



**Universidad
de Valparaíso
CHILE**

**EFICACIA DE UN DESINFECTANTE A BASE DE COBRE Y SU COMPARACIÓN
CON NISTATINA, HIPOCLORITO DE SODIO Y CLORHEXIDINA EN LA
REDUCCIÓN DE COLONIAS DE *CANDIDA ALBICANS* EN RESINAS
ACRÍLICAS DE TERMOCURADO. ESTUDIO *IN VITRO*.**

Alumnos:

Daisy Gorup Valenzuela
Elisa Huerta Garcia
Manuel Manríquez Núñez

Docente guía:

Dr. Wilfredo González Arriagada
Catedra de Patología Oral

Trabajo de investigación
requisito para optar al
Título de Cirujano Dentista

Valparaíso- Chile
2018

DEDICATORIA

A todos aquellos que me apoyaron en esta etapa tan importante de mi vida, muchas gracias a quienes estuvieron siempre presentes y aportaron con positivismo durante este camino. Especialmente a mi familia que con su amor incondicional siempre me apoyó y creyó en mí en los momentos más difíciles, que sin ellos esto no habría sido posible, los quiero mucho. A la Cucha quién me acompañó durante muchas noches de estudio y que con su cariño fue un pilar fundamental durante los periodos de estrés.

A mis amigos, compañeros y personas cercanas que fueron un gran apoyo emocional y que me otorgaron gran felicidad durante todos estos años y sacaron lo mejor de mí, los recordaré con un gran cariño.

A mis amigos y compañeros de tesis quienes fueron una parte fundamental al final de este recorrido con quien compartí muchos momentos de frustración y alegría, les deseo lo mejor.

Daisy Gorup V.

Debo agradecer a todas las personas que me acompañaron en este largo camino, principalmente a mis padres Luis y Carmen, por ser únicos, incondicionales, enseñarme a luchar con todas las fuerzas por mis objetivos y demostrarme que nada es imposible. Gracias por estar siempre presentes, por sus palabras de aliento y por darlo todo por mí.

A mis amigos, compañeros, profesores y a todas aquellas personas que conocí durante mi periodo universitario, que dejaron huellas y lindos recuerdos, gracias por los gratos momentos, por sus palabras de aliento, por las risas y por escuchar en los momentos oscuros, se les quiere y los tendré siempre presente.

A mis amigas y tesisistas, el trío estrella, hicimos un gran equipo, lleno de momentos de estrés, de éxito y alegrías, lo logramos terminamos la temida tesis, les deseo lo mejor para el futuro.

Manuel Manríquez Núñez

Dedicado a mis padres, por su fuerza, sacrificio, palabras de aliento y apoyo constantes. Infinitas gracias por el amor incondicional, sabiduría y por sobre todo paciencia. Gracias a ustedes finalmente puedo cerrar el ciclo.

Muchas gracias a mis hermanos por ser fuentes inagotables de recargo energético. A los amigos, que fueron una luz en los momentos oscuros. A aquellos compañeros y profesores que además de estar presentes, dejaron enseñanzas de vida inolvidables. Y a mis compañeros de tesis, que el futuro les depare mucha alegría, sabiduría y éxito. ¡Lo logramos!

Elisa Huerta García

AGRADECIMIENTOS

Debido a su preocupación, dedicación y gran colaboración para la realización de esta tesis, se les recordará siempre con gran afecto. Muchas Gracias,

Dr. Wilfredo González.

Dr. Rodrigo Cruz

Peggy Vieille

Andrés Vivanco

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO.....	2
1.- Aspectos demográficos.....	2
I. Situación del adulto mayor en Chile.....	2
II. Patologías más prevalentes, lesiones paraprotéticas	2
2.- Consideraciones básicas de la prótesis removible.	3
I. Aspectos generales.....	3
II. Clasificación de prótesis removible	3
III. Resina acrílica	3
3.- Estomatitis subprotésica (ESP).....	4
I. Clasificación.....	4
II. Etiología y factores de riesgo.....	5
III. Diagnóstico	7
IV. Tratamiento.....	7
4.- Agentes desinfectantes de prótesis removible.....	8
I. Método de higiene de prótesis removible.....	8
II. Desinfectantes antimicóticos.....	9
5.- Pruebas de sensibilidad.	12
I. Test de sensibilidad para determinación de concentración mínima inhibitoria en organismos fúngicos (CMI):	12
II. Tipos de métodos de susceptibilidad:	13
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:	13
OBJETIVO GENERAL.....	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
1. Variables.....	14
2. Definiciones:.....	14
3. Fase preexperimental	15
I. Prueba de inoculación.....	15
II. Estudio piloto.	16

III. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del sulfato de cobre.....	21
4. Fase experimental	25
I. Procedimiento	25
II. Análisis estadístico	29
RESULTADOS	29
1. Fase Preexperimental	29
I. Prueba de inoculación.....	29
II. Estudio piloto	30
III. Determinación concentración mínima inhibitoria (CMI) para desinfectante en base de dilución de sulfato de cobre.....	30
IV. Medición de pH	30
2. Fase experimental	30
3. Análisis estadístico	31
DISCUSIÓN	34
CONCLUSION	36
SUGERENCIAS Y LIMITACIONES.....	36
BIBLIOGRAFÍA	39
ANEXOS	45

INTRODUCCIÓN

En Chile se estima que la población mayor de 60 años corresponde al 17% de la población nacional y se espera que para el año 2020 aumente aproximadamente al 21%¹. Del total de la población mayor de 65 años, alrededor del 63.2% es portador de prótesis removible¹. Estudios mencionan que dos tercios de los individuos que portan prótesis removibles pueden sufrir estomatitis subprotésica² la cual es una enfermedad de etiología multifactorial³ y se describe como una proliferación fibroepitelial de la mucosa de paladar duro en contacto con prótesis dentales mucosoportadas, asociada al desajuste de la base acrílica o metálica, edad avanzada del usuario, prótesis de larga data, higiene oral deficiente y hábitos de uso de las prótesis⁴, así como también se relaciona con infección bacteriana y fúngica², siendo mayoritaria la presencia de *Candida*, con mayor prevalencia la especie *Candida albicans*². Además en las últimas décadas, Chile se ha consolidado como el mayor productor de cobre a nivel mundial⁵, produciendo gran interés en su uso como material de auto desinfección en el área médica, ya que múltiples estudios han demostrado efectividad del cobre contra una serie de bacterias y hongos, entre ellas *Candida albicans*^{5,6,7,8,9,10,11,12,13,14}. Por lo anterior, se ha convertido en un foco de atención para estudios recientes en el área de odontología sobre su posible uso como tratamiento en casos de estomatitis subprotésica a través de la desinfección de prótesis removible acrílica¹⁵.

Si bien existen una gran cantidad de estudios que explican el mecanismo de acción y efectividad del cobre contra *Candida albicans*^{6,17,18} o la efectividad del mismo en conjunto con otros complejos^{7,8,10,11,12,13,14}, hay pocos estudios respecto a su empleo en la práctica odontológica. En el área de prótesis removible podemos encontrar estudios recientes donde se comparan diferentes desinfectantes versus el uso de partículas de cobre inmersos al interior de la estructura acrílica¹⁵, pero existe poca evidencia del efecto del cobre como desinfectante en solución. Es por este motivo, que este estudio propone comparar un agente desinfectante en base a cobre en solución con similares características respecto a su presentación versus desinfectantes recomendados por el MINSAL^{1,19}.

Dentro de la revisión de la literatura, la mayor parte de los estudios encontrados analiza el efecto antifúngico del cobre sobre la *Candida albicans*. En éstos, el método más utilizado para medir la sensibilidad antimicrobiana se basa en el método de difusión por discos, en el que se mide la aparición del halo de inhibición, midiendo de esta forma la acción directa del cobre como antifúngico sobre *Candida albicans*^{6,7,10}, pero no se considera el medio en el que se encontraría, lo que es trascendental en la práctica clínica odontológica. Es por esto, que además de cambiar la presentación del desinfectante en base a sulfato de cobre, se plantea una modificación para el estudio de sensibilidad, ya que se busca determinar la eficacia del efecto del desinfectante en el uso de prótesis removible, midiéndose sobre acrílico de termocurado inoculado con *Candida albicans*, lo que sería un acercamiento más próximo a la realidad clínica actual.

Finalmente, el objetivo de este estudio es evaluar la efectividad antimicótica *in vitro* de un desinfectante a base de sulfato cobre en placas de resinas acrílica de termocurado en cultivos de *Candida albicans*.

MARCO TEÓRICO

1.- Aspectos demográficos.

I. Situación del adulto mayor en Chile.

En los últimos años, se ha producido un envejecimiento de la población en Chile, estimándose que la cantidad de adultos mayores de 60 años corresponde a 2.679.910 personas, correspondiendo al 17% de la población nacional, y para el año 2020 aumentará a un 21% llegando a 3.271.990 personas^{1,20}. Del punto de vista de la odontología, según datos del MINSAL, los adultos mayores de la Región Metropolitana muestran un aumento en la mantención de sus dientes, siendo que, en 2008, el 80% de adultos de 65-74 años mantenía algunos de sus dientes, con un promedio de 12 dientes presentes¹. La última Encuesta Nacional de Salud revela que un 27,8% de la población chilena presenta dentadura completa y que los desdentados totales alcanzan un 33,4% si se consideran ambos maxilares^{21,22}.

Debido al aumento del edentulismo, se observa un incremento del uso de prótesis removibles ya sean totales o parciales. Del total de la población mayor de 65 años, un 37,1% es portador de prótesis removible maxilar (25,3%) o mandibular (0,8%)²⁰, siendo que, sólo durante el año 2002, se realizaron 18.245 prótesis removibles en los servicios públicos del país²¹.

II. Patologías más prevalentes, lesiones paraprotéticas

Las lesiones orales en pacientes portadores de prótesis removibles en Chile han sido poco estudiadas²³, en consecuencia, son escasos los estudios que permitan conocer la prevalencia de estas patologías, incluyendo la estomatitis subprotésica, que es una de las lesiones más frecuentes en pacientes portadores de prótesis removibles²⁴.

En 2003 Espinoza et al. reportaron que en Santiago de Chile un 53% de los adultos mayores presentan una o más lesiones de la mucosa oral, siendo la más frecuente la estomatitis subprotésica con una prevalencia del 22,3%²⁵. Dos tercios de los individuos que portan prótesis removibles pueden sufrir de estomatitis subprotésica², la cual está asociada al uso de prótesis removible, ya sea total o parcial, y que corresponde a lesiones erosivo-ulcerosas de alta prevalencia, entre 22,3 - 29,6%^{25,26,27}.

Respecto a su etiología, la mayoría de los estudios reportan que es multifactorial^{24,28}, sin embargo, se puede asociar a las siguientes causas: trauma de la mucosa generado por la prótesis removible, higiene deficiente y acumulación de biofilm, reacción de hipersensibilidad a los materiales de la prótesis, factores dietéticos

(incluyendo los que causan deficiencias hematológicas), infección micótica y factores sistémicos²⁸.

2.- Consideraciones básicas de la prótesis removible.

I. Aspectos generales

En odontología, el término prostodoncia o rehabilitación oral se aplica tanto a la especialidad que se encarga de las prótesis dentales, como a las herramientas que se utilizan para el reemplazo de las piezas perdidas, restituyendo en la cavidad oral los dientes perdidos mediante dientes artificiales, con el fin de restaurar y mantener las funciones del sistema estomatognático, y el bienestar del paciente, aumentando la capacidad masticatoria, mejorando la estética y la función fonética^{29,30,31}.

II. Clasificación de prótesis removible

- a. **Prótesis removible total:** Son aquellos aparatos protéticos elaborados para pacientes totalmente desdentados. Tienen como componentes piezas dentales artificiales que se encuentran fijas a una base acrílica mucosoportada, presentando una superficie interna, la cual está en contacto con la mucosa de la cavidad oral^{29,32}.
- b. **Prótesis removible parcial:** Son aquellos aparatos protéticos elaborados para pacientes desdentados parciales. Tienen como componentes una base metálica o acrílica y elementos de anclaje, pueden ser mucosoportadas o dentomucosoportadas^{29,32}.
- c. **Prótesis implantosoportada y retenida:** Aparatología protésica que puede ser soportada y retenida de forma parcial o total por implantes, pueden ser fijas o removibles. Consta de una estructura protésica anclada a implantes colocados previamente dentro de los huesos maxilares, mediante cemento, tornillos o aditamentos con el objetivo de recuperar su función y estética³³.

III. Resina acrílica

Las resinas acrílicas para prótesis removibles 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 prótesis²⁹. La polimerización del acrílico se puede efectuar a través de dos medios: físicos (con radiación o calor) y químicos.

a. Acrílico de autocurado

Son denominados productos de autocurado o de curado en frío, las resinas acrílicas que presentan un iniciador, el peróxido de benzoilo, cuya función es reaccionar con el polvo para producir radicales libres que inician la polimerización del material acrílico a temperatura ambiente, al cual se añade también activadores químicos que son las aminas terciarias^{34,35,36}.

b. Acrílico de termocurado:

Consisten en la unión de un monómero (líquido) y un polímero (polvo) los cuales deben mezclarse al igual que las resinas acrílicas de autocurado, pero para completar el proceso de su polimerización requieren de una fuente de calor externa, siendo utilizado generalmente el calor húmedo o baño de agua, en el cual es necesario dejar hervir una mufla con el aparato protésico a una temperatura de 65°C por un lapso de 1-2 horas. Este método de polimerización es uno de los más usados actualmente, debido a que contiene menos monómero de metilmetacrilato sin reaccionar, lo que reduce la irritación tisular tras la colocación inicial de la prótesis en cavidad oral, además de ser uno de los métodos de polimerización más exactos y presentar una resistencia relativamente elevada a la fractura por fatiga^{35,36}.

3.- Estomatitis subprotésica (ESP).

Corresponde a un proceso inflamatorio que afecta la mucosa bucal subyacente a una prótesis removible parcial o total y restringido al área que cubre²⁸. Se caracteriza por un área eritematosa, área ulcerada o proliferación fibroepitelial provocada por la base protésica. De etiología multifactorial y asociada principalmente a procesos infecciosos como candidiasis^{37,38,39,40}.

Se produce mayoritariamente en pacientes de edad avanzada, siendo la lesión de mucosa oral más frecuente en las personas mayores de edad²⁵. No presenta sintomatología asociada, pero en algunos casos está acompañada de ardor y prurito^{37,38,40}, afectando con mayor frecuencia la mucosa palatina².

I. Clasificación

a. Newton 1962⁴¹

- Tipo I: Estomatitis protésica localizada simple. El uso de prótesis mal ajustadas produce obstrucción de los ductos salivales. Es una inflamación localizada y mínima, con presencia de petequias. Se relaciona al trauma producido por la prótesis.
- Tipo II: Inflamación simple generalizada. Inflamación difusa que aparece en la superficie de soporte de la prótesis. Aparece con eritema, edema y puede presentar sangramiento. La mucosa se encuentra hiperémica, lisa y atrófica. Corresponde al tipo más común de ESP. Se encuentra demarcada por los bordes protésicos.

- Tipo III: Estomatitis protética granular o papilar hiperplásica. La mucosa tiene aspecto granular irregular o nodular. Se ve engrosada, pudiendo dar aspecto aterciopelado o papilar. Hay inflamación intensa e hiperemia. Puede aparecer en todo el paladar o solo en el centro.

Los tipos II y III tienen relación a procesos infecciosos, a diferencia del tipo I que se relaciona a trastornos traumáticos.

b. Moreira et al. 1989⁴²

- Grado I: Lesiones clínicas caracterizadas por signos inflamatorios mínimos, generalmente asintomáticos. Pueden aparecer áreas hiperémicas localizadas o en forma de pequeños puntos eritematosos.
- Grado II: Lesiones francamente inflamatorias, pueden llegar a observarse los contornos de la prótesis. La superficie mucosa es roja brillante, aparecen áreas eritematosas difusas.
- Grado III: Lesiones constituidas por una mucosa gruesa de gránulos irregulares, que pueden tener aspecto aterciopelado o papilar.

II. Etiología y factores de riesgo

No existe evidencia concluyente de la etiología de ESP, pero se sabe que es multifactorial, principalmente asociada a levaduras del género *Candida*, en especial *Candida albicans*^{37,43,44}.

a. *Candida albicans*

Las levaduras del género *Candida* corresponden a más de 350 especies, pero solo algunas de ellas están implicadas en infecciones humanas⁴⁵, se encuentran presentes en la flora normal de piel, mucosas y aparato gastrointestinal².

Se ha descubierto que *Candida albicans*, es capaz de crecer en rangos de pH 2 a 10⁴⁶, *Candida albicans* ha sido aislada en distintos sitios anatómicos que varían en pH incluyendo estómago (pH 2)⁴⁷, vagina (pH 4-5)⁴⁸ y mucosa oral⁴⁹, sugiriendo la adaptación al pH ambiental siendo fundamental en la patogenicidad de *Candida albicans*. Esto puede explicarse por una adaptación por parte de la pared celular de acuerdo al pH en el que se encuentra. En condiciones ácidas se demostró una pérdida de la estructura organizacional de la pared celular más externa, teniendo una apariencia menos fibrilar⁴⁶, por otro lado, a pH alcalino se promueve el crecimiento de hifas en *Candida albicans*⁵⁰.

La levadura *Candida* es la causa más común de infecciones por hongos, siendo *Candida albicans* la cuarta causa de infecciones micóticas crónicas en la mucosa^{8,43} y es señalada generalmente como agente causal de ESP, pudiendo existir otras especies microbianas involucradas²⁸. 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 clínicas⁵¹.

b. Otros factores de riesgo

Además de la presencia de *Candida albicans*, existen diversos factores que pueden afectar el desarrollo de ESP, los que pueden ser clasificados como:

- Factores sistémicos:
 - Disminución en el flujo salival y variación de pH⁵².
 - Enfermedades crónicas^{53,54}.
 - Dieta escasa en nutrientes o alta en carbohidratos⁵².
 - Enfermedades degenerativas⁵².
 - Pacientes inmunosuprimidos⁵².

- Factores locales:
 - Mecánico. Debido a trauma protésico^{53,55,56,57}.
 - Método de higiene. Una mala higiene favorece la acumulación de placa bacteriana potenciado el desarrollo de organismos oportunistas^{43, 58}, además el ambiente ácido producido por éstos microorganismos contribuye a la aparición de ESP²⁵.
 - Tiempo de uso. Uso continuado de la prótesis y en especial nocturno²³.
 - Prótesis antiguas. El deterioro de las prótesis aumenta las probabilidades de ESP^{23,44}.
 - Alergia al material de la base protésica. Sensibilidad a los materiales de confección de la base protésica que producen irritación de la mucosa en contacto con la prótesis⁵⁷.
 - Reacción irritante. Productos para higienizar la prótesis pueden producir una reacción irritativa si no son bien enjuagados^{55,57,58,59}.
 - Microbiano. Producto de toxinas generadas por el biofilm o por infección micótica, en especial por presencia de *Candida albicans*⁵⁷.

- Otros factores
 - Combinaciones de factores previos⁵⁷.
 - Cigarrillo^{43,56,59}.
 - Edad^{25,60}.
 - Consumos de alimentos calientes con la prótesis puesta⁶⁰.
 - Aspectos propios de la prótesis⁵². El acrílico debido a su porosidad funciona como un reservorio de diversos microorganismos⁶¹.
 - Origen desconocido⁵⁷.

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 salen al raspado. El diagnóstico considera las características propias de cada paciente⁶².

ESP es considerada una lesión oral asociada a candidiasis oral, en especial a *Candida albicans*. Su presencia puede ser confirmada por observación directa al microscopio y/o mediante su aislamiento en cultivo⁶². La resolución de la lesión, luego de la instauración del tratamiento en un periodo de 1 a 2 semanas, confirma el diagnóstico⁶³.

IV. Tratamiento

Debido su etiología multifactorial, es preciso identificar y corregir los factores predisponentes y tratar la infección²⁶. Generalmente se realiza mediante el control de placa, eliminación del uso nocturno y terapia antifúngica^{62,64}. Es por este motivo que se han planteado diversas opciones de tratamiento:

- a. Control de placa: Mejorando la higiene bucal, la limpieza de la prótesis y desalentando a los pacientes a usar sus prótesis en la noche. Se recomienda sumergir el aparato protésico durante la noche en una solución antiséptica⁶⁵.
- b. Eliminación de factor traumático: Mediante el reemplazo de prótesis antiguas, la eliminación de irregularidades anatómicas y/o restableciendo una oclusión atraumática³⁷.
- c. Siliconas o acondicionadores de tejidos combinados con agentes antifúngicos^{37,66,67}.
- d. Terapia farmacológica antifúngica:
 - Tópica: Se utiliza en fases iniciales³⁸.
 - Sistémica: Se sugiere para pacientes inmunosuprimidos. También se utilizan en casos con mayor complejidad, que no responden al tratamiento tópico³⁸.

La terapia farmacológica tiene una amplia variedad de opciones, entre los que se encuentran:

- Anfotericina B³⁸. Presentación en tabletas, cremas o enjuagues. Se une a la membrana de *Candida* desencadenando muerte celular⁶⁸. Tiene sabor desagradable que afecta el cumplimiento del tratamiento por parte del paciente^{62,68}.

- Nistatina^{38,68}. Presentación en suspensión oral o enjuagues y comprimidos²⁵. Tiene poca absorción al ser ingerida y un sabor desagradable que afecta el cumplimiento del tratamiento del paciente⁶⁸.
- Clorhexidina: Efectiva en la reducción de la formación y crecimiento de biopelículas por *Candida*^{69,70}.
- Fluconazol: De uso sistémico, se utiliza cuando la estomatitis no responde al tratamiento tópico o en pacientes inmunosuprimidos⁷¹.

Tratamiento recomendado por Ministerio de Salud

El tratamiento recomendado por el MINSAL para ESP sugiere controlar factores irritativos⁶⁵, reforzar medidas de higiene oral y protésica⁷², indicar antimicóticos tópicos y sistémicos frente a sospecha de infección fúngica⁷².

Dentro de las medidas de higiene oral y limpieza del aparato protésico, indica que las prótesis deben mantenerse limpias, mediante la combinación de métodos mecánicos (cepillado con agua, jabón, dentífricos o abrasivos y tratamiento de ultrasonido) y de métodos químicos (uso de hipocloritos, peróxidos, enzimas, ácidos y enjuagues para prótesis)¹.

Para la limpieza diaria recomienda remover y limpiar las prótesis con un cepillo suave, pasta dental y depositarlas en un recipiente con agua pura, enjuagándose la boca después de su uso. También enjuagatorios de clorhexidina al 0.12%, limpieza de la mucosa bucal con un cepillo suave embebido en clorhexidina o enjuagatorios con agua y sal al 0.9% (agregando media cucharadita de sal en 250 ml de agua fresca). La desinfección en casa debe ser realizada 1 vez por semana con 10 gotas de cloro en un vaso con agua. En el caso de prótesis metálicas deben dejarse remojar en la noche en una solución de clorhexidina, ya que el hipoclorito de sodio causa decoloración del metal¹.

4.- Agentes desinfectantes de prótesis removible

I. Método de higiene de prótesis removible.

Las prótesis removibles tradicionales de acrílico de termocurado, constituyen un medio favorable para la colonización y proliferación de los microorganismos debido a la capacidad de adhesión al polimetilmetacrilato por parte de éstos^{6,61}, razón por la cual las prótesis deben mantenerse limpias y libres de residuos alimenticios para evitar su colonización, tinciones, mal olor o inflamación de la mucosa de soporte^{6,73}.

Algunos autores han observado que la higiene de los pacientes no siempre es la más adecuada, esto se debe a la falta de orientación por parte del tratante, negligencia del paciente o una capacidad motriz disminuída^{6,74}. Además, las

características, tipo y calidad del acrílico de las prótesis, defectos en su confección o la ineficiente capacidad de limpieza de productos comerciales, pueden favorecer la formación del biofilm y evitar su correcta remoción^{6,74}.

De acuerdo a la literatura, los métodos más comunes para la limpieza de las prótesis removibles se pueden dividir en dos grupos: mecánicos y químicos^{75,76}.

- a. Método mecánico: Si bien este método es sencillo y económico, no es suficiente en la remoción de biofilm y es necesario combinarlo con el uso de desinfectantes químicos⁷⁷.
- b. Método químico: Es el más popular y eficaz para la limpieza de prótesis, respecto al control y prevención de estomatitis subprótesis asociada a *Candida albicans*, en relación al método mecánico⁷⁷. Los desinfectantes se clasifican como peróxidos alcalinos, hipocloritos alcalinos, ácidos, desinfectantes y enzimas²⁷. La efectividad depende de la concentración, tiempo de exposición y pH. Por otra parte, la concentración bacteriana, concentración del desinfectante y tipo de material expuesto al desinfectante son factores que afectan el tiempo de desinfección protésica⁷³.

Se ha reportado que sumergir las prótesis por unos minutos diariamente en clorhexidina, produce una reducción del ardor de la mucosa en pacientes con estomatitis subprótesis, sin embargo, puede haber recurrencia si es suspendido el tratamiento²⁷.

II. Desinfectantes antimicóticos

a. Clorhexidina:

Antiséptico de acción rápida y de amplio espectro, de pH 5.5 a 7, no irritante, de baja absorción en piel y mucosas y baja toxicidad sistémica⁷⁸. Indicado para las afecciones 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 úlceras⁷⁹.

Debido a sus propiedades catiónicas se une a la hidroxiapatita del esmalte, a la película adquirida y a las proteínas salivales lo que le otorga la propiedad de sustentabilidad y liberación gradual durante 8 a 12 horas^{68,73}.

Se disocia a un pH fisiológico, formando una molécula cargada positivamente, capaz de unirse a la pared bacteriana y otra molécula cargada negativamente, alterando su equilibrio osmótico. Dependiendo de su concentración será el efecto que producirá en la célula, a bajas concentraciones produce un aumento de la permeabilidad y filtración de los componentes intracelulares y sustancias de bajo peso molecular como fósforo y potasio, lo que genera un efecto bacteriostático. En concentraciones más altas, produce la precipitación del citoplasma bacteriano y muerte celular generando un efecto bactericida^{73,78}.

b. Hipoclorito de sodio

Compuesto halogenado, altamente alcalino (base fuerte de pH 11 a 11.5), utilizado como agente desinfectante e irrigante⁸⁰. Líquido claro, pálido, verde-amarillento y con fuerte olor a clorito e irritante de piel y mucosas^{73,78}. Fuerte saponificador y solvente sobre el tejido necrótico, componentes salivales^{73,81} y restos orgánicos, además de ser un potente antimicrobiano de amplio espectro contra bacterias grampositivas y gramnegativas, esporas, virus lipófilos e hidrófilos y hongos^{78,81}. Presenta un efecto de acción rápida pero no prolongada⁷³.

Su forma activa es el ácido hipocloroso no disociado (HOCl)⁸², presenta capacidad oxidativa sobre grupos sulfhidrilo (-SH) de aminoácidos y proteínas^{73,83,84}, produciendo la inhibición de sistemas enzimáticos bacterianos. Además, contribuye con la inactivación de componentes de la pared bacteriana, deshidrata y solubiliza las proteínas.

c. Nistatina

Agente antimicótico producido por cultivos de *Streptomyces noursei*^{81,85}, relativamente tóxico, presenta un pH 6.5 a 8. Puede inducir náuseas, vómitos^{78, 85, 81} e irritaciones en la piel⁷⁹, por lo tanto, se indica para el tratamiento de infecciones mucocutáneas producidas por las distintas especies de *Candida* en boca, esófago y vagina^{79,81} como profilaxis de candidiasis en pacientes inmunodeprimidos⁷⁹ y en la prevención del desarrollo de sobreinfecciones como consecuencia del tratamiento con antibióticos de amplio espectro.

Es un polvo higroscópico amarillo que se ve alterado por la exposición prolongada a la luz, calor o aire y se descompone de manera gradual por arriba de los 160°C⁷⁸. Posee una función fungistática o fungicida según su concentración⁸¹.

En el caso de estomatitis se usa vía oral, ya en sea en suspensión o tabletas y su aplicación es de 2 a 3 veces al día en adultos⁷⁹, el tratamiento se prolonga hasta 48 horas después de desaparecidos los síntomas. En estomatitis se recomienda mantener en la cavidad oral el mayor tiempo posible⁸¹.

d. Cobre

- Aspectos generales

Actualmente, las características del cobre son conocidas y valoradas por facilitar el funcionamiento de la sociedad moderna; por consiguiente, tiene un amplio uso en áreas industriales, informáticas, telecomunicaciones, entre otras. Es por esto que la presencia del cobre en la actividad humana y su consumo a nivel mundial es del orden de los 18 millones de toneladas anuales⁸⁶.

El cobre es un micronutriente para organismos aerobios, tanto procariontas como eucariotas⁸⁷. Al actuar como enzima cofactor esencial, impulsa procesos y estudios

bioquímicos significativos que han determinado sus propiedades biocidas en la prevención y el control del crecimiento de una amplia variedad de microorganismos^{12,88,89}. Dentro del área médica ha cobrado importancia como antimicrobiano, mediante su incorporación a la infraestructura hospitalaria como elemento de ayuda contra las infecciones. Para Chile, principal productor de cobre en el mundo, es un tema de alto interés⁹⁰.

- Mecanismo de acción como antifúngico

El efecto que produce el cobre en contacto con diferentes especies de hongos, entre ellas *Candida albicans*, es mediante un proceso denominado “muerte por contacto” el que genera un daño a la membrana citoplasmática, produciendo su despolarización y facilitando la entrada de iones de cobre a la célula, lo que amplifica su daño^{11,18,91}. Este ingreso de iones de cobre al interior de la célula, puede inducir reacciones de radicales libres⁸⁷ y secundariamente producir un aumento en el estrés oxidativo⁹².

e. Sulfato de cobre

Compuesto químico de fórmula CuSO_4 ⁹³ que se presenta en 2 formas principalmente: sulfato de cobre (I) (sulfato cuproso) y como sulfato de cobre (II) (pentahidratado), se encuentra en el comercio como prismas irregulares de color azul transparente^{93,94,95,96} y que en contacto con el aire produce una ligera eflorescencia blanca, experimentando la fusión acuosa a un calor suave, más soluble en agua caliente que en fría. Su sabor es acre, metálico y nauseoso⁹⁵.

- Sulfato de cobre (I) o sulfato cuproso (Cu_2SO_4):

Sal anhidra insoluble de color blanco, en donde el ion cobre se encuentra en estado de oxidación +1, siendo muy inestable, su uso es menos frecuente que el pentahidratado, en caso de someterse a calor intenso, se descompone en óxido cúprico, gas sulfuroso y oxígeno⁹⁷. La forma anhidra se usa como detector de humedad⁹⁴.

- Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$):

Fuerte irritante para la piel y las membranas mucosas, incluyendo nariz, garganta y ojos, en caso de ingesta puede producir hipotensión, vómitos, gastroenteritis hemorrágica asociada con erosión de las mucosas, gusto metálico, sensación de quemaduras en el epigastrio y diarrea y depresión del sistema nervioso central con coma en los casos graves⁸⁸.

Se elabora a partir de una reacción del óxido de cobre III con ácido sulfúrico diluido, esta dilución se calienta hasta alcanzar la saturación resultando en el

desprendimiento de gas sulfuroso y en la formación de la sal sulfato de cobre ⁹⁶. Posteriormente, se deja enfriar, cristalizando el pentahidratado azul⁹⁴.

El sulfato de cobre III se utiliza como preparación de otros compuestos de cobre para fabricar fungicidas⁹⁴, se utiliza como alguicidas⁹³, abonos, pesticidas⁹⁸, en prevención de hongos para plantas⁹⁷, complemento alimenticio en animales y en medicina, entre otros⁹⁸. En odontología, de acuerdo con Anand et al. se observaron que incorporando CuSO₄ a compuestos antimicóticos como fluconazol y anfotericina B, existe un aumento de la inhibición porcentual de *Candida albicans*¹².

El pH descrito para el sulfato de cobre pentahidratado es de 3.5 a 4.4 en concentraciones de 1% a 10% en agua a 20°C⁹⁹.

5.- Pruebas de sensibilidad.

Existen diferentes pruebas de sensibilidad antimicrobiana, las cuales se basan en la evaluación *in vitro* de la capacidad que tienen diferentes agentes antimicrobianos y antifúngico de inhibir el crecimiento de microorganismos. Esta capacidad puede ser evaluada por métodos de dilución o difusión^{100,101,102}.

Actualmente, el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) y el European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) presentan guías para susceptibilidad para microorganismos¹⁰². Para la determinación de algunos hongos filamentosos, CLSI dispone de un protocolo estándar [M38-A]^{103,104}.

I. Test de sensibilidad para determinación de concentración mínima inhibitoria en organismos fúngicos (CMI):

El CMI es un método de prueba de susceptibilidad antifúngica disponible para detectar la resistencia antimicótica y para determinar el mejor tratamiento contra un hongo específico¹⁰⁰. La CMI se define como la concentración más baja de un antifúngico que inhibe el crecimiento de un microorganismo en un determinado periodo de tiempo y se expresa en mg/L^{6,105}.

II. Tipos de métodos de susceptibilidad:

a. Métodos basados en agar:

El método de difusión por disco es una de las más antiguas técnicas para el estudio de susceptibilidad antimicrobiana y continúa siendo una de las más ampliamente utilizadas en la rutina de los laboratorios clínicos¹⁰⁰. Este método ha sido desarrollado y validado sólo en el caso de azoles y equinocandinas para *Candida*¹⁰². Se utiliza un inóculo estandarizado a 0.5 McFarland y las placas son incubadas a 35° C durante 24 h. Los resultados de la prueba de susceptibilidad según los criterios interpretativos de diámetro de zona para especies de *Candida* permiten clasificar los aislados en susceptibles, resistentes, susceptible dosis-dependiente y no susceptible⁸. Las pruebas de disco son económicas, fáciles de realizar y proporcionan una prueba de detección ideal¹⁰².

b. Métodos de microdilución en caldo:

Los métodos de microdilución son el gold estándar en los métodos de sensibilidad tanto de levaduras como de hongos filamentosos¹⁰². Estos métodos se basan en la capacidad de crecimiento fúngico en pocillos de placas de microdilución, las cuales contienen un caldo de cultivo y diluciones seriadas de los antifúngicos en el medio líquido, el cual se inocula con un número estandarizado de microorganismos y se incuba durante un tiempo determinado¹⁰⁵. Las desventajas de este método es el prolongado tiempo de espera para los resultados (entre 24 y 72 horas), la ausencia de “breakpoints” de varios hongos y fármacos antifúngicos, entre otros¹⁰⁴.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:

¿Existe diferencia en la efectividad antimicótica frente a *Candida albicans* en cuerpos de muestra de acrílico de termocurado, de un desinfectante fabricado a base de sulfato de cobre, en comparación con nistatina, hipoclorito de sodio y clorhexidina?

OBJETIVO GENERAL

Evaluar efectividad antimicótica *in vitro* del sulfato de cobre en cultivos de placas de resinas acrílicas de termocurado inoculadas con *Candida albicans*, frente a desinfectantes de nistatina, hipoclorito de sodio y clorhexidina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) *in vitro* de un desinfectante experimental a base de sulfato de cobre para *Candida albicans*.
- Comparar la disminución de unidades formadoras de colonias *in vitro* de un desinfectante experimental a base de sulfato de cobre con uno a base de nistatina 100000 UI.
- Comparar la disminución de unidades formadoras de colonias *in vitro* de un desinfectante experimental a base de sulfato de cobre con uno a base de hipoclorito de sodio 0.5%.
- Comparar la disminución de unidades formadoras de colonias *in vitro* de un desinfectante experimental a base de sulfato de cobre con uno a base de clorhexidina 0.12%.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio de tipo experimental analítico, *in vitro*. Donde se utilizaron cepas de *Candida albicans* (ATCC 90028) del laboratorio de micología de la Facultad de Medicina Universidad de Valparaíso, inoculadas en placas de acrílico de termocurado de 15x15x2mm, esterilizadas en autoclave y cultivadas en agar Sabouraud en el laboratorio de micología de la Facultad de Medicina Universidad de Valparaíso.

Para la determinación del tamaño muestral se utilizó el método de la tripleta, que consiste en utilizar el menor número impar posible, en este caso 3, para que en el caso de alguna diferencia, el tercero en discordia defina el resultado. Con el fin de obtener mayor certeza las 3 preparaciones para cada desinfectante fueron triplicadas, obteniendo un tamaño muestral mayor y por ende más representativo, utilizando 9 preparaciones por desinfectante. Por lo tanto, el tamaño total de las muestras fue de 54.

Uno de los investigadores se estandarizó en el conteo de UFC mediante un ciego simple con un gold estándar (Dr. Rodrigo Cruz, director del departamento de micología de la Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso) que consistió en contabilizar UFC en 10 sectores de placas de cultivo de *Candida albicans* en agar Sabouraud, los que fueron anotados en una planilla. Procedimiento supervisado por otro investigador, quien seleccionó e indicó los sectores a cuantificar. Se obtuvo una concordancia de 0.99 según índice de Lin.

1. Variables

Dependientes:

Unidades formadoras de colonias (UFC) de *Candida albicans*, de tipo cuantitativa y continua.

Independientes:

Corresponden a los agentes desinfectantes (Desinfectante de cobre de 4.7 µg/ml y 9.4µg/ml, clorhexidina 0.12%, nistatina 100000 UI, hipoclorito de sodio 0.5%). Variable de tipo cualitativa nominal.

2. Definiciones:

Efectividad: Se definirá como efectividad de un desinfectante, aquel que logre una reducción de unidades formadoras de colonias de *Candida albicans* con una diferencia estadísticamente significativa en comparación al grupo control.

CMI: Para este estudio CMI corresponde a la concentración más baja del desinfectante a base de sulfato de cobre que inhibe el crecimiento de UFC de *Candida albicans* superior a un 90% en un determinado periodo de tiempo y se expresa en mg/L.

3. Fase preexperimental

I. Prueba de inoculación

3 cuerpos de muestra de acrílico de termocurado fueron sumergidos en 30 ml de caldo Sabouraud con cepa de *Candida albicans* (ATC 90028) a una concentración de 1 MacFarland (Fig.1). Se incubaron por 72 horas a 37°C en estufa de cultivo Memmert IN110 (Fig.2). Pasado dicho tiempo, se retiraron de la estufa y fueron

enjuagados de a 3 con 100 ml de suero fisiológico (NaCl 0.9%) por 30 segundos (Fig.3). Se procedió a llevar cada cuerpo de muestra a un tubo de ensayo individual con 15 ml de suero fisiológico 0.9%, los cuales se sometieron a agitación con Vortex Dragonlab MX-F por 60 segundos (Fig.4). Se extrajo 1 ml de cada tubo y fue depositado en cada placa de cultivo con agar Sabouraud, donde fue plaqueado (Fig.5) y cultivado a 37°C por 72 horas en estufa de cultivo Memmert IN110 (Fig.6).

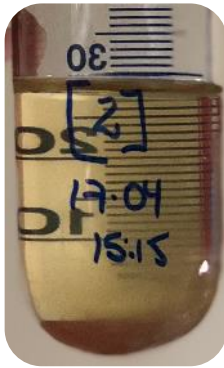


Figura 1



Figura 2

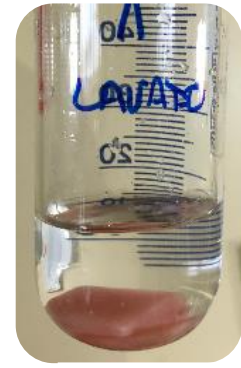


Figura 3

Fig.1: Inoculación de 3 cuerpos de muestra de acrílico de termocurado con caldo Sabouraud a 1 MacFarland; Fig.2: Cultivo en estufa Memmert IN110 por 72 horas a 37°C; Fig.3: Enjuague de 3 cuerpos de acrílico en 100 ml con suero fisiológico NaCl 0.9% por 30 segundos.

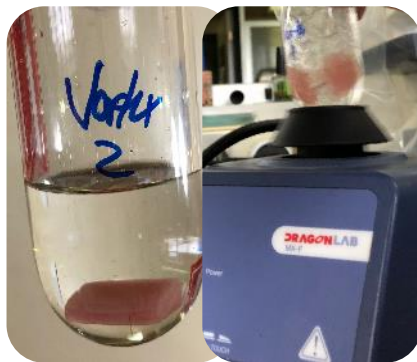


Figura 4

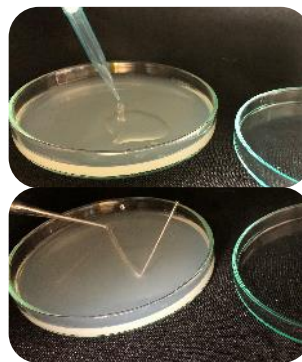


Figura 5



Figura 6

Fig.4: Tubo de ensayo individual con 15 ml de suero fisiológico NaCl 0.9% y agitación con Vortex Dragonlab MX-F por 60 segundos; Figura 5: 1ml de suero fisiológico NaCl 0.9% depositado en placa de cultivo con agar Sabouraud. Fig.6: Cultivo en estufa Memmert IN110 por 72 horas a 37°C.

La inoculación de los 3 cuerpos de muestra de acrílico de termocurado se determinó visualmente, donde se comprobó si existía o no crecimiento de *Candida albicans* en las placas Petri (Fig.7).

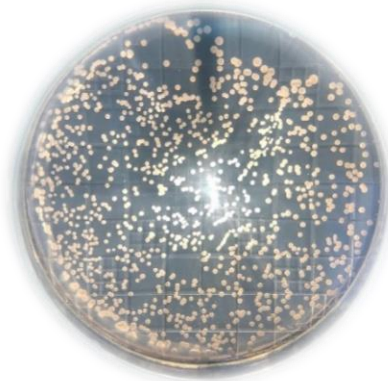


Figura 7

Fig.7: UFC presentes en placa petri luego de la etapa de cultivo por 72 horas a 37°C.

II. Estudio piloto.

Se realizó un estudio piloto con el objetivo de poner a prueba el protocolo de investigación e identificar la variable concentración del sulfato de cobre.

a. Inoculación de cuerpos de muestra:

15 cuerpos de muestra de acrílico de termocurado fueron sumergidos en 100 ml de caldo Sabouraud con cepa de *Candida albicans* (ATC 90028) a una concentración de 1 MacFarland (Fig.8), se incubaron por 72 horas a 37°C en estufa de cultivo Memmert IN110 (Fig.9). Pasado dicho tiempo, se retiraron de la estufa y fueron enjuagados de a 3 con 100 ml de suero fisiológico 0.9% por 30 segundos (Fig.10).

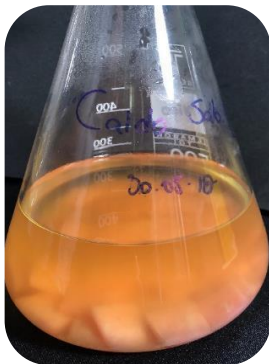


Figura 8



Figura 9



Figura 10

Fig.8: Inoculación de cuerpos de muestra de acrílico de termocurado con caldo Sabouraud a 1 MacFarland; Fig.9: Cultivo en estufa Memmert IN110 por 72 horas a 37°C; Fig.10: Enjuague de cuerpos de acrílico en 15 ml cada uno con suero fisiológico NaCl 0.9% por 30 segundos.

b. Preparación de desinfectantes:

- Clorhexidina 0.12%: Colutorio marca Oralgene 0.12% 120 ml (Fig. 11). Nistatina 100000 UI: Recetario magistral 100000 UI en solución sin alcohol 1000 ml (Fig. 12).
- Hipoclorito de sodio (NaOCl) 0.5%: Marca Anga Ltda. al 2%, se diluyó 25 ml de hipoclorito de sodio en 75 ml de agua destilada (Fig. 13).
- Sulfato de cobre 1.4µg/ml: Sulfato de cobre marca Alga Stop 11.8%, se diluyó 6.25 µL en 500 ml de agua destilada (Fig. 14).



Figura 11



Figura 12



Figura 13

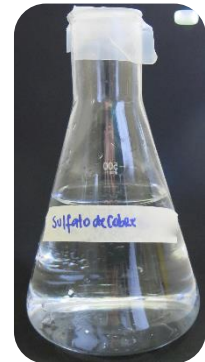


Figura 14

Desinfectantes: Figura 11: Clorhexidina 0.12%, Oralgene 120ml; Figura 12: Nistatina 100.000UI Recetario magistral 1000ml; Figura 13: Hipoclorito de sodio (NaOCl) 0.5%, Anga Ltda. al 2%; Figura 14: Sulfato de cobre 1.4µg/ml, Alga Stop 11.8%;

Grupo control

Cloruro de Sodio 0.9% FlexPharma (Fig. 15).



Figura 15

Grupo control: Fig.15: Cloruro de Na 0.9% FlexPharma.

c. Desinfección:

Se dividieron los cuerpos de muestra en 5 grupos, correspondientes a los desinfectantes y al control negativo, en tubos de ensayo individuales que contenían 10 ml del desinfectante respectivo (Fig. 16). Fueron divididas de la siguiente forma: 3 muestras con suero fisiológico 0.9% (control negativo), 3 muestras con clorhexidina 0.12%, 3 muestras con nistatina 100000 UI, 3 muestras con hipoclorito de sodio 0.5%, 3 muestras con sulfato de cobre 1.4 µg/ml (Fig. 17).



Figura 16



Figura 17

Fig.16: Colocación de desinfectante en tubos de ensayo; Fig.17: División de grupos de 3 tubos por cada desinfectante.

d. Cultivo post-desinfección

Transcurrido 6 horas se retiraron los cuerpos de muestra de cada tubo de ensayo y fueron enjuagados de a 3 con 100 ml de suero fisiológico 0.9% por 30 segundos (Fig. 18) y se procedió a llevar cada cuerpo de muestra a un tubo de ensayo individual con 15 ml de suero fisiológico 0.9%, los cuales se sometieron a agitación con Vortex Dragonlab MX-F por 60 segundos (Fig. 19). Posteriormente se extrajo 1ml de cada tubo y fue depositado en cada placa de cultivo con agar Sabouraud, fue plaqueado (Fig. 20) y cultivado a 37°C por 72 horas en estufa de cultivo Memmert IN110 (Fig. 21).



Figura 18



Figura 19

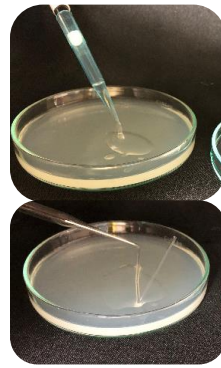


Figura 20



Figura 21

Fig.18: Enjuague de cuerpos de acrílico de a 3 en 100 ml con suero fisiológico NaCl 0.9% por 30 segundos; Fig.19: Agitación con Vortex Dragonlab MX-F en 15ml cada uno con suero fisiológico NaCl 0.9% por 60 segundos; Fig.20: 1ml de suero fisiológico NaCl 0.9% depositado en placa de cultivo con agar Sabouraud. Fig.21: Cultivo en estufa Memmert IN110 por 72 horas a 37°C.

e. Prueba de morfología:

Se identificó la presencia de *Candida albicans* mediante la prueba de morfología de las colonias, con lupa estereoscópica Zeiss Stemi 2000-C a 40X. Se identificaron como colonias de *Candida albicans* aquellas colonias cremosas de color blanco amarillento, lustrosas, poco elevadas y de bordes bien definidos.

f. Conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC):

Previo al conteo se realizó una calibración de uno de los investigadores con un gold estándar, para el proceso de conteo de unidades formadoras de colonias (Dr. Rodrigo Cruz, Departamento de micología, Universidad de Valparaíso).

Para el conteo de UFC se utilizó el contador de colonias American Optical Darkfield Quebec 3330 (Fig. 22) en el cual se colocaron cada una de las placas Petri en la plataforma del contador con una rejilla milimetrada, iluminada mediante un sistema de iluminación de campo oscuro y se observó a través de un lente amplificador de 1.5X, procediéndose al recuento de UFC mediante el conteo visual-análogo.



Figura 22

Fig.22: Contador de colonias American Optical Darkfield Quebec

III. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del sulfato de cobre.

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria del desinfectante a base de sulfato de cobre sobre *Candida albicans*, se realizó una microdilución en caldo, adaptando el estándar CLSI para el estudio de sensibilidad a los antifúngicos, propuesto por el comité de estandarización de ensayos *in vitro* americano.

a. 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 con glutamina y con bicarbonato sódico, tamponado con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) 0.164 M, ajustado a PH 7 +/- 0.1 y con 0.2% de glucosa.

Componentes

- RPMI 1640..... 10.40 g
- Tampón MOPS.....34.53 g
- Agua destilada1000 ml

Se disolvieron 900 ml de agua destilada las cantidades indicadas de RPMI 1640 y del tampón MOPS, agitando hasta su completa disolución. Se ajustó el pH a 6.9 – 7.1 utilizando NaOH 1N. Finalmente se añadió agua destilada hasta completar un litro y se filtró estérilmente con un filtro de 0.45 µm. Se mantuvo refrigerado hasta su uso a 4 – 8° C.

b. Preparación del inóculo

Desde un cultivo de *Candida albicans* (ATCC 90028) en agar Sabouraud de 24 horas a 37°C, se preparó una suspensión a una concentración 0.5 McFarland en un tubo con 5 ml de suero fisiológico 0.9%. Se realizó una dilución 1:1000 de caldo RPMI 1640. La solución para la posterior inoculación de placas se preparó tomando 10 µl, que fue agregado a un tubo con 10 ml de RPMI 1:1000.

c. Preparación de las diluciones de desinfectante en base a sulfato de cobre

Se determinó una concentración madre (CM) de sulfato de cobre 10 veces superior de 2.94 µg/ml (valor determinado según las instrucciones del fabricante). A partir de esta solución madre se preparó una serie de diluciones, proceso detallado en la figura 23, utilizando como diluyente RPMI 1640. La concentración madre corresponde a 3010.56 µg/ml (Tabla I).

Al terminar las diluciones todos los tubos contenían 1 ml, excepto el tubo n°11 que tenía 2 ml, motivo por el cual se desechó 1 ml del tubo n°11 (Fig. 24).

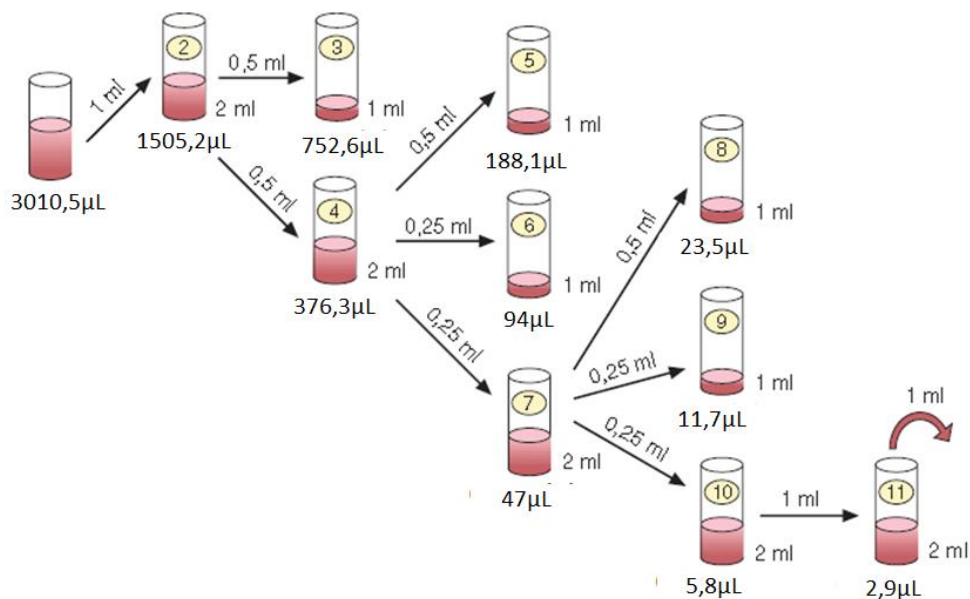


Figura 23: Serie de diluciones de antifúngico según protocolo CLSI.

Posteriormente se realizó una dilución 1:5 agregando 4ml de RPMI a cada tubo.



Figura 24

Fig.24: Diluciones de antifúngico según protocolo CLSI, de mayor a menor concentración de desinfectante a base de sulfato de cobre.

d. Preparación de placas de microdilución

Se sembraron 100 μ l de dilución en las placas de microdilución, donde a cada pocillo se le agregó 10 μ l del desinfectante de sulfato de cobre a diferentes concentraciones, más 90 μ l de levadura, preparada previamente en la fase de inoculación. De la columna 1 a 10 (de izquierda a derecha) se rellenó con las diferentes concentraciones del desinfectante, donde la columna 1 correspondió a la concentración del tubo 2 y así sucesivamente. La columna 11 fue el control de crecimiento, conteniendo solamente dilución de levadura 1:1000. La columna 12 fue control de esterilidad, conteniendo únicamente caldo RPMI 1640 (Fig. 25). Se llevó a cultivo por 24 horas a 37°C, en ausencia de luz.



Figura 25

Fig.25: Placa de microdilución, columnas 1 a 10 contienen diferentes concentraciones del desinfectante, columna 11 fue control de crecimiento (CC) y columna 12 fue control de esterilidad (CE).

Los resultados del crecimiento de *Candida albicans* en cada pocillo fueron analizados mediante una lectura visual, con lupa estereoscópica Zeiss Stemi 2000-C a 40X, determinado que la CMI era la concentración más baja utilizada en la que no se observaba crecimiento de la levadura (Fig. 26). Adicionalmente se tomó 3µl de muestra de uno de los pocillos y se sembró en agar Sabouraud para corroborar que la levadura observada correspondía a *Candida albicans*.

Tabla I.

Tubo N°	[µg/ml] inicial	Transferir (ml)	A un tubo con RPMI (ml)	[µg/ml] resultante	Tubo	[µg/ml] final en placa
1	3010,56	1	1	1505,28	2	150,528
2	1505,28	0,5	0,5	752,64	3	75,264
3	1505,28	0,5	1,5	376,32	4	37,632
4	376,32	0,5	0,5	188,16	5	18,816
5	376,32	0,25	0,75	94,08	6	9,408
6	376,32	0,25	1,75	47,04	7	4,704
7	47,04	0,5	0,5	23,52	8	2,352
8	47,04	0,25	0,75	11,76	9	1,176
9	47,04	0,25	1,75	5,88	10	0,588
10	5,88	1	1	2,94	11	0,294



Figura 26.A



Figura 26.B



Figura 26.C

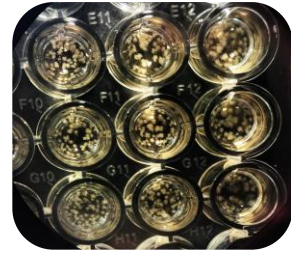


Figura 26.D

Fig.26: Análisis de crecimiento de *Candida albicans* en placa de microdilución con lupa estereoscópica Zeiss Stemi 2000-C a 40X. 26.A: columnas 1, 2 y 3; 26.B: columnas 4, 5 y 6; 26.C: columnas 7, 8 y 9; 26.D: columnas 10, 11 y 12.

4. Fase experimental

I. Procedimiento

a. Inoculación de cuerpos de muestra:

54 cuerpos de muestra de acrílico de termocurado fueron sumergidos en 100ml de caldo Sabouraud con cepa de *Candida albicans* (ATCC 90028) a una concentración de 1 MacFarland (Fig. 27), se incubaron por 72 horas a 37°C en estufa de cultivo Memmert IN110 (Fig. 28). Pasado dicho tiempo, se retiraron de la estufa y fueron enjuagados con 100 ml de suero fisiológico 0.9% por 30 segundos (Fig. 29).



Figura 27



Figura 28



Figura 29

Fig.27: Inoculación de 56 cuerpos de muestra de acrílico de termocurado con caldo Sabouraud a 1 MacFarland. Fig.28: Cultivo en estufa Memmert IN110 por 72 horas a 37°C; Fig.29: Enjuague de cuerpos de acrílico en 15 ml cada uno con suero fisiológico NaCl 0.9% por 30 segundos.

b. Preparación de desinfectantes:

- Clorhexidina 0.12%: Colutorio marca Oralgene 0.12% 120 ml (Fig. 30).
- Nistatina 100000 UI: Recetario magistral 100000 UI en solución sin alcohol 1000 ml (Fig. 31).
- Hipoclorito de sodio 0.5%: Marca Anga Ltda. al 2%, se diluyó 25 ml de hipoclorito de sodio en 75 ml de agua destilada (Fig. 32).
- Sulfato de cobre 4.7 µg/ml: Sulfato de cobre marca Alga Stop 11.8%, se diluyó 3.9 µL en 100 ml de agua destilada (Fig. 33).
- Sulfato de cobre 9.4 µg/ml: Sulfato de cobre marca Alga Stop 11.8%, se diluyó 7.9 µL en 100 ml de agua destilada (Fig. 34).



Figura 30



Figura 31



Figura 32

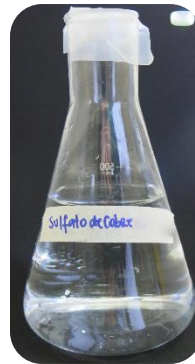


Figura 33

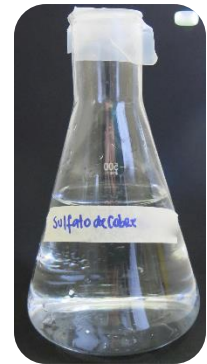


Figura 34

Desinfectantes: Fig. 30: Clorhexidina 0.12% Oralgene 120 ml; Fig. 31: Nistatina 100.000 UI Recetario magistral 1000 ml; Fig. 32: Hipoclorito de sodio (NaOCl) 0.5% Anga Ltda. al 2%; Fig. 33: Sulfato de cobre 4.7µg/ml; Fig. 34: Sulfato de cobre 9.4µg/ml.

Grupo control

- Cloruro de sodio 0.9% FlexPharma (Fig. 35).



Figura 35

Grupo control: Fig.35: Cloruro de Na 0.9% FlexPharma.

c. Desinfección:

Se dividieron los cuerpos de muestra en 6 grupos y se depositaron en un tubo de ensayo individual con 10 ml de cada desinfectante y grupo control (Fig. 36): 9 muestras con suero fisiológico (control negativo), 9 muestras con Clorhexidina 0.12%, 9 muestras con nistatina 100000 UI, 9 muestras con hipoclorito de sodio 0.5%, 9 muestras con sulfato de cobre 4.7µg/ml y 9 muestras con sulfato de cobre 9.4µg/ml, por un periodo de 6 horas.

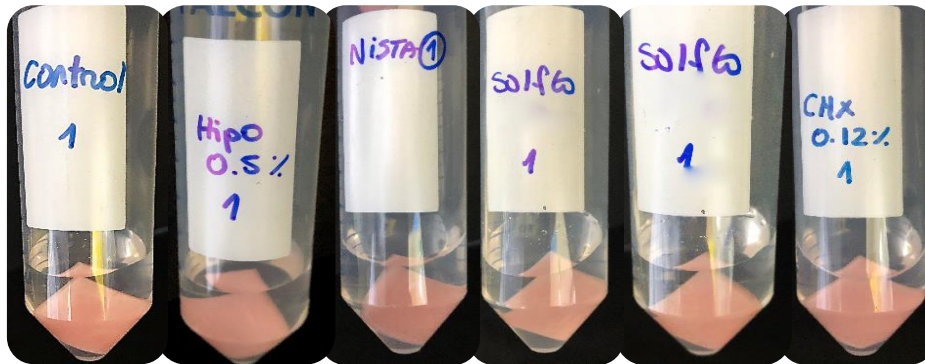


Figura 36

Fig.36: Desinfección de muestras de acrílico en 10ml en los distintos desinfectantes y grupo control.

d. Cultivo post-desinfección:

Transcurrido 6 horas se retiraron los cuerpos de muestra de cada tubo de ensayo y fueron enjuagados de a 3 con 100 ml de suero fisiológico 0.9% por 30 segundos (Fig. 37) y se procedió a llevar cada cuerpo de muestra a un tubo de ensayo individual con 15 ml de suero fisiológico 0.9%, los cuales se sometieron a agitación con Vortex Dragonlab MX-F por 60 segundos (Fig. 38). Se extrajo 1 ml de cada tubo, y fue depositado en cada placa de cultivo con caldo Sabouraud, donde fue plaqueado (Fig. 39) y cultivado a 37°C por 72 horas en estufa de cultivo Memmert IN110 (Fig. 40), dando un total de 54 placas Petri (Fig. 41).



Figura 37



Figura 38

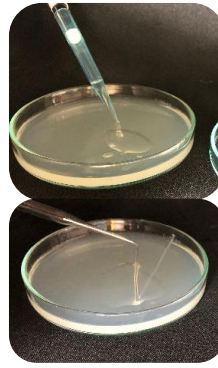


Figura 39

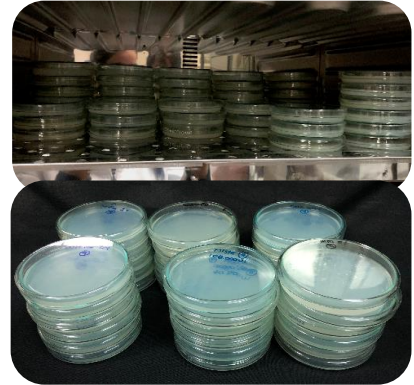


Figura 40

Fig.37: Enjuague de cuerpos de acrílico de a 3 en 100 ml con suero fisiológico NaCl 0.9% por 30 segundos; Fig.38: Agitación con Vortex Dragonlab MX-F en 15ml cada uno con suero fisiológico NaCl 0.9% por 60 segundos; Fig.39: 1ml de suero fisiológico NaCl 0.9% depositado en placa de cultivo con agar Sabouraud. Fig.40: Cultivo en estufa Memmert IN110 por 72 horas a 37°C.

e. Prueba de morfología:

Se identificó la presencia de *Candida albicans* mediante la prueba de morfología de las colonias, con lupa estereoscópica Zeiss Stemi 2000-C a 40X y se identificaron como colonias de *Candida albicans* aquellas colonias cremosas de color blanco amarillento, lustrosas, poco elevadas y de bordes bien definidos.

f. Conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC):

Para el conteo de UFC se utilizó el contador de colonias American Optical Darkfield Quebec 3330 en el cual se colocaron cada una de las placas Petri en la plataforma del contador con una rejilla milimetrada, se iluminó a través de un sistema de iluminación de campo oscuro y se observó a través de un lente amplificador de 1.5X y se procedió al recuento de UFC mediante el conteo visual-análogo.

La unidad de medición fue en número de unidades formadoras de colonias por ml.

g. Medición de pH

Se realizó una medición de pH para cada desinfectante, agua destilada, grupo control y sulfato de cobre a la concentración comercial (11.8%) utilizando un pH metro pH/ion Meter 450 marca Corning. Se midió 3 veces cada producto y se calculó un promedio.

II. Análisis estadístico

Para realizar este estudio se implementó el software estadístico SPSS Statistics versión 19. Mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba U de Mann-Whitney.

RESULTADOS

Para la realización de este estudio, fueron inoculados 54 cuerpos de muestra de acrílico de termocurado, procedimiento ya descrito anteriormente, los cuales fueron divididos en 6 grupos de 9 cuerpos de muestra para cada uno de los desinfectantes y grupo control (donde clorhexidina corresponde al grupo CHX, nistatina al grupo Nista, hipoclorito de sodio al grupo Hipo y sulfato de cobre al grupo SulfCo).

1. Fase Preexperimental

I. Prueba de inoculación

La inoculación de los 3 cuerpos de muestra de acrílico de termocurado se determinó visualmente, donde se comprobó si existía o no crecimiento de *Candida albicans* en las placas Petri. Luego de las 72 horas se observó crecimiento de *Candida albicans* en las tres placas estudiadas (Tabla II), previa comprobación de morfología mediante microscopía.

Placa n°	Presencia de <i>Candida albicans</i>
1	Sí
2	Sí
3	Sí

Tabla II. Presencia de *Candida albicans* proveniente de muestras de acrílico inoculadas en placas Petri luego de 72 horas de cultivo a 37°C.

II. Estudio piloto

Se sometieron a prueba 3 cuerpos de muestra de acrílico para cada grupo desinfectante. Luego de 72 horas se observó crecimiento de *Candida albicans* en el grupo SulfCo 1.4 µg/ml, donde la placa 1 fue similar al grupo control, a diferencia de los otros desinfectantes donde no hubo crecimiento de colonias (Tabla III).

Placa/ Desinfectante	Control	Nista 100.000UI	CHX 0.12%	Hipo 0,5%	SulfCo 1.47 [µg/ml]
1	587	0	0	0	95
2	97	0	0	0	56
3	140	0	0	0	41

Tabla III. Número de UFC en estudio piloto.

III. Determinación concentración mínima inhibitoria (CMI) para desinfectante en base de dilución de sulfato de cobre.

El valor de concentración mínima inhibitoria para el sulfato de cobre sobre *Candida albicans* se analizó mediante lectura visual con microscopio. No se observó crecimiento de la levadura en los pocillos 1 a 6, determinando que la concentración más baja utilizada en la que no se observa crecimiento de la levadura corresponde a 4.7 µg/ml (Tabla IV)

Posterior a la siembra en agar Sabouraud de 3µl de muestra del pocillo 10, se corroboró que la levadura observada correspondía a *Candida albicans*.

Pocillo (N°)	SulfCo [µg/ml]	Crecimiento <i>C. albicans</i>
1	150,528	No
2	75,264	No
3	37,632	No
4	18,816	No
5	9,408	No
6	4,704	No
7	2,352	Sí
8	1,176	Sí
9	0,588	Sí
10	0,294	Sí

Tabla IV. Presencia de *Candida albicans* para determinación de CMI.

IV. Medición de pH

Medición n°	Control	Agua destilada	Nista 100.000 UI	CHX 0.12%	Hipo 0,5%	SulfCo 11.8%	SulfCo 4.7 [µg/ml]	SulfCo 9.4 [µg/ml]
1	5.2	6.9	5.9	7.7	11.5	8.8	7.5	7.9
2	5.6	7.1	6	7.9	11.6	8.8	7.6	7.9
3	5.4	7.3	6.1	7.8	11.4	8.8	7.4	7.9
MEDIA	5.4	7.1	6	7.8	11.5	8.8	7.5	7.9

2. Fase experimental

Los resultados obtenidos respecto a la acción antimicótica de cada desinfectante y el número de UFC observadas, respectivas a cada placa de cultivo son descritas en la tabla V.

Placa	Desinfectante					
	Control (suero)	Nista 100.000UI	CHX 0.12%	Hipo 0,5%	SulfCo 4,7µg/ml	SulfCo 9,4µg/ml
Placa 1	329	0	0	0	1	0
Placa 2	212	0	0	0	8	2
Placa 3	133	0	0	0	1	0
Placa 4	39	0	0	0	137	0
Placa 5	109	0	0	0	2	0
Placa 6	145	0	0	0	17	0
Placa 7	37	0	0	0	14	0
Placa 8	47	0	0	0	0	43
Placa 9	62	0	0	0	0	0
MEDIA	123,6	0	0	0	20	5

Tabla V. Presencia de UFC en placas de cultivo según cada desinfectante utilizado.

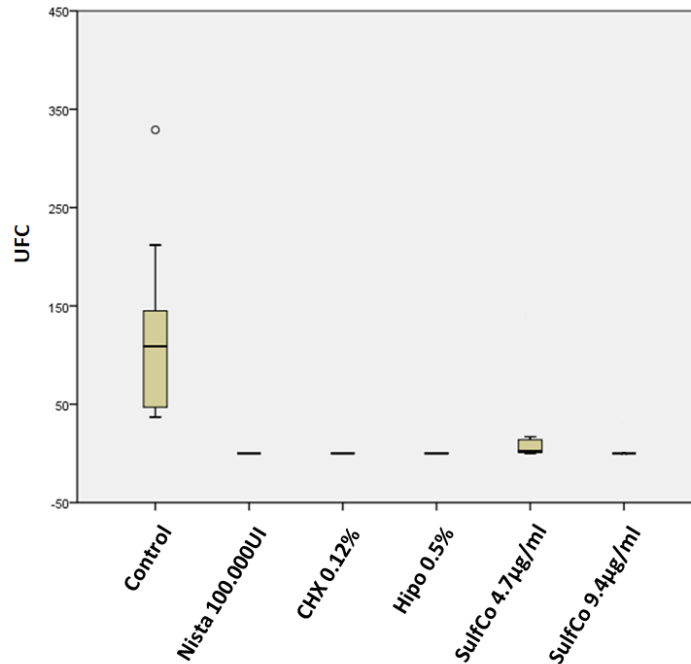


Gráfico 1. Medias de UFC obtenidas por cada desinfectante estudiado y grupo control.

El gráfico 1 muestra las medias de UFC obtenidas por cada grupo, donde se puede observar que la media del grupo control corresponde a 123.6 UFC y la de los desinfectantes corresponden a 0 UFC para nistatina 100000 UI, clorhexidina 0.12% e hipoclorito de sodio 0.5%, 20 UFC para sulfato de cobre al 4.7 µg/ml y 5 UFC para sulfato de cobre 9.4 µg/ml.

3. Análisis estadístico

Se utilizó el software estadístico SPSS statistics, versión 19. Se realizó un análisis de los supuestos de los cuales se cumplió el de aleatoriedad e independencia, no cumpliéndose el de homocedasticidad (Tabla VI) y normalidad (gráfico 2, 3 y 4)

Prueba de homocedasticidad de varianzas

Estadístico de Levene	Cantidad		Sig.
	gl1	gl2	
8,985	5	48	,000

Tabla VI. Prueba de homocedasticidad.

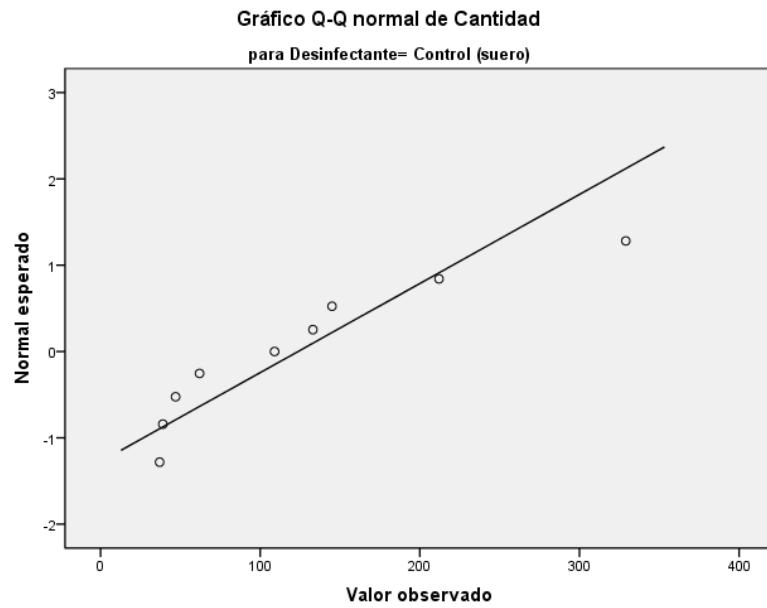


Gráfico 2. Muestra una distribución normal de los datos del grupo control.

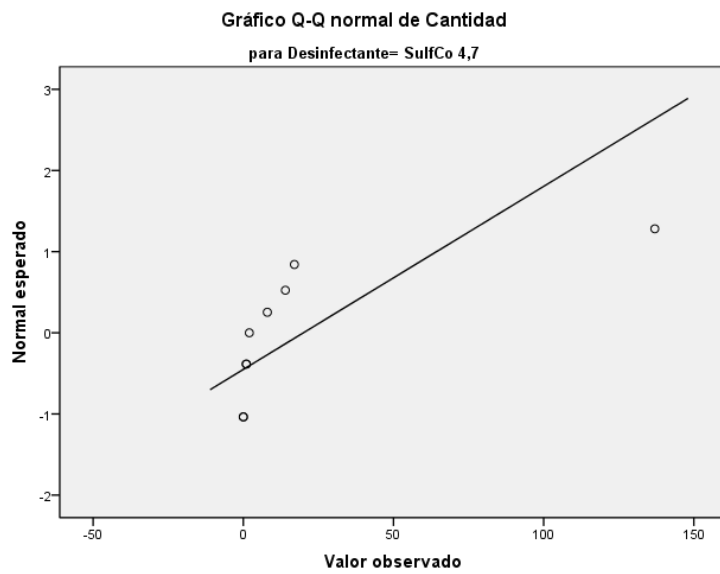


Gráfico 3. Muestra una distribución no normal de los datos para sulfato de cobre 4.7 $\mu\text{g/ml}$.

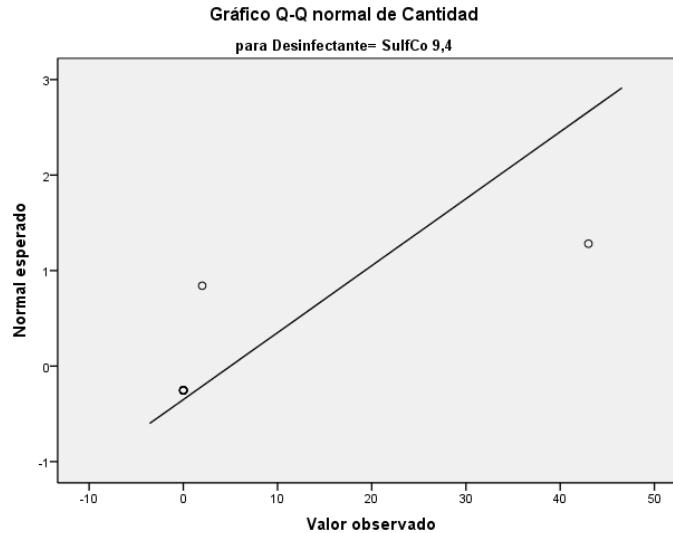


Gráfico 4. Muestra una distribución no normal de los datos para sulfato de cobre 9.4 $\mu\text{g/ml}$.

Luego de definir la no normalidad de los datos, éstos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis, observándose diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.001$) se realizó el test de comparaciones múltiples U. de Mann-Whitney, para determinar cuál fue el o los pares que presentaron la diferencia, con un nivel de confianza de 95%.

Con el test U. de Mann-Whitney se observó que:

- 1) Existe diferencia significativa en la disminución de unidades formadoras de colonias de *Candida albicans* entre:
 - a) Sulfato de cobre 4.7 $\mu\text{g/ml}$ y nistatina 100000 UI ($p=0.002$)
 - b) Sulfato de cobre 4.7 $\mu\text{g/ml}$ y clorhexidina 0.12% ($p=0.002$)
 - c) Sulfato de cobre 4.7 $\mu\text{g/ml}$ e hipoclorito 0.5% ($p=0.002$)
 - d) Sulfato de cobre 4.7 $\mu\text{g/ml}$ y el grupo control ($p=0.002$)
 - e) Sulfato de cobre 4.7 $\mu\text{g/ml}$ y sulfato de cobre 9.4 $\mu\text{g/ml}$ ($p=0.47$)
 - f) Grupo control y sulfato de cobre 9.4 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.001$)
 - g) Grupo control y nistatina 100000 UI ($p < 0.001$)
 - h) Grupo control y clorhexidina 0.12% ($p < 0.001$)
 - i) Grupo control e hipoclorito 0.5% ($p < 0.001$)

- 2) No existe diferencia significativa en la disminución de unidades formadoras de colonias de *Candida albicans* entre:
 - a) Sulfato de cobre 9.4 $\mu\text{g/ml}$ y nistatina 100000 UI ($p=0.146$)
 - b) Sulfato de cobre 9.4 $\mu\text{g/ml}$ y clorhexidina 0.12% ($p=0.146$)
 - c) Sulfato de cobre 9.4 $\mu\text{g/ml}$ e hipoclorito 0.5% ($p=0.146$)

DISCUSIÓN

El presente estudio analiza un desinfectante experimental, correspondiente a sulfato de cobre, en 2 concentraciones, en comparación a 3 desinfectantes, utilizando un grupo control (suero fisiológico 0.9%) con la finalidad de corroborar su acción antifúngica sobre la presencia de *Candida albicans* adheridas a cuerpos de muestra de acrílico de termocurado. Esta investigación corresponde a un estudio *in vitro*, donde fue posible visualizar la reducción de unidades formadoras de colonias (UFC) de *Candida albicans*, luego de la inmersión en los desinfectantes, y así estudiar la efectividad del sulfato de cobre en comparación con el grupo control y cada agente desinfectante en forma particular. Este estudio demuestra que la utilización de sulfato de cobre como desinfectante, podría ser útil en la práctica odontológica sobre *Candida albicans*.

Se realizó una prueba de inoculación para comprobar si existía adherencia de *Candida albicans* de laboratorio en acrílico recién confeccionado y en condiciones ideales, ya que en la práctica clínica la *Candida albicans* tiene capacidad de adherirse a las porosidades del acrílico protésico, adhesión que se ve favorecida por las condiciones propias del paciente y el uso y mantención que se le da a la aparatología protésica. Otros autores, ya han determinado que la *Candida albicans* sí tiene capacidad de unión al acrílico, incluso en un estudio *in vitro*^{6,61,106}.

En una segunda etapa, se llevó a cabo una prueba piloto, ya que a pesar de que existen diferentes estudios que evalúan la efectividad de cobre sobre *Candida albicans*^{5,11,18,87,92}, no se ha descrito para un desinfectante a base de sulfato de cobre sobre cuerpos de prueba acrílicos. Al utilizar un desinfectante comercial no probado para *Candida albicans*, se buscó como prueba piloto evaluar el protocolo y las indicaciones del fabricante como base para determinar una concentración adecuada. Otros autores previamente utilizaron protocolos similares, donde se comparaba la acción de diferentes desinfectantes con un control en colonias de *Candida albicans* cultivadas en resinas acrílicas^{6,10,61,106,107}. Además, se utilizaron como comparación aquellos desinfectantes recomendados por el MINSAL, obteniéndose que a una concentración de desinfectante de sulfato de cobre a 1.4µg/ml existe reducción de las UFC de *Candida albicans*, pero a valores similares al control en algunas placas, a diferencia de clorhexidina, nistatina e hipoclorito, en donde a las concentraciones recomendadas no hay crecimiento fúngico.

Debido al carácter experimental del desinfectante a base de sulfato de cobre y los resultados obtenidos en la prueba piloto, se calculó una concentración mínima inhibitoria (CMI). A pesar de que mediante evaluación visual-análoga con lupa estereoscópica no se observa crecimiento de *Candida albicans* a una concentración de 4.7µg/ml, luego de llevar a cabo la fase experimental, donde se tomó la concentración de 4.7µg/ml y la inmediatamente superior (9.47µg/ml), es posible determinar que la concentración de 9.4µg/ml es aquella que produce una reducción de más del 90% de UFC en comparación al grupo control, por lo que la CMI para sulfato de cobre contra *Candida albicans* es de 9.4µg/ml. A diferencia de Anand et al.¹² que determinó CMI para sulfato de cobre sobre *Candida albicans* de 1mg/ml, desigualdad

que puede explicarse debido a que además de estudiar *Candida albicans* incorporó *Candida glabrata* en su estudio.

Al utilizar clorhexidina 0.12%, hipoclorito de sodio 0.5% y nistatina 100.000UI se observa la inhibición completa de crecimiento de colonias *Candida albicans* sobre la superficie de agar Sabouraud, lo que se evidencia al presentar una diferencia estadísticamente significativa en la reducción de las UFC de *Candida albicans* respecto al grupo control, comprobando su acción antiséptica tras un periodo de inmersión de 6 horas de los cuerpos de muestras de acrílico de termocurado. Estudios previos demostraron que existe alta reducción de colonias de *Candida albicans* tratadas con clorhexidina, en comparación con el grupo control^{6,61}. Estos estudios comprueban la efectividad de clorhexidina 0.12% frente a *Candida albicans*, lo que permitiría su uso y tratamiento de la estomatitis subprotésica asociada a esta levadura. La efectividad del hipoclorito de sodio también ha sido descrita por otros autores^{106,108}, siendo necesario un tiempo mayor a 5 minutos para producir una inhibición completa del crecimiento de la levadura. Adicionalmente, la nistatina, también ha demostrado su efectividad contra la *Candida albicans* en diferentes superficies^{109,110} y es utilizada frecuentemente en la práctica clínica para el tratamiento de la estomatitis subprotésica¹.

No se observó una reducción total de UFC de *Candida albicans* con el sulfato de cobre 4.7µg/ml, luego de una inmersión en el desinfectante por 6 horas, provocando una diferencia estadísticamente significativa entre el desinfectante experimental y sus comparaciones. Sin embargo, al evaluar su efectividad en comparación al grupo control, sí produjo una reducción significativa en las colonias de *Candida albicans*, lo que indica que, en bajas concentraciones, el sulfato de cobre tiene efecto antifúngico contra *Candida albicans*, pero que comparativamente a los otros desinfectantes no es tan efectivo. Estos resultados pueden explicarse debido a que los otros desinfectantes se encuentran a una concentración más alta que la utilizada por el sulfato de cobre 4.7µg/ml. Sin embargo, al ser utilizado a una concentración de 9.4µg/ml, genera una diferencia significativa respecto al grupo control, siendo similar a los otros desinfectantes estudiados. Si bien, no existen estudios que analicen el efecto de sulfato de cobre sobre *Candida albicans* en resinas acrílicas de termocurado, existen diversos estudios acerca de la efectividad del cobre como desinfectante que refuerzan los resultados obtenidos por el presente estudio^{10,18}. Además, el cobre puede ser un coadyuvante en la terapia antimicótica, ya que la presencia de cobre en la membrana celular fúngica puede contribuir a aumentar la velocidad y la actividad fungicida de anfotericina B y fluconazol, generando una disminución en el diámetro y deshidratación de *Candida albicans*^{12,14}. Sin embargo, la CMI determinada por Anand et al.¹² de 1mg/ml es mayor a la de nuestro estudio, lo que implica que la efectividad del sulfato de cobre podría tener un componente dosis dependiente, ya que el efecto antimicótico del sulfato de cobre a una concentración de 4.7µg/ml fue menor que el observado a concentraciones de 9.4µg/ml. Por otro lado, surge el tema de la toxicidad del cobre en el ser humano a altas dosis, la que se ha descrito para individuos que accidentalmente ingirieron elevadas dosis de este metal^{111,112}. Para dosis de cobre de hasta 1 gramo, predominan los síntomas gastrointestinales y la ingestión de dosis más altas puede provocar náuseas, vómitos, dolor de cabeza, diarrea, anemia hemolítica, hemorragia

gastrointestinal, insuficiencia hepática y renal e incluso la muerte^{111,112}, por lo que las dosis utilizadas en este estudio no presentarían riesgo de toxicidad en caso de ingesta accidental.

Estudios han demostrado que el pH es un factor que puede influir en las propiedades del sulfato de cobre^{113,114}. En medios muy ácidos que contengan ácido sulfúrico, la concentración de iones sulfato disminuye lo que reduce su efectividad desinfectante¹¹⁴. Debido a que en este estudio se utilizaron diluciones a base de sulfato de cobre a pH de 7.5 y 7.9, el efecto del sulfato de cobre no se encontraría alterado. Además, considerando que *Candida albicans* es capaz de crecer en rangos de pH 2 a 10^{46,47,48,49}, se demuestra que la reducción de UFC de *Candida albicans* se debe a la capacidad antifúngica del sulfato de cobre como tal, no influyendo el pH en los resultados obtenidos en este estudio.

Debido a que sulfato de cobre 9.4 µg/ml presenta una efectividad similar a los otros desinfectantes en la reducción de colonias de *Candida albicans*, podría considerarse como un potencial coadyuvante en el tratamiento de estomatitis subprotésica. Si bien, en la actualidad se presenta comercialmente para otros usos, a futuro podría crearse un desinfectante a base de sulfato de cobre que pudiese ser utilizado en la práctica odontológica, teniendo como ventaja su bajo costo y fácil utilización. A pesar de esto, se requieren estudios respecto al uso de sulfato de cobre donde se evalúe su acción sobre la estructura protésica en el tiempo y en contacto con tejido humano.

CONCLUSION

1. La CMI para el desinfectante a base de sulfato es de 9.4µg/ml.
2. Efectividad del desinfectante a base de sulfato de cobre fue semejante a nistatina 100000UI, hipoclorito de sodio 0.5% y clorhexidina 0.12%.

SUGERENCIAS Y LIMITACIONES

1. Para futuras investigaciones se sugiere evaluar el sulfato de cobre a través de un estudio *in vitro*, utilizando muestras obtenidas a partir de pacientes portadores de prótesis removibles que padecen estomatitis subprotésica, principalmente asociada a *Candida albicans*.
2. Además, se recomienda la utilización de un instrumento de medición de mayor sensibilidad como un contador de colonias digital.
3. A la vez evaluar el sulfato de cobre en conjunto con otras medidas terapéuticas para el tratamiento de estomatitis subprotésica.
4. Por otro lado, podría evaluarse la efectividad del sulfato de cobre en distintos tiempos.
5. La presentación del sulfato de cobre fue de un desinfectante de piscinas comercial que contenía 11.8% de sulfato de cobre pentahidratado y otros componentes no especificados, siendo una limitación de este estudio.

RESUMEN

Eficacia de un desinfectante a base de cobre y su comparación con clorhexidina, nistatina e hipoclorito de sodio en la reducción de colonias de *Candida albicans* en resinas acrílica de termocurado. Estudio in vitro.

En Chile, de los mayores de 65 años el 62,3% es portador de prótesis removible y $\frac{2}{3}$ tienen riesgo de estomatitis subprótesis asociada a *Candida albicans* (CA). En odontología se investiga el cobre por su capacidad antimicrobiana, no hay descrito un desinfectante de sulfato de cobre (CuSO₄).

Objetivo: Evaluar efectividad antimicótica de CuSO₄ en muestras de resinas acrílicas en cultivos de CA.

Se confeccionaron 72 muestras y fueron esterilizadas. 3 se utilizaron para comprobación de inoculación, 15 para prueba piloto, 54 para experimentación. Éstas se inocularon e incubaron 72 horas a 37°C, se dividió en 6 grupos de 9, fueron enjuagados e inmersos en: suero (control negativo), clorhexidina, nistatina, hipoclorito, CuSO₄ 4.7µg/ml y CuSO₄ 9.4µg/ml, durante 6 horas. Se enjuagaron y vortearon, se extrajo 1ml, se depositó en placas de cultivo agar Sabouraud, se cultivó 72 horas a 37°C. Se contabilizó UFC mediante conteo visual-análogo.

Resultados: Se realizó análisis estadístico con programa SPSS con prueba estadística Kruskal-Wallis y U. de Mann-Whitney, CuSO₄ mostró una diferencia significativa en comparación con control, demostrándose capacidad antifúngica frente a CA.

Discusión: CuSO₄ mostró una reducción significativa de colonias de CA en comparación con el control, demostrándose su capacidad antifúngica frente a CA, coincidiendo con Anand (2017), quienes observaron que incorporando CuSO₄ a catequinas de té verde y antimicóticos hay aumento de la inhibición de CA.

Conclusión: Se demostró que CuSO₄ tiene eficacia en la disminución de colonias de CA.

BIBLIOGRAFÍA

1. Guía Clínica AUGE. Salud Oral Integral para adultos de 60 años: Prevención y tratamiento de caries radiculares, (2015).
2. Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont*. 2011;20(4):251-60.
3. Lazarde L J, Pacheco A. Identificación de especies de *Candida* en un grupo de pacientes con candidiasis atrófica crónica. *Acta Odontológica Venezolana*. 2001;39 N°1.
4. Carreira Piloto V, Almagro Urrutia ZE. La estomatitis subprótesis en pacientes desdentados totales. *Revista Cubana de Estomatología*. 2000;37:133-9.
5. Prado JV, Vidal AR, Duran TC. Application of copper bactericidal properties in medical practice. *Rev Med Chil*. 2012;140(10):1325-32.
6. Calderón-Valencia M, Moromi-Nakata H. Eficacia de diferentes agentes desinfectantes en la remoción de *Candida albicans*, *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* adheridos a resina acrílica de termocurado. 2015. 2015;17(2):4.
7. Amiri M, Etemadifar Z, Daneshkazemi A, Nateghi M. Antimicrobial Effect of Copper Oxide Nanoparticles on Some Oral Bacteria and *Candida* Species. *Journal of Dental Biomaterials*. 2017;4(1):347-52.
8. Rahimi G, Khodavandi A, Yaghobi R. Antimycotic Effect of Copper Oxide Nanoparticles on *Candida albicans* Biofilm. *Micro & Nano Biomedicine*. 2016;1(1):7-12.
9. Mudiar R, Bhagawa A. Efficacy of Copper Charged Water against *Candida albicans* 2016.
10. Raman N, Joseph J, Velan AS, Pothiraj C. Antifungal Activities of Biorelevant Complexes of Copper(II) with Biosensitive Macrocyclic Ligands. *Mycobiology*. 2006;34(4):214-8.
11. Yogurtcu BM, Demirci S, Dogan A, Asutay AB, Sahin F. Anticandidal activity of hetero-dinuclear copper(II) Mn(II) Schiff base and its potential action of the mechanism. *World J Microbiol Biotechnol*. 2017;33(11):202.
12. Anand J, Rai N. Anticandidal synergistic activity of green tea catechins, antimycotics and copper sulphate as a mean of combinational drug therapy against candidiasis. *J Mycol Med*. 2017;27(1):33-45.
13. Hoffman AE, Miles L, Greenfield TJ, Shoen C, DeStefano M, Cynamon M, et al. Clinical isolates of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and *Candida krusei* have different susceptibilities to Co(II) and Cu(II) complexes of 1,10-phenanthroline. *Biometals*. 2015;28(2):415-23.
14. Chudzik B, Tracz IB, Czernel G, Fiolka MJ, Borsuk G, Gagos M. Amphotericin B-copper(II) complex as a potential agent with higher antifungal activity against *Candida albicans*. *Eur J Pharm Sci*. 2013;49(5):850-7.
15. Correa S. Preparación de resinas acrílicas cargadas con nanopartículas de cobre y sus propiedades antimicrobianas frente a *Candida albicans*. Repositorio académico de la Universidad de Chile: Universidad de Chile; 2012.
16. Hauser NC, Dukalska M, Fellenberg K, Rupp S. From experimental setup to data analysis in transcriptomics: copper metabolism in the human pathogen *Candida albicans*. *Journal of biophotonics*. 2009;2(4):262-8.

17. Cheng X, Xu N, Yu Q, Ding X, Qian K, Zhao Q, et al. Novel insight into the expression and function of the multicopper oxidases in *Candida albicans*. *Microbiology*. 2013;159(Pt 6):1044-55.
18. Quaranta D, Krans T, Espirito Santo C, Elowsky CG, Domaille DW, Chang CJ, et al. Mechanisms of contact-mediated killing of yeast cells on dry metallic copper surfaces. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(2):416-26.
19. Guía clínica salud oral integral para adultos de 60 años. . In: MINSAL, editor. Santiago2010.
20. Ministerio de Salud. Guía clínica salud oral integral para adultos de 60 años. (2010)
21. MINSAL. Resultados Encuesta Nacional de Salud. Informe Final. Santiago, Chile. In: salud Md, editor. 2003.
22. Kressin N, Spiro A, 3rd, Bosse R, Garcia R, Kazis L. Assessing oral health-related quality of life: findings from the normative aging study. *Med Care*. 1996;34(5):416-27.
23. Romero N. Prevalencia y manejo de estomatitis subprotésica en pacientes portadores de prótesis removibles, Universidad Andrés Bello, Sede Concepción. 2012-2015. Concepción Chile.
24. 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.
25. Espinoza I, Rojas R, Aranda W, Gamonal J. Prevalence of oral mucosal lesions in elderly people in Santiago, Chile. *J Oral Pathol Med*. 2003;32(10):571-5.
26. Vigild M. Oral mucosal lesions among institutionalized elderly in Denmark. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1987;15(6):309-13.
27. Budtz-Jorgensen E. Oral mucosal lesions associated with the wearing of removable dentures. *J Oral Pathol*. 1981;10(2):65-80.
28. Lazarde L, Pacheco A. Identificación de especies de *Candida* en un grupo de pacientes con candidiasis atrófica crónica. *Acta Odontológica Venezolana*. 2001;39 N°1.
29. Mayta Ali CR, Mendoza Alejo GA, Zeballos López L. Prótesis Removible de Resina. *Revista de Actualización Clínica Investiga*. 2012;24:1158-63.
30. Preti G, Bassi F. C, S., Catapano S, Corsalini M, Gastaldi Gea. *Rehabilitación Protésica*. 2ªedición ed. Colombia2008. 269- 75 p.
31. Preti G, Bassi F. C, S., Catapano S, Corsalini M, Gastaldi Geal. *Rehabilitación Protésica*. 3ªedición ed. Colombia2008.
32. Lucas L, Gennari F, Goiato MC, Dos Santos D, Moreno A, Falcón-Antenucci R. Estética en prótesis removibles. *Revista Cubana de Estomatología*. 2010;47:224-35.
33. The glossary of prosthodontic terms. *The journal of prosthetic dentistry: The academy of prosthodontics*. The glossary of prosthodontic terms.
34. Toledano M, Osorio R, Sánchez F, Osorio Epsm-tc, margin-right:0cm, et al. *Arte y Ciencia de los Materiales Odontológicos*. 7ªedición ed. España2009.
35. W. PR. *La Ciencia de los Materiales Dentales*. 9ªedición ed. México: Interamericana McGraw 1993. p. 183-216.
36. Kenneth K. *Ciencia de los materiales dentales*. 10ª edición ed. México2000. 245-85 p.

37. Cajas N. Asociación entre recuento salival de levaduras del género *Candida* y estomatitis protésica en pacientes portadores de prótesis removible Santiago de Chile: Universidad de Chile; 2012.
38. Ferrando R. Ocurrencia de levaduras del género *Candida* en sujetos con estomatitis protésica en tratamiento. Chile: Universidad de Chile; 2014.
39. Neppelenbroek KH. Sustained drug-delivery system: a promising therapy for denture stomatitis? *J Appl Oral Sci.* 2016;24(5):420-2.
40. Neville B, Damm D, Allen C, J. B. *Oral and Maxillofacial Pathology.* Third edition ed. Elsevier Editorial. 2009.
41. Perić M, Živković R, Milić Lemić A, Radunović M, Miličić B, Arsić Arsenijević V. The severity of denture stomatitis as related to risk factors and different *Candida* spp. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology.* 2018;126(1):41-7.
42. Lazarde J. Estomatitis subprótesis. 2001;39.
43. Le Bars P, Piloquet P, Daniel A, Giunelli B. Immunohistochemical localization of type IV collagen and laminin (alpha1) in denture stomatitis. *J Oral Pathol Med.* 2001;30(2):98-103.
44. Franch C. Prevalencia de lesiones de mucosa oral en adultos de 35-44 años en Chile. Chile: Universidad de Chile; 2017.
45. 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.
46. Sherrington S. Adaptation of *Candida albicans* to environmental pH induces cell wall remodelling and enhances innate immune recognition. *PLOS Pathogens* [Internet]. 2017.
47. Zwolinska-Wcislo M, Budak A, Trojanowska D, Bogdal J, Stachura J. Fungal colonization of the stomach and its clinical relevance. *Mycoses.* 1998;41(7-8):327-34.
48. Gunther LS, Martins HP, Gimenes F, Abreu AL, Consolaro ME, Svidzinski TI. Prevalence of *Candida albicans* and non-*albicans* isolates from vaginal secretions: comparative evaluation of colonization, vaginal candidiasis and recurrent vaginal candidiasis in diabetic and non-diabetic women. *Sao Paulo Med J.* 2014;132(2):116-20.
49. Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999;10(3):359-83.
50. Hall R. Dressed to impress: impact of environmental adaptation on the *Candida albicans* cell wall *Molecular Microbiology.* 2015;97:7-17.
51. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. *Microbiología médica.* 6ta edición ed. Barcelona: Elsevier; 2009.
52. Estrada Pereira GA, Márquez Filiu M, Agüero Despaigne LA. Diagnóstico clínico de pacientes con estomatitis subprótesis portadores de aparatología protésica. *MEDISAN.* 2017;21:3180-7.
53. Díaz T. Prevalencia de lesiones orales en pacientes portadores de prótesis removibles, no asociadas a patologías sistémicas. Chile: Universidad Andrés Bello; 2011
54. Dorko E, Jenca A, Pilipcinec E, Danko J, Svicky E, Tkacikova L. *Candida*-associated denture stomatitis. *Folia Microbiol (Praha).* 2001;46(5):443-6.
55. Dervis E. Clinical assessment of common patient complaints with complete dentures. *Eur J Prosthodont Restor Dent.* 2002;10(3):113-7.

56. Kantardjiev TV, Popova EV. Anti-Candida antibodies in serum and saliva of patients with denture stomatitis. *Folia Med (Plovdiv)*. 2002;44(4):39-44.
57. Emami E, Taraf H, de Grandmont P, Gauthier G, de Koninck L, Lamarche C, et al. The association of denture stomatitis and partial removable dental prostheses: a systematic review. *Int J Prosthodont*. 2012;25(2):113-9.
58. Khasawneh S, al-Wahadni A. Control of denture plaque and mucosal inflammation in denture wearers. *J Ir Dent Assoc*. 2002;48(4):132-8.
59. Fenlon MR, Sherriff M, Walter JD. Factors associated with the presence of denture related stomatitis in complete denture wearers: a preliminary investigation. *Eur J Prosthodont Restor Dent*. 1998;6(4):145-7.
60. Radford DR, Challacombe SJ, Walter JD. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials in vivo and in vitro. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10(1):99-116.
61. Sousa FA, Paradella TC, Koga-Ito CY, Jorge AO. Effect of sodium bicarbonate on *Candida albicans* adherence to thermally activated acrylic resin. *Braz Oral Res*. 2009;23(4):381-5.
62. Wilson J. The aetiology, diagnosis and management of denture stomatitis. *Br Dent J*. 1998;185(8):380-4.
63. Sapp J, Eversole L, Wysocki G. Elsevier, editor. Barcelona: Elsevier España, S. L. 2005.
64. Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. *Aust Dent J*. 1998;43(1):45-50.
65. A. S. F. C. Odds, *Candida* and Candidosis, A Review and Bibliography (Second Edition). X + 468 S., 97 Abb., 92 Tab. u. 22 Farbtafeln. London—Philadelphia—Toronto—Sydney—Tokyo 1988. Baillière Tindall (W. B. Saunders). £ 35.00. ISBN: 0-7020-1265-3. *Journal of Basic Microbiology*. 1990;30(5):382-3.
66. Thomas CJ, Nutt GM. The in vitro fungicidal properties of Visco-gel, alone and combined with nystatin and amphotericin B. *J Oral Rehabil*. 1978;5(2):167-72.
67. Abu-el Teen K, Ghannum M, Stretton RJ. Effects of sub-inhibitory concentrations of antifungal agents on adherence of *Candida* spp. to buccal epithelial cells in vitro. *Mycoses*. 1989;32(11):551-62.
68. Epstein JB. Oral and pharyngeal candidiasis. Topical agents for management and prevention. *Postgrad Med*. 1989;85(5):257-8, 63-5, 68-9.
69. Salim N, Moore C, Silikas N, Satterthwaite JD, Rautemaa R. Fungicidal amounts of antifungals are released from impregnated denture lining material for up to 28 days. *J Dent*. 2012;40(6):506-12.
70. Ayuso-Montero R, Torrent-Collado J, López-López J. Estomatitis protésica: puesta al día. *RCOE*. 2004;9:645-52.
71. Barata D, Durán A, Carillo S. Estomatitis Protésica. Aspectos clínicos y tratamiento 2002; Vol. 5, Núm. 10:[622-7 pp.]
72. Koeck B. Prótesis completas. 4ta edición ed: München, Urban & Fischer; 2007.
73. Carvallo P, Ollino A. Comparación in vitro de la eficacia de la clorhexidina 0,12%, pastillas efervescentes corega tabs e hipoclorito de sodio 2% sobre la reducción de *Candida albicans* en prótesis removibles acrílicas: Universidad de Valparaíso; 2013.

74. Peracini A. Soluções higienizadoras de prótese total: avaliação da remoção de biofilme e efeito sobre propriedades da resina acrílica termopolimerizável: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2012.
75. Radnai M, Kertesz A, Fazekas A. [Hygienic considerations of fixed bridges]. *Fogorv Sz.* 1994;87(5):131-6.
76. Jagger DC, Harrison A. Denture cleansing--the best approach. *Br Dent J.* 1995;178(11):413-7.
77. K. M, K. V, M. L. The effect of prosthesis disinfection on salivary microbial levels. *Journal of Oral Rehabilitation.* 1998;25(4):304-10.
78. Remington A. *Farmacía.* 20º ed: Editorial médica panamericana; 2003. p. 432; 1797; 857;.
79. *Vademecum Odontológico.* S.A Me, editor2011-2012.
80. Soares I, Goldberg F. *Endodoncia técnica y fundamentos*2002.
81. Flórez J. *Farmacología Humana.* Quinta edición ed2008.
82. Hedgecock L. *Antimicrobia agents: Henry Kimpton;* 1967.
83. Cole A. *Biochemistry and Oral Biology.* 2º ed1988.
84. 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.
85. Tripathi K. *Farmacología en odontología fundamentos.* 1º ed2005.
86. WBMS, Oficina Mundial de estadística del metal 2008.
87. Goldstein S, Czapski G. Transition metal ions and oxygen radicals. *Int Rev Exp Pathol.* 1990;31:133-64.
88. Boal AK, Rosenzweig AC. Structural biology of copper trafficking. *Chem Rev.* 2009;109(10):4760-79.
89. Nevitt T, Ohrvik H, Thiele DJ. Charting the travels of copper in eukaryotes from yeast to mammals. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1823(9):1580-93.
90. Grass G, Rensing C, Solioz M. Metallic copper as an antimicrobial surface. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(5):1541-7.
91. Prado JV, Vidal AR, Duran TC. [Application of copper bactericidal properties in medical practice]. *Rev Med Chil.* 2012;140(10):1325-32.
92. Dupont CL, Grass G, Rensing C. Copper toxicity and the origin of bacterial resistance--new insights and applications. *Metallomics.* 2011;3(11):1109-18.
93. IPCS CIdEd. Fichas Internacionales de Seguridad Química, SULFATO DE COBRE (Anhidro) In: Ministerio de trabajo y asuntos sociales e, editor. 2003.
94. *Diccionario de ciencias oxford-complutense* 2000. 218 p.
95. Jourdan A. *Farmacopea universal* 1829.
96. Wurtz A. *Lecciones elementales de química moderna*1873.
97. Borkow G, Lara HH, Covington CY, Nyamathi A, Gabbay J. Deactivation of human immunodeficiency virus type 1 in medium by copper oxide-containing filters. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(2):518-25.
98. *ambiental Sds. Riesgo químico-accidentes graves* In: Dirección general de salud pública cds, región de Murcia . editor. 2008.
99. SA O. *Hoja de Seguridad Productos OPPAC Sulfato de cobre.* 10 ed: OPPAC SA; 2013.
100. Prat S. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar. In: Instituto ISP M, editor.

101. Araya IP, Soledad. Ramírez, Verónica. Recomendaciones para el control de calidad en bacteriología: Estudio de susceptibilidad antimicrobiana mediante difusión por disco. In: MINSAL. IdSP, editor. 2015. p. 3.
102. Alastruey-Izquierdo A. Susceptibility test for fungi: clinical and laboratorial correlations In 2015;57(Suppl 19):57-64.
103. John HR, Barbara DA, David A, Beth AS, Steven DB, Vishnu C. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi, approved standard. Second edition. M38-A22002. 1-35 p.
104. Arian S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. Med Mycol. 2007;45(7):569-87.
105. Arendrup M, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope W. EUCAST antifungal MIC method for yeasts 2017.
106. Ferreira MA, Pereira-Cenci T, Rodrigues de Vasconcelos LM, Rodrigues-Garcia RC, Del Bel Cury AA. Efficacy of denture cleansers on denture liners contaminated with *Candida* species. Clin Oral Investig. 2009;13(2):237-42.
107. Ucar A. Acción de agentes químicos en la eliminación de *Cándida albicans* sobre Prótesis Dentales. . Acta Odontológica Venezolana. 2007.
108. Rudd RW, Senia ES, McCleskey FK, Adams ED, Jr. Sterilization of complete dentures with sodium hypochlorite. J Prosthet Dent. 1984;51(3):318-21.
109. Falah-Tafti A, Jafari AA, Lotfi-Kamran MH, Fallahzadeh H, Hayan RS. A Comparison of the efficacy of Nystatin and Fluconazole Incorporated into Tissue Conditioner on the In Vitro Attachment and Colonization of *Candida Albicans*. Dent Res J (Isfahan). 7. India 2010. p. 18-22.
110. Bueno MG, Urban VM, Barberio GS, da Silva WJ, Porto VC, Pinto L, et al. Effect of antimicrobial agents incorporated into resilient denture relines on the *Candida albicans* biofilm. Oral Dis. 2015;21(1):57-65.
111. Franchitto N, Gandia-Mailly P, Georges B, Galinier A, Telmon N, Ducassé JL, et al. Acute copper sulphate poisoning: A case report and literature review. Resuscitation. 2008;78(1):92-6.
112. Bulcke F, Dringen R, Scheiber IF. Neurotoxicity of Copper. Adv Neurobiol. 2017;18:313-43.
113. Ayala J, Fernández B. Synthesis of Commercial Products from Cooper Wire-Drawing Waste. The Journal of The Minerals, Metals & Materials Society (TMS) 2014:1099–105
114. Justel FJ, Claros M, Taboada ME. Solubilities and physical properties of saturated solutions in the copper sulfate + sulfuric acid + seawater system at different temperatures. Brazilian Journal of Chemical Engineering. 2015;32:629-35.

ANEXO 1:

**SOLICITUD DE CERTIFICADO DE BIOSEGURIDAD
PARA PROYECTOS DE INVESTIGACION**

**(PREVIO AL LLENADO DE ESTE FORMULARIO, LEA LAS INSTRUCCIONES EN
PAGINAS ANTERIORES)**

PRIMERA SECCION: ANTECEDENTES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.

1. **TÍTULO:**

Eficacia de un desinfectante a base de cobre y su comparación con clorhexidina, nistatina e hipoclorito en la reducción de colonias de <i>Candida albicans</i> en resinas acrílicas de termocurado. Estudio <i>in vitro</i> .

2. **FONDO E INSTITUCION**

--

(Señale nombre del concurso e institución a la que postula. En lo posible, trate de no utilizar siglas o acrónimos).

3. **INVESTIGADOR RESPONSABLE: Indicar unidad académica y datos de contacto (al menos email).**

Nombre: Wilfredo González Arriagada. Departamento de investigación, facultad de odontología, Universidad de Valparaíso Teléfono: +56950925788 Correo electrónico: wilfredo.gonzalez@uv.cl
--

4. **INVESTIGADOR ALTERNO: Indicar unidad académica y datos de contacto.**

Nombre: Rodrigo Cruz Choappa Departamento de micología, facultad de medicina, universidad de Valparaíso Correo electrónico rodrigo.cruz@uv.cl
--

5. **COINVESTIGADORES: Indicar unidad académica y datos de contacto.**

--

(Señale nombre completo, correo electrónico, dirección y unidad académica de los investigadores responsables, alternos y co-investigadores según corresponda).

6. **DEPENDENCIA(S) DE LA
UNIVERSIDAD DE VALPARAISO
DONDE SE DESARROLLARA LA
INVESTIGACION**

Laboratorio del departamento de micología. Facultad de medicina de la Universidad de Valparaíso.

(Señale nombre del laboratorio, anexo correspondiente y unidad académica donde se realizará la investigación).

Uso interno del Comité

Código/numeración de solicitud	
Fecha de recepción solicitud	
Fecha emisión de Certificado	
Fecha de Seguimiento	

7. RESUMEN DEL PROYECTO.

Debe explicar el problema y plantear en forma explícita la hipótesis (si es que la hay) y objetivos. Señale brevemente materiales y métodos. Esta sección debe tener una extensión máxima de una página. Trate de no utilizar siglas o acrónimos o indique entre paréntesis el significado de ellos.

7.1 Planteamiento del problema e Hipótesis:

En Chile se estima que la población mayor de 60 años corresponde al 17% de la población nacional y se espera que para el año 2020 aumente aproximadamente al 21% [2]. Del total de la población mayor de 65 años, alrededor del 63.2% es portador de prótesis removible [2]. Estudios mencionan que dos tercios de los individuos que portan prótesis removibles pueden sufrir estomatitis subprótesis[6], la cual es una enfermedad de etiología multifactorial [18] y se describe como una proliferación fibroepitelial de la mucosa de paladar duro en contacto con prótesis dentales mucosoportadas, asociada al desajuste de la base acrílica o metálica, edad avanzada del usuario, prótesis de larga data, higiene oral deficiente y hábitos de uso de las prótesis[19], así como también se relaciona con infección bacteriana y fúngica(6), mayoritariamente cándida y con mayor prevalencia la especie cándida albicans[6].

Además, en las últimas décadas, Chile se ha consolidado como el mayor productor de cobre a nivel mundial[16,23], produciendo gran interés en su uso como material de autodesinfección en el área médica, ya que múltiples estudios han demostrado efectividad del cobre contra una serie de bacterias y hongos, entre ellas *Candida albicans* [3,7,8,9,11,12,13,14,15,16]. Por lo anterior, se ha convertido en un foco de atención para estudios recientes en el área de odontología sobre su posible uso como tratamiento en casos de estomatitis subprotésica [17], a través de la desinfección de prótesis removible acrílica.

Si bien existen una gran cantidad de estudios que explican el mecanismo de acción y efectividad del cobre contra *Candida albicans* [4,5,10] o la efectividad del mismo en conjunto con otros complejos[7,8,11,12,13,14,15], hay pocos estudios respecto a su empleo en la práctica odontológica. En el área de prótesis removible existen estudios recientes donde se comparan diferentes desinfectantes

versus el uso de partículas de cobre inmersos al interior de la estructura acrílica [17], pero existe poca evidencia del efecto del cobre como desinfectante en solución. Es por este motivo, que se propone comparar un agente desinfectante en base a cobre con similares características respecto a su presentación versus desinfectantes recomendados por el MINSAL[1,2].

Dentro de la revisión de la literatura, la mayor parte de los estudios encontrados analiza el efecto antifúngico del cobre sobre la *Candida albicans*. En éstos, el método más utilizado para medir la sensibilidad antimicrobiana se basa en el método de difusión por discos, en el que se mide la aparición del halo de inhibición, midiendo de esta forma la acción directa del cobre como antifúngico sobre *Candida albicans* [3,7,9,11], sin embargo, no se considera el ambiente natural en el que se encontraría, lo que es trascendental en la práctica clínica odontológica. Es por esto que, además de cambiar la presentación del desinfectante en base a cobre, se planteará una modificación para el estudio de sensibilidad, ya que se busca determinar la eficacia del efecto del desinfectante en el uso de prótesis removible, midiéndose sobre acrílico inoculado con *Candida albicans*, lo que sería un acercamiento más próximo a la realidad clínica actual.

Finalmente, el objetivo del estudio es evaluar la efectividad antimicótica in vitro de un desinfectante a base de cobre en placas de resinas acrílica en cultivos de *Candida albicans*. Donde, como hipótesis nula se plantea no hay diferencia significativa en cuanto a la eficacia antimicótica de los desinfectantes a base de cobre con nistatina, clorhexidina e hipoclorito de sodio frente a *Candida albicans* inoculada sobre acrílico de termocurado.

1. Ministerio de salud. (2010). Guía clínica de salud oral integral para adultos de 60 años.
2. Ministerio de salud. (2015). Guía clínica de salud oral integral para adultos de 60 años.
3. Calderón, M. (2014). Eficacia de diferentes agentes desinfectantes en la remoción de *Candida albicans*, *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* adheridos a resina acrílica de termocurado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
4. Hauser, N. C., Dukalska, M., Fellenberg, K., & Rupp, S. (2009). From experimental setup to data analysis in transcriptomics: copper metabolism in the human pathogen *Candida albicans*. *Journal of biophotonics*, 2(4), 262-268.
5. Cheng, X., Xu, N., Yu, Q., Ding, X., Qian, K., Zhao, Q., ... & Li, M. (2013). Novel insight into the expression and function of the multicopper oxidases in *Candida albicans*. *Microbiology*, 159(6), 1044-1055.
6. Gendreau, L., & Loewy, Z. G. (2011). Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *Journal of Prosthodontics*, 20(4), 251-260.
7. Amiri, M., Etemadifar, Z., Daneshkazemi, A., & Nateghi, M. (2017). Antimicrobial Effect of Copper Oxide Nanoparticles on Some Oral Bacteria and *Candida* Species. *Journal of Dental Biomaterials*, 4(1), 347.
8. Rahimi, G., Khodavandi, A., & Yaghobi, R. (2016). Antimycotic Effect of Copper Oxide Nanoparticles on *Candida albicans* Biofilm. *Micro & Nano Biomedicine*, 1(1), 7-12.
9. Mudiari, R., Bhagawat, A., & Kelkar, V. (2016). Efficacy of Copper Charged Water against *Candida albicans*. *Food Processing & Technology*.
10. Quaranta, D., Krans, T., Santo, C. E., Elowsky, C. G., Domaille, D. W., Chang, C. J., & Grass, G. (2011). Mechanisms of contact-mediated killing of yeast cells on dry metallic copper surfaces. *Applied and environmental microbiology*, 77(2), 416-426.
11. Raman, N., Joseph, J., Velan, A., & Pothiraj, C. (2006). Antifungal activities of biorelevant complexes of copper (II) with biosensitive macrocyclic ligands. *Mycobiology*, 34(4), 214-218.
12. Yoğurtçu, B. M., Demirci, S., Doğan, A., Asutay, A. B., & Şahin, F. (2017). Anticandidal activity of hetero-dinuclear copper (II) Mn (II) Schiff base and its potential action of the mechanism. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11), 202.
13. Anand, J., & Rai, N. (2017). Anticandidal synergistic activity of green tea catechins, antimycotics and copper sulphate as a mean of combinational drug therapy against candidiasis. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*, 27(1), 33-45.
14. Hoffman, A. E., Miles, L., Greenfield, T. J., Shoen, C., DeStefano, M., Cynamon, M., & Doyle, R. P. (2015). Clinical isolates of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and *Candida krusei* have different susceptibilities to Co (II) and Cu (II) complexes of 1, 10-phenanthroline. *Biometals*, 28(2), 415-423.
15. Chudzik, B., Tracz, I. B., Czernel, G., Fiołka, M. J., Borsuk, G., & Gagoś, M. (2013). Amphotericin B-copper (II) complex as a potential agent with higher antifungal activity against *Candida albicans*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(5), 850-857.
16. Prado, J. V., Vidal, A. R., & Durán, T. C. (2012). Application of copper bactericidal properties in medical practice. *Revista medica de Chile*, 140(10), 1325-1332.
17. Correa Hernández, S. A. (2012). Preparación de resinas acrílicas cargadas con nanopartículas de cobre y sus propiedades antimicrobianas frente a *Candida albicans*.
18. Lazarde, J. (2001). Estomatitis subprotésica. *Acta odontol. venez*, 39(3), 9-17.
19. Carreira Piloto, V. and Almagro Urrutia, Z. (2000). La estomatitis subprótesis en pacientes desdentados totales. *Revista Cubana de Estomatología*, [online] 37(3), pp.133-139.

Pregunta de investigación: ¿Existe diferencia en la efectividad antimicótica frente a *Candida albicans* en cuerpos de muestra de acrílico de termocurado, de un desinfectante experimental en base a cobre, en comparación a nistatina, hipoclorito de sodio y clorhexidina?

Finalmente, el objetivo del estudio es evaluar la efectividad antimicótica *in vitro* de un desinfectante a base de cobre en placas de resinas acrílica en cultivos de *Candida albicans*.

Hipótesis: Los desinfectantes en base a cobre presentan igual efectividad antimicótica en comparación con nistatina, clorhexidina e hipoclorito de sodio frente a *Candida albicans*

7.2 Objetivos

Objetivo general: Evaluar efectividad antimicótica *in vitro* de un desinfectante a base de cobre en placas de resinas acrílicas en cultivos de *Candida albicans*.

Objetivos específicos:

- Comparar la disminución de unidades formadoras de colonias *in vitro* de un desinfectante experimental a base de cobre (10mg/ml) con nistatina 100.000 UI
- Comparar la disminución de unidades formadoras de colonias *in vitro* de un desinfectante experimental de cobre (10mg/ml) con hipoclorito de sodio 0.5%
- Comparar la disminución de unidades formadoras de colonias *in vitro* de un desinfectante experimental a base de cobre (10mg/ml) con clorhexidina 0.12%

7.3 Materiales y métodos

Diseño:

Estudio de tipo experimental analítico, *in vitro*.

Muestra:

Candida albicans cultivadas (caldo cerebro corazón) en el laboratorio de micología de la facultad de medicina universidad de Valparaíso.

Selección de muestra:

Para la determinación del tamaño muestral nos basaremos en el método de tripleta, utilizado por diversos estudios de investigación.

Este consiste en utilizar el menor número impar posible, en este caso 3, para que, en el caso de alguna diferencia, el tercero en discordia defina el resultado. Con el fin de obtener mayor certeza, decidimos triplicar el tamaño muestral de modo que utilizaremos 3 preparaciones para cada desinfectante y este valor será triplicado para obtener una muestra más representativa

Procedimientos:

Se confeccionarán en un laboratorio externo 48 piezas de resina acrílica de termocurado a partir de una plancha de 2mm de grosor que se seccionará en cuadrados de 10X10mm. Los investigadores, bajo la supervisión del docente Rodrigo Cruz, manipularán las muestras que serán esterilizadas a 121 °C por 15 minutos y luego sumergidas en suero fisiológico.

Tres cuerpos de muestras serán retirados del suero y se distribuirán para la comprobación de la inoculación de acrílico de termocurado con *Candida albicans* y se utilizará el conteo de número de unidades formadoras de colonias, en la unidad contadora de colonias Quebec. La identificación de la cepa *Candida albicans* será confirmada por medio de tinción gram, prueba del túbulo germinativo y morfología de las colonias en placas de agar.

Una vez comprobada la inoculación en el acrílico de termocurado, todas las piezas (45 muestras) serán sumergidas en un medio de cultivo caldo cerebro-corazón, que contendrá la cepa *Candida albicans* y se cultivará a 37° por 72 horas. Nueve muestras serán utilizadas para el control negativo (inmersión en suero fisiológico) y las 36 restantes para cada desinfectante (9 para NaClO 0,5 %, 9 para clorhexidina 0,12 %, 9 para desinfectante de cobre 10mg/ml y 9 para nistatina 100.000UI). Para la desinfección se sumergirán las muestras durante 6 horas en recipientes de 200 ml con cada uno de los agentes desinfectantes previamente mencionados.

Las muestras serán enjugadas con 1 ml de suero fisiológico y serán transferidas a tubos individuales con caldo cerebro corazón, se incubarán durante 72 horas a 37°C, y se agitarán durante 60 segundos en un agitador Vortex.

Se tomará una muestra de 1ml de caldo proveniente de los tubos de cada suspensión y serán cultivadas en placas de agar Sabouraud, e incubadas durante 72 horas a 37°C. Transcurridas las 72 horas de incubación, se procederá al conteo del número de colonias en UFC de cada cápsula Petri, en la unidad contadora de colonias Quebec.

Todos los procedimientos serán documentados a través de un registro fotográfico con una cámara Canon PowerShot G15 12 Megapíxeles, sobre un trípode fijo a 20 cm de las placas de cultivo y con un fondo oscuro para evitar la reflexión de la luz.

SEGUNDA SECCION: VALORACION DE ASPECTOS DE BIOSEGURIDAD

1.	En esta investigación se utilizarán cultivos de microorganismos patógenos y/o no patógenos. VER EN MANUAL CONICYT NIVEL DE BIOSEGURIDAD DE VIRUS Y VECTORES VIRALES PÁG. 37-43; BACTERIAS Y HONGOS PÁG. 104-107; FITOPATÓGENOS PÁG. 108-115.	SI X	NO
1a.	<p><i>Si su respuesta es SI, indique el nombre de cada microorganismo y su nivel de bioseguridad según Manual de CONICYT.</i></p> <p>Hongo patógeno de interés en Chile, Cándida, nivel de BS-2</p>		
1b.	<p><i>Si su respuesta es SI, describa los procedimientos que utilizará para manejarlos y desecharlos.</i></p> <p>Para su manejo se utilizará protección del operador durante todo el proceso, tanto en la manipulación de las muestras, como en la experimentación, los operadores harán lavado las manos, uso de guantes, lentes de protección u ópticos y mascarillas. Además, se utilizará pinzas anatómicas, placas Petri, tubos de ensayo y pipetas estériles.</p> <p>Para su desecho todo resto de muestra experimental (residuo biológico), serán dispuestos en una bolsa plástica del contenedor de desechos, ubicada en el área de trabajo. Esta bolsa será retirada del contenedor, se cerrará y se eliminará en un contenedor amarillo rotulado "Residuos Biológicos". Todas las muestras, ya terminada la fase experimental, serán eliminadas en estos mismos contenedores amarillos de residuos biológicos.</p>		

1c.	<p><i>Si su respuesta es SI, describa los procedimientos para manejar, desechar o reutilizar el material empleado en los cultivos</i></p> <p>Para su manejo se utilizará protección del operador durante todo el proceso, los operadores harán lavado las manos, uso de guantes, lentes de protección u ópticos y mascarillas.</p> <p>Para la reutilización de instrumental se procederá a la desinfección mediante la utilización de detergente enzimático agregando 5 cc, por litro de agua. Se colocará el material totalmente sumergido en la solución, dejando en reposo de 15 minutos y utilizando cepillo de cerdas suaves para retirar restos de suciedad que puedan quedar en el material. Se procederá a enjuagar con agua potable, secar y su posterior esterilización.</p>		
1d.	<p><i>Si su respuesta es SI, describa la infraestructura y los equipos de protección personal que se utilizarán durante este procedimiento.</i></p> <p>Para su manejo se utilizará protección del operador, durante todo el proceso, tanto la manipulación de las muestras, como en la experimentación, los operadores harán lavado las manos, uso de guantes, lentes de protección u ópticos y mascarillas.</p>		
1e.	<p><i>Si su respuesta es SI, describa los procedimientos para manejar, desechar o reutilizar los elementos de protección personal contaminados.</i></p> <p>En caso del derrame y contaminación de los elementos de protección personal, se desechará en los contenedores de residuos biológicos. En caso de los lentes de protección se desinfectarán con detergente enzimático agregando 5 cc, por litro de agua. Se colocará el material totalmente sumergido en la solución, dejando en reposo de 15 minutos y utilizando cepillo de cerdas suaves para retirar restos de suciedad que puedan quedar en el material. Se procederá a enjuagar con agua potable y secar.</p>		
2.	<p>En esta investigación se realizará manipulación genética de microorganismos. VER EN MANUAL CONICYT NIVEL DE BIOSEGURIDAD DE VIRUS Y VECTORES VIRALES PÁG. 37-43; BACTERIAS Y HONGOS PÁG. 104-107; FITOPATÓGENOS PÁG. 108-115.</p>	SI	NO X
2a.	<p><i>Si su respuesta es SI, indique el nombre de cada microorganismo y su nivel de bioseguridad según Manual de CONICYT.</i></p>		
2b.	<p><i>Si su respuesta es SI, describa los procedimientos que utilizará para manejarlos y desecharlos</i></p>		
2c.	<p><i>Si su respuesta es SI, describa los procedimientos para manejar, desechar o reutilizar el material empleado en la manipulación genética.</i></p>		
2d.	<p><i>Si su respuesta es SI, describa la infraestructura y los equipos de protección personal que se utilizarán durante el procedimiento.</i></p>		
2e.	<p><i>Si su respuesta es SI, describa los procedimientos para manejar, desechar o reutilizar los elementos de protección personal contaminados.</i></p>		
3.	<p>En esta investigación se utilizarán cultivos celulares.</p>	SI X	NO
3a.	<p><i>Si su respuesta es SI, indique tipo y origen de las líneas celulares utilizadas.</i></p>		

	Familia Sacaromicetos , género Candida, especie Candida Albicans		
3b.	<p><i>Si su respuesta es SI, describa los procedimientos que utilizará para manejarlos y desecharlos (medios de cultivo, líneas celulares, etc).</i></p> <p>Para su manejo se utilizará protección del operador durante todo el proceso, los operadores harán lavado las manos, uso de guantes, lentes de protección u ópticos y mascarillas. Además, se utilizará pinzas anatómicas, placas Petri, tubos de ensayo y pipetas estériles.</p> <p>Para su desecho, todo resto de muestra experimental (residuo biológico), serán dispuestos en una bolsa plástica del contenedor de desechos, ubicada en el área de trabajo. Esta bolsa será retirada del contenedor, se cerrará y se eliminará en un contenedor amarillo rotulado "Residuos Biológicos". Todas las muestras, ya terminada la fase experimental, serán eliminadas en estos mismos contenedores amarillos de residuos biológicos.</p>		
3c.	<p><i>Si su respuesta es SI, describa los procedimientos para manejar, desechar o reutilizar el material empleado en los cultivos.</i></p> <p>Para su manejo se utilizará protección del operador durante todo el proceso, los operadores harán lavado las manos, uso de guantes, lentes de protección u ópticos y mascarillas.</p> <p>Para la reutilización de instrumental se procederá a la desinfección mediante la utilización de detergente enzimático agregando 5 cc, por litro de agua. Se colocará el material totalmente sumergido en la solución, dejando en reposo de 15 minutos y utilizando cepillo de cerdas suaves para retirar restos de suciedad que puedan quedar en el material. Se procederá a enjuagar con agua potable, secar y su posterior esterilización.</p>		
3d.	<p><i>Si su respuesta es SI, describa la infraestructura y los equipos de protección personal que se utilizarán durante el procedimiento.</i></p> <p>Para su manejo se utilizará protección del operador durante todo el proceso, tanto en la manipulación de las muestras, como en la experimentación, los operadores harán lavado las manos, uso de guantes, lentes de protección u ópticos y mascarillas.</p>		
3e.	<p><i>Si su respuesta es SI, describa los procedimientos para manejar, desechar o reutilizar los elementos de protección personal contaminados.</i></p> <p>En caso del derrame y contaminación de los elementos de protección personal posteriormente será desechado en los contenedores de residuos biológicos. En caso de los lentes de protección se desinfectarán con detergente enzimático agregando 5 cc, por litro de agua. Se colocará el material totalmente sumergido en la solución, dejando en reposo de 15 minutos y utilizando cepillo de cerdas suaves para retirar restos de suciedad que puedan quedar en el material. Se procederá a enjuagar con agua potable y secar.</p>		
4.	En esta investigación se realizará manipulación genética de células u organismos.	SI	NO X
4a.	<i>Si su respuesta es SI, indique el procedimiento, tipo de células u organismos y vectores.</i>		
4b.	<i>Si su respuesta es SI, describa los procedimientos que utilizará para manejar y desechar medios de cultivo, células y organismos</i>		
4c.	<i>Si su respuesta es SI, describa los procedimientos para manejar, desechar o reutilizar el material empleado para la manipulación genética.</i>		

4d.	<i>Si su respuesta es SI, describa la infraestructura y los equipos de protección personal que se utilizarán durante el procedimiento.</i>		
4e.	<i>Si su respuesta es SI, describa los procedimientos para manejar, desechar o reutilizar los elementos de protección personal contaminados.</i>		
5.	En esta investigación se utilizarán medicamentos y otras sustancias químicas. Declare toda sustancia química a utilizar en cualquiera de las fases de la investigación.	SI X	NO
5a.	<p><i>Si su respuesta es SI, indique el nombre de cada sustancia química señalando su potencial riesgo según MANUAL CONICYT PAG 125-135. Señale para cada sustancia la concentración, volumen o masa total a utilizar.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ● Desinfectante a base de cobre 3Lt. No categorizado en manual CONICYT ● Clorhexidina 0.12% 3LT. No categorizado en manual CONICYT ● Nistatina 100.000 UI 3Lt. No categorizado en manual CONICYT ● hipoclorito 0.5% 3Lt. No categorizado en manual CONICYT 		
5b.	<p><i>Si su respuesta es SI, describa los procedimientos que utilizará para manejar y desechar los residuos químicos producidos.</i></p> <p>Para la manipulación de las sustancias, se utilizará guantes, mascarillas, lentes de protección, cubrepelo y delantal para proteger a los operadores de dichos elementos. Posterior al uso, la eliminación se efectuará desechando los elementos directamente al desagüe con los medidos de seguridad antes mencionados.</p>		
5c.	<p><i>Si su respuesta es SI, describa los procedimientos para manejar, desechar o reutilizar el material empleado con los medicamentos y/o sustancias químicas.</i></p> <p>Para la manipulación de las sustancias, se utilizará guantes, mascarillas, lentes de protección, cubrepelo y delantal para proteger a los operadores de dichos elementos.</p> <p>Para la reutilización de instrumental se procederá a la desinfección mediante la utilización de detergente enzimático agregando 5 cc, por litro de agua. Se colocará el material totalmente sumergido en la solución, dejando en reposo de 15 minutos y utilizando cepillo de cerdas suaves para retirar restos de suciedad que puedan quedar en el material. Se procederá a enjuagar con agua potable, secar y su posterior esterilización.</p>		
5d.	<p><i>Si su respuesta es SI, describa la infraestructura y los equipos de protección personal que se utilizarán durante el procedimiento.</i></p> <p>Para la manipulación de las sustancias, se utilizará guantes, mascarillas, lentes de protección, cubrepelo y delantal para proteger a los operadores de dichos elementos</p>		
5e.	<p><i>Si su respuesta es SI, describa los procedimientos para manejar, desechar o reutilizar los elementos de protección personal contaminados.</i></p> <p>Debido a que los productos anteriormente mencionados de seguridad no se contaminarán con elementos biológicos, pueden ser desechados a la basura común.</p> <p>En caso del derrame y contaminación de los elementos de protección personal serán desechados en un contenedor de residuos biológicos. En caso de los lentes de protección se desinfectarán con detergente enzimático agregando 5 cc, por litro de agua. Se colocará el material totalmente sumergido en la solución, dejando en reposo de 15 minutos y utilizando cepillo de cerdas suaves para retirar restos de suciedad que puedan quedar en el material. Se procederá a enjuagar con agua potable y secar.</p>		

6.	En esta investigación se utilizará material radioactivo.	SI	NO X
6a.	<i>Si su respuesta es SI, indique el nombre de cada material radioactivo señalando su potencial riesgo según MANUAL CONICYT PAG 116.</i>		
6b.	<i>Si su respuesta es SI, describa los procedimientos que utilizará para manejar y desechar los residuos radiactivos producidos.</i>		
6c.	<i>Si su respuesta es SI, describa los procedimientos para manejar, desechar o reutilizar el material contaminado con radiactividad.</i>		
6d.	<i>Si su respuesta es SI, describa la infraestructura y los equipos de protección personal que se utilizarán durante el procedimiento.</i>		
6e.	<i>Si su respuesta es SI, describa los procedimientos para manejar, desechar o reutilizar los elementos de protección personal contaminados.</i>		
7.	En esta investigación se utilizará material cortopunzante o material de vidrio que pueda generar riesgo.	SI X	NO
7a.	<i>Si utilizará material cortopunzante: describa los procedimientos que utilizará para manejar y desechar el material utilizado y/o generado.</i> No se utilizarán materiales cortopunzantes.		
7b.	<i>Si utilizará material de vidrio: describa los procedimientos que utilizará para manejar y desechar el material quebrado.</i> En caso de existir ruptura de elementos de vidrio como placas Petri o tubos ensayo, se recolectarán los fragmentos con guantes de protección y pinzas y posteriormente serán depositados en contenedores de desechos cortopunzantes.		
8.	En esta investigación se utilizarán y/o generarán desechos biológicos (muestras de tejidos y/o fluidos biológicos humanos, de animales de experimentación u otros organismos).	SI X	NO
8a.	<i>Si su respuesta es SI, indique tipo de muestras utilizadas o desechos generados.</i> Se utilizarán cultivos de colonias de <i>Candida albicans</i> y medios de cultivo cerebro-corazón facilitados por departamento de micología de facultad de medicina, Universidad de Valparaíso.		
8b.	<i>Si su respuesta es SI, describa los procedimientos que utilizará para manejar y desechar los residuos biológicos generados.</i> Residuos biológicos - Todo resto de nuestra muestra experimental, serán dispuestos en una bolsa plástica del tacho de desechos, ubicada en nuestra área de trabajo. Esta bolsa se retira del tacho, se cierra y se eliminará en un contenedor amarillo rotulado "Residuos Biológicos" - Todas las muestras, ya terminada la fase experimental de nuestra tesis, serán eliminadas en estos mismos contenedores amarillos de residuos biológicos.		

8c.	<p><i>Si su respuesta es SI, describa los procedimientos para manejar, desechar o reutilizar el material contaminado con residuos biológicos.</i></p> <p>Manejo de muestras: Se utilizarán 45 muestras de acrílico de termocurado las cuales estarán previamente esterilizadas, para evitar la posible contaminación con otros microorganismos.</p> <p>Protección del operador: Durante todo el proceso y manipulación de las muestras, como en la experimentación, los operadores harán lavado las manos, uso de guantes, lentes de protección u ópticos y mascarillas.</p> <p>Manejo de área de trabajo: El área de trabajo que se ocupará para la manipulación de las muestras será el mesón de laboratorio del departamento de micología de la facultad de medicina de la Universidad de Valparaíso.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Se realizará la desinfección, tanto antes como después del procedimiento a toda la superficie del área de trabajo con alcohol al 70%. - Se dispondrá de una barrera física sobre la superficie, lo cual será una servilleta clínica, sobre la cual que se trabajará en todo momento - Estará delimitada un área sucia, donde se encontrará un basurero, para desperdicios biológicos. <p>Manejo de desechos</p> <p>Materiales dentales y protección: Todo desecho que se produzca durante la fase experimental de dicha tesis, ya sea guantes, servilletas, mascarillas, etc. Será eliminado en el basurero asimilables a desechos domiciliarios.</p> <p>Residuos biológicos</p> <ul style="list-style-type: none"> - Todo resto de nuestra muestra experimental, serán dispuestos en una bolsa plástica del tacho de desechos, ubicada en nuestra área de trabajo. Esta bolsa se retira del tacho, se cierra y se eliminará en un contenedor amarillo rotulado “Residuos Biológicos” - Todas las muestras, ya terminada la fase experimental de nuestra tesis, serán eliminadas en estos mismos contenedores amarillos de residuos biológicos.
8d.	<p><i>Si su respuesta es SI, describa la infraestructura y los equipos de protección personal que se utilizarán durante el procedimiento</i></p> <p>Para la manipulación de los cultivos, se utilizará guantes, mascarillas, lentes de protección y delantal para proteger a los operadores de dichos elementos.</p> <p>Las muestras, una vez usadas, serán desechados en una bolsa plástica, que a su vez será depositada en un recipiente de desecho biológico ubicado en las dependencias del laboratorio de micología de la facultad de medicina de la Universidad de Valparaíso.</p>
8e.	<p><i>Si su respuesta es SI, describa los procedimientos para manejar, desechar o reutilizar los elementos de protección personal contaminados.</i></p> <p>Debido a que los productos anteriormente mencionados de seguridad no se contaminarán con elementos biológicos, pueden ser desechados a la basura común.</p> <p>En caso del derrame y contaminación de los elementos de protección personal será desechado en un contenedor de residuos biológicos. En caso de los lentes de protección se desinfectarán con detergente enzimático agregando 5 cc, por litro de agua. Se colocará el material totalmente sumergido en la solución,</p>

	dejando en reposo de 15 minutos y utilizando cepillo de cerdas suaves para retirar restos de suciedad que puedan quedar en el material. Se procederá a enjuagar con agua potable y secar.		
9.	Esta investigación utilizará dispositivos o equipos generadores de agentes físicos tales como temperaturas extremas, presiones extremas, ruido, radiaciones UV, IR, RX.	SI	NO X
9a	Si su respuesta es SI, indique tipo de dispositivos o agentes físicos.		
9b	<i>Si su respuesta es SI, describa las medidas preventivas y equipos de protección personal que utilizará para mitigar los riesgos asociados a estos agentes físicos.</i>		
10.	En esta investigación se contempla el traslado de muestras biológicas o químicas que forman parte de la investigación (no corresponde a residuos para desecho).	SI	NO X
10a	<i>Si su respuesta es SI, describa los medios de traslados y las precauciones que tomará para evitar derrames, pérdidas o fugas durante el transporte que puedan ser de riesgo para el investigador, la comunidad o el medio ambiente.</i>		
11.	Señale aquí cualquier antecedente adicional que sea de interés para la evaluación de bioseguridad.		

ANEXO 2: Carta de Bioseguridad Aprobación Proyecto de Tesis

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

Sr. Prof. Dr. Wilfredo González Arriagada Presente

De nuestra consideración:

Valparaíso, 28 de Marzo de 2018

Se realizó la evaluación de su Proyecto de Investigación titulado “**Eficacia de un desinfectante a base de cobre y su comparación con clorhexidina, nistatina e hipoclorito en la reducción de colonias de *Candida albicans* en resinas acrílicas de termocurado. Estudio in vitro**” no encontrándose reparos desde el punto de vista metodológico, bioético 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

ANEXO 3: Protocolo CMI

a) **Determinación de CMI.**

Preparación caldo RPMI 1640

Caldo RPMI 1640 con glutamina y sin bicarbonato de sodio tamponado en MOPS ajustado a pH +/- 7.01 y con 0.2% de glucosa.

RPMI 164010,40 g.

Tampón MOPS 34.53 g.

Agua destilada 1.000 ml

1. Disolver RPMI 1640 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 o 10N. Añadir agua destilada hasta completar 1 litro.
3. Filtrar estérilmente.
4. Mantener refrigerado hasta su uso (4-8 °C máximo por 6 meses)

Inóculo

1. Para *Candida albicans* se preparará en 5ml de suero fisiológico inoculado a una concentración 0,5 McFarland.
2. Se realizará una disolución 1:1000 con medio RPMI 1640, tomando desde la solución 0,5 McFarland 10 ul que serán depositados en un tubo de ensayo, donde se agregará también 10 ml de RPMI 1640.
3. Esta última disolución es la que se utilizará para inocular las placas.

Disoluciones desinfectante

1. Se preparará una solución madre a una concentración 10 veces superior a la concentración a estudiar del antifúngico, mediante una disolución con agua estéril.
2. A partir de la solución madre se realizará una serie de diluciones utilizando como diluyente RPMI 1640, según lo indicado en la tabla.
3. Al terminar las disoluciones todos los tubos contendrán 1 ml, excepto el tubo número 11 que tendrá 2ml, por lo que se descartará 1 ml de este último.

4. A continuación, se realizará una disolución 1:5, añadiendo a todos los tubos 4 ml de RPMI.

Tubo n	Concentración inicial µg/ml	Transferir ml	A un tubo con RPMI ml	Resultante µg/ml	Tubo	Concentración final placa
1	Solución madre	1	1		2	
2		0,5	0,5		3	
2		0,5	1,5		4	
4		0,5	0,5		5	
4		0,25	0,75		6	
4		0,25	1,75		7	
7		0,5	0,5		8	
7		0,25	0,75		9	
7		0,25	1,75		10	
10		1	1	Solución a evaluar	11	

Donde para preparar el tubo 1 se tomará 51,02 µl y se aforará hasta 2 ml de agua destilada.

Llenado de placas

1. Se añadirá a las placas 100 µl de disolución, tomando 10 µl de desinfectante desde el tubo número 2 a la columna 1 de la placa de pocillos, luego 10 µl de desinfectante desde el tubo 3 a la columna 2 y se seguirá el mismo proceso hasta la columna número 10.
2. Posteriormente a cada pocillo se le agregará 90 µl de RPMI 1640 inoculado con *Candida albicans* (preparado en el paso de inóculo). En consecuencia, las concentraciones de los pocillos serán diluidas ½.
3. Los pocillos de la columna 11 corresponderán al control de crecimiento, por lo que serán rellenos con 200 µl de RPMI 1640 inoculado con *Candida albicans*.
4. Los pocillos de la columna 12 corresponderán al control de esterilidad que fueron rellenos con 200 µl de RPMI (sin *Candida albicans*).

Determinación concentración mínima inhibitoria

Se realizará por determinación visual-análoga mediante una lupa estereoscópica Zeiss Stemi 2000-C a 40X, donde será seleccionado como CMI aquel pocillo a la concentración más baja que no evidencie crecimiento fúngico. Esta concentración será sometida a prueba en la fase experimental.

ANEXO 4: Protocolo fase preexperimental

a. Prueba de inoculación

Objetivo de la etapa: Comprobar adherencia de *Candida albicans* en muestras de acrílico de termocurado.

1. 3 cuerpos de muestra de acrílico de termocurado 15x15x2mm serán sumergidos en 30ml de caldo Sabouraud con cepa de *Candida albicans* (ATC 90028) a concentración 1 MacFarland.
2. Se incubarán los 3 cuerpos de muestra de acrílico de termocurado por 72 horas a 37°C en estufa de cultivo Memmert IN110.
3. Se enjuagarán los 3 cuerpos de muestra de acrílico de termocurado de forma simultánea con 100ml de suero fisiológico 0.9% durante 30 segundos.
4. Se llevará cada cuerpo de muestra de acrílico de termocurado a un tubo de ensayo individual con suero fisiológico 0.9% y se procederá a la agitación con el Vortex Dragonlab MX-F por 60 segundos.
5. Se procederá a tomar una muestra de 1ml de cada tubo, se depositará en placas de cultivo y se homogenizará, posteriormente se cultivará con caldo Sabouraud a 37°C por 72 horas en estufa de cultivo Memmert IN110.
6. Posteriormente se determinará la presencia de unidades formadoras de colonias, mediante estudio de la morfología de las colonias en placas Petri.

b. Estudio piloto.

Objetivo de la etapa: probar el protocolo de investigación e identificar la variable concentración del sulfato de cobre.

1. 15 cuerpos de muestra de acrílico de termocurado 15x15x2mm serán sumergidos en caldo Sabouraud con cepa de *Candida albicans* a concentración 1 MacFarland.
2. Se incubarán los cuerpos de muestra de acrílico de termocurado por 72 horas a 37°C en una estufa de cultivo Memmert IN110.
3. Se enjuagarán los 15 cuerpos de muestra de acrílico de termocurado en grupos de 3 muestras con 100ml de suero fisiológico NaCl 0.9% durante 30 segundos.
4. Se dividirán las muestras en 5 grupos, según cada desinfectante y el control negativo.
 - a. 3 muestras con suero fisiológico 0.9% (control negativo)
 - b. 3 muestras con Hipoclorito de Sodio 0.5%

- c. 3 muestras con Clorhexidina 0.12%
 - d. 3 muestras con Nistatina 100000 UI
 - e. 3 muestras con desinfectante a base de cobre a concentración determinada según indicación del fabricante.
5. Se llevará cada muestra a un tubo de ensayo individual que contenga 15 ml de desinfectante, por 6 horas.
6. Las muestras serán enjuagadas luego de transcurridas las 6 horas, con 15 ml de suero fisiológico 0.9% durante 30 segundos.
7. Se llevará cada muestra a un tubo de ensayo individual con 15 ml de suero fisiológico 0.9% y se procederá a la agitación con el Vortex Dragonlab MX-F por 60 segundos
8. Se tomará una muestra de 1ml de cada tubo, se depositará en placas de cultivo y se homogenizará, posteriormente serán cultivadas a 37°C por 72 horas en estufa de cultivo Memmert IN110.
9. Se procederá al conteo de unidades formadoras de colonias en placas Petri mediante prueba de morfología de las colonias y el conteo en la unidad contadora de colonias tipo Quebec American Optical Darkfield Quebec 3330.
10. Comprobación y conteo de UFC:
Se realizará el conteo de unidades formadoras de colonias mediante prueba de morfología de las colonias, en unidad contadora de colonias tipo Quebec American Optical Darkfield Quebec 3330.
 - a. Prueba de morfología de las colonias: Se identificarán como colonias de *Candida albicans* aquellas colonias cremosas de color blanco amarillento, lustrosas, poco elevadas y de bordes bien definidos.
 - b. Uso de unidad contadora de colonias tipo Quebec: Se utilizará el contador de colonias American Optical Darkfield Quebec 3330 en el cual se colocarán cada una de las placas Petri en la plataforma del contador que contiene una rejilla milimetrada. Se iluminarán a través de un sistema de iluminación de campo oscuro y se observarán mediante de un lente amplificador de 1.5X. Se procederá al recuento de UFC mediante el conteo visual-análogo.
11. La unidad de medición será en número de unidades formadoras de colonias por ml.

b) Estudio experimental.

Objetivos de la etapa: Determinar si el agente desinfectante en base a cobre es eficaz sobre *Candida albicans* adherida al acrílico.

Determinar si el agente desinfectante en base a cobre tiene igual o mayor efectividad que los otros agentes a estudiar.

1. 54 cuerpos de muestra de acrílico de termocurado 15x15x2mm serán sumergidos en 100ml de caldo Sabouraud con cepa de *Candida albicans* a concentración de 1 MacFarland.
2. Se incubarán los cuerpos de muestra de acrílico de termocurado por 72 horas a 37°C en una estufa de cultivo Memmert IN110.
3. Se enjuagarán los cuerpos de muestra de acrílico de termocurado en grupos de 3 muestras con 100ml de suero fisiológico 0.9% durante 30 segundos.
4. Se dividirán las muestras en 6 grupos, según cada desinfectante y el control negativo.
 - a. 9 muestras con suero fisiológico 0.9% (control negativo)
 - b. 9 muestras con Hipoclorito de sodio 0.5%
 - c. 9 muestras con Clorhexidina 0.12%
 - d. 9 muestras con Nistatina 100.000 UI
 - e. 9 muestras con desinfectante sulfato 4.7µg/ml de cobre
 - f. 9 muestras con desinfectante sulfato de cobre 9.4µg/ml
5. Se llevará cada muestra a un tubo de ensayo individual que contenga 15 ml de desinfectante, por 6 horas.
6. Las muestras serán enjuagadas luego de transcurridas las 6 horas, en grupos de a 3 con 100ml de suero fisiológico 0.9% durante 30 segundos.
7. Se llevará cada muestra a un tubo de ensayo individual con 15 ml de suero fisiológico 0.9% y se procederá a la agitación con el Vortex Dragonlab MX-F por 60 segundos.
8. Se tomará una muestra de 1ml de cada tubo, se depositará en placas de cultivo y se homogenizará, posteriormente serán cultivadas a 37°C por 72 horas en estufa de cultivo Memmert IN110.
9. Se procederá al conteo de unidades formadoras de colonias en placas Petri mediante prueba de morfología de las colonias y el conteo en la unidad contadora de colonias tipo Quebec American Optical Darkfield Quebec 3330.
10. Comprobación y conteo de UFC:

Se realizará el conteo de unidades formadoras de colonias mediante prueba de morfología de las colonias, en unidad contadora de colonias tipo Quebec American Optical Darkfield Quebec 3330.

 - a. Prueba de morfología de las colonias: Se identificarán como colonias de *Candida albicans* aquellas colonias cremosas de color blanco amarillento, lustrosas, poco elevadas y de bordes bien definidos.
 - b. Uso de unidad contadora de colonias tipo Quebec: Se utilizará el contador de colonias American Optical Darkfield

Quebec 3330 en el cual se colocarán cada una de las placas Petri en la plataforma del contador que contiene una rejilla milimetrada. Se iluminarán a través de un sistema de iluminación de campo oscuro y se observarán mediante de un lente amplificador de 1.5X. Se procederá al recuento de UFC mediante el conteo visual-análogo.

11. La unidad de medición será en número de unidades formadoras de colonias por ml.

ANEXO 6: Medición de pH

1. Se realizará una medición de pH, utilizando un pH metro pH/ion Meter 450 marca Corning, de:
 - a. Suero fisiológico 0.9%
 - b. Clorhexidina 0.12%.
 - c. Nistatina 100000 UI
 - d. Hipoclorito de sodio 0.5%
 - e. Sulfato de cobre 4.7 µg/ml
 - f. Sulfato de cobre 9.4 µg/ml
 - g. Sulfato de cobre 11.8% (Alga Stop)
2. Se realizarán 3 medidas de cada producto sumergiendo la punta de medidor en el líquido.
3. Se calculará un promedio para determinar el pH final de cada uno.

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 dió 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 Pfaller y cols. [1], en la que se incluyen 603 candidiasis invasoras 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 moho 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

Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A)

con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) 0,164 M (ICN, Sigma), ajustado a pH 7±0,1 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 infusión endovenosa, comprobando que las CMI para las cepas control estén dentro del intervalo recomendado.

Antifúngicos solubles en agua (fluconazol, 5-fluorocitosina, 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 sí, para mayor seguridad, se quiere esterilizar, debe hacerse por filtración (mediante filtros 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-fluorocitosina, 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.

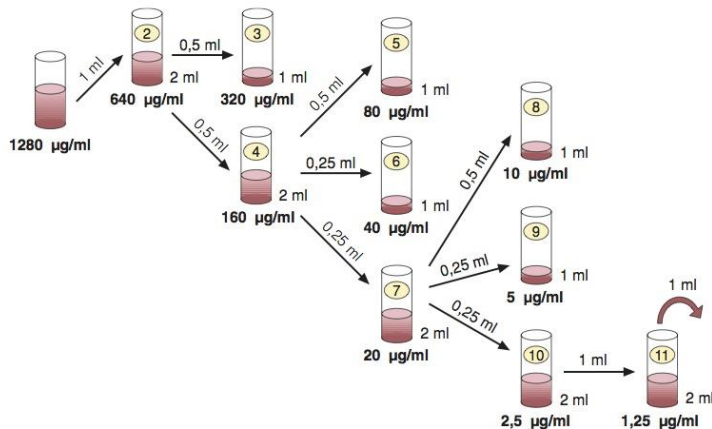


Figura 15a.1. Esquema para las diluciones de antifúngicos solubles en agua. Diluyente RPMI 1640.

Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A)

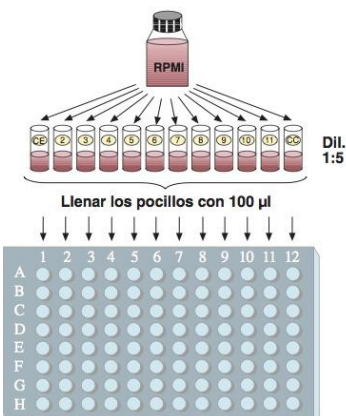
Antifúngicos insolubles en agua (anfotericina B, anidulafungina, itraconazol, ketoconazol, posaconazol, ravuconazol, voriconazol)

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 0,03 $\mu\text{g/ml}$. 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



Concentración final después de inocular: 64 - 0,12 $\mu\text{g/ml}$

Figura 15a.2. Segundo paso de las diluciones de antifúngicos solubles en agua (método de microdilución).

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

Tubo	Concentración	Transferir	A un tubo con	Concentración resultante	Tubo
nº 2	1600 $\mu\text{g/ml}$	0,5 ml	0,5 ml de DMSO	800 $\mu\text{g/ml}$	nº 3
nº 2	1600 $\mu\text{g/ml}$	0,25 ml	0,75 ml de DMSO	400 $\mu\text{g/ml}$	nº 4
nº 2	1600 $\mu\text{g/ml}$	0,25 ml	1,75 ml de DMSO	200 $\mu\text{g/ml}$	nº 5
nº 5	200 $\mu\text{g/ml}$	0,5 ml	0,5 ml de DMSO	100 $\mu\text{g/ml}$	nº 6
nº 5	200 $\mu\text{g/ml}$	0,25 ml	0,75 ml de DMSO	50 $\mu\text{g/ml}$	nº 7
nº 5	200 $\mu\text{g/ml}$	0,25 ml	1,75 ml de DMSO	25 $\mu\text{g/ml}$	nº 8
nº 8	25 $\mu\text{g/ml}$	0,5 ml	0,5 ml de DMSO	12,5 $\mu\text{g/ml}$	nº 9
nº 8	25 $\mu\text{g/ml}$	0,25 ml	0,75 ml de DMSO	6,25 $\mu\text{g/ml}$	nº 10
nº 8	25 $\mu\text{g/ml}$	0,25 ml	1,75 ml de DMSO	3,12 $\mu\text{g/ml}$	nº 11

Observar que...

- Al terminar las diluciones, todos los tubos contienen 1 ml excepto el nº11 que contiene 2 ml.
- En los tubos nº 2 al nº 11 la concentración del antifúngico es 100 veces superior a la concentración final deseada.
- Los tubos nº 2 al nº 11 están diluidos en DMSO.

15a.2.4. Llenado de las placas

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

- El contenido del tubo nº 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 nº 2 (2A - 2H).

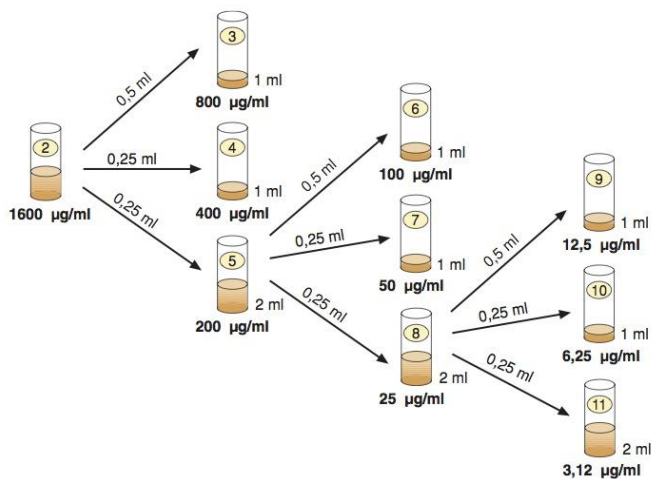


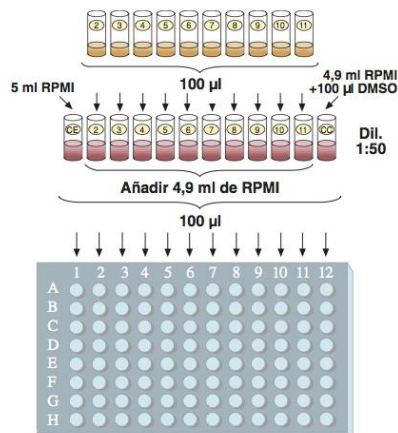
Figura 15a.3. Esquema para las diluciones de antifúngicos insolubles en agua. Diluyente dimetil sulfóxido (DMSO).

©2007 Revista Iberoamericana de Micología - ISSN: 978-84-611-8776-9

- 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 estaño, para evitar la evaporación, y se congelan a -70°C , o bien a -40°C .

¡Atención!

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



Concentración final después de inocular: 16-0,03 µg/ml

Figura 15a.4. Segundo paso de las diluciones de antifúngicos insolubles en agua (método de microdilución). Diluyente RPMI 1640.

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 pases 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 (ClNa 0,85%). 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 1×10^6 - 5×10^6 UFC/ml. Posteriormente se realiza una dilución 1:1000 con medio RPMI (concentración de 1×10^3 - 5×10^3). Esta última dilución es la que se utiliza para inocular las placas de antifúngico. La concentración final de levaduras en las placas será de $0,5 \times 10^3$ - $2,5 \times 10^3$. En la Figura 15a.5 se representan esquemáticamente todos estos pasos.

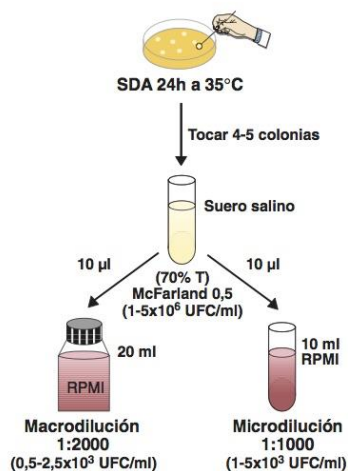


Figura 15a.5. Preparación del inóculo de levaduras.

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.2.6. 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 0,03 μ g/ml en los insolubles.
- En una placa de antifúngico se pueden ensayar hasta 8 cepas diferentes.

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 ($\geq 50\%$), 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 fungiestáticos**, la CMI debe ser la concentración más baja de antifúngico que produce una reducción aparente del crecimiento de la levadura ($\geq 50\%$), 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 405 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 fungiestáticos**, 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:

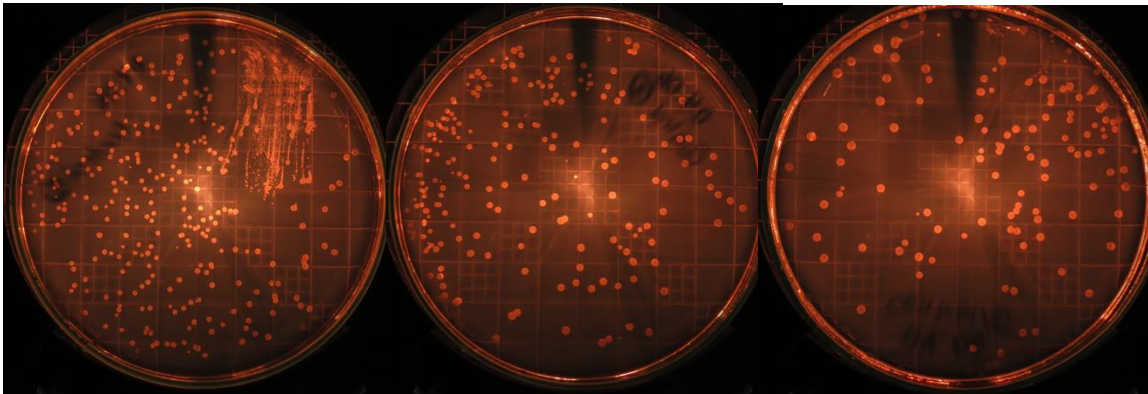
C. parapsilosis ATCC 22019
C. krusei ATCC 6258

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].

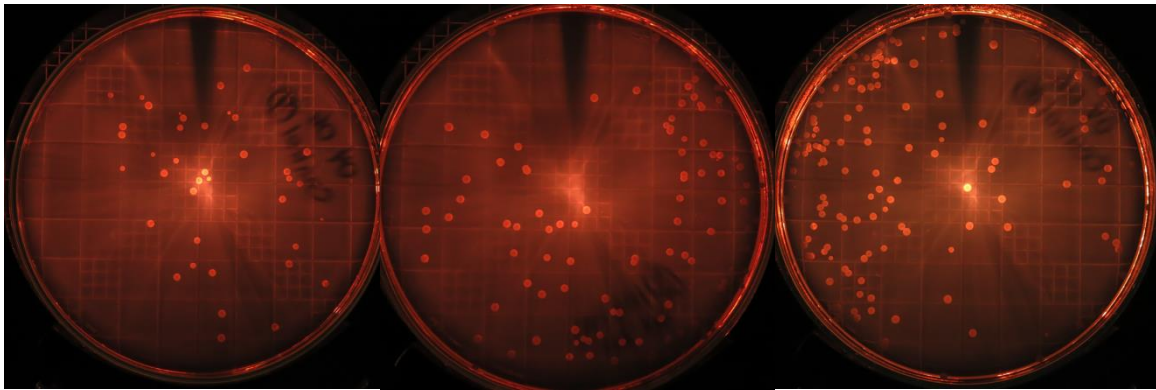
ANEXO 7: Fotografías de UFC



Control 1

Control 2

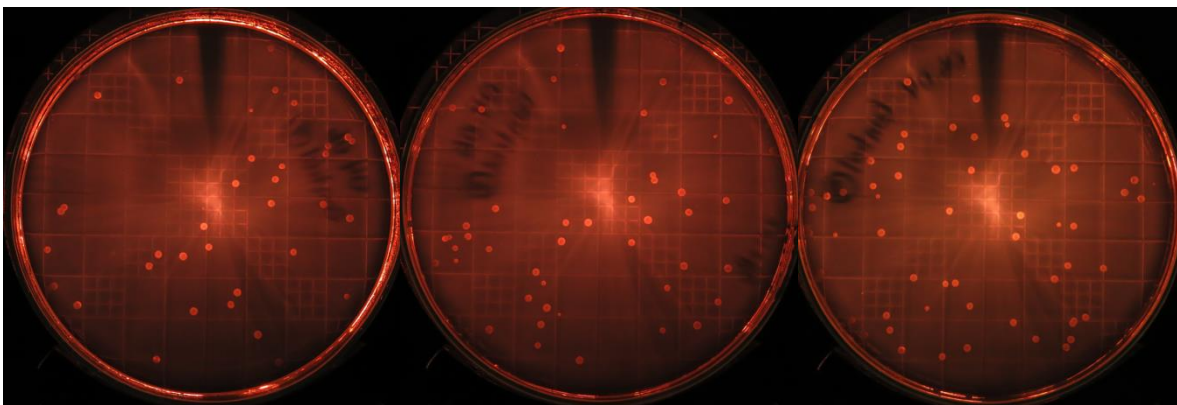
Control 3



Control 4

Control 5

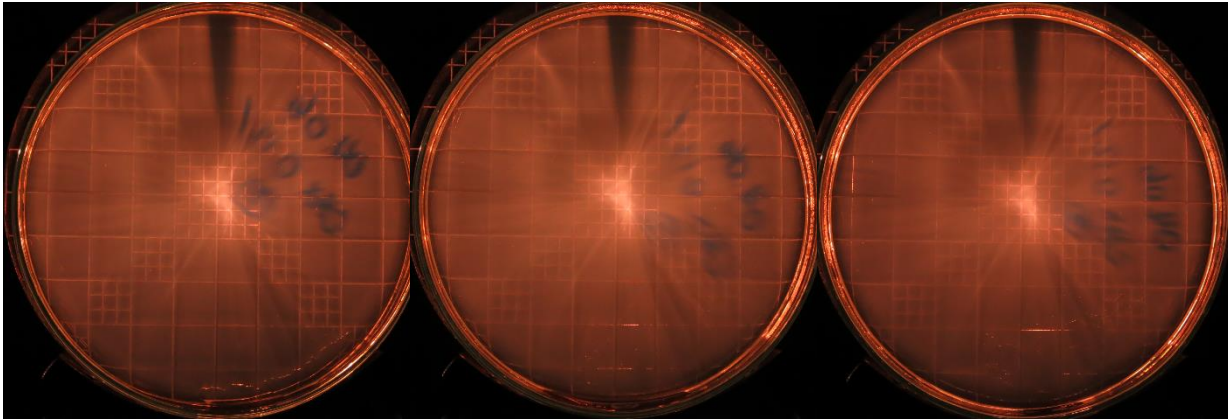
Control 6



Control 7

Control 8

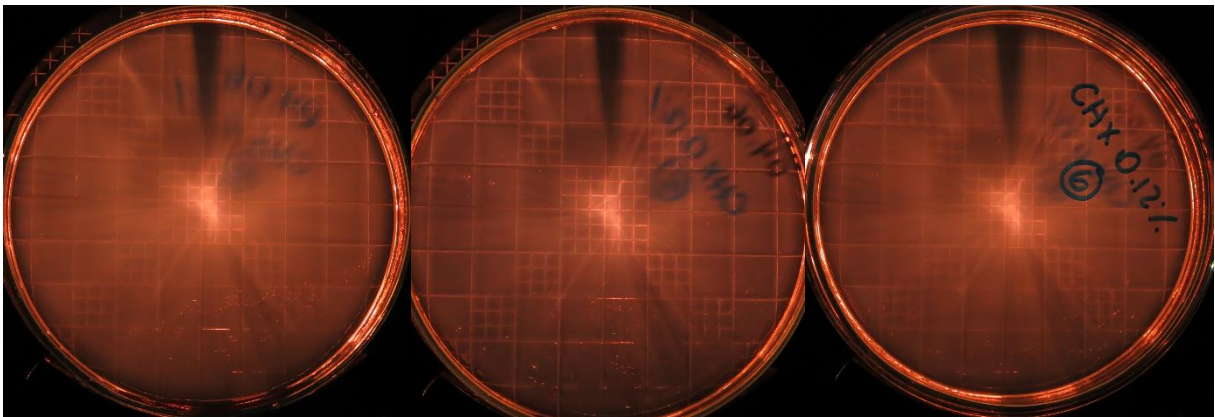
Control 9



Clorhexidina 1

Clorhexidina 2

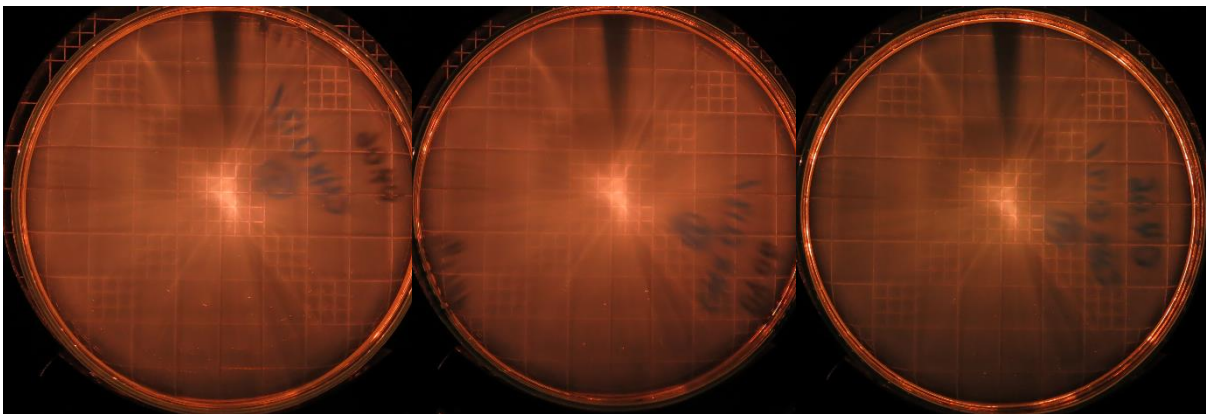
Clorhexidina 3



Clorhexidina 4

Clorhexidina 5

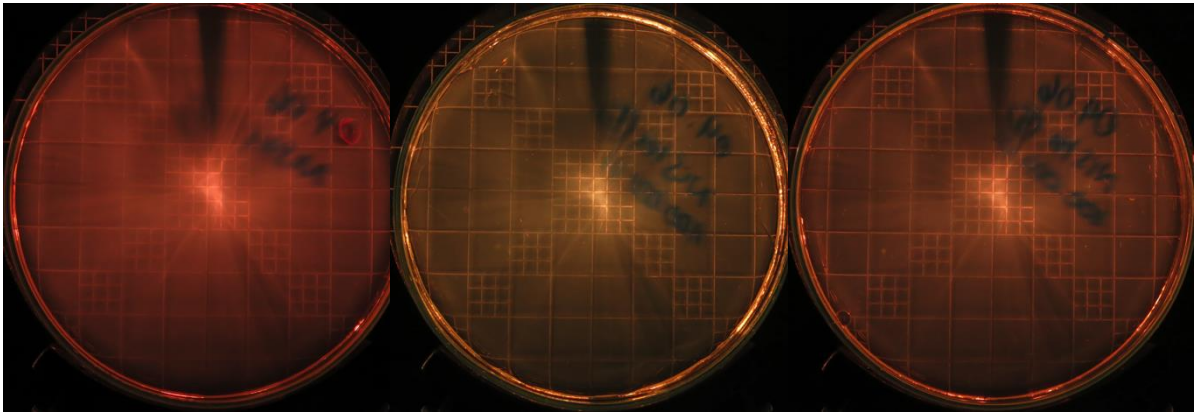
Clorhexidina 6



Clorhexidina 7

Clorhexidina 8

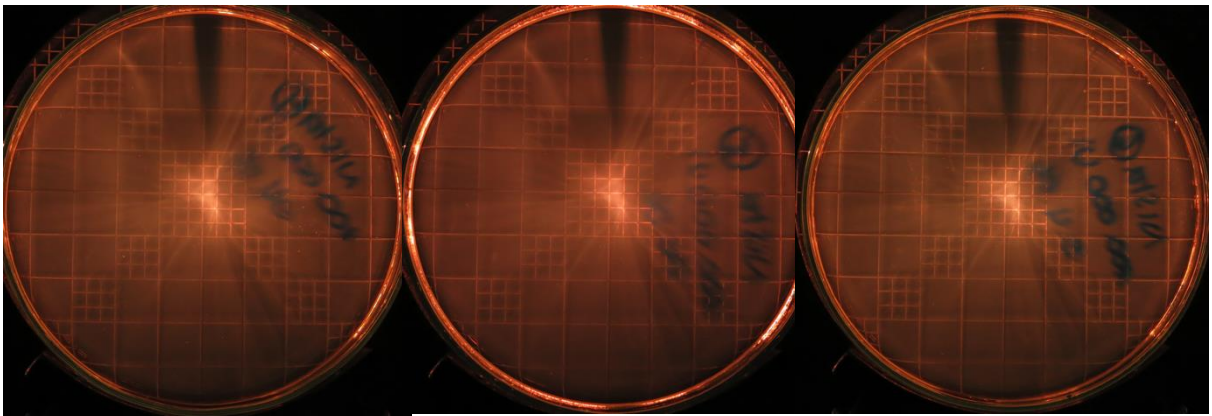
Clorhexidina 9



Nistatina 1

Nistatina 2

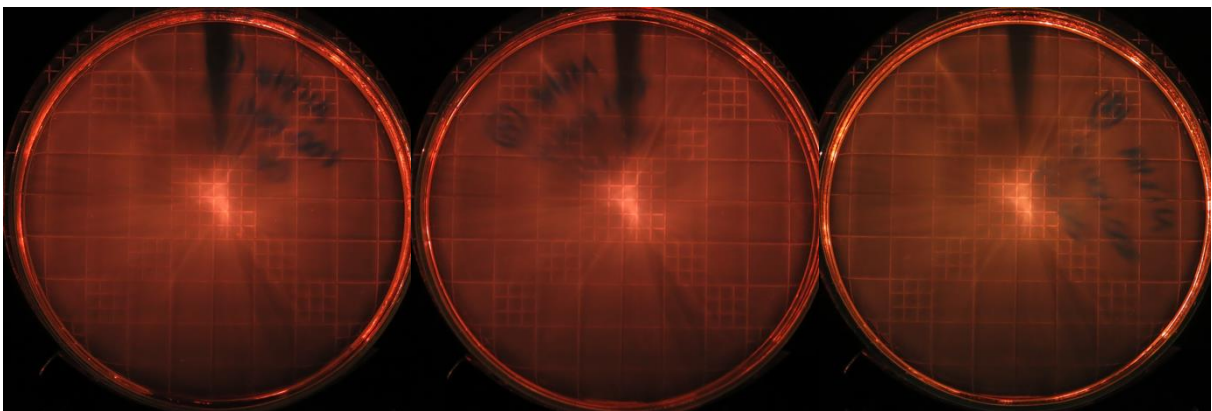
Nistatina 3



Nistatina 4

Nistatina 5

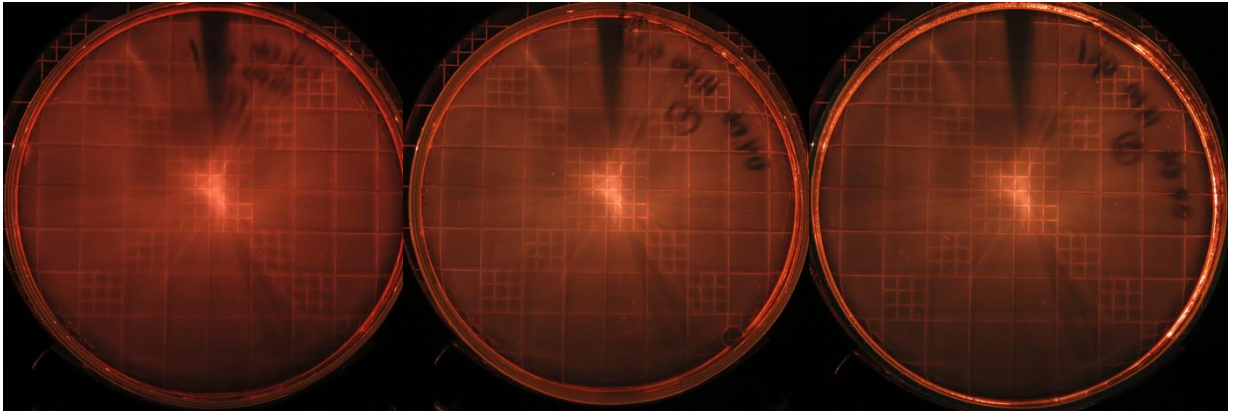
Nistatina 6



Nistatina 7

Nistatina 8

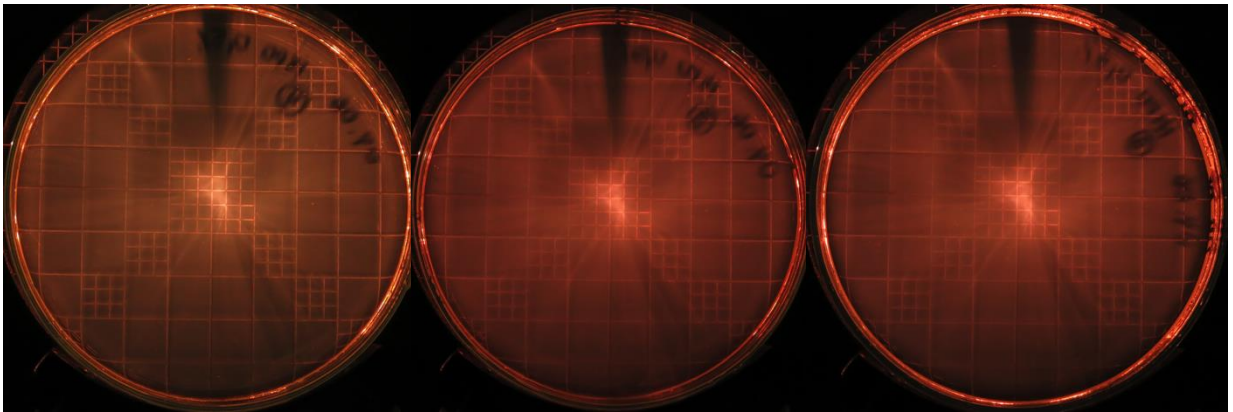
Nistatina 9



Hipoclorito
de sodio 1

Hipoclorito
de sodio 2

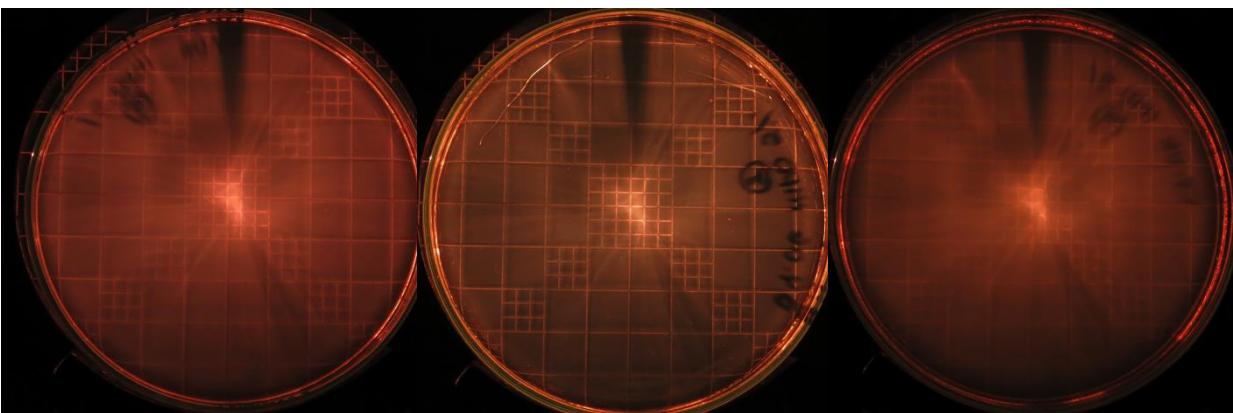
Hipoclorito
de sodio 3



Hipoclorito
de sodio 4

Hipoclorito
de sodio 5

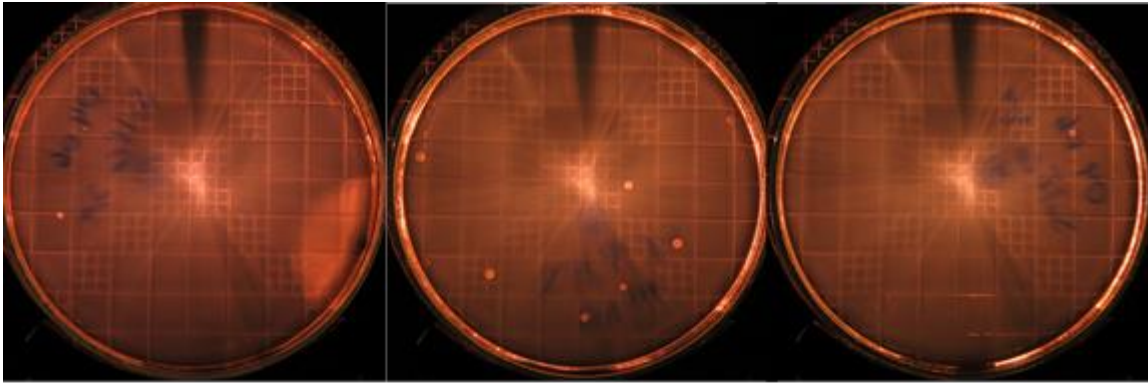
Hipoclorito
de sodio 6



Hipoclorito
de sodio 7

Hipoclorito
de sodio 8

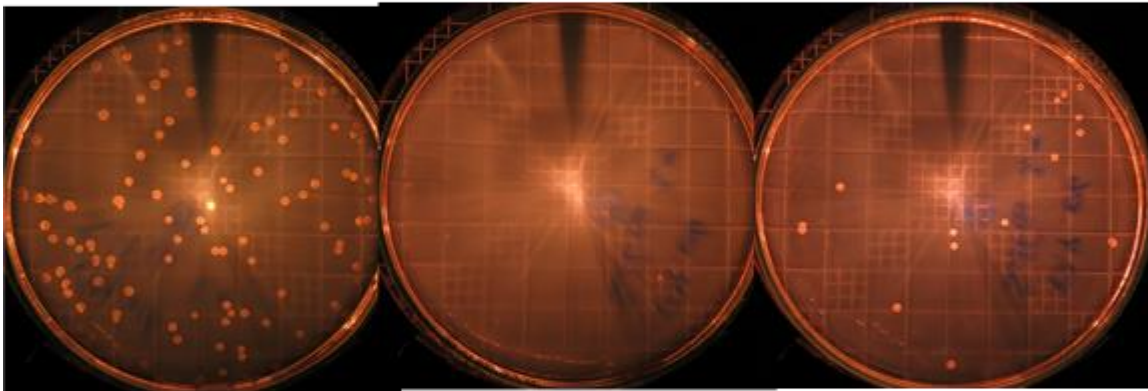
Hipoclorito
de sodio 9



Sulfato de cobre
4.7µg/ml 1

Sulfato de cobre
4.7µg/ml 2

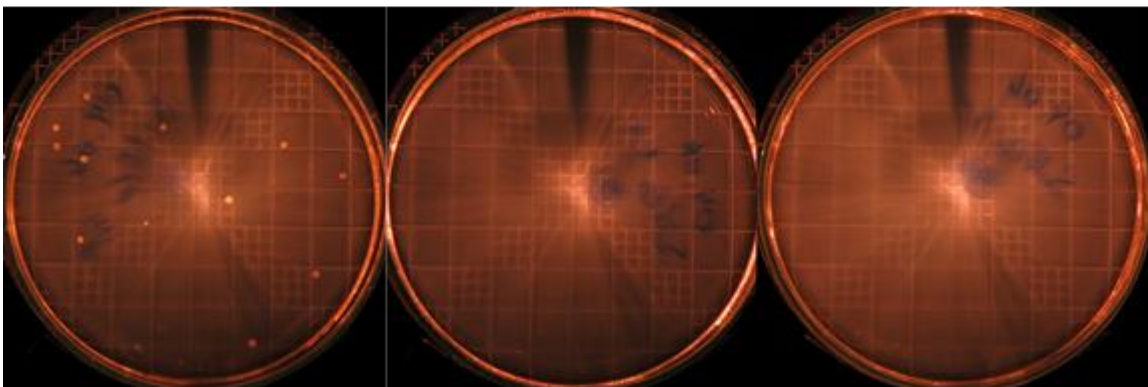
Sulfato de cobre
4.7µg/ml 3



Sulfato de cobre
4.7µg/ml 4

Sulfato de cobre
4.7µg/ml 5

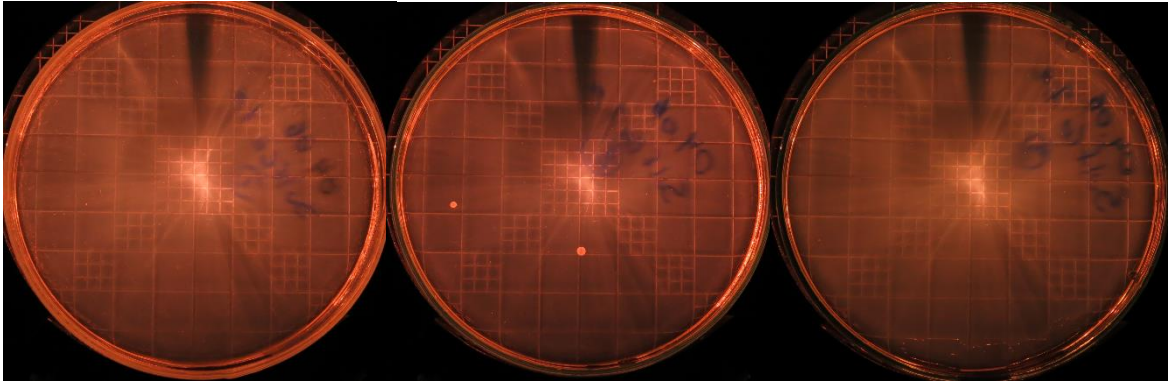
Sulfato de cobre
4.7µg/ml 6



Sulfato de cobre
4.7µg/ml 7

Sulfato de cobre
4.7µg/ml 8

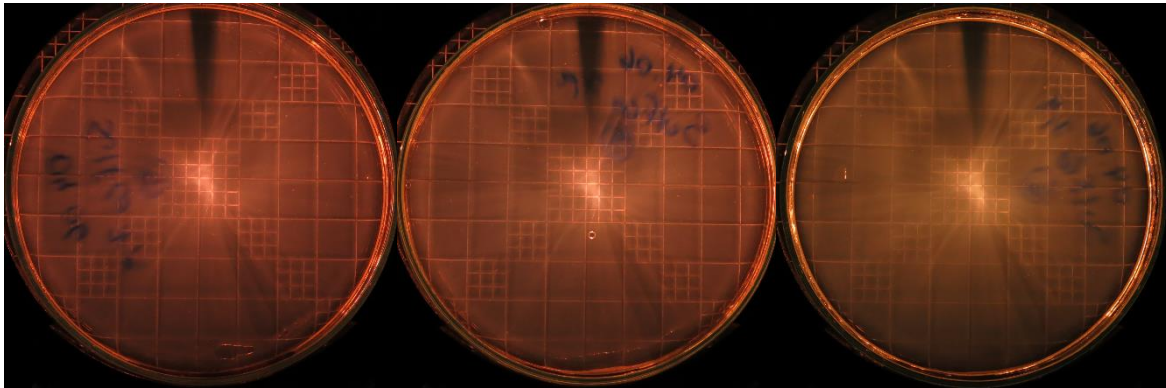
Sulfato de cobre
4.7µg/ml 9



Sulfato de cobre
9.4µg/ml 1

Sulfato de cobre
9.4µg/ml 2

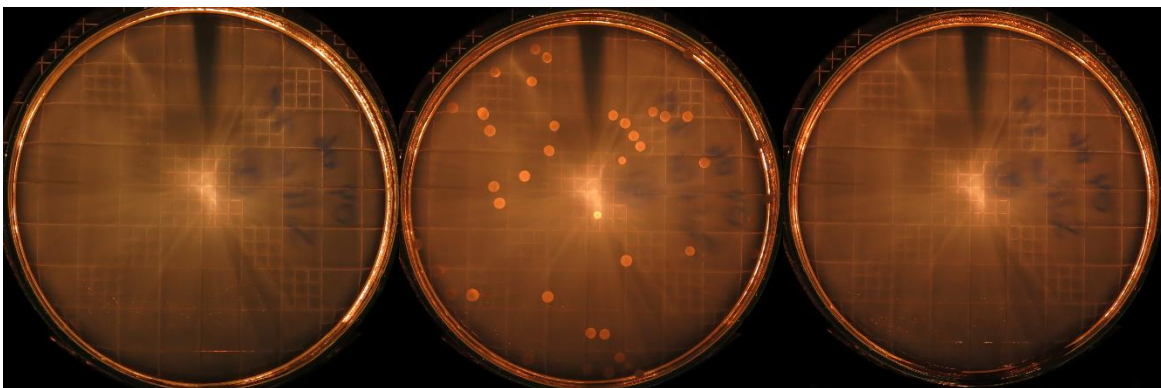
Sulfato de cobre
9.4µg/ml 3



Sulfato de cobre
9.4µg/ml 4

Sulfato de cobre
9.4µg/ml 5

Sulfato de cobre
9.4µg/ml 6



Sulfato de cobre
9.4µg/ml 7

Sulfato de cobre
9.4µg/ml 8

Sulfato de cobre
9.4µg/ml 9