



UNIVERSIDAD FINIS TERRAE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
MAGISTER EN REHABILITACIÓN ORAL

**EVALUACIÓN IN VITRO DE LA EFICACIA DE AGENTES
COADYUVANTES EN LA HIGIENE PROTÉSICA SOBRE CANDIDA
ALBICANS**

RODRIGO RUBÉN AMÉSTICA HERNÁNDEZ

Tesis presentada a la Facultad de Odontología de la Universidad Finis Terrae
para optar al grado de Magister en Rehabilitación Oral

Profesor Guía: Álvaro Cartagena González

Santiago, Chile

2017

i

INDICE	
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	3
MARCO TEÓRICO	4
1. ESTOMATITIS PROTÉSICA	4
1.1 Definición y Características	
1.2 Etiología	
1.3 Tratamiento	
2. CANDIDA ALBICANS	6
2.1 Definición y Características	
2.2 Diagnóstico	
3. RESINA ACRÍLICA	8
1.1 Generalidades	
1.2 Prótesis removibles y factores de proliferación microbiológica	
4. CONTROL DEL BIOFILM	10
4.1 AGENTES DE DESINFECCIÓN	
4.1.1 Hipoclorito de Sodio	
4.1.2 Clorhexidina	
4.1.3 Peróxidos Alcalinos	
MATERIALES Y MÉTODO	13
Diseño del Estudio	
Universo y Muestra	
Variables	
PROCEDIMIENTOS	15
1. Obtención de la muestra	
2. Aislamiento de <i>Candida albicans</i>	
3. Procedimiento de siembra de <i>Candida albicans</i>	
4. Pruebas de laboratorio	
5. Toma de muestras	
6. Recolección de datos	
7. Análisis estadístico	

RESULTADOS	22
1. Descripción de la muestra	
2. Análisis del crecimiento de <i>Candida albicans</i>	
3. Análisis de la presencia de <i>Candida albicans</i>	
DISCUSIÓN	26
CONCLUSIONES	30
BIBLIOGRAFIA	31

RESUMEN

Objetivo: El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia de tres agentes desinfectantes antifúngicos (gluconato de clorhexidina al 0,12%, hipoclorito de sodio al 5%, y tabletas de perborato de sodio Corega® Tabs) sobre especímenes de acrílico de termocurado sembrados in vitro con *Candida albicans*.

Material y Método: Se consideraron 360 rectángulos de acrílico de termocurado con un área de 200 mm² que fueron sembrados con una solución de 1x10⁶ cel/ml de *Candida albicans* por 48 horas a 35°C en un horno de cultivo. Luego fueron distribuidos al azar en grupos de 30 rectángulos, los que fueron inmersos en gluconato de clorhexidina al 0,12%, hipoclorito de sodio al 5%, tabletas de perborato de sodio Corega® Tabs, y suero fisiológico al 0,9%, por 5, 60 y 480 minutos.

Luego se tomó una muestra de cada rectángulo, la que fue cultivada en media placa Petri de ChromAgar específico para *Candida albicans* por 48 horas a 35°C. Se tomaron fotografías estandarizadas de cada placa Petri y se analizaron mediante el software Adobe Photoshop CS5, midiendo la cantidad de píxeles en cada placa, siendo tabulados en Microsoft Excel y analizados estadísticamente mediante software Stata v 14.

Resultados: Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.000001$) en los tres periodos de tiempo estudiados, luego de aplicar el test de Kruskal Wallis al comparar la clorhexidina al 0,12%, las Corega® Tabs, y el hipoclorito al 5% con el control negativo (suero fisiológico al 0,9%).

Al comparar los tratamientos experimentales clorhexidina al 0,12% y las Corega® Tabs en los diferentes periodos de tiempo y determinar cuál de ellos fue el más efectivo en inhibir el crecimiento de *Candida albicans*, se realizó el test de Friedman, no encontrando diferencias estadísticamente significativas en los distintos tiempos evaluados ($p > 0.05$).

Mediante test de McNemar se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.0196$) al evaluar la acción de clorhexidina al 0,12% entre los 5 minutos y 480 minutos de acción. Por otra lado, al evaluar la acción de las Corega® Tabs, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.0339$), al comparar los periodos de 5 y 60 minutos de acción así como entre los 5 minutos y los 480 minutos de acción ($p = 0.0047$).

Cuando comparamos ambos tratamientos en los intervalos de 5 minutos ($p = 1$), 60 minutos ($p = 0.1797$), y 480 minutos ($p = 0.3173$), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Conclusión: Este estudio in vitro sugiere que todos los tratamientos probados son antifúngicos efectivos contra *Candida albicans* sobre acrílico de termocurado. Se recomienda el uso por al menos 480 minutos de clorhexidina al 0,12%, y 60 minutos para las tabletas de perborato de sodio Corega® Tabs, pues allí se logra su máxima efectividad antifúngica contra *Candida albicans*.

Palabras claves: *Candida albicans*. Denture cleaners. Acrylic resin. Clorhexidine. Sodium perborate. Disinfectants.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas la población chilena ha experimentado un cambio demográfico importante, producto de esto la población adulta ha ido en un progresivo aumento respecto de la población joven (1). Adicionalmente, los avances de la tecnología han producido una mejoría de las condiciones de vida y de la salud de la población chilena, lo que a su vez ha llevado a un aumento de la sobrevivencia de la población y, dentro de los elementos más destacables que contribuyen a este fenómeno social, podemos mencionar en términos generales a los avances médicos y científicos (2). Esta tendencia, nos sugiere que en el mediano plazo estaremos frente a una población compuesta de manera importante por adultos mayores, por lo que nos vemos con la responsabilidad de conocer las necesidades de dicho grupo para poder proporcionar una atención integral y de calidad en salud (3). Por lo anterior, resulta evidente que este aumento en la proporción de la población adulta pondrá a prueba la capacidad de atención de los sistemas de salud del país, pues se hace imprescindible contar con especialistas y programas específicos para la atención de éstos y sus necesidades.

En el área de la odontología, se hace indispensable que los profesionales conozcan el estado de salud de la población adulta, que en el grupo de 64 a 75 años presenta una pérdida promedio de 15,81 dientes, con un edentulismo total del 33,4% (4), así como las manifestaciones bucales de enfermedades sistémicas de alta prevalencia en este grupo (5). Lo anterior, instala la necesidad de conocer y proveer las alternativas de rehabilitación integral, donde la prevención de nuevas patologías puede ser tanto o más importante que la rehabilitación misma. Esta última, generalmente, implicará un tratamiento en base a prótesis removible total o parcial, lo que según estudios alcanza un 76% (6), situación determinada fundamentalmente por asuntos económicos (5).

Cuando nos referimos a tratamientos rehabilitadores en base a prótesis removible acrílicas (PRA) debemos pensar en la prevención de enfermedades asociadas a su utilización, las que debido a sus características superficiales, constituyen un potencial lecho para microorganismos y hongos, produciendo alteraciones de la mucosa oral. Ejemplo de esto es la estomatitis protésica, con una morbilidad del 60% (7), siendo su principal factor etiológico la *Candida albicans* (8-10).

Importante entonces es la limpieza mecánica de estos aparatos protésicos, la que se ve dificultada por la pérdida de motricidad a causa del envejecimiento (11), por lo que es ideal apoyar esta con agentes coadyuvantes, los que aumentan los gastos y tienen poca evidencia científica que justifique su utilización (12).

Dado lo anterior es que para los pacientes portadores de PRA se hace necesario contar con un producto que sea eficiente en la desinfección de las prótesis dentales acrílicas, de fácil acceso, uso simple y económico; y que sea

capaz de inactivar a la *Candida albicans*, principal factor de la estomatitis protésica (13).

Actualmente, los productos disponibles en el mercado farmacéutico chileno para la higiene protésica son en base a peróxidos alcalinos, encontrando Corega Tabs (Glaxosmithkline), Eciclean (Biotoscana), y Kin Oro (Pharma Investi). Sin embargo la evidencia científica que avale el uso de estos productos es escasa, y tampoco existen claros protocolos de higiene para PRA que los relacionen con un tiempo de acción específico (12).

Por otra parte, la clorhexidina sigue siendo ampliamente utilizada en el área dental por su gran espectro de acción ante bacterias y hongos, teniendo varios estudios que avalan su uso en porcentajes del 2% sobre PRA (14-16) Sin embargo la concentración presente en el mercado chileno es en general de 0,12%, la cual está poco estudiado su efecto sobre PRA y *Candida albicans*.

Lo expuesto anteriormente, demuestra la necesidad de dar respuesta a un problema de salud bucal a nivel nacional, como lo es la estomatitis protésica asociada a *Candida albicans*. Por lo tanto, el propósito de este estudio es comparar la eficacia como fungicida del gluconato de clorhexidina al 0,12%, con otros compuestos como los peróxidos alcalinos y el hipoclorito de sodio, sobre *Candida albicans* en una superficie acrílica de termocurado.

HIPÓTESIS

La actividad fungicida del gluconato de clorhexidina al 0,12% en solución acuosa sobre *Candida albicans*, sobre acrílico de termocurado, es similar a la que poseen los peróxidos alcalinos y el hipoclorito de sodio al 5%.

OBJETIVOS

Objetivo general

Comparar la eficacia fungicida del gluconato de clorhexidina al 0,12% con otros productos de igual propósito, como los peróxidos alcalinos y el hipoclorito de sodio al 5%, sobre *Candida albicans* en una superficie acrílica de termocurado.

Objetivos específicos

1. Analizar la eficacia fungicida/fungistática del gluconato de clorhexidina al 0,12% y otros productos de igual actividad como los peróxidos alcalinos y el hipoclorito de sodio sobre *Candida albicans* en acrílico de termocurado.
2. Analizar la relación eficacia fungicida/tiempo del gluconato de clorhexidina al 0,12% y otros productos de igual actividad como los peróxidos alcalinos y el hipoclorito de sodio sobre *Candida albicans* en acrílico de termocurado.
3. Describir información relevante sobre la susceptibilidad de la *Candida albicans* a los fungicidas utilizados en clínica.
4. Obtener información útil para el desarrollo de estudios que permitan aumentar el nivel de evidencia respecto de este tema.

MARCO TEÓRICO

1. Estomatitis protésica

1.1 Definición Y Características

Es un proceso inflamatorio en donde se encuentra involucrado la mayoría de la mucosa ubicada bajo el aparato protésico removible, ya sea completo o parcial (17).

Algunos autores lo clasifican como una forma de candidiasis eritematosa, otros usan el término de *candidiasis atrófica crónica*, a modo de sinónimo. Clínicamente se caracteriza por un variado grado de eritema, a veces acompañado de petequias sangrantes, localizándose bajo la superficie de soporte protésica removible (9).

La estomatitis protésica es un proceso asintomático (9), aunque se describen en la literatura casos con sensación de ardor u otra sensación dolorosa, halitosis, sabor desagradable y resequedad bucal (17).

1.2 Etiología

La etiología es multifactorial, pero la prótesis dental es considerada como el factor etiológico indispensable (8,18).

Bajo esta se genera un biofilm, en donde encontramos bacterias y hongos, específicamente la especie *Candida albicans* (8-10). Investigaciones han determinado que la *Candida albicans* es el agente más importante en el desarrollo de la estomatitis protésica (13) llegando a afectar al 60% de los sujetos que portan prótesis dentales (7).

Un estudio de Dar-Odeh NS et al. (56), en Jordania, en donde se analizó y evaluó lesiones de la mucosa oral de 167 individuos, las que luego fueron examinadas mediante microscopia, obtuvo que el 28% padecía de estomatitis protésica asociada a la especie *Candida*, de los cuales el 72% confirmó como factor etiológico la *Candida albicans*. Esto se relaciona con su capacidad de adherirse y proliferar en tejidos duros y blandos de la cavidad oral, y así producir un complejo bacteriano heterogéneo (7).

Por su parte, Arendorf TM et Walker DM (17), resumieron los factores etiológicos de estomatitis protésica en: trauma protésico, estado de higiene bucal y protésico, factores dietéticos, infecciones por *Candida*, y condiciones sistémicas predisponentes.

1.3 Tratamiento

El tratamiento para la estomatitis protésica se fundamenta en el control de los múltiples factores etiogénicos de la lesión (7).

Específicamente, cuando esta patología es asociada a *Candida albicans*, se recomienda el uso de una delgada capa de Nistatina o Clotrimazol en crema sobre la superficie tisular de la prótesis. Para asegurar óptimos resultados, la superficie tisular de la prótesis debe ser simultáneamente tratada, mediante la aplicación de tabletas antifúngicas de Nistatina, 4 o 5 veces al día por dos semanas. Además, la prótesis debiese dejarse en una dilución de agua más nistatina, o solamente clorhexidina al 0.2% (19).

La mayoría de estos productos producen la completa remisión de los síntomas dentro de 12 a 14 días (7). Webb (20) demostró la importancia de la terapia antifúngica en el tratamiento y prevención de la candidiasis oral.

El uso de sustancias antisépticas como la clorhexidina al 0,2% administrada 3 ó 4 veces al día, es capaz de reducir significativamente la cantidad de biofilm, pero no presenta una acción significativa sobre *Candida albicans* (20).

Los mejores resultados se obtuvieron al sumergir las prótesis en clorhexidina al 2% junto a la aplicación de terapia antifúngica tópica. Cabe destacar que nunca se debe administrar clorhexidina junto con nistatina, ya que esta disminuye la capacidad antifúngica de la última (20).

Otros antisépticos utilizados son el hipoclorito de sodio, que a una concentración del 0,02% produce una significativa disminución de *Candida* y bacterias. (7). Desafortunadamente su uso no es recomendable por el daño que causa sobre la superficie protésica (21).

La irradiación con microondas también ha sido un tratamiento efectivo en la desinfección de prótesis. Estudios in-vitro demuestran la capacidad de producir la muerte de células de *Candida albicans*. Clínicamente se ha avalado esta efectividad en el tratamiento de estomatitis protésica asociada a *Candida albicans* (7).

Sin embargo, este tratamiento puede producir cambios conformacionales en la prótesis, por lo que su uso masivo no es recomendable (22).

Otros estudios recomiendan una correcta higiene oral y de la prótesis, mediante un cepillo blando sobre la mucosa lesionada, y un cepillado de la superficie tisular protésica más algún desinfectante, debido a la irregularidad y porosidad de la superficie protésica (23). Además se recomienda el retiro de la prótesis durante la noche o por lo menos 6 horas (7).

2. *Candida albicans*

2.1 Definición y Características

El género *Candida* comprende más de 150 especies de levaduras, dentro de las cuales destacan las patógenas humanas *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, y *C. albicans* (24), siendo esta última la principal especie asociada a micosis oral y la más virulenta del género *Candida* (25,26).

La *Candida* se puede encontrar como comensal en piel, tracto gastrointestinal, tracto genitourinario (27,19), y en la cavidad bucal (*C. albicans*, 75%; *C. tropicalis*, 8%; y *C. krusei*, 3 al 6%) (28), viviendo en perfecto equilibrio con los demás miembros de la microbiota oral.

Su transformación a patógeno dependerá tanto de la alteración de los mecanismos defensivos de la persona colonizada, como del complejo potencial de factores de virulencia del hongo. Dentro de los mecanismos defensivos del humano frente a la *Candida*, encontramos los mecanismos inespecíficos y específicos humorales y celulares (29).

Una vez sobrepasados los mecanismos defensivos del hospedero, el hongo mediante sus determinantes de virulencia podrá producir una micosis (29), que en el caso de la *Candida spp.* se denomina candidiasis ó, candidosis. (9).

La inadecuada higiene oral contribuye a la formación de un ambiente conducente a la colonización y adhesión de *Candida* (19).

El proceso de infección de los tejidos por *C. albicans* se diferencia en tres estadios: adhesión y colonización, en donde el rol protector de la saliva cumple una labor fundamental de protección del hospedero; penetración, que se facilita por la transformación levadura-micelio (formación de tubos germinales) y proteasas; y la respuesta inflamatoria aguda (29).

Las prótesis dentales favorecen la infección por parte de *C. albicans*, ya que en la interfase creada entre ellas y la mucosa subyacente se produce una baja de pH y condición anaerobia, lo que sumado al bajo flujo salival presente, se traduce en un medio propicio para la adhesión y colonización, a lo que si le sumamos los vectores de fuerza verticales resultantes de la prótesis, se ve favorecida la penetración a los tejidos (19).

2.2 Diagnóstico

Actualmente podemos encontrar más de 30 métodos para realizar un diagnóstico diferencial de *Candida albicans* (30), sin embargo describiremos brevemente los utilizados en este trabajo.

El test del tubo germinativo es considerado la prueba más económica, simple y eficiente para diferenciar *Candida albicans* de otros tipos de *Candida* (31). Cuando la *Candida albicans* es cultivada en suero entre 2 a 4 horas a 37°C, produce unas estructuras denominadas tubos germinativos o pseudohifas, características de este hongo. Sin embargo esta la posibilidad de generar falsos positivos por parte de *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, y *C. parapsilosis* (30).

También podemos realizar un cultivo de la muestra, que se logra a la temperatura ambiente y en los medios habituales, como Agar-Sabouraud (peptona 10,0 grs., glucosa 40,0 grs., agar 15,0 grs., y agua destilada c.s.p. 1000 mL.), o caldo de Sabouraud (digerido enzimático de caseína 10,0grs., dextrosa 20,0 grs., y agua destilada c.s.p. 1000 mL.) a los cuales se les adiciona cloranfenicol (50 mg/l) o cicloheximida (Actidione); o en extracto de malta (extracto de malta 20,0 grs., peptona 1,0 grs., glucosa 20,0 grs., agar 15,0 grs., agua destilada c.s.p. 1000 mL.)(1), todos estos medios deben ser esterilizados mediante autoclave, a 121°C, durante 15 minutos, evitando sobrecalentar el preparado (32).

Por otro lado, se encuentran en el mercado, medios específicos cromáticos, como el agar cromo-candida (peptona 10,0 grs., glucosa 20,0 grs., cloranfenicol 0,50 grs., sustrato cromogénico 0,40 grs., agar bacteriológico 15,0 grs., agua destilada c.s.p. 1000 mL), el que generalmente se suministra preparado, y que de no ser así, no se debe esterilizar mediante calor, ya que se desnaturalizan los cromógenos (32), Este último tiene una gran especificidad, permitiéndonos observar, de fácil manera, diversas especies de *Candida* (9).

Los hongos crecen rápidamente a 37°C y en 24 a 48 horas se obtienen colonias lisas, blandas, brillantes, de color blanco o ligeramente beige; con el tiempo se hacen plegadas, rugosas o membranosas y a simple vista se observa el micelio sumergido (28).

El agar cromo-candida, es un medio cromogénico que genera pigmentos coloreados según la especie de *Candida spp.* presente en el medio luego de 48 horas de cultivo a 37°C (33), resultando colonias verdes para *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*; colonias azules para *Candida tropicalis*; colonias rosa-púrpura para *Candida krusei*; y colonias lila claro para *Candida grabalta* y *Candida parapsilosis* (34). Por este motivo es que se realizan pruebas diferenciales específicas para *Candida albicans*, como la filamentación en suero, y así diferenciarla de otras especies como la *Candida dubliniensis*.

3. Resina acrílica o acrílico

3.1 Generalidades

Las bases de las prótesis removibles pueden confeccionarse con materiales de base orgánica o de base metálica, según el caso, prefiriéndose las primeras en prótesis completas, y una combinación de ambas para prótesis parciales (35).

Los materiales orgánicos para base de prótesis removible, están representados por las resinas acrílicas, las que se componen de un polvo (polímero, pigmentos, plastificantes, iniciador) y un líquido (monómero, inhibidor, agente de las cadenas cruzadas), los que al mezclarse dan como resultado una masa plástica, que se adapta sobre el molde previamente preparado, y luego se hace polimerizar (curado del monómero), para obtener un polímero rígido (35).

Para que se produzca la polimerización se debe activar el agente iniciador, peróxido de benzoílo, presente en el polvo, mediante activadores físicos, como el calor, denominándose acrílico de termocurado o termopolimerizable, o con una radiación electromagnética de longitud de onda específica, denominándose acrílico fotopolimerizables o fotocurables; o con activadores químicos, agentes que son incorporados al monómero acrílico, denominándose entonces acrílico autocurable o autopolimerizable (35).

3.2 Prótesis removibles y factores de proliferación microbiológica

Las bases acrílicas de prótesis removibles poseen un conjunto de características que hacen posible la colonización por *Candida spp.* y diversos microorganismos. Varias revisiones agrupan los principales factores que condicionan la colonización:

- La prótesis, por su configuración, posee varias rugosidades que dependen del tipo de polimerización y del acabado (pulido) al que esta haya sido sometida. Estas rugosidades aumentan la energía libre superficial haciendo más fácil la colonización de las bacterias, además amplían la superficie de esta para dar cabida a más microorganismos y por ende un potencial foco de nuevas enfermedades (36).
- En general hay prótesis a las cuales se les realizan acondicionamientos para un mejor ajuste e incluso para lograr la adherencia que les falta. Estas sustancias modifican la superficie protésica creando un nuevo medio de colonización. Es verdad que muchas de estas sustancias tienen cierto potencial bacteriostático, pero se sabe que se pierde con el tiempo y además, es sorteado por el sinergismo microbiológico, haciendo posible la colonización (37).

- La saliva hoy en día juega un papel controversial, pues hay estudios que consideran que la humedad que suma está a la prótesis facilita la colonización por *Candida spp* (7,26,38,39), sin embargo hay otros autores que mencionan que los anticuerpos y enzimas que esta contiene disminuiría este potencial colonizador (40). No obstante, no se puede generalizar por lo que se debe evaluar y considerar la calidad de esta saliva y la forma como se realizaron los estudios, pues es distinto comparar la saliva de un individuo joven a la de un adulto, que puede presentar enfermedades crónicas que varían enormemente la calidad de esta (7).
- La prótesis no solo es un buen reservorio para la *Candida albicans*, sino que también para varios microorganismos (7, 39). Esta mutua cooperación hace que la sobrevivencia de estos patógenos a la saliva y desinfectantes, sea mucho mayor (36).

Da Silva et al. (41), describieron que en conjunto a la *Candida albicans*, sobre la superficie protésica, era fácil encontrar otras bacterias tales como: *Streptococcus mutans*, *S. aureus*, *Escherichia coli* y el *Bacillus subtilis*, entre otros.

Debemos mencionar que la prótesis dental acrílica tiene efectos secundarios que facilitan su colonización por parte de microorganismos: aísla la mucosa subyacente ante la acción de autolimpieza de la musculatura oral; crea una condición de anaerobiosis; y debido a los detritos orgánicos aumenta la acidez, lo que aumenta la capacidad proliferativa de las levaduras y bacterias. Estas condiciones permite al *C. albicans* formar fácilmente biopelículas en la superficie de las prótesis (42). Sin embargo la distribución de la *Candida albicans* no es uniforme dentro de la boca ni en la prótesis, encontrándose los mayores niveles en la superficie palatina de esta última, lo que permite que sea un reservorio continuo de microorganismos que favorecen la infección (26).

4. Control del Biofilm

Para mantener controlado el biofilm protésico la higiene mecánica es la alternativa más popular, mediante el uso de cepillos con jabones o dentífricos. Sin embargo, existe gran cantidad de evidencia de que, la utilización de este único método, no es suficiente para eliminar la placa bacteriana de las bases de las prótesis por lo que hay que combinarlo con el uso de desinfectantes (43). Adicionalmente, otra desventaja de este método mecánico es que si son empleados de manera exagerada o con una fuerza y técnica incorrecta puede causar daño a las prótesis, teniendo efectos negativos, como manchas persistentes y distorsión de los retenedores afectando su capacidad retentiva (7). Igualmente, son ineficaces en pacientes con limitación motora, ya que la remoción efectiva de la placa bacteriana requiere de cierto grado de destreza manual, la cual está reducida en adultos mayores (11). Aun así la mayor ventaja su sencillez y economía.

El método químico es un método complementario para la limpieza de prótesis, es superior al mecánico en cuanto al control de placa bacteriana y a la proliferación micótica según Montagner H et al. (44).

Según estudios de Paranhos HF et al. (45), la combinación del método químico con el mecánico es lo más efectivo para eliminar la *Candida albicans*.

En la literatura podemos encontrar diversos agentes químicos utilizados para la limpieza protésica, en donde dependiendo el compuesto activo, el tiempo de exposición y las concentraciones de los agentes, vamos a obtener diferentes resultados de desinfección. Entre ellos encontramos: hipoclorito de sodio (14), glutaraldehído (46), clorhexidina (15,44,47), peróxidos alcalinos (12,45,48), ácido acético (48,49), cloruro de benzalconio (14), ácido cítrico (50), derivados terpénicos (51), xilitol (52). A continuación nos centraremos en los relevantes para nuestra investigación.

4.1 Agentes de desinfección

4.1.1 Hipoclorito de Sodio

Producto más utilizado en desinfección. Es muy útil para remover manchas de las prótesis, disuelve algunos componentes salivales y otras sustancias orgánicas. Es bactericida y fungicida (7). Actúa directamente sobre la matriz orgánica de la placa dental y además causa la destrucción de la estructura del polímero del acrílico (7). El hipoclorito no disuelve el cálculo, pero sí inhibe la formación de éste sobre las prótesis (7). Aunque son limpiadores eficaces presentan diversos inconvenientes como la corrosión del metal, el aumento de la flexibilidad de los retenedores, y degradación de la superficie acrílica, lo que restringe su empleo según Banabé W et al. (53).

4.1.2 Clorhexidina

En los últimos años se ha estudiado bastante la clorhexidina como sustancia antimicrobiana. Hoy, es considerada la mejor elección entre los antisépticos para el control del biofilm, para la prevención de la caries y gingivitis (53, 54). También es usada como tratamiento para varias lesiones de la cavidad oral como la periodontitis y la estomatitis según Da Silva FC et al. (41). Sin embargo al usarlo diariamente produce tinciones en las estructuras dentales, lengua y aparatos removibles (44).

La clorhexidina es un biocida de amplio espectro de actividad contra variados organismos, incluyendo la *Candida albicans*. Su acción contra biofilms de *Candida albicans*, es significativamente menor que la acción contra *C. albicans* en suspensión (15).

Hoy podemos encontrar en el mercado diversas concentraciones de clorhexidina, estas varían entre 0,2%; 0,12%, y 0,05%. Las primeras dos concentraciones son las más utilizadas para los tratamientos bucales (53). Las diferencias entre ellas se basan en su posología, en donde a concentraciones al 0,2% se utilizan al mismo volumen en la mitad del tiempo de enjuague que las de concentraciones al 0,12%, obteniendo los mismos resultados, pero reduciendo de manera significativa los efectos secundarios como las tinciones, irritaciones en los tejidos blandos y apariciones de cálculos. Sin embargo la efectividad antimicrobiana se mantiene relativamente pareja para ambas concentraciones, a lo largo del periodo del tratamiento (54).

Las concentraciones al 0,05% se usan para el control de placa, para tratamientos más largo. Sin embargo la eficacia se ve reducida considerablemente en comparación a las concentraciones superiores. Por esta razón, para aumentar su eficacia se asocian a otros compuestos tales como cetilpiridinio, sales de zinc, triclosán, etc (55). El efecto secundario asociado a esta concentración sigue siendo la tinción dentaria, ahora bien se requiere de un tiempo de exposición mayor o de un tiempo de tratamiento mucho más prolongado para que se forme (16).

4.1.3 Peróxidos Alcalinos

Limpiadores compuestos de perborato y bicarbonato de sodio, son comúnmente utilizados para la limpieza de prótesis. Sin embargo deben ser asociados a una remoción mecánica para que surjan los efectos sobre el biofilm en la superficie protésica según Makino SI et al. (48).

Presentan una buena actividad antimicrobiana anaerobia contra el biofilm protésico, comparado con concentraciones de hipoclorito de sodio. Esta propiedad, sumada a la ausencia de olor y mal sabor, los hacen una buena opción para la higiene protésica (45). Este mismo estudio encontró diferencias

significativas en la eliminación de *Candida albicans* al comparar estos agentes ante la limpieza mecánica, siendo superior esta última, incluso cuando se comparó con la aplicación del agente químico sumado a la limpieza mecánica.

Muchos laboratorios hoy en día están trabajando en la confección de pastillas limpiadoras efervescentes en base a estos componentes. Sin embargo, aún no han mostrado una evidencia significativa en el control de microorganismos en comparación a los productos desinfectantes conocidos, como la clorhexidina. Ahora bien, sus efectos secundarios son bastante reducidos, por lo que sería una alternativa viable siempre y cuando se estuviera al tanto de sus limitaciones (56).

MATERIAL Y MÉTODO

Diseño del Estudio

Estudio comparativo experimental *in vitro* exploratorio.

Universo y Muestra

Se consideraron 30 muestras de acrílico de termocurado Marche® (Felix Martin y Cia; Santiago, Chile), de dimensiones 2mm x 20mm x 10mm.

Se utilizará el cálculo de tamaño mediante la comparación de proporciones, con un $p_1=20\%$ (56), un p_2 desconocido por lo que adquiere el valor de 0.5 asumiendo que habrá una distribución homogénea, y un nivel de significancia del 5%, resultando a lo menos 39 especímenes por grupo.

$$n_0 = \frac{(Z_\alpha \sqrt{2p(1-p)} + Z_\beta \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)})^2}{(p_1 - p_2)^2};$$

Por motivos económicos, y debido a que el trabajar con 39 especímenes por grupo encarecía el estudio, se decidió trabajar con 30 muestras de acrílico de termocurado Marche® por grupo, de dimensiones 2mm x 20mm x 10mm.

Variables

El estudio contempla dos variables dependientes: la Presencia de *Candida albicans* y el Crecimiento de *Candida albicans*, las que se verán afectadas por las variables independientes, Tipo de fungicida y el Tiempo.

1. **Crecimiento de *Candida albicans* (variable dependiente cuantitativa):**

Definición conceptual: cantidad de colonias de *Candida albicans* presentes en un medio de cultivo, una vez completado el periodo de incubación.

Definición operacional: Cantidad de colonias formadas sobre la mitad de una placa petri de agar cromo-candida y observadas macroscópicamente mediante una fotografía de estas, y luego procesadas computacionalmente para determinar la cantidad de pixeles que representa; una vez completado el periodo de incubación de 48 horas a 35°C, en condiciones de aerobiosis.

2. Presencia de *Candida albicans* (variable dependiente dicotómica):

Definición conceptual: presencia de colonias de *Candida albicans* en un medio de cultivo, una vez completado el periodo de incubación.

Definición operacional: Se considerarán dos categorías, presencia de colonias de *Candida albicans* (positiva) o ausencia de colonias de *Candida albicans* (negativa).

3. Tipo de Fungicida (variable independiente cuantitativa):

Definición conceptual: Corresponde a la denominación particular de la sustancia o compuesto del cual será evaluada su capacidad fungicida

Definición operacional Para el efecto se considerarán los siguientes fungicidas:

- Gluconato de clorhexidina al 0,12% (GC)

Se utilizarán 5400 mililitros de colutorio antiséptico Oralgene®, distribuido en 90 vasos milimetrados estériles que contendrían 60 ml.

Se considerará para su medición dos categorías con y sin exposición a GC.

- Peróxido alcalino (PA)

Se utilizarán 90 tabletas efervescentes Corega® Tabs, del laboratorio Block Drug Company, distribuidas en 90 vasos milimetrados estériles, a los cuales se les adiciono 60 ml de agua tibia (37°C). Se considerará para su medición dos categorías con y sin exposición a PA.

- Hipoclorito de Sodio (HNA)

Se utilizarán 5400 mililitros de hipoclorito de sodio al 5% (Clorox®, Clorox Chile S.A.) distribuido en 90 vasos milimetrados estériles que contenían 60 ml. Se considerará para su medición dos categorías con y sin exposición a HNA.

4. Exposición (variable independiente cuantitativa continua):

Definición conceptual: Periodo medido en minutos, desde que se pone la muestra en uno de los 3 agentes estudiados, hasta su lavado con agua destilada para posterior cultivo.

Definición operacional: Se considerarán para el efecto tres intervalos de tiempo medidos en minutos; 5, 60 y 480 minutos.

Procedimientos

1. Obtención de las unidades muestrales

Se confeccionaron 360 rectángulos de 10mm x 20mm x 2mm de acrílico de termocurado Marche®, el mismo utilizado en la confección de prótesis removibles, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Luego de su polimerización completa, se inspeccionaron minuciosamente en busca de irregularidades en su superficie, las cuales fueron eliminadas mediante un pimpollo fino para acrílico a baja velocidad.

Los rectángulos fueron acabados con un cepillo fino instalado en un torno, a fin de eliminar cualquier residuo. Luego se lavaron con agua y se secaron.

Los 360 rectángulos se enumeraron con la ayuda de un marcador negro, para finalmente ser esterilizados con autoclave (Runyes® modelo Y115. Ningbo Runyes Medical Instrument Co. Ltd; Ningbo, China), y almacenados hasta su uso.

2. Aislamiento de la *Cándida albicans*

En el laboratorio bioMérieux (Las Condes, Chile) se adquirió una cepa de *Candida albicans* NCPF3179, la cual viene en presentación de *Bioball*.

Estas se manejaron en los laboratorios de ciencias de la Universidad Finis Terrae, en donde se hidrataron y se sembraron en medios de cultivo específicos agar cromo-cándida. Se sembraron 3 placas, y se escogió una al azar y con ella se preparó la solución de *Candida albicans* utilizada en este estudio.

3. Procedimiento de siembra de *Candida albicans* en las unidades de muestra

Se tomaron los 360 rectángulos de acrílicos enumerados, y se distribuyeron aleatoriamente en 12 grupos de 30 unidades, a los que se les designó con una letra del abecedario, de la A hasta la L. Así también, a estos grupos se les asignó, de manera aleatoria, uno de los tres tratamientos: gluconato de clorhexidina al 0,12% colutorio Oralgene®. (Laboratorios Maver Ltda. Lampa, Chile), tabletas de perborato de sodio Corega® tabs. (Block Drug Company, Inc. Memphis, USA), hipoclorito de sodio Clorox® al 5%, (Clorox Chile S.A. Santiago, Chile); más un grupo control de suero fisiológico al 0,9% Apiroflex®. (Laboratorio Sanderson S.A. Santiago, Chile), en uno de los tres tiempos a evaluar: 5, 60, ó 480 minutos.

Los 5 minutos se decidieron basados en las indicaciones del fabricante de Corega® Tabs, que indica este tiempo de acción, para luego terminar con una limpieza mecánica. Así esperamos reflejar en este tiempo su máxima acción. Los 60 minutos para concordar con otros estudios que han evaluado los efectos

antifúngicos en ese periodo (40, 55). Por último se observaron los resultados en 480 minutos de acción constante de los agentes, lo que equivale al supuesto periodo de sueño que debería tener un adulto portador de prótesis removible, quien se la ha retirado según las indicaciones de su odontólogo, y dejado en un vaso con el agente durante la noche.

Esquema de tratamientos:

Los 360 rectángulos acrílicos se distribuyeron en 12 grupos con letras (ABCDEFGHIJKL)

- Grupos ACEL correspondieron a tratamientos por 480 minutos.
 - A: Gluconato de clorhexidina al 0,12% - Oralgene® (30 rectángulos)
 - C: Perborato de sodio – Corega® tabs (30 rectángulos)
 - E: Hipoclorito de sodio - Clorox® (30 rectángulos)
 - L: Suero fisiológico - Apiroflex® (30 rectángulos)

- Grupos BDFI correspondieron a tratamientos por 60 minutos.
 - B: Gluconato de clorhexidina al 0,12% - Oralgene® (30 rectángulos)
 - D: Perborato de sodio – Corega® tabs (30 rectángulos)
 - F: Hipoclorito de sodio - Clorox® (30 rectángulos)
 - I: Suero fisiológico - Apiroflex® (30 rectángulos)

- Grupos GHJK correspondieron a tratamientos por 5 minutos.
 - G: Gluconato de clorhexidina al 0,12% - Oralgene® (30 rectángulos)
 - H: Perborato de sodio – Corega® tabs (30 rectángulos)
 - J: Hipoclorito de sodio - Clorox® (30 rectángulos)
 - K: Suero fisiológico - Apiroflex® (30 rectángulos)

Estos fueron dispuestos en tubos de ensayo estériles Vacutainer® (Becton Dickinson and Company; New Jersey, USA), con la ayuda de una pinza de disección estéril. Luego, mediante una pipeta de 10 ml HBG Precicolor®. (Henneberg-Sander GmbH; Gießen, Alemania), se les agregó 1,5 ml de caldo de cultivo Sabouraud (Laboratorio de Micología, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso. Valparaíso, Chile), más 0,1 ml de una suspensión de *Candida albicans* en suero estéril al 0,9%, con el uso de una micropipeta High Tech Lab®. (PZ HTL S.A. Varsovia, Polonia).

La suspensión de *Candida albicans* se preparó en suero fisiológico estéril al 0,9% donde, con un asa de nicron calibrada estéril, se inocularon colonias de *Candida albicans* procedentes del cultivo de agar cromo-candida seleccionado, hasta lograr una densidad óptica de 0.284 mediante una longitud de onda de 530 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S, Thermo Scientific®. (Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA), correspondiente a 1×10^6 células por mililitro (41,56) (Fig 1).



Fig 1: Solución de *Candida albicans*.

Los 360 tubos de ensayo cultivados, se llevaron a un horno de cultivo SM-100, Memmert®. (Mettmert GmbH. Co. Schwabach, Alemania) a 35°C por 24 horas (Fig 2).



Fig 2: Tubos de ensayo con los especímenes de estudio en solución de *Candida albicans* y caldo Sabouraud.

4. Pruebas de laboratorio

Se retiraron los 360 tubos cultivados desde el horno, y se dejaron a temperatura ambiente (25°C). Con la ayuda de una pinza de disección estéril, fueron retiradas las muestras y depositadas en vasos milimetrados estériles de 120 ml de capacidad (Dentalab S.L. Barcelona, España), los cuales contenían 60 ml de cada agente estudiado. La clorhexidina se depositó en los vasos, segundos antes de la muestra, para evitar factores inhibitorios de su acción.

En el caso de Corega® Tabs, se ubicó la muestra sobre la tableta, previamente situada en el centro del vaso milimetrado. Luego se colocó las muestras en los vasos, y se añadió 60 ml de agua tibia (30°C).

Cada grupo fue tapado con papel kraft estéril, a modo de evitar el efecto inhibitorio de la luz γ sobre la clorhexidina, y para simular el efecto de la oscuridad nocturna (Fig. 3).



Fig 3: Tratamientos a evaluar en proceso .

Se trabajó de manera rápida y sistematizada, con el objetivo de que las muestras estuvieran en los agentes estudiados el tiempo más preciso posible. Se empezó con los primeros 4 grupos, ACEL, que corresponderán al periodo de 480 minutos. Luego se continuó con los grupos BDFI, asignándoles el periodo de 60 minutos, y finalmente se terminó con los grupos GHJK, que correspondieron al menor periodo de tiempo, 5 minutos.

5. Toma de las muestras

Una vez finalizado el tiempo asignado a cada grupo, las muestras se retiraron de las soluciones con la ayuda de una pinza de disección estéril, y se les aplicó 2 ml de agua bidestilada estéril Apiroflex® para detener la acción del agente fungicida, y luego se colocaron sobre un trozo de papel kraft estéril.

Se procedió a tomar la muestra de la superficie tratada, mediante un hisopo estéril. Se pasa por la superficie de esta 6 veces, de izquierda a derecha, sin rotar el hisopo, con el fin de concentrar la muestra en una misma superficie.

Posteriormente, se realizó la siembra de las muestras en la mitad de cada placa petri específica de agar cromo-candida, mediante la técnica de siembra por estría (56), la cual realiza movimientos en zigzag. Empezamos desde el centro de la placa Petri hacia el margen, abarcando toda la superficie en cinco movimientos horizontales, evitando pasar sobre una estría realizada previamente.

Las placas petri específicas se cultivaron en condiciones aerobias, por 48 horas, a 35°C en un horno de cultivo Memmert modelo SM-100, (Memmert®, Schwabach, Alemania) ubicado en la facultad de odontología de la Universidad Finis Terrae (Santiago, Chile).

6. Recolección de datos

Luego de las 48 horas de cultivo, se retiraron las muestras y se procedió a tomar fotografías mediante un sistema estandarizado, asegurando que cada foto presentase los mismos parámetros que la anterior (Fig. 4)



Fig 4: Estandarización de la toma de fotografías.

Se utilizó una cámara digital Nikon® modelo D5500 (Nikon Co; Bangkok, Tailandia) con un lente Nikkor® 18-140 mm (Nikon Co; Shanghai, China), sin utilizar zoom a una distancia de 30 centímetros de la placa petri.

Las placas petri se posicionaron siempre en el mismo lugar mediante tres puntos referenciales marcados sobre una superficie blanca.

Las fotografías obtenidas se procesaron digitalmente mediante el software Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems Inc. San Jose, USA), en donde se dividió cada placa petri por su diámetro. A continuación se determinó la cantidad de pixeles de cada imagen que abarca el crecimiento de las colonias de *Candida albicans*, para posteriormente ser tabulados en el software Microsoft Excel (Microsoft Co. Albuquerque, USA) (Fig. 5).

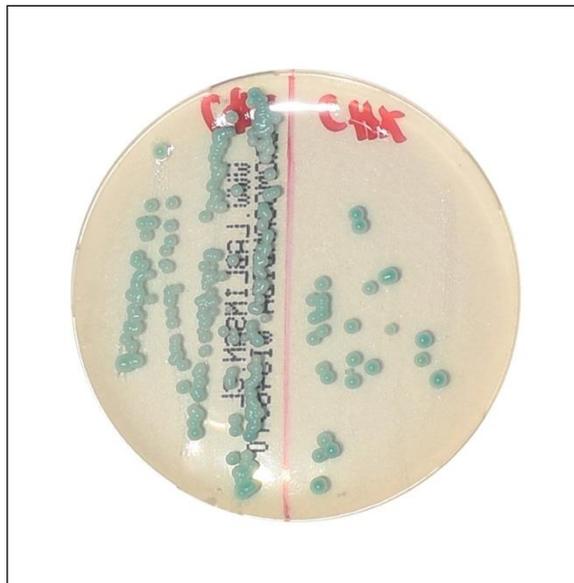


Fig 5: Medio de cultivo ChromAgar específico para *Candida albicans*, confirmando un crecimiento positivo en ambas mitades de la placa.

7. Análisis estadístico

Este se realizó mediante la utilización del software Stata versión 14 (Stata Corp; Texas, USA).

Se desarrolló estadística descriptiva de las variables dependientes mediante medidas de resumen, considerándose la mediana (p50) y el rango intercuartílico (IQR), ya que no hubo distribución normal de los datos. Para complementar, los resultados se presentan en tablas y gráficos.

En cuanto a la estadística inferencial o prueba de hipótesis se verificaron previamente los distintos supuestos para determinar el uso de estadígrafos paramétricos o no paramétricos. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $p \leq 0.05$.

Hipótesis a contrastar:

HO1 No existen diferencias en la actividad fungicida entre la Clorhexidina y el Peróxido alcalino

H11 Si existen diferencias en la actividad fungicida entre la Clorhexidina y el Peróxido alcalino

HO2 No existen diferencias en la actividad fungicida entre la Clorhexidina y el Hipoclorito de sodio

H12 Si existen diferencias en la actividad fungicida entre la Clorhexidina y el Hipoclorito de sodio

RESULTADOS

1. Descripción de la muestra

En la tabla I, podemos observar la descripción de la muestra utilizada. Los cuatro grupos tuvieron el mismo número de especímenes y fueron procesados simultáneamente.

Tabla I: Descripción de la muestra.

GRUPO	TIEMPO			Total
	5	60	480	
CLORHEXIDINA	30	30	30	90
COREGATABS	30	30	30	90
HIPOCLORITO	30	30	30	90
SUERO	30	30	30	90
Total	120	120	120	360

Se estudió la distribución de los datos mediante el test de Shapiro Wilk, comprobándose que no existe distribución normal ($p < 0.05$). Por este motivo, los resultados se describirán con medidas de resumen no paramétricas, como son la Mediana (p50) y el Rango Intercuartílico (iqr); para 5 minutos de acción en los distintos agentes (Fig. 1), y para los respectivos 60 y 480 minutos de acción (Fig. 2 y 3)

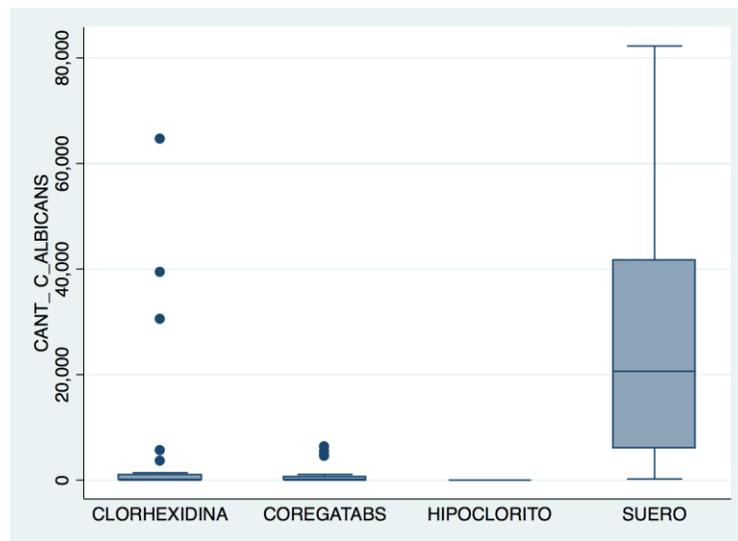


Figura 1: Distribución de los resultados del Crecimiento de *Candida albicans*, luego de 5 minutos en el agente desinfectante.

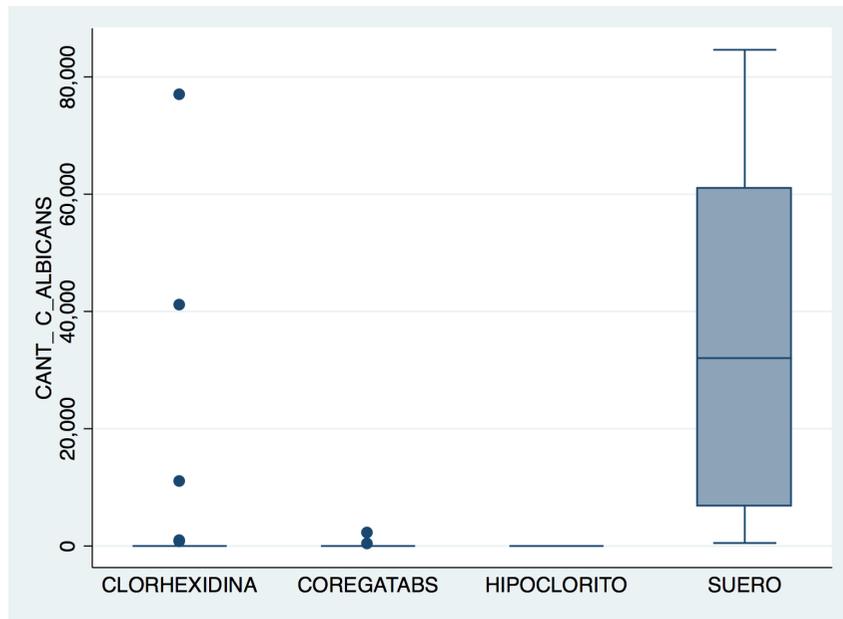


Figura 2: Distribución de los resultados del Crecimiento de *Candida albicans*, luego de 60 minutos en el agente desinfectante.

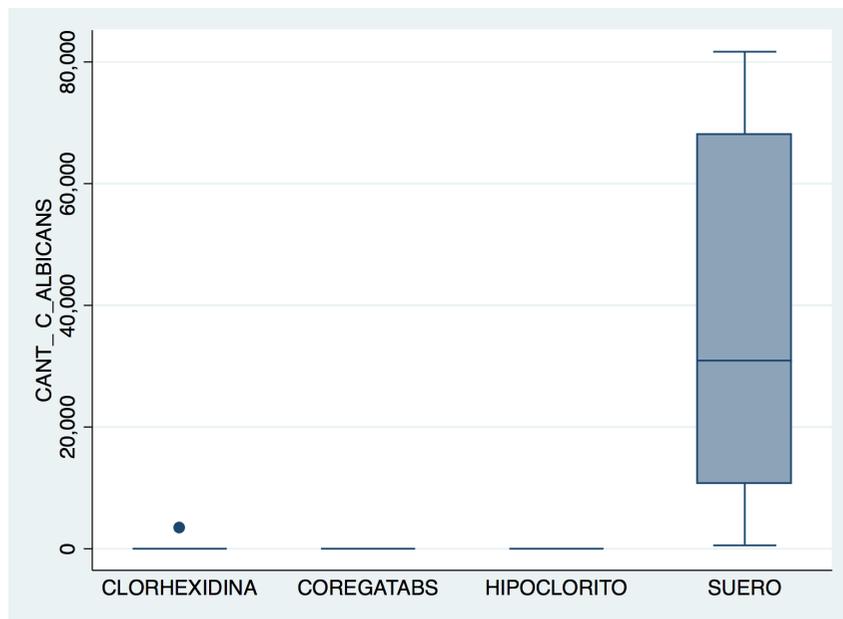


Figura 3: Distribución de los resultados del Crecimiento de *Candida albicans*, luego de 480 minutos en el agente desinfectante.

2. Análisis del Crecimiento de *Candida albicans*

Para evaluar la variable cantidad de *Candida albicans* presente entre los grupos (clorhexidina al 0,12%, las Corega® Tabs, y el hipoclorito al 5% con el control negativo (suero fisiológico) sin considerar el tiempo, se aplicó el test de Kruskal Wallis, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.000001$) entre ellos.

Al comparar los tratamientos clorhexidina al 0,12% y las Corega® Tabs versus el control negativo, si bien hubo crecimiento de *Candida albicans*, si se encontraron diferencias significativas ($p < 0.000001$) en los tres periodos de tiempo estudiados.

En el caso del hipoclorito de sodio al 5%, todos los especímenes mostraron un crecimiento nulo estadísticamente significativo ($p < 0.000001$) de colonias de *Candida albicans* en todos los periodos de tiempo estudiados.

Para comparar la acción de la clorhexidina al 0,12%, las Corega® Tabs, y el hipoclorito de sodio al 5% en los diferentes periodos de tiempo y detectar significancia estadística para su actividad inhibitoria en el crecimiento de *Candida albicans*, se realizó el test de Friedman que permite comparar la igualdad de tratamientos en medidas repetidas, el cual no resultó significativo ($p > 0.05$), por tanto no hay evidencia suficiente para aceptar la hipótesis de la investigación cuando buscamos evaluar en que intervalo de tiempo hay mayor eficiencia para cada tratamiento sobre esta variable. Esto se puede atribuir por trabajar con una muestra menor a la obtenida mediante el cálculo de tamaño muestral según los parámetros establecidos.

3. Análisis de la Presencia de *Candida albicans*

Para analizar esta variable, se realizó el test estadístico de McNemar, que permite determinar si la variación de los resultados puede ser atribuida al tratamiento utilizado.

Cuando evaluamos la acción de la clorhexidina al 0,12% sobre esta variable en los distintos intervalos de tiempo, se encontró que esta presentaba diferencias estadísticamente significativas sólo entre los 5 minutos y 480 minutos de acción ($p = 0.0196$). Por tanto podemos decir que la clorhexidina al 0,12% tiene su mayor eficacia a los 480 minutos de acción, dentro de los tiempos evaluados.

Por otra lado, al evaluar la acción de las Corega® Tabs sobre esta variable, se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los periodos de 5 y 60 minutos de acción ($p = 0.0339$), así como entre los 5 minutos y los 480 minutos de acción ($p = 0.0047$). Entonces, estas presentan su mayor eficacia a partir de los 60 minutos de acción, dentro de los tiempos evaluados.

Finalmente el hipoclorito de sodio al 5%, no tuvo diferencias estadísticamente significativas en los intervalos estudiados, pues siempre sus crecimientos fueron nulos.

DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación tuvo por objeto testear la eficacia de agentes desinfectantes antifúngicos sobre especímenes deacrílico de termocurado sembrados in vitro con *Candida albicans*, hongo saprofito de la cavidad oral, con gran potencial patógeno y relacionado a una de las alteraciones más prevalentes en la cavidad oral de pacientes con aparato protésico removible, la estomatitis protésica (10).

Así fue como se evaluó a los peróxidos alcalinos, utilizando a las tabletas efervescentes Corega® Tabs, las que presentan estudios que avalan su potencial antifúngico (44,56,60). También se evaluó el gluconato de clorhexidina la cual presenta un efecto antifúngico y antimicrobiano comprobado (15,44,47), mas son pocos los que han estudiado el efecto sobre la *Candida albicans* de la concentración al 0,12% (56) centrándose principalmente en el *gold standard* de esta, el 0,2%. (41). Por último, se tuvo como controles negativo y positivo al cloruro de sodio al 0,9% y el hipoclorito de sodio al 5%, respectivamente.

Luego de realizar la inoculación, los resultados obtenidos demuestran diferencias significativas en los distintos tratamientos al ser comparados con el control negativo. Esta situación, demuestra que los productos evaluados poseen un efecto antifúngico contra *Candida albicans*, independiente del tiempo en que estén en acción producirán acción fungicida sobre esta, lo que también se ha demostrado en estudios anteriores (12,14,15,44,45,47,48)

Al no existir una distribución normal de los datos se utilizó el test estadístico de Kruskal Wallis para comparar la diferencia en la cantidad de *Candida albicans* en los distintos grupos. Podemos observar que todos los tratamientos tuvieron diferencias significativas al ser evaluados ante el suero fisiológico si no tenemos en consideración el tiempo. Estas diferencias, nos permiten sugerir que todos los productos evaluados al ser utilizados en forma de directa, tendrían una acción antifúngica contra *Candida albicans* desde los 5 minutos de acción en adelante. Si bien estos resultados similares se han obtenidos en otros estudios (12,41,45,56,61), discrepan con lo expuesto por Montagner H et al. (44), quienes a los 10 minutos de acción de clorhexidina al 2%, no encontraron diferencias con el grupo control de suero fisiológico,

Cuando evaluamos la acción de la clorhexidina al 0,12% en los tres periodos de tiempo, podemos observar que nunca logro anular la presencia de *Candida albicans*; sin embargo, a medida que se incrementaba el tiempo se pudo observar que ésta disminuyo su crecimiento.

Cervantes FA et al. (56), sólo obtuvo diferencias significativas en la clorhexidina al 0,12%, concluyendo a su vez que es el agente más efectivo en la reducción de colonias de *Candida albicans*. Dentro de los demás productos que evaluó se encontraba las Corega®Tabs, las que no demostraron diferencias

significativas. Esto no se condice con nuestros resultados, que si bien no son del todo comparables por diferencias metodológicas (tiempo de acción, área acrílica, cantidad de clorhexidina utilizada), si podemos afirmar que la clorhexidina tiene un poder fungicida estadísticamente significativo, aunque las Corega®Tabs demostraron un mejor rendimiento en todos los intervalos de tiempo analizados.

Otros estudios evalúan el efecto de clorhexidina al 2%, dentro de los cuales destacamos el de Montagner H et al. (44) quien, midiendo la turbidez, determinó que esta concentración no presenta características fungicidas ante la *Candida albicans*, recomendando el uso de clorhexidina al 4% para el tiempo de 10 minutos. Estos resultados no son consistentes con los obtenidos en este estudio, en donde utilizando una concentración menor y por menos tiempo (5 minutos), ya obtuvimos efecto fungicida estadísticamente significativo. Los resultados de ese estudio, se basaron en medir la turbidez de una solución de caldo cerebro corazón con un espécimen de 100 mm² de acrílico de termocurado, luego que éste se sometiera a los siguientes procedimientos: fuese sembrado y cultivado por 11 horas a 35°C, posteriormente se aplicó el producto evaluado por 10 minutos; se lavó con suero fisiológico; fue secado con una gasa para retirar el exceso, y finalmente se aplicó un neutralizador del producto evaluar (Tween 80 con 0,07% de lecitina para la clorhexidina). Los resultados demuestran que la turbidez lograda por la clorhexidina al 2%, son iguales a los obtenidos por el grupo control de suero fisiológico. Estos resultados basados en la medición de la turbidez de una solución no son los adecuados para evaluar efectividad contra *Candida albicans*, debido a que este parámetro puede estar influenciado por características intrínsecas de cada agente evaluado, incluyendo el neutralizador, logrando altos valores de turbidez que no necesariamente se puedan atribuir al hongo (62). Así también, al momento de secar el espécimen con una gasa se refiere a una “suave compresión” la que al ser realizada por uno o múltiples operadores (tampoco se especifica en el estudio) puede afectar fuertemente el resultado.

Al analizar la acción en los distintos intervalos de tiempo, en nuestro estudio se obtuvo diferencias significativas sólo entre los 5 y 480 minutos de acción, determinando que el tiempo uso ideal de la clorhexidina al 0,12% es igual o mayor a los 480 minutos.

Por su parte, en nuestro estudio pudimos observar que las tabletas efervescentes Corega®Tabs lograron la mejor efectividad fungicida contra *Candida albicans*, pues alcanzaron una presencia nula de esta a los 480 minutos de acción, y desde los 5 minutos obtuvo crecimientos de *Candida albicans* estadísticamente significativos, muy menores por sobre el control de suero fisiológico.

Estos resultados se contraponen a lo concluido por Cervantes FA et al. (56), quien evaluó el potencial fungistático de Corega® Tabs a los 10 minutos de acción, con las mismas condiciones de siembra, aunque utilizando áreas de acrílico más reducidas (4 mm²), así como cantidad de agente (10 ml), quien luego

de realizar la lectura de UFC, no obtuvo diferencias significativas por parte de Corega® Tabs en las 10 muestras utilizadas, concluyendo que es inefectivo al momento de reducir la cantidad de colonias de *Candida albicans* presentes en la muestra al actuar por 10 minutos.

Da Silva FC et al. (41) también evaluó las tabletas efervescentes en base a perborato de sodio, esta vez sin una marca comercial asociada, y tampoco encontró efectivo fungicida de parte de estas luego de 10 minutos de acción, demostrando valores similares al grupo control. Sin embargo si encontró acción contra *S. mutans* y *S. aureus*. En nuestro estudio se encontraron diferencias significativas tanto en el crecimiento como presencia de *Candida albicans*. Cabe destacar que según las últimas publicaciones de la empresa que comercializa el producto (Glaxo, Smith & Kline), se realizaron modificaciones a la fórmula de las Corega®Tabs, a lo que podemos atribuir el incremento en su efecto fungicida (60).

También debemos señalar algunas diferencias en la aplicación del mismo, pues tanto Cervantes FA et al. (56) como Da Silva FC et al. (41), introdujeron los cuadrados acrílicos en una solución ya preparada, sin mediar el efecto efervescentes de estas tabletas en su actuar. Así, tampoco se detalla la temperatura a la que se encontraba esta solución, siendo no la óptima que señala el fabricante como “agua tibia”.

El estudio de Montagner H et al. (44), arrojó resultados similares a nuestro estudio. Midiendo la turbidez, concluyó que las Corega®Tabs producían una reducción significativa de *Candida albicans*, aunque no producían un efecto fungicida total en este tiempo. Debemos nuevamente poner en duda la consistencia de estos resultados en base a la turbidez de la solución, ya que no lo consideramos un método válido por las razones expuestas anteriormente.

Así también, Duyck J et al. (12), compararon la efectividad de Corega® Tabs Anti-bacteria® (Glaxo, Smith & Kline, Bélgica) versus agua en la reducción *Candida albicans*. En aquel estudio, determinaron que las tabletas basadas en peróxidos alcalinos disminuían de manera estadísticamente significativa la cantidad de *Candida albicans*, tanto en biofilms en desarrollo como maduros. De igual manera, y basados en la inexistencia de un protocolo de almacenamiento protésico, sugirieron que esta era una alternativa válida.

Esto es congruente con nuestros resultados, pues sentados en la misma inquietud de la falta de protocolos de tratamiento para prótesis durante la noche, es que el uso de tabletas efervescentes Corega® Tabs demuestra ser de gran utilidad fungicida ante *Candida albicans*.

Otros estudios como el de Paranhos HF et al. (45), que evaluó tabletas efervescentes de peróxidos alcalinos marca Bonyplus® en 5 minutos de acción, descartó que estas presenten un poder fungicida. Lo mismo concluyeron Da Silva FC et al. (41), quien también trabajó con tabletas efervescentes de peróxidos alcalinos, esta vez sin detallar la marca comercial.

Al analizar la acción en los distintos intervalos de tiempo, en nuestro estudio se obtuvo diferencias significativas entre los 5 y 60 minutos de acción y entre los 5 y 480 minutos de acción, determinando que el tiempo de uso ideal de las Corega® Tabs es sobre los 60 minutos.

CONCLUSIONES

Todos los tratamientos evaluados demostraron tener actividad fungicida sobre *Candida albicans* disminuyendo el crecimiento de esta durante el periodo de acción, siendo el hipoclorito de sodio al 5% el que presentaría una mayor eficiencia en relación al tiempo de exposición, aunque no recomendaríamos su uso por los daños corrosivos que produce sobre acrílicos y metales (53).

Recomendamos el uso de Corega® Tabs a partir de los 60 minutos, y el gluconato de clorhexidina al 0,12% a los 480 minutos de acción, pues en estos intervalos de tiempo demostraron su mayor eficacia fungicida sobre la presencia de *Candida albicans*, siempre siguiendo las normas de uso según el fabricante.

Se sugiere realizar nuevos estudios, que trabajen con tamaños de muestra ideales, y evalúen también la combinación de la higiene mecánica de las prótesis removibles, como de los coadyuvantes de ésta, y así poder crear un protocolo certero de higiene protésica contra *Candida albicans* u otros microorganismos prevalentes en patologías asociadas al uso de prótesis dentales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Schkolnik M. Enfoque estadístico del Adulto Mayor. Boletín Informativo del Instituto Nacional de Estadísticas. 2007 Sep 26 [citado 2015 Nov 20]; [aprox. 4 p.]. Disponible en: www.ine.cl/docs/default-source/FAQ/enfoque-estadístico-adulto-mayor-en-chile.pdf?sfvrsn=2
2. He W, Goodkind D, Kowal P. An Anging World 2015. U.S. Census Bureau. 2016 Mar 28 [citado 2016 Nov 10]; [aprox 175 p.]. Disponible en: <https://www.census.gov/library/publications/2016/demo/P95-16-1.html>
3. Escobar C. [www.facso.uchile.cl]. Santiago de Chile: c 2014. [citado 2016 Nov 10]; [aprox 2 p.]. Disponible en: <http://www.facso.uchile.cl/noticias/106310/la-valoracion-social-de-la-vejez-en-chile>
4. Gamonal JA, Mendoza C, Espinoza SI, Muñoz MA, Urzúa I, Aranda CW, et al. Clinical Attachment Loss in Chilean Adult Population: First Chilean National Dental Examination Survey. J Periodontol. 2010; 81(10):1403-1410.
5. Departamento de Salud Pública Pontificia Universidad Católica de Chile. Encuesta Nacional de Salud 2003 [libro electrónico]. 2003 [citado 2015 Nov 20]. Disponible en: www.medicinadefamiliares.cl/Protocolos/encnacsalres.pdf
6. Araneda J, Rochefort C, Matas J, Jiménez LF. Prioridad para el adulto mayor que utiliza prótesis removible ¿estética o función? Estudio realizado en pacientes adultos mayores que concurren a la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Rev Dent Chile 2009; 100(2):14-22.
7. Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, et al. Candida-associated denture stomatitis. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2011; 16(2):139-43.
8. Dagistan S, Aktas AE, Caglayan F, Ayyildiz A, Bilge M. Differential diagnosis of denture-induced stomatitis, Candida, and their variations in patients using complete denture: a clinical and mycological study. Mycoses. 2008; 52:266-271.
9. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Oral and Maxillofacial Pathology. 3a.ed. St. Louis: Saunders; 2009.
10. Radford DR, Challacombe SJ, Walter JD. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials in vivo and in vitro. Crit Rev Oral Biol Med. 1999; 10:99–116.
11. Hoogendam YY, van der Lijn F, Vernooij MW, Hofman A, Niessen WJ, van der Lugt A, et al. Older age relates to worsening of fine motor skills: a population-based study of middle-aged and elderly persons. Front Aging Neurosci. 2014; 6(259):1-7.

12. Duyck J, Vandamme K, Muller P, Teughels W. Overnight storages of removable dentures in alkaline peroxide-based tablets affects biofilm mass and composition. *J Dent.* 2013; 41:1281-1289.
13. Kilic K, Koc NA, Tekinsen FF, Yildiz P, Kilic D, Zararsiz G, et al. Assessment of *Candida* Species Colonization and Denture-Related Stomatitis in Bar- and Locator-Retained Overdentures. *J Oral Implantol.* 2014; 15(5):549-556.
14. Jafari AA, Falah-Tafti A, Lotfi-Kamran MH, Fallahzadeh H, Akaberi F. Evaluation of In Vitro Effectiveness of Seven Disinfectants over Controlling *Candida* on Complete Dentures. *Iran Red Crescent Med J.* 2012; 14(1):117-118.
15. Suci PA, Tyler BJ. Action of chlorhexidine digluconate against yeast and filamentous forms in an early-stage *Candida albicans* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(11):3522-3531.
16. Calsina-Gomis G, Serrano-Granger J. Are there any differences between different concentrations of chlorhexidine? Comparison of mouthrinses. *RCOE.* 2005;10(4):457-464.
17. Webb BC, Thomas CJ, Whittle T. A 2-year study of *Candida*-associated denture stomatitis treatment in aged care subjects. *Gerodontology.* 2005; 22:168-176.
18. Barbeau J, Seguin J, Goulet JP. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 96:51–59.
19. Sherman RG, Prusinski L, Ravenel MC, Joralmon RA. Oral Candidosis. *Quintessence Int.* 2002; 33:521-532.
20. Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 3. Treatment of oral candidosis. *Aust Dent J.* 1998; 43:244-9.
21. Kadir T, Gümrü B, Uygun-Can B. Phospholipase activity of *Candida albicans* isolates from patients with denture stomatitis: the influence of chlorhexidine gluconate on phospholipase production. *Arch Oral Biol.* 2007; 52:691-6.
22. Sanitá PV, Vergani CE, Giampaolo ET, Pavarina AC, Machado AL. Growth of *Candida* species on complete dentures: effect of microwave disinfection. *Mycoses.* 2009; 52:154-60
23. Dorocka-Bobkowska B, Konopka K. Susceptibility of *Candida* isolates from denture-related stomatitis to antifungal agents in vitro. *Int J Prosthodont.* 2007; 20:504-6.

24. Weems JJ Jr. Candida parapsilosis: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. Clin Infect Dis. 1992; 14(3):756-66.
25. Samaranayake L, Keung L, Lijian J. Oral mucosal fungal infections. Periodontol 2000. 2009; 49:39–59.
26. Singh A, Verma R, Murari A, Agrawal A. Oral Candidiasis: An Overview. J Oral Maxillofac Surg Med Pathol. 2014; 18:81-85.
27. Brevis P, Cancino J, Cantin M. Estomatitis Subprotesis: Estudio clínico y microbiológico de Candida. J. Odontostomat. 2008; 2:101-108.
32. Arenas GR. Micología Medica Ilustrada. 3a ed. Mexico DF: McGraw-Hill – Interamericana; 2008.
29. Liébana UJ. Microbiología Oral. 2a ed. Madrid: McGraw-Hill – Interamericana; 2002.
30. Neppelenbroek KH, Seó RS, Urban VM, Silva S, Dovigo LN, Jorge JH, et al. Identification of Candida Species in the Clinical Laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. Oral Dis. 2014; 20:329-344.
31. Guzel AB, Ilkit M, Akar T, Burgut R, Demir SC. Evaluation of risk factors in patients with vulvovaginal candidiasis and the value of chromID Candida agar versus CHROMagar Candida for recovery and presumptive identification of vaginal yeast species. Med Mycol. 2011; 49(1):16-25.
32. Rezusta A, Sanchez A, Gil J. Fundamentos básicos para el diagnóstico micológico, Guía Práctica de Identificación y Diagnostico en Micología Clínica. Rev Iberoam Micol. 2001; 3.
33. Hernandez S, Villamil J, Lama E, Puc R, Rueda F. Prevalencia de C. albicans en pacientes con y sin estomatitis subprotésica. Rev Odontol Latinoam. 2009; 1:7-11.
34. Cuétara M, Alhambra A, del Palacio A. Diagnostico microbiológico tradicional de la candidiasis invasora en el enfermo critico no neutropenico. Rev Iberoam Micol. 2006; 23:4-7.
35. Edelberg MH, Macchi RL. Materiales Dentales. 4a Ed. Argentina: Panamericana; 2009.
36. Nasution AI. Virulence Factor and Pathogenicity of *Candida albicans* in Oral Candidiasis. World J Dent 2013; 4(4):267-271

37. Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, Crielaard W, Ten Cate JM. Development of candida-associated denture stomatitis: new insights. *J Appl Oral Sci.* 2008; 16(2):86-94.
38. Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW, Webb BC, et al. Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of Candida species in the oral cavity. *Aust Dent J.* 1998; 43:45-50.
39. Rocha JM, Piai R. Treatment protocol for denture stomatitis, prior to anatomical molding. *Gerodontology* 2013; 30:232–235.
40. Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martínez F, Aldape-Barrios B, Quindós G, Sánchez-Vargas LO. Candida albicans, Staphylococcus aureus and Streptococcus mutans colonization in patients wearing dental prosthesis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2005; 10(1):27-39.
41. Da Silva FC, Kimpara ET, Mancini MN, Balducci I, Jorge AO, Koga-Ito CY. Effectiveness of six different disinfectants on removing five microbial species and effects on the topographic characteristics of acrylic resin, *J Prosthodont.* 2008; 8:627-633.
42. Christopher R, Edward A, Edgerton M. Sensitivity of Candida albicans Biofilm Cells Grown on Denture Acrylic to Antifungal Proteins and Chlorhexidine, *Arch Oral Biol.* 2009; 54:588–594.
43. Mähönen K, Virtanen K, Larmas M. The effect of prosthesis disinfection on salivary microbial levels. *J Oral Rehab.* 1998; 25:304-310.
44. Montagner H, Montagner F, Braun K, Peres P, Gomes B. In vitro antifungal action of different substances over microwaved-cured acrylic resins. *J Appl Oral Sci.* 2009; 5:432-435.
45. Paranhos HF, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Cruz PC, de Freitas-Pontes KM, Watanabe E, et al. Effect of Three Methods for Cleaning Dentures on Biofilms Formed In Vitro on Acrylic Resin. *J Prosthodont.* 2009; 18(5):427-431.
46. Souza R, Souza E, Sousa-Neto M, Pietro R. In vitro evaluation of different chemical agents for the decontamination of gutta-percha cones. *Pesqui Odontol Bras.* 2003; 1:75-78.
47. Silva T, Claro A, Vieira M, Cardoso A. Vinegar as an antimicrobial agent for control of candida spp. in complete denture wearers. *J Appl Oral Sci.* 2008; 6:385-390
48. Makino SI, Cheun HI, Tabuchi H, Shirahata T. Antibacterial activity of chaff vinegar and its practical application, *J Vet Med Sci.* 2000; 8:893-895.

49. Pinto TM, Neves AC, Leão MV, Jorge AO. Vinegar as an antimicrobial agent for control of *Candida* spp. In complete denture wearers. *J Appl Oral Sci.* 2008; 16(6):385-390.
50. Faot F, Cavalcanti YW, Bertolini M, de Pinto L, da Silva WJ, Del Ber Cury AA. Efficacy of citric acid denture cleanser on the *Candida albicans* biofilm formed on poly(methylmethacrylate): effects on residual biofilm and recolonization process. *BMC Oral Health.* 2014; 14:77-89.
51. Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Quindós G. In vitro activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. *BMC Oral Health.* 2011; 11:119-126.
52. Payne J. Is Xylitol an effective treatment for oral candida infections?. *Dent Nurs.* 2015; 11(3):133-135.
53. Banabé W, De Mendonca T, Pimenta F, Pegpraro L, Scolaro J. Efficacy of sodium hypochlorite and coconut soap used as disinfecting agents in the reduction of denture stomatitis, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *J Oral Rehab.* 2004; 31:453-459.
54. Shyamacharan A Samanth et al The Most Effective Concentration of Chlorhexidine as a Mouthwash- Systematic Review. *J. Pharm. Sci. & Res.* 2017; 9(2):233-236.
55. Newman MG, Takei H, Klokkevold PR, Carranza FA. Carranza's Clinical Periodontology. 12a Ed. Canada: Saunders; 2014.
56. Cervantes FA, Paradella TC, Koga-Ito CY, Cardoso AO. Effect of sodium bicarbonate on *Candida albicans* adherence to thermally activated acrylic resin. *Braz Oral Res.* 2009; 23(4):381-385.
57. Stanier RY, Ingraham JL, Wheelis ML, Painter PR. Microbiología. 2a ed. Barcelona Reverté SA; 1992.
58. Dar-Odeh NS, Shehabu AA. Oral Candidosis in patients with removable dentures. *Mycoses.* 2003; 46:187-191.
59. Schkolnik M. Enfoque estadístico del Adulto Mayor. Boletín Informativo del Instituto Nacional de Estadísticas. 2007 Sep 26 [citado 2015 Nov 20]; [aprox. 4 p.].
60. Kiesow A, Sarembe S, Pizzey RL, Axe AS, Bradshaw DJ. Material compatibility and antimicrobial activity of consumer products commonly used to clean dentures. *J Prosthet Dent.* 2016; 115:189-198.
61. Jafari AA, Falah-Tafti A, Lotfi-Kamran MH, Fallahzadeh H, Akaberi F. Evaluation of In Vitro Effectiveness of Seven Disinfectants over Controlling

- Candida* on Complete Dentures. Iran Red Crescent Med J 2012; 14(1):117-118.
62. Thenmozhi R, Arumugam K, Nagasathya A, Thajuddin N, Paneerselvam A. Studies on Mycoremediation of used engine oil contaminated soil samples. Adv. Appl. Sci. Res., 2013, 4(2):110-118