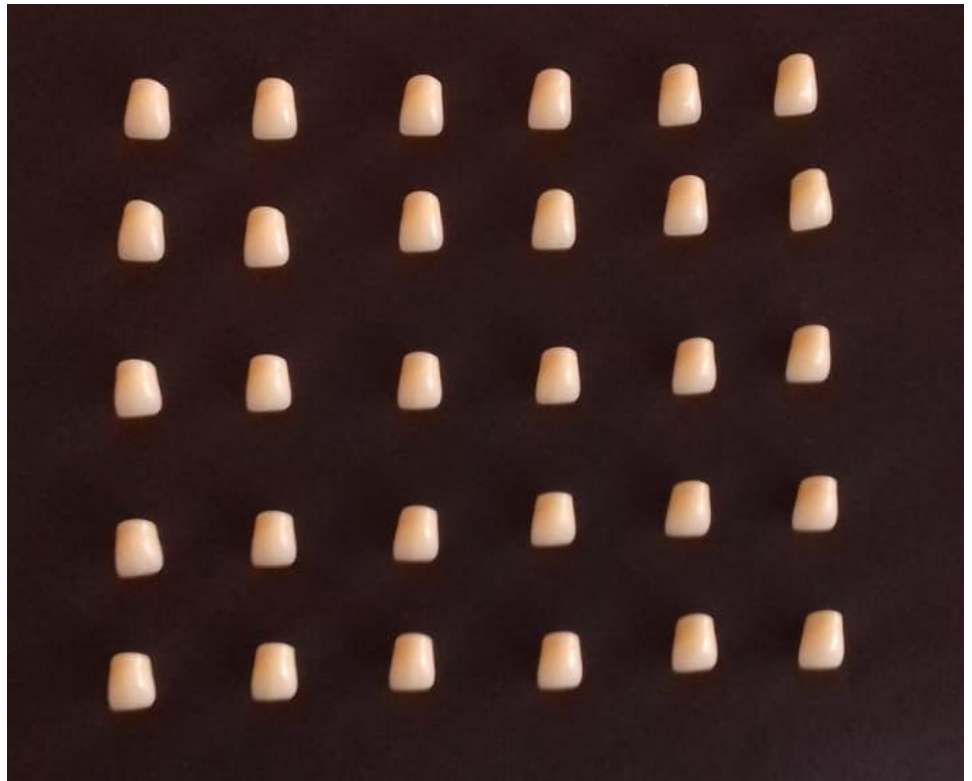


Figura XV: Fotografía de dientes acrílicos luego de 30 días de experimentación. Fila C1:10min de inmersión en canela. C2:20min de inmersión en canela. H1:10min de inmersión en hipoclorito. C2:20 min de inmersión en hipoclorito. S: Control 20 min de inmersión en suero fisiológico.

Ahora que se tienen los datos finales e iniciales, se puede establecer una comparación entre ellos, comprobando si existe diferencia en el color de las muestras sometidas a estudio. De acuerdo a la ecuación:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

donde: $\Delta L^* = L^* \text{ final} - L^* \text{ inicial}$

$$\Delta a^* = a^* \text{ final} - a^* \text{ inicial}$$

$$\Delta b^* = b^* \text{ final} - b^* \text{ inicial}$$

L = luminosidad (0 = negro perfecto / 100 = difuso reflectante perfecto)

A = medida de rojo o verde (positivo = rojizo / negativo = verdoso)

B = medida de amarillo azulado (positivo = amarillo / negativo = azulado)

ΔE						
grupo 1 (C1)		ΔL	ΔA	ΔB	ΔE	ΔE promedio
	1	0,3	0,1	3,7	3,7	2,52
	2	0,5	0,3	1,5	1,6	
	3	0	0,2	1	1,0	
	4	0	0,2	2,8	2,8	
	5	2,6	0	3,3	4,2	
	6	0,9	0,3	1,5	1,8	
grupo 1 (C2)		ΔL	ΔA	ΔB	ΔE	ΔE promedio
	1	0	1,3	2,3	3,2	4,16
	2	0	0	4,8	4,8	
	3	1,5	0	4,2	4,5	
	4	0	0,1	5,3	4,4	
	5	0	0,4	4	4,0	
	6	0	0	4,1	4,1	
grupo 2 (H1)		ΔL	ΔA	ΔB	ΔE	ΔE promedio
	1	0	1,5	2,6	3,0	4,06
	2	3,8	0,4	6,1	7,2	
	3	0	0,5	6,8	6,8	
	4	0	0	3,7	3,7	
	5	0	0	2,6	2,6	
	6	0	0,5	0,9	1,0	
grupo 2 (H2)		ΔL	ΔA	ΔB	ΔE	ΔE promedio
	1	0	0,3	5,6	5,6	5,95
	2	7	1	0	6,8	
	3	0	2	1,9	5,9	
	4	0	0,2	6,4	6,4	
	5	2	0,7	6	6,2	
	6	0	0	5	4,8	
grupo 3 (S1)		ΔL	ΔA	ΔB	ΔE	ΔE promedio
	1	0	0,4	1,2	1,3	1,19
	2	0	0,1	0,4	0,4	
	3	0	0	0,3	0,3	
	4	0	0,4	2,1	2,1	
	5	0,5	0	0	0,5	
	6	2,5	0	0,5	2,5	

Figura XVI: Resultados de medición con espectrofotómetro, diferencia de color ΔE inicial versus día 30.

De acuerdo con los resultados ΔE , se observa lo siguiente:

- En la mayoría de los casos se observa una mayor variación en el color en el grupo H1 (color naranja).
- Entre ambos grupos se encuentra una diferencia de rango de 20% a 76% en la estabilidad del color.
- El grupo H1 es el que presenta la mayor variabilidad en la estabilización del color.
- El grupo C1 es el que presenta la menor variabilidad en la estabilización del color.

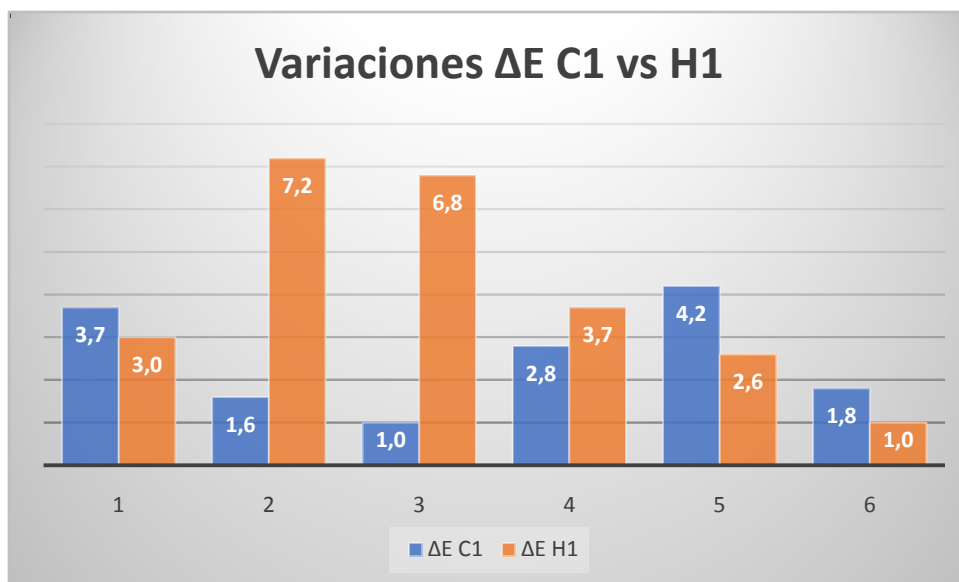


Figura XVII: Grafico variación color entre canela (azul) e hipoclorito (naranja) 10

- Para los grupos C2 y H2 la variabilidad es menor.
- De todas formas, el grupo H2 tiene una variabilidad mayor.
- Las variaciones oscilan entre el 2% hasta 60% en diferencias de color.

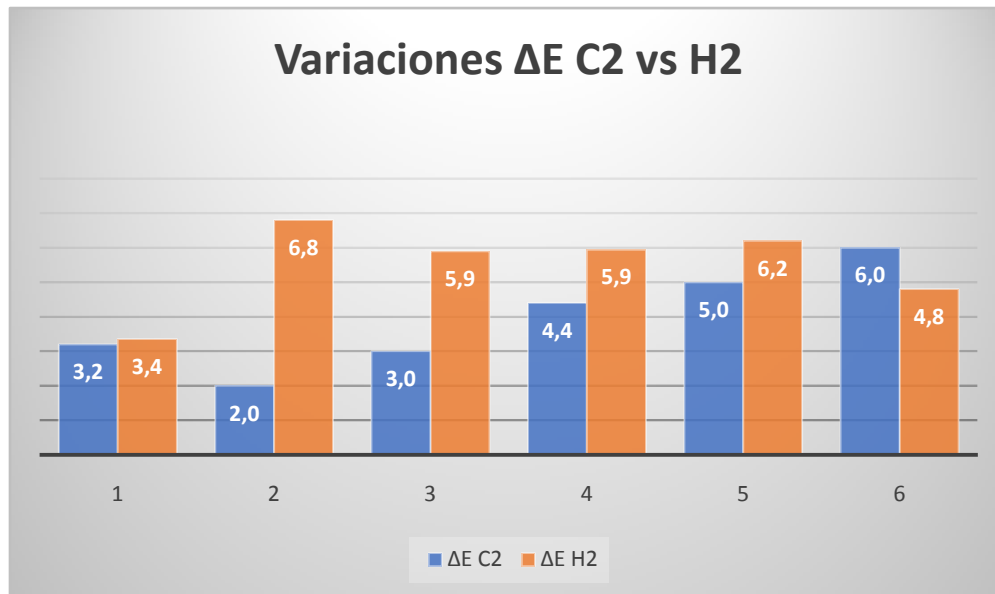


Figura XVIII: Grafico variación color entre canela e hipoclorito 20 minutos sumergido.

I. Análisis Estadístico

Es necesario realizar un estudio estadístico evaluativo de los resultados, de la misma forma que se analizó la primera fase del presente estudio.

Identificación de las variables

De acuerdo con el experimento realizado, se identifican las siguientes variables:

- Variables Cualitativas: No se observan variables cualitativas que afecten el desarrollo de la experiencia.
- Variables Cuantitativas: Variación en la estabilidad del color en las muestras acrílicas dentales marché 1.1 de termocurado color 46.

Pruebas de bondad de ajuste:

Se realizan las pruebas estadísticas primarias necesarias para los siguientes análisis de datos. Estas pruebas se ejecutan a través de un software estadístico. En este caso, se ha utilizado el software "InfoStat/L".

- Pruebas de normalidad a través de prueba **Shapiro-Wilks**.
- Homocedasticidad.

Se espera que el p valor encontrado, sea mayor a 0,05. Ya que, si es mayor, se estará en el lado de la hipótesis nula, por lo tanto, se trata de distribuciones normales, de varianza homogénea, por lo que se estaría cumpliendo con los supuestos necesarios.

Prueba de Normalidad Shapiro-Wilks

Se observa que el valor p es de $0,4670 > 0.05$, por lo que se infiere que los datos siguen una distribución normal.

Shapiro-Wilks (modificado)					
Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
ΔE promedio	5	4,69	2,16	0,90	0,4670

Luego se obtienen gráficos Q-Q plop, cuales confirman que la distribución de los datos es normal. El hecho de que los datos sigan una distribución normal nos permite realizar un test de ANOVA de 1 factor para poder realizar el análisis de hipótesis nula.

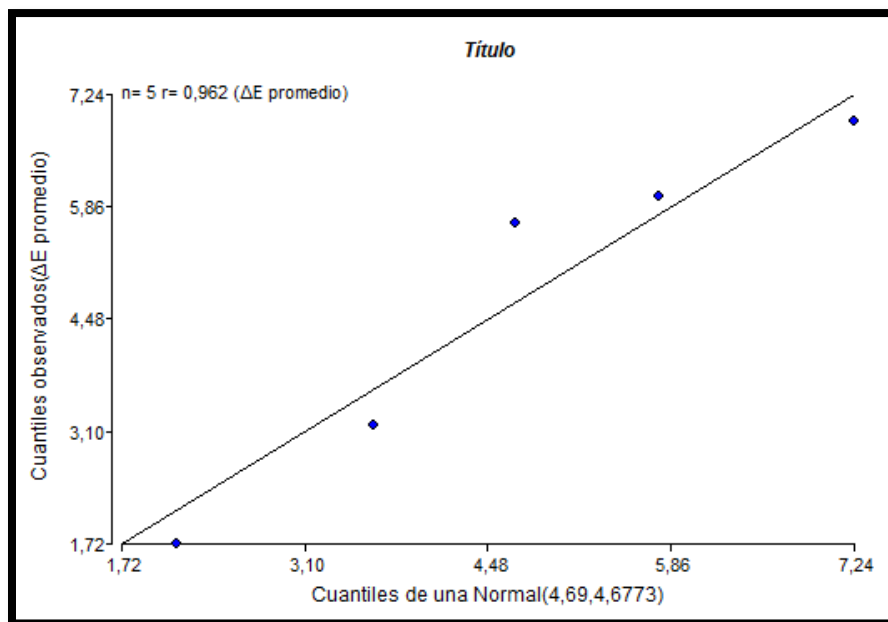


Figura XIX: Grafico de distribución normal.

Test ANOVA

Se realiza test ANOVA de 1 factor, para estudio grupo C1 vs H1 donde las variaciones de ΔE son significativamente diferentes (p -valor $< 0,10$).

La hipótesis nula (H_0) es: No hay diferencias de color significativas, derivadas del análisis estadístico entre las muestras sometidas al aceite de canela versus las que fueron tratadas con hipoclorito de sodio.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
ΔE Cl	6	0,80	0,01	21,80

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	7,97	5	1,59	0,05	0,0712
ΔE H1	7,97	5	1,59	0,05	0,0712
Error	0,00	0	0,00		
Total	7,97	5			

Medias ajustadas, error estándar y número de observaciones

ΔE H1	Media	E.E.	n
1,53	5,09	0,31	1
1,53	6,50	0,02	0
5,80	6,53	0,31	0
4,31	5,05	0,15	1
2,20	5,11	0,66	1

indican diferencias significativas para el nivel elegido

TablaVII: Análisis de varianza paramétrica ANOVA canela e hipoclorito 10 min.

Para el segundo se realiza test ANOVA de 1 factor, para grupo C2 vs H2 donde las variaciones de ΔE son significativamente diferentes (p -valor $< 0,10$).

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
ΔE C2	6	0,80	0,01	21,80

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3,42	4	0,86	1,01	0,0234
ΔE H2	3,42	4	0,86	1,01	0,0234
Error	0,84	1	0,84		
Total	4,27	5			

Medias ajustadas, error estándar y número de observaciones

ΔE H2	Media	E.E.	n
2,80	4,50	0,92	1
5,00	4,10	0,92	1
5,60	2,60	0,92	1
6,40	4,65	0,65	2
7,10	4,80	0,92	1

indican diferencias significativas para el nivel elegido

Tabla VIII: Análisis de varianza paramétrica ANOVA canela e hipoclorito 20 min.

DISCUSIÓN

El presente estudio analizó 3 aceites esenciales de canela comercializados en Chile, utilizando un grupo control de hipoclorito de sodio 0,5 %, con la finalidad de comprobar la acción antifúngica sobre *Cándida albicans* que se describe en la literatura de estos compuestos.

Esta investigación corresponde a un estudio *in vitro*, donde se determinó la concentración mínima inhibitoria (CIM) para cada aceite sobre el crecimiento de *C. albicans*, y donde también, se comprobó la estabilidad colorimétrica de dientes de acrílico de termocurado luego de ser inmersos en una solución en base a aceite de canela a una determinada concentración derivada del estudio de CIM durante 10 y 20 minutos diarios durante 30 días.

Si bien diversos estudios han informado acerca de la efectividad de aceites esenciales de *Cinnamomum zeylanicum* y *Cinnamomum cassia* sobre *C. albicans* y han determinado concentraciones inhibitorias mínimas para estas soluciones^{101, 104}; debido a la gran variabilidad en la composición química del aceite, según la variedad de canela a trabajar y la parte de la planta donde es obtenido el producto⁸⁵, resulta útil analizar aceites comercializados en Chile y poder comparar los resultados que estos presentan.

Nuestro estudio mostro una CIM de:

0.01% v/v para los aceites Knop y Pranarom (aceites 1 y 2) y 0,15% v/v para el aceite Katmandú (aceite 3).

Las diferencias en los resultados obtenidos entre los aceites 1 y 2 versus el aceite 3 pueden ser explicados en relación a la composición química que presentan estos aceites.

El aceite Katmandú (3) es obtenido de la destilación de la hoja de la canela y los aceites Knop y Pranarom (1 y 2) son obtenidos de la destilación de la corteza del árbol de canela.

Previos estudios indican que el aceite esencial de hojas de *C. zeylanicum* tiene cantidades significativas de eugenol⁸⁷ y el aceite obtenido de la corteza del árbol de canela tiene, por su lado, como mayor constituyente al Cinamaldehído⁸⁶, hechos que son corroborado por los análisis cromatográficos de los aceites aquí utilizados (anexo 1).

Eugenol y Cinamaldehído, sustancias postuladas actualmente como los principios activos en los aceites de canela⁵¹, presentan de acuerdo con la literatura disponible, diferentes mecanismos de acción antifúngica⁹⁹.

Respecto al Eugenol, al revisar la evidencia, aun no se tiene claro cuáles son los mecanismos exactos por los cuales se induce la muerte celular, pero se postula que se encuentran relacionados con la inactivación de la síntesis de ergosterol y la producción de radicales libres^{99 100}. Respecto a las propiedades antimicóticas del cinamaldehído, han sido referidos como mecanismos de acción la disminución en el contenido de ergosterol y la disminución en la actividad ATPasa de la membrana plasmática⁹⁸.

El cinamaldehído, es un fenilpropanoide que proporciona una actividad antimicrobiana, significativamente más alta que la del eugenol y el timol, desinfectantes ampliamente utilizados en odontología contra bacterias tanto en planctónicos¹⁰⁶ como en biofilm¹⁰⁷.

El resultado de la CIM para los aceites 1 y 2 es menor a la encontrada por Benbelaïda *et. al.*¹⁰³ que determinó una CIM para aceite de *Cinnamomum cassia* sobre *C. albicans* de 0.052 en % volumen/volumen. Esta diferencia puede explicarse debido a que la cepa de levadura es diferente y a que, como ya fue mencionado anteriormente las propiedades de los aceites difieren según la variedad de canela utilizada.

Los resultados microbiológicos en los 3 aceites de canela permitieron demostrar la efectividad de las soluciones frente al crecimiento de *C. albicans*, al ser significativamente más bajos que la concentración de NaOCl que se utiliza actualmente como desinfectante (0,5 %), de la cual existe gran evidencia respecto a las consecuencias negativas que puede ejercer sobre los materiales de la prótesis^{68, 61}.

En el estudio de Oliveira¹⁰⁰, de 15 pacientes que utilizaron colutorio experimental en base a canela (*Cinnamomum zeylanicum*) a MIC (625.0 µg/ml) durante 30 días, solo 1 individuo reportó un ligero "ardor" en la región de la lengua después de usar el enjuague bucal; sin embargo, el paciente informó que esta queja fue de corta duración (aproximadamente 2 minutos después de su uso), lo cual puede ser explicado por el alto contenido de eugenol del aceite cuando éste es obtenido de la destilación de las hojas), sin embargo, la concentración y el origen del aceite utilizado en dicho estudio difiere a los utilizados en esta investigación.

Este estudio tiene limitaciones relacionadas con el diseño in vitro, el uso de especies únicas y solo 3 exposiciones a aceites esenciales. Por lo tanto, no se expresa el comportamiento real o efectos adversos que pudiesen tener el aceite en mucosa oral, o la efectividad antifúngica con otras cepas de *C. albicans*. Como resolver estas limitantes e ideas de futuras investigaciones se hablan en el apartado de sugerencias.

En cuanto a los resultados de la evaluación de la estabilidad colorimétrica de los dientes de acrílico de termocurado marché, mostraron que todos los grupos experimentaron algún grado de variación de color después de la inmersión en las diferentes soluciones.

El grupo 4 (inmersión en NaOCl 0.5% por 20 minutos) fue el que presentó un mayor delta E, siendo este de 6,98, seguido del grupo 3 (hipoclorito de 10 minutos) con un delta E de 5.98.

Los dientes que fueron sumergidos en solución de canela mostraron un delta E de 3.17 para los que fueron sumergidos durante 10 minutos y 5.66 para los que fueron sumergidos durante 20 minutos.

El grupo control, correspondiente a dientes sumergidos en agua destilada por 20 minutos arrojó el menor delta E de los cinco grupos, siendo este de 1.72.

El instrumento utilizado para la medición del cambio de color (Vita Easyshade V) a pesar de ser considerado el mecanismo más objetivo para medir color en la actualidad, siendo un 33% más preciso que el método visual, tiene varias limitaciones con lo que respecta al presente estudio. Por ejemplo, según las indicaciones del fabricante, es confeccionado para la medición de color en dientes naturales o cerámicas, no en dientes acrílicos.

Los grupos sumergidos en hipoclorito de sodio presentaron los mayores valores delta E, esto podría ser explicado de acuerdo con lo postulado por Reis et al, quien sostiene que el hipoclorito de sodio induce un efecto de blanqueamiento en la superficie de la resina acrílica¹⁰⁸.

La sorción de agua se conoce como una de las principales propiedades de las resinas¹⁰⁹. El efecto del agua en la red polimérica se ha descrito como plastificación, la cual conduce a la alteración de la superficie de los materiales poliméricos, como los dientes artificiales, debido a la relajación de los enlaces a lo largo de la red polimérica. La disminución de varias propiedades, como la estabilidad del color, se produce debido a la separación de las cadenas de polímero por una molécula que no forma enlaces químicos con la cadena, sin embargo, actúa como un ocupante del espacio. Esto explica porque incluso el grupo de inmersión en suero también presentó un grado de alteración de color captada por el espectrofotómetro.

Al comparar los resultados obtenidos mediante el uso del espectrofotómetro versus una evaluación visual de las muestras, se puede inferir que una posición estandarizada del lector no fue posible delogar a cabalidad, dado que la diferencia de color, mediante el método visual, entre los grupos es imperceptible tras 30 días de experimentación, lo cual no coincide con los resultados arrojados por el instrumento utilizado. Esto puede ser explicado por la curvatura que los dientes acrílicos presentan por vestibular pudiendo verse alterada la correcta toma de color, al no obtener un contacto íntimo entre el lector y el acrílico, además según un estudio realizado por la Universidad Mayor en 2015¹¹⁰ se obtuvo como resultado que sólo hay un 18% de coincidencia entre el método visual y el instrumental con espectrofotómetro, lo que indica la alta sensibilidad de este instrumento ante mínimos cambios en las coordenadas del sistema CIEL, las cuales no son percibidas por el ojo humano.

Estos resultados pueden ser comparados con los obtenidos por Freire 2014, donde se sumergió a las muestras en hipoclorito al 0,5% (dientes acrílicos) durante 20 minutos al día por 30 días, en el cual se obtuvo un delta E de 5.36 para el grupo de dientes acrílicos de color oscuro versus un delta E de 2.19 para el grupo de color claro, lo cual puede indicar que el color del acrílico puede tener una implicancia en la estabilidad de color.

CONCLUSIONES

1. A partir de los resultados se concluye que existe un efecto antimicrobiano sobre el crecimiento de *Candida albicans* al utilizar aceite esencial de canela como agente desinfectante, utilizando como control hipoclorito de sodio al 0.5%

2.A partir de los resultados de la medición de color con sistema CIELAB de los dientes acrílicos, se concluye que existe una menor variación en la estabilidad de color al utilizar el aceite de canela como método desinfectante al compararlo al hipoclorito de sodio al 0,5%.

SUGERENCIAS

Respecto a los resultados microbiológicos, este estudio tiene limitaciones relacionadas con el diseño in vitro, el uso de especies únicas y solo 3 exposiciones a aceites esenciales. Por lo cual se sugiere para nuevas investigaciones el trabajar con el compuesto químico cinamaldehído puro, de manera de poder evaluar su actividad de forma aislada.

Respecto a los resultados de color se encontraron con limitantes tales como que el instrumento utilizado para medir cambio de color no es específico para el acrílico, la ausencia de un aparato termociclador lo cual no nos permite asemejar las condiciones que se somete el acrílico en boca por lo que los días que se sometió al aceite podrían no ser suficientes.

Sugerimos trabajar con superficies de acrílico planas para aumentar la precisión y estandarización de la medición, recrear las condiciones del acrílico en boca median un instrumento que asemeje el desgaste de acrílico, aumentar los días de exposición a las sustancias utilizadas en el estudio, y probar la acción antibacteriana del aceite esencial de canela contra otros patógenos orales.

RESUMEN

Como método químico de limpieza de prótesis dental removible se recomienda el uso de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 0,5 % del cual se ha comprobado que puede provocar degradación de los componentes de la resina acrílica, alteraciones en la rugosidad, deformación de la prótesis y cambios de color en los dientes acrílicos. El aceite esencial de canela posee numerosos efectos antimicrobianos, mostrando una fuerte actividad contra *Cándida albicans*, patógeno de gran implicancia en el desarrollo de la Estomatitis subprótesis (ES).

Los objetivos del trabajo son: i) determinar el efecto antifúngico de 3 aceites esenciales de canela comercializados en Chile sobre *Cándida albicans* determinando la concentración inhibitoria mínima (CIM) y ii) analizar la estabilidad de color de los dientes acrílicos debido al uso de este aceite como agente desinfectante.

Para la determinación de la CIM, se realizó por microdilución en caldo para cada aceite, adaptando el estándar CLSI, en 3 ocasiones diferentes.

Mediante el uso de un espectrofotómetro de Vita EasyshadeV se realizaron tomas de color a dientes acrílicos antes y después de 30 días de ser sumergidos en distintas soluciones (Canela CIM, NaOCl 0,5% y suero), y se estableció la diferencia de color mediante la fórmula CIELab.

La CIM para los aceites esenciales de canela fue de 0.01% v/v para el AceitePranarom® y Knop, y de 0.15% v/v para aceiteKatmandú®. Las diferencias en estos resultados pueden explicarse por la composición química de estos aceites, obteniéndose resultados de CIM más bajos cuando el principal constituyente químico es cinamaldehído.

Todos los grupos experimentaron algún grado de variación de color después de la inmersión en las diferentes soluciones. El grupo 4 (inmersión en NaOCl 0.5% por 20 minutos) fue el que presentó un mayor delta E, siendo este de 6,98, seguido del grupo 3 (hipoclorito de 10 minutos) con un delta E de 5.98. Los dientes que fueron sumergidos en solución de canela mostraron un delta E de 3.17 para los que fueron sumergidos durante 10 minutos y 5.66 para los que fueron sumergidos durante 20 minutos.

Se concluye que los aceites evaluados son efectivos contra el crecimiento de *C. albicans* y que existe una menor variación en la estabilidad de color al utilizar el aceite de canela como método desinfectante comparado a NaOCl al 0,5%, y que los dientes sumergidos en canela presentaron un menor delta E en comparación a los inmersos en NaOCl para ambos tiempos de experimentación.

REFERENCIAS

- ¹INE. 2015. Estadísticas Vitales Anuario 2015. Santiago, Chile
- ²MINSAL (2003). *Encuesta nacional de salud*. Santiago, Chile..
- ³Arteaga O, Urzúa I, Espinoza I, Muñoz A, Mendoza C. Prevalencia de caries y pérdida de dientes en población de 65 a 74 años de Santiago, Chile. *Rev Clin Periodoncia Implantología Rehabilitación Oral* 2009;2(3):161-6.
- ⁴Ayuso-Montero Raúl, Torrent-Collado José, López-López José. Estomatitis protésica: puesta al día. *RCOE [Internet]*. 2004 Dic ; 9(6): 645-652. Disponible en:http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1138-123X2004000600004&Ing=es
- ⁵Darwazeh AM, Al-Refai S, Al-Mojaiwel S. Isolation of Candida species from the oral cavity and fingertips of complete denture wearers. *J Prosthet Dent* 2001;86:420-3.
- ⁶Gunne, J. Masticatory ability in patients with removable dentures. A clinical study of masticatory efficiency, subjective experience of masticatory performance and dietary intake. *Swed Dent J Suppl*. 1985;27:1–107.
- ⁷Roumanas ED. The social solution-denture esthetics, phonetics, and function. *J Prosthodont*. 2009;18:112– 115
- ⁸Wang Y. The language function after teeth lost and restoration. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 1965;1:30–34.
- ⁹Montero, J., Castillo-Oyagüe, R., Lynch, C. D., Albaladejo, A., & Castaño, A. (2013). Self-perceived changes in oral health-related quality of life after receiving different types of conventional prosthetic treatments: A cohort follow-up study. *Journal of Dentistry*, 41(6), 493–503.
- ¹⁰D. Loza, H. R. Valverde. "Diseño de Prótesis Parcial Removible" Ed. Ripano, Madrid. 2007. 239 pp. 45- 66. Cap. 2
- ¹¹The glossary of prosthodontic terms. *The journal of prosthetic dentistry: The academy of prosthodontics. The glossary of prosthodontic terms*.
- ¹²Assunção, W. G., Barão, V. A. R., Delben, J. A., Gomes, É. A., & Tabata, L. F. A comparison of patient satisfaction between treatment with conventional complete dentures and overdentures in the elderly: a literature review. *Gerodontology*. 2009;27(2), 154–162.
- ¹³Edelberg MH, Macchi RL. *Materiales Dentales*. 4a Ed. Argentina: Panamericana; 2009.
- ¹⁴Mayta Ali CR, Mendoza Alejo GA, Zeballos López L. Prótesis Removible de Resina. *Revista de Actualización Clínica Investiga*. 2012;24:1158-63
- ¹⁵Albores L, Maya R, Peña M, et al. Evaluation of the water sorption and porosity of three resin denture base materials. *Rev ADM*. 2014;71(3):136-41.
- ¹⁶Gautam R, Singh R, Sharma V, et al. Biocompatibility of polymethylmethacrylate resins used in dentistry. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012;100(5):1444- 50.
- ¹⁷José María Fonollosa Pla *Prótesis Completas. Sobredentaduras y prótesis híbridas. Teoría y técnica de laboratorio* © Ediciones Especializadas Europeas S.L. CIF: B-61.731.360 . 2014. Primera Ed. ISBN: 978-84-941739-6-7. 3.
- ¹⁸Lucas LVM Gennari FH; Goiato Cohello M; Dos Santos DM; Moreno A; Falcón-Antenucci RM. *Estética en prótesis removibles*. 2012
- ¹⁹Joiner A. Tooth colour: a review of the literature. *Journal of dentistry*. 2004;(32):3-12..
- ²⁰Joiner A, Hopkinson I, Deng Y, Westland S. A review of tooth colour and whiteness. *Journal of Dentistry*. 2008;(36):2-7.
- ²¹Firdchild M. Color appearance models and complex visual stimuli. *Journal of dentistry*. 2010;(38):25-33.
- ²²Valenzuela V, Bofill S, Crisostomo J, Pavez F, Brunet J. Selection of tooth colour: Comparison of visual and spectrophotometric methods. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*. 2016;(9(2)).
- ²³Chu S, Trushkowsky R, Paravina R. Dental color matching instruments and systems. Review of clinical and research aspects. *Jornal of dentistry*. 2010;(38):2-16.
- ²⁴Danilo G, Fernanda H, Raimundo S. Evaluación in vitro del color de resinas compuestas de esmalte tonos A2 y A3 con Vita Easyshade V. 2018;

- ²⁵[Internet]. Biodental.com.ar. 2019 [cited 16 July 2019]. Available from: http://www.biodental.com.ar/home/wp-content/uploads/2015/11/VITA_Easyshade_V.pdf
- ²⁶ Velasquez L, Gallardo J. ORAL HEALTH-RELATED QUALITY OF LIFE IN EDENTULOUS PATIENTS WITH COMPLETE REMOVABLE DENTURES DENTAL. CLINIC UCSG 2014. Conrado. 2018;(14(61)).
- ²⁷ Rodriguez V, Arellano L, Zambrano R, Roldan M. Lesiones de los tejidos blandos de soporte en pacientes portadores de dentaduras totales. Los Nevados, estado Mérida. Revista odontológica de los andes. 2007;(2(1)).
- ²⁸ Diaz Y, Martell I, Zamora J. Afecciones de la mucosa oral encontradas en pacientes geriátricos portadores de prótesis estomatológicas. Revista cubana de estomatología. 2007;(44-3).
- ²⁹ Gutiérrez CG, Bustos Medina L, Sanchez M, Zaror Cornejo L, Zambrano ME. Estomatitis Subprotésica en Pacientes de la IX Región, Chile. International journal of odontostomatology. 2013;7:207-13
- ³⁰ Rodriguez V, Arellano L, Zambrano R, Roldan M. Lesiones de los tejidos blandos de soporte en pacientes portadores de dentaduras totales. Los Nevados, estado Mérida. Revista odontologica de los andes. 2007;(2(1)).
- ³¹ Avila G, Rojas S, Santos S, Durañona L. Caracterización de las lesiones de la mucosa bucal en pacientes portadores de prótesis. Revista electronica Dr Zoilo Marinello. 2014;(39-8).
- ³² Pérez Hernández Y, Pérez Ayala D, Milians Planes E, Díaz CZ, Vento Blanco Y. La rehabilitación protésica en las lesiones bucales del adulto mayor. Rev Cienc Méd Pinar del Río [internet]. ene.-feb. 2015
- ³³ Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont* 2011; **20**: 251-260.
- ³⁴ Lee X, Cajas N. Asociación entre recuento salival de levaduras del género *Candida* y estomatitis protésica en pacientes portadores de prótesis removible. [Internet]. 2012 [cited 16 July 2019];. Available from: <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/115700>.
- ³⁵ Lee X, Cajas N, Gomez L, Vergara C, Ivankovic M, Astorga E. Ocurrencia de levaduras del género *Candida* y estomatitis protésica antes y después del tratamiento rehabilitador basado en prótesis removible. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral*. 2015;(8-1)..
- ³⁶ Pires FR, Santos EB, Bonan PR, De Almeida OP, Lopes MA. Denture stomatitis and salivary *Candida* in brazilian edentulous patients. *J Oral Rehabil* 2002;29:1115-9.
- ³⁷ Newton AV. Denture sore mouth. *Br Dent J* 1962; 112: 357-359.
- ³⁸ Wilson J: The aetiology, diagnosis and management of denture stomatitis. *Br Dent J* 1998;185:380-384
- ³⁹ Otero E, Peñamaría M, Rodríguez M, Martín P, Blanco A. Oral candidosis in the older patient. *Avances en odontoestomatología*. 2015;(31-3).
- ⁴⁰ Gonzalez S, Reyes V, Gil M, Perez K. Risk factors associated to the apparition of subprosthesis stomatitis. *Revista de ciencias medicas de La Habana*. 2015;(21-1).
- ⁴¹ Ayuso R, Torrent J, Lopez J. Estomatitis protésica: puesta al día. *RCOE*. 2004;(9-6).
- ⁴² Williams DW, Kuriyama T, Silva S, Malic S, Lewis MA. *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontol* 2000. 2011;55(1):250-65.
- ⁴³ Mergoni G, Percudani D, Lodi G, Bertani P, Manfredi M. Prevalence of *Candida* Species in Endodontic Infections: Systematic Review and Meta-analysis. *JOE*. 2018;(44-11).
- ⁴⁴ Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002;(78):455-459.
- ⁴⁵ Le Bars P, Piloquet P, Daniel A, Giumelli B. Immunohistochemical localization of type IV collagen and laminin (alpha1) in denture stomatitis. *J Oral Pathol Med*. 2001;30(2):98-103.
- ⁴⁶ Verran J, Maryan CJ. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. *J Prosthet Dent* 1997; 77: 535_9.
- ⁴⁷ Wilson J. The aetiology, diagnosis and management of denture stomatitis. *Br Dent J*. 1998;185(8):380-4.
- ⁴⁸ Puryer j. Denture Stomatitis – A Clinical Update. *Prosthodontics*. 2016;.
- ⁴⁹ Barata D, Duran A, Carrillo S. Estomatitis protesica. Aspectos clinicos y tratamiento. *Prof dent*. 2002;(5-10):622-627.

-
- ⁵⁰ De souza et al. Improving practice guidelines for the treatment of denture-related erythematous stomatitis: a study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2017;(18-211).
- ⁵¹ Machado A, Breeding L, Vergani C, da cruz L. Hardness and the surface roughness of relined and denture base acrylic resins after repeated disinfection procedures. *J Prosthet Dent*. 2009;(102-2):115-22.
- ⁵² Hong G, Murata H, Sadamori S, Hamada T. Influence of denture cleansers on the color stability of three types of denture base acrylics. *J Prosthet Dent*. 2009;(101-3):205-13.
- ⁵³ Calderon M, Moromi H. Eficacia de diferentes agentes desinfectantes en la remoción de *Candida albicans*, *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* adheridos a resina acrílica de termocurado. *Odontología sanmarquina*. 2014;(17-2).
- ⁵⁴ Balero D, Helena C, Freitas R, Resende L, Oliveira H. Abrasiveness of conventional and specific denture-cleansing dentifrices. *Brazilian dental journal*. 2012;(23-2).
- ⁵⁵ ur
- ⁵⁶ Felton D. Evidence-based guidelines for the care and maintenance of complete dentures: a publication of the American College of Prosthodontists. *J Prosthodont*. 2011;(20-1):1-12.
- ⁵⁷ Oliveira J, da Silva I, Trindade L, Lima E, Carlo H, Cavalcanti A et al. Safety and Tolerability of Essential Oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume Leaves with Action on Oral Candidosis and Its Effect on the Physical Properties of the Acrylic Resin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014;2014:1-10.
- ⁵⁸ Freire T, Aguilar F, Garcia L, Pires de souza F. Colour stability of denture teeth submitted to different cleaning protocols and accelerated artificial aging. *Eur J Prosthodont Restor Dent*. 2014;(22-1):24-7.
- ⁵⁹ Baba Y, Sato Y, Owada G, Minakuchi S. Effectiveness of a combination denture-cleaning method versus a mechanical method: comparison of denture cleanliness, patient satisfaction, and oral health-related quality of life. *J Prosthodont Res*. 2018;(62-3):353-358.
- ⁶⁰ MINSAL. Recomendaciones de higiene bucal y cuidados para personas portadoras de prótesis dentales removibles. Santiago, Chile; 2019.
- ⁶¹ Paranhos HeF, Salles AE, Macedo LD, Silva-Lovato CH, Pagnano VO, Watanabe E. Complete denture biofilm after brushing with specific denture paste, neutral soap and artificial saliva. 2013;(24(1)):47-52.
- ⁶² Papadiochou S, Polyzois G. Hygiene practices in removable prosthodontics: A systematic review. *Int J Dent Hyg*. 2018;(16(2)):179-201.
- ⁶³ Paranhos HF, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Cruz PC, de Freitas-Pontes KM, Watanabe E, et al. Effect of Three Methods for Cleaning Dentures on Biofilms Formed In Vitro on Acrylic Resin. *J Prosthodont*. 2009; 18(5):427-431.
- ⁶⁴ Remington A. Farmacia. 20^o ed: Editorial médica panamericana; 2003. p. 432; 1797; 857;.
- ⁶⁵ 2002. 81. Flórez J. Farmacología Humana. Quinta edición ed2008. 8
- ⁶⁶ Hedgecock L. Antimicrobial agents: Henry Kimpton; 1967.
- ⁶⁷ Cole A. Biochemistry and Oral Biology. 2^o ed1988.
- ⁶⁸ Arnhold J, Hammerschmidt S, Arnold K. Role of functional groups of human plasma and luminol in scavenging of NaOCl and neutrophil-derived hypochlorous acid. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1097(2):145-51.
- ⁶⁹ Cartagena A, Amestica R. EVALUACIÓN IN VITRO DE LA EFICACIA DE AGENTES COADYUVANTES EN LA HIGIENE PROTÉSICA SOBRE *CANDIDA ALBICANS*. Universidad Finnis terrae. 2017;.
- ⁷⁰ Suci P, Tayler B. Action of Chlorhexidine Digluconate against Yeast and Filamentous Forms in an Early-Stage *Candida albicans* Biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;(46-11):3522–3531.
- ⁷¹ Calderon M, Moromi H. Eficacia de diferentes agentes desinfectantes en la remoción de *Candida albicans*, *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* adheridos a resina acrílica de termocurado. *odontología sanmarquina*. 2014;(17-2).
- ⁷² Cornejo A, Juarez C. EFECTO DE DOS SOLUCIONES LIMPIADORAS DE PRÓTESIS TOTALES EN EL CONTROL DE PLACA BACTERIANA. *REVISTA CIENCIA Y TECNOLOGÍA*. 2017;(3-5):6-14.
- ⁷³ Makino SI, Cheun HI, Tabuchi H, Shirahata T. Antibacterial activity of chaffvinegar and its practical application. *J VetMedSci*. 2000; 8:893-895.

- ⁷⁴Paranhos HF, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Cruz PC, de Freitas-Pontes KM, Watanabe E, et al. Effect of Three Methods for Cleaning Dentures on Biofilms Formed In Vitro on Acrylic Resin. *J Prosthodont*. 2009; 18(5):427-431.
- ⁷⁵Falzon C, Balavanoba A. *Phytotherapy An Introduction to Herbal Medicine*. 2017;:217-227.
- ⁷⁶Vairappan CS, Nagappan T, Kulip J. The essential oil profiles and antibacterial activity of six wild *Cinnamomum* species. *Nat Prod Commun*. 2014;9:1387–1389.
- ⁷⁷Dantas L et al. Efficacy of citronella and cinnamon essential oil on *Candida albicans* biofilms. *Acta Odontologica Scandinavica*. 2016;.
- ⁷⁸Flores M et al. INVESTIGACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES, SUS CARACTERÍSTICAS Y FINALIDAD DE USO. ANÁLISIS DEL ESTADO DE SU REGULACIÓN EN CHILE Y EL MUNDO. Universidad de Chile [Internet]. 2010 [cited 16 July 2019];. Available from: http://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2010/qf-flores_mc/pdfAmont/qf-flores_mc.pdf
- ⁷⁹Bruneton, J. (2001) *Farmacognosia, fotoquímica, plantas medicinales*. Editorial Acriba 2ª Edición
- ⁸⁰Bandoni, A. *Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica*. 2000. 1ª Edición. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata.
- ⁸¹Remasinghe P, Piger S, Premakumara G. Medicinal properties of 'true' cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*): a systematic review. *BMC Complement Altern Med*. 2013;(13-275).
- ⁸²Jayaprakasha G, Rao L. Chemistry, biogenesis, and biological activities of *Cinnamomum zeylanicum*. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2011;(51-6).
- ⁸³García H. *Flora Medicinal de Colombia*. Tercera ed. Bogotá: Tercer Mundo Editores; 2000.
- ⁸⁴Maistre J. *Las plantas de especias*. Segunda ed. Barcelona: Editorial Blume; 2000.
- ⁸⁵Shen Q, Chen F, Luo J: Comparison studies on chemical constituents of essential oil from ramulus cinnamomi and cortex cinnamomi by GC-MS. *Zhong Yao Cai* 2002, 25:257–258
- ⁸⁶Singh G, Maurya S, DeLampasona MP, Catalan CA: A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food Chem Toxicol* 2007, 45:1650–1661.
- ⁸⁷Simic A, Sokovic MD, Ristic M, Grujic-Jovanovic S, Vukojevic J, Marin PD: The chemical composition of some lauraceae essential oils and their antifungal activities. *Phytother Res* 2004, 18:713–717.
- ⁸⁸Shreaz S. Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. *Fitoterapia*. 2016;(112).
- ⁸⁹Sadhna RS, Libin RS, Javier Z, Bibiana RG, Lynn L, Mendel F. Carvacrol and cinnamaldehyde inactivate antibiotic-resistant *Salmonella enterica* in buffer and on celery and oysters. *J Food Protect* 2010;73:234-40
- ⁹⁰Demo M, Oliva M, Ramos B, Zigadlo J. Determination of the antibacterial activity of the pure components of essential oils. *Higiene Alimentaria* 2001;85:87-90.
- ⁹¹Kwon JA, Yu CB, Park HD. Bactericidal effects and inhibition of cell separation of cinnamic aldehyde on *Bacillus cereus*. *Lett Appl Microbiol* 2003;37:61-65
- ⁹²Xie XM, Fang JR, Xu Y. Study of antifungal effect of cinnamaldehyde and citral on *Aspergillus flavus*. *Food Science* 2004;25:32-34.
- ⁹³Bang KH, Lee DW, Park HM, Rhee YH. Inhibition of fungal cell wall synthesizing enzymes by trans-cinnamaldehyde. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 2000;64:1061-63.
- ⁹⁴Liao BC, Hsieh CW, Liu YC, Tzeng TT, Sun YW, Wung BS. Cinnamaldehyde inhibits the tumor necrosis factor- α -induced expression of cell adhesion molecules in endothelial cells by suppressing NF- κ B activation: Effects upon I κ B and Nrf2. *Toxicol Appl Pharm* 2008;229:161-71.
- ⁹⁵Koh WS, Yoon SY, Kwon BM, Jeong TC, Nam KS, Han MY. Cinnamaldehyde inhibits lymphocyte proliferation and modulates T cell differentiation. *Int J Immunopharmacol* 1998;20:643-60.
- ⁹⁶Imai T, Yasuhara K, Tamura T, Takizawa T, Ueda M, Hirose M, Mitsumori K. Inhibitory effects of cinnamaldehyde on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung carcinogenesis in rasH2 mice. *Cancer Lett* 2002;175: 9-16.
- ⁹⁷Kwon BM, Lee SH, Cho YK, Bok SH, So SH, Youn MR. Synthesis and biological activity of cinnamaldehydes as angiogenesis inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 1997;7: 2473-6

-
- ⁹⁸ Shreaz S, Sheikh RA, Bhatia R, Hashmi AA, Manzoor N, Khan LA. Anticandidal activity of cinnamaldehyde, its ligand and Ni (II) complex: Effect of increase in ring and side chain. *Microb Pathogenesis* 2010;49:75-82
- ⁹⁹ Ahmad A, Khan A, Manzoor N, Khan L. Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against *Candida*. *Microb Pathog.* 2010;(48-1):35-41.
- ¹⁰⁰ Khan A, Ahmad A, Akhtar F, Yousuf S, Xess I, Khan LA, et al. Induction of oxidative stress as a possible mechanism of the antifungal action of three phenylpropanoids. *FEMS Yeast Res* 2011; 11(1):114-22.
- ¹⁰¹ Oliveira J. Safety and Tolerability of Essential Oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume Leaves with Action on Oral Candidosis and Its Effect on the Physical Properties of the Acrylic Resin. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014;.
- ¹⁰² Carvalho, P.C.L., de Sa, N.P., Lacerda, I.C.A., Pataro, C., Rosa, L.H., Alves, R.S., Lyon, J.P., Rosa, C.A., Johann, S. Anti-Candida Activity of Cinnamon Inhibition of Virulence Factors of Clinical Strains of *Candida albicans* by Essential Oil of *Cinnamomum zeylanicum*. *PSM Microbiol.* 2018.3(1): 4-12.
- ¹⁰³ Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida, Jacqueline Felipe de Paula, Rossana Vanessa Dantas de Almeida, David Wynne Williams, Josimeri Hebling & Yuri Wanderley Cavalcanti. Efficacy of citronella and cinnamon essential oils on *Candida albicans* biofilms, *Acta Odontologica Scandinavica.* 2016. 74:5, 393-398, DOI: 10.3109/00016357.2016.1166261
- ¹⁰⁴ Benbelaid, Fethi & Khadir, Abdelmounaim & Bendahou, Mourad & Ben-Yelles, Ilhem & Muselli, Alain & Costa, Jean. Eradication of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* biofilms by *Cinnamomum cassia* essential oil solution as a root canal irrigant. *The Natural Products Journal.* 2017. 07.
- ¹⁰⁵ Cantón, Emilia & Martin Mazuelos, Estrella & Espinel-Ingroff, A. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). 2007. capítulo 15a
- ¹⁰⁶ Didry, N.; Dubreuil, L.; Pinkas, M. Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. *Pharm. Acta Helv.*, 1994, 69(1), 25-28.
- ¹⁰⁷ Kavanaugh, N.L.; Ribbeck, K. Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, 78(11), 4057-4061
- ¹⁰⁸ Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dent Mater.* 2006; 22:211-222
- ¹⁰⁹ Reis KR, Bonfante G, Pegoraro LF, Conti PC, Oliveira PC, Kaizer OB. In vitro wear resistance of three types of polymethyl methacrylate denture teeth. *J Appl Oral Sci* 2008;16(3):17
- ¹⁰⁸ Crisóstomo, J. (2015). Estudio comparativo del método visual y espectrofotometría en la selección del color dentario. Retrieved 5 November 2019, from <http://repositorio.umayor.cl/xmlui/handle/sibum/1562>

ANEXOS

UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
Comité de Revisión
Proyectos de Investigación


Valparaíso, 05 de Abril de 2019

Sr.
Prof. Dr. Rafael Cabellos Olguin
Presente

De nuestra consideración:

Se realizó la evaluación de su Proyecto de Investigación titulado "Efecto del uso de aceite esencial de canela como agente antimicrobiano sobre *Candida albicans* y cambios en la estabilidad de color en dientes acrílicos de termocurado", bajo el código PREGBIOSEG-07-18 no encontrándose reparos desde el punto de vista metodológico ni de bioseguridad. En consecuencia, se aprueba la ejecución de su proyecto.

Atentamente,



Prof. Dr. Ricardo Moreno Silva
Presidente
Comité de Revisión
Proyectos de Investigación
Facultad de Odontología

Analisis cromatográficos

1. Aceite katmandú

ANÁLISIS

Producto: Aceite Esencial Canela Hoja
Nombre común: CANELA
Nombre botánico: Cinnamomum zeylanicum
Origen: Sri Lanka
Parte Destilada: Hojas
Extracción: Destilación al vapor de agua

Batch: 1007578
Vencimiento: 11/2019

Características del análisis

Analytical conditions: GC Column Rxi-5SiLMS, Length: 30.0m, Inside Diameter: 0.25mm, Thickness: 0.25µm

Mass Spectrometer: Detector Type: Quadrupole MS, Ion Source: EI, Ion Source Temp: 200.0°C

Over Temp. Program (°C): 50.0 to 270.0, Temp Rate: 5.0

Características físicas

Densidad a 20°C	1,0463
Índice de refracción a 20°C	1,5319
Rotación Óptica	-0,05°

Katmandú
aromas del mundo

PERFIL CROMATOGRÁFICO - TABLA DE RESULTADOS

Componente	%
Linalool	2,21
Eugenol	73,48
b- caryophyllene	4,56
Benzyl benzoate	4,34
Sabinene	0,25
Total	84,59 %

2. Aceite Pranarom

Tableau de résultats 2 : CINNAMOMUM CASSIA LOT N° OF24890

Pics	Temps de rétention	Constituants	%
46	67,6	2-METHOXY-BENZALDEHYDE	0,08
47	69,2	OXYDE DE CARYOPHYLLENE	0,05
48	71,1	NEROLIDOL	0,23
49	71,5	3-PHENYLPROPANOL	0,14
50	72,0	E-CINNAMALDEHYDE	85,41
51	73,6	GLOBULOL	0,02
52	73,8	VIRIDIFLOROL	0,05
53	76,0	SPATHULENOL	0,08
54	77,2	ACETATE DE CINNAMYLE	4,44
55	77,7	EUGENOL	0,06
56	78,3	SESQUITERPENOL	0,02
57	79,2	CADINOL ISOMERE	0,04
58	80,5	CARVACROL	0,02
59	81,4	RIMUENE Mw=272	0,01
60	83,4	ALCOOL CINNAMIQUE	0,26
61	87,0	OXYDE DE MANOYLE	0,65
62	88,2	DITERPENE Mw=272	0,04
63	91,3	Trans-o-METHOXY-CINNAMALDEHYDE	0,59
64	92,4	COUMARINE Mw=146	1,39
65	99,7	BENZOATE DE BENZYLE	0,06
		TOTAL	99,98

Date de l'analyse – date of the analysis : Février 2016,

Pranarôm International
C. Schulze
Contrôle qualité

Emilia Cantón Lacasa
Estrella Martín Mazuelos
Ana Espinel-Ingroff

15a.1. Fundamento

Cuando la anfotericina B y la 5-fluorocitosina eran las únicas opciones terapéuticas para el tratamiento de las infecciones fúngicas profundas, la realización de pruebas de sensibilidad antifúngica no estaba muy justificada. A medida que la industria farmacéutica fue introduciendo en el mercado nuevos antifúngicos o nuevas formulaciones de los ya conocidos, se hizo necesaria la realización de pruebas de sensibilidad con el fin de comparar la actividad de los mismos y detectar las posibles resistencias.

Motivado por esta nueva realidad, el "Clinical Laboratory Standard Institute" (CLSI, antes NCCLS) realizó, en 1985, una encuesta en diferentes laboratorios para conocer qué pruebas de sensibilidad antifúngica realizaban habitualmente y cómo las realizaban. Además, se les solicitó la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a una serie de cepas utilizando su propia metodología. Los resultados mostraron que pocos laboratorios realizaban pruebas de sensibilidad antifúngica y que la metodología empleada (medio de cultivo, inóculo, etc.) era muy variada. Los resultados de las CMI también fueron impactantes: en algunos casos, las diferencias entre los distintos laboratorios fueron hasta 512 veces mayores.

Como consecuencia de esta realidad el CLSI creó un subcomité para el estudio y estandarización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos en las levaduras del género *Candida* y en *Cryptococcus neoformans*, que dio lugar a la publicación, en 1992, de la propuesta de un método (M27-P). En 1995 se publicó el método provisional (M27-T) y, en 1997, se aprobó definitivamente el método conocido como M27-A en el que se incorporan los puntos de corte de fluconazol, itraconazol y 5-fluorocitosina y las CMI para las cepas control de calidad. En el año 2008 se publicó un nuevo documento, el M27-A3, en el que se incluyen los valores de la CMI de voriconazol, ravuconazol y posaconazol para las cepas control de calidad. En un intento de facilitar y agilizar la realización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos en los laboratorios clínicos, en 2003 el comité estandarizó el método de difusión en disco, (documento M44-P) que fue aprobado definitivamente en 2004 (documento M44-A).

Como complemento del método de sensibilidad para levaduras, en 1998 el CLSI publicó su propuesta metodológica para el estudio de sensibilidad

antifúngica en hongos filamentosos (documento M38-P) y en 2002 aprobó el método definitivo (documento M38-A).

A pesar de todo, las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos no están tan desarrolladas como las de los antibacterianos. Los puntos de corte y los criterios de sensibilidad y resistencia de las levaduras para los antifúngicos fluconazol, itraconazol y 5-fluorocitosina sólo estaban determinados para las micosis orofaríngeas de enfermos con sida y para las candidemias. Por lo tanto, estos datos pueden variar en el futuro y hay que prestar atención a las nuevas normas que vayan publicando los comités de estandarización de ensayos *in vitro*, tanto europeo (EUCAST) como americano (CLSI). Recientemente, una revisión exhaustiva de los puntos de corte de fluconazol, realizada por Pfaffer y cols. [1], en la que se incluyen 603 candidiasis invasivas y 692 candidiasis orofaríngeas producidas por aislados con CMI a fluconazol elevadas, ha permitido ratificar los puntos de corte de fluconazol propuestos por el CLSI tanto los determinados por el método de microdilución como los determinados por difusión en disco.

En este Capítulo se describen con detalle los métodos de referencia para levaduras, M27-A3 y M44-A [2,3], y para hongos filamentosos, M38-A, propuestos por el CLSI [4]. Básicamente, consisten en cuantificar la inhibición de crecimiento producida por el antifúngico comparada con el crecimiento de la levadura o hongo en el mismo medio pero sin antifúngico (control). El medio de cultivo, pH, tampón, inóculo, tiempo y temperatura de incubación deben ajustarse estrictamente a lo recomendado en dichos documentos puesto que cualquier variación de estos parámetros puede afectar los resultados.

15a.2. Método de microdilución para levaduras (M27-A3)

15a.2.1. Medio de cultivo

El medio de cultivo que ha dado mejor concordancia, tanto intra como interlaboratorio, es el medio sintético RPMI 1640 con glutamina y sin bicarbonato sódico (Gibco, ICN, Oxoid, Sigma), tamponado

con ácido mesofolino propano sulfónico (MOPS) 0,164 M (ICN, Sigma), ajustado a pH 7a0,1 y con 0,2% de glucosa.

Componentes:

- RPMI 1640 10,40 g
- Tampón MOPS 34,53 g
- Agua destilada 1.000 ml

Preparación:

1. Disolver en 900 ml de agua destilada las cantidades indicadas, agitando hasta su completa disolución.
2. Ajustar el pH a 6,9 - 7,1, utilizando NaOH 1N ó 10N (medir la cantidad utilizada).
3. Añadir agua destilada hasta completar 1 litro.
4. Filtrar estérilmente.
5. Mantener refrigerado hasta su uso (4-8 °C, máximo 6 meses).

15a.2.2. Preparación de la solución madre de antifúngico

Preferiblemente debe utilizarse sustancia valorada que se puede solicitar a los laboratorios productores.

Un consejo...

- En caso de no disponer de sustancia valorada se puede utilizar el preparado comercial para infección endovenosa, comprobando que las CMI para las cepas control están dentro del intervalo recomendado.

Antifúngicos solubles en agua (fluconazol, 5-fluorocitoxina, caspofungina, micafungina)

1. Preparar una solución, pesando la cantidad suficiente de polvo para obtener una concentración al menos 10 veces superior a la concentración más alta de antifúngico a ensayar y disolverla en agua destilada estéril.
2. Repartir en alícuotas de 1,1 ml y congelar a -70 °C hasta su utilización (máximo 6 meses), o a -40 °C (máximo 2 meses).

Un consejo...

- El tiempo de estabilidad indicado es orientativo ya que depende del tipo de antifúngico. Una vez descongelado no debe volverse a congelar. Las placas de antifúngico preparadas tendrán la misma fecha de caducidad que la de la solución madre.

Antifúngicos insolubles en agua (anfotericina B, anidulafungina, itraconazol, ketoconazol, posaconazol, ravuconazol, voriconazol)

1. Preparar una solución, pesando la cantidad suficiente de polvo para obtener una concentración de 1.600 µg/ml (100 veces superior a la concentración más alta de antifúngico a ensayar) y disolverla en dimetil sulfoxido (DMSO).
2. Repartir en alícuotas de 1,1 ml y congelar a -70 °C hasta su utilización (máximo 6 meses), o a -40 °C (máximo 2 meses).

Unos consejos...

- Es importante seguir estas recomendaciones ya que concentraciones de antifúngico más elevadas no se disuelven bien.
- Normalmente la solución madre no necesita esterilizarse pero si, para mayor seguridad, se quiere esterilizar, debe hacerse por filtración (mediante filtro de membrana o cualquier otro material que no absorba o retenga el antifúngico).

15a.2.3. Preparación de las diluciones de antifúngico

Se recomienda seguir el método de las diluciones dobles seriadas aditivas. Los pasos a seguir son diferentes según el antifúngico sea soluble o insoluble en agua.

Antifúngicos solubles en agua (fluconazol, 5-fluorocitoxina, caspofungina, micafungina)

Seguir las indicaciones de la **Tabla 15a.1** y las **Figuras 15a.1** y **15a.2**. Las concentraciones a ensayar son las comprendidas entre 64 y 0,12 µg/ml. Los volúmenes indicados son suficientes para preparar 5 placas de antifúngico.

Brevemente:

1. A partir de la solución madre se prepara la serie de diluciones a una concentración 10 veces superior a la concentración final deseada, utilizando como diluyente RPMI 1640.
2. Seguidamente se realiza una dilución 1/5 añadiendo a todos los tubos 4 ml de RPMI, con lo que la concentración del antifúngico en los tubos es 2 veces mayor que la concentración final deseada (de 128 µg/ml a 0,25 µg/ml).

Tabla 15a.1. Diluciones de los antifúngicos solubles en agua.

Tubo	Concentración	Transferir	A un tubo con	Concentración resultante	Tubo
n° 1	1280 µg/ml	1 ml	1 ml de RPMI	640 µg/ml	n° 2
n° 2	640 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de RPMI	320 µg/ml	n° 3
n° 2	640 µg/ml	0,5 ml	1,5 ml de RPMI	160 µg/ml	n° 4
n° 4	160 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de RPMI	80 µg/ml	n° 5
n° 4	160 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml de RPMI	40 µg/ml	n° 6
n° 4	160 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml de RPMI	20 µg/ml	n° 7
n° 7	20 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de RPMI	10 µg/ml	n° 8
n° 7	20 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml de RPMI	5 µg/ml	n° 9
n° 7	20 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml de RPMI	2,5 µg/ml	n° 10
n° 10	2,5 µg/ml	1 ml	1 ml de RPMI	1,25 µg/ml	n° 11

Observar que...

- Al terminar las diluciones todos los tubos contienen 1 ml, excepto el tubo n° 11 (2 ml). De este último se desechará 1 ml.
- En los tubos n° 2 al n° 11 la concentración del antifúngico es 10 veces superior a la concentración final deseada.

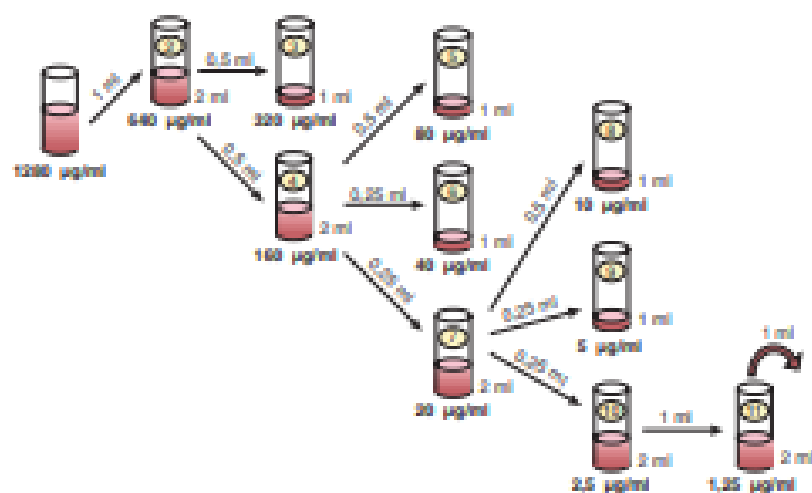


Figura 15a.1. Esquema para las diluciones de antifúngicos solubles en agua. Diluyente RPMI 1640.

Antifúngicos insolubles en agua (anfotericina B, anidulafungina, itraconazol, ketoconazol, posaconazol, ravuconazol, voriconazol)

Los pasos a seguir se detallan en la Tabla 15a.2 y en las Figuras 15a.3 y 15a.4. Las concentraciones a ensayar son las comprendidas entre 16 y 0,05 $\mu\text{g/ml}$. Los volúmenes indicados son suficientes para preparar 5 placas de antifúngico.

Brevemente:

1. A partir de la solución madre se prepara la serie de diluciones a una concentración 100 veces superior a la concentración final deseada, utilizando como diluyente DMSO.
2. Seguidamente se realiza una dilución 1/50 tomando 100 μl de cada tubo y se transfieren a otro tubo que contiene 4,9 ml de RPMI, con lo que la concentración de antifúngico es dos veces mayor que la concentración final deseada (32 $\mu\text{g/ml}$ - 0,06 $\mu\text{g/ml}$) y la de DMSO, 2% (Figura 15a.4).

Añadir a todos los tubos 4 ml de RPMI

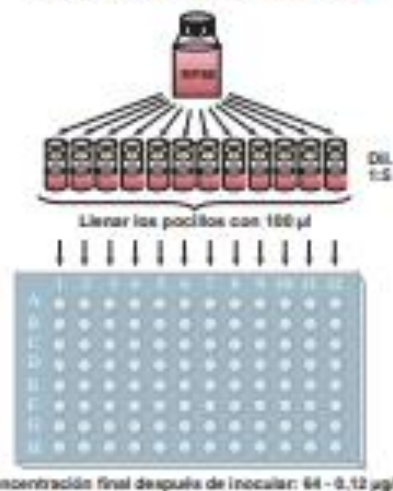


Figura 15a.2. Segundos pasos de las diluciones de antifúngicos solubles en agua (método de microtitulación).

Tabla 15a.2. Diluciones de los antifúngicos insolubles en agua.

Tubo	Concentración	Transferir	A un tubo con	Concentración resultante	Tubo
n° 2	1600 $\mu\text{g/ml}$	0,5 ml	0,5 ml de DMSO	800 $\mu\text{g/ml}$	n° 3
n° 2	1600 $\mu\text{g/ml}$	0,25 ml	0,75 ml de DMSO	400 $\mu\text{g/ml}$	n° 4
n° 2	1600 $\mu\text{g/ml}$	0,25 ml	1,75 ml de DMSO	200 $\mu\text{g/ml}$	n° 5
n° 5	200 $\mu\text{g/ml}$	0,5 ml	0,5 ml de DMSO	100 $\mu\text{g/ml}$	n° 6
n° 5	200 $\mu\text{g/ml}$	0,25 ml	0,75 ml de DMSO	50 $\mu\text{g/ml}$	n° 7
n° 5	200 $\mu\text{g/ml}$	0,25 ml	1,75 ml de DMSO	25 $\mu\text{g/ml}$	n° 8
n° 8	25 $\mu\text{g/ml}$	0,5 ml	0,5 ml de DMSO	12,5 $\mu\text{g/ml}$	n° 9
n° 8	25 $\mu\text{g/ml}$	0,25 ml	0,75 ml de DMSO	6,25 $\mu\text{g/ml}$	n° 10
n° 8	25 $\mu\text{g/ml}$	0,25 ml	1,75 ml de DMSO	3,12 $\mu\text{g/ml}$	n° 11

Observar que...

- Al terminar las diluciones, todos los tubos contienen 1 ml excepto el n° 11 que contiene 2 ml.
- En los tubos n° 2 al n° 11 la concentración del antifúngico es 100 veces superior a la concentración final deseada.
- Los tubos n° 2 al n° 11 están diluidos en DMSO.

15a.2.4. Llenado de las placas

Las placas de microtitrer se rellenan con 100 μl de solución de antifúngico siguiendo los siguientes pasos (Figuras 15a.2 y 15a.4):

- El contenido del tubo n° 2 se vierte en una cubeta o en una placa de Petri estéril y con ayuda de una pipeta multicanal (8 canales) se toman 100 μl y se llenan los pocillos de la columna n° 2 (2A - 2H).



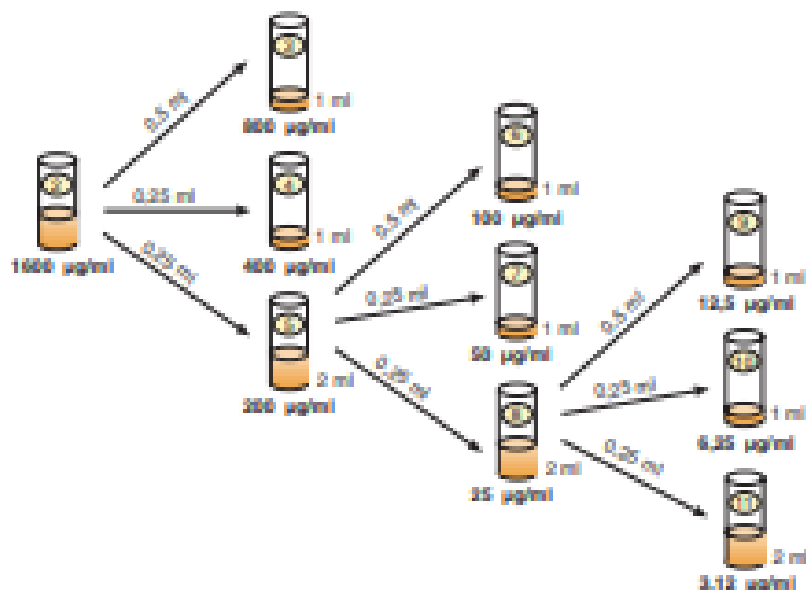
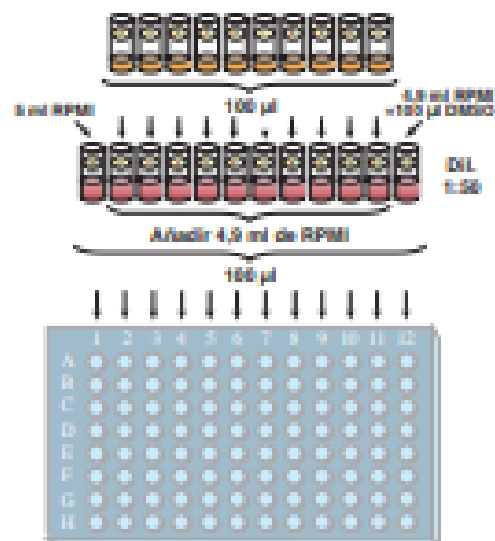


Figura 18A.3. Esquema para las diluciones de antifúngicos insolubles en agua. Disolvente directo utilizado (DMSO).

©2007 Versión del manual de Microbiología - ISBN: 97884-47118-729-8

- Con el contenido del tubo nº 3 se llenan los pocillos de la columna nº 3 (3A - 3H).
- Con el contenido del tubo nº 4 se llenan los pocillos de la columna nº 4 (4A - 4H).
- Etc... y así hasta la columna nº 11.
- Los pocillos de la columna nº 12 se llenan con 100 µl de RPMI (control de crecimiento). **ATENCIÓN:** cuando se trata de antifúngicos insolubles en agua, la columna nº 12 se rellena con 100 µl de RPMI con un 2% de DMSO, o el disolvente que se haya utilizado.
- Los pocillos de la columna nº 1 se llenan con 200 µl de RPMI (control de esterilidad).
- Una vez llenas las placas se cierran y envuelven convenientemente con una bolsa de plástico o con papel de estano, para evitar la evaporación, y se congelan a -70 °C, o bien a -40 °C.



Concentración final después de inocular: 10-0,03 µg/ml

Figura 18A.4. Segunda fase de las diluciones de antifúngicos insolubles en agua pretada de microdilución. Disolvente RPMI 1000.

¡Atención!

- La fecha de caducidad de las placas será la de la solución madre y no la del día de preparación de las placas.

15a.2.5. Preparación del inóculo

Si la levadura ha estado almacenada o congelada, antes de realizar las pruebas de sensibilidad conviene hacer por lo menos dos pasos en medio de agar glucosado de Sabouraud (SDA).

Inóculo para *Candida* spp.

Se prepara tocando con el asa de cultivo 5 colonias ≥ 1 mm y de 24 h de crecimiento en placa de SDA que se resuspenden en un tubo de solución salina (CINa 0,05%). Se agita bien y, con ayuda de un espectrofotómetro (longitud de onda: 530 nm), se ajusta a una densidad óptica 0,5 McFarland, añadiendo la cantidad necesaria de solución salina. Esta solución tiene una concentración aproximada de 1×10^8 - 5×10^8 UFC/ml. Posteriormente se realiza una dilución 1:1000 con medio RPMI (concentración de 1×10^5 - 5×10^5). Esta última dilución es la que se utiliza para inocular las placas de antifúngico. La concentración final de levaduras en las placas será de $0,5 \times 10^5$ - $2,5 \times 10^5$. En la Figura 15a.5 se representan esquemáticamente todos estos pasos.

Inóculo para *C. neoformans*

Se prepara igual que para *Candida* spp., pero partiendo, en este caso, de un cultivo de 48 h en SDA.

15a.2.8. Inoculación de las placas

El día del ensayo se sacan las placas del congelador y se dejan a temperatura ambiente hasta su completa descongelación.

Se inoculan con 100 μ l de la suspensión de levadura desde el pocillo 2 hasta el 12.

La columna n° 1 (1A - 1H) que contiene 200 μ l de RPMI, se utiliza para el control de esterilidad del medio. También sirve para leer la absorbancia del medio.

La columna n° 12 (12A - 12H) no contiene antifúngico pero debe tener la misma concentración de disolvente que los pocillos con antifúngico. Es el control de crecimiento.

Observar que...

- Al inocular las placas, las concentraciones de los pocillos se diluyen 1:2. En consecuencia, la concentración final de antifúngico en los pocillos será de 64 μ g/ml a 0,12 μ g/ml, en los solubles en agua, y de 16 μ g/ml a 0,02 μ g/ml en los insolubles.
- En una placa de antifúngico se pueden ensayar hasta 8 cepas diferentes.

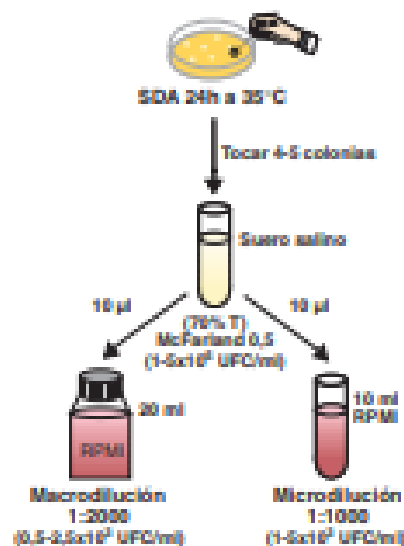


Figura 15a.5. Preparación del inóculo de levadura.

15a.2.7. Control de pureza del cultivo

Es conveniente hacer un control del inóculo utilizado; para ello se siembran 10 μ l del pocillo control (n° 12) en una placa de CHROMagar y, a las 24 h, se cuentan las UFC. De esta forma se controla la pureza y densidad del cultivo y se comprueba la identificación de la cepa.

15a.2.8. Incubación de las placas

Las placas se incuban a 35 °C. Las inoculadas con especies del género *Candida* durante 48 h y las inoculadas con *C. neoformans* durante 72 h.

15a.2.9. Lectura e interpretación de los resultados

Lectura visual

La lectura visual debe realizarse con ayuda de un espejo invertido.

Azoles y 5-fluorocitosina: la CMI es la concentración más baja de antifúngico que produce una reducción aparente del crecimiento de la levadura (>50%), comparada con el crecimiento control después de 48 h de incubación.

Equinocandinas: La CMI se lee como en los azoles pero a las 24 h de incubación.

Anfotericina B: la CMI es la concentración más baja de antifúngico que inhibe el crecimiento de la levadura, o lo que es lo mismo, que produce una reducción del 100% del crecimiento.

Unos consejos...

- En general, para los antifúngicos fungistáticos, la CMI debe ser la concentración más baja de antifúngico que produce una reducción aparente del crecimiento de la levadura (> 50%), comparada con el crecimiento control.
- **ATENCIÓN:** La CMI de las equinocandinas se lee a las 24 h de incubación.
- Para los antifúngicos fungicidas, la CMI es la concentración más baja de antifúngico que inhibe el crecimiento de la levadura, o lo que es lo mismo, que produce una reducción del 100% del crecimiento.

Lectura espectrofotométrica

Aunque no es la recomendada por el CLSI, puede hacerse una lectura espectrofotométrica a 408 nm (longitud de onda de máxima absorbancia del medio), también puede leerse a 490 y 530 nm ya que, prácticamente, la CMI no varía [5,6].

Antes de realizar la lectura espectrofotométrica es conveniente agitar las placas para obtener una suspensión homogénea y, una vez realizada, se resta a todos los pocillos la absorbancia del medio, es decir la absorbancia del pocillo de la columna nº 1.

La CMI para los azoles, 5-fluorocitosina, equinocandinas y, en general, los antifúngicos fungistáticos, es la concentración más baja de antifúngico cuya densidad óptica es $\leq 50\%$ del pocillo control de crecimiento (pocillo de la columna nº 12). La CMI para la anfotericina B y, en general, otros antifúngicos fungicidas, es la concentración más baja cuya densidad óptica es $\leq 5\%$ del control.

Observaciones...

- La lectura de las CMI en los azoles suele ser una de las fuentes de variabilidad tanto intra como interlaboratorio. Es un poco complicada para los no entrenados ya que se mantiene un cierto crecimiento en las concentraciones superiores a la CMI. A este crecimiento se le llama 'cola de crecimiento' (trailing growth) y se presenta sobre todo en las cepas de *C. albicans* y *C. tropicalis*.
- Algunas veces, cuando se realiza la lectura visual, es conveniente agitar los pocillos con un bastoncillo de madera estéril, para poder comparar la turbidez con la del pocillo control.

15a.2.10. Cepas control de calidad

En cada ensayo debe incluirse una cepa control para poder detectar cualquier anomalía o desactivación del antifúngico. El CLSI aconseja utilizar las siguientes cepas:

- C. parapsilosis* ATCC 22019
- C. krusei* ATCC 6258

Son cepas que han mostrado tener estabilidad genética y para las que la CMI se ha determinado repetidamente. En la Tabla 15a.3 se especifica las CMI de los antifúngicos para estas cepas [2,7-9].

15a.2.11. Puntos de corte para *Candida* spp.

Por el momento, sólo se dispone de los puntos de corte para fluconazol, itraconazol, voriconazol, equinocandinas y 5-fluorocitosina. Para establecer los puntos de corte para fluconazol, el CLSI se ha basado en estudios de correlación *in vitro-in vivo* de micosis orofaríngeas en pacientes con sida y, en menor cantidad, en candidemias producidas por *Candida* en enfermos no neutropénicos. Recientemente estos puntos de corte se han confirmado incluyendo más casos tanto de candidiasis invasoras como orofaríngeas [1,10]. Por tanto, sólo son aplicables a las micosis orofaríngeas y candidemias de especies del género *Candida*, excepto *C. krusei*, que es intrínsecamente resistente a fluconazol. Para itraconazol, los datos se basan en estudios de correlación *in vitro-in vivo* de micosis orofaríngeas y no se dispone hasta la fecha de datos en micosis invasoras. Los puntos de corte de 5-fluorocitosina están basados en antiguos datos farmacocinéticos *in vivo* para *Candida*. Los puntos de corte de voriconazol están basados en el análisis de los datos obtenidos de 249 pacientes de seis estudios clínicos en fase III de voriconazol [11].

Tabla 15a.3. Intervalo de la CIM de los antifúngicos para las cepas control de calidad, obtenidas por el método de microdilución M27-A3 (2,7-8).

Antifúngico	Intervalo de las CIM ($\mu\text{g/ml}$)			
	C. parapsilosis ATCC 32019		C. lusitana ATCC 6258	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Amfotericina B	0,25 - 2	0,5 - 4	0,5 - 2	1 - 4
Anidulafungina	0,25 - 3	0,5 - 2	0,05 - 0,12	0,03 - 0,12
Caspofungina	0,25 - 1	0,5 - 4	0,12 - 1	0,25 - 1
Micalofungina	0,25 - 2	0,5 - 4	0,12 - 0,5	0,12 - 0,5
Fluconazol	0,5 - 4	1 - 4	8 - 64	16 - 128
Itraconazol	0,12 - 0,5	0,12 - 0,5	0,12 - 1	0,25 - 1
Isavuconazol	0,03 - 0,25	0,06 - 0,5	0,12 - 1	0,25 - 1
Posaconazol	0,06 - 0,25	0,06 - 0,25	0,06 - 0,5	0,12 - 1
Posaconazol	0,016 - 0,12	0,03 - 0,25	0,06 - 0,5	0,25 - 1
Voriconazol	0,016 - 0,12	0,03 - 0,25	0,06 - 0,5	0,12 - 1
5-fluorocitosina	0,06 - 0,25	0,12 - 0,5	4 - 16	8,0 - 32

Aplicando estos criterios, el CLSI ha establecido diferentes categorías de sensibilidad: sensible, intermedia, resistente y una nueva categoría aplicable a los azoles: sensible dependiendo de la dosis administrada (S-DD) (2,9-11).

- La categoría de **sensible** no lleva implícito el éxito terapéutico.
- La categoría de **resistente** se correlaciona con un ~60% de fracaso terapéutico.
- La categoría **S-DD** para el fluconazol se basa en los niveles de antifúngico que se alcanzan con dosis ≥ 400 mg/día en pacientes con buen funcionamiento renal. Para el itraconazol se basan en una buena absorción del fármaco y que se alcancen niveles en sangre $\geq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$.

En la categoría de intermedia, sólo aplicable a 5-fluorocitosina, no se sabe con certeza si la cepa es sensible, ya que los datos que se tienen no permiten categorizarla como sensible o resistente.

En la Tabla 15a.4 se indican los puntos de corte de los antifúngicos.

Tabla 15a.4. Puntos de corte según el CLSI (2,9-11).

Antifúngico	Intervalos de las CIM ($\mu\text{g/ml}$)			
	Sensible	S-DD	Intermedia	Resistente
Fluconazol	< 8	16 - 32	-	> 64
Itraconazol	$< 0,12$	0,25 - 0,5	-	> 1
Voriconazol	< 1	2	-	> 4
5-fluorocitosina	< 4	-	8 - 16	32
Caspofungina*	< 2	-	-	> 2
Micalofungina*	< 2	-	-	> 2
Anidulafungina*	< 2	-	-	> 2

*No sensible

15a.3. Método de macrodilución para levaduras (M27-A3)

En este método se utilizan tubos estériles de 11x70 mm y el volumen final en cada tubo es de 1 ml. El medio de cultivo, la preparación del inóculo y de la solución madre de antifúngico es igual al método de microdilución.

15a.3.1. Preparación de las diluciones de antifúngico

Antifúngicos solubles en agua

1. Preparar las diluciones del antifúngico siguiendo los pasos de la Figura 15a.1.
2. Las diluciones se reparten en alícuotas de 0,1 ml, en tubos de 11x70 y se congelan a -70 °C hasta su utilización completamente curados.
3. El día del ensayo se descongelan los tubos y se diluyen 1/10 añadiendo a cada tubo 0,9 ml de RPMI inoculado (Figura 15a.4).
