



**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO DEL GEL DE COBRE
(COPPER CLEAN®) SOBRE *STREPTOCOCCUS MUTANS* Y
*CÁNDIDA SPP.***

Trabajo de Investigación
requisito para optar al
Título de Cirujano Dentista

Alumnas: Nathaly González Maturana
Macarena Vera Sepúlveda

Docente Guía: Dra. María Soledad Lopetegui Buschmann
Cátedra de Periodoncia

Valparaíso – Chile
2015

DEDICATORIA

A mis padres, quienes me han dado su apoyo incondicional durante todos estos años de carrera, gracias por estar siempre presentes y por creer en mí. Especialmente a ti mamá, por escucharme y aconsejarme cuando lo he necesitado, por tu preocupación, tu cariño y por darme las fuerzas necesarias para levantarme cuando he tropezado.

A mis compañeros, por hacer de mi vida universitaria una de las mejores etapas de mi vida. Por alegrar los días de clases y clínicas, por su ayuda y buena disposición, gracias por todo. Los quiero mucho y les deseo lo mejor en lo que sigue.

Finalmente a ti, Gus. Por ser uno de los pilares más importantes en mi vida, gracias por estar a mi lado, por escuchar mis alegrías y mis problemas, por los consejos, las críticas y los abrazos que me has dado. Te quiero con todo mi corazón.

Macarena.

Principalmente a mis padres, por su apoyo incondicional, no sólo a lo largo de esta carrera si no que en la vida, gracias por darme la libertad de seguir mis sueños siempre y de ser mi red de apoyo en todo momento, por acompañarme en las buenas y aguantarme en las malas. A Carmen, Fernando y Antonia, por creer en mí, escucharme, alentarme y hacerme reír en todos los momentos que necesite. Y a mis primos y tíos que sacan lo mejor de cada momento juntos. Los quiero a todos infinitamente.

A los compañeros y profesores que me acompañaron durante este viaje, gracias por los conocimientos, ayuda y aliento y por convertir estos años en inolvidables. En especial a mis amigos por el cariño y la confianza, y por estar siempre ahí celebrando los triunfos y dando ánimo en las derrotas, los quiero mucho.

Y a mi amiga y compañera de tesis, por seguirme en este proyecto y convertir esta experiencia en una de las mejores de la carrera, a pesar de los inconvenientes.

Nathaly

AGRADECIMIENTOS

Durante la realización de esta tesis surgieron muchas dudas y problemas, los que gracias a su ayuda, apoyo y buena disposición pudimos superar. Los recordaremos siempre con mucho cariño. Gracias a:

Dr. Rodrigo Cruz.

Dra. María Soledad Lopetegui.

Dr. Miguel Muñoz.

Dr. Wilfredo González.

ÍNDICE

I.	Introducción	1
II.	Marco Teórico	3
	II.1 Biofilm	3
	II.1.1 Definición, formación biofilm	3
	II.1.2 Flora microbiana oral	3
	II.2 Patologías más prevalentes	4
	II.2.1 Caries Dental	4
	II.2.2 Estomatitis, Candidiasis oral	5
	II.3 Microorganismos para estudio in vitro	7
	II.3.1 <i>Streptococcus mutans</i>	7
	II.3.2 <i>Cándida spp.</i>	9
	II.4 Metales antimicrobianos	11
	II.4.1 Cobre	11
	II.5 Agentes antisépticos	15
	II.5.1 Clorhexidina	15
	II.5.2 Alcohol Gel	17
	II.6 Medios de cultivo	18
	II.7 Métodos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos	23
III.	Objetivos	26
IV.	Hipótesis	26
V.	Materiales y métodos	27
	V.1 Diseño	27
	V.2 Universo	27

V.3 Muestra	27
V.4 Selección y tamaño de la muestra	27
V.5 Criterios de inclusión	28
V.7 Variables	28
V.8 Definiciones conceptuales y operacionales	28
V.9 Procedimiento experimental	30
VI. Resultados	32
VI.1 Estadística descriptiva	32
VI.2 Análisis estadístico	45
VII. Discusión	52
VIII. Conclusiones	56
IX. Sugerencias	57
X. Resumen	58
XI. Referencias Bibliográficas	59

I. INTRODUCCION

Las enfermedades bucodentales son patologías crónicas comunes altamente prevalentes, constituyendo en la actualidad un importante problema de salud pública, debido al gran impacto social que generan y porque son uno de los ámbitos en que las personas tienen mayores problemas de acceso, costo y oportunidad, expresados sobre todo en los grupos de nivel socioeconómico bajo y medio.

La caries dental y las enfermedades periodontales son algunas de las patologías orales más prevalentes a nivel nacional y en el mundo. Bacterias acidogénicas como el *S. mutans*, *S. sanguis* y *Lactobacillus* son considerados como factores contribuyentes a la caries dental¹. Si estas patologías no reciben un tratamiento oportuno pueden llegar a afectar la calidad de vida de las personas, principalmente a través de la manifestación de dolor, malestar, limitación social y funcional. Esto va asociado muchas veces de la rehabilitación oral de los pacientes con aparatologías removibles, las que a su vez, sin una adecuada higienización pueden asociarse a otras patologías, como la estomatitis oral, inflamación de los tejidos blandos asociada a levaduras del género *Cándida*, siendo la especie más común la *C. albicans*². Es por esto, que resulta de suma importancia lograr un efectivo control de la infección bucal, a través de maniobras de prevención, mediante métodos mecánicos como el cepillado y complementado con productos con propiedades antimicrobianas.

En la actualidad, se han realizados variados estudios en el área médica, que involucran el uso de nanopartículas metálicas con propiedades antibacterianas, antivirales y antifúngicas; principalmente para el control de infecciones intrahospitalarias. Los metales más utilizados para este fin han sido la plata, zinc, cobalto y el cobre, siendo este último el que ha demostrado ser más eficiente para reducir las cargas bacterianas, al ser aplicado como recubrimiento de superficies en los recintos hospitalarios que habitualmente presentan una alta carga microbiana^{3,4,5,6}. Se ha descrito que las propiedades antimicrobianas de los metales dependen del área de contacto con los microorganismos, sin embargo, muchas de sus propiedades aún siguen sin aclararse^{7,8}.

Esta tesis evalúa la actividad antimicrobiana in vitro del gel de cobre (Cooper Clean®) sobre cepas de *Streptococcus mutans* y *Cándida spp.*, mediante métodos de difusión por discos.

La relevancia de este estudio radica en el conocimiento que aportará a las escasas investigaciones científicas en el área odontológica sobre las propiedades antimicrobianas de este metal.

Además podría ser aplicado sobre otros patógenos orales y/o en otra presentación, contribuyendo así a que en un futuro se desarrollen nuevas formulaciones antimicrobianas para el uso odontológico, tales como, dentífricos, geles, colutorios; brindando una alternativa al uso de otros agentes comúnmente utilizados, como la clorhexidina, a la que se le han asociado ciertas desventajas, como la alteración del gusto, irritación de la mucosa, tinción del esmalte, entre otras ¹.

II. MARCO TEÓRICO

II.1 Biofilm

II.1.1 Definición

La microbiota de la cavidad oral está compuesta por una gran cantidad de microorganismos, más de 1000 especies diferentes que van colonizando y formando parte de nuestra microbiota habitual, muchos de ellos beneficiosos e indispensables para mantener la salud, pero además están presentes muchas especies patógenas oportunistas, que son capaces de generar un desequilibrio microbiano, lo que culmina en diversas enfermedades, dentro de las cuales las más prevalentes son la caries dental, enfermedades del periodonto y/o infecciones fúngicas.

El biofilm dental, también conocido como placa bacteriana, es una biopelícula estructural y funcionalmente organizada. Se forma de manera ordenada, tiene una composición microbiana diversa, compleja, enzimáticamente activa, firmemente adherida e inmersa en una matriz formada por los mismos microorganismos, sus productos, células y moléculas del hospedero, asociada a la superficie dentaria⁹.

Los primeros microorganismos que constituyen el biofilm son compatibles con la salud, pero sobre estos se produce la adhesión de otros patógenos, los que bajo ciertas condiciones ambientales, como la tensión de oxígeno, los nutrientes disponibles o la región anatómica en la que se ubiquen, pueden llevar a que el huésped desarrolle caries y periodonciopatías. La formación del biofilm involucra un patrón ordenado de colonización bacteriana, la que involucra variados aspectos, como la interacción de las diferentes especies microbianas, las características fisicoquímicas de la saliva y la superficie dentaria⁹

Generalmente, se describen las siguientes etapas: Película adquirida, Colonización Primaria, Multiplicación bacteriana y Colonización secundaria¹⁰

II. 1.2 Microbiota oral

La cavidad oral es un complejo ecosistema donde cohabitan una amplia variedad de especies microbianas, de 500 a 1000 especies, siendo éstas principalmente comensales. (Tabla I).

Grupo Bacteriano	Sitio			
	Placa	Lengua	Saliva	Surco
Gingival				
Cocos G+ Facultativos	28.2	44.8	46.2	28.8
Estreptococos	27.9	38.3	41.0	27.1
<i>S. mutans</i>	(0-50)	(0-1)	(0-1)	(0-30)
<i>S. sanguis</i>	(40-60)	(10-20)	(10-30)	(10-20)
<i>S. mitior</i>	(20-40)	(10-30)	(30-50)	(10-30)
<i>S. salivarius</i>	(0-1)	(40-60)	(40-60)	(0-1)
<i>S. milleri</i>	(3-25)	(0-1)	(0-1)	(14-56)
Estafilococos	0.3	6.5	4.0	1.7
Cocos G+ anaerobicos	12.6	4.2	13.0	7.4
Cocos G- anaerobicos	6.4	16.0	15.9	10.7
Cocos G- facultativos	0.4	3.4	1.2	0.4
Bacilos G+ facultativos	23.8	13.0	11.8	15.3
Bacilos G+ anaerobicos	18.4	8.2	4.8	20.2
Bacilos G- facultativos	NDb	3.2	2.3	1.2
Bacilos G- anaerobios	10.4	8.2	4.8	16.1
Espiroquetas	ND	ND	ND	1.0

Fuente: Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiological reviews. 1980 Jun;44(2):331-84.
 Los datos entre paréntesis son expresados como un porcentaje de los conteos totales de estreptococos facultativos.
 h ND, No detectado.

Tabla I. Distribución de bacterias en varios sitios en la boca humana.

Como se aprecia en la **Tabla I**, las especies microbianas predominantes son diferentes según el sitio de localización. Siendo los de mayor recuento los *Streptococcus*.

Pueden ser identificados como una de las siguientes especies: *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. mitior*, *S. salivarius*, y *S. milleri*. Las especies más importantes en el humano son *S. mutans* y *S. sobrinus*, los que se han caracterizado por ser colonizadores secundarios del biofilm que rodea a los dientes y su patogenicidad se ha demostrado en relación a su capacidad de producir ácidos a partir de la sacarosa, lo que culmina con la producción de caries dental ¹¹.

II.2 Patologías más prevalentes

II.2.1 Caries Dental

Definición

La caries dental es una de las enfermedades infecciosas más frecuentes en el ser humano, es una patología crónica, transmisible, que se inicia después de la erupción dentaria y se caracteriza por la destrucción localizada de los tejidos duros dentales, mediante la acción de los ácidos producidos por el metabolismo de las bacterias adheridas al esmalte de los dientes. Si no se atiende oportunamente, afecta la salud general y la calidad de vida de los individuos de todas las edades ¹². En Chile afecta al 85% de los niños en edad escolar.

Etiología

En el proceso de caries interactúan tres factores, conocido como la triada de Keyes, estos son: las características del huésped (tanto del diente como la saliva), la dieta (en especial aquellas ricas en carbohidratos) y la presencia de microorganismos cariogénicos. Además se suma un cuarto factor, el tiempo, que es necesario para que los otros factores actúen.

Cuando se consumen hidratos de carbono estos son metabolizados por las bacterias presentes en la cavidad oral, generando ácidos que llevan a un descenso de pH (por debajo de 5,5 es considerado como pH crítico) y con esto se genera la disolución de componentes orgánicos y desmineralización de componentes inorgánicos de los tejidos duros del diente, liberando iones de calcio y fosfato. Esto ocurre como un ciclo normal sobre la superficie del diente acompañado de remineralización, debido al alto contenido de minerales en la saliva. Pero si se genera un desequilibrio entre estos procesos hacia la desmineralización, se producen cavitaciones, caries ¹³.

La presencia de microorganismos capaces de producir ácido suficiente para descalcificar la estructura del diente es necesaria para este proceso. En los últimos años se ha implicado al *S. mutans* como el principal y más virulento microorganismo responsable de la caries dental. Existen otros microorganismos como el *Lactobacillus*, *Actinomyces* y otras especies de *Streptococcus*, pero su rol es de menor importancia ^{1,14}.

Clínicamente la manifestación de este proceso comienza como una mancha blanca o marrón en la superficie del esmalte sin pérdida de continuidad, luego se produce la cavitación del esmalte, detectable al paso de la sonda. A medida que el proceso va progresando comienza a generar respuesta ante estímulos como el frío, calor, alimentos dulces y ácidos. Esto sigue avanzando y cuando el proceso ha llegado a dentina se observa un fondo marrón claro de consistencia blanda al tacto, y una vez que llega a tener contacto con la pulpa puede generar necrosis, con o sin sintomatología asociada y con o sin secreciones purulentas, debido a la inflamación producida por bacterias asociadas ¹⁵.

II. 2.2 Estomatitis

Definición

La estomatitis se refiere a cualquier condición inflamatoria del tejido oral, incluyendo la mucosa, tejido periodontal, apical y pulpar, por lo tanto está asociado a múltiples patologías. Estomatitis, literalmente significa inflamación de la boca.

Se asocia a múltiples factores que pueden ser locales en la boca, como la falta de higiene, traumas, prótesis mal ajustadas, entre otras, o generales como la edad, género o patologías sistémicas asociadas ¹⁶.

Candidiasis Oral

Según Bagán, la candidiasis "es una enfermedad micótica causada por cualquiera de las especies del género *Cándida*, constituyéndose como una enfermedad oportunista, muy frecuente en nuestros días" ^{17,18}.

En el ser humano los hongos del género *Cándida* son parte de la microbiota habitual de la boca, sistema gastrointestinal, tracto respiratorio, vaginal y piel. Pueden ser transmisibles pero solo producen infección de la mucosa en presencia de una predisposición local o general, de ahí que sean considerados hongos oportunistas¹⁸.

La gran mayoría de las micosis orales están producidas por levaduras del género *Cándida*, principalmente por la especie *C. albicans*. Son frecuentes en lactantes, ancianos y personas con factores predisponentes generales o locales.

Siendo el *C. albicans* el que con mayor frecuencia se ha podido aislar en la cavidad oral, se ha considerado el más importante en el desarrollo de la candidiasis a este nivel. Se ubica en primer lugar en el dorso de la lengua y luego es capaz de colonizar otros sitios como las mucosas y las piezas dentarias ².

Clasificación

Existen muchas clasificaciones de Candidiasis, pero utilizaremos la de Holmstrup y Axell ¹⁷:

1. Forma aguda:

- **Pseudomembranosa:** se caracteriza por la presencia de lesiones blancas en toda la boca, especialmente en surcos, mucosa yugal, lengua y paladar, que se desprenden fácilmente al pasar una gasa, dejando una superficie enrojecida. Se asocia con halitosis.
- **Eritematosa:** es una forma poco común que presenta depapilación de la mucosa lingual, que produce imposibilidad de ingerir alimentos ácidos, picantes y calientes, acompañada además de disfagia y pérdida del espesor de la lengua.

2. Forma crónica:

- **Pseudomembranosa:** igual que la forma aguda pero de mayor persistencia.
- **Eritematosa:** se genera principalmente sobre mejillas y paladar, aparecen zonas enrojecidas, bien delimitadas, dolorosas al contacto con los alimentos, que además puede acompañarse de formas pseudomembranosas. Frecuentes en pacientes con sida.
- **Leucoplasia-candidiasis (Plake-like):** es de difícil diagnóstico, pues tiende a la confusión con otras patologías. Aparece como una formación retrocomisural, bilateral, o en forma de placas alargadas o radiadas. Son indoloras; al palpar encontramos una consistencia dura similar a la de una leucoplasia y además puede sufrir ulceraciones en su superficie.
- **Forma nodular:** también de difícil diagnóstico. Suele localizarse en la región retrocomisural, formando zonas nodulares, endurecidas, sin alteración de la coloración de la mucosa y que, a veces, están recubiertas de una capa queratósica adherida.

3. Candidiasis asociada con otras lesiones

- **Queilitis angular:** aparecen finas grietas que siguen los pliegues comisurales, suele ser bilateral y puede ulcerarse haciendo más difícil el diagnóstico que, por lo general, será siempre histológico.
- **Glositis romboidal media:** se dice que es ocasionada por *Cándida*, aunque no se sabe bien su etiología ni relación.
- **Estomatitis por prótesis:** este tipo aparece en aquellos sujetos portadores de prótesis removible¹⁷.

II.3 Microorganismos para estudio in vitro

II.3.1 *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa, que se encuentra normalmente en la cavidad bucal humana, formando parte del biofilm dental. Su nombre lo recibe por su tendencia a cambiar de forma, se puede encontrar como coco o de forma más alargada, como bacilo¹⁹.

Es un microorganismo no móvil, catalasa negativo, productor rápido de ácido láctico con capacidad de cambiar un medio de pH 7 a pH 4.2 en, aproximadamente, 24 horas. Fermentador de glucosa, lactosa, rafinosa, manitol, inulina y salicina con la producción de ácido ¹¹.

Ha sido el más aislado en lesiones cariosas humanas, siendo el primero en colonizar la superficie del diente después de la erupción.

Adherencia y agregación

S. mutans tiene la capacidad de adherirse a superficies, establecer uniones con otros *Streptococcus* y con bacterias de otras especies. La interacción se produce por cargas electrostáticas y por la acción de proteínas presentes en la superficie de las bacterias, denominadas adhesinas, que se unen a las proteínas salivales las cuales actúan como receptores y facilitan la adherencia bacteriana. Se ha observado que mientras mayor es la capacidad de adherencia del microorganismo, mayor es la experiencia de caries dental ¹⁹.

Los azúcares consumidos con la dieta constituyen el sustrato de la microflora bucal. La sacarosa se considera el más cariogénico, no sólo porque su metabolismo produce ácidos, sino porque el *S. mutans* lo utiliza para producir a través de la acción de las glucosiltransferasas (Gtfs) un polisacárido extracelular, el glucano, que le permite a la bacteria adherirse firmemente al diente, inhibiendo las propiedades de difusión de la placa.

Factores de virulencia

Son aquellas condiciones o características específicas de cada microorganismo que lo hacen patógeno. En el caso del *S. mutans*, los más involucrados en la producción de caries son ¹⁹.

- **Acidogenicidad:** es la capacidad de fermentar los azúcares de la dieta para producir principalmente ácido láctico como producto final del metabolismo. Esto hace que baje el pH y se desmineralice el esmalte dental.
- **Aciduricidad:** es la capacidad de producir ácido en un medio con pH bajo.
- **Acidofilicidad:** Capacidad de resistir la acidez del medio bombeando protones (H⁺) fuera de la célula.
- **Síntesis de glucanos y fructanos:** producidos por medio de enzimas como la glucosil y fructosiltransferasa, a partir de la sacarosa. Estos pueden ayudar a la célula a adherirse al diente y ser usados como reserva de nutrientes.

- **Síntesis de polisacáridos intracelulares, como el glucógeno:** sirven como reserva alimenticia y mantienen la producción de ácido durante largos períodos.
- **Producción de dextranasa:** además de movilizar reservas de energía, esta enzima puede regular la actividad de las glucosiltransferasas removiendo productos finales de glucano.

II.3.2 Levaduras del Género *Cándida*

Las levaduras del género *Cándida* pertenecen al Phylum Ascomycotina, han sido aisladas en la microbiota normal de la piel y membranas mucosas. Este género incluye aproximadamente 150 especies identificadas. Estos microorganismos, corresponden a levaduras mitospóricas alargadas o ligeramente redondas de 2 - 6 x 3 - 9 μm que se reproducen por gemación.

C. albicans es el agente implicado más frecuentemente en la candidiasis oral. Otras especies como *C. glabrata*, *C. parasilopsis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* o *C. krusei*, poseen una importancia etiológica secundaria²⁰. (Tabla II)

Especie	Frecuencia
<i>C. albicans</i>	50%
<i>C. tropicalis</i>	15-30%
<i>C. parapsilosis</i>	15-30%
<i>C. glabrata</i>	15-30%
<i>C. krusei</i>	~1%
<i>C. guilliermondii</i>	~1%
<i>C. lusitaniae</i>	~1%
<i>C. dubliniensis</i>	~1%

Tabla II. Especies patógenas de *Cándida*

Cándida albicans

Hongo que en estado saprófito se encuentra en forma de levadura comensal, de aspecto redondeado u ovalado de 2-7 x 3-8 μm . Bajo ciertas condiciones ambientales o alteraciones de la inmunidad del hospedero, expresa factores de virulencia y se convierte en patógeno, generando la Candidiasis.

Los mecanismos de patogenicidad claramente identificados en *C. albicans* son: adherencia, dimorfismo, cambio fenotípico, formación de biopelículas y adaptación²¹.

1. **Adherencia:** es un mecanismo multifactorial en el que el *C. albicans* utilizando varios tipos de adhesinas dependientes de su estado morfológico, modifica su adherencia a distintas superficies celulares, incluyendo células epiteliales, endoteliales y fagocíticas. La máxima expresión de adherencia de esta levadura es la formación de biopelículas en el hospedero, que persé constituye un mecanismo patogénico.
2. **Dimorfismo (morfogénesis):** corresponde a la transición de la forma levaduriforme unicelular, a la forma filamentosa (pseudohifas o hifas). Esta transición se ve facilitada por determinados nutrientes, un pH cercano al neutro, una temperatura de 37°C, una concentración de CO₂ de aproximadamente 5,5%, la presencia de suero, ciertos aminoácidos y biotina.
3. **Invasión:** la secreción de proteinasas es fundamental para degradar las barreras del tejido y obtener nutrientes en el sitio de la infección. Las proteinasas aspárticas secretadas o saps de *C. albicans* hidrolizan proteínas del hospedero tales como, albumina, queratina, hemoglobina, colágeno, fibronectina e inmunoglobulina A. la producción de saps además se correlaciona con la formación de hifas, adherencia y el cambio fenotípico.

Cándida parapsilosis

Hongo patógeno oportunista, de aspecto redondeado u ovalado pequeño, de unos 2.0-3.5 x 3.0-4,5 μm , con algunas formas alargadas presentes. En medios de cultivos se observa como colonias de color blanco a color crema.

Puede causar infecciones cutáneas, especialmente en las uñas, y enfermedades sistémicas, como la endocarditis. Otras manifestaciones clínicas incluyen la endoftalmitis y fungemia.

II.4 Metales Antimicrobianos

En el contexto de la búsqueda de nuevos materiales con propiedades antimicrobianas aparecen los metales, como la plata, cobre, zinc, manganeso, níquel, entre otros.

II.4.1 COBRE

Historia

El uso del cobre por las civilizaciones humanas data entre el 5^{to} y 6^{to} milenio a.C. Fue el primer metal utilizado, posiblemente porque podía encontrarse en forma de metal nativo, con elevada maleabilidad y que no requería de fundición. Su uso se esparció por toda Europa y el Medio Oriente, transformando el cobre en artículos de adorno, mediante golpes. Con la invención de la fundición, la era de la metalurgia comenzó y con el objetivo de mejorar sus propiedades, específicamente su dureza y resistencia, surgen las combinaciones con otros metales, específicamente con el estaño, apareciendo así el bronce. Los primeros artefactos de bronce se originaron en el Medio Oriente y China, y datan de antes del 3000 a.C., pero no fue hasta el 2^{do} milenio a.C. que el bronce fue utilizado en toda Europa. La capacidad de fundir y forjar el hierro en aproximadamente los 1000 años a.C. marca el final de la edad de bronce y da comienzo a la edad de hierro⁸.

El uso médico más antiguo del cobre es mencionado en el papiro de Smith, uno de los libros más antiguos conocidos. Este texto médico egipcio, escrito entre 2600 y 2200 a.C. describe la aplicación de cobre para esterilizar el agua y heridas en el pecho. Griegos, romanos, aztecas y otras civilizaciones también utilizaban cobre o compuestos de cobre para el tratamiento de dolencias tales como dolores de cabeza, quemaduras, parásitos intestinales e infecciones del oído y para la higiene en general⁸.

El uso de cobre en la medicina se generalizó entre los siglos XIX y XX, y una variedad de preparaciones con cobre inorgánico se usaron para tratar la adenitis crónica, eczema, impétigo, infecciones tuberculosas, el lupus, la sífilis, la anemia y la neuralgia facial. El uso del cobre como agente antimicrobiano continuó hasta la llegada de los antibióticos disponibles en el mercado en el año 1932⁸.

La propagación de bacterias resistentes a los antibióticos, principalmente en los hospitales (infecciones intrahospitalarias), plantas de procesamiento de alimentos e instalaciones de cría de animales ha planteado la necesidad de aplicar nuevas maniobras para evitar dicha propagación. Una de estas alternativas es el uso de

superficies de cobre en las áreas de higiene, método aplicado desde muchos años, pero que había perdido la importancia y aceptación en las últimas décadas. Generando así en la actualidad, un gran interés en el uso del cobre como material de auto desinfección⁸.

Definición

Es un metal blando, pesado, maleable y dúctil de color café rojizo, que se puede encontrar en estado natural o combinado con otros minerales. Dentro de sus principales propiedades se encuentran:

- **Conductividad Eléctrica:** El cobre tiene una excepcional capacidad para transportar la corriente eléctrica, mejor que cualquier otro conductor no superconductor, excepto la plata.
- **Conductividad Térmica:** El cobre conduce calor hasta ocho veces mejor que otros metales.
- **Conformabilidad:** Es un material fácilmente conformable debido a sus propiedades de ductilidad y maleabilidad. Se puede doblar con facilidad para adaptarse a la forma necesaria.
- **Resistencia a la Corrosión:** Los metales de cobre pueden resistir el ataque de una amplia gama de ambientes corrosivos, lo que los hace ideales para su uso en aplicaciones en las industrias de desalinización, productoras de energía, petróleo y gas en alta mar. En presencia de humedad y de una variedad de componentes atmosféricos naturales y artificiales, el cobre finalmente cambia a una pátina protectora y agradable que conserva su funcionalidad durante siglos.
- **Facilidad para Alearse:** La importancia industrial del cobre se ha extendido por la facilidad con la que se alea con otros metales.
- **Efecto Antimicrobiano:** Hoy en día existe una creciente preocupación por las infecciones contraídas en hospitales y aquellas que se originan en la industria procesadora de alimentos. Las propiedades bactericidas, fungicidas y, en cierta medida, antiviral del cobre, de los compuestos de cobre y de las aleaciones de cobre se han conocido durante siglos. El cobre y las aleaciones de cobre en superficies han demostrado ser un importante factor para disminuir la transmisión de enfermedades bacterianas y fúngicas en lugares de asistencia a la salud y en los sistemas de tratamiento de aire. Es por esto que esta propiedad ha tomado gran interés en el último tiempo ³.

Mecanismo acción

Los mecanismos antimicrobianos del cobre son complejos y pueden actuar a través de varias vías, ya sea dentro de las células microbianas como en los espacios extracelulares²². Un factor crítico en la actividad antimicrobiana es la capacidad del cobre de donar y aceptar electrones, derivado de su alto potencial de oxidación y reducción. Esta propiedad electroquímica le permite al cobre alterar proteínas dentro de la célula microbiana de tal modo que éstas ya no puedan cumplir sus funciones metabólicas

Los estudios han demostrado además, que el cobre es responsable de inhibir el transporte de electrones a través de la pared celular entre el medio intracelular y el ambiente, es capaz asimismo de fijarse en el ácido nucleico (DNA) y desordenar la estructura helicoidal de esta molécula ^{7, 8, 23}.

Muerte celular mediada por contacto

El estudio de las propiedades antimicrobianas de superficies metálicas con cobre es relativamente reciente y cobró impulso cuando la EPA (Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos) registró casi 300 diferentes superficies de cobre con efecto antimicrobiano en el 2008. Antes de eso, una serie de estudios ya habían evaluado la cinética de la muerte celular por contacto al exponer bacterias al cobre o aleaciones de cobre. En general, los microorganismos fueron inactivados por el cobre en un periodo de horas, pero ciertos parámetros tales como las técnicas de inoculación, temperatura de incubación y concentración de cobre no fueron usualmente utilizados de manera sistemática, por lo que se vio dificultada la comparación entre los estudios. Sin embargo, se determinó que ciertos mecanismos aumentaron la eficacia de la muerte celular por contacto, como utilizar cobre o sus aleaciones con alta concentración ^{24,25}, incubación a altas temperaturas ⁷, alta humedad relativa ²⁴ y aplicación en seco de las superficies metálicas de cobre ⁸.

El mecanismo de la muerte celular por contacto, aún no puede ser explicado con claridad, pero se han identificado una serie de factores que contribuyen, dentro de los más importantes se encuentran⁸:

- 1) **“Cambio en la permeabilidad de membrana”**: está relacionado con la pérdida de los nutrientes vitales y agua a través de las perforaciones en la pared celular, causando su debilitamiento y finalmente la muerte. Iones de cobre pueden penetrar dentro de la célula mediante las perforaciones alterando procesos vitales de la célula, por ejemplo inactivación de enzimas, con esto se impide el transporte de nutrientes, mecanismos de reparación de la membrana y la multiplicación. Al comparar que tan significativo es el cambio

en la permeabilidad de la membrana, se ha visto que esta depende de la cantidad de ácidos grasos que esta posea, mientras mayor sea la cantidad de estos, mayor la permeabilidad ²⁶.

2) Alteración de proteínas: el cobre tiene la capacidad de alterar la función de un gran número de proteínas presentes en los microorganismos, tanto de la superficie celular como en su interior. El metal al estar en contacto con la célula, produce una alteración en sus proteínas, lo que lleva a una alteración de la estructura y función celular. Mientras mayor sea la concentración de cobre en el medio, más alta es la posibilidad de que las proteínas sean modificadas. Esto se explica a través de dos mecanismos ^{26,27}.

- Desplazamiento de metales esenciales desde los sitios de unión en las proteínas o mediante interacciones directas con alguna parte de esta. Lo que genera este proceso, son cambios conformacionales de la proteína o de sus sitios activos, lo que impide que esta pueda cumplir su función.
- Alteración de la forma de las proteínas mediante el ataque de radicales libres contra aminoácidos, especialmente histidina y prolina.

3) “Ruptura de la membrana externa”: todo organismo presenta un potencial transmembrana (micro - corriente eléctrica que estabiliza la pared) y se cree que el cobre en contacto con la pared altera esta corriente, debilitándola y generando perforaciones. Otra forma de generar estas perforaciones podría ser mediante la oxidación localizada del cobre al interactuar con componentes de la membrana del microorganismo como los lipopolisacáridos, esto en presencia de oxígeno. Esta ruptura de membrana se produciría en un inicio, dejando la parte interna del microorganismo intacta ²⁶.

4) Alteración de ácidos nucleicos: mediante la formación de enlaces, entre las cadenas y dentro de estas, el cobre es capaz de alterar la estructura en forma de hélice del ADN, generando la desnaturalización de la molécula ²⁶.

Debido a los múltiples daños que puede producir el cobre en los microorganismos, estos han ido evolucionando. Se han descrito varios mecanismos de tolerancia a este metal en variados géneros bacterianos, los que pueden participar en la homeostasis natural del cobre o conferir propiedades adicionales de resistencia a estas bacterias, permitiéndoles soportar elevadas concentraciones del metal. En general, ellos apuntan a la detoxificación de las formas iónicas del cobre tanto en el citoplasma como en el espacio periplasmático, involucrando ATPasas

como transportadores dependientes del gradiente de protones, y enzimas oxidativas, que tendrían la función de alterar el estado de oxidación de los iones de cobre disminuyendo su toxicidad ^{8,24}.

En 2008, la agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) reconoció al cobre como un potente agente antimicrobiano, aprobando su uso con la finalidad de eliminar riesgos microbiológicos en el ambiente intrahospitalario.

Dentro de sus propiedades sanitarias se destacan ²⁸:

- 1) Las superficies de cobre eliminan a 99.9% de los patógenos bacterianos alrededor de dos horas de exposición.
- 2) Las superficies de cobre son efectivas para eliminar al 99.9% de los patógenos bacterianos alrededor de 24 horas de exposición.
- 3) Las superficies de cobre permanecen efectivas para eliminar al 99.9% de los patógenos bacterianos dentro de dos horas de exposición aún después de repetidos episodios de humedecimiento y secado abrasiones y recontaminación.
- 4) Las superficies de cobre mantienen su actividad antibacteriana alcanzando el 99.9% de eliminación a las dos horas de exposición.
- 5) Las superficies de cobre impiden la multiplicación bacteriana entre las rutinas de limpieza y sanitización del ambiente.
- 6) Las superficies de cobre continúan eliminando a más del 99.9% de las bacterias antes de dos horas, después de repetidas contaminaciones en el período de 24 horas.

II.5 AGENTES ANTISÉPTICOS

II.5.1 Clorhexidina

Es una molécula bicatiónica, simétrica, de cuatro anillos de clorofenilo más dos grupos biguanida unidos por un puente central de hexametileno. Tiene amplio espectro de acción a un pH óptimo entre 5,5 y 8.

Químicamente se presenta de tres formas: como digluconato, acetato e hidrocloreuro ²⁹. En Odontología se suele utilizar en forma de digluconato de clorhexidina en solución acuosa o alcohólica.

In vitro, la clorhexidina tiene efectividad frente a bacterias Gram – y Gram + incluyendo a aerobios y anaerobios e incluso hongos y levaduras.

Los siguientes microorganismos muestran una alta susceptibilidad a la clorhexidina: *Streptococcus*, *Estafilococos*, *C. albicans*, *Escherichia coli*, *Salmonellas*, y bacterias anaeróbicas³⁰.

Mecanismo de acción

Al ser una base fuerte dicatiónica a pH superior a 3,5 con dos cargas positivas en cada extremo del puente de hexametil, es altamente interactiva con los aniones, siendo esto relevante para su eficacia, seguridad, efectos secundarios locales y dificultad para formularla en productos²⁹.

Se absorbe sobre la superficie bacteriana, cargada negativamente, provocando por ósmosis la rotura de la membrana celular. A bajas concentraciones actúa como bacteriostático y da como resultado la pérdida de los constituyentes citoplasmáticos de bajo peso molecular mientras que a concentraciones elevadas tiene una acción bactericida determinando la coagulación del citoplasma.

Además posee alta sustentividad, es decir, una vez adsorbida su liberación será gradual, de 8 a 12 horas e incluso hasta después de las 24 horas²⁹.

Su pH óptimo de acción se encuentra entre 5,5 y 7, y en función de éste ejerce su acción frente a diferentes bacterias. Con un pH entre 5,0 y 8,0 es activa frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas²⁹.

En boca se adsorbe rápidamente a las superficies, incluidos los dientes con película adquirida, proteínas salivales y a la hidroxiapatita, los estudios parecen indicar que su acción inhibitoria es únicamente debida a la clorhexidina unida a la superficie de los dientes. Es posible que la molécula se adhiera a la superficie por un catión, dejando los otros libres para interactuar con las bacterias que intentan colonizar la superficie del diente. Esto explicaría porque las pastas con una base de sustancias aniónicas como el lauril sulfato sódico reducen la inhibición de la placa por la clorhexidina si se usan poco después de los colutorios²⁹.

La clorhexidina posee una serie de presentaciones, como barnices, colutorios, aplicaciones tópicas, soluciones irrigadoras, gel y chip. Dependiendo de su presentación será su indicación, pero en general se utiliza para:

- Enjuagues bucales en el tratamiento de la gingivitis y de la enfermedad periodontal.

- Como sustancia irrigadora durante tratamientos radiculares.
- Control de *S. mutans* en pacientes con alta actividad de caries (quimioterapéutico)
- Embarazas y madres con alta vulnerabilidad a las caries, destinado a controlar la primo-infección con *S. mutans* en el niño.
- Profilaxis y prevención de infecciones pre y post quirúrgicas de la boca.
- La estomatitis, la estomatitis ulcerativa y la gingivitis aguda ulcerativa necrotizante.
- Se incorpora en una serie de instrumentos médicos, como catéteres intravenosos, vendajes antimicrobianos e implantes dentales.
- También es utilizada a largo plazo en pacientes inmunodeprimidos y discapacitados físicos o psíquicos.

II.5.2 Alcohol

Es un líquido incoloro y transparente, libre de sedimento de partículas en suspensión y de material extraño. Es volátil e inflamable. Se le añaden desnaturizantes para darle un sabor desagradable y de esta manera evitar la ingesta oral, éstos son productos químicos no tóxicos y amargos, como el benzoato de denatonium, octaacetato de sacarosa, metilisobutilcetona o el dietilftalato.

La concentración de alcohol se expresa en porcentaje en volumen.

Fórmula química: C_2H_5OH

Además de ser antimicrobiano, es un buen solvente de otros productos, entre ellos muchos antisépticos y desinfectantes, potenciando su actividad.

Mecanismo de acción

Actúa mediante la destrucción de la membrana celular y la desnaturización de las proteínas de los microorganismos. Ésta sólo es posible en presencia de agua, ya que esta retrasa la evaporación y aumenta el tiempo de contacto, y por esto el alcohol absoluto presenta menor poder bactericida que aquellos con agua³¹. Podría tener cierta acción bacteriostática al inhibir la producción de metabolitos esenciales para la división celular rápida.

Su acción es rápida, incluso desde los 15 segundos, aunque no tiene efecto persistente³¹.

Espectro:

Actúa sobre bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, incluyendo micobacterias, hongos y virus (hepatitis B y VIH), pero no son esporicidas.

El etanol al 70% destruye alrededor del 90% de las bacterias cutáneas en dos minutos, siempre que la piel se mantenga en contacto con el alcohol sin secarlo. Los alcoholes se inactivan en presencia de materia orgánica ³¹.

Usos:

Son ampliamente usados para desinfección de superficies o antisepsia de la piel. A bajas concentraciones pueden ser usados como preservantes y para potenciar la actividad de otros biocidas.

Se puede encontrar en forma de gel o en solución. Los más usados son el alcohol etílico o etanol y el alcohol isopropílico y las concentraciones varían entre el 70% y el 96% para el primero y entre el 70% y el 100% para el segundo. Aunque sus aplicaciones son idénticas, se suele usar habitualmente el etanol por ser el menos irritante.

II.6 Medios de cultivo

Los medios de cultivo son preparados que intentan reproducir artificialmente las condiciones del hábitat natural de las bacterias. Sus componentes deben satisfacer las necesidades nutricionales de las bacterias que se estudiarán, para permitir su crecimiento y multiplicación ³².

Composición

Hay una gran cantidad de sustancias que se incorporan a los medios de cultivo, dentro de las más importantes se encuentran ³²:

- **Agua:** elemento universal para la vida.
- **Peptonas:** Se obtienen por hidrolisis ácida o enzimática de proteínas. Constituyen una fuente de nitrógeno, carbono y azufre.
- **Hidratos de carbono:** el más utilizado es la glucosa. Tras su degradación enzimática por los microorganismos, constituyen una fuente de energía y de carbono.

- **Extracto de carne:** es un concentrado de elementos hidrosolubles de composición indefinida (corazón, cerebro, hígado, músculo, etc.)
- **Extracto de levadura:** fuente importante de aminoácidos, vitaminas y factores de crecimiento.
- **Suero o sangre de caballo y vitaminas:** elementos útiles para microorganismos exigentes.
- **Cloruro de sodio:** equilibra la presión osmótica del medio.
- **Minerales:** como el calcio, hierro, manganeso, magnesio, etc.
- **Agentes solidificantes:** se utilizan para dar a los medios de cultivo una consistencia semisólida o sólida. El más utilizado es el agar, polímero obtenido de las algas rojas. Por debajo de los 45°C comienza a solidificarse, dando lugar a un gel resistente a la hidrólisis bacteriana. Otros agentes son el silicato sódico al 10% y la gelatina.

Preparación

Para su preparación, las sustancias que componen el medio de cultivo deben ser disueltas en agua y calentadas para favorecer la disolución de la mezcla, una vez que esta esté homogénea se ajusta al pH óptimo. Luego deben ser dispensados en tubos de ensayos o placas Petri para su posterior esterilización ³².

Condiciones para incubación de un cultivo

Las condiciones necesarias para la incubación de un medio de cultivo son ³².

- **Temperatura:** la óptima para el crecimiento bacteriano es de 36°C ± 1°C.
- **Atmósfera:** depende del tipo de respiración del microorganismo. Las bacterias aerobias y anaerobias facultativas se incuban en presencia de oxígeno; las anaerobias estrictas requieren de un 85% de nitrógeno, 10% hidrógeno y 5% de dióxido de carbono.
- **Presión osmótica:** concentración de un 1% de Cloruro de sodio.
- **Humedad:** favorece el crecimiento de los microorganismos.

- **PH:** el crecimiento bacteriano es favorable a los pH cercanos a la neutralidad.

Clasificación de los medios de cultivo³²:

1. Según su contenido

- **Definidos o sintéticos:** se conoce perfectamente su composición química.
- **No sintéticos o empíricos:** no se conoce la composición exacta. Son los más utilizados (ejemplo; caldo Schaedler, agar cerebro-corazón).

2. Según su estado

- **Líquidos:** se denominan caldos. Sus constituyentes están disueltos en agua sin sustancias solidificantes. Se utilizan para inocular muestras o cuando se cultiva un único microorganismo.
- **Semisólidos:** contienen agar en menos de un 1%. Se utilizan para analizar alguna característica especial de las bacterias.
- **Sólidos:** contienen agar en un 1.5-2%.

3. Según su utilización en el laboratorio

- **Básicos:** para bacterias no exigentes, contienen los nutrientes mínimos para su desarrollo.
- **Enriquecidos:** medios básicos que se suplementan con nutrientes como sangre y suero, para bacterias muy exigentes.
- **Selectivos:** permiten el crecimiento de algunas especies y la inhibición de otras.
- **Diferenciales:** llevan incorporadas determinadas sustancias que pondrán de manifiesto visualmente la presencia de alguna característica bioquímica de la bacteria.

Medios de cultivo para *Streptococcus mutans*

Para su aislamiento y posterior identificación existen diferentes medios de cultivo ³³:

Sólidos

- **No selectivos:** agar sangre.
- **Selectivos para *Streptococcus* orales:** agar mitis-salivarius (MSA), que contiene un 5% de sacarosa e inhibidores de otras bacterias como telurito potásico, azul tripán y cristal violeta.
- **Selectivos para grupo *mutans*:** mitis-salivarius-bacitracina (MSB), similar al anterior pero con 0.2 U/ml de bacitracina y sacarosa al 30%.
- **Agar con tripticasa, extracto de levadura, cisteína, sacarosa y bacitracina (TYCSB):** es uno de los más utilizados, ya que es un medio económico y de fácil preparación ¹¹. Este agar permite el aislamiento selectivo de especies de *Streptococcus* productores de caries dentales, tales como el *S. mutans*, *S. sobrinus* y *S. sanguis*, esto es facilitado por el contenido de bacitracina que inhibe la flora acompañante.

Debido a que son anaerobios facultativos, la temperatura óptima para su desarrollo es de 36 \pm 1°C, y se aconseja incubar las placas inoculadas 24 horas en anaerobiosis y posteriormente 24 horas en aerobiosis lo que favorece la formación de agua oxigenada que es un importante carácter diferencial por la síntesis de polisacáridos extracelulares que facilita el reconocimiento de las colonias.

Líquidos

En estos casos pueden utilizarse distintos caldos siempre y cuando cuenten con los nutrientes adecuados para su desarrollo, como por ejemplo: caldo cerebro-corazón (BHI), caldo con soja tripsinizada (TSB) y caldo Schaedler ³².

Medio de cultivo para *Cándida spp.* Agar Mueller-Hinton

Medio de cultivo recomendado universalmente para la realización de la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos, mediante el método de difusión en disco. Esto por ser un medio de cultivo nutritivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano.^{34,35, 36}

Por su composición ha sido recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), para ser utilizado en forma rutinaria en la realización del antibiograma en medio sólido, debido a que presenta buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad y porque la mayoría de los patógenos microbianos crece satisfactoriamente, entre otros³⁶.

Cuando se suplementa con sangre de carnero al 5%, permite realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en especies de *Streptococcus*³⁷.

Composición (en gramos por litro)

Infusión de carne..... 300

Peptona acida de caseína..... 17.5

Almidón..... 1.5

Agar..... 1.5

PH final 7.3 ± 0.1

Preparación:

Suspender 37 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Dejar embeber de 10 a 15 minutos. Calentar con agitación frecuente y hervir durante un minuto para disolución total. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 45-50°C y distribuir en placas Petri estériles, en volumen apropiado para que el espesor sea de 4mm sobre una superficie horizontal³⁷.

Previo a su distribución en placas de Petri, puede ser suplementado con 5% de sangre ovina desfibrinada estéril (Britasheep) preparándose así Mueller Hinton Sangre Agar³⁷

Características del producto:

Medio de cultivo deshidratado: color beige, homogéneo, libre deslizamiento.

Medio de cultivo preparado: color ámbar claro.

Suplementado con sangre: color rojo cereza.

Almacenamiento:

Medio de cultivo deshidratado a 10-35 °C.

Medio de cultivo preparado a 2-8 °C.

Incubación: 35°C± 2°C por 24 horas.

II.7 Métodos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Su realización se desarrolla mediante las pruebas de sensibilidad o antibiograma, cuyo principal objetivo es evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos, traduciendo, en una primera aproximación, su resultado como factor predictivo de la eficacia clínica.

El antibiograma define la actividad in vitro de un antibiótico frente a un microorganismo determinado y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana³⁶.

Existen varios métodos, dentro de los más destacados encontramos³⁸:

1. Métodos de difusión

- Por discos
- Epsilometría (E-test)

2. Métodos de dilución

- Dilución en agar
- Dilución en caldo

Método de difusión por discos

Método basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores, es uno de los métodos que el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos³⁶.

Consiste en depositar, en la superficie del agar de una placa Petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona o halo de inhibición del desarrollo microbiano.

Luego se realiza una medición del diámetro del halo y se compara con estándares para cada antimicrobiano y cepa y se establece si esta última es sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) según las categorías establecidas por el CLSI.

Es un método fácil de realizar, rápido y barato. Aplicable a una amplia variedad de bacterias y hongos. Sin embargo, este tipo de método no permite una lectura directa del valor de la Concentración mínima inhibitoria (CMI).

Lectura de los resultados

La lectura debe realizarse a las 18-24 horas de incubación. La placa debe sostenerse unos centímetros por sobre una superficie negra e iluminarse con luz reflejada. Sólo si el crecimiento fuese insuficiente a las 24 horas, leer las placas a las 48 horas.

Método de difusión E-Test

El principio de este método es una expansión de la técnica de difusión en disco. Con este método podemos, mediante lectura directa, determinar la concentración inhibitoria mínima (CMI).

Consiste en una tira de plástico no poroso de 6 cm de largo por 5 mm de ancho que incorpora un gradiente predefinido de antimicrobiano equivalente a 15 diluciones. El protocolo para preparar el inóculo es el mismo que para la difusión en disco. Siguiendo el método de difusión, una vez inoculado la placa de agar con el microorganismo, se coloca la tira de E-test sobre su superficie, produciéndose de forma inmediata una difusión del antibiótico desde el soporte hasta el agar, creándose de este modo a lo largo de la tira un gradiente exponencial de las concentraciones del antimicrobiano. Tras la incubación de las placas, se puede observar una zona de inhibición elipsoidal y simétrica. Después de la incubación la CMI será el valor obtenido en el punto en el que el extremo de inhibición intersecciona con la tira.

En este método la orientación de la tira es muy importante, ya que si la colocamos al revés no se observa elipse de inhibición ya que la gradiente de concentraciones se sitúa solo sobre una de las caras de la tira. Se ha utilizado para determinar la CMI de diversos antibióticos en una amplia gama de bacterias, incluyendo *Helicobacter pylori*, *Corynebacterium spp.*, *Streptococcus* nutricionalmente deficientes, *Enterococos* con resistencia elevada a aminoglicósidos.

El E-test se considera como un método alternativo para el estudio cuantitativo de la sensibilidad antimicrobiana del que cabe destacar su sencillez y buena correlación con la técnica estándar de dilución en agar para el estudio de la CMI.

Métodos de dilución

Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar).

- **En agar:**

En estos métodos se incorpora el antimicrobiano a evaluar a un medio con agar. El antimicrobiano se añade cuando el medio aún está fundido. Para lograr el rango de dilución deseado se prepara una serie de placas, cada una con una determinada concentración de antimicrobiano. Las placas se inoculan con un replicador una vez que se haya solidificado el medio de cultivo. El número de placas de cada concentración a preparar vendrá dado por el número de microorganismos que se vaya a estudiar, teniendo en cuenta que la mayoría de los replicadores permiten inocular entre 32 y 36 organismos.

En la mayoría de los casos, el medio de cultivo a emplear es agar Mueller-Hinton, pero en función de los microorganismos y de sus necesidades nutritivas puede ser adecuado o necesario añadir algún suplemento a este medio, o emplear un medio diferente.

- **En caldo:**

El CLSI recomienda para la mayoría de los microorganismos utilizar caldo Mueller-Hinton, al que se añadirán los suplementos necesarios para asegurar el crecimiento de organismos exigentes. El medio debe tener un pH de 7.2 a 7.4 y estar ajustado con Ca²⁺ (20-25 mg/l) y Mg²⁺ (10-12.5 mg/l).

Existen dos modalidades de los métodos de dilución, en las que se utilizan tubos (macrométodo) o placas de microtitulación (micrométodo).

III. OBJETIVOS

Objetivo General:

- Evaluar la actividad antimicrobiana in vitro del gel de cobre (Copper Clean®) en cultivos de *Streptococcus mutans* y *Cándida spp.*

Objetivos específicos:

- Comparar el efecto antimicrobiano in vitro del gel de cobre (Copper Clean®) con clorhexidina al 0,12% sobre *S. mutans*, *C. albicans* y *C. parapsilosis*.
- Evaluar el efecto antimicrobiano in vitro del gel de cobre (Copper Clean®), en el tiempo sobre *S. mutans*, *C. albicans* y *C. parapsilosis*.

IV. HIPÓTESIS

- El gel de cobre Copper Clean®, presenta actividad antibacteriana in vitro sobre *S. mutans*.
- El gel de cobre Copper Clean®, presenta actividad antifúngica in vitro sobre *C. albicans* y *C. parapsilosis*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 Diseño

Estudio de tipo analítico experimental in vitro.

V.2 Universo

- Todas las cepas de *S. mutans*, aisladas a través del test CRT® Bacteria en la Facultad de Odontología, de la Universidad de Valparaíso.
- Todas las cepas de *C. albicans* y *C. parapsilosis* presentes en el Laboratorio de Micología de la Facultad de Medicina, de la Universidad de Valparaíso.

V.3 Muestra

- Colonias de *S. mutans* cultivadas en Agar Mueller-Hinton suplementado con sangre de cordero al 5%, en el Laboratorio de Micología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso.
- Colonias de *C. albicans* ATCC 90028 y *C. parapsilosis* ATCC 2299 cultivadas en Agar Mueller-Hinton en el Laboratorio de Micología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso.

Unidad muestral:

Colonias de *S. mutans* y *C. albicans*, *C. parapsilosis*.

V.4 Selección y tamaño de la muestra

Para la determinación del tamaño muestral nos basamos en el método de tripleta, utilizado por diversos estudios de investigación. Este consiste en utilizar el menor número impar posible, 3, para que en caso de alguna diferencia, el tercero en discordia defina el resultado.

Con el fin de obtener mayor certeza en los resultados decidimos triplicar el tamaño muestral, de manera que utilizamos 9 preparaciones para cada microorganismo de interés. Al ser tres los microorganismos a estudiar, el tamaño total de las muestras fue de 27 preparados.

V.5 Criterios de inclusión:

- Cepas de *S. mutans* aisladas a través del test CRT® Bacteria en las Clínicas Odontológicas de la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso.
- Cepas de *C. albicans* ATCC 90028 y *C. parapsilosis* ATCC 2299 presentes en el Laboratorio de Micología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso.
- Medios de cultivos y cepas de *S. mutans* y *Cándida spp.*, que no hayan estado expuestos a condiciones de riesgo de mantención de los estándares predefinidos (contaminación, temperatura, pH, corte de luz u otro).

V.7 Variables

Variables dependientes

- Halo de inhibición en cultivos de *S. mutans*.
- Halo de inhibición en cultivos de *C. albicans* y *C. parapsilosis*.

Variables Independientes

- Gel de cobre (Cooper Clean®) al 0,0001%.
- Clorhexidina en solución al 0,12%.
- Alcohol gel.
- Agua destilada.

V.8 Definiciones conceptuales/ operacionales

Definiciones conceptuales:

- **Halo de inhibición:** área que rodea al disco de sensibilidad marcando la zona en que los respectivos antimicrobianos han inhibido el crecimiento del microorganismo en estudio.
- **Gel de cobre Copper Clean®:** Gel higienizante antimicrobiano en base a nano partículas de cobre, libre de alcohol. El cobre que presenta esta incorporado mediante el colorante cosmético CI 77400, reconocido como tal por el ISP. El cobre presente es de una pureza del 99,997% y se encuentra en una concentración del 0,0001 %.

- **Clorhexidina:** es una sustancia antiséptica de acción bactericida y fungicida. Pertenece al grupo de las biguanidas y se utiliza ampliamente en odontología en concentraciones del 0,05% al 2% en presentaciones para el uso oral.
- **Alcohol gel:** sustancia incolora antiséptica, usada en la higienización de manos y antebrazos. Posee alcohol etílico al 70%, que es el activo germicida que proporciona un rápido y seguro efecto antiséptico actuando sobre la mayoría del espectro de las bacterias Gram positivas y Gram negativas.
- **Agua destilada:** es aquella agua cuya composición se basa en la unidad de moléculas de H₂O. Es aquella a la que se le han eliminado las impurezas e iones mediante destilación.

Definiciones operacionales:

- **Presencia de Halo de inhibición:** Variable cualitativa dicotómica.
Valores de la variable: SI-NO
- **Diámetro del halo de inhibición:** variable cuantitativa continua, medida en milímetros.
- **Gel de Cobre Copper Clean®:** Variable cuantitativa continua, medida en gramos.
- **Clorhexidina:** Variable cuantitativa continua, medida en gramos.
- **Alcohol gel:** Variable cuantitativa continua, medida en gramos.
- **Agua destilada:** Variable cuantitativa continua, medida gramos.

V.9 Procedimiento experimental

El estudio fue realizado en el Laboratorio de Micología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso, bajo supervisión del Doctor Rodrigo Cruz Choappa, docente de la Cátedra de Micología.

Se trabajó con dos especies de *Cándida*; *C. albicans* ATCC 90028 y *C. parapsilosis* ATCC 2299, ambas facilitadas por el Laboratorio de Micología y con cepas de *S. mutans*, las cuales fueron aisladas a través del cultivo de saliva en el test CRT® Bacteria.

El medio de cultivo para determinar sensibilidad, Mueller-Hinton, fue preparado en el Laboratorio de Micología según recomendaciones internacionales y el medio Agar Mueller-Hinton suplementado con sangre de cordero al 5% para *S. mutans*, fue adquirido a través del Laboratorio Linsan SA.

El gel de cobre (Cooper Clean®) fue adquirido en el comercio.

La clorhexidina se preparó mediante recetario magistral, en una concentración de 0,12% en solución.

La preparación de los medios de cultivo y evaluación del método de sensibilidad por discos, se detalla en los Anexos 1, 2, 3 y 4.

Detalle del procedimiento

Se realizó un estudio in vitro con la finalidad de evaluar el efecto antimicrobiano del gel de cobre (Copper Clean®), mediante métodos de difusión por discos, sobre colonias de *S. mutans*, *C. albicans* y *C. parapsilosis*.

Se prepararon un total de 27 medios de cultivos en placas Petri, con Agar Mueller-Hinton para *Cándida spp.* y Agar Mueller-Hinton suplementado con sangre de cordero al 5% para *S. mutans*. Los cuales posteriormente fueron inoculados con las cepas en estudio.

En cada placa Petri se colocaron cuatro discos de gasas estériles de 10 mm de diámetro, impregnados con aproximadamente 0.03 gramos de gel de cobre (Copper Clean®) al 0,0001%, de clorhexidina al 0,12%, de alcohol gel y de agua destilada. Posterior a esto, las 18 placas inoculadas con *Cándida* se cultivaron a 37°C y evaluadas a las 24-48 horas y 7 días. Las 9 placas inoculadas con *S. mutans* fueron cultivadas a 37°C en un ambiente de anaerobiosis, esto logrado mediante una campana Gaspack y una pastilla efervescente liberadora de CO₂, y evaluadas a las 16-24-48 horas y 7 días.

Se aplicó clorhexidina al 0,12% en solución como control positivo debido a su conocida eficacia como antimicrobiano en el uso odontológico, específicamente en el área de la periodoncia. Escogimos la presentación de 0,12%, la que es utilizada principalmente como antiséptico de tratamiento, debido a que es el enfoque que queremos dar a la aplicación del cobre en la odontología. Y alcohol gel como segundo control positivo, para representar el mismo vehículo utilizado con el gel de cobre y por su conocida acción antimicrobiana. Por otro lado se empleó agua destilada como control negativo, por ser una sustancia libre de impurezas.

Análisis estadístico

Para realizar este estudio se implementó el software estadístico SPSS Statistics versión 22. Los datos fueron analizados mediante la prueba de Anova, que evalúa la diferencia entre los promedios de dos o más muestras. Y el test HSD Tukey, aplicado al presentarse diferencias significativas entre los grupos de estudio.

VI. RESULTADOS

VI.1 ESTADISTICA DESCRIPTIVA

La base de datos de la evaluación del halo de inhibición en *S. mutans* y *Cándida spp.*, con los cuatro tratamientos recibidos, se presenta en el Anexo 5.

A continuación se presentan las **Tabla III** y **IV** que corresponde al análisis descriptivo de los cuatro tratamientos aplicados a *S. mutans*.

Tratamiento	Presencia de halo de inhibición	
	Si	No
Gel de cobre	9	0
Clorhexidina	9	0
Alcohol gel	0	9
Agua destilada	0	9

Tabla III. Presencia de halo de inhibición en *S. mutans*, con los cuatro tratamientos aplicados.

Tratamiento	Media a las 16 horas	Media a las 24 horas	Media a las 48 horas	Media a los 7 días
Gel de cobre	13,44 mm	3,67 mm	1,22 mm	0 mm
Clorhexidina	20,44 mm	20,33 mm	20,22 mm	20,22 mm
Alcohol gel	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Agua destilada	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm

Tabla IV: Medias del diámetro del halo de inhibición en *S. mutans* con los cuatro tratamientos, en el tiempo.

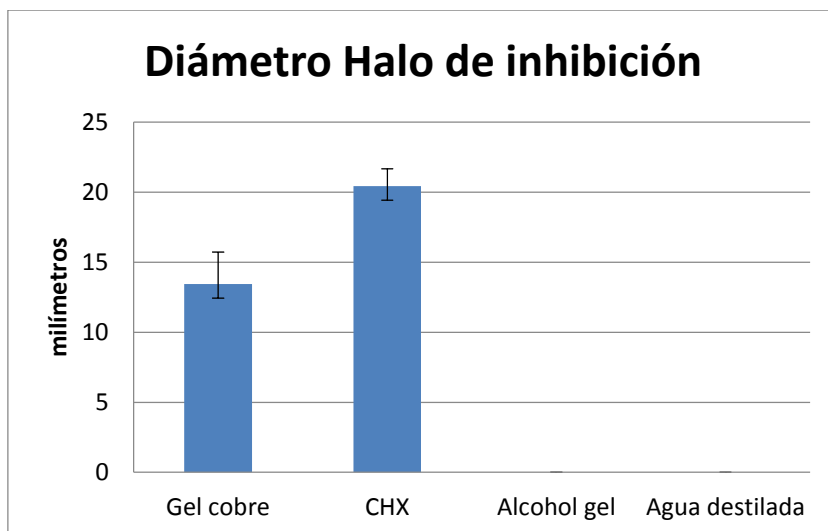


Figura 1. Medias del diámetro del halo de inhibición en *S. mutans*, a las 16 horas, con los cuatro tratamientos.

La **Figura 1** muestra que la inhibición para el *S. mutans* a las 16 horas es mayor con la clorhexidina con 20,44 mm, seguida por el gel de cobre con una media de 13,44 mm. No se observa efecto para el alcohol gel.

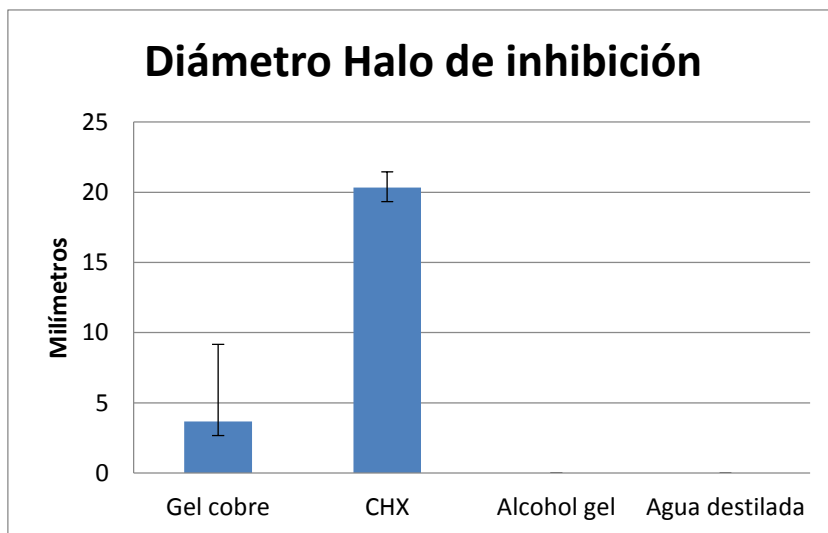


Figura 2. Medias del diámetro del halo de inhibición en *S. mutans*, a las 24 horas, con los cuatro tratamientos.

En la **Figura 2** vemos que la inhibición a las 24 horas es mayor con la clorhexidina con una media de 20,33 mm, valor similar obtenido con la evaluación realizada a las

16 horas. La media del gel de cobre es de 3,67 mm, presentando una marcada disminución en su efecto inhibitorio. El alcohol gel no presenta efecto.

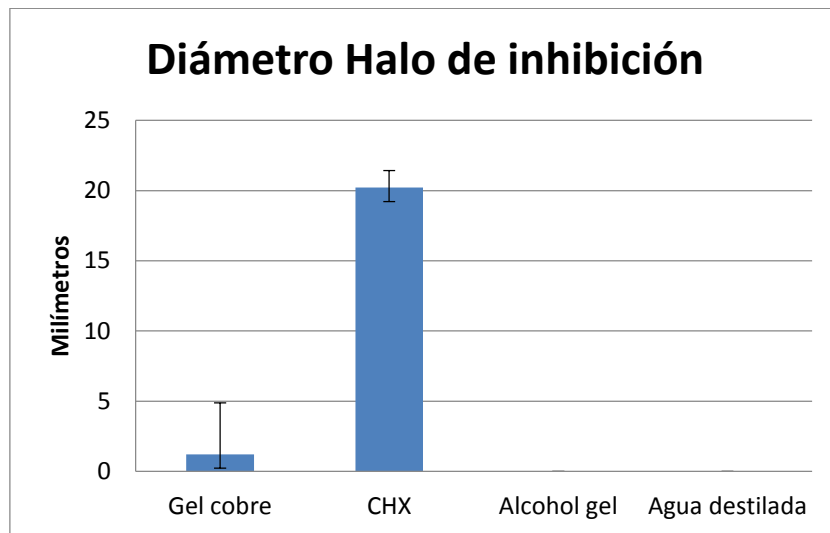


Figura 3. Medias del diámetro del halo de inhibición en *S. mutans*, a las 48 horas, con los cuatro tratamientos.

En la **Figura 3** observamos que la mayor inhibición alcanzada a las 48 horas está dada por la clorhexidina, mostrando valores similares a las dos evaluaciones previas. Por su parte el gel de cobre presenta una media cercana a los 0 mm, teniendo así un efecto inhibitorio prácticamente nulo. El alcohol gel no presenta efecto.

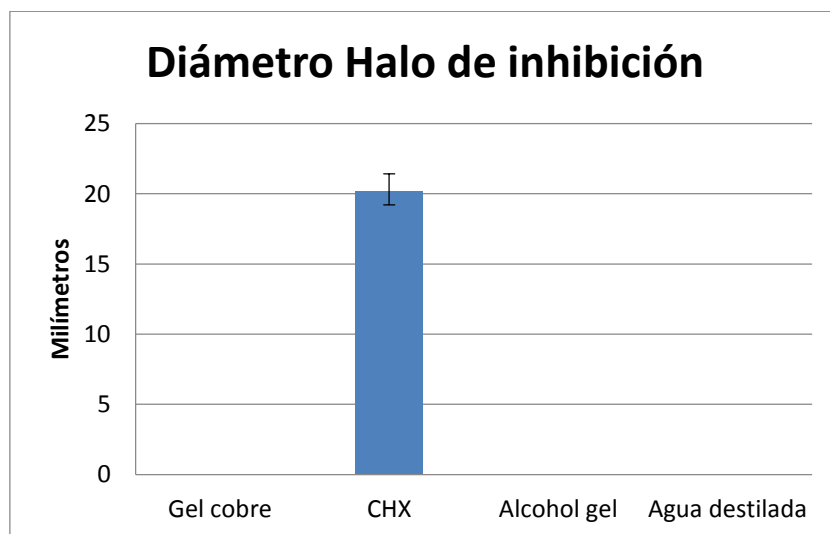


Figura 4. Medias del diámetro del halo de inhibición en *S. mutans*, a los 7 días, con los cuatro tratamientos.

En la **Figura 4** se aprecia que a los 7 días sólo se presenta inhibición del *S. mutans* con la clorhexidina. Mientras que el gel de cobre y el alcohol gel no presentan efecto.

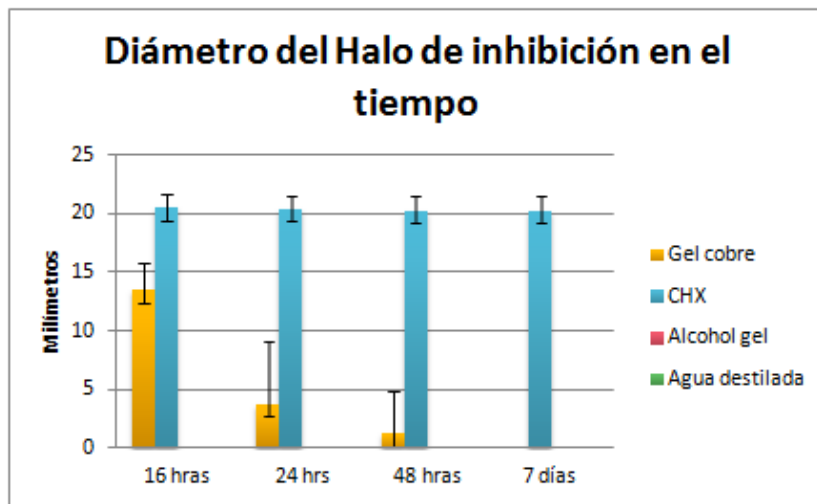


Figura 5. Medias del diámetro del halo de inhibición en *S. mutans*, en el tiempo, con los cuatro tratamientos.

En la **Figura 5** vemos que para el *S. mutans*, la mayor inhibición alcanzada está dada por la clorhexidina, siendo mayor a las 16 horas manteniendo su efecto hasta los 7 días. En el caso del gel de cobre se alcanza la mayor inhibición a las 16 horas, su efecto va disminuyendo en el tiempo llegando a 0 a los 7 días. Esto explicaría que el gel ante el *S. mutans* tiene un efecto bacteriostático y no bactericida.

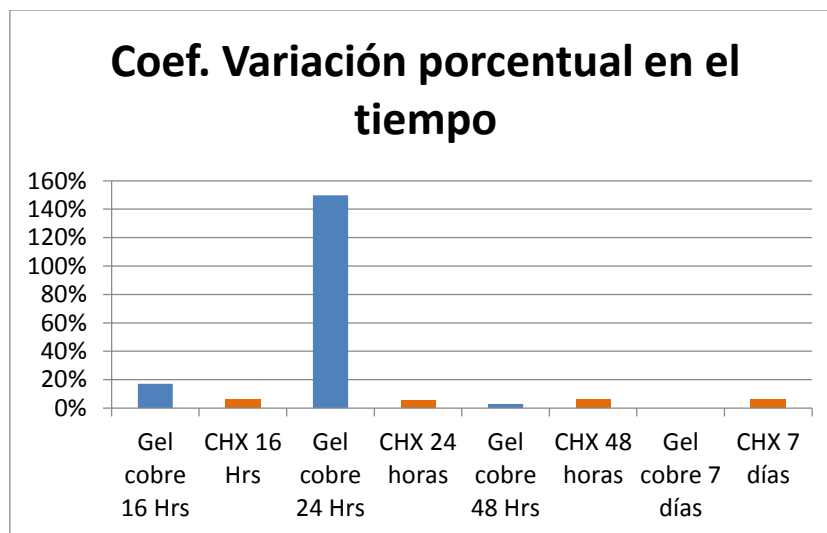


Figura 6. Coeficiente de variación porcentual en *S. mutans*, en el tiempo, con gel de cobre y clorhexidina.

El coeficiente de variación es una calificación que permite evaluar la calidad estadística de las estimaciones. Mientras mayor sea el coeficiente de variación, existe una mayor heterogeneidad de los valores de la variable. Considerándose valores hasta de un 10% como aceptables.

En la **Figura 6** podemos observar que el mayor coeficiente de variación está dado por el gel de cobre, esto durante los tres periodos de evaluación, alcanzando un valor cercano a 150%, en la evaluación a las 24 horas, lo que evidencia una alta heterogeneidad entre en los valores obtenidos, lo que se corresponde con datos muy inestables. Mientras que para la clorhexidina esta variación es menor y más estable.

A continuación se presentan las **Tablas V y VI** que corresponde al análisis descriptivo de los 4 tratamientos aplicados a *C. albicans*.

Tratamiento	Presencia de halo de inhibición	
	Si	No
Gel de cobre	9	0
Clorhexidina	9	0
Alcohol gel	0	9
Agua destilada	0	9

Tabla V. Presencia de halo de inhibición en *C. albicans*, con los cuatro tratamientos aplicados.

Tratamiento	Media a las 24 horas	Media a las 48 horas	Media a los 7 días
Gel de cobre	33,56 mm	32,56 mm	33 mm
Clorhexidina	20 mm	20,44 mm	20 mm
Alcohol gel	0 mm	0 mm	0 mm
Agua destilada	0 mm	0 mm	0 mm

Tabla VI: Medias del diámetro del halo de inhibición en *C. albicans* con los cuatro tratamientos, en el tiempo.

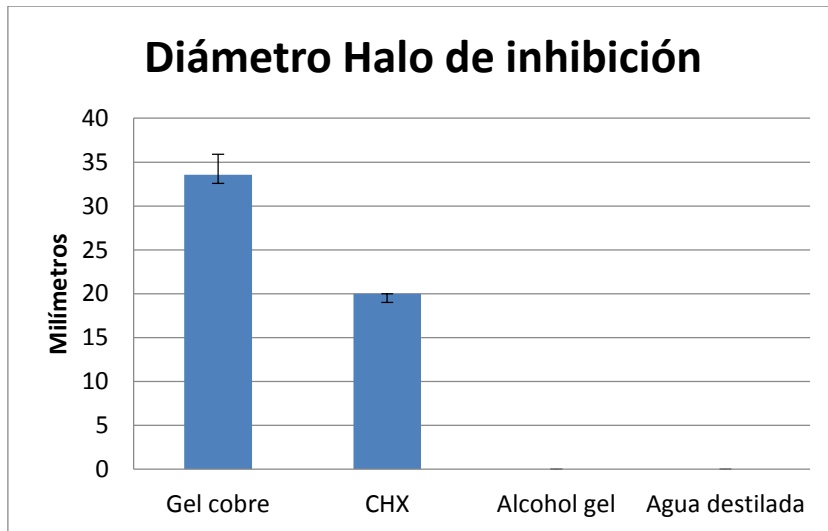


Figura 7. Medias del diámetro del halo de inhibición en *C. albicans*, a las 24 horas con los cuatro tratamientos.

La **Figura 7** refleja las medias del diámetro del halo de inhibición en *C. albicans*, a las 24 horas con los cuatro tratamientos. La mayor inhibición se obtuvo con el gel de cobre, seguida por la clorhexidina, mientras que con el alcohol gel no se obtuvo efecto. Resultados similares se observaron a las 48 horas y a los 7 días, tal como se refleja en la **Figura 8** y **Figura 9**, respectivamente.

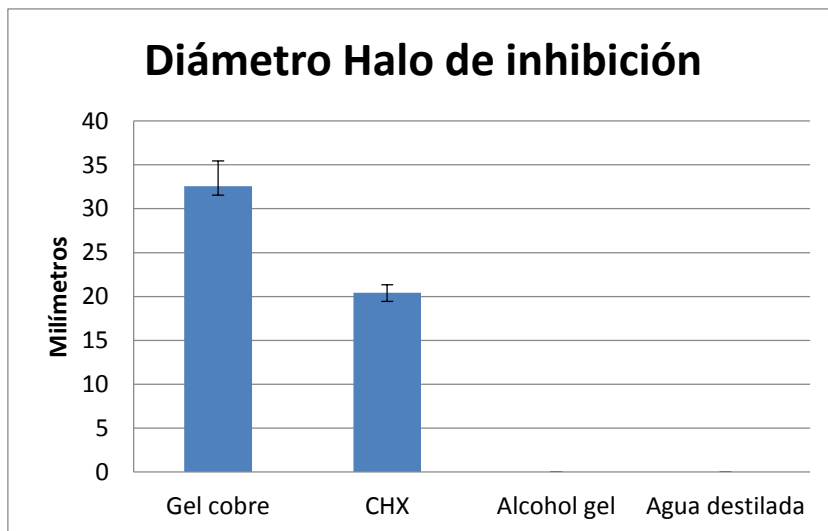


Figura 8. Medias del diámetro del halo de inhibición en *C. albicans*, a las 48 horas con los cuatro tratamientos.

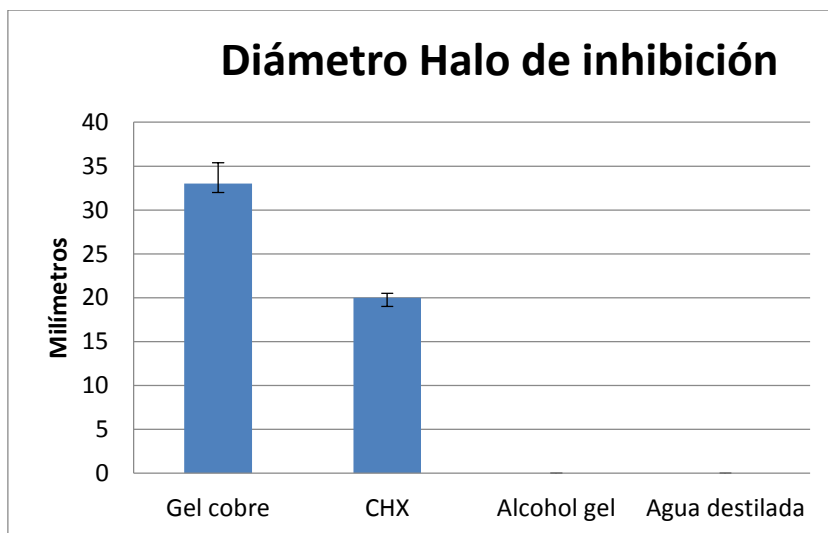


Figura 9. Medias del diámetro del halo de inhibición en *C. albicans*, a los 7 días con los cuatro tratamientos.

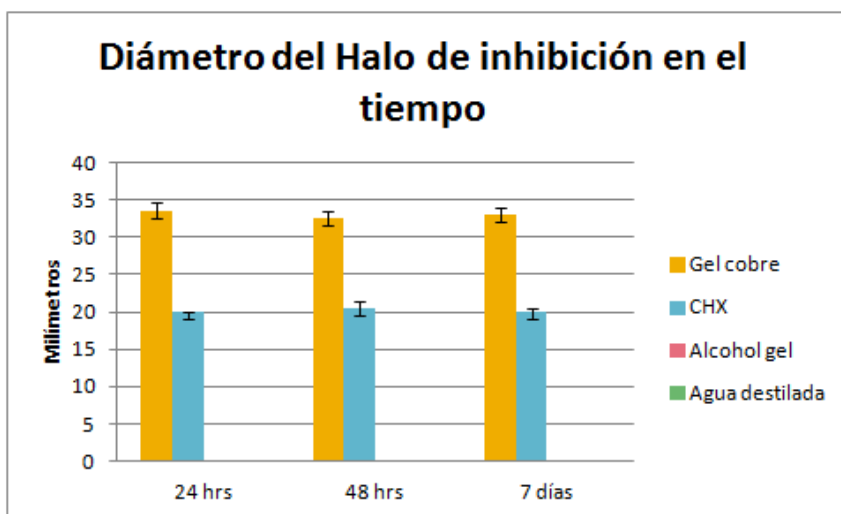


Figura 10. Medias del diámetro del halo de inhibición en *C. albicans*, en el tiempo, con los cuatro tratamientos.

En la **Figura 10** se observa que durante los tres periodos de evaluación de los cultivos, el que tuvo mayor actividad antimicrobiana fue el gel de cobre disminuyendo levemente su acción al cabo de los 7 días. Además se puede observar que tanto las medias del gel de cobre como de la clorhexidina se mantuvieron estables durante los tres periodos de evaluación.

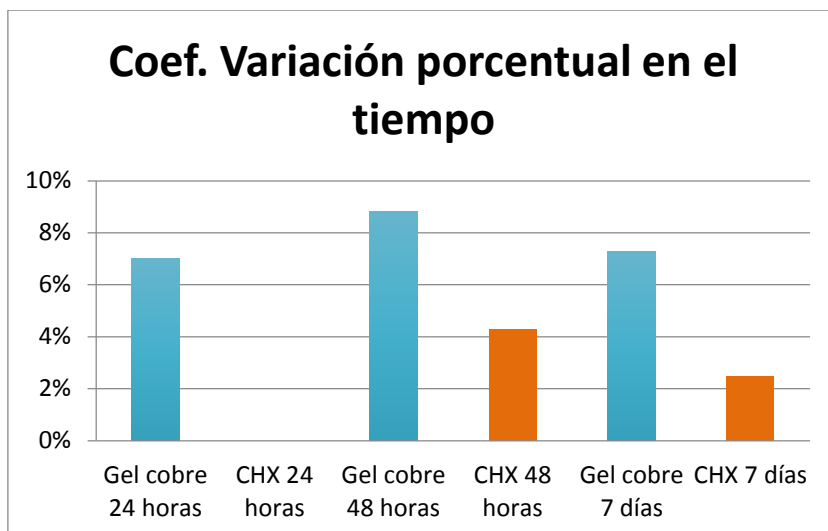


Figura 11. Coeficiente de variación porcentual en *C. albicans*, en el tiempo, con gel de cobre y clorhexidina.

En la **Figura 11**, se puede observar que el gel de cobre en relación a la clorhexidina, es el tratamiento que genera un mayor coeficiente de variación porcentual, esto en los tres periodos de evaluación, variando entre un 7%-9%. Mientras que con la clorhexidina se obtienen valores entre un 3%-5%. Porcentajes que en ambos casos determinan una precisión aceptable, correspondiente con datos consistentes y estables de baja heterogeneidad. Por lo que estos datos pueden ser extrapolables para otras investigaciones.

A continuación se presentan las **Tablas VII y VIII** que corresponde al análisis descriptivo de los cuatro tratamientos aplicados a *C. parapsilosis*.

Tratamiento	Presencia de halo de inhibición	
	Si	No
Gel de cobre	9	0
Clorhexidina	9	0
Alcohol gel	0	9
Agua destilada	0	9

Tabla VII. Presencia de halo de inhibición en *C. parapsilosis*, con los cuatro tratamientos aplicados.

Tratamiento	Media a las 24 horas	Media a las 48 horas	Media a los 7 días
Gel de cobre	27,38 mm	20,56 mm	18 mm
Clorhexidina	25,22 mm	25,89 mm	25,44 mm
Alcohol gel	0 mm	0 mm	0 mm
Agua destilada	0 mm	0 mm	0 mm

Tabla VIII: Medias del diámetro del halo de inhibición en *C. parapsilosis* con los cuatro tratamientos, en el tiempo.

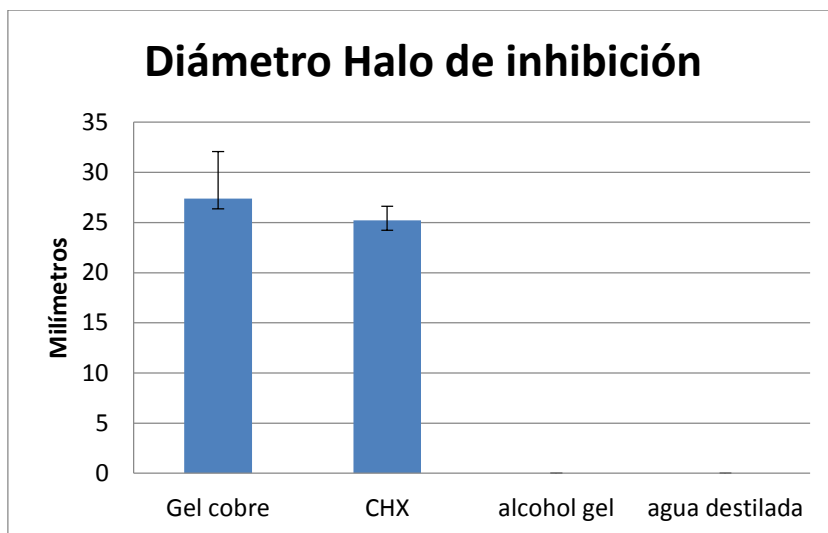


Figura 12. Medias del diámetro del halo de inhibición en *C. parapsilosis*, a las 24 horas con los cuatro tratamientos.

La **Figura 12** refleja que a las 24 horas se obtuvieron valores similares de inhibición con el gel de cobre y la clorhexidina, mientras que con el alcohol gel no se obtuvo efecto.

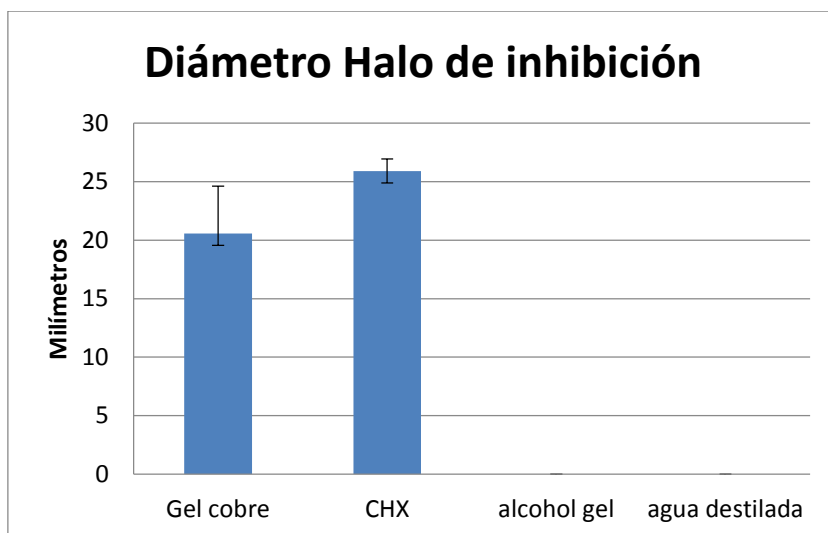


Figura 13. Medias del diámetro del halo de inhibición en *C. parapsilosis*, a las 48 horas con los cuatro tratamientos.

En la **Figura 13** se evidencia que a las 48 horas la inhibición es mayor con la clorhexidina, seguida por el gel de cobre. El alcohol gel y el agua destilada siguen sin presentar inhibición. En este momento de la evaluación la clorhexidina ha mantenido su efecto inhibitorio mientras que el gel de cobre ha presentado una disminución.

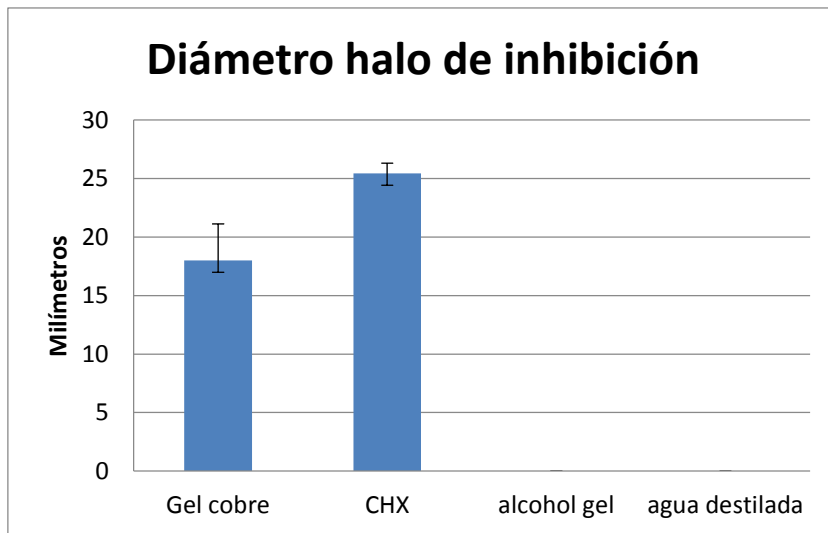


Figura 14. Medias del diámetro del halo de inhibición en *C. parapsilosis*, a los 7 días con los cuatro tratamientos.

En la **Figura 14** se demuestra que la inhibición sobre *C. parapsilosis* a los 7 días es mayor en la clorhexidina seguida por el gel de cobre.

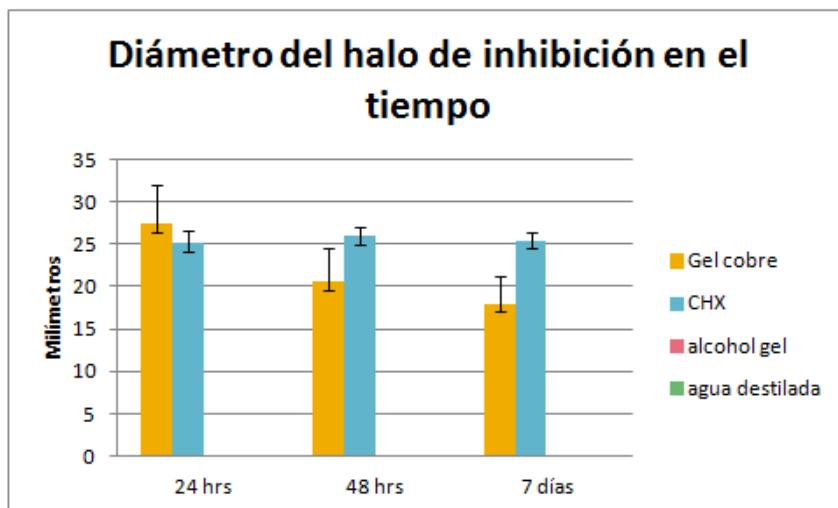


Figura 15. Medias del diámetro del halo de inhibición en *C. parapsilosis*, en el tiempo, con los cuatro tratamientos.

En la **Figura 15** se observa que la máxima inhibición alcanzada para el *C. parapsilosis* está dada por el gel de cobre a las 24 horas, pero con el paso del tiempo pierde su efecto observándose una disminución del halo, esto puede deberse a la estabilización del halo con el paso del tiempo y un menor efecto residual del gel para

este microorganismo. En cuanto a la clorhexidina, presenta un efecto inhibitorio constante siendo mejor que el gel de cobre a las 48 horas y a los 7 días. Esto puede deberse a la estabilidad del halo inhibitorio y su alto efecto residual. El alcohol gel no presenta efecto inhibitorio.

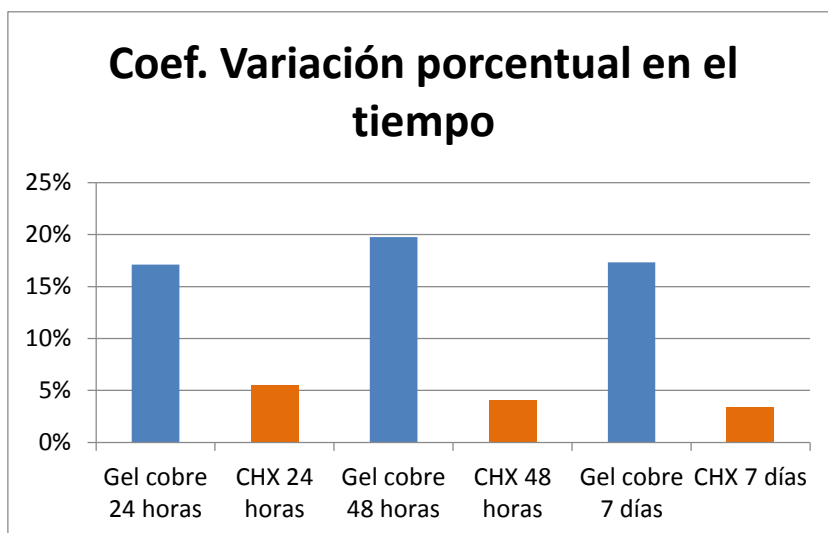


Figura 16. Coeficiente de variación porcentual en *C. parapsilosis* en el tiempo, con gel de cobre y clorhexidina.

En la **Figura 16** podemos observar que el mayor coeficiente de variación está dado por el gel de cobre, esto durante los tres periodos de evaluación, alcanzando valores entre un 17-20%. Lo que evidencia una gran heterogeneidad de los valores de la variable y una precisión regular en cuanto a la calidad estadística de las estimaciones.

La clorhexidina a su vez, presentó un coeficiente de variación entre un 3-5%. Lo que evidencia una homogeneidad de los valores de la variable, es decir valores más estables y precisos.

VI.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para realizar este trabajo se implementó el software estadístico SPSS Statistics versión 22, software de gran utilidad en administración de datos y pruebas paramétricas y no paramétricas para estudios sociales, medicinales y de diversas áreas.

Los datos fueron analizados mediante la prueba de Anova o de análisis de varianza, que es utilizada cuando se estudia la diferencia entre los promedios de dos o más muestras. De esta manera se determinó si existe o no diferencia significativa entre los tratamientos de gel de cobre, clorhexidina, alcohol gel y agua destilada.

Cuando se presentan diferencias significativas entre los grupos se realizan test de comparaciones múltiples, en este caso, se utilizó el test HSD Tukey, para determinar cuál es el par que presenta las mayores diferencias.

Comparación de medias

Planteamiento de hipótesis:

H0: $\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_r$ / No existe diferencia significativa

H1: al menos dos medias difieren / Existe diferencia significativa

Streptococcus mutans

Halo de inhibición	P-valor	Condición
A las 16 horas	,000	Rechazo
A las 24 horas	,000	Rechazo
A las 48 horas	,000	Rechazo
A los 7 días	,000	Rechazo

Tabla IX: Prueba de Anova para probar diferencia entre los cuatro grupos de tratamiento en *S. mutans* a las 16-24-48 horas y a los 7 días.

Como se puede observar, de la prueba de Anova se obtiene un p-valor de 0,000, tanto a las 24-48 horas y 7 días, por lo que se rechaza la hipótesis nula (H0) y asumimos que existe una diferencia significativa entre los cuatro grupos de tratamientos aplicados, con un nivel de significancia del 5%.

Como se encontró diferencia significativa, se aplicó el test HSD Tukey de comparaciones múltiples, para determinar cuál de las variables causó la diferencia.

Variable Dependiente	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	P-valor
Halo de inhibición a las 16 horas	Gel de cobre	Clorhexidina	-7,000	,000
		Alcohol gel	13,444	,000
		Agua destilada	13,444	,000
	Clorhexidina	Alcohol gel	20,444	,000
		Agua destilada	20,444	,000
	Alcohol gel	Agua destilada	,000	1,000
Halo de inhibición a las 24 horas	Gel de cobre	Clorhexidina	-16,667	,000
		Alcohol gel	3,667	,043
		Agua destilada	3,667	,043
	Clorhexidina	Alcohol gel	20,333	,000
		Agua destilada	20,333	,000
	Alcohol gel	Agua destilada	,000	1,000
Halo de inhibición a las 48 horas	Gel de cobre	Clorhexidina	-19,000	,000
		Alcohol gel	1,222	,543
		Agua destilada	1,222	,543
	Clorhexidina	Alcohol gel	20,222	,000
		Agua destilada	20,222	,000
	Alcohol gel	Agua destilada	,000	1,000
Halo de inhibición a los 7 días	Gel de cobre	Clorhexidina	-20,222	,000
		Alcohol gel	,000	1,000
		Agua destilada	,000	1,000
	Clorhexidina	Alcohol gel	20,222	,000
		Agua destilada	20,222	,000
	Alcohol gel	Agua destilada	,000	1,000

Tabla X: Test de comparaciones múltiples HSD Tukey para los cuatro grupos de tratamiento en *S. mutans* a las 16- 24- 48 horas y a los 7 días.

A partir de esta prueba, se puede determinar qué:

- A las 16 y 24 horas, existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos:
 - Gel de cobre - alcohol gel
 - Gel de cobre - agua destilada
 - Clorhexidina – gel de cobre
 - Clorhexidina - alcohol gel
 - Clorhexidina- agua destilada.

Siendo el gel de cobre el que generó la diferencia significativa en relación al alcohol gel y agua destilada. Y la clorhexidina en relación al gel de cobre, alcohol gel y agua destilada.

No se encontró diferencia significativa entre los grupos alcohol gel – agua destilada.

- A las 48 horas y 7 días, existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos:
 - Clorhexidina – gel de cobre
 - Clorhexidina – alcohol gel
 - Clorhexidina – agua destilada

Siendo la clorhexidina la variable que genera la diferencia significativa en todos los casos.

No se encontró diferencia significativa entre los grupos gel de cobre – alcohol gel, gel de cobre – agua destilada y alcohol gel – agua destilada.

La clorhexidina es la variable que genera una mayor diferencia significativa en todos los periodos de evaluación, con una mayor diferencia en el tiempo. Es decir, es la que genera un mayor efecto antimicrobiano en *S. mutans*.

Cándida Albicans

Halo de inhibición	P-valor	Condición
A las 24 horas	,000	Rechazo
A las 48 horas	,000	Rechazo
A los 7 días	,000	Rechazo

Tabla XI: Prueba de Anova para probar diferencia entre los cuatro grupos de tratamiento en *C. albicans* a las 24-48 horas y a los 7 días.

Como se puede observar, de la prueba de Anova se obtiene un p-valor de 0,000, tanto a las 24-48 horas y 7 días, por lo que se rechaza la hipótesis nula (H0) y asumimos que existe una diferencia significativa entre los cuatro grupos de tratamientos aplicados, con un nivel de significancia del 5%.

Como se encontró diferencia significativa, se aplicó el test HSD Tukey de comparaciones múltiples, para determinar cuál de las variables causó la diferencia.

Variable dependiente	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	P-valor
Halo de inhibición a las 24 horas	Gel de cobre	Clorhexidina	13,556	,000
		Alcohol gel	33,556	,000
		Agua destilada	33,566	,000
	Clorhexidina	Alcohol gel	20,000	,000
		Agua destilada	20,000	,000
	Alcohol gel	Agua destilada	,000	1,000
Halo de inhibición a las 48 horas	Gel de cobre	Clorhexidina	12,111	,000
		Alcohol gel	32,556	,000
		Agua destilada	32,556	,000
	Clorhexidina	Alcohol gel	20,444	,000
		Agua destilada	20,444	,000
	Alcohol gel	Agua destilada	,000	1,000
Halo de inhibición a los 7 días	Gel de cobre	Clorhexidina	13,000	,000
		Alcohol gel	33,000	,000
		Agua destilada	33,000	,000
	Clorhexidina	Alcohol gel	20,000	,000
		Agua destilada	20,000	,000
	Alcohol gel	Agua destilada	,000	1,000

Tabla XII: Test de comparaciones múltiples HSD Tukey para los cuatro grupos de tratamiento en *C. albicans*, a las 24- 48 horas y a los 7 días.

A partir de esta prueba, se puede determinar que entre los pares de estudio gel de cobre con clorhexidina - alcohol gel - agua destilada, y clorhexidina con gel de cobre-alcohol gel y agua destilada, se encontró diferencia estadísticamente significativa, tanto a las 24-48 horas y a los 7 días, con un p-valor de 0,000. Mientras que no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los pares alcohol gel y agua destilada, en ningún periodo de evaluación.

El gel de cobre fue el que generó un mayor efecto antimicrobiano en los tres periodos de evaluación, presentando valores similares entre estos. Mientras que la clorhexidina fue la que generó el segundo mayor efecto antimicrobiano, presentando una diferencia significativamente mayor con el agua destilada y alcohol gel, los cuales nos presentaron efecto inhibitorio.

Tanto el gel de cobre como la clorhexidina presentan actividad antifúngica en el tiempo.

Cándida Parapsilosis

Halo de inhibición	P-valor	Condición
A las 24 horas	,000	Rechazo
A las 48 horas	,000	Rechazo
A los 7 días	,000	Rechazo

Tabla XIII: Prueba de Anova para probar diferencia entre los cuatro grupos de tratamiento en *C. parapsilosis* a las 24-48 horas y a los 7 días.

Como se puede observar, se obtiene un p-valor de 0,000, tanto a las 24-48 horas y 7 días, por lo que se rechaza la hipótesis nula (H0) y asumimos que existe una diferencia significativa entre los cuatro grupos de tratamientos aplicados, con un nivel de significancia del 5%.

Como se encontró diferencia significativa, se aplicó el test HSD Tukey de comparaciones múltiples, para determinar cuál de las variables causó la diferencia.

Variable dependiente	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	P-valor
Halo de inhibición a las 24 horas	Gel de cobre	Clorhexidina	2,153	,251
		Alcohol gel	27,375	,000
		Agua destilada	27,375	,000
	Clorhexidina	Alcohol gel	25,222	,000
		Agua destilada	25,222	,000
	Alcohol gel	Agua destilada	,000	1,000
Halo de inhibición a las 48 horas	Gel de cobre	Clorhexidina	-5,333	,000
		Alcohol gel	20,556	,000
		Agua destilada	20,556	,000
	Clorhexidina	Alcohol gel	25,889	,000
		Agua destilada	25,889	,000
	Alcohol gel	Agua destilada	,000	1,000
Halo de inhibición a los 7 días	Gel de cobre	Clorhexidina	-7,444	,000
		Alcohol gel	18,000	,000
		Agua destilada	18,000	,000
	Clorhexidina	Alcohol gel	25,444	,000
		Agua destilada	25,444	,000
	Alcohol gel	Agua destilada	,000	1,000

Tabla XIV: Test de comparaciones múltiples HSD Tukey para los cuatro grupos de tratamiento en *C. parapsilosis* a las 24- 48 horas y a los 7 días.

A partir de esta prueba, se puede determinar que a las 24 horas, no existe diferencia estadísticamente significativa entre el par gel de cobre-clorhexidina, ya que se obtiene un p-valor de 0,251. Y tampoco entre los pares alcohol gel y agua destilada en ningún periodo de la evaluación. Entre los demás pares, tanto a las 24-48 horas y a los 7 días si se encontró diferencia estadísticamente significativa, con un p-valor de 0,000.

A diferencia del efecto del gel de cobre sobre *C. albicans*, se encontró que en el *C. parapsilosis*, la clorhexidina es la que tiene un mayor efecto antimicrobiano. Teniendo una diferencia significativa con el gel de cobre, a las 48 horas y a los 7 días. Tanto el gel de cobre como la clorhexidina presentan actividad antifúngica en el tiempo.

VII. DISCUSION

Actualmente existen numerosos estudios en los que se ha evaluado la acción antimicrobiana del cobre sobre cepas bacterianas asociadas a infecciones intrahospitalarias, las que constituyen un problema global debido a su impacto desde el punto de vista médico, ético y de costos ^{1, 3, 7, 8, 39, 40}.

El cobre es un nutriente esencial para la vida del hombre y de cualquier ser vivo. Sin embargo, estudios experimentales aprobados por la EPA, sugieren que altas concentraciones de este metal o de aleaciones de cobre eliminan cerca del 99,9% de las bacterias en un periodo de horas, cuando es utilizado en superficies de contacto sólidas y a partir de materiales en estado sólido, como los productos laminados, además de tener una acción continua y permanente. A pesar de estos descubrimientos, el número de estudios en los que se ha utilizado el cobre como agente antimicrobiano contra microorganismos orales es reducido. Nuestro trabajo demuestra que la utilización de nanopartículas de cobre en gel o en otros vehículos podría ser útil en la práctica odontológica y médica.

El protocolo de investigación utilizado difiere de otros estudios in vitro, en los que se efectuaron pruebas mediante el método de dilución en agar ⁴⁰, uso del cobre a diferentes concentraciones ³ y en diferentes presentaciones, como láminas metálicas ⁶ o nanopartículas poliméricas. Se optó por utilizar el método de difusión en discos, recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos, ya que es un método fácil de realizar, rápido y aplicable a una amplia variedad de bacterias y hongos.

En el estudio de Kappes *et al.* sólo se realizó una medición de los cultivos bacterianos a las 48 horas; y en el estudio de Prado *et al.* se realizaron controles de los cultivos bacterianos a las 18 horas, 24 horas y 48 horas. En la presente investigación se realizaron controles similares a este último, debido a que no hay estudios publicados que evalúen específicamente la acción del cobre en el *S. mutans*. Se realizaron múltiples mediciones para obtener un seguimiento de su inhibición, debido a que las bacterias son de rápido crecimiento; en un principio hasta las 48 horas, tiempo en el que el microorganismo alcanza la mayor curva de crecimiento, pero además se incorporó una medición a los 7 días con el fin de evaluar la actividad antibacteriana del gel de cobre en el tiempo.

En el estudio de Godoy *et al.*, se evaluaron los cultivos de *Cándida spp.* a las 48 y 72 horas. Sin embargo en nuestra investigación se realizaron controles a las 24 horas, debido a que es el tiempo de crecimiento de estos microorganismos ⁴¹ y posteriormente a las 48 horas y 7 días con el fin de evaluar la actividad antifúngica del gel de cobre en el tiempo.

Los resultados de la presente investigación arrojaron que tanto el gel de cobre como la clorhexidina presentan una actividad antibacteriana sobre el *S. mutans*, mientras que el alcohol gel no presentó efecto, posiblemente por su rápida volatilización, lo que genera que el alcohol no alcance a entrar en contacto con los microorganismos en estudio.

El tratamiento con clorhexidina fue el que generó un halo de inhibición mayor en todas las mediciones, manteniendo su efecto estable al cabo de los 7 días. El gel de cobre (Copper Clean®) por su parte, a las 16 horas y 24 horas presenta un efecto de inhibición sobre el *S. mutans* estadísticamente menor en relación a la clorhexidina, y posterior a este tiempo disminuye su acción, teniendo un efecto prácticamente nulo en la medición de las 48 horas y no presentando acción antibacteriana al cabo de los 7 días.

En otro estudio, Ahrari *et al*, reportaron resultados similares, en que la clorhexidina al 0,2% presentó una gran eficacia antimicrobiana en *S. mutans* y *S. sanguis* y que ésta actividad fue estadísticamente mayor en relación a soluciones con nanopartículas de óxido de zinc (ZnO), óxido de cobre (CuO), dióxido de titanio (TiO₂) y plata.

Estudios a nivel nacional, reportaron que el cobre tiene acción bactericida a altas concentraciones⁶. Al 99,9% se da el máximo efecto del metal y como aleación debe estar al menos en un 70%. Otros estudios, a nivel internacional, también utilizaron cobre a elevadas concentraciones para lograr un efecto bactericida⁷. En nuestro estudio, el gel de cobre utilizado presenta una concentración del 0,0001 % y probablemente debido a esto, es que presenta un efecto bacteriostático y no bactericida, eventualmente se podría modificar esta concentración para un mayor efecto.

La clorhexidina es el único tratamiento que presenta efecto en el tiempo, propiedad conocida de la sustancia, como “alta sustentividad”, es decir, que una vez que es adsorbida por el microorganismo, se libera de forma gradual, de 8 a 12 horas e incluso hasta después de las 24 horas. En el caso del gel de cobre, no se genera un efecto antibacteriano en el tiempo, a pesar de que el cobre no se consume ni evapora, esto probablemente se explica por la baja concentración de nanopartículas del metal que no alcanza a generar un efecto bactericida.

Tanto el gel de cobre como la clorhexidina presentan una actividad antifúngica sobre el *C. albicans*, mientras que el alcohol gel no presenta efecto. El estudio de Mehtar *et al*. también reportó actividad antifúngica del cobre sobre *C. albicans*, en concentraciones desde 55% en aleación, exponiendo que para hongos la concentración necesaria es menor a la requerida para bacterias, en este caso incluso una concentración del 0,0001 % ha sido suficiente para generar un efecto fungicida.

El tratamiento con gel de cobre (Copper Clean®) fue el que generó un halo de inhibición mayor en todas las mediciones, manteniendo su efecto estable al cabo de los 7 días. Generando diferencia estadísticamente significativa en comparación a la clorhexidina. El estudio de Mozayeni *et al.* también comparó el efecto de la clorhexidina con un gel de nanopartículas metálicas, pero en este caso con plata y en una concentración mayor de la clorhexidina (2%), observando un efecto estadísticamente mayor con la clorhexidina a diferencia de lo obtenido con nuestro estudio.

Al cabo de los 7 días, tanto el gel de cobre (Copper Clean®), como la clorhexidina, siguen presentando halo de inhibición sobre el *C. albicans*, con parámetros estables en relación a las mediciones previas. Lo que determina que ambos tienen un efecto antifúngico en el tiempo. En el caso de la clorhexidina este resultado se presenta debido a su sustantividad, la cual genera una liberación gradual posterior a su adsorción por el microorganismo. Y en cuanto al cobre este efecto se debe a que el material, que actúa por contacto, no se pierde ni consume tras su actividad y se mantiene sobre el sensidisco y para *C. albicans* las concentraciones presentes en el gel de cobre son suficientes para generar un efecto fungicida. En el estudio de Mozayeni *et al.* también se evidencia la actividad antifúngica de la clorhexidina en el tiempo, para *C. albicans*.

Tanto el gel de cobre como la clorhexidina presentan una actividad antifúngica sobre el *C. parapsilosis*, mientras que el alcohol gel no presenta efecto. En el estudio de Hoffman *et al.* también se observa este efecto antifúngico sobre diferentes especies de *Cándida*.

No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el gel de cobre y la clorhexidina en el control de las 24 horas, pero si a las 48 horas y a los 7 días, siendo el tratamiento con clorhexidina la que generó la diferencia.

Al cabo de los 7 días, tanto el gel de cobre (Copper Clean®), como la clorhexidina, siguen presentando halo de inhibición sobre el *C. parapsilosis*, en el caso de la clorhexidina los niveles de inhibición son estables en relación a las mediciones previas y en el caso del gel de cobre éstos presentan una disminución gradual a lo largo de los controles. Lo que determina que ambos tratamientos presentan un efecto antifúngico en el tiempo, pero en el caso del cobre este efecto es inestable y puede deberse a que la concentración del gel para este tipo de *Cándida* requiera ser mayor.

En el estudio de Hoffman *et al.*, al igual que en el presente estudio se observaron respuestas desiguales de las especies de *Cándida* ante el cobre, a pesar de pertenecer a la misma familia tienen diferente susceptibilidad.

La evidencia científica demuestra que mientras mayor es la concentración de cobre contenido, es más efectivo el efecto antimicrobiano. Ya que la concentración del gel de cobre (Copper Clean®) es baja, es esperable que si se aumenta se obtengan mejores efectos antimicrobianos.

Los resultados obtenidos posibilitarían la utilización del gel de cobre (Copper Clean®) como antimicrobiano. Sin embargo, cabe destacar que una simulación exacta de la cavidad oral no es posible en condiciones de laboratorio. La incubación no puede reproducir fielmente la temperatura bucal, el pH, la humedad, entre otros. Y además el contacto constante de los agentes antimicrobianos con los microorganismos en los medios de cultivo, no será factible para muchos productos de uso intraoral. Por lo que serán necesarios estudios posteriores que permitan dilucidar el efecto antimicrobiano de estos agentes bajo condiciones in vivo y los posibles efectos secundarios sobre la microbiota oral.

VIII. CONCLUSIONES

El gel de cobre Copper Clean®, presenta efecto bacteriostático sobre *S. mutans* principalmente durante las primeras 16 horas.

El gel de cobre Copper Clean®, presenta efecto antifúngico sobre *C. albicans* y *C. parapsilosis*.

El gel de cobre en comparación con la clorhexidina al 0,12% presenta mayor efecto antifúngico sobre *C. albicans*. Y la clorhexidina presenta un mayor efecto antimicrobiano sobre *S. mutans* y *C. parapsilosis*.

El alcohol gel no presenta actividad antimicrobiana sobre ninguno de los microorganismos en estudio.

El gel de cobre, a los 7 días, sólo presenta efecto antimicrobiano sobre *Cándida spp.*, la clorhexidina a su vez, sobre *S. mutans* y *Cándida spp.*

IX. SUGERENCIAS

- Las futuras investigaciones que utilicen medios de cultivos, microorganismos, o nano partículas de metales, deben tener presente que para adquirirlos, no se pueden solicitar como persona natural, sino que deber ser solicitadas a través de una institución que cuente con un centro de investigación. Y además hay que considerar los largos tiempos de espera para la obtención de dichos materiales, que puede variar entre uno a dos meses.
- El gel de cobre (Copper Clean®) utilizado en nuestro estudio tiene una baja concentración y una sola presentación. Por lo que sugerimos que para futuros estudio in vitro, se solicite la fabricación de un producto a diversas concentraciones, que permita determinar la concentración inhibitoria mínima del metal, y en diferentes presentaciones, ya que se ha determinado que estructuras sólidas son las que han demostrado tener un efecto antimicrobiano más efectivo.
- El método de estudio de sensibilidad a los antimicrobianos utilizado en nuestra investigación, fue el de difusión por discos, método de evaluación cualitativo. Por lo que se sugiere utilizar un método cuantitativo como el método E-test o cultivo en caldo con concentraciones crecientes del metal.

X. RESUMEN

Introducción:

Actualmente existen diversos estudios en relación a nanopartículas metálicas y su actividad antimicrobiana en la práctica médica, específicamente sobre el cobre, pero son escasos en el ámbito odontológico, y por esto surge la relevancia de investigar en ésta área.

Objetivo:

Evaluar la actividad antimicrobiana in vitro del gel de cobre Copper Clean® en cultivos de *Streptococcus mutans* y *Cándida spp*

Materiales y método:

Se realizó un estudio in vitro para evaluar el efecto antimicrobiano del gel de cobre (Copper Clean®), mediante métodos de difusión por discos, sobre *S. mutans*, *C. albicans* y *C. parapsilosis*. Se prepararon un total de 27 medios, los cuales posteriormente fueron inoculados con las cepas en estudio. En los cultivos se colocaron cuatro discos de gasas estériles, impregnados con gel de cobre al 0,0001%, clorhexidina al 0,12%, alcohol gel y agua destilada. Posterior a esto, las 18 placas inoculadas con *Cándida* se cultivaron a 37°C y evaluadas a las 24-48 horas y 7 días. Las 9 placas inoculadas con *S. mutans* fueron cultivadas a 37°C en anaerobiosis y fueron evaluadas a las 16-24-48 horas y 7 días.

Resultados:

El gel de cobre (Copper Clean®) presenta actividad bacteriostática sobre el *S. Mutans*. En comparación con la clorhexidina, ésta presenta un efecto estadísticamente mayor. Respecto a las *Cándida spp.*, el gel de cobre (Copper Clean®) presenta un efecto antifúngico en ambas especies. En *C. albicans*, el gel de cobre en relación a la clorhexidina es el que genera un efecto estadísticamente mayor. En *C. Parapsilosis*, no existe diferencia significativa entre el gel de cobre y la clorhexidina a las 24 horas, pero sí a las 48 horas y los 7 días, siendo la clorhexidina la que presenta mayor efecto residual. Ambos tratamientos presentan efecto residual sobre *Cándida spp.*

Conclusión:

El gel de cobre (Copper Clean®) tiene efecto bacteriostático en *S. mutans* principalmente hasta las 16 horas, y efecto antifúngico sobre *Cándida spp.* hasta el 7mo día. La clorhexidina tiene efecto antimicrobiano estadísticamente mayor en *S. mutans* y *C. parapsilosis* en comparación con el gel de cobre.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Eslami N, Rajabi O, Ghazvini K, Barati S, Ahrari F. The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* to colloidal solutions of different nanoparticles applied as mouthwashes. *Dent Res J (Isfahan)*. 2015;12(1):44. doi:10.4103/1735-3327.150330.
2. Salerno C, Pascale M, Contaldo M, et al. Candida-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011;16(2). doi:10.4317/medoral.16.e139.
3. Kappes T, Domínguez M, Bello H, Mella S, Riedel G. Actividad de cobre sobre bacilos gramnegativos multi-resistentes aislados en hospitales chilenos. 2012;29(6):622-627. doi:10.4067/S0716-10182012000700006.
4. Valeria Prado J, Roberto Vidal a., Claudia Durán T. Aplicación de la capacidad bactericida del cobre en la práctica médica. *Rev Med Chil*. 2012;140(10):1325-1332. doi:10.4067/S0034-98872012001000014.
5. Rivero P. Impacto del cobre en la reducción de infecciones intrahospitalarias, mortalidad y gasto en antimicrobianos en una Unidad de Cuidados Intensivos de adultos. 2014;31(3):274-279.
6. Valeria PJ, Mario EM, Roberto V a., Claudia DT. Actividad bactericida de superficies de cobre frente a bacterias asociadas a infecciones nosocomiales, en un modelo in vitro de adherencia y sobrevivencia. *Rev Med Chil*. 2013;141(3):291-297. doi:10.4067/S0034-98872013000300002.
7. Bleichert P, Espírito Santo C, Hanczaruk M, Meyer H, Grass G. Inactivation of bacterial and viral biothreat agents on metallic copper surfaces. *BioMetals*. 2014. doi:10.1007/s10534-014-9781-0.
8. Grass G, Rensing C, Solioz M. Metallic copper as an antimicrobial surface. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(5):1541-1547. doi:10.1128/AEM.02766-10.
9. Philip D Marsh*. Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. *BMC Oral Health*. 2006. doi:10.1186/1472-6831-6-S1-S14.
10. Molina DF, Bucodental H. Biofilm oral: Formación, consecuencias, enfermedades asociadas y prevención. :2-9.
11. Ojeda-garc JC, Oviedo-garc E, Andr L. *Streptococcus mutans* and dental caries *Streptococcus mutans* y caries dental Revisiones Te m a Revisiones Te m a. 2013;26(1):44-56.

12. PALOMER R L. Caries dental en el niño: Una enfermedad contagiosa. *Rev chil pediatr.* 2006;vol.77, n.(Caries dental en el niño: Una enfermedad contagiosa.):56-60.
13. Martínez ER, Suárez MC, Feito RMS, González JF. Indicaciones Y Valoración De Su Rendimiento. 2006:23-31.
14. Alejandro L, Galaviz A, Alejandra C, Rosales N. Streptococcus mutans en saliva y su relación con caries dental. *Adm.* 2001.
15. Doctoral T, Navarro LF, Bag V. Aportación al diagnóstico precoz de la caries dental.
16. Correa Hernández Sebastián. Preparación de resinas acrílicas cargadas con nanopartículas de cobre y sus propiedades antimicrobianas frente a *Cándida Albicans*. *Trab Investig Univ Chile, Fac Odontol.* 2012.
17. Rodríguez Ortega Judy, Miranda Tarragó Josefa MLH y SGJ. Candidiasis de la mucosa bucal. *Rev Cuba Estomatol.* 2002;39 n.2.
18. Bucal C, Revisi UN a, Las TDE, et al. Candidiasis bucal revision sistematica. 2009:1-8.
19. Nuñez P. Bioquímica de la caries dental. *Rev Habanera Ciencias Médicas.* 2010;9:155-166.
20. Vazquez JA SJ. Candidiasis. *Essentials Clin Mycol.* 2011;Part 3:167-206.
21. Alburquenque C, Tapia C V, Key P. Interacción *Candida albicans* -Hospedero : un proceso complejo en el que la inmunidad innata juega un importante papel. 2013;28(2):37-47.
22. Beeton ML, Aldrich-Wright JR, Bolhuis A. The antimicrobial and antibiofilm activities of copper(II) complexes. *J Inorg Biochem.* 2014;140:167-172. doi:10.1016/j.jinorgbio.2014.07.012.
23. Manuscript A. NIH Public Access. *Changes.* 2012;29(6):997-1003. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted.
24. Noyce JO, Michels H, Keevil CW. Potential use of copper surfaces to reduce survival of epidemic meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the healthcare environment. *J Hosp Infect.* 2006;63(3):289-297. doi:10.1016/j.jhin.2005.12.008.

25. Gordon a S, Howell LD, Harwood V. Responses of diverse heterotrophic bacteria to elevated copper concentrations. *Can J Microbiol.* 1994;40(5):408-411. doi:10.1139/m94-067.
26. O'Gorman J, Humphreys H. Application of copper to prevent and control infection. Where are we now? *J Hosp Infect.* 2012;81(4):217-223. doi:10.1016/j.jhin.2012.05.009.
27. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 1984;219(1):1-14. doi:10.1016/j.siny.2010.04.003.
28. Araya M, Grohnert MO, Pizarro F. Cobre Salud, Medio Ambiente y Nuevas Tecnologías. :126.
29. Antis MS, Implantol AP. Antisépticos or Revisión literatur atura perspectiv Re visión de la liter atura y perspecti v a actual. *Av Periodoncia.* 2006;18(1):31-59.
30. Santos MG. ¿ Qué Inactiva a la Clorhexidina ? 1997;31(5):11-12.
31. Saldaña LS, Anduaga ES. Ntisépticos y desinfectantes. *Dermatología Peru.* 2005;15(2):82-103.
32. Ureña JL. Microbiología oral. *McGraw Hill.* 2002;2a edición:83-90.
33. Od RM a, Carlos L, Od MC, Constanza M, Od VR, C SJG. Estudio comparativo de medios de cultivo para crecimiento y recuperación del *Streptococcus mutans* ATCC 25175 “ in vitro .” *Methods.* 2005;2:25-30.
34. García-martos P, García-agudo R, Hernández- JM, Marín P, Tallero E. Identificación de levaduras de interés clínico en el medio de cultivo CHROMagar Candida. 1998:131-135.
35. Godoy P, Almeida L, Colombo A. Identificación de *Candida albicans* utilizando el medio cromogénico Albicans ID. *Rev Iberoam Micol.* 2001;19:197-199. http://www.researchgate.net/publication/238095919_Identificacin_de_Candida_albicans_utilizando_el_medio_cromognico_Albicans_ID/file/9c96052e7c19386cd7.pdf.
36. Prat S. Prueba de Suceptibilidad antimicrobiana por difusión en Agar. 2010.
37. Use I, Summary P. Mueller hinton agar (7101). *World Health.* 2011;(June):7-9.
38. De R, Española S, Picazo EJJ, Cantón R, Gómez-lus ML, Rodríguez-avial C. Procedimientos en Microbiología Clínica.

39. Francisco S. Guía de uso de endnote web. *Knowl Creat Diffus Util.* 2007;(1):1-23. <http://www.fisterra.com/mbe/Guia-EndNote-Web-2-v-1-1.pdf>.
40. Martínez JJ, Tévez LLL. Determinación de las propiedades antimicrobianas de los metales de transición Zinc (II), Cobre(II), Manganeso (II), Cobalto (II), Níquel (II) y Cadmio (II) frente a cinco cepas bacterianas. :5-7.
41. Salazar EICPP. DETECCIÓN DE *Candida albicans* EN PACIENTES CON ESTOMATITIS SUB-PROTÉSICA, MEDICADOS CON ANFOTERICINA TÓPICA". *Acta Odontológica Venez.* 2003;v.41 n.3.

ANEXO 1

Preparación medio de cultivo Agar Mueller-Hinton

Agar Mueller Hinton	1 litro	½ litro	¼ litro
Agar Mueller Hinton	38 gramos	19 gramos	9,5 gramos
Agar	8 gramos	4 gramos	2 gramos
Agua destilada	1,000 ml	500 ml	250 ml

Tabla I. Medidas para preparación de Agar Mueller Hinton

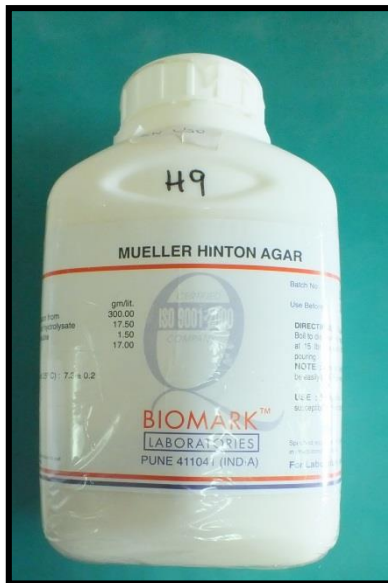


Figura 1: Agar Mueller Hinton

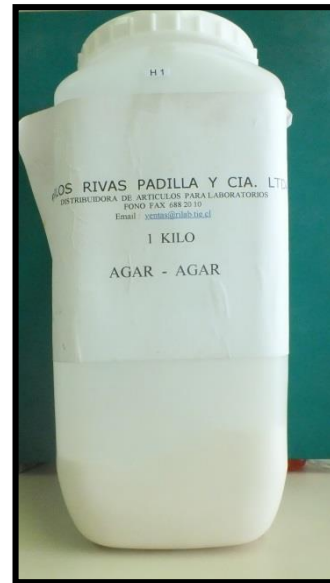


Figura 2: Agar-Agar

Como se aprecia en la **Tabla I**, para su preparación se debe disponer de dos agares, Agar Mueller Hinton y Agar-Agar, y agua destilada, los cuales deben dispensarse según la cantidad de litros que se deseen obtener. Una vez realizada la mezcla se debe calentar con agitación frecuente y debe ser hervida durante un minuto para su disolución total. Posteriormente se debe esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Una vez que el autoclave alcance una temperatura de 45-50°C, la solución puede retirarse y ser distribuida en placas Petri estériles, en volumen apropiado para que el espesor sea de 4mm sobre una superficie horizontal.



Figura 3. Secuencia de autoclavado del Agar Mueller Hinton.



Figura 4. Secuencia de distribución del agar en placas Petri.

ANEXO 2

Procesamiento del Inóculo para *Streptococcus mutans* mediante método de difusión por discos

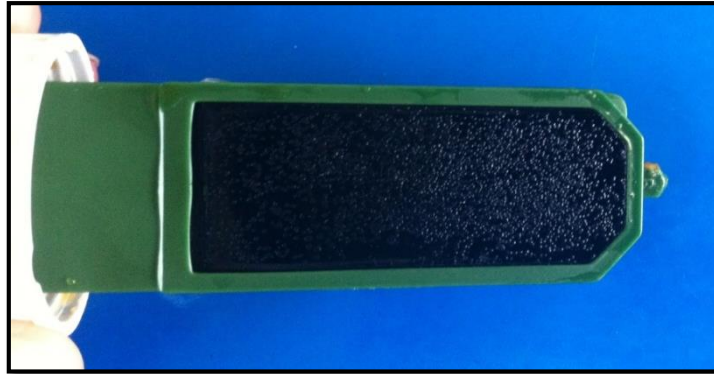


Figura 1. Subcultivo de *S. mutans* en agar Mitis-Salivarius

Se realizaron subcultivos de *S. mutans* a través del test CRT® *bacteria* (Figura 1).

El CRT® *bacteria*, es un test de riesgo de caries que utiliza medios de cultivos microbiológicos para la identificación de *S. mutans* y *Lactobacilos* presentes en la saliva mediante agares selectivos.



Figura 2. CRT® *bacteria*; el agar azul, para la determinación de los *S. mutans* y el agar claro, para la de los *Lactobacilos*.

El agar Mitis-Salivarius azul con bacitracina sirve para el registro de los *S. mutans*; el medio de cultivo claro, el agar de Rogosa, sirve para la evaluación de los *Lactobacilos* (**Figura 2**). Los agares llevan unas láminas que los protegen de la contaminación y evitan que se deshidraten.



Figura 3. Materiales requeridos para realizar CRT® bacteria

Modo de uso

La utilización de CRT® bacteria resulta sencilla y rápida. El paciente debe morder una pastilla de parafina, para transferir las bacterias de la superficie del diente a la saliva y así recogerla en un recipiente.

Una pastilla de Hidrocarbonato sódico (NaHCO_3) se pone en el fondo del recipiente de la prueba, liberando Anhídrido carbónico (CO_2) en contacto con la humedad, lo cual crea una atmósfera favorable para el crecimiento de las bacterias.

Se debe humedecer por completo con saliva ambos agares, sin rayarlos, con ayuda de una pipeta. Manteniendo el soporte ligeramente inclinado, se impide que la saliva se deslice con excesiva rapidez y se favorece la humectación de la superficie. El soporte del agar se vuelve a meter de inmediato en el tubo de prueba, cerrando éste bien. Dos días de incubación en la incubadora, a 37°C , bastan para que las colonias de bacterias crezcan (**Figura 4**).

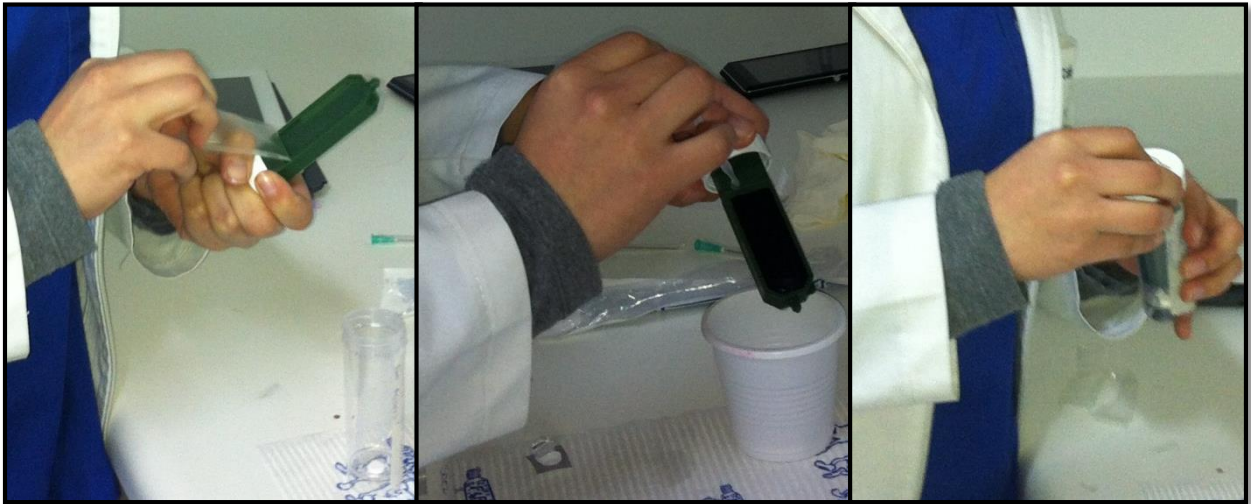


Figura 4. Secuencia de aplicación de test CRT® *bacteria*

La preparación del inóculo se realizó seleccionando no más de 5 colonias de aspecto similar (aproximadamente 1mm de diámetro) de estos subcultivos, posteriormente fueron suspendidas en suero fisiológico estéril (tubos de 1.8ml) y agitadas por aproximadamente 15 segundos, para luego ajustar la turbidez a una concentración de 0.5 McFarland. (**Figura 5**).

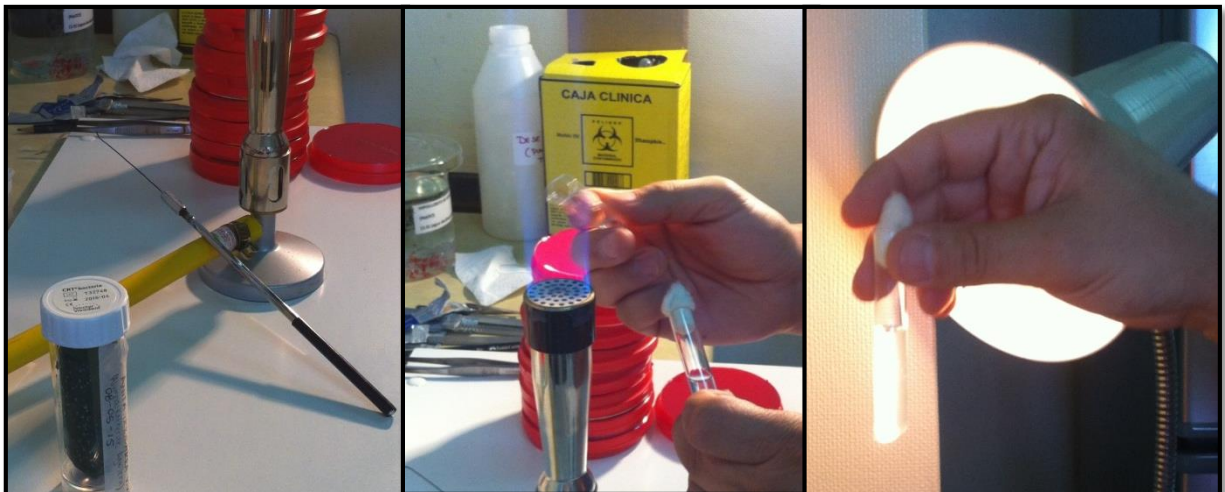


Figura 5. Secuencia de selección de colonias y ajuste de turbidez.

Una vez ajustada la turbidez, se introdujo una tórula de algodón estéril en el tubo con la solución y se presionó varias veces contra la pared interna del tubo de manera de eliminar el exceso de líquido. Posteriormente se sembró la superficie del Agar Mueller-Hinton suplementado con sangre de cordero al 5% en tres direcciones distintas, y se dejó reposar la placa entre 5-15 minutos para que el medio pudiese absorber la solución con el inóculo (**Figura 7**).



Figura 6. Agar Mueller Hinton suplementado con sangre de cordero al 5%

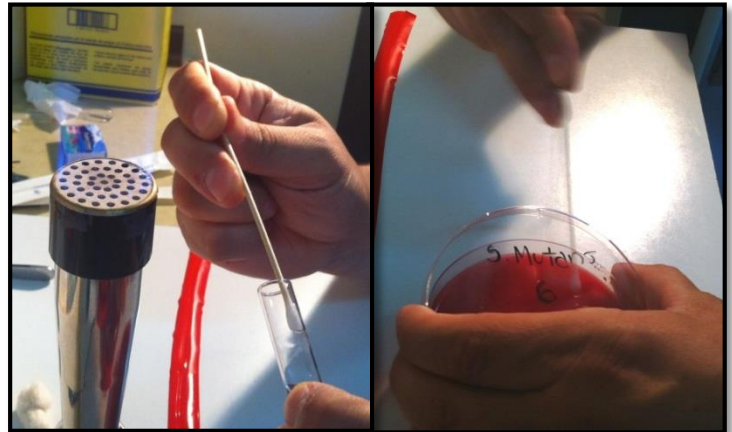


Figura 7. Sembrado en el medio de cultivo previamente rotulado

Finalmente se colocaron los cuatro discos de gasas estériles impregnados con aproximadamente 0,03 gr de clorhexidina al 0,12%, gel de cobre Copper Clean®, alcohol gel y agua destilada sobre nueve placas Petri, presionando suavemente los discos contra el agar, para asegurar su adherencia. (**Figura 8**).

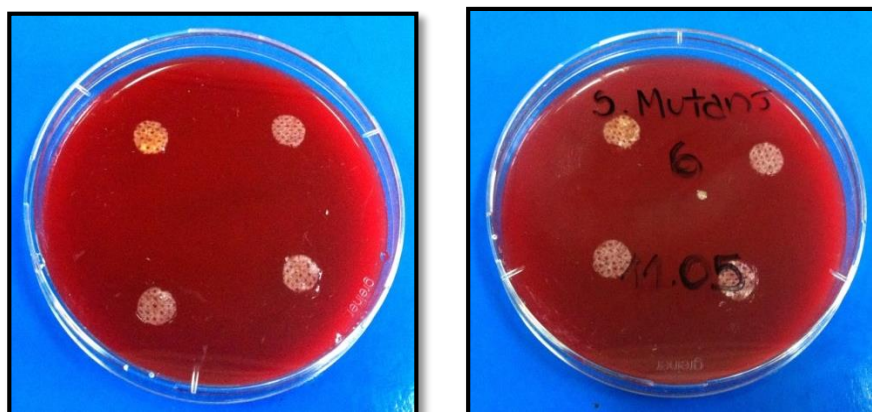


Figura 8. Aplicación de sensibilizadores con los cuatro grupos de tratamiento.

Las placas inoculadas se dejaron reposar unos 15 minutos antes de invertirlas para su incubación a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en un ambiente de anaerobiosis. Este ambiente se logró mediante una campana de Gaspak y una pastilla efervescente liberadora de CO_2 al 5% (**Figura 9**).



Figura 9. Placas inoculadas y cultivadas en anaerobiosis mediante campana de Gaspak.



Figura 10. Estufa de cultivo con regulación automática de CO_2 .

ANEXO 3

Procesamiento del Inóculo para *Cándida* Spp. mediante método de difusión por discos

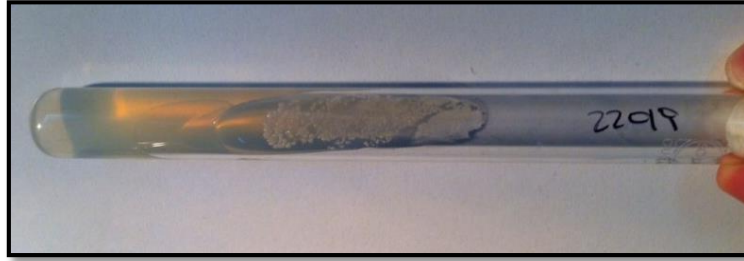


Figura 1. Subcultivo de *C. parapsilosis* en agar sabouraud



Figura 2. Subcultivo de *C. albicans* en agar sabouraud

Se debe trabajar con subcultivos de *C. albicans* y *C. parapsilosis*, realizados en agar sabouraud, con no más de 24 horas de incubación a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. (**Figura 1** y **Figura 2**).

La preparación del inóculo se realizó seleccionando no más de 5 colonias de aspecto similar (aproximadamente 1mm de diámetro) de estos subcultivos, posteriormente fueron suspendidas en suero fisiológico estéril (tubos de 1.8ml) y agitadas por aproximadamente 15 segundos, para luego ajustar la turbidez a una concentración de 0.5 McFarland. (**Figura 3**).



Figura 3. Concentración McFarland 0.5, ajuste de turbidez

Una vez ajustada la turbidez, se introdujo una tórula de algodón estéril en el tubo con la solución y se presionó varias veces contra la pared interna del tubo de manera de eliminar el exceso de líquido. **(Figura 4).**

Posteriormente se sembró la superficie del Agar Mueller-Hinton en tres direcciones distintas, y se dejó reposar la placa entre 5-15 minutos para que el medio pudiese absorber la solución con el inóculo.

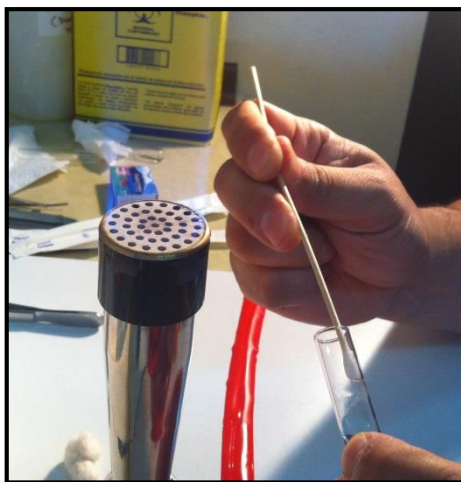


Figura 4. Siembra en medio de cultivo previamente rotulado

Finalmente se colocaron los cuatro discos de gases estériles impregnados con aproximadamente 0,03 gr de clorhexidina al 0,12%, gel de cobre Copper Clean®, alcohol gel y agua destilada sobre las 18 placas petri, presionando suavemente los discos contra el agar, para asegurar su adherencia. **(Figura 5 y Figura 6)**

Las placas se dejaron reposar unos 15 minutos antes de invertirlas para su incubación a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. **(Figura 7).**



Figura 5. Placas Petri rotuladas, con gel de cobre, alcohol gel, agua destilada y clorhexidina al 0,12%



Figura 6. Aplicación de sensidiscos



Figura 7. Estufa de cultivo a 37°C

ANEXO 4

Evaluación del diámetro del halo de inhibición

Para realizar las mediciones se utilizó una regla especial para medición de diámetros, que se observa en la **figura 1**.



Figura 1.- Regla para medición de diámetros de inhibición.

Streptococcus Mutans: para este microorganismo las evaluaciones se realizaron a las 16 hrs, 24 hrs, 48 hrs y 7 días.

Evaluación a las 16 horas:

Se observó la presencia de halos de inhibición en torno a los discos con gel de cobre y clorhexidina. En los tratamientos con alcohol gel y agua destilada no se presentó halo.

El tratamiento con gel de cobre (esquina superior derecha) generó una media de 13,44 mm de inhibición y el tratamiento con clorhexidina (esquina superior izquierda) generó una media de 20,44 mm de inhibición (**Figura 2**).

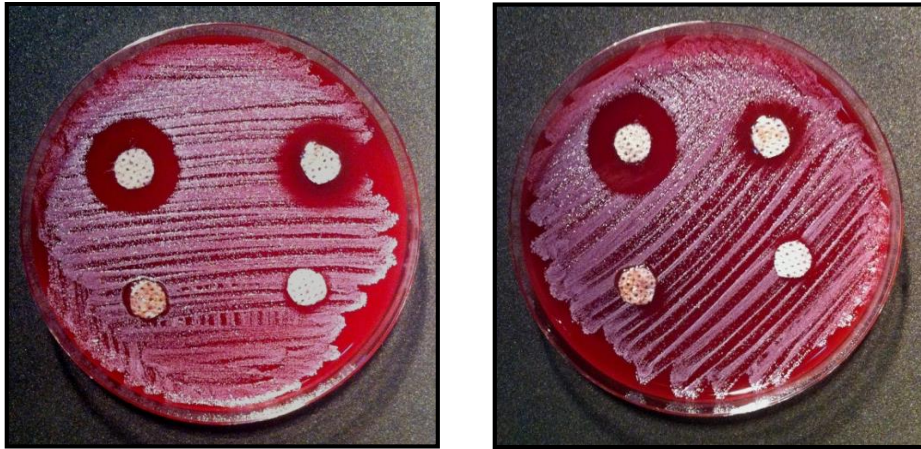


Figura 2. *S. mutans* a las 16 horas.

Evaluación a las 24 horas:

Se siguen presentando halos de inhibición en relación a los discos con gel de cobre y clorhexidina. En los tratamientos con alcohol gel y agua destilada no se observa inhibición.

La media de los halos en torno a los discos con gel de cobre es de 3,67 mm, disminuyendo altamente su efecto en relación a la evaluación de las 16 horas en que se obtuvo una media de 13,44mm. La clorhexidina a su vez, generó una media de 20,33mm, valor similar al obtenido a las 16 horas (**Figura 3**).

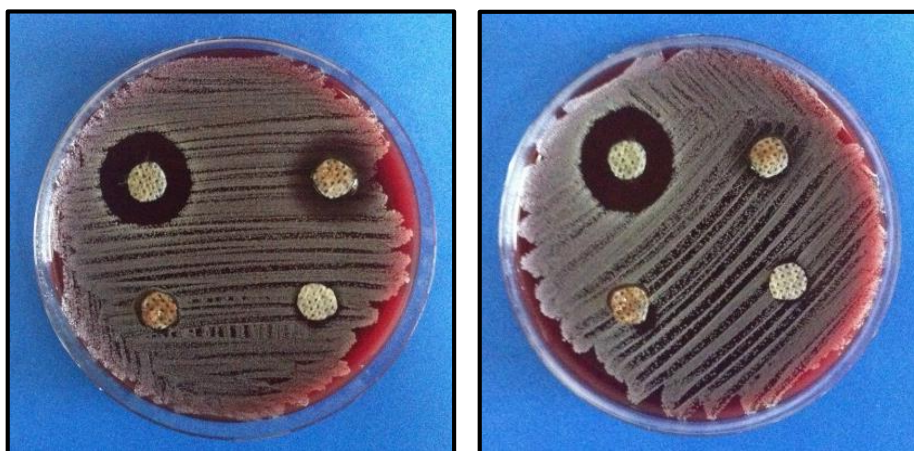


Figura 3. *S. mutans* a las 24 horas.

Evaluación a las 48 horas:

Se siguen observando halos en relación a la clorhexidina. A su vez el halo en torno a los discos con gel de cobre ha desaparecido completamente, esto por la colonización bacteriana en la zona en que previamente se generaba inhibición. Los tratamientos con alcohol gel y agua destilada siguen sin presentar efecto (**Figura 4**).

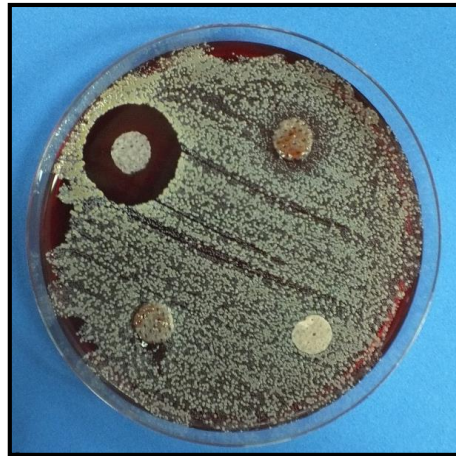


Figura 4. *S. mutans* a las 48 horas.

Evaluación a los 7 días:

Al finalizar las evaluaciones, a los 7 días, sólo es posible pesquisar inhibición en relación a la clorhexidina, con una media de 20,22mm.



Figura 5.- *S. mutans* a los 7 días.

Cándida spp: en el caso de la *Cándida* tanto *albicans* como *parapsilosis*, se decidió realizar evaluaciones a las 24 horas, 48 horas y 7 días.

Cándida Albicans

Evaluación a las 24 horas:

Se observó la presencia de halos de inhibición en torno a los discos con gel de cobre y clorhexidina. En los tratamientos con alcohol gel y agua destilada éste no se presentó.

El tratamiento con gel de cobre (esquina superior derecha) generó una media de 33,56 mm de inhibición y el tratamiento con clorhexidina (esquina superior izquierda) generó una media de 20 mm de inhibición (**Figura 6**).

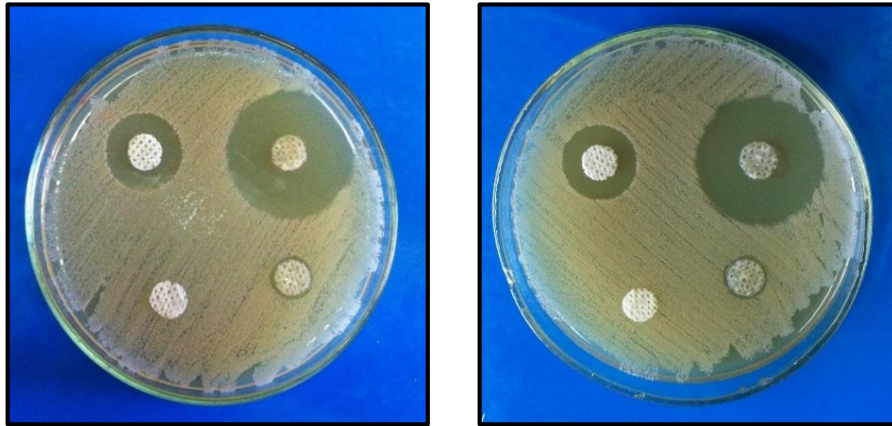


Figura 6. *C. albicans* a las 24 horas.

Evaluación a las 48 horas:

Se siguen presentando halos de inhibición en relación a los discos con gel de cobre y clorhexidina. En los tratamientos con alcohol gel y agua destilada no se observa inhibición.

El tratamiento con gel de cobre generó una media de 32,56 mm de inhibición, disminuyendo 1mm en relación a la evaluación a las 24 horas, y el tratamiento con clorhexidina generó una media de 20,44 mm de inhibición, aumentando levemente su acción en 0,44mm (**Figura 7**).

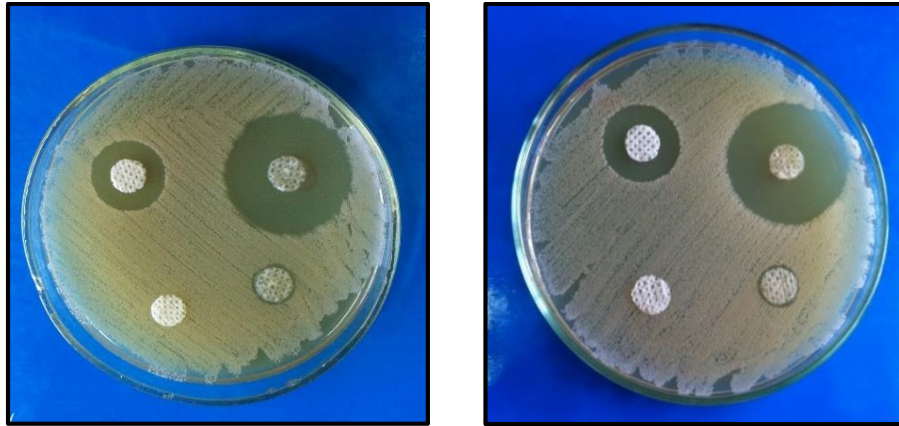


Figura 7. *C. albicans* a las 48 horas.

Evaluación a los 7 días:

Se observa la mantención de los halos de inhibición tanto para el gel de cobre como para la clorhexidina. En los tratamientos con alcohol gel y agua destilada no se observa inhibición.

El tratamiento con gel de cobre generó una media de 33 mm de inhibición y el tratamiento con clorhexidina generó una media de 20mm, teniendo ambos un efecto estable en relación a las evaluaciones anteriores (**Figura 8**).

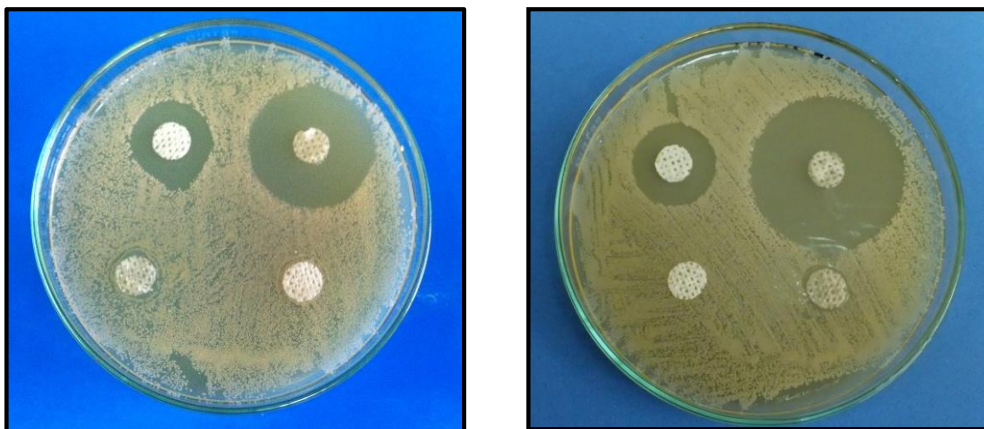


Figura 8. *C. albicans* a los 7 días.

Cándida Parapsilosis

Evaluación a las 24 horas:

Se observó la presencia de halos de inhibición en torno a los discos con gel de cobre y clorhexidina, en el caso de del gel de cobre los límites son poco definidos. En los tratamientos con alcohol gel y agua destilada no se presentó halo.

El tratamiento con gel de cobre (esquina superior derecha) generó una media de 27,38 mm de inhibición y el tratamiento con clorhexidina (esquina superior izquierda) generó una media de 25,22 mm de inhibición (**Figura 9**).

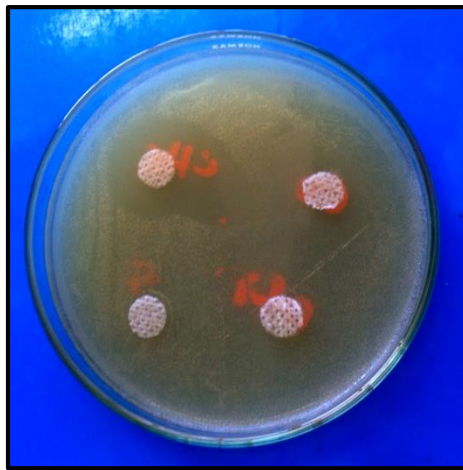


Figura 9. *C. parapsilosis* a las 24 horas.

Evaluación a las 48 horas:

Se siguen presentando halos de inhibición en relación a los discos con gel de cobre y clorhexidina. En los tratamientos con alcohol gel y agua destilada no se observa inhibición.

Los límites del halo formado en torno a los discos con gel de cobre se aprecian mejor delimitados que a las 24 horas, con una media de 20,56mm, disminuyendo su efecto en 6 mm aproximadamente. En el caso del tratamiento con clorhexidina, se observan halos bien delimitados, con una media de 25, 99mm manteniendo su efecto prácticamente sin cambios (**Figura 10**).

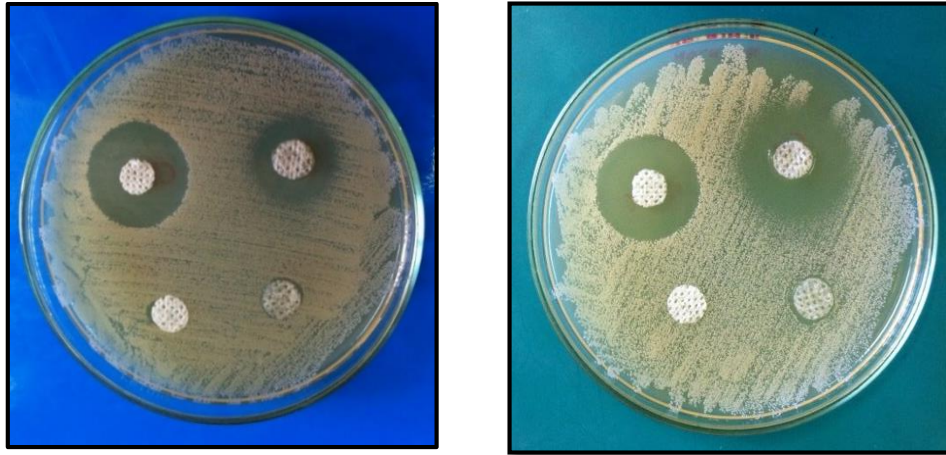


Figura 10. *C. parapsilosis* a las 48 horas.

Evaluación a los 7 días:

Se observa la mantención de los halos de inhibición tanto para el gel de cobre como para la clorhexidina. En los tratamientos con alcohol gel y agua destilada no se observa inhibición.

El tratamiento con gel de cobre generó una media de 18 mm de inhibición, disminuyendo altamente su efecto, en relación a la evaluación a las 24 horas, en que la media del halo de inhibición fue de 27,38mm.

El diámetro de los halos formados en torno a los discos con clorhexidina se mantiene estable en el tiempo, con una leve variación, generando una media de 25,44 mm de inhibición (**Figura 11**).

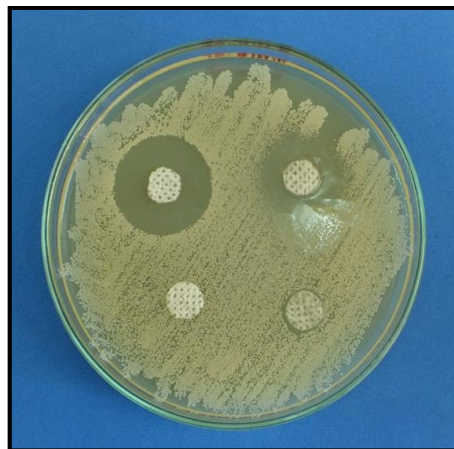


Figura 11. *C. parapsilosis* a los 7 días.

ANEXO 5

Base de datos *S. mutans*

Diámetro del halo de inhibición en
milímetros

<i>S. mutans</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Desviación estándar	X	Coefficiente Variación %
Cu 16 horas	12	19	11	12	14	13	13	14	13	2,29	13,44	17
Cu 24 horas	0	11	0	0	11	0	11	0	0	5,5	3,67	149,8
Cu 48 horas	0	11	0	0	0	0	0	0	0	3,66	1,22	3
Cu 7 días	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CHX 16 horas	22	21	20	21	21	19	19	19	22	1,23	20,44	6,04
CHX 24 horas	22	21	20	21	21	19	19	19	21	1,11	20,33	5,49
CHX 48 horas	22	21	19	21	21	19	19	19	21	1,20	20,22	5,94
CHX 7 días	22	21	19	21	21	19	19	19	21	1,20	20,22	5,94
OH 16 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OH 24 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OH 48 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OH 7 días	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H2O 16 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H2O 24 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H2O 48 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H2O 7 días	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Base de datos *C. albicans*

Diámetro del halo de inhibición en milímetros

<i>C. albicans</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Desviación Estándar	X	Coefficiente Variación %
Cu 24 horas	30	32	34	32	35	32	34	38	35	2,35	33,56	7
Cu 48 horas	30	30	32	30	34	30	38	35	34	2,88	32,56	8,84
Cu 7 días	32	30	32	31	37	32	36	35	32	2,40	33,00	7,27
CHX 24 horas	20	20	20	20	20	20	20	20	20	0,00	20,00	0
CHX 48 horas	22	20	22	20	20	20	20	20	20	0,88	20,44	4,3
CHX 7 días	20	20	20	20	21	19	20	20	20	0,50	20,00	2,5
OH 24 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00	0
OH 48 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00	0
OH 7 días	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00	0
H2O 24 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00	0
H2O 48 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00	0
H2O 7 días	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00	0

Base de datos *C. parapsilosis*

Diámetro del halo de inhibición en milímetros

C. Parapsilosis	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Desviación estándar	X	Coficiente Variación %
Cu 24 horas	30	34	28	20	22	-	30	30	25	4,68	27,38	17,1
Cu 48 horas	22	20	20	14	18	16	25	25	25	4,06	20,56	19,77
Cu 7 días	20	18	18	16	14	13	22	20	21	3,12	18,00	17 1/3
CHX 24 horas	26	24	24	24	24	26	26	28	25	1,39	25,22	5,51
CHX 48 horas	26	28	26	26	26	26	25	24	26	1,05	25,89	4,05
CHX 7 días	26	24	26	25	26	26	26	24	26	0,88	25,44	3,45
OH 24 horas	10	10	11	11	11	11	12	12	14	1,22	11,33	10,76
OH 48 horas	11	11	11	11	11	11	11	13	12	0,70	11,33	6,17
OH 7 días	11	11	11	11	11	11	11	12	11	0,33	11,11	2,97
H2O 24 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	0
H2O 48 horas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	0
H2O 7 días	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	0