



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLÓGIA  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGIA CONSERVADORA  
ÁREA ENDODONCIA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS  
LABORATORIO DE NANOBIO MATERIALES  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL  
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

**“Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de nanopartículas de cobre frente a *Enterococcus faecalis*”**

**Catalina Andrea Galleguillos Morales**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
CIRUJANO – DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Dr. Cristian Covarrubias Gallardo**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Prof. M. Leyla Gómez Carranza**

**Dra. Isabel Mardones Peñailillo**

**PRI-ODO 15-004**

**Santiago - Chile**

**2016**





UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA CONSERVADORA  
ÁREA ENDODONCIA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS  
LABORATORIO DE NANOBIO MATERIALES  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL  
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

**“Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de nanopartículas de cobre frente a *Enterococcus faecalis*”**

**Catalina Andrea Galleguillos Morales**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
CIRUJANO – DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Dr. Cristian Covarrubias Gallardo**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Prof. M. Leyla Gómez Carranza**

**Dra. Isabel Mardones Peñailillo**

**PRI-ODO 15-004**

**Santiago - Chile**

**2016**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a mis tutores Prof .Dr. Cristian Covarrubias, Prof. M .Leyla Gómez y Dra. Isabel Mardones, por la disposición infinita para guiarme, enseñarme e introducirme en el mundo de la investigación.

Agradecer también a Daniela Salinas, Jonathan Pérez, Darna Venegas y Rocío Orellana, por su disposición y colaboración para que esto llegara hasta el final.

Agradecer también a todos aquellos docentes que creyeron en mí y ayudaron a madurar mi aprendizaje y el amor por la carrera.

A mis amigos, compañeros de carrera y por supuesto a mi familia; a mis padres por apoyarme y animarme a seguir; a mis hermanos, sobrinos, tíos y primos por su interés y preocupación; y a Cristian Ramírez por ser mi compañero durante estos últimos 4 años.

# Índice

Introducción.....	1
Marco teórico .....	3
Generalidades de la infección endodóntica .....	3
Tipos de infección endodóntica .....	5
<i>Enterococcus faecalis</i> .....	7
Terapia endodóntica y medicación intracanal. ....	9
Nanopartículas.....	11
Hipótesis y objetivos. ....	15
Materiales y métodos.....	16
1. Síntesis y caracterización de las nanopartículas de cobre. ....	16
2. Evaluación de la actividad antibacteriana.....	17
2.1. Selección de la cepa bacteriana .....	17
2.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	17
2.3. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB). ....	18
2.4. Determinación actividad antimicrobiana de CuNPs como medicación intracanal en modelo <i>in vitro</i> . ....	19
3. Microscopía electrónica de barrido con microanálisis elemental por energía dispersiva de rayos X (SEM/EDX) de bacterias tratadas mediante medicación intracanal. ....	22
Análisis de datos .....	23
Resultados .....	24
1.- Caracterización de nanopartículas de cobre.....	24
2.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria .....	24
3.- Determinación de la concentración mínima bactericida.....	25
4.- Determinación de la actividad antimicrobiana de nanopartículas de cobre como medicación intracanal en un modelo <i>in vitro</i> .....	27
4.1- Medición de la actividad antimicrobiana de la medicación.....	27
4.2 Análisis SEM/EDX de los especímenes medicados. ....	29
Discusión .....	34
Conclusiones.....	38
Referencias .....	39
Anexos .....	46

## RESUMEN

“Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de nanopartículas de cobre frente a *Enterococcus faecalis*”

### Introducción

La patología pulpar y periapical se origina de una infección bacteriana que invade el sistema de canales radiculares, dando una respuesta inmunoinflamatoria en el hospedero, la que posteriormente se traduce en la destrucción de los tejidos perirradiculares.

Existen microorganismos que son capaces de resistir los procedimientos endodónticos, identificándose dentro de éstos a *Enterococcus faecalis*, responsable de fracasos de tratamiento y patología endodóntica persistente. Por esta razón, existe la medicación intracanal, la cual pretende eliminar microorganismos remanentes, dejando un agente antimicrobiano entre sesiones clínicas. En la actualidad, el medicamento más efectivo y comúnmente usado, es el hidróxido de calcio. Sin embargo, se ha observado que esta bacteria, en algunos casos, no es susceptible a su acción antimicrobiana.

Las nanopartículas metálicas, como las de cobre, aparecen como una nueva alternativa de antimicrobianos, cuyo efecto ya ha sido demostrado contra algunos microorganismos orales, tales como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Candida albicans* y *Streptococcus mutans*. Sin embargo, no existen referencias de estudios frente a patógenos endodónticos. En el presente proyecto, se propone estudiar la actividad antibacteriana de las nanopartículas de cobre frente a *Enterococcus faecalis*.

## **Materiales y métodos**

Se determinó la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de nanopartículas de cobre frente a *Enterococcus faecalis*, a partir del método de macrodilución.

Para evaluar la efectividad antimicrobiana intracanal, se contaminaron especímenes de dientes con *Enterococcus faecalis* y se procedió a medicar el canal radicular con nanopartículas de cobre a distintas concentraciones. Además, se utilizó como control un grupo con hidróxido de calcio y un tercer grupo sin medicamento. Dicha medicación se dejó por 1 y 7 días; posteriormente, se sembró y realizó recuento de unidades formadoras de colonias.

## **Resultados**

Las nanopartículas de cobre presentaron acción antimicrobiana frente a *Enterococcus faecalis in vitro*, con valores de concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de 150 ppm y 225 ppm, respectivamente. Al ser utilizadas como medicación intracanal en un modelo *in vitro*, su efecto antimicrobiano a 150 ppm y 300 ppm fue equivalente a la acción de Ultracal XS®. Observaciones mediante microscopía electrónica de barrido, demostraron que las nanopartículas de cobre, además de tener un efecto bactericida, remueven bacterias de la superficie radicular y alteran su morfología.

## **Conclusiones**

Mediante la determinación de los valores de concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida, se comprobó la hipótesis de que las nanopartículas de cobre presentan actividad antimicrobiana frente a la bacteria endodóntica *Enterococcus faecalis*. Al utilizar las nanopartículas de cobre como medicación en un modelo intracanal presentan una acción antimicrobiana equivalente a la presentada por Ultracal XS®. El Análisis por microscopía electrónica de barrido y microanálisis elemental por energía dispersiva de rayos x

sugiere que además del mecanismo bactericida de las nanopartículas de cobre, tendrían una acción antimicrobiana removiendo el biofilm desde el sistema de canales radiculares mediante un efecto anti-fouling. La actividad antimicrobiana presentada por las nanopartículas de cobre frente a *Enterococcus faecalis* sugiere que podría ser evaluada en el futuro como alternativa de agente antimicrobiano en procedimientos endodónticos.

## **Introducción.**

La patología pulpar y periapical se origina de una infección bacteriana que invade el sistema de canales radiculares (SCR), dando una respuesta inmunoinflamatoria en el hospedero, que posteriormente se traduce en la destrucción de los tejidos perirradiculares (Nair, 2004).

Existen microorganismos que, pese a la preparación quimiomecánica del SCR, son difíciles de erradicar debido a la acción de factores de virulencia, como adhesinas, enzimas o la formación de biofilm (Łysakowska y cols, 2015).

Se identifica a *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) como uno de los microorganismos responsables de fracasos de tratamiento endodóntico, además de la existencia de patología endodóntica persistente. Por esta razón, existe la medicación intracanal, que consiste en aplicar y mantener un agente antimicrobiano en el canal radicular entre sesiones clínicas, cuyo objetivo es eliminar los microorganismos que puedan permanecer luego de realizar la preparación quimiomecánica. El agente más utilizado es el hidróxido de calcio, que alcaliniza el medio por su elevado pH, alterando el ADN y desnaturalizando las proteínas bacterianas. Sin embargo, se ha observado que esta bacteria, en algunos casos, no es susceptible de su acción antimicrobiana (Torabinejad y Walton, 2010).

En la búsqueda de un antibacteriano más efectivo se comenzó a sintetizar nanopartículas metálicas, dentro de las cuales se han estudiado las nanopartículas de plata y de cobre, estas últimas probadas contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Correa, 2012), *Candida albicans* (González, 2013) y *Streptococcus mutans* (Soler, 2015; Trepiana, 2015) con resultados favorables. Sin embargo, no existen estudios aplicados a microorganismos causantes de patología endodóntica.

El mecanismo de acción de las nanopartículas de cobre (CuNPs), no está totalmente dilucidado, pero se cree que en contacto con el medio fisiológico, se generarían iones de cobre con carga positiva, que serían atraídos por la carga

negativa de la membrana celular bacteriana, provocando alteraciones en la estructura de la membrana, así como en la replicación de ADN y proteínas necesarias para la supervivencia del microorganismo (Sondi y Salopek, 2004; Chatterjee y cols, 2014).

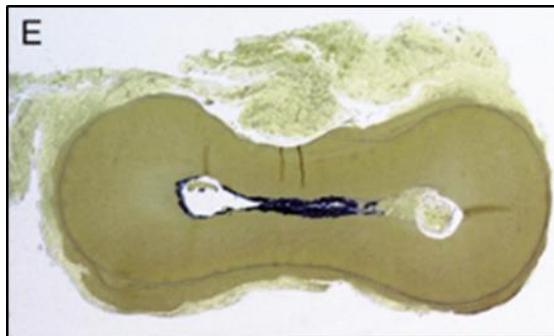
En el presente proyecto, se propone estudiar la actividad antibacteriana de las CuNPs frente a *E. faecalis*. Para este propósito, se determinarán parámetros microbiológicos fundamentales como la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de las CuNPs frente a este patógeno. De acuerdo a estos resultados, se escogerán las concentraciones de CuNPs que serán utilizadas en un modelo de medicación intracanal *in vitro*.

## Marco teórico

### Generalidades de la infección endodóntica

La cavidad pulpar corresponde al espacio que existe dentro del diente, y que contiene la pulpa dental, la cual, otorga irrigación terminal e inervación al órgano dentario. Se caracteriza por ser inextensible, ya que está rodeada por tejidos duros como esmalte, dentina y cemento. Se puede dividir en cámara pulpar y sistema de canales radiculares; donde la cámara pulpar es única y central, situada en la porción coronal del diente y desde donde emerge el SCR.

El SCR, se describe como tal, debido a que está conformado por una serie de canales que pueden seguir a las raíces en toda su longitud, comunicarse entre sí, bifurcarse o volver a unirse; además, existe una serie de espacios y comunicaciones, dentro de los cuales encontramos los istmos, los que se definen como una estrecha comunicación entre canales radiculares que se originan a partir de un mal cierre de las proyecciones de la formación de las raíces durante el desarrollo embrionario (**Figura 1**). Su importancia radica en que constituyen zonas de difícil dominio instrumental, pudiendo contener tejido pulpar, remanente vital y/o necrótico, restos de preparación quimiomecánica y microorganismos que podrían determinar una falla en el control de la infección y, finalmente, un fracaso en la terapia endodóntica (Ricucci & Siqueira, 2010).



**Figura 1:** Sección transversal raíz mesial de molar inferior (Ricucci & Siqueira, 2010). Se observa presencia de istmo que comunica ambos canales, determinando una zona intermedia no instrumentable (x8).

En salud, la pulpa dental se encuentra aislada del ambiente séptico de la cavidad oral, donde la presencia de líquido dentinario y el contenido tubular son capaces de dificultar una posible invasión bacteriana. Cuando está expuesta al medio oral, por caries, fracturas o sacos periodontales, puede ser invadida por microorganismos que provocan inflamación y necrosis del tejido pulpar, estableciéndose en los canales radiculares una infección endodóntica con propiedades como antigenicidad, actividad mitogénica, quimiotaxis, destrucción tisular mediada por enzimas y activación de células del hospedero (Nair, 2004).

## **Tipos de infección endodóntica**

Según el momento de entrada de los microorganismos al SCR, podemos identificar las infecciones endodónticas primarias, secundarias y persistentes. La infección endodóntica primaria está constituida por una microbiota polimicrobiana mixta, con predominio de anaerobios Gram negativo (**Tabla 1**). Sin embargo, es posible encontrar otros tipos de bacterias, hongos, virus e incluso archeas (Hernández y cols, 2015).

La infección endodóntica secundaria se refiere a la causada por microorganismos ausentes en la infección primaria, que colonizan el SCR durante el tratamiento o una vez que éste ha finalizado. Es causada principalmente por microorganismos Gram positivo (Siqueira, 2003).

La infección endodóntica terciaria se refiere a la infección persistente, causada por microorganismos involucrados en la infección primaria o secundaria que han resistido los procedimientos realizados durante el tratamiento. Puede originarse por adaptación a las condiciones ambientales, capacidad bacteriana de sobrevivir al antimicrobiano o disponer de libre acceso a los tejidos periapicales para ejercer su patogenicidad (Siqueira, 2003).

Dentro de los determinantes ecológicos que permiten la sobrevivencia de ciertos patógenos en el canal radicular encontramos al potencial de óxido-reducción, que permite el paso de un ambiente aerobio a uno anaerobio. Esto ocurre producto del metabolismo bacteriano y la deficiencia de irrigación en la zona, con el consecuente déficit de oxígeno, lo cual permite que puedan establecerse gradualmente microorganismos anaerobios (Estrela, 2005).

Además, gracias al sinergismo se produce una agregación bacteriana por funciones metabólicas o protectoras (Estrela, 2005).

**Tabla 1:** Microbiota en infecciones de origen pulpar

<b>Anaerobios estrictos*</b>		<b>Anaerobios facultativos*</b>	
<b>Cocos Gram (+)</b>	<b>Bacilos Gram (+)</b>	<b>Cocos Gram (+)</b>	<b>Bacilos Gram (+)</b>
<i>Streptococcus</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Actinomyces</i>
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Eubacterium</i>	<b><i>Enterococcus</i></b>	<i>Corynebacterium</i>
	<i>Propionibacterium</i>		<i>Lactobacillus</i>
<b>Cocos Gram (-)</b>	<b>Bacilos Gram (-)</b>	<b>Cocos Gram (-)</b>	<b>Bacilos Gram (-)</b>
<i>Veillonella</i>	<i>Porphyromonas</i>	<i>Neisseria</i>	<i>Capnocytophaga</i>
	<i>Fusobacterium</i>		<i>Eikenella</i>
	<i>Prevotella</i>		
	<i>Selenomonas</i>		
	<i>Treponema</i>		
	<i>Campylobacter</i>		

\*spp (Estrela, 2005; Nair, 2004)

### ***Enterococcus faecalis***

Forman parte del género *Enterococcus*, encontrándose en la microbiota oral y del tracto gastrointestinal. Son cocos Gram positivo que se disponen en parejas y en cadenas cortas. Su tamaño oscila entre 0,5 a 0,8  $\mu\text{m}$ ; son facultativos y crecen en un rango de temperatura entre 10 ° a 45 °C. Sin embargo, su temperatura óptima de crecimiento es de 35 °C. Para su desarrollo requieren medios con vitamina B, bases de ácidos nucleicos y una fuente de carbono como la glucosa. Además, pueden crecer en ambientes tóxicos, con altas concentraciones de cloruro de sodio (6,5%) (Silva y cols, 2006).

Por otra parte, se ha visto que pueden crecer en medios con pH ácido y alcalino. El pH crítico para su erradicación debe ser mayor a 11, esto se debe a que genera alcalino resistencia debido al transporte de protones vinculado a ATP (Nakajo y cols, 2006).

Se reconoce que *E. faecalis* se encuentra en el 33% de los dientes con infección endodóntica primaria, es 9 veces más factible ser encontrado en dientes con infección secundaria, y es difícil de erradicar. Es uno de los patógenos responsables de patología endodóntica persistente, debido a que se encuentra en el 60% a 90% de los dientes tratados endodónticamente (Łysakowska y cols, 2015; Torabinejad y Walton, 2010). Esto se explica por sus factores de virulencia (**Tabla 2**), dentro de los que se destaca la formación de biofilm en la superficie dentaria interna, permitiéndole ser hasta mil veces más resistente a la acción de antimicrobianos; tener capacidad tamponante y adhesinas de unión al colágeno que le permiten la invasión de los túbulos dentinarios desde una profundidad de 250 hasta 400  $\mu\text{m}$  (Haapasalo y cols, 1987; Zhang y cols, 2015; Łysakowska y cols, 2015).

**Tabla 2:** Factores de virulencia de *Enterococcus faecalis*.

<b>Factor de virulencia</b>	<b>Efecto biológico</b>
<b>Sustancia de agregación</b>	Convierte la superficie de la bacteria donadora en superficie adherente para células receptoras, facilitando su agregación, el intercambio de plásmidos y la unión a las células epiteliales (Kayaoglu y cols, 2004).
<b>Proteína enterocócica de superficie</b>	Proteína de superficie enterocócica (ESP): Formación de biofilm. Adhesina de unión a colágeno (ACE): Media la unión al colágeno tipo I, IV y laminina (Dentina radicular) (Kayaoglu y cols, 2004).
<b>Adhesinas hidrocarbonadas</b>	Median la unión con la célula del hospedero (Portenier y cols, 2003)
<b>Ácido lipoteicoico</b>	Vinculante de <i>E.faecalis</i> , actúa como receptor para la sustancia de agregación. Estimulan a linfocitos a liberar mediadores inflamatorios y enzimas lisosomales (Portenier y cols, 2003)
<b>Gelatinasa</b>	Metaloproteinasa que hidroliza colágeno, fibrinógeno, hemoglobina. Los péptidos producidos son fuente de nutrientes para colonizar el SCR (Portenier y cols, 2003)
<b>Hialuronidasa</b>	Abastece de nutrientes al microorganismo, por medio de la degradación del ácido hialurónico. Facilita la proliferación bacteriana en el hospedero (Kayaoglu y cols, 2004)
<b>Citolisina</b>	Hemolisina, destruye eritrocitos, neutrófilos y macrófagos. Inhibe el crecimiento de las bacterias Gram positivo (favorece la colonización) Produce daño tisular local ( Portenier y cols, 2003)

## **Terapia endodóntica y medicación intracanal.**

La terapia endodóntica busca controlar la infección intracanal y prevenir su reinfección, con el fin de lograr la reparación de los tejidos periapicales. Para cumplir con este objetivo, existe la preparación quimiomecánica del SCR, con diferentes instrumentos y agentes antisépticos. Sin embargo, se hace difícil la erradicación de todos los microorganismos, debido a la existencia de accidentes anatómicos como istmos e irregularidades, los que resultan de difícil acceso con el instrumental utilizado; de hecho, se ha probado que la preparación quimiomecánica sólo elimina el 90% de la microbiota residente (Bystrom y Sundqvist, 1981, Siqueira y cols, 1999).

La medicación intracanal consiste en aplicar y dejar un agente antimicrobiano en el SCR entre sesiones clínicas, con el fin de disminuir los microorganismos remanentes que persistan en el SCR.

Los objetivos de este procedimiento son la eliminación de las bacterias que puedan persistir luego de la preparación quimiomecánica, la neutralización de residuos tóxicos, la reducción de la inflamación de los tejidos periapicales, la disminución de los exudados apicales y la constitución de una barrera mecánica ante una posible filtración de la obturación temporal (Chong y cols, 1992).

Dentro de los agentes utilizados para este fin, se encuentra el hidróxido de calcio, base fuerte, que en medio acuoso se disocia en iones calcio e hidroxilo, alcalinizando el medio; esto alteraría la membrana citoplasmática bacteriana, induciendo destrucción de fosfolípidos y ácidos grasos insaturados, desnaturalización de proteínas y daño en el ADN bacteriano (Mohammadi y cols, 2012).

La acción antimicrobiana inicial del hidróxido de calcio está dada por un pH inicial de 12,5; que es capaz de Inducir la ruptura de enlaces iónicos de las proteínas bacterianas, perdiendo actividad biológica de enzimas y alterando el metabolismo celular. Sin embargo, debido a la capacidad buffer de la dentina, el pH inicial baja a 10,5; sin poder mantener el pH crítico para erradicar a *E. faecalis*. Por otro lado,

este microorganismo acidifica su citoplasma con bombas de hidrógeno, logrando neutralizar aún más el pH del medio (Brändle y cols, 2008).

Por este motivo, es necesario explorar un agente antibacteriano capaz de actuar de mejor forma que los ya conocidos.

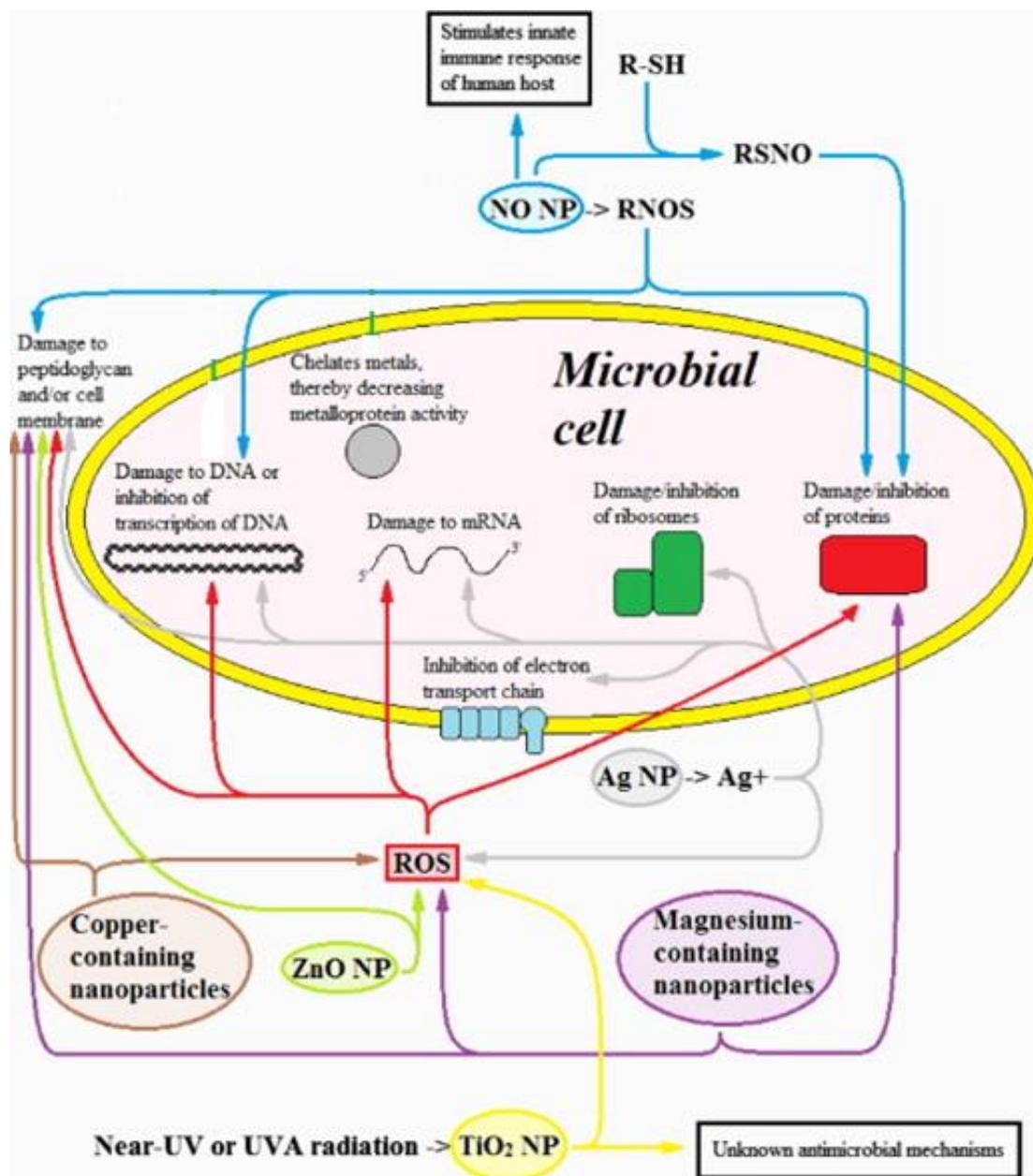
## Nanopartículas

La nanotecnología se refiere a la posibilidad de manipular los materiales a escala de átomos y moléculas individuales. Una nanopartícula metálica se define como una aglomeración nanométrica (clusters) de unos pocos átomos del elemento metálico en estado de oxidación cero (Mahendra y cols, 2009; Thabet y cols, 2010), cuya mejorada bioactividad (Propiedades antimicrobianas) está dada por el área de contacto o volumen que se ve aumentada al reducir el tamaño de la partícula (menor a 100 nm), lo que permite mayor interacción con moléculas y proteínas de la membrana celular (Cushing y cols, 2004; Wu y cols, 2014).

Para la obtención de nanopartículas, existen diferentes técnicas basadas en la estrategia de síntesis “bottom-up”. En este tipo de métodos, en general, se disuelve una sal del metal en un solvente, se adiciona un compuesto reductor y un agente orgánico para estabilizar y prevenir la aglomeración de las nanopartículas formadas. Posteriormente, la mezcla reactiva se somete a un tratamiento térmico (calor, microondas) que puede variar en tiempo y temperatura dependiendo del tipo de partícula metálica preparada (Thabet y cols, 2010). Además, recientemente se han desarrollado métodos basados en el concepto de “química verde” que utilizan reductores y estabilizantes con mayor biocompatibilidad para aplicaciones biomédicas, como por ejemplo biopolímeros o carbohidratos (Usman y cols, 2012).

Las nanopartículas metálicas aparecen como una nueva generación de antimicrobianos, demostrando este efecto con nanopartículas de plata frente a *Streptococcus mutans* (Trepiana, 2015), nanopartículas de cobre frente a *Candida albicans* (Correa, 2012); entre otros. Su mecanismo de acción no se conoce totalmente, se cree que en contacto con el medio fisiológico, se generarían iones con carga positiva que serían atraídos por la carga negativa de la membrana celular bacteriana (Sondi y Salopek, 2004). Así, se produciría una acumulación y disolución de nanopartículas metálicas en la membrana plasmática, generando un aumento en su permeabilidad, cuya consecuencia sería liberar lipopolisacáridos, proteínas de membrana y biomoléculas intracelulares (Khan y cols, 2012). Además, los iones metálicos interferirían en la producción de ATP, interrumpiendo la replicación del

ADN y generando radicales libres de oxígeno, que conlleva a un estrés oxidativo a la célula bacteriana, provocando su muerte (**Figura 2**) (Fang y cols, 2007; Pelgrift y cols, 2013).



**Figura 2.** Esquema de los mecanismos de acción de diferentes nanopartículas metálicas sobre células bacterianas. (Pelgrift y cols, 2013)

## **Nanopartículas de cobre.**

Las propiedades antimicrobianas del cobre, en general, han sido ampliamente demostradas, considerando entre sus acciones, el efecto antimicrobiano frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella entérica*, *Clostridium difficile* y *Mycobacterium tuberculosis*. Por otro lado, presenta acción antiviral a bajas concentraciones, contra virus influenza A y virus de inmunodeficiencia humana; además, tiene acción antifúngica demostrada contra *Candida albicans* (Quaranta y cols, 2011). Esta característica ha permitido que pueda ser utilizado y aplicado en diversas áreas como industrial, sanitaria y médica (Prado y cols, 2012; Ren y cols, 2009).

El efecto antimicrobiano de las CuNPs está mediado por la interacción con el fósforo y azufre de la membrana celular bacteriana, permitiendo la formación de filamentos celulares, que permiten su disrupción. Además, la despolarización de la membrana lleva a un estrés oxidativo, que deriva en oxidación de proteínas y degradación del ADN; presentando su mayor eficacia antimicrobiana cuando el tamaño de la nanopartícula es menor a 12 nm (Chatterjee y cols, 2014).

Las nanopartículas de cobre se presentan como un material ventajoso respecto de otras nanopartículas metálicas, ya que, pese a tener características químicas y antimicrobianas similares, tienen un menor costo económico. Además, respecto de las nanopartículas de plata, presentan mayor facilidad para mezclarlas con polímeros y son más estables en sus propiedades químicas y físicas (Arsalan y Cols, 2014).

Respecto a bacterias orales, en nuestro grupo de investigación se ha demostrado la actividad de las CuNPs frente a: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, concluyéndose que sistemas de nanopartículas de plata y/o CuNPs/biopolímero presentan propiedades para inhibir su desarrollo (González, 2013); *Candida albicans*, donde se observó que las resinas acrílicas cargadas con CuNPs poseen marcada actividad antimicrobiana frente a ésta, cuando entra en contacto con su superficie (Correa, 2012); *Streptococcus mutans*, se concluyó que las CuNPs y sus

combinaciones presentan actividad antimicrobiana para inhibir crecimiento y desarrollo de películas de este microorganismo, sobre superficies de esmalte dentario. Además, se determinó que la concentración mínima bactericida de CuNPs sobre la bacteria ya mencionada es de 30 ppm (Soler, 2015; Trepiana, 2015).

De acuerdo a los resultados observados de CuNPs, en trabajos previos, frente a diferentes bacterias y levaduras orales, y considerando las propiedades antimicrobianas de amplio espectro conocidas para el cobre, se esperaría que nanopartículas de este metal tuvieran actividad antibacteriana frente a patógenos endodónticos resistentes como *E. faecalis*. Sin embargo, a nuestro mejor conocimiento de la información reportada en la literatura, no se han realizado estudios de CuNPs frente a patógenos endodónticos.

En el presente proyecto, se propone estudiar la actividad antibacteriana de las CuNPs frente a *E. faecalis*. Para este propósito se determinarán parámetros microbiológicos fundamentales como la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de las CuNPs frente al patógeno. De acuerdo a estos resultados, se escogerán las concentraciones de CuNPs que serán utilizadas en su evaluación como agente de medicación intracanal, en un modelo *in vitro*.

## **Hipótesis y objetivos.**

### **Hipótesis**

Las nanopartículas de cobre tienen actividad antibacteriana *in vitro* sobre *Enterococcus faecalis*.

### **Objetivo General**

Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de nanopartículas de cobre frente a *Enterococcus faecalis*.

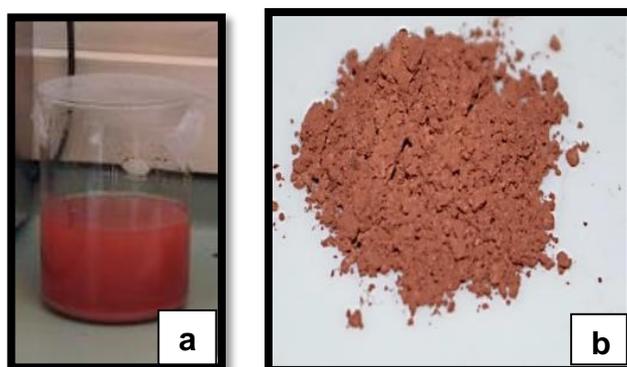
### **Objetivos Específicos.**

1. Determinar la concentración mínima inhibitoria de nanopartículas de cobre sobre *Enterococcus faecalis*.
2. Determinar la concentración mínima bactericida de nanopartículas de cobre sobre *Enterococcus faecalis*.
3. Determinar la actividad antimicrobiana de nanopartículas de cobre, frente *Enterococcus faecalis* en un modelo de medicación intracanal *in vitro*.

## Materiales y métodos

### 1. Síntesis y caracterización de las nanopartículas de cobre.

La suspensión acuosa de CuNPs se formó mezclando 96,84 ml de ácido ascórbico 10%; 0,242 g de almidón (estabilizante de las partículas) y 3,14 ml de una solución de acetato de cobre 0,2 M. Luego, se calentó la mezcla en el microondas por 1 minuto en dos series de 30 segundos y se obtuvo la suspensión de CuNPs. Las CuNPs fueron centrifugadas durante 6 ciclos de 20 minutos, cada uno a 12.000 rpm, utilizando una centrifuga marca Hermle® modelo z 326. Entre cada ciclo, se eliminó el sobrenadante y las CuNPs fueron lavadas y re-suspendidas en agua destilada. Esta solución se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas, en un congelador marca Ilshinbiobase® modelo FD5508, y luego se realizó una liofilización para obtener nanopartículas en polvo (**Figura 3**).



**Figura 3:** (a) Suspensión pura de CuNPs. (b) Nanopartículas en polvo.

Las CuNPs preparadas fueron analizadas mediante microscopía electrónica de barrido con análisis de dispersión de rayos- X (SEM/EDX).

## **2. Evaluación de la actividad antibacteriana.**

### **2.1. Selección de la cepa bacteriana**

Se utilizó una cepa de *E. faecalis* (ATCC 29212), liofilizada, que se cultivó en agar sangre a 37° C por 48 horas.

### **2.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).**

Para la determinación de la CMI se utilizó el método de macrodilución (Picazo, 2000). Se dispuso una batería de tubos de ensayo de vidrio del mismo calibre bajo campana de bioseguridad, por triplicado. En cada uno de los tubos se depositó 1 ml de solución de CuNPs de distintas concentraciones según Tabla 3, obtenidas por dilución de una solución madre de 1000 ppm. Luego, se agregó a todos los tubos por igual 1 ml de caldo cerebro-corazón (BHI), y 100 µL de la suspensión bacteriana de 48 horas de crecimiento, ajustada a un estándar de 0,5 Mc Farland, equivalente a  $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias/ml, utilizando espectrofotómetro HALO RB – 10 UV – VIS RATIO BEAM, leyendo a longitud de onda 550 nm, con una densidad óptica igual a 0,125.

Los tubos se llevaron a estufa a 37°C por 48 horas. Transcurrido este período se identificó de modo visual la dilución que presentó ausencia de crecimiento bacteriano previo al tubo que sí presentó desarrollo bacteriano. El control positivo fue el cultivo de *E. faecalis* sin CuNPs, mientras que el control negativo fue una solución de CuNPs con BHI.

**Tabla 3.** Diluciones de CuNPs, a partir de una solución madre de 1000 ppm, utilizadas en la determinación de CMI y CMB.

Tubo	Concentración de CuNPs (ppm)
1	500
2	400
3	300
4	200
5	150
6	100
7	75
8	50
9	Control +
10	Control -

### 2.3. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB).

Por triplicado, se organizó una serie de tubos con diferentes concentraciones de CuNPs por dilución a partir de una solución madre de 1000 ppm (**Tabla 3**). Cada tubo contenía 1 ml de solución de CuNPs, 1 ml de BHI y 100  $\mu$ L de una suspensión bacteriana de 48 horas de crecimiento, ajustado a un valor Mc Farland 0,5. Los tubos se cultivaron por 48 horas a 37 °C; transcurrido este período se sembró a partir de cada uno de los tubos en los que no se observó crecimiento 100  $\mu$ L sin diluir, y 100  $\mu$ L de diluciones 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000, hechas en buffer fosfato estéril pH 7,4; en agar cerebro-corazón (BHA). Las placas sembradas se llevaron a estufa a 37 °C por 48 horas. Transcurrido este período, se contaron de modo visual las unidades formadoras de colonias (UFC) bajo lupa estereoscópica.

## **2.4. Determinación actividad antimicrobiana de CuNPs como medicación intracanal en modelo *in vitro*.**

### **2.4.1. Preparación de los especímenes dentales.**

Para este propósito se ocupó un modelo de medicación intracanal reportado por Orstavik & Haapasalo modificado (1987), respecto de longitud de la muestra de especímenes y su fijación a las placas de Petri.

Se obtuvieron 180 dientes extraídos por indicación ortodóncica y/o periodontal en la Clínica de Cirugía de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, previa firma de un consentimiento informado (Anexo 1), que fue explicado por los investigadores y una copia fue entregada a los participantes del estudio para su lectura (selección de muestra tiene validez externa, Wu y cols, 2014).

Los criterios de inclusión fueron dientes uniradiculares y unicanaliculares sanos con desarrollo apical completo. Se excluyeron del presente estudio aquellos dientes que presentaron patologías reabsortivas.

Los dientes extraídos fueron mantenidos en una solución de alcohol al 70% con glicerina líquida (1:1) hasta su manipulación, para evitar su deshidratación.

Se removieron las coronas y los ápices con piedras de diamante de alta velocidad con refrigeración, obteniéndose especímenes de 10 mm. Se removieron con cureta los restos de tejido periodontal de la superficie externa del diente.

Se amplió cada canal radicular con fresa Gates Glidden # 3 para estandarizar el diámetro interno. Los especímenes se llevaron a baño ultrasónico con Hipoclorito de Sodio al 5,25% durante 10 minutos, lavado con solución salina y luego se llevaron a baño ultrasónico con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 17% para eliminar el barro dentinario. Se realizó un lavado final con solución salina para eliminar residuos. El canal radicular se secó con puntas de papel y se selló la superficie radicular externa con 2 capas de barniz de uñas.

#### 2.4.2. Infección de los especímenes dentales.

Los especímenes se colocaron en tubos con tapa rosca y se llevaron a autoclave para su esterilización. Colonias de 48 horas de desarrollo de *E. faecalis* (ATCC 29212) crecidas en BHA, fueron suspendidas en 10 ml de caldo BHI y cultivado a 37°C por 48 horas.

A partir de este cultivo, se preparó otro ajustado a un estándar de 0,5 Mc. Farland, equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml, utilizando espectrofotómetro HALO RB – 10 UV – VIS RATIO BEAM, leyendo a longitud de onda 550 nm, con una densidad óptica igual a 0,125.

Bajo campana de seguridad se agregó a cada tubo con espécimen 1 ml de caldo con suspensión bacteriana Mc. Farland 0,5. Los tubos con los especímenes contaminados se cerraron y se mantuvieron a 37°C durante 7 días, reemplazando cada 48 horas 500 µL de BHI saturado por 500 µL de BHI fresco (**Figura 4**).



**Figura 4:** Especímenes de diente sumergidos en 1 ml de caldo con cultivo de *Enterococcus faecalis* 0,5 Mc Farland.

### 2.4.3. Medicación de los especímenes dentales.

Completados los 7 días de incubación, los especímenes se lavaron con suero fisiológico estéril 0,9%, y se secó cada canal con puntas de papel estéril. Luego, se fijaron en placas de petri estériles utilizando cera estéril, que también obliteró la superficie apical del canal radicular (**Figura 5**). Estas placas de cultivo se llenaron con agar corriente a 46°C hasta alcanzar la superficie superior de las muestras.

A continuación se dividieron al azar 3 grupos para la aplicación del tratamiento intracanal:

Grupo 1: Control sin medicación (n=50)

Grupo 2: CuNPs en suspensión pura a diferentes concentraciones según CMI y CMB (n=50)

Grupo 3: Producto comercial Ultracal XS® (Ultradent, EE.UU) Compuesto por Hidróxido de Calcio 35% (n=50)



**Figura 5:** Especímenes fijados con cera y agar-agar en placas de Petri.

Se incluyó como referencia el producto comercial Ultracal XS®; utilizado generalmente para este propósito (Gold standard).

El procedimiento de medicación se realizó aplicando el agente (CuNPs o Ultracal XS®) con jeringas y agujas de 27 gauge hasta completar el lumen del canal. Una vez medicados, los especímenes fueron incubados a 37°C durante 1 y 7 días.

#### **2.4.4. Recuento de unidades formadoras de colonias.**

Completado los tiempos de incubación, los especímenes se lavaron con suero fisiológico estéril 0,9% durante 30 segundos. Posteriormente, con el propósito de recolectar muestras de los microorganismos adheridos a la dentina radicular, las muestras se sumergieron en una solución surfactante (suero fisiológico 0,9% + tween 80 al 1%) durante 10 minutos. A partir de la solución surfactante se sembraron 100  $\mu$ L de diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000 en BHA además de una alícuota de 100  $\mu$ L sin diluir. Cada grupo de placas de agar se cultivó a 37°C durante 48 horas.

### **3.- Microscopía electrónica de barrido con microanálisis elemental por energía dispersiva de rayos X (SEM/EDX) de bacterias tratadas mediante medicación intracanal.**

Los especímenes luego del primer día de medicación, se lavaron con suero fisiológico estéril 0,9% durante 30 segundos. Posteriormente se secó el lumen del canal con puntas de papel estéril.

Para el procesamiento de muestras, se fijaron en glutaraldehído al 2,5% en Buffer Cacodilato de sodio 0.1 M por 2 horas. Luego las muestras fueron lavadas en Buffer cacodilato de sodio 0.1 M. Posteriormente se deshidrataron en una batería alcoholes ascendentes 50 °, 70 °, 95 °, 100 ° I y 100 ° II por 5 minutos cada uno.

Para el secado punto crítico se colocaron las muestras en el Secador de punto crítico AUTOSAMDRI-815, SERIES A OVERVIEW durante 45 minutos por cada muestra, con el objetivo de remover todas las moléculas de agua a través de CO<sub>2</sub>.

Una vez secas las muestras, son montadas en portamuestras de aluminio y posteriormente se metaliza con oro en METALIZADOR DENTON VACUMM DESK V. Finalmente se Visualizaron al microscopio electrónico de barrido Jeol Modelo JSM- IT300LV.

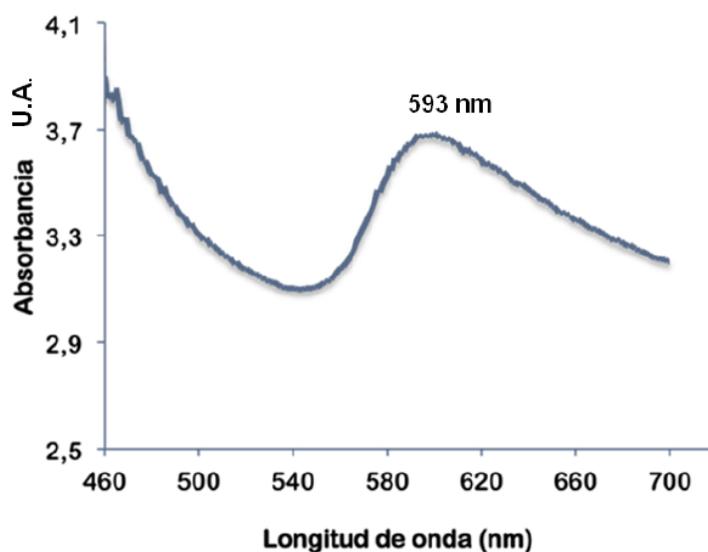
## **Análisis de datos**

El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism®. Las variables (UFC) fueron analizadas considerando el promedio  $\pm$  desviación estándar. Se usó el test de análisis de varianza en una vía (ANOVA), seguido del test de múltiples comparaciones de Bonferroni, usando un nivel de significancia  $p < 0,05$ .

## Resultados

### 1.- Caracterización de nanopartículas de cobre

Durante la espectrofotometría de absorción molecular la suspensión de CuNPs, exhibió un máximo de absorción a 593 nm (**Figura 6**) correspondiente a su plasmón de resonancia superficial característico, que confirma la formación efectiva de las nanopartículas de cobre con tamaño nanométrico.



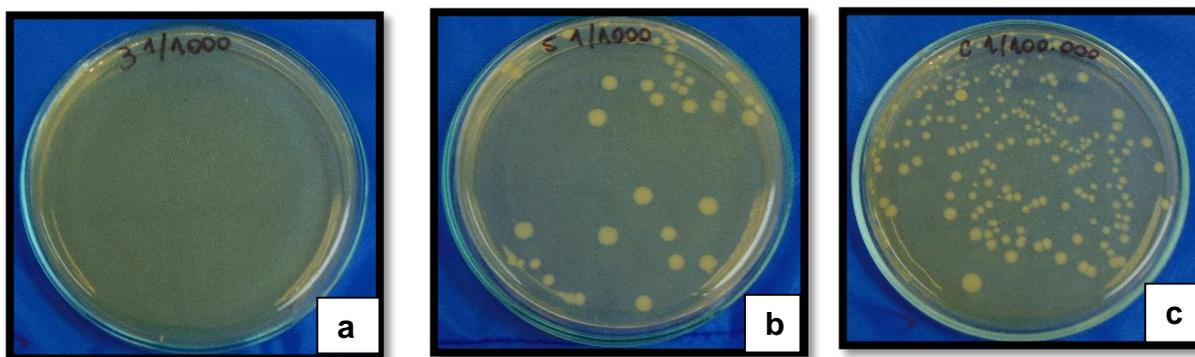
**Figura 6:** Espectro de absorción molecular de suspensión de CuNPs

### 2.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria de nanopartículas de cobre frente a *E. faecalis* determinada en el rango de concentraciones presentada en la **tabla 3**, fue de 150 ppm.

### 3.- Determinación de la concentración mínima bactericida

Según la observación de los tubos en los ensayos de CMI, la concentración mínima bactericida se debía encontrar entre 150 ppm y 300 ppm de CuNPs. En la **Figura 7** se observan las placas con UFC de *E. faecalis* con las concentraciones de CuNPs de 300 ppm, 150 ppm y control.



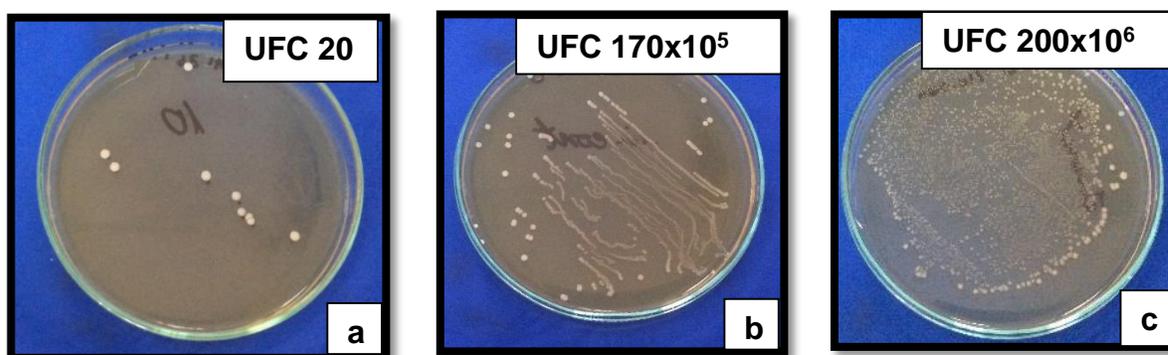
**Figura 7:** (a) Siembra de CuNPs a 300 ppm, dilución 1/1000. (b) Siembra de CuNPs a 150 ppm, dilución 1/1000. (c) Siembra control, dilución 1/100.000.

Los resultados anteriores indicaron por lo tanto que a una concentración CuNPs de 300 ppm no hay crecimiento bacteriano. Con el propósito de determinar con mayor precisión el valor de CMB, se estudió un nuevo rango de concentraciones CuNPs entre 150 a 250 ppm de acuerdo a los valores presentados en la **Tabla 5**.

**Tabla 5:** concentraciones de CuNPs por tubo para determinar CMB

Tubo	Concentración de CuNPs (ppm)
1	250
2	225
3	200
4	175
5	150

En la **Figura 8** se muestra los resultados del crecimiento de UFC de las concentraciones CuNPs de 200, 225 ppm y el control. Donde se observa que a 225 ppm hay un 99,99% de inhibición de crecimiento bacteriano, respecto del control. En el espécimen medicado a 200 ppm, la inhibición es del 80%. Por lo tanto, se determina que con una concentración de 225 ppm se consigue la CMB de las CuNPs frente a *E. faecalis*.

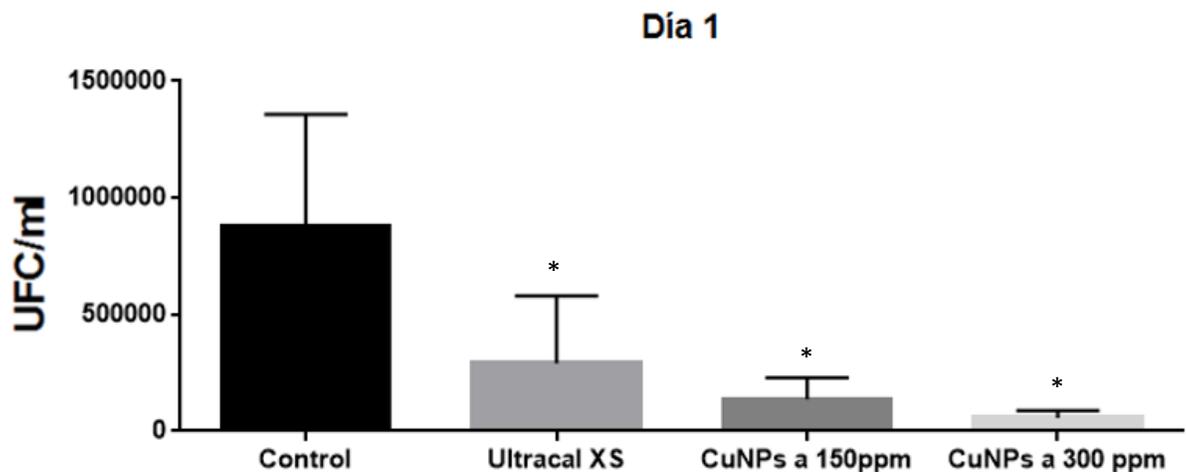


**Figura 8:** Resultado de UFC de *Enterococcus faecalis* crecidas a partir una concentración de CuNPs de 225 ppm directo (A), a una dilución de 1/100 (B), CuNPs 200 ppm a una de dilución 1/100 (C) y del control sin CuNPs a una dilución de 1/1.000 (D).

#### 4.- Determinación de la actividad antimicrobiana de nanopartículas de cobre como medicación intracanal en un modelo *in vitro*.

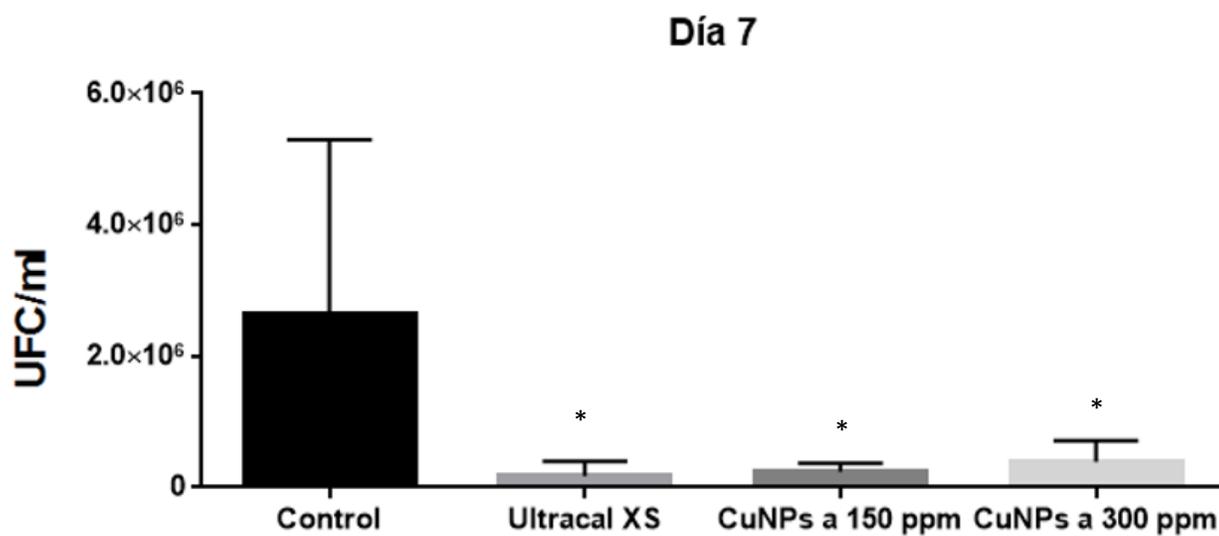
##### 4.1- Medición de la actividad antimicrobiana de la medicación.

En la **Figuras 9 y 10** se presentan los valores de recuento de UFC de *E. faecalis* luego de la medicación intracanal durante 1 y 7 días, respectivamente. Luego de 1 día de medicación los recuentos de ultracal XS® y las diferentes concentraciones de CuNPs fueron significativamente menor que los del control (P Value < 0,05). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre CuNPs y Ultracal XS® (P value > 0,05), determinado mediante el test de múltiples comparaciones de Bonferroni.



**Figura 9:** Recuento de UFC de *E. faecalis* intracanal de los diferentes grupos de medicación y del grupo control. (\*) Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control.

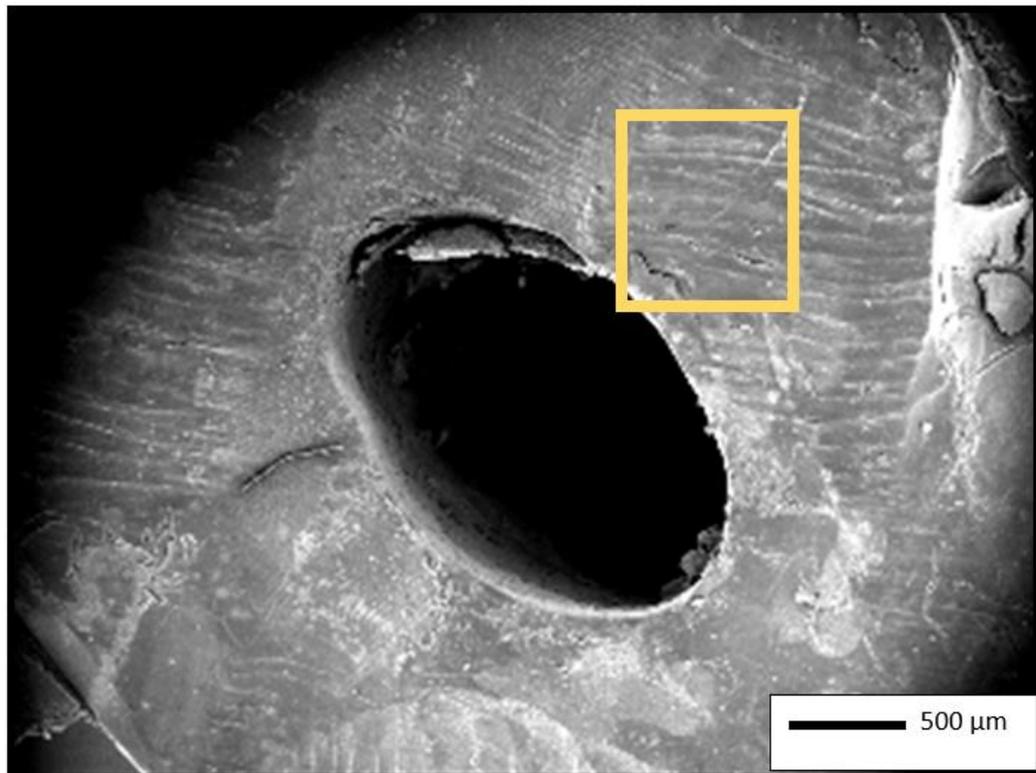
Luego de 7 días de medicación se mantuvo el efecto antimicrobiano tanto de CuNPs como de UltracalXS®.



**Figura 10:** Recuento de UFC de *E. faecalis* intracanal de los diferentes grupos de medicación y del grupo control. (\*) Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control.

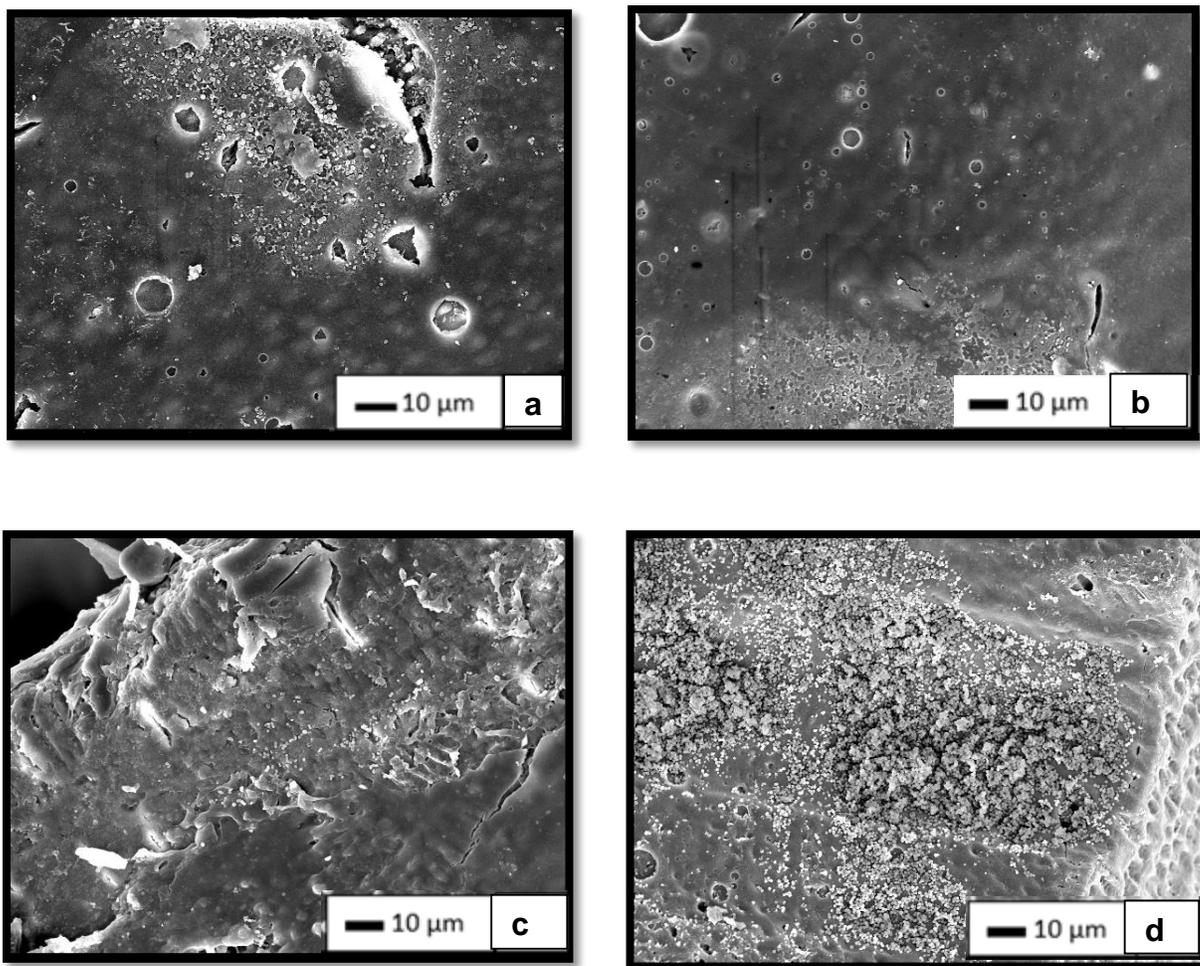
#### 4.2 Análisis SEM/EDX de los especímenes medicados.

Se observó mediante microscopía electrónica de barrido un espécimen de cada grupo al primer día de medicación. En la **Figura 11** (x30), se muestra el canal radicular de un modelo del espécimen, y se indica en color amarillo el área que fue analizada con mayor significación.



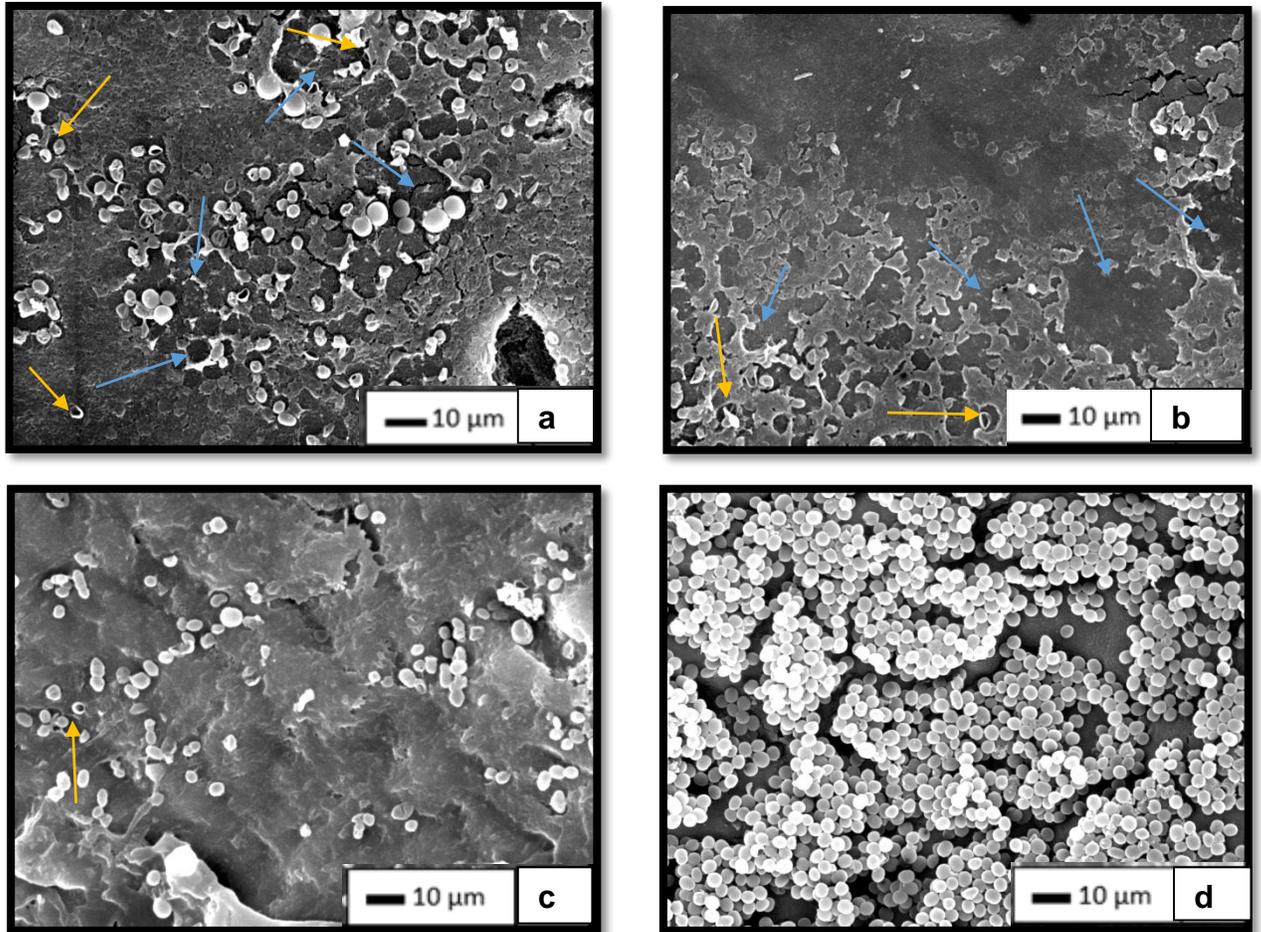
**Figura 11:** Imagen SEM de corte de un espécimen luego de 1 día de medicación. En el recuadro amarillo se indica el área posteriormente analizada con mayor magnificación.

En la **Figura 12**, se presentan imágenes de cada grupo de medicación a mediana magnificación (x1000), en las que ya es posible detectar el biofilm de *E.faecalis* formado sobre la superficie dentinaria radicular. Se puede observar que en las superficies radiculares medicadas existe claramente una menor cantidad de biofilm en relación al control sin medicar.



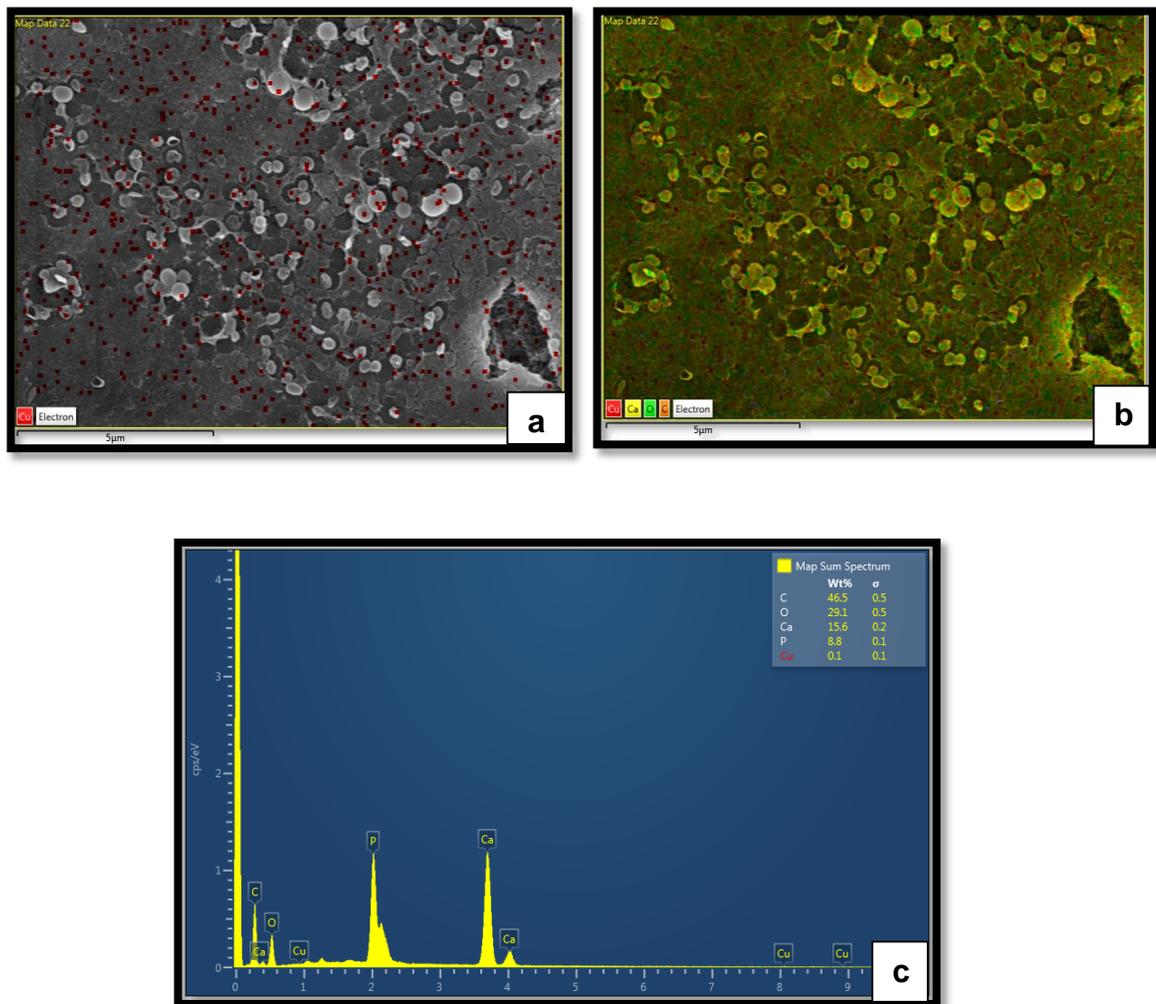
**Figura 12:** Imágenes SEM de cada grupo de medicación (x1000) (a) CuNPs 150 ppm. (b) CuNPs 300 ppm. (c)Control con Ultracal XS®. (d) Control sin medicación.

En la **Figura 13**, se presentan imágenes de mayor aumento (x4500), en donde se observa que algunos microorganismos no conservan la forma redondeada (cocácea) en los grupos medicados. Además en las superficies tratadas con CuNPs, se observa registros de la morfología cocácea de bacterias aparentemente removidas desde el biofilm.



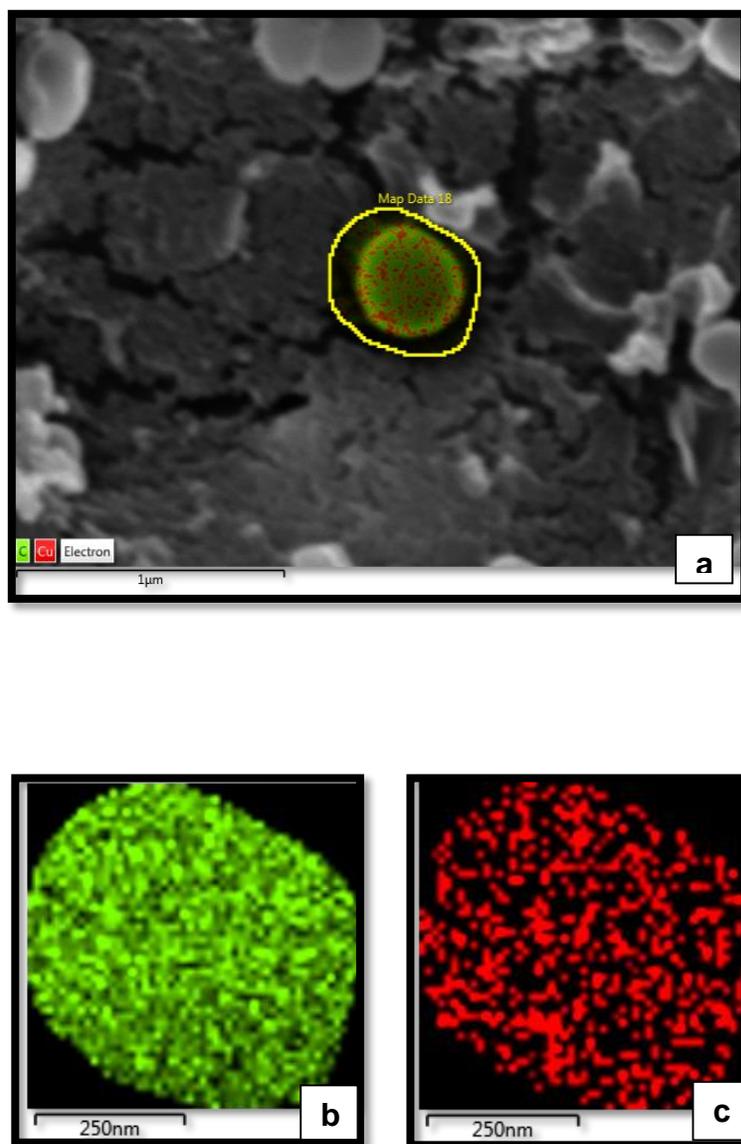
**Figura 13:** Imágenes SEM de cada grupo de medicación (x4500) **(a)** CuNPs 150 ppm. **(b)** CuNPs 300 ppm. **(c)** Control con Ultracal XS®. **(d)** Control sin medicación. Con flecha azul se indica la impronta cocácea sobre el biofilm (a, b). Cambios en la morfología de las bacterias son indicados con flecha de color amarillo (a, b, c).

Las superficies observadas por SEM también se analizaron simultáneamente mediante microanálisis EDX. En la **Figura 14 a, b**; se observa con puntos rojos la distribución de átomos de cobre (CuNPs) sobre la dentina radicular, indicando que las CuNPs se adhieren y se distribuyen por toda la superficie del biofilm/tejido dentario. El mapeo también revela los distintos componentes elementales de la dentina (Ca, O, P, C). La composición porcentual de estos elementos se presenta en la **Figura 14c**.



**Figura 14.** (a) Mapeo EDX indicando con puntos rojos la distribución de las nanopartículas de cobre a 150 ppm sobre *E. faecalis*.(x4500) (b) Mapeo EDX mostrando la distribución de CuNPs respecto de otros elementos de la dentina. Color rojo CuNPs, color amarillo Calcio, Color verde oxígeno, color naranja carbono. (c) Espectro EDX que muestra la composición porcentual de los elementos presentes en la dentina y del cobre de las CuNPs, en espécimen medicado a 150 ppm.

En la **Figura 15** se muestra el análisis EDX sobre una bacteria individual a mayor magnificación, en donde se observa la distribución de carbono en color verde y de CuNPs en color rojo sobre toda el área ocupada por la célula de *E. faecalis*. En la **Figura 15 b, c**; se observa los mapeos de distribución por separado de carbono y CuNPs ocupando el área de la bacteria.



**Figura 15.** (a) Mapeo elemental EDX de C (verde) y Cu (rojo) en el área en torno a una bacteria de *E. faecalis* medicada con CuNPs. (b, c) Mapeos separados de los elementos en el área ocupada por la bacteria.

## Discusión

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de nanopartículas de cobre frente a *Enterococcus faecalis*, debido a que es causante de gran parte de los fracasos endodónticos (Pardi, 2009). Además, el mecanismo de acción antimicrobiano de las nanopartículas metálicas, con múltiples objetivos en la célula bacteriana, disminuye la posibilidad de generar resistencia antimicrobiana respecto de la que se genera con los antibióticos usados tradicionalmente (Wu y cols, 2014). Por otro lado, hasta este momento, no existían estudios reportados que evaluaran la actividad antimicrobiana de nanopartículas de cobre frente a patógenos endodónticos.

Para cumplir con el objetivo del presente estudio, se sintetizaron y caracterizaron las nanopartículas de cobre, se determinó su concentración mínima inhibitoria y bactericida, frente al *Enterococcus faecalis*; con estos datos se evaluó su actividad antimicrobiana en un modelo de medicación intracanal *in vitro*.

La síntesis de nanopartículas se llevó a cabo utilizando como agente estabilizante almidón, lo que permitió que la nanopartícula obtenida fuera más estable en suspensión y más amigable para aplicaciones biomédicas. Su caracterización se realizó mediante la medición del plasmón de resonancia superficial, obteniéndose la máxima absorbancia a los 593 nm, lo cual confirmó esta propiedad física única para los materiales metálicos cuando tienen dimensiones nanométricas (Chatterjee y cols, 2014).

En este trabajo la CMB obtenida para CuNPs frente a *Enterococcus faecalis* fue de 225 ppm, validando la hipótesis. Este valor es relativamente alto respecto al presentado por CuNPs frente a otros microorganismos, como por ejemplo frente a *Streptococcus mutans*, que fue de 30 ppm (Trepiana, 2015). Esta gran diferencia en las concentraciones necesarias para su acción bactericida, se podría explicar debido a que el cobre interacciona con grupos amino y carboxilo de la superficie celular de la bacteria. Se ha reportado que las bacterias pueden diferir en la concentración de estos grupos funcionales superficiales en su estructura, por lo tanto podrían tener diferente grado de interacción o afinidad con las CuNPs (Pelgriff

y cols, 2013). Una mayor afinidad de de CuNPs o iones de cobre con la superficie bacteriana producirían una alteración en la estructura de la membrana, aumentando la permeabilidad a través de ella (fuga de elementos esenciales desde el interior de la bacteria) o afectando el funcionamiento de proteínas de la membrana (Chatterjee y cols, 2014).

Para realizar un acercamiento a la práctica clínica endodóntica, se evaluó la actividad antimicrobiana de las CuNPs frente a un biofilm de *Enterococcus faecalis* formado sobre la superficie interna del canal radicular *in vitro*. Esto presentaba un desafío mayor debido a la posibilidad del patógeno para evadir la acción de la medicación, por sus factores de virulencia, como las proteínas de superficie y las adhesinas de unión al colágeno (Kayaoglu y cols, 2004), además de la compleja anatomía del sistema de canales radiculares.

En este ensayo se corroboró la acción antimicrobiana de CuNPs, determinándose que las dos concentraciones estudiadas presentaron acción antimicrobiana equivalente a la de Ultracal XS® al primer y al séptimo día de medicación (test de múltiples comparaciones de Bonferroni).

A pesar que la CMB de CuNPs fue de 225 ppm, la medicación con CuNPs a 150 ppm, produjo un efecto equivalente a la de CuNPs a 300 ppm, probablemente debido a un acumulación localizada de CuNPs en la vecindad del biofilm, que podría elevar las concentraciones de la partícula por sobre su CMB. Este efecto también se ha visto en la acción de las CuNPs en materiales acrílicos frente a *Candida albicans*, donde las concentraciones efectivas pueden ser hasta 100 veces menores que la CMB (Correa, 2012).

Al comparar UltracalXS® con CuNPs, se pueden observar diferencias respecto de su consistencia, manipulación y mecanismo de acción antimicrobiano.

La presentación en pasta de Ultracal XS®, tiene aspectos favorables como servir de barrera mecánica, pero esta misma característica podría impedir que fluya a las áreas de difícil acceso. Las CuNPs, en cambio, se presentan en suspensión acuosa, que favorece la penetración en todo el interior del sistema radicular. Sin embargo las suspensiones CuNPs podrían decantar en el tiempo, produciendo una

distribución poco homogénea del antimicrobiano en el sistema de canales radiculares. Futuros estudios podrían estar orientados a encontrar un vehículo apropiado para una aplicación con liberación controlada y sostenida de las CuNPs en el SCR.

En otros estudios en los que se trabajó con *E. faecalis* pero enfrentándolos a nanopartículas de plata, utilizadas como solución irrigante (trabajo actual se utilizó como medicación), se concluyó que se requería una concentración de 1000 ppm para inhibir la formación de biofilm. Sin embargo, usando las nanopartículas de plata en gel como medicación, se requirió de una concentración de 100 ppm para lograr una acción similar a la de hidróxido de calcio (Wu y cols, 2014).

Respecto a la eficacia antimicrobiana de CuNPs, una característica importante de su acción sobre *E. faecalis*, es que al primer día de medicación provocaría una disrupción del biofilm, demostrado en la impronta cocácea que se observa en las imágenes de SEM. Esta acción tendría la ventaja de no permitir la contaminación de los túbulos dentinarios, debido a que las bacterias se desprenderían de la superficie dentinaria radicular. Adicionalmente, al interrumpir la formación del biofilm, disminuye la comunicación bacteriana, afectando la capacidad de que las bacterias se vuelvan resistentes al agente antimicrobiano (Pelgrift y cols, 2013). Este efecto se podría atribuir a las propiedades antifouling del cobre, concepto que se refiere a la alteración del metabolismo bacteriano para disminuir la adhesión de microorganismos en superficies tratadas con este elemento. Los iones de cobre que puedan producir las CuNPs forman enlaces electrostáticos con regiones cargadas negativamente en la superficie celular, generando estrés y deformando la pared celular bacteriana (Borkow, 2005).

Por otro lado, mediante análisis EDX se encontró que las CuNPs se adhieren sobre la superficie radicular medicada. Además, las nanopartículas se distribuyen de manera uniforme en el área ocupada por las células de *Enterococcus faecalis*. Estas observaciones sugieren que podría haber una alta interacción de las CuNPs con la estructura celular bacteriana. Esta característica es ventajosa respecto de la acción de Ultracal XS®, ya que este actúa por una alcalinización del medio, acción que

disminuye con el tiempo debido a la capacidad buffer de la dentina (Torabinejad y Walton, 2010).

Los resultados obtenidos en este trabajo, en relación a la actividad bactericida frente a *E.faecalis* de las CuNPs y su capacidad para remover el biofilm formado sobre la estructura dentinaria, sugiere que estas partículas podrían ser usadas para otorgarle propiedades antimicrobianas a materiales endodónticos, permitiendo ser utilizadas en las distintas etapas de la terapia, incluyendo la posibilidad de su uso como irrigante.

## Conclusiones

1. Mediante la determinación de los valores de CMI y CMB se comprobó la hipótesis de que las CuNPs presentan actividad antimicrobiana frente a la bacteria endodóntica *Enterococcus faecalis*.
2. Al utilizar las CuNPs como medicación en un modelo intracanal, las partículas demuestran una acción antimicrobiana equivalente a la presentada por Ultracal XS®.
3. Análisis realizados mediante SEM/EDX sugieren que además del mecanismo bactericida de las CuNPs, las nanopartículas tendrían una acción antimicrobiana removiendo el biofilm desde el sistema de canales radiculares mediante un efecto anti-fouling.
4. La actividad antimicrobiana presentada por las CuNPs frente a *E. faecalis*, sugiere que podrían ser evaluadas como alternativa de agente antimicrobiano en procedimientos endodónticos.

## Referencias

- Allaker R. (2010). The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. *J Dent Res*; 89:1175-86
- Arsalan J, Mahsa J (2014). Síntesis of copper nanoparticules and its antibacterial activity against *Escherichia coli*. *Asian journal of biological sciences*. DOI:10.3923/ajbs.2014.183.186.
- Brändle N. Zehnder M, Weiger R, Waltimo T. (2008). Impact of growth conditions on susceptibility of five microbial species to alkaline stress. *J Endod*; 34:579-82.
- Borkow G. y Gabbay J. (2005) Copper as a biocidal tool. *Current Medicinal Chemistry*, 12: 2163-2175.
- Byström A, y Sundqvist G, (1981). Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res* 89:321-8
- Cao, H., Qi, Z., Jiang, H., Zhao, J., Liu, Z., & Tang, Z. (2012). Detection of *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in primary endodontic infections in a Chinese population. *Int Endod J*, 45(8), 773-781
- Cioffi N, Ditaranto N, Torsi L, Picca RA, Sabbatini L, Valentini A, y cols (2005). Analytical characterization of bioactive fluoropolymer ultra-thin coatings modified by copper nanoparticles. *Anal Bioanal Chem* 381:607-16
- Correa S, (2012). Preparación de resinas acrílicas cargadas con nanopartículas de cobre y sus propiedades antimicrobianas frente a *Candida*

albicans. *Tesis para optar al Título de Cirujano dentista, Universidad de Chile.*

- Cushing B., Kolesnichenko V., O'Connor C. (2004) Recent advances in the liquid-phase syntheses of inorganic nanoparticles. *Chem Rev* 104:3893-3946.
- Chatterjee A, Chakraborty R, Basu T (2014). Mechanism of antibacterial activity of copper nanoparticles. *Nanotechnology* 25: 135101-135113.
- Chong BS1, Pitt Ford TR. (1992) The role of intracanal medication in root canal treatment. *Int Endod J.* (2):97-106.
- Estrela C. (2005). Ciencia endodóntica. 1° Edición, Artes Médicas. Latinoamérica. Sao Paulo.
- Fang J., Lyon D., Wiesner M., Dong J., Alvarez M. (2007). Effect of a fullrene water suspension on bacterial phospholipids and membrane phase behavior. *Sci Tot Environ* 41: 2636-2642.
- Foschi, F., Cavrini, F., Montebugnoli, L., Stashenko, P., Sambri, V., & Prati, C. (2005). Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients. *Oral Microbiol Immunol*, 20(5), 289-295
- González, J. (2013). Síntesis de materiales bactericidas basados en nanopartículas metálicas y biopolímeros para terapia periodontal odontológica. *Tesis para optar al Título de cirujano dentista, Universidad de Chile.*

- Haapasalo M., Ranta H., Ranta K. (1987). Facultative Gram-negative enteric rods in persistent periapical infections. *Acta Odontol Scand* 41:19-22.
- Haapasalo M., Orstavik D. (1987). *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 66:1375-1379.
- Hernández S., Donoso M., Jané E., Salazar L., Segura J., Velasco E., y cols (2015). Viruses in pulp and periapical inflammation: a review. *Odontology* 2015 Mar 22.
- Hong, L., Hai, J., Yan-Yan, H., Shenghui, Y., & Benxiang, H. (2015). Colonization of *Porphyromonas endodontalis* in primary and secondary endodontic infections]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 33(1), 88-92.
- Kayaoglu G, Orstavik D. (2004) Virulence factors on *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 15: 308-320.
- Khan S., Alam F., Azam A. (2012). Gold nanoparticles enhance methylene blue-induced photodynamic therapy: a novel therapeutic approach to inhibit *Candida albicans* biofilm. *Int J Nanomedicine* 7: 3245-3257.
- Li Z., Lee D., Sheng X., Cohen R., Rubner M. (2006). Two-level antibacterial coating with both release-killing and contact-killing capabilities. *Langmuir* 21;22:9820-9823.
- Łysakowska M., Ciebiada-Adamiec A., Sienkiewicz M., Sokołowski J. y Banaszek K. (2015). The cultivable microbiota of primary and secondary infected root canals, their susceptibility to antibiotics and association with the signs and symptoms of infection. *doi: 10.1111/iej.12469*.
- Mahendra R., Alka Y., Aniket G. (2009) Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology advances* 76-83

- Mohammadi Z., Shalavi S., y Yazdizadeh M., (2012). Antimicrobial activity of calcium hydroxide in endodontics: a review. *Chonnam Med J*;48:133-40.
- Nair P. (2004) Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol*; 15:348-81
- Negroni M. (2009). Microbiología estomatológica: Fundamentos y guía práctica. 2da edición. Editorial panamericana. ISBN 978-950-06-1584-6
- Nakajo K, Komori R, Ishikawa S, Ueno T, Suzuki Y, Iwami Y, y cols (2006) Resistance to acidic and alkaline environments in the endodontic pathogen *Enterococcus faecalis*. *Oral Microbiol Immunol* ; 21: 283-8
- Ozbek, S. M., & Ozbek, A. (2010). Real-time polymerase chain reaction of "red complex" (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola*) in periradicular abscesses. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 110(5), 670-674.
- Pardi G, Guilarte C, Cardozo E, Briceño E (2009) Detección de *Enterococcus faecalis* en dientes con fracaso en el tratamiento endodóntico. *Acta venezolana V. 47 n1*
- Picazo J. (2000) Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los microbianos, Sociedad española de enfermedades infecciosas y microbiología oral.
- Pelgrif R, Friedman A (2013) Nanotechnology as a therapeutic too to combat microbial resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews Volume 65*, doi:10.1016/j.addr.2013.07.011

- Portenier I, Waltimo T, Haapasalo M. (2003) *Enterococcus faecalis* The root canal survivor and 'star' in post-treatment disease. *Endod Topics* 6: 135-159
- Prado J, Vidal A, Durán T. (2012) Aplicación de la capacidad bactericida del cobre en la práctica médica. *Rev Med Chile*; 140: 1325-1332
- Quaranta D, Krans T, Espirito Santo C, Elowsky C G, Domaille DW, y cols, (2011) Mechanisms of contact-mediated killing of yeast cells on dry metallic copper surfaces. *Appl Environ Microbiol*; 77: 416-26.
- Ren G, Hu D, Cheng E, Vargas-Reus MA, Reip P, Allaker RP (2009) Characterization of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *Int J antimicrob Agents* 33:587-590
- Ricucci D, Siqueira JF Jr. (2010) Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod*. doi: 10.1016/j.joen.2010.04.007
- Silva S, Pires P, Monteiro DR, Negri M, Gorup LF, Camargo ER, y cols (2013) The effect of silver nanoparticles and nystatin on mixed biofilms of *Candida glabrata* and *Candida albicans* on acrylic. *Med Mycol* ;51:178-84
- Siqueira Jf (2003) Microbial causes of endodontic flare-ups. *International endodontic journal*. DOI: 10.1046/j.1365-2591.2003.00671.
- Siqueira JF, Lopes HP (1999) Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J*.;32(5):361-9.porten
- Soler, C. (2015) Preparación de adhesivo de resina modificado con nanopartículas de cobre y evaluación de sus propiedades antimicrobianas

frente a *Streptococcus Mutans*. Tesis para optar al Título de cirujano dentista, Universidad de Chile.

- Sondi I. y Salopek B. (2004) Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci.* 1;275:177-82.
- Svitlana Chernousova (2012) Silver as Antibacterial Agent: Ion, Nanoparticle. *Review DOI: 10.1002/anie.201205923*
- Sofi W, Gowri M, Shruthilaya M, Suresh R, Venkatraman G (2012) Silver nanoparticles as an antibacterial agent for endodontic infections. *BMC Infectious Diseases:60*
- Thabet M, Badawy AM, Genaidy A, Scheckel KG, Luxton TP, Suidan M (2010). An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and 61 applications: A systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Science of the Total Environment* 408 999–1006.
- Torabinejad y Walton (2010). Endodoncia, principios y práctica. 4° Edición, Elsevier España.
- Trepiana, D. (2015). Síntesis de suspensions de nanopartículas de cobre y quitosano, y evaluación de sus propiedades antimicrobianas frente a *Streptococcus mutans*. Tesis para optar al Título de Cirujano dentista, Universidad de Chile.
- Triches T, Figueiredo LC, Feres M, de Freitas SF, Zimmermann GS, Cordeiro MM (2014) Microbial profile of root canals of primary teeth with pulp necrosis and periradicular lesion. *J Dent Child (Chic); 81:14-9.*

- Usman M, Ibrahim N, Shameli K, Zainuddin N, Wan-Yunus W (2012). Copper Nanoparticles Mediated by Chitosan: Synthesis and Characterization via Chemical Methods. *Molecules* 17: 14928-14936
- Weckwerth, Zapata, Vivan, Tanomaru Filho, Maliza, Duarte, *In vitro* alkaline pH resistance of *Enterococcus faecalis*. *Braz Dent J.* 24:474-6. doi: 10.1590/0103-6440201301731.
- Wu, Y. Yang W, Wang C, Hu J, Fu J.(2005) Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. *Int J Pharm.* 295:235-45.
- Wu, D. Fan W, Kishen A, Gutmann JL, Fan B. (2014) Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod.*285-90. doi: 10.1016/j.joen.2013.08.022.
- Zhang C, Du J, Peng Z. (2015) Correlation between *Enterococcus faecalis* and Persistent Intraradicular Infection Compared with Primary Intraradicular Infection: A Systematic Review. *pii: S0099-2399,00377-5.* doi: 10.1016/j.joen.2015.04.008.

## Anexos

Edición 26.06.2015



**Carta de Consentimiento Informado  
PARA PADRES O TUTORES DEL PACIENTE MENOR DE EDAD**

**Investigadora Responsable** Isabel Mardones P,  
Sergio Livingstone Polhammer 943, Independencia  
Contacto telefónico: 76496357. Mail: imardones@odontologia.uchile.cl

Yo, \_\_\_\_\_ estoy dispuesto a permitir la participación **voluntaria** de \_\_\_\_\_, quien es mi hijo/pupilo, en este proyecto de investigación. He leído la información descrita y mis preguntas acerca del estudio han sido respondidas satisfactoriamente. Al firmar esta copia, indico que tengo un entendimiento claro del proyecto. Doy mi consentimiento al investigador y al resto de colaboradores, a realizar el procedimiento pertinente.

RUT y Firma del padre o tutor: \_\_\_\_\_

Nombre de hijo/pupilo: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

**Sección a llenar por el Investigador Principal**

He explicado al Sr(a) \_\_\_\_\_ la naturaleza de la investigación, le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que conozco la normativa vigente para la realizar la investigación con seres humanos y me apego a ella.

Nombre y Firma del Investigador que toma el CI \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Isabel Mardones Peñailillo  
Nombre y Firma del Investigador Principal \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Nombre y Firma del director del Centro o de su Representante \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_



Edición 26.06.2015



**DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PACIENTE ADULTO DONANTE DE DIENTE PARA PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**Título del Proyecto:** “Acción de nanopartículas de cobre como medicación intracanal sobre *Enterococcus faecalis*. Estudio preliminar *in vitro*”

**Investigador Principal:** Isabel Mardones Peñailillo. Contacto: 76496357 Mail: imardones@odontologia.uchile.cl

**Sede de Estudio:** Facultad de Odontología, Universidad de Chile – Sergio Livingstone Polhammer 943 – Independencia, Santiago

**Fecha de Edición:** 24 de junio de 2015

**ANTECEDENTES GENERALES**

Usted ha sido invitado a participar **voluntariamente** en un estudio titulado “Acción de nanopartículas de cobre como medicación intracanal sobre *Enterococcus faecalis*. Estudio preliminar *in vitro*”. El objetivo de este estudio es probar si partículas de cobre tienen propiedades antibacterianas frente a los microbios que producen infección dentro del diente. El cobre es antimicrobiano, sin embargo, no se ha estudiado su efecto contra una bacteria que está dentro del canal cuando está infectado.

En términos generales, este estudio consiste en usar dientes con una sola raíz para probar sobre ellos la capacidad de la partícula de cobre para matar las bacterias. Este formulario será explicado por el investigador y se entregará a los participantes para su lectura. El participante podrá retirarse del estudio en cualquier momento que lo desee y sus datos serán eliminados a partir de ese momento. No tendrá que efectuar gasto alguno como consecuencia del estudio. No recibirá pago por su participación. Usted podrá solicitar información actualizada sobre el estudio, al investigador responsable

**PROCEDIMIENTO**

Le solicitaremos donar sus dientes a pacientes a los cuales ha sido indicada la extracción de dientes con una sola raíz por indicación ortodóncica o periodontal y no usarán sus dientes para guardar células madres. Estos dientes donados voluntariamente se usarán en procedimientos de laboratorio para probar que partículas de cobre tienen acción antibacteriana. Una vez que los dientes sean usados en este estudio, se destruirán. Usted no correrá ningún riesgo durante y posterior al procedimiento de la investigación debido a que se realizará en el diente extraído y no se analizará ninguna información genética en los tejidos dentarios y la identificación de los donantes, será mantenida con estricta confidencialidad por el investigador. Su nombre y datos personales serán codificados para el uso en este estudio y no serán identificados públicamente. Los resultados emanados de este estudio podrán ser publicados en revistas científicas.

**BENEFICIOS**

Con su donación de dientes permitirá estudiar las nanopartículas de cobre como posible nuevo medicamento intracanal en los tratamiento de endodoncia.

En caso de cualquier duda puede acudir a Investigadora Responsable Isabel Mardones, Sergio Livingstone Polhammer 943, Independencia, los días Miércoles de 15:00 a 18:00 hrs o vía telefónica al 76496357 o dirigirse a la Dra. María Angélica Torres, Presidente del Comité Ético Científico, Facultad de Odontología, Universidad de Chile al correo electrónico cec.fouch@odontologia.uchile.cl.



Edición 26.06.2015



## Carta de Consentimiento Informado PARA DONANTE DE DIENTES MAYOR DE 18 AÑOS

**Investigadora Responsable** Isabel Mardones P,  
Sergio Livingstone Polhammer 943, Independencia  
Contacto telefónico: 76496357. Mail: imardones@odontologia.uchile.cl

Yo, \_\_\_\_\_, estoy dispuesto a participar voluntariamente en el este proyecto de investigación. He leído la información descrita y mis preguntas acerca del estudio han sido respondidas satisfactoriamente. Al firmar esta copia, indico que tengo un entendimiento claro del proyecto. Doy mi consentimiento al investigador y al resto de colaboradores, a realizar el procedimiento pertinente.

RUT y Firma del participante: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

### Sección a llenar por el Investigador Principal

He explicado al Sr(a) \_\_\_\_\_ la naturaleza de la investigación, le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que conozco la normativa vigente para la realizar la investigación con seres humanos y me apego a ella.

Nombre y Firma del Investigador que toma el CI \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Isabel Mardones Peñailillo  
Nombre y Firma del Investigador Principal \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Nombre y Firma del director del Centro o de su Representante \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_





Edición 26.06.2015

**DOCUMENTO DE ASENTIMIENTO INFORMADO**  
**Para donante mayor de 12 años y menor de 18 años**

**Título del Proyecto:** "Acción de nanopartículas de cobre como medicación intracanal sobre *Enterococcus faecalis*. Estudio preliminar in vitro"

**Investigador Principal:** Isabel Mardones Peñailillo. Contacto: 76496357 Mail: imardones@odontologia.uchile.cl

**Sede de Estudio:** Facultad de Odontología, Universidad de Chile – Sergio Livingstone Polhammer 943 – Independencia, Santiago

**Fecha de Edición:** 24 de junio de 2015

¡Hola!

Mi nombre es Isabel Mardones y mi trabajo consiste en investigar y probar un nuevo medicamento dentro de un diente, que ha sido sacado de la boca por indicación de tu dentista u ortodoncista, para ver si es capaz de matar unas bacterias que pueden entrar en los dientes y provocarles enfermedad.

**Puedes elegir si quieres participar o no.** Hemos conversado de lo que se trata esta investigación con tus padres/apoderado y ellos saben que te estamos preguntando a ti también para saber si quieres participar o no. Si vas a participar en la investigación, tus padres/apoderado también tienen que aceptarlo, pero si no deseas formar parte en la investigación, no tienes por qué hacerlo, aun cuando tus padres lo hayan aceptado. Puedes discutir cualquier aspecto de este documento con tus padres o amigos o cualquier otro con el que te sientas cómodo.

Puede que haya algunas palabras que no entiendas o cosas que quieras que te las explique mejor. Por favor, puedes pedirme que te aclare tus dudas.

En términos generales, este estudio consiste en usar dientes con una sola raíz para probar sobre ellos la capacidad de la partícula de cobre para matar las bacterias. Podrás retirarte del estudio en cualquier momento que lo desees y tus datos serán eliminados a partir de ese momento. No tendrás que efectuar gasto alguno como consecuencia del estudio. No recibirás pago por tu participación. Podrás solicitar información actualizada sobre el estudio, a mí que soy la investigadora responsable.

**Procedimiento**

Los dientes sacados por indicación de frenillos o soporte los usaremos para pruebas de laboratorio para probar que las partículas de cobre matan bacterias. Una vez que los dientes sean utilizados para realizar este estudio, se destruirán. No corres ningún riesgo durante y posterior al procedimiento de la investigación debido a que se realizará en el diente extraído.

La información obtenida de este estudio será mantenida con estricta confidencialidad por el investigador. Tu nombre y datos personales no serán identificados públicamente. Asimismo, no realizarán análisis genéticos en los tejidos dentarios. Los resultados emanados de este estudio podrán ser publicados en revistas científicas.



Edición 26.06.2015



### Carta de Consentimiento Informado

Versión III: niños mayores de 12 años y menores de 18 años

Fecha edición: 24 de junio de 2015

**Investigadora Responsable** Isabel Mardones P,  
Sergio Livingstone Polhammer 943, Independencia  
Contacto telefónico: 76496357. Mail: imardones@odontologia.uchile.cl

Yo, \_\_\_\_\_ quiero participar **voluntariamente** en este proyecto de estudio. Me ha explicado la información descrita y mis preguntas acerca del estudio han sido respondidas satisfactoriamente. Al firmar esta copia, indico que entiendo el estudio y que acepto participar en él. Doy mi consentimiento al investigador y al resto de colaboradores, a realizar el procedimiento que corresponde.

Firma del joven: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

#### Sección a llenar por el Investigador Principal

He explicado al Sr(a) \_\_\_\_\_ la naturaleza de la investigación, le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que conozco la normativa vigente para la realizar la investigación con seres humanos y me apego a ella.

Nombre y Firma del Investigador que toma el CI \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Isabel Mardones Peñailillo  
Nombre y Firma del Investigador Principal \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Nombre y Firma del director del Centro o de su Representante \_\_\_\_\_

