



**UNIVERSIDAD  
ANDRÉS BELLO**

FACULTAD DE ODONTOLOGIA  
ASIGNATURA DE PATOLOGIA ORAL

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE EXTRACTOS  
DE *BUDDLEJA GLOBOSA* (MATICO) SOBRE EL  
CRECIMIENTO *IN VITRO* DE *CANDIDA ALBICANS*

Tesis para optar al grado de Magíster en Odontología con  
Especialización en Diagnóstico, Patología y Medicina Oral

Alumna: Rosa Cuevas Pareja

Tutor: MSc. Alejandra Fernández

Tutores asociado: Dr. Lorgio Eduardo Aguilera Jopia

MSc. Claudia Elizabeth Barraza Zepeda

Profesor: Alex Patricio Cea Villablanca

VIÑA DEL MAR- CHILE

ABRIL 2019



## INDICE

<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
<b>Figura 1: Ilustración de <i>Buddleja Globosa</i> .....</b>	<b>4</b>
<b>MARCO TEORICO.....</b>	<b>5</b>
<b>HIPOTESIS.....</b>	<b>18</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>19</b>
<b>OBJETIVO ESPECIFICOS.....</b>	<b>19</b>
<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>19</b>
<b>ETAPA PRECLINICA.....</b>	<b>20</b>
<b>FIGURA 2: Obtencion Extractos acuoso de matico.....</b>	<b>21</b>
<b>FIGURA 3: Obtencion Extractos Metanolico de matico.....</b>	<b>22</b>
<b>ETAPA CLINICA.....</b>	<b>24</b>
<b>ETAPA LABORATORIOS.....</b>	<b>25</b>
<b>FIGURA 4: Flujograma de antibiograma.....</b>	<b>27</b>
<b>TABLA 1: CUADRO DE VARIABLES.....</b>	<b>28</b>
<b>CONSIDERACIONES ETICAS.....</b>	<b>29</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
<b>FIGURA 5. Grafica de Distribución de levaduras del genero <i>Candida</i> según el sitio de aislamiento en agar Chomoagar <i>Candida</i>.....</b>	<b>30</b>
<b>FIGURA 6.- Variación de la tonalidad de color que presentan los aislados clínicos en Chomoagar <i>Candida</i>.....</b>	<b>31</b>
<b>FIGURA 7. Respuesta metabólica para diferenciar <i>C. albicans</i> de <i>C. dubliniensis</i> en</b>	

caldo hipertónico.....	32
<b>FIGURA 8.</b> Estructura básica de Clamidoconidios en muestra de cultivo en suero liofilizado.....	33
<b>FIGURA 9:</b> Diámetros de los halos de inhibición de aislados clínicos de <i>Candida</i> para los extractos acuoso.....	34
<b>FIGURA 10.</b> Grafica del Diametro de Inhibición en mm en relación a Extractos acuosos metanolico butanolico y fenolico con el control de Nistatina.....	35
<b>FIGURA 11.</b> Grafica del Diametro de Inhibición en mm en relación a los aislados clínicos obtenidos de mucosa y placa.....	35
<b>TABLA 2.</b> Diametro del halo de inhibición en mm en relación al efecto combinado de nistatina más extracto butanolico.....	36
<b>TABLA 3.</b> Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) del extracto Butanolico de matico frente a <i>Candida albicans</i> y <i>Candida dubliniensis</i> .....	37
<b>DISCUSION</b> .....	38
<b>CONCLUSIONES</b> .....	44
<b>SUGERENCIAS</b> .....	45
<b>RESUMEN</b> .....	46
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	47
<b>CONSENTIMIENTO INFORMADO</b> .....	53
<b>AUTORIZACION COMITÉ DE ETICA</b> .....	56
<b>ANALISIS DE VARIANZA</b> .....	57
<b>MATRIZ DE VARIANZA RESUMEN</b> .....	60

**TEST DE FISHER.....61**

**TABLA 4.Puntos de corte Candida según especie. Chile, 2015-2016...62**

## INTRODUCCIÓN

*Candida albicans* es una levadura comensal que puede estar presente en la cavidad oral de individuos sanos en un porcentaje que varía desde un 2 % a un 69,1% de la población dependiendo de la zona geográfica y las técnicas usadas para su detección. Sin embargo, bajo ciertas condiciones puede actuar como un patógeno oportunista generando Candidiasis que representa la forma más prevalente de infección micótica superficial, con predilección en mucosa oral y genital (1), (2), (3), (4), (5.)

En las últimas décadas se ha registrado un incremento en el número de casos de candidiasis y además en sus complicaciones, no solo en pacientes inmunosuprimidos sino también, en pacientes con desregulaciones locales de su homeostasis. Se suma a esto que en los últimos años los casos de resistencia de *Candida albicans*, en particular a los derivados triazolónicos, están siendo cada vez mayores con la concomitante complicación de los tratamientos (6),(7),(8),(9). Otro factor a considerar son los casos de reacciones de hipersensibilidad a algunos productos y la carencia en el mercado de fármacos específicos para uso intraoral, incluido en ello los antifúngicos, debiendo recurrir la mayoría de las veces a preparados de uso dérmico u oftalmológico, que no son aptos ni por sabor ni por adherencia, a las mucosas orales.

Es de conocimiento general que desde tiempos remotos, el ser humano ha buscado en la fitoterapia la curación a las enfermedades o, de modo contrario, el provocar daño a otros o incluso la muerte. (10), (11).

A pesar de esa larga y variada historia de usos, aún existen innumerables extractos herbáceos de los cuales desconocemos totalmente sus potenciales beneficios terapéuticos. Estas propiedades incluyen efectos de tipo antibacteriano, antifúngicos antiinflamatorios, analgésicos, antioxidantes, antihipertensivos y/o antineoplásicos entre muchos otros (12), (13), (14),(15),(25),(26).

Los principios activos herbales proporcionan una fuente importante de posibilidades ya que están equilibrados naturalmente, conteniendo sustancias complementarias que se potencian entre sí generando mejores propiedades terapéuticas. Esto permite su uso sin grandes efectos citotóxicos ni contraindicaciones lo que es una gran ventaja respecto al uso de la farmacología alópata (16),(17).

Hoy en día, por tanto, es necesario generar mayores alternativas en terapias naturales o en formas complementarias a los tratamientos convencionales y eventualmente proporcionar medicamentos de prevención que sean de fácil aplicación con mínimos efectos adversos indeseados (15). Concomitante a esto, la incorporación de biomoléculas bioactivas a materiales que estén en contacto con nuestras mucosas, tales como los materiales usados para la confección de prótesis dentales, enjuagues

bucales o dentífricos, pueden constituir un mejoramiento de los mismos a escalas prometedoras.

El género *Buddleja* cuenta con más de 100 especies distribuidas por todo el planeta, siendo la especie *B. globosa* común en Perú, Argentina y Chile. *Buddleja globosa* Hope o matico llamada también Pañil por los pueblos originarios, es un arbusto o en ocasiones un árbol, que ha sido usado latamente como potente cicatrizante y antiinflamatorio desde tiempos pre hispánicos (20) (21). Hoy la etnofarmacología lo reconoce como medicamento herbario en la legislación sanitaria chilena (18) (19).

Numerosos son los productos de matico expedidos en el comercio ya sea en forma de cremas cicatrizantes, ungüentos, polvos, y algunos en mezclas con otras plantas de acción similar. Las dosis de citotoxicidad demostradas están en el orden de 50 µg/mL a 100 µg/mL en estudios *in vitro*, no existiendo datos a la fecha de resultados *in vivo*. (17). No obstante, no ha sido probada la actividad antifúngica de sus hojas. (16) (22) (23).

Dado lo anterior, respecto al incremento de Candidiasis y sus factores predisponentes, a la falta de fármacos para uso oral y a la progresiva resistencia a los derivados azólicos, se pretende evaluar la acción antifúngica *in vitro* de la planta *Buddleja globosa* (matico), en el crecimiento de aislados de *Candida* extraídas de pacientes portadores de prótesis acrílica, en búsqueda de alternativas terapéuticas naturales.



El presente trabajo es parte de una línea de investigación, orientada a la extracción de moléculas herbales, algales y minerales con actividad bactericida y fungicida.



**Figura 1** .Matico (*Buddleja globosa*) del libro "Plantas de los bosques de Chile" Ilustración realizada por Gülnur Ekş

## MARCO TEORICO

### I.- *Candida* y Candidiasis, consideraciones generales.

*Candida* es un microorganismo oportunista clasificado dentro del grupo de levaduras, de los cuales se han identificado más de 150 especies. En los seres humanos es parte de la microbiota comensal de la piel, tracto gastrointestinal y genitourinario, entre otras (1), (2), (3), (4). Esta especie de levaduras es la más encontrada en la cavidad oral presentándose en el 80 % de individuos sanos, incluso aumenta su prevalencia en niños, adultos jóvenes y pacientes hospitalizados (3),(5).

Se caracteriza por ser un hongo dimórfico, es decir que puede presentarse en la fase blastoconidial, cuando es inocua o como pseudohifas en la fase donde puede invadir al huésped. A la citología se observa globosa u ovoide o levemente alargada, de 3 a 5  $\mu\text{m}$  x 6 a 12 $\mu\text{m}$ ; en cultivo de agar Sabouraud forma colonias blancas, lisas y de aspecto cremoso que crecen entre las 24 y 48 hrs. a 37° C. Su olor es dulzón y varía con el tiempo de incubación. De las infecciones causadas por *Candida*, llamadas Candidiasis, la provocada por la *Candida albicans* es la más virulenta y la más frecuente. (8)(24)

Del grupo de *Candidas spp no -albicans*, la *C. tropicalis* y *C. glabrata*, son las más comunes. Otras especies como *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. famata*, *C.*

*guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. pseudotropicalis* y *C. stellatoidea*, poseen una similitud genética con *C. albicans*, especialmente *C. stellatoidea*, siendo clasificada incluso como una variante sacarosa negativa de la primera, para poder diferenciarlas. Las pruebas de diferenciación de *Candida albicans* de otras especies se basan en la presencia de tubo germinativo después de ser incubadas en suero por 90 min a 37 ° C. El uso del medio selectivo *CHROMagar Candida* es un medio eficaz para su identificación. (2)(8)

De todas las especies de *Candida* solo algunas pueden llegar a ser patógenas y se ha reportado un aumento en su proporción en aquellos pacientes con cuadros recurrentes de candidiasis (Crist *et al.*, 1996; Williams & Lewis, 2011; Samaranayake, 1990).

La candidiasis oral y perioral es sin duda la más frecuente de las micosis de tipo superficial que afectan al hombre. Es más prevalente en los extremos de la vida, vale decir niños pequeños y ancianos, o asociado a inmunodeficiencias, presentándose en un 5% a 7 % de los niños recién nacidos. Su prevalencia en pacientes con SIDA es estimada entre un 9 % a 31% y en un 20% en pacientes con terapias oncológicas (1).

Clínicamente la Candidiasis puede manifestarse como lesiones blancas, rojas, o mezclas de áreas rojas y blancas a la vez. Según esto, los tipos clínicos que se reconocen, según su morfología, son: de predominio blanco la llamada candidiasis pseudomembranosa y la candidiasis hiperplásica crónica. Por otra parte en las de predominio eritematoso tenemos la variante atrófica de las candidiasis. (2),(4).

Según la clasificación de Bagan *et al*, respecto a su curso, la candidiasis puede presentar de forma aguda o crónica, siendo la pseudomembranosa de tipo agudo y la

atrófica de doble presentación, aguda o crónica . La primera manifiesta una placa blanca desprendible al raspado que puede afectar porciones de la lengua, mejillas, paladar o incluso faringe. Las comisuras es otro lugar frecuente de presentación, siendo esta llamada Queilitis angular , y asociada a pacientes inmunodeprimidos o con pérdida de la dimensión vertical como es el caso de adultos mayores desdentados. (1),(2).

Por otro lado, la variedad atrófica se puede presentar a nivel de la mucosa lingual, la cual se observa depapilada, lisa y enrojecida, llegando a producir inclusive una hiperplasia local lo que se denomina Glositis romboidal media. En aquellos pacientes portadores de prótesis, es frecuente que la variedad atrófica crónica se presente en la mucosa de soporte del aparato.

Su diagnóstico diferencial es habitualmente con los llamados Desórdenes potencialmente malignos de la mucosa bucal y/o con lesiones liquenoides, o de hipersensibilidad tipo IV. Respecto a las de predominio rojo, habitualmente son erosivas y presentan ardor como síntomas característicos.

En estos casos el diagnóstico diferencial debe hacerse con lesiones atróficas metabólicas, como Síndromes de mala absorción o anemias por déficit de Vit B.

Muchas condiciones alteran la homeostasis de la cavidad oral tanto a nivel local como sistémico. En la patogenia de la candidiasis se deben considerar a modo general, los siguientes factores determinantes: el medio bucal, el estado inmunológico del huésped y su interacción con la cepa, y las propiedades de virulencia de *Candida*.(2),(4),(5).

Entre los factores locales, los más relevantes son la cantidad y calidad de la saliva, (por sus propiedades físicas en relación a viscosidad, efecto tampón y arrastre mecánico y

propiedades bioquímicas,(por sus componentes enzimáticos,) y el uso de aparatos protésicos (2),(4),(5).

A nivel sistémico está fuertemente asociados a la pérdida de la hemostasia, el consumo de antibióticos, los tratamientos con corticosteroides o inmunosupresores, y la terapia oncológica (1) ,(2),(4),(5).

Los hábitos del huésped, como el tabaquismo o la higiene, la composición de la dieta, el uso de prótesis removibles, el dormir o no con prótesis, la anatomía topográfica de las mucosas, que puede favorecer aún más la retención y adhesión, entre otros parámetros, conforman un ecosistema multifactorial complejo, de fácil alteración. (1),(3).

Por otra parte, a nivel poblacional el aumento de la sobrevida de las personas en todo el planeta, se acompaña frecuentemente con mayor pérdida de dientes, lo que conduce al incremento del número de pacientes portadores de prótesis parciales o totales, que corresponde a uno de los factores locales más asociados a la presencia de Candidiasis (12). Según un estudio realizado por Bianchi *et al.*, (2015), del 62,2% los pacientes portadores de prótesis se aislaron cepas de *Candida albicans*, mientras en del grupo que no utilizaba prótesis solo se aisló un 37,8 5% (13),(10). La presencia de Candida es mucho mayor en el acrílico de la prótesis que en la mucosa y en los pacientes que dormían con su prótesis comparados con los que se la sacaban (2),(25),(26).

A este fenómeno se suma que un 80% de los medicamentos más prescritos hoy en día producen reducción del flujo salival o sensación de boca seca. El incremento en el uso de antihipertensivos y antidepresivos tricíclicos indicados para el tratamiento de dos patologías crónicas de prevalencia mundial, como son la Hipertensión arterial y la Depresión, están fuertemente asociados a xerostomía y/o hiposialia. Dicha condición favorece la instalación de Candidiasis, mayoritariamente de tipo atrófico crónico (27).

La interacción del huésped con la microbiota autóctona depende de sus condiciones inmunológicas, sin embargo, es determinante la interacción de las especies de *Candida* entre sí, con la potenciación o la inhibición de una cepa con otra (2). Si se produce un desequilibrio entre la microbiota tipo *albicans* y las especies *no albicans* se incrementa la virulencia de forma proporcional (8). A pesar de aquello, *Candida albicans* sigue siendo la más abundante y la responsable en un 50% a un 90 % de las infecciones fúngicas localizadas.(2),(5).

La virulencia de la *C. albicans* y *las no albicans* está determinada por varios factores. De estos destacan los enzimáticos con la producción de fosfolipasas (liberadas en mayor cantidad en estado de hifa) y proteinasas extracelulares que pueden actuar sobre las proteínas salivales incluyendo a la Ig A, el colágeno e incluso la queratina a nivel epitelial (2) (8). Su acción es más eficaz en un ambiente de pH bajo y se ha visto un aumento en la proteasa ácida (aspartilproteinasas) en pacientes con SIDA lo que favorecería su colonización y diseminación en estos pacientes.

Otro hecho relevante asociado a la patogenicidad y la poca efectividad de los tratamientos es su adherencia y capacidad para formar biopelículas con otras especies, lo que condiciona su permanencia y aumenta la capacidad de resistencia (28). Aunque al inicio es una adherencia inespecífica, como la que experimenta hacia las resinas acrílicas y otros biomateriales, luego se hace más firme debido a cambios que se generan tanto en la superficie del huésped como en la de la *Candida*, reflejada en expresión de receptores o uniones bivalentes. La pared celular, compuesta en un 90% de polisacáridos, es otro de los factores importantes de virulencia del hongo. Le determina sus diversas morfologías, le permite protegerse de la lisis osmótica, le otorga antigenicidad y las variadas interacciones con el exterior mediante los receptores de superficie (29). Los cambios fenotípicos de la levadura le otorgan una mayor capacidad adaptativa en ambientes adversos lo que también se refleja en una mayor resistencia a la fagocitosis y a la acción farmacológica.

Esto fenómenos se han observado tanto a nivel oral, gastrointestinal, urinario y respiratorio lo que refleja la transversalidad de sus territorios y la gran capacidad adaptativa de las levaduras (6) (7) (8).

## **II.- Farmacología antifúngica y Resistencia:**

En relación a los tratamientos farmacológicos de la Candidiasis oral, estos son de preferencia de aplicación tópica, en base a cremas o gel. Sin duda las presentaciones

en el mercado son escasas y destaca la falta de vehículos con adhesión a mucosas, el alto costo de los pocos que existen, su mal sabor, su largo tiempo de administración y la toxicidad de algunas presentaciones (4)(26).

Los más comúnmente empleados en clínica son los derivados azólicos para tratamientos tópicos (miconazol, cotrimazol), y los derivados polienicos donde se encuentra la nistatina y la anfotericina B, esta última solo para uso endovenoso. (4)

Como ya se mencionó, la primera opción de tratamiento para los cuadros locales es la forma tópica y solo se usa sistémico cuando la lesión persiste y/o se hace refractario al tratamiento (2), (4)

Unos de los mecanismos de acción de los antifúngicos van dirigidos específicamente contra los ergosteroles que predominan en las membranas fúngicas y son responsables de su impermeabilidad y su fluidez. Esto ocurre con la familia de los polienicos y azoles.

Debido a inhibiciones enzimáticas, se acumulan metilesteroles, que afecta los grupos acilos de los fosfolípidos de la membrana plasmática alterando su permeabilidad. Esto permite por un lado la salida de componentes citoplasmáticos al exterior, lo que causa la muerte de la levadura, y por otro lado inhibe la formación de células hijas ya que esto requiere de una plasticidad que la membrana ha perdido. Esto último le otorga el carácter fungistático del fármaco (29).

Cabe destacar que el ergosterol se encuentra en las membranas de todas las células eucariontes por lo que eventualmente estos fármacos pueden interactuar con cualquiera



de estas, en forma inespecífica, produciendo efectos de alta toxicidad como es el caso de la Anfotericina B. Esta además es nefrotóxica, causa cuadros febriles, irritación gastrointestinal y daños renales (azotemia) (29).

El suministro de los polienoles no carece de dificultad. Su estructura lipídica y afinidad por los lípidos dificulta mucho su administración ya que se debe administrar solo en emulsiones, insolubles al agua.

Los últimos estudios realizados para comprender a nivel molecular los mecanismos de resistencia, han relacionado mutaciones en genes transportadores de fármacos especialmente en la familia de los azoles, aunque se ha determinado actividad cruzada con otros derivados (7). La diana principal de los antifúngicos es el citocromo P450 (Erg11p) implicado en la desmetilación de la molécula de lanosterol que permite la biosíntesis de ergosterol de la membrana celular. Los azoles actúan inhibiendo la actividad de Erg11p lo que conduce al agotamiento del ergosterol y a la acumulación de esteroides 14 $\alpha$ -metilados (lanosterol y 14 $\alpha$ -metil-3-6-diol). El aumentar el contenido de la enzima diana ya sea por amplificación génica o por regulación positiva del gen correspondiente, es uno de los mecanismos de protección de las levaduras a la acción de los azoles. Otro de los mecanismos que se han estudiado dice relación con la regulación positiva de dos genes asociados a sistemas de eflujo en sus membranas plasmáticas, el gen transportador ABC y un gen transportador de múltiples fármacos denominado CaMDR1 (para resistencia a múltiples fármacos de *C. albicans*). Esto

permite la eliminación más rápida de los fármacos lo que impide se logre la concentración intracelular adecuada (7).

Dado el aumento de estas mutaciones, muchos casos se han vuelto más difíciles de tratar, debiendo adoptar conductas tales como alargar el tiempo de exposición o subir la concentración de las dosis antifúngicas, lo que conlleva a aumentar los costos y a amplificar los efectos secundarios indeseados.

### **III.- Fitoterapias**

Es por tanto necesario el disponer de otras terapias como alternativa o mejor aún como complementarias, de similar eficacia, segura y con mínimas contraindicaciones como son los extractos herbáceos o algares entre otros(30) ,(31),(32). En un extenso estudio de base de datos sobre la acción de extractos vegetales sobre crecimiento de *Candida* desde el año 2005 al 2013 se encontraron 8 familias y 208 especies vegetales con acción sobre *Candida sp* (30). De estas especies, muchas crecen ampliamente en nuestro país.

Respecto a los mecanismos de acción antifúngica, la acción antiadherente de algunos compuestos es otro modo de acción de los extractos evitando la instalación del microorganismo en la mucosa, como es el caso de la *Púnica granatum*, que pese a no tener efecto fungicida ni fungistática, puede inhibir el crecimiento (25).

La gran diversidad de especies nativas y endémicas con las que cuenta Chile, ha generados numerosos trabajos dirigidos a caracterizar especies de uso medicinal, lo que tiene amplias implicancias tanto para la creación de terapias alternativas, complementarias y/o sinérgicas junto con poderosas razones de tipo preventivo (16) (17).

Es sabido incluso a nivel popular que las propiedades de las plantas varían además en las diversas estaciones del año, según la variabilidad de precipitaciones o de riego, si son hojas senescentes o jóvenes, que zona de la planta se usa, si es un ejemplar nativo o de vivero, el modo de almacenaje y la edad del ejemplar. Todo ello influye en la concentración de estos principios bioactivos (12) (17) (20)(33)

La fitoterapia se formula usualmente a partir de materias primas que contienen una amplia gama de sustancias que pueden variar ampliamente en su farmacocinética y sus efectos toxicológicos.

Debido a que los productos bioactivos interactúan entre sí de modo sinérgico o aboliendo o reduciendo las propiedades de cada uno por separado, es requisito una proporción óptima de los mismos. (16) (17)

Por lo tanto, se requiere estandarizar los protocolos de reproducción de la planta y la recolección y procesamiento de las muestras (33) (34), lo que hoy se conoce como la trazabilidad de los procesos (11). Esto permitirá la conversión de una planta medicinal

en un fitofármaco, qué debe tener una dosificación precisa y producir resultados estandarizados sobre todo si se trata de sustancias de alta actividad.

La mayoría se usa como concentrado asociado a un solvente extractor que debe ser estable, selectivo y de baja toxicidad lo que facilita su administración. Dicho concentrado está conformado por un gran número de compuestos de distinta naturaleza química. Esto se conoce como matriz vegetal compleja (34).

Los extractos más comunes utilizados son el agua y los compuesto hidroxílicos (etanol y propilen glicol). Una infusión acuosa en caliente a 40° C por 24 h con agitación, es capaz de preservar las moléculas antimicrobianas que a mayor temperatura se destruirían. Dentro de los hidroxilicos, el etanol al 95%, por 4 horas a 4° C, es uno de los más utilizados. Se debe considerar el vehículo de transporte del extracto en el uso humano e intraoral. Este debe ser totalmente biocompatible e hidrófilo, por lo que se privilegia el uso de compuestos adhesivos e inocuos como propyl celulosa (16), (17), (32).

Si nos enfocamos en nuestro país, recién el 2002 el Ministerio de Salud promulgo en el Reglamento del Sistema Nacional de Control de Productos Farmacéuticos las categorías de fitofármaco y de medicamento herbario tradicional (18) (35). De las 460 especies de plantas medicinales existentes, solo 130 tenían algún estudio que

respaldara su libre uso y se han ido incorporado desde entonces, dentro de los medicamentos autorizados para entregar a los usuarios. Entre estas últimas se encuentra la *Buddleja globosa* Hope, con estudios clínicos en curso actualmente (17), sin embargo la mayoría no tienen una fundamentación clínica para su uso (Dr. Sandro Bustamante, Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile).

La *B. globosa* o conocida popularmente como matico o pañil es un arbusto nativo de Chile, Bolivia, Perú y Argentina cuyas propiedades medicinales han sido extensamente estudiadas (12) (13) (17) (18) (20) (35) (36). Se caracteriza por sus hojas lanceoladas de color verde pardo, con inflorescencias globosas de color amarillo entre los meses de noviembre y enero (ver Figura 1). Como se mencionó anteriormente, en Chile está reconocido oficialmente como medicamento herbario tradicional por el Ministerio de Salud desde el año 2007. Son varios los estudios *in vitro* e *in vivo* sobre sus características cicatrizantes, analgésicas, anti inflamatorias, gastroprotectoras, antioxidante, antibacterianas y fungicidas, entre otras. (13),(16),(17),(20),(22),(34), (36),(37). Una de las últimas propiedades en ser detectadas es su efecto de inhibición de la agregación plaquetaria por lo que serviría para disminuir el riesgo de accidente vascular (44).

El matico presenta varios principios activos dependiendo de la zona de la planta que se analice, hojas, tallos, raíces o cortezas, y entre esos se han identificado heterósidosfeniletanoides, fenólicos (flavonoides) y terpenoides (como las saponinas)

como sus principales compuestos químicos. Estos son productos secundarios de la fotosíntesis y son la protección natural de la planta ante patógenos y rayos UV.

Cada fracción constituyente de la planta tiene acciones más bien específicas hacia cierta acción farmacológica. Estudios cromatograficos han permitido aislar flavonoides glicosídicos (Marín *et al.*, 1979), feniletanoides (Pardo *et al.*, 1993), iridooides (Houghton & Hikino, 1989), triterpenoides (López *et al.*, 1979), y sesquiterpenoide (21),(38). Las hojas tienen un alto contenido de polifenoles, compuestos con reconocidos efectos antioxidantes relacionados con la inhibición de la lipoperoxidación (23).

La porción rica en flavonoides tendría la propiedad de inhibir la enzima COX y de estimular el proceso de NADPH-oxidasas para la modulación de especies reactivas de oxígeno. Fuera del efecto antioxidante también se han encontrado características antineoplásicas. (17)

Por otro lado polifenoles, terpenos y esteroides estimularían la proliferación de fibroblastos, las catequinas serían las responsables de inducir el proceso de epitelización mediada por queratinocitos y, la fracción de polifenoles, estimularía la remodelación fibroblástica. Los terpenos están presentes en muchas plantas son los responsables del aroma y algunos poseen propiedades antibacterianas, por lo que están siendo estudiados en varias especies. Los terpenoides son terpenos modificados químicamente por oxidación. Pardo *et al.*, (1993) descubrieron que la porción verbascósido de las hojas tenía actividad antimicrobiana. Con los extractos alcohólicos

se lograron aislar, en forma más abundante, los compuestos verbascósido (feniletanoide) y el 7-Oglucósido de luteolina (flavona), seguido por otros dos denominados MAT-3 y MAT-5. La buddledina A y buddledina B son dos compuestos terpenoides obtenidos de extractos lipofílicos de la corteza de tallos de *B. globosa* que presentan actividad antifúngica contra dermatofitos incluso comparable con el miconazol, en concentraciones de 12 µg/mL (16),(17),(21). En relación a las propiedades antifúngicas de las hojas de matico, no se encontró ninguna información de estudios al respecto.

Por tanto conocer las propiedades, las moléculas secundarias activas, con una estricta evaluación farmacológica y resultados clínicos de tratamiento reproducibles es parte de los protocolos para el proceso de transformar una planta medicinal a un fitofármaco,. Solo así se autoriza el uso masivo.

## FORMULACIÓN DE HIPOTESIS

**Hipótesis Nula:** la utilización de extractos de *Buddleja globosa* sobre colonias de *Candida albicans* no afecta su crecimiento

**Hipótesis Alternativa:** la utilización de extractos de *Buddleja globosa* sobre colonias de *Candida albicans* afecta su crecimiento

## OBJETIVO PRINCIPAL:

1.- Evaluar el efecto de extractos de *Buddleja globosa* (matico) sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans* obtenidas en pacientes portadores de prótesis acrílica.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Evaluar la acción inhibitoria de extractos acuosos, metanólicos, butanólicos y fenólicos obtenidos de hojas de matico, sobre aislados clínicos de *Candida albicans*.
2. Evaluar la acción inhibitoria de extractos combinados con Nistatina sobre aislados clínicos de *Candida albicans*.
3. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima fungicida (CMF) de los extractos con mayor capacidad inhibitoria sobre el crecimiento de *Candida albicans*

## MATERIALES Y METODOS

### DISEÑO DE ESTUDIO

**-Selección de la población:** la selección de la muestra correspondió a los pacientes que cumplieran con los criterios de inclusión , atendidos entre el periodo de abril a junio 2017, en la Clínica Odontológica Docente asistencial de la Universidad de La Serena . La determinación de este tamaño muestral no obedece a aspectos estadísticos , si no que más bien a aspectos logísticos y responde a la condición de estudio epidemiológico de carácter piloto.

**-Criterios de exclusión e inclusión:**

Criterios de Inclusión:



-Pacientes portadores de prótesis acrílicas removibles parciales o totales por al menos 2 años.

-Presencia de sintomatología y/o signología de Candidiasis subprotésica.

Criterios de exclusión: estomatitis subprotésica de otro origen.

### **-PROCEDIMIENTOS:**

Preparación de extractos

Extracción de las muestras de *Candida* desde pacientes portadores de prótesis

Antibiograma por difusión en disco y determinación de MIC y CMF.

Lectura de resultados

Análisis estadísticos

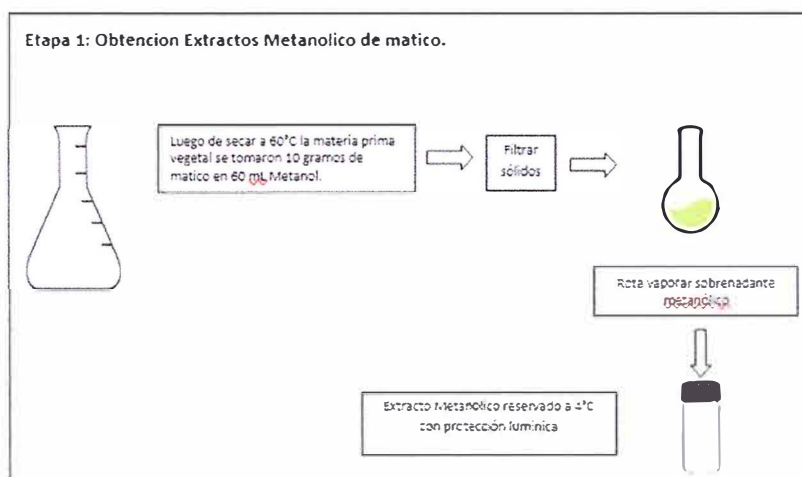
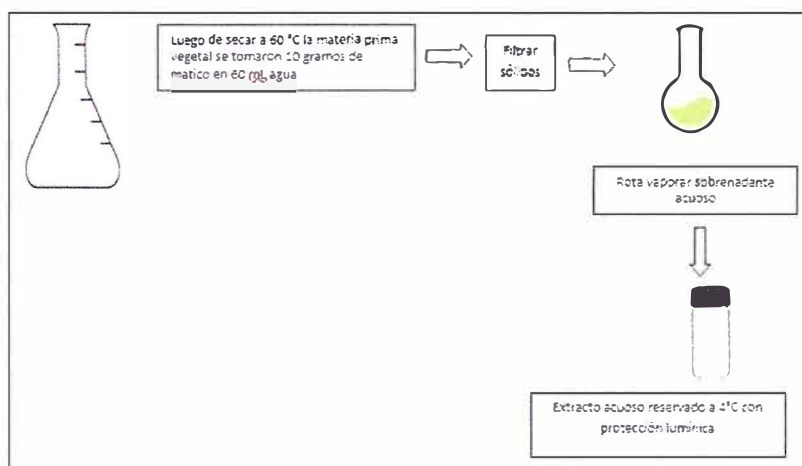
## **1° ETAPA PRE CLÍNICA**

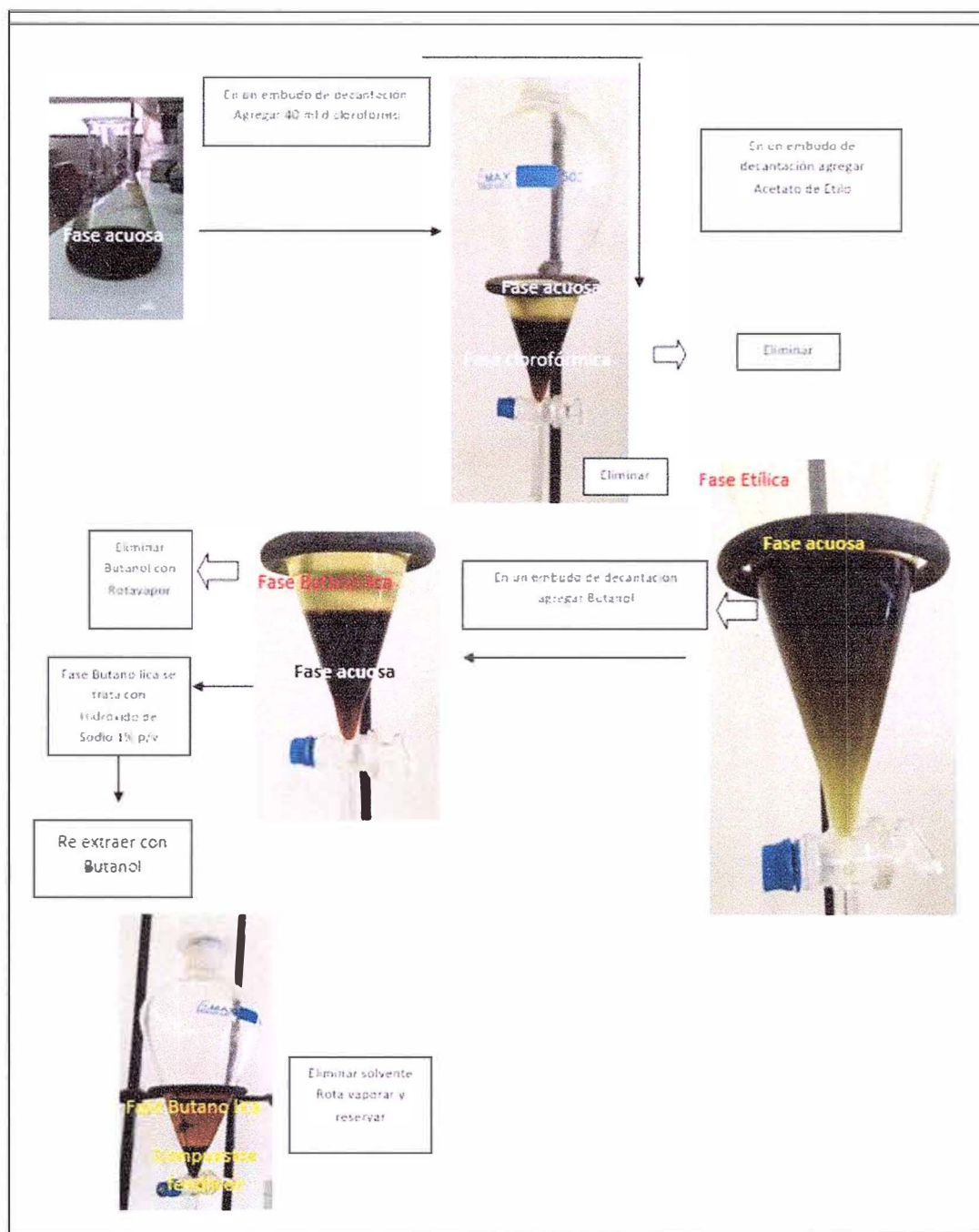
### **Preparación de los extractos**

1.- Se recolectaron de 100 g de hojas frescas y pedúnculo de hoja no lignificada, de 10 ejemplares de *Buddleja globosa* para obtener un 1 Kg de vegetal fresco. Se eligieron arbustos en su hábitat natural de los cuales se seleccionaron hojas sanas libres de envejecimiento o deterioro por plagas o propios del vegetal. La recolección se realizó en el Valle del Elqui, en un transecto de 10 Km entre las localidades de El Molle y Vicuña, Región de Coquimbo, durante el mes de abril del año 2017, que corresponde a la estación de entrada de otoño. Las muestras de matico fueron identificadas y confirmadas por expertos del Departamento de Biología y Ecología de Microorganismos de la Universidad de la Serena.

2.- El material obtenido se dividió en dos muestras de 500 g y se procedió a un secado en estufa a 60° C por 48 h a 72 h. Luego se calculó el peso seco de la biomasa vegetal que correspondió a un 30% del total. Por molienda mecánica se procedió a la trituración de las muestras de hojas secas hasta obtener un tamaño de particulado de menos de 2 mm de diámetro en promedio.

**Figura 2 . Metodología obtencion de extractos crudos de Matico: Etapa 1 Obtencion Extractos acuoso de matico**





**Figura 3.** Obtención del extracto semipurificado, fase acuosa, butanolica y compuestos fenolicos.

3.- Para obtención de extractos etanólicos y acuosos se dispusieron 10 g de hojas secas y molidas en cada uno de ocho frascos de 100 mL. Cuatro frascos fueron macerados con 60 mL de etanol 95° y las otras cuatro fueron maceradas con 60 mL de agua destilada. La maceración se realizó durante 72 h a 4°C agitando la mezcla regularmente para su homogenización. Posteriormente se filtraron en papel Whatman N° 1. Se repitió la misma maniobra para re extraer las muestras. Una vez filtrado por segunda vez, todo el sobrenadante acuoso y etanólico se pasó por un Rotavapor Buchii R-100 a 40° C al vacío. Para la obtención de extractos semipurificados se separó este extracto previo en una mezcla de metanol y agua, el cual posteriormente se filtró y centrifugó. El sobrenadante se rotavaporó para reducirlo a unas  $\frac{3}{4}$  partes del volumen inicial y se purificó por extracción líquido-líquido empleando solventes de polaridades crecientes (Ruiz 2003). Una vez recuperado el extracto crudo de cada solvente por separado, se guardaron en viales cubiertos con papel metálico. Estas soluciones de aspecto oleosos, se mantuvieron refrigeradas a 2 C ° hasta las prueba de sensibilidad por difusión.

Luego en un matraz Erlenmeyer de 100 mL se mezcló 10 g de matico, 60 ml de metanol-agua (6:4) a 25°, para maceración. A las 24 h se filtraron los residuos sólidos con gasa clínica. Posteriormente se trasladó a tubos Falcon para centrifugación obteniéndose un sobrenadante que se rotavaporó hasta  $\frac{3}{4}$  partes del volumen inicial

con reducción de presión. De este extracto se tomó una porción para purificarlo, mezclándolo en partes iguales con cloroformo para fraccionarlo mediante decantación se retira la fase clorofórmica y se reserva la fase hidrometanólica, la cual se vuelve a fraccionar con Acetato de Etilo. Luego se agregó a la fase acuosa, un volumen igual de Butanol, que luego de la precipitación queda en la parte superior del embudo y es la porción que tiene las saponinas. Esta se reservó y se rotavaporó quedando una fase butanólica seca que se re suspende y se reserva. Parte de esta fase butanólica seca fue tratada con Hidróxido de Na OH al 1% para extraer y reservar los compuestos fenólicos y luego a una re extracción de saponinas, mezclando nuevamente con Butanol en partes iguales. (Ver figura 2)

## **2° ETAPA: CLÍNICA**

1.- Obtención de cepas: Previamente se les explicó a los pacientes el objetivo del proyecto junto con la firma del consentimiento informado. Se aplicó la historia clínica junto al examen clínico completo. Se realizó una toma de muestras mediante citología exfoliativa por hisopado de la zona de mucosa subprotésica y de la cara interna del aparato protésico.

2.-Se procedió a recolección de las muestras en tubos con medio Stuart que fueron trasladados de manera rápida y bajo cadena de frío al laboratorio de Biología y Ecología

de Microorganismos de la Universidad de la Serena, donde se incubaron a 37°C para luego ser sembradas en agar diferencial para levaduras.

3.-Se procedió conjuntamente a la identificación de las cepas por tinción de Gram para asegurar la presencia de células levaduriformes y descartar microbiota bacteriana.

4.-Todos los pacientes fueron tratados de su condición, con rebasado de sus aparatos protésicos y derivados a las asignaturas clínicas de rehabilitación integral para la renovación de sus prótesis.

### **3° ETAPA LABORATORIO**

#### **1.-Aislamiento, tipificación y cultivo de aislados clínicos.**

En placas de Petri con agar *Sabouraud*, se inocularon por agotamiento 2 muestras de cada paciente, una extraída desde mucosa sub protésica y otra de la superficie interna de la prótesis, en total fueron 22 muestras.

Después de la incubación por 72 h se procedió a la confirmación de la identificación fenotípica de las colonias de *Candida albicans*, cuya morfología corresponde a colonias blancas en agar Sabouraud, mayores a 3 mm de diámetro, elevación convexa alta con bordes enteros a ondulados y aspecto de superficie granular. Posteriormente se realiza protocolo de identificación que incluye pruebas bioquímicas enzimáticas en CHROMagar Candida para el aislamiento y la identificación de *Candida albicans*, C.

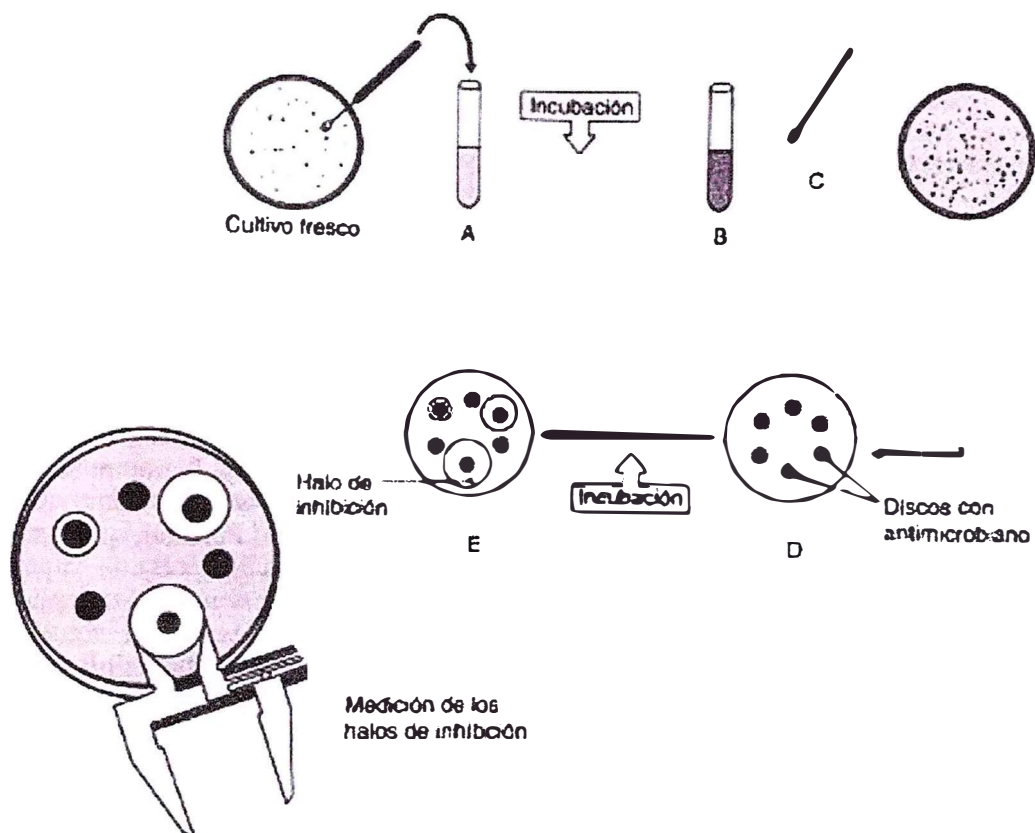
*tropicalis* y *C. kruzei* a partir de muestras clínicas, seguidas de pruebas de filamentación con observación de tubo germinativo y crecimiento en caldo hipertónico.

## **2.-Preparación del inóculo para antibiograma por difusión en disco**

En tubos eppendorf con 1 mL de suero fisiológico se procedió a la inoculación de las cepas de *Candida albicans*, identificadas en la etapa anterior, mediante tórula estéril hasta lograr una turbidez equivalente a 0,5 de la escala de Macfarlán lo que equivale a una concentración de  $1,5 \times 10^8$  UFC mL. De esta suspensión se obtuvo la muestra de 100  $\mu$ L para resembrar en placas de agar Sabouraud, mediante la técnica de siembra por diseminación en superficie.

## **3. Pruebas de sensibilidad mediante antibiograma por difusión en disco según Kirby-Bauer.**

Se sembraron los aislados clínicos por triplicado en agar Sabouraud por hisopado y previamente se prepararon los sensidiscos de 6 mm de diámetro previamente calibrados y esterilizados. Después de la siembra las placas se dejaron reposar por 10 min para su mejor impregnación luego se colocaron los discos manualmente con pinzas estériles asegurándonos que contacten perfectamente con la superficie del agar, por lo que debimos presionar ligeramente sobre la superficie del agar. Las placas fueron incubadas a 37 °C por un periodo de 72 h.



**Figura 4:** Flujograma de antibiograma: A: inóculo obtenido desde aislado de cultivos, B: turbidez equivalente a 0,5 de la escala de Macfarlán C: siembra por agotamiento D: colocación de sensibilizadores y carga de los extractos E: después de 72 hrs, F: medición de los halos.

#### 4.- Lectura de los resultados:

Luego de las 72 horas de incubación se realizó la lectura de los halos de inhibición con pie de metro digital. Se registró para tabulación. La interpretación de los resultados puede realizarse en función de las normas del NCCLS (Ver Tabla 4)



Según los resultados de los halos de inhibición se procedió a la selección del extracto con mejores resultados y de mayor efecto sobre el crecimiento de las levaduras y se realiza una segunda etapa donde se aplica a las 17 cepas, combinado con Nistatina. Además, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima fungicida y (CMF).

Para la tabulación y el análisis de los resultados se organizaron en tablas que permitan aplicar pruebas estadísticas descriptivas y analíticas. Se realizó prueba de ANOVA, de doble entrada, y para evaluar la significancia se aplicó un LSD de Fisher. Se utilizó el programa Infostat, versión 2017.

**Tabla 1:** Cuadro de variables

<b>NOMBRE</b>	<b>DEFINICION</b>	<b>MEDICION</b>
Origen aislado clínico	Muestra extraída desde la mucosa palatina del paciente.  Muestra extraída desde la superficie interna de la prótesis acrílica del paciente	Aislados  Clínicos (1 al 17)
Solvente	Agua destilada  Metanol  Butanol  Fenol	Acuoso: 1  Metanólico: 2  Butanólico: 3  Fenólico: 4

## **CONSIDERACIONES ÉTICAS**

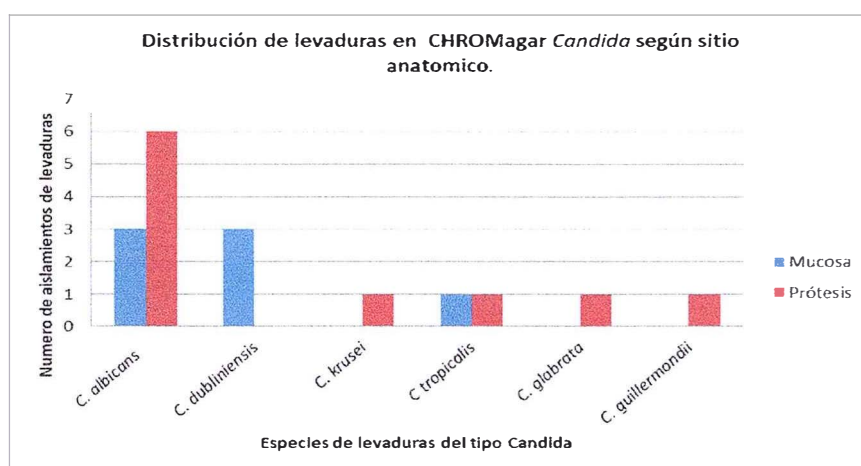
Cada paciente incorporado al estudio fue informado adecuadamente y con antelación sobre los objetivos del estudio, el procedimiento a seguir, la importancia que podría tener a futuro y los beneficios que podrá obtener al participar. Se le aplicó su ficha y examen clínico y se procedió a la toma de la Citología exfoliativa previa firma del Consentimiento informado adjunto al final del texto. Como parte del plan de tratamiento de estos pacientes se procedió a tratar la patología, hacer rebasado de sus prótesis e insertarlos en los programas de Prótesis de la carrera de Odontología de la Universidad de La Serena, con el fin de renovar sus aparatos protésicos. En su defecto fueron tratados en la clínica privada de la tesista. El Comité de Ética autorizó el estudio y el consentimiento informado con fecha 7 de Enero del 2018, según consta en certificado adjunto.

## **RESULTADOS**

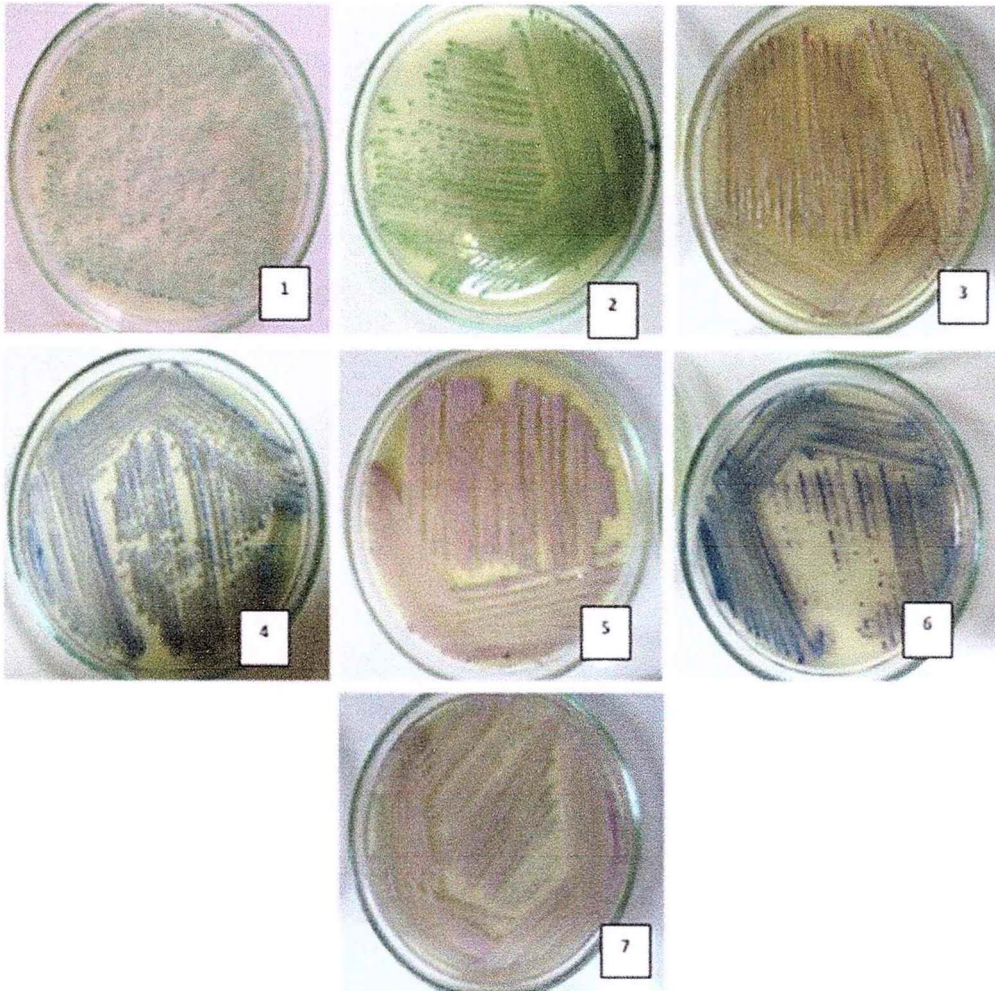
Se obtuvieron 24 muestras correspondientes a mucosa palatina y cara interna de prótesis acrílicas, a partir de 12 pacientes de los cuales 4 correspondieron a hombres (33%) y 8 mujeres (67%) cuyo promedio de edad fue de 68,2 años fluctuando entre 58 años y 85 años. De estas se seleccionaron 17, excluyéndose las otras por contaminación bacteriana.

## 1. Identificación y caracterización fenotípica de las levaduras CHROMagar *Candida*®

Del total de 17 cepas sembradas en CHROMagar *Candida*®, el 52,9 % de las cepas presentaron una coloración verde oscuro, correspondiente a *C. albicans* un 17,6 % verde claro correspondiente a sospecha de *Dublinskiensis*, un 11,8 % una coloración azul metálico, correspondiente a *Krusei* un 5,8 % una coloración rosada y un 5,8 % una coloración café claro (Fig 5). El detalle de la macroscopía colonial de observa en la figura 6.



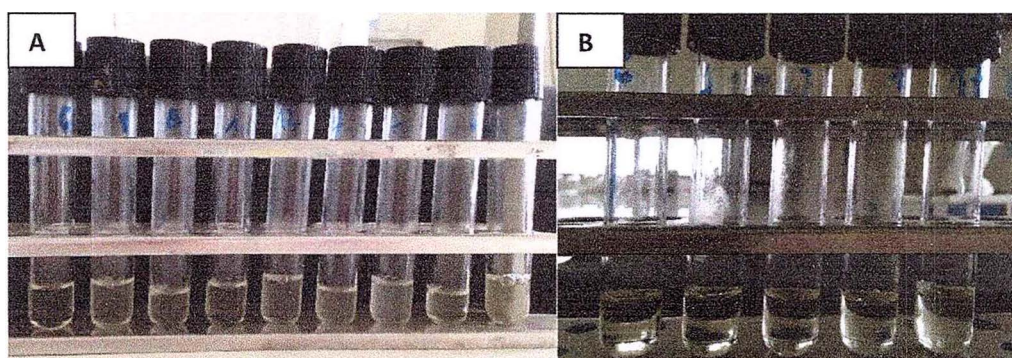
**Figura 5. Grafica de Distribución de levaduras del genero *Candida* según el sitio de aislamiento en agar Chomoagar *Candida*.**



**Figura 6.- Variación de la tonalidad de color que presentan los aislados clínicos en Chomoagar Candida.** 1. *Candida albicans*. 2. *Candida dubliniensis*: colonias verdes 3. *Candida Guillermondi*: colonias color café. 4 y 6. *Candida tropicalis*: colonias azules 5. *Candida krusei*: colonias color rosa superficie rugosa. 7. *Candida glabrata*: color rosa claro superficie lisa

## .2. Resultados de tipificación en Prueba de caldo hipertónico

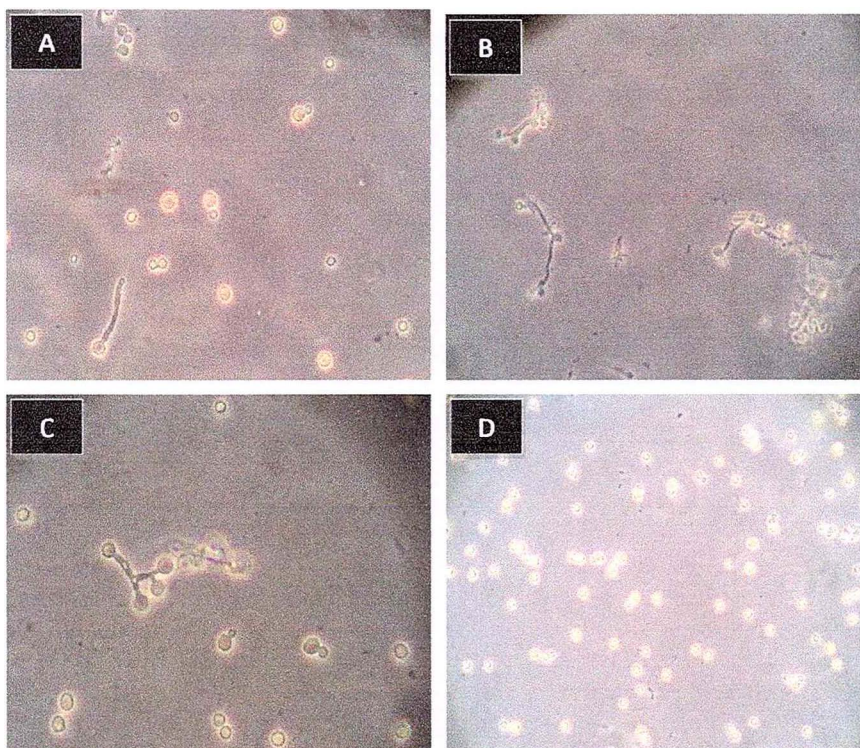
El objetivo de esta prueba es lograr la diferenciación entre *Candida albicans* que resiste el medio hipertónico y *Candida dubliniensis* que no puede crecer. Los resultados muestran después de 96 horas de incubación a 42 °C, de los 12 aislados, 3 son sospechosos de *C. dubliniensis*. Las comparaciones visuales de la prueba de caldo hipertónico se observa en la figura 3, donde se puede apreciar claramente la diferencia en el grado de turbidez del caldo, entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*. En base a estas diferencias fueron catalogadas como turbidez positiva, compatible con *Candida albicans*, o negativa compatible con *C. dubliniensis*.



**Figura 7. Respuesta metabólica para diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis* en caldo hipertónico.** La imagen A corresponde a las que presentaron turbidez en caldo hipertónico y la B corresponde a las que no presentaron turbidez. Se incluye el tubo control (C)

### Prueba de fermentación y formación de tubo germinativo

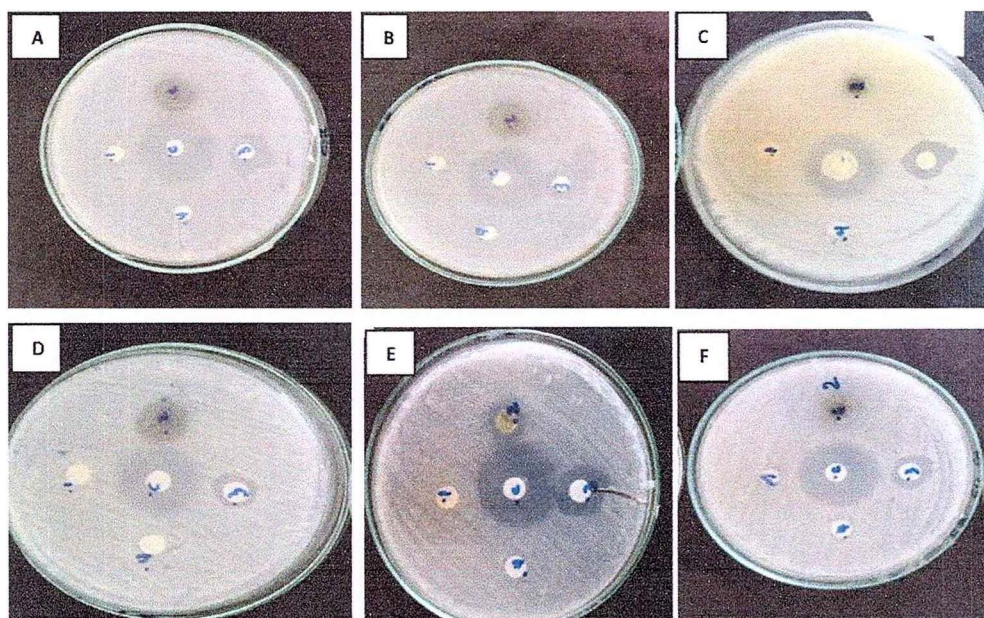
Analizadas las 17 cepas observamos que todas ellas presentaron clamidoconidios únicos y múltiples al ser sembradas en suero liofilizado de conejo. Estos resultados nos indicaron que logramos diferenciar las dos especies *C. albicans* y *C. dubliniensis* pues solamente las primeras desarrollan esta estructura de resistencia lo que permite diferenciarlas de otras especies de *Candida*. (Figura 8)



**Figura 8.** Estructura básica de Clamidoconidios en muestra de cultivo en suero liofilizado de conejo característico de *Candida albicans*, A, B y C: presencia y desarrollo de tubo germinativo. D: estado levaduriforme. La imagen de la muestra de cultivo correspondiente al aislado clínico número 4.

## 5. Determinación de efectos de los extractos sobre el crecimiento in vitro de los aislados clínicos.

Los resultados del antibiograma en 17 aislados clínicos mostraron efectos de inhibición del crecimiento en los extractos Metanólico y Butanólico, con un promedio de inhibición 9,4 mm de diámetro para el primero y un promedio de 11 mm de diámetro para el segundo. En cambio se mostró resistencia de las cepas a los extractos acuosos y fenólico los que mostraron colonias resistentes creciendo en la zona interna y adyacente a los sencidiscos. El Promedio para la Nistatina fue 20,4 mm. (Ver Fig 5 y grafico 2)



**Figura 9:** Diámetros de los halos de inhibición de aislados clínicos de *Candida* para los extractos acuoso (1) Metanólico, (2) Butanólico (3) fenólico (4) y (C) Nistatina. (C) A, B, D y, E: *Candida albicans*; C: *Candida tropicalis*; F: *Candida dubliniensis*.

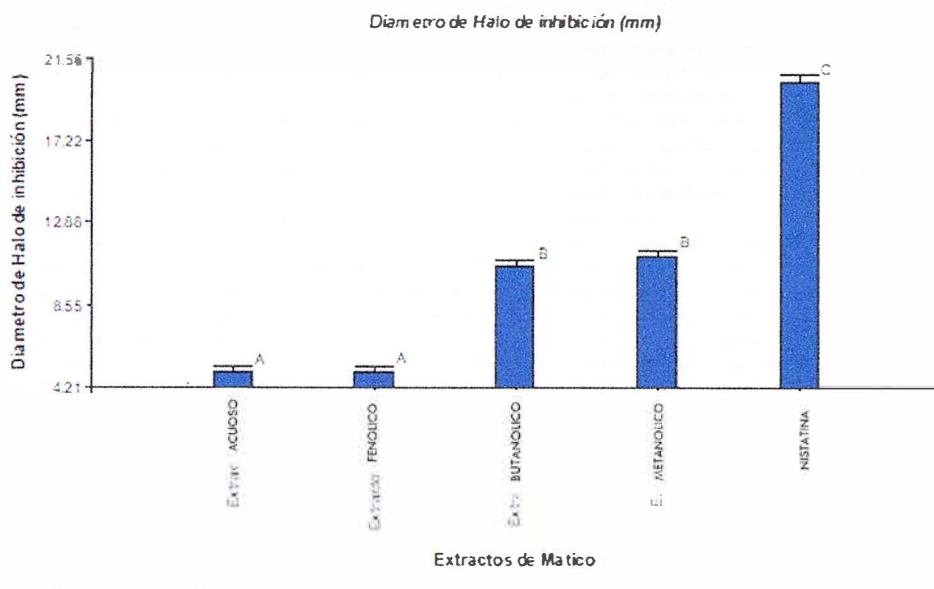


Figura 10. Grafica del Diametro de Inhibición en mm en relación a Extractos acuoso fenolico butanolico y metanolico con el control de Nistatina. Se muestra barra de error estandar.

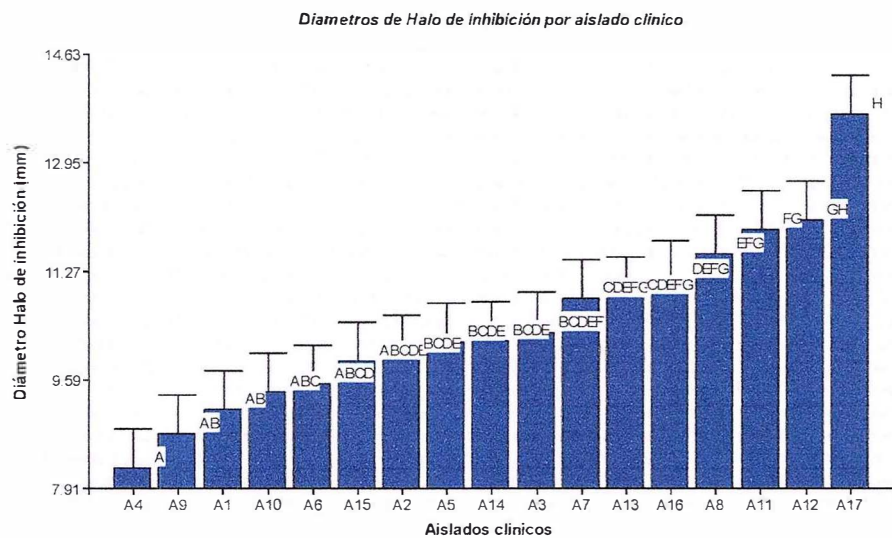


Figura 11. Grafica del Diametro de Inhibición en mm en relación a los aislados clínicos obtenidos de mucosa y placa. Se muestra barra de error estandar.



## 6. Evaluación del efecto antifúngico del combinado de Nistatina y extracto

### Butanolico.

En una segunda etapa se procedió a evaluar el efecto de Nistatina combinada con el extracto Butanolico, elegido por ser el de mejor resultado inhibitorio frente a los aislados clínicos.

Tabla 2. Diámetro del halo de inhibición en mm en relación al efecto combinado de nistatina más el extracto Butanolico.

<b>Aislado Clínico</b>	<b>Diámetro del Halo de Inhibición (mm) Nistatina Control 40 µgr/ml</b>	<b>Diámetro del Halo de Inhibición(mm)Nistatina combinada con extracto Butanolico.40 µgr/ml</b>
1	22	22
2	5	5
3	25	12
4	26	13
5	22	25
6	25	19
7	27	20
8	5	5
9	28	26
10	5	5
11	22	25
12	5	5
13	25	28
14	20	20
15	28	24
<b>Promedio</b>	<b>19</b>	<b>17</b>

## 7. Evaluación de Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) y Concentración Fungicida Mínima (CFB)

Se seleccionó el Extracto butanolico para evaluación de CIM y CMF por su efecto inhibitorio mayor que los demás extractos evaluados en esta investigación.

**Tabla 3 Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) del extracto Butanolico de matico frente a *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*.**

CIM µg/mL	Morfotipo de <i>Candida dubliniensis</i> aislada de mucosa	Morfotipo de <i>Candida albicans</i> aislada de Placa	Morfotipo de <i>Candida albicans</i> aislada de mucosa
500	-	-	-
250	-	-	-
125	+	-	-
62.5	+	-	-
31,3	+	-	-
15,6	+	-	-
7,8	+	+	-
3,9	+	+	-
1,9	+	+	-
0,98	+	+	-
Control	+	+	+

## DISCUSION

Al analizar los resultados encontramos que, al igual que en el resto de los estudios, existe una mayor prevalencia de la especie *albicans* (53%) por sobre las otras cepas de *Candida*, siendo esta el principal agente etiológico de la Estomatitis subprotésica, presente entre un 19% a 50,6% en pacientes portadores de prótesis. (10). En la prueba de crecimiento en caldo hipertónico 9 de los 12 aislados, es decir el 75% resultaron ser *Candida albicans*.

Aunque la patología más frecuente asociada a *albicans* son infecciones superficiales de mucosas, las candidemias y la diseminación a profundidad cada vez se hace más presente (1) (2) (4). Varios son los factores que inducen a la transformación micelar de este saprofito, pero dentro de los factores de virulencia más relevantes en esta patología, está la adhesión a diversas superficies por su capacidad para formar biofilm y su característica de ser hidrofóbico. Dentro de las superficies plásticas inertes, el acrílico que usamos en la confección de prótesis dentales es un medio fácil de colonizar por su alta porosidad y su textura rugosa, lo que dificulta su erradicación, actuando como un verdadero reservorio de la *Candida* (8), (25).

Es sabido que mundialmente se está produciendo un cambio de paradigmas en múltiples campos, lo que incluye el uso cada vez más masivo de la fitoterapia como una alternativa o complementariedad a las terapias tradicionales. Los riesgos de recurrencia de una infección, de resistencia a los fármacos convencionales, o de hipersensibilidad a los mismos, son cada vez más frecuentes y complejos de tratar. (14)(39)(40)(41)(42)

Múltiples son los estudios realizados en plantas que han demostrado actividad anti fúngica sobre *Candida albicans* de origen oral o genitourinario, entre ellas *Citrullus colocynthis*, de la India, *Piperangustifolium* o matico peruano, *Juglans regia*, *Eucaliptus globulus* y *Punica granatum*(26),(28),(30),(31),(32). Sin embargo no se ha encontrado información respecto al uso de matico chileno sobre *Candida albicans*, excepto una investigación del Dr. Julio Becerra de la Universidad del Biobío, Chile, del año 2008 de la cual no se pudieron recopilar antecedentes.

De los extractos obtenidos de *Buddleja globosa* específicamente el metanólico y butanólico, expresaron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de colonias siendo en el metanólico un promedio de inhibición de 10.63 mm, similar al Butanólico pero de mayor varianza (27,82) con respecto a su media. Esto debe analizarse en vista al origen de cada cepa y a los parámetros asociados a cada paciente, tales como el tiempo de uso de las prótesis, hábitos de mantención e higiene, estado de salud, niveles de secreción salival, fármacos, entre otros.

El extracto Butanólico muestra un similar promedio de halo de 11,17mm. pero presenta una distribución más homogénea con una varianza de 8,2 con respecto a su media (Ver gráfico 2 y anexo 4)

Ambos extractos representan en promedio la mitad de la acción de los fungicidas comunes: 10,23 mm de los extractos versus 20,35 mm del antifúngico tradicional. (Ver tabla 2). Cabe destacar que los numerosos estudios relacionados con los compuestos bioactivos del matico no consideran el extracto Butanolico como el más utilizado sino que los datos son provenientes de extractos hexánicos, diclorometano y metanólico.

Algunos autores como Backhouse seleccionaron el extracto metanólico como el más adecuado debido a que contienen los flavonoides más activos, además de ser catalogado como hipoalergénico (34). Por tanto no tenemos datos comparativos análogos.

En los datos evaluados con ANOVA de doble entrada presenta diferencias significativas en la acción de los extractos entre sí, con valor de  $p < 0,0001$ . Los resultados del test LDS aplicado, para determinar diferencias entre los extractos y su acción frente a los aislados, determina que estos son altamente significativos con  $P < 0,0001$ .

En ambas modalidades, tanto en la CIM como en la CMF se obtuvieron medidas disimiles según el sitio de extracción de la cepa, fluctuando el rango desde 250  $\mu\text{L}$  hasta 0.98  $\mu\text{L}$ .

Por un lado el aislado número 12, correspondiente a una *Candida albicans* extraída de mucosa, no tuvo crecimiento en ninguna concentración. Vale decir que la CIM coincide con CMF en la dilución máxima, con la posibilidad ,previo estudio de citotoxicidad, de uso en concentraciones mínimas.

En el aislado número 8, de *Candida albicans* proveniente de prótesis, tanto los valores de CIM y CMF están a una concentración de 15,6  $\mu\text{g/ml}$  . Sin embargo en el aislado 7, de *Candida dubliniensis*, tenemos la CIM a los 250  $\mu\text{gr/ml}$  y la CMF A 62,5  $\mu\text{gr/ml}$  ,lo

que se contrapone teóricamente con los comportamientos menos patógenos de *dublinskiensis* respecto de *albicans*. Al chequear el origen de ese aislado, se trataría de una paciente afectada con Síndrome de Sjögren, hiposialica, con episodios frecuentes de candidiasis y tratamiento antifungico, lo que podría haber influido en estos resultados. Otra explicación es que pueden confundirse ambas especies, siendo muchas de sus características similares.

*Candida albicans* ha sido la que más ha demostrado resistencia a actividad antifúngica, encontrándose muchos de estos casos asociados a pacientes con reiterada automedicación. El uso inapropiado de las medicaciones antimicrobianas tanto en dosis, frecuencia o tiempo de uso, puede llevar al estado de resistencia clínica secundaria a la que hay que sumar a la resistencia microbiológica per ce. (6),(9),(8).

Ambas conductas conllevarían a una alta recurrencia de la infección, sumada a la persistencia de los factores predisponentes, que no siempre se pueden compensar.

Si comparamos los resultados con otros estudios de determinación de Concentración mínima inhibitoria sobre *Candida albicans* los resultados son igualmente dispares. Como ejemplos tenemos el realizado con la planta *Punica granatum*, donde se encontraron efectos inhibitorios a CMI = 128 µg / mL, mientras que el extracto hidroalcoholico con *Citrullus colocynthis* presento una CIM a 1.56 µg /ml - 1.25 µg/ml y CMF de 3.12 – 25 µg/ml (26) (39).

Por otro lado la comparación del efecto inhibitorio del extracto butanólico mezclado con Nistatina es menor con una media de 17mm comparado con la Nistatina sola que es de 19 mm. Vale decir que no se observó sinergismo ni potenciación del efecto fungicida Sin embargo, y este hallazgo no es menor, se pudo apreciar que en un tercio de las placas se observaba a las 48 hrs de incubación, un crecimiento de colonias sobre el halo inhibitorio de la Nistatina, cosa que no ocurrió en el área donde estaba la mezcla.

Esto podría interpretarse como una presencia de resistencia a la Nistatina en esas cepas, la que no se presenta en la combinación de la Nistatina con el extracto butanólico. Por lo tanto, y debe ser considerado en un siguiente estudio, podría existir alguna acción en conjunto de ambos productos, prolongando durante más tiempo la sensibilidad al antifungico o disminuyendo la resistencia que se presenta al cabo de un tiempo. Estamos sin embargo conscientes que aunque podamos hacer una estandarización de las pruebas de susceptibilidad antifúngica in vitro estas no son homologables a la realizada en estudios clínicos (9)

Los resultados observados en la tabla 3 establecen que si bien la nistatina tiene mayor grado de inhibición 24.5 mm contra 11.5mm del extracto butanólico, el halo de inhibición de la combinación de extracto butanólico con Nistatina es de 17 mm y se acerca mucho más al valor promedio de la Nistatina. Por lo tanto aunque no sería una alternativa respecto a su eficiencia, si podría serlo como complementariedad a su

acción lo que podría traducirse en una posología menos toxica, menos frecuente o con menos efectos adversos.

Desde las hojas del matico se han aislado una gran cantidad de compuestos como la luteolina-7-0-glucósido (Harborne y Williams, 1971),  $\beta$ amirina, acetato de  $\beta$ -amirina, glutinol, esterol condriasterol, ester metílico del ácido cumárico, ester metílico del ácido ferúlico (29), 7-p-metoxi cinamoilaucubina, 7-p-metoxi cinamoilcatalpósido, equinacósido (23 y Hikino, 1989), verbascósido (Pardo et al., 1993) y angarósido A (Pardo et al., 1997) ,pero ninguno ha sido probado como fungicida.

En raíces o tallos fueron encontradas los sesquiterpenos Buddelina A y B que si demostraron mayor efecto antifungico incluso comparados con el Miconazol pero solo sobre hongos de presencia dermatológica como *Trichophyton rubrum*, *Tricophyton interdigitale* y *Epidermophyton floccosum* y no sobre especies de *Candida albicans*.

En relación a la inocuidad de su uso, no se han encontrado efectos tóxicos aun en dosis de extracto mayores de 600 mg/Kg vía intraperitoneal pero no debemos desconocer la necesarias pruebas de citotoxicidad que estas mezclas herbáceas complejas deben pasar.

Muchos de estos productos sabemos que pueden llegar a ser parte de una complementariedad o de sinergismos entre los fármacos tradicionales lo que puede llegar a bajar su toxicidad y a aumentar su capacidad biocida, como lo vimos en los datos obtenidos. (39)(40)(41)



## CONCLUSIONES

Los resultados de la presente investigación confirman la hipótesis de que los extractos de *Buddleja Globosa* hope tiene efecto inhibitorio sobre los aislados clínicos *in vitro* de *Candida albicans* de origen oral.

La actividad antimicótica de la *Buddleja Globosa* hope no se ha estudiado en extenso como sus otras propiedades cicatrizantes, antiinflamatorias, antioxidantes y antitrombóticas. No hay actualmente ensayos estandarizados concluyentes respecto al efecto anti fúngico de las hojas de matico en su estado natural sino solo de la corteza.

No hay información respecto al uso de extractos butanólicos, por lo que los resultados obtenidos son, según nuestra información actual, nuevos en la materia.

Es una necesidad la identificación de los compuestos moleculares que presenten mayor acción con el fin de lograr aislar y concentrar compuestos farmacológicos que tengan la mayor eficacia versus baja toxicidad.

## SUGERENCIAS

En una siguiente etapa debemos determinar cuáles son las moléculas activas en nuestro extracto butanólico mediante metodología analítica como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (43)

En paralelo poder probar el extracto en cultivos celulares y evaluar su citotoxicidad, utilizando la CMI encontrada.

No obstante hubiese una actividad citotóxica sería una opción usar nanotecnología como vía alternativa de administración de fitofármacos que evitan este efecto, al actuar en epítomos específicos de nuestro microorganismo o célula blanco.

Junto a lo anterior es necesario una trazabilidad desde la producción y cultivo de los ejemplares hasta la estandarización farmacológica de los mismos con el fin de obtener el máximo beneficio de las plantas medicinales de uso popular, que hoy son hierbas medicinales o Fito medicamentos, y lograr que pasen a la categoría de fitofármaco.

## RESUMEN

La *Candida albicans* es un microorganismo que está presente en nuestra cavidad oral y que puede volverse patógena bajo ciertas circunstancias. Estas incluyen el uso de prótesis acrílicas por muchos años, la terapia antibiótica o falta de saliva entre otras condiciones, que son cada vez más frecuentes en la población. A lo anterior, se suma el aumento de los casos de resistencia a los fármacos anti fúngicos para uso oral, que además son escasos en el mercado. Esto ha llevado a los investigadores a buscar alternativas farmacológicas en plantas medicinales para la obtención de moléculas biocidas.

En nuestro país una de las plantas medicinales más utilizadas es la *Buddleja globosa* Hope denominada popularmente Matico. Desde sus hojas se extrajeron mediante solventes, 4 extractos semipurificados, acuosos, metanólico, butanólico y fenólico, los que fueron aplicados sobre cepas del hongo *Candida Albicans* aislados desde la cavidad oral de pacientes portadores de prótesis.

Se determinó que el extracto metanólico y butanólico presentaba acción inhibitoria al crecimiento de colonias de *Candida albicans*, mostrando diferencias significativas en la acción de los extractos entre sí, y entre los extractos versus aislados, con valores de  $p < 0,0001$ . La nistatina control presenta el doble de halo inhibitorio promedio. Se aplicó un combinado de extracto butanolico combinado con nistatina y mostro menor efecto que la Nistatina sola, encontrándose sin embargo casos de resistencia en esta ultima, que no estaban en el combinado. Se debe realizar un siguiente estudio complementario

## BIBLIOGRAFIA

- 1.-Patil, S., Rao, R.S.,Majumdar, B.,Anil, S.(2015) "Clinical Appearance of Oral Candida Infection and Therapeutic Strategies"*Front Microbiol*; 2015; 6:1391
- 2.-Scully ,C.,El-Kabir,M., Samaranayake, L.P.(1994)"Candida and Oral Candidosis: A Review" *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 5(2):125-157 1994
- 3.-Stoopler, E. T.,Sollecito, T. P.(2014) ".Oral mucosal diseases: evaluation and managment."*Med. Clin. North Am.*, 98 (2014) :1323- 1352.
- 4.- Lopes Colombo, A. L.; Guimaraes, T. Aranha Camargo, L. F.,Richtmann, R.,Queiroz-Telles, F. D.,Costa Salles, M. J.,Da Cunha, C.Yasuda, M.Shikanai,M., Moretti, M. L. & Nucci, M.(2013) "Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociada de Brasileira de Infectologia, Sociada de Paulista de Infectologia and Sociada de Brasileira de Medicina Tropical." *Braz.J. Infect. Dis* 2012., 17(3):283-312, 2013.
- 5.-Martins, N.,Ferreira, I., Barros L.,Silva S., Henriques M. (2014) "Candidiasis: Predisposing Factors, Prevention, Diagnosis and Alternative Treatment " *Mycopathologia* (2014) 177:223–240.
- 6.-Sanglar,D.,(2002)"Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs". *Microbiology* 2002, 5:379 - 385
- 7.-Sanglar, D.Odds,F. (2002)"Resistence of Candida Species to antifungal agents : molecular mechanisms and clinical consequences"*The Lancet ,Infectious Diseases Vol 2 Issue 2P* 73-85.
- 8.-Mayer, F., Wilson,D., Hube, B.,(2013)"Candida albicans pathogenicity mechanisms"

*Virulence*, 2013 Feb 15; 4(2): 119–128.

9.-Kanafani, Z.A., Perfect, J.R., (2008). "Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact". *Clin. Infect. Dis. – Antimicrob. Resist.* 46,2008, 120–128.

10.- Berdonces , J.,(2003) "Historia de la fitoterapia" *Natura medicatrix* 2003;21(3):142-152.

11.- Avello, M., Cisternas,I.,(2010)"Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile" . *Rev Med Chile* . 2010, 138: 1288 – 1293.

12. Rubio, B., (2010)"Evolución clínica de un extracto de Matico en el tratamiento de Eritrodisestesia palmar plantar secundaria a quimioterapia y en la profilaxis de radioepitelitis en pacientes sometidos a radioterapia" Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias farmacéuticas, Facultad de Ciencias químicas y farmacológicas, Universidad de Chile,2010.

13.-Vogel H., Razmilic, I. ,Polanco,X., Letelier, M.E. (2010)" Effect of different provenances and production conditions on antioxidant properties in Buddleja globosa leaves" *Bol. Latinoam. Caribe plantas med. Aromat*; 9 (5), sept 2010. 333- 342

14.- Oliveira M., Velásquez., Bermúdez.,(2005) "La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales, una revisión de sus objetivos y enfoques actuales" *Revista de ciencia y tecnología de América*, Vol. 30, N°. 8, 2005, págs. 453-459

15.-Elvin-Lewis,M., (2001)"Should we be concerned about herbal remedies". *Journal of Ethnopharmacology* 75 (2001) 141–164.

16.- Goity,E.,(2007) "Estudio químico y farmacológico de un extracto activo de Buddleja globosa hope, Buddlejaceae , Matico y diseño de la metodología analítica.".Memoria

para optar al título de Químico farmacéutico, de Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas Departamento de Química y Farmacológica y Toxicológica, Universidad de Chile. 2007

17.- Morales, M.(2015) "Fundamentación básica al uso etnomédico de matico (Buddleja globosa Hope) " *Revista de fitoterapia* 2015(1) :37-51.

18.-Parada, M,(2012)"Legislación en Chile sobre fitofármacos y plantas medicinales " *Revista de farmacología Chile*, 2012 Vol.5, 2-7

19.- Instituto Salud Pública de Chile Monografía Oficial (2007),"Buddleja globosa Hope Matico,pag 1-16.

20.-Letelier, M., Jones, R., López, C.,Palma, K., Aracena, P. Razmilic Polanco X. et als (2012)" Safety profil and wound healing properties of standardized Buddleja globosa Hope (matico) extract in rats". *Rev Farmacology Chile* 2012; 5(2):13- 19

21.-Houghton , P.(2003)"Buddleja globosa: a medicinal plant of Chile their chemistry , biological activity and tradicional uses ". *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas* vol 2, num 3 , mayo 2003, 36 – 41

22.-Apablaza, E. C. (2006) "*Diseño de la estandarización química y evaluación de la actividad analgésica tópica de un extracto activo de Buddleja globosa Hope, Buddlejaceae matico*". Memoria para optar al título de Químico farmacéutico de Universidad de Chile,2006.

23.-Backhouse, N..(2008)"Analgésic antiinflamatory and anti oxidant properties of Buddlejaglobosa , Buddlejaceae", *Journal Etnopharmacol*,116(2): 263-269, 2008.

- 24.-Muzyka, B.,(2005) "Oral fungal infections "*Dent Clin North Am.* 2005 Jan;49(1):49-65.
- 25.- Thaweboon,B,Thaweboon, S.,"Effect of *Phyllanthusemblica* Linn. on candida adhesion to oral epithelium and denture acrylic" *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* (2011)41-45.
- 26.- Vasconcelos, L., Sampaio,M., F.C. Sampaio, et al., "Use of *Punicagranatum* as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis" , *Mycoses* 46 (2003) 192–196.
- 27.- Miranda-Rius J, Brunet-Llobet, L., Lahor-Soler,E., Farré M.(2015) "Salivary Secretary Disorders, Inducing Drugs, and Clinical Management"*Review Int J Med Sci* 2015; 12(10):811-824.
- 28.-Vásquez C." Efecto fungicida del aceite esencial de *Piperangustifolium* en el tratamiento de candidiasis bucal subprotésica " Tesis Universidad de San Martín de Porres,Lima ; 2003.
- 29.-Tapia,C.,(2005) " Mechanisms of action, adverse reactions and new antifungal agents" *Medwave 2005 Abr;5(4):3548* , Jornadas de Actualización en MicologíaMedica, 2005 Universidad de Chile.
- 30.- Giordani, C. ,Santin ,R., Cleff ,M.,(2015)" Levantamento de extratos vegetais com ação anti-Candida no período de 2005-2013 "*Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.17, n.1, p.175-185, 2015.*

- 31.- Martins N., Ferreira I., Barros L. , Carvalho A., Henriques M., Silva S., (2015) "Plants used in folk medicine: The Potential Of their hydromethanolic extracts against Candida species" . *Industrial crops and products* 66 (2015) 62-67.
- 32.- Casaroto A. Soares, V.,(2010) "Phytomedicines for Candida- associated denture stomatitis". *Fitoterapia* 81 (2010) 323 – 328.
- 33.-Vogel, H.,Doll, U., Razmilic, I., San Martin, J., "Domestication studies of Matico (Buddleja Globosa Hope) " *Acta Horticultura* 576 203-206
- 34.-Valdes Bravo (2013) "*Uso de infusión de matico (Buddleja globosa) y el biopolímero quitosano condroitin sulfato en recuperación de heridas de piel en conejos: análisis comparativo*". Memoria para optar al título de Médico Veterinario. Universidad Austral de Chile, 2013.
- 35.-Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. 2010, Medicamentos herbarios tradicionales, pag. 111.
- 36.-Backhouse N, Erazo S, Negrete R, Correa O. Costra E. Fernández M. Johnston M. Fernandez G. Delporte C. (2003) "Evaluación farmacológica y química de Buddlejaglobosa Hope , Buddlejaceae. Diseño y evaluación de un preparado dermatológico . Estandarizacion de su cultivo." *II Encuentro de Investigación y Creación, Universidad de Chile* ,Abril del 2003.
- 37.-Lopez Valladares (2012) "*Efecto de un preparado de extractos de hojas de matico y Llantén en plastibase en el proceso reparativo de una herida estandarizada de mucosa palatina de rata* " Tesis para optar al título de Cirujano dentista de Universidad de Chile, 2012.



- 38.-Liao, Y.H. , Houghthon P., Bloomfield, S., Vlientinck A., Vanden- Berghe, D.,(1999)" Know and novel constitutens from Buddleja species and their activity against leucocyte eicosanoide generation". *J Nat prod* 1999; 62 (9): 1241 – 1245.
- 39.- Eidi S.,Ghodrati,H.,Rahbar N.(2015) "Evaluation of antifungal activity of hydroalcoholic extracts of Citrullus colocynthis fruit". *Journal of Herbal Medicine*5 (2015) 36-40
- 40.-Hamza O, Van den Bout-van Beukel y cols(2006)"Antifungal activity os some Tanzanian plants used traditionally for the treatment of fungal infections"*Journal of Ethnofarmacology* 108(2006) 124- 132
- 41.-Pilna, J., Vlkova,E. , Krofta.},K., Nesvadba,V., Rada,V., Kokoska,L.. (2015) " In vitro growth-inhibitory effect fethanol GRAS plant and supercritical CO2 hop extracts on planktonic cultures of oral pathogenic microorganisms" *Fitoterapia* (2015) 260–268.
- 42.-Vengurlekar,S., Sharma, R.,Piyush T.(2012) "Efficacy of some natural compounds as antifungal agents " *Pharmacogn Rev.* Jul-Dec 2012; 6(12): 91–99.
- 43.- Valenzuela, G.,(2009)" *Diseño de una metodología analítica en hplc para estandarizar un extracto de Buddleja globosa hope, Buddleja ceae y evaluación de la cesión del extracto desde un gel dermatológico*"Tesis para optar al título de Químico farmacéutico. Universidad de Chile,2009.
- 44.-Fuentes M, Sepúlveda C, Alarcon M., Palomo I.,Fuentes E.(2018) "Buddleja globosa (matico) prevents collagen induced Platelet Activation by Decreasing phospholipase C-gamma 2 and proteinkinase C phosphorylation signaling" *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 8,66-71.

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

La Serena.....,2017

Por medio del presente documento solicitamos a Ud. la autorización para participar voluntariamente, y en forma anónima, en este 1° estudio para ver los efectos de extractos de matico sobre unos microbios llamados Candida que son unos hongos que serán tomados desde la superficie de su paladar y sembrados en el laboratorio. Este hongo está presente en casi todas las personas pero que a veces se vuelven más invasivos cuando hay algún cambio en la boca. Este estudio se denomina “Evaluación del efecto del extracto natural de Budlejia globosa Hope (matico) sobre el desarrollo in vitro de Candida albicans” y tiene como propósito buscar nuevas alternativas de tratamiento para una enfermedad llamada Candidiasis y que es común en nuestra población. Participan en este estudio aquellas personas que sean autovalentes que usan placas acrílicas totales, por más de un año, que tienen características clínicas de tener infección por este hongo, por lo que Ud. fue seleccionado como participante. Ud. no tendrá riesgo alguno y podrá saber si efectivamente tiene esos tipo de hongo y como tratarlo y prevenirlo.

Con este propósito se tomará por una vez una muestra superficial de su paladar con una torula de algodón, maniobra indolora completamente y muy rápida, de menos de 1 minuto de duración. Esto no presenta riesgos ni complicaciones para Ud.

Esta muestra será analizada en microscopio y puesta en una estufa para que crezca. Si a Ud. se le diagnostica portador de este tipo de hongo, será tratado y/o derivado para la renovación de su prótesis a costos preferenciales de la Universidad, aunque se retire del estudio

Este estudio será realizado por la Dra. Rosa Cuevas, Odontóloga, estudiante de Magister de la Universidad Andes Bello, en conjunto con la Universidad de La Serena. Así mismo se solicita autorización para que estas muestras extraídas puedan ser usadas para probar en ellas los extractos de matico. Ninguno de sus datos personales será utilizados ni publicado y nadie tendrá acceso a su información excepto la alumna responsable del proyecto abajo firmante. Ud tendrá una copia de este consentimiento y podrá conversarlo y analizarlo con otras personas si participa o no del estudio, siendo una decisión en la cual puede tomarse todo el tiempo necesario En caso de desistir de este estudio Ud. podrá hacerlo en cualquier momento sin ninguna condición y podrá acceder a los beneficios indicados. Además, se le informa que Ud. podrá conocer los resultados obtenidos una vez finalizado el estudio y en caso de detectarse alguna enfermedad se le notificará en forma personal y confidencial parra su respectivo tratamiento. Todas las muestras obtenidas serán utilizadas solo para aislar el hongo y serán destruidas una vez terminada la investigación.

Es muy importante su participación en este estudio pues permitirá saber si la planta Matico tiene algún efecto sobre el crecimiento de este hongo de la boca y así aportar con otras alternativas de tratamiento más naturales y prácticas, al alcance de toda la población. Ante cualquier duda puede dirigirse a la alumna tesista o a cualquier

miembro del equipo abajo nombrado, el que se encargara de aclararle cualquier consulta.

Por la participación en este trabajo Ud. no recibirá remuneración alguna.

Nombre y firma participante

Firma tesista Rosa CuevasP.

Rut

Fono: 98489646 mail:recuevas@userena.com

Tutora:MSc Alejandra Fernández,

mail:[fernandez.alejandra@gmail.com](mailto:fernandez.alejandra@gmail.com)Fono+56998796026

Asociados Dr. Lorgio Eduardo Aguilera Jopia mail: [laquiler@userena.cl](mailto:laquiler@userena.cl)

Fono+56997917751

MSc. Claudia Elizabeth Barraza Zepeda, mail: [cbarraza@userena.cl](mailto:cbarraza@userena.cl)

Fono +56977326431

Profesor: Alex Patricio Cea Villablanca, mail: [acea@userena.cl](mailto:acea@userena.cl)

Fono +56974996564



Santiago, 08 de Enero de 2018

### CERTIFICADO

El Comité Ético Científico de la Escuela de Odontología de la Universidad Andrés Bello, sede Santiago, certifica que el proyecto investigación "PROEXT 001/2017 titulado " Evaluación del efecto del extracto natural de *Budlejia globosa* Hope (matico) sobre el desarrollo in vitro de *Candida albicans*" a cargo de la Dra. Rosa Cuevas Pareja fue Aprobado después de una revisión exhaustiva que comenzó el 29 de Octubre de 2017, en la cual se plantearon observaciones por este Comité, comentadas en sesiones plenarios las cuales fueron debidamente aclaradas o implementadas según lo informado por los investigadores, concluyendo con fecha de hoy 07 de enero de 2018.

En virtud de lo anterior, en este acuerdo se estableció de forma unánime la implementación de la investigación. Sin desmedro de lo anterior, cualquier cambio posterior en el transcurso del estudio deberá ser informado formalmente a este Comité para su re-evaluación y nueva aprobación. Este comité podrá solicitar en cualquier momento antecedentes y realizar una revisión si se están cumpliendo a cabalidad las condiciones presentadas por los investigadores a cargo del proyecto.



Comité Ético Científico  
Universidad Andrés Bello  
Facultad de Odontología  
Campus República

**RESUMEN DEL ANÁLISIS DE VARIANZA DE DOS FACTORES  
CON VARIAS MUESTRAS POR GRUPO**

RESUMEN	E1	E2	E3	E4	N	Total
<b>A1</b>						
Cuenta	3	3	3	3	3	15
Suma	15	15	30,2	15	61,6	136,8
Promedio	5	5	10,0666667	5	20,5333333	9,12
Varianza	0	0	7,66333333	0	4,89333333	40,8117143

<b>A2</b>						
Cuenta	3	3	3	3	3	15
Suma	15	24	35,8	15	59,9	149,7
Promedio	5	8	11,9333333	5	19,9666667	9,98
Varianza	0	12,51	0,85333333	0	2,96333333	35,9902857

<b>A3</b>						
Cuenta	3	3	3	3	3	15
Suma	15	34,9	32,1	15	58	155
Promedio	5	11,6333333	10,7	5	19,3333333	10,3333333
Varianza	0	23,0533333	1,56	0	9,54333333	34,8180952

<b>A4</b>						
Cuenta	3	3	3	3	3	15
Suma	15	24	26	15	43,2	123,2
Promedio	5	8	8,6666667	5	14,4	8,21333333
Varianza	0	3,07	2,12333333	0	53,28	21,0340952

<b>A5</b>						
Cuenta	3	3	3	3	3	15
Suma	15	25,1	36,6	15	61	152,7
Promedio	5	8,3666667	12,2	5	20,3333333	10,18
Varianza	0	11,9233333	52,99	0	0,33333333	44,4902857

<b>A6</b>						
Cuenta	3	3	3	3	3	15
Suma	15	28,3	29,1	15	55,4	142,8

Promedio	5	9,43333333	9,7	5	18,4666667	9,52
Varianza	0	15,1633333	0,91	0	1,70333333	28,456

*A7*

Cuenta	3	3	3	3	3	15
Suma	15	30	40	15	62,7	162,7
Promedio	5	10	13,3333333	5	20,9	10,8466667
Varianza	0	0,09	2,96333333	0	3,61	38,738381

*A8*

Cuenta	3	3	3	3	3	15
Suma	15	39,3	37,9	15	66	173,2
Promedio	5	13,1	12,6333333	5	22	11,5466667
Varianza	0	11,83	0,30333333	0	0,76	44,3955238

*A9*

Cuenta	3	3	3	3	3	15
Suma	15	15	29,8	15	56,3	131,1
Promedio	5	5	9,93333333	5	18,7666667	8,74
Varianza	0	0	5,49333333	0	0,66333333	31,7197143

*A10*

Cuenta	3	3	3	3	3	15
Suma	15	20	31	15	60	141
Promedio	5	6,66666667	10,3333333	5	20	9,4
Varianza	0	8,33333333	12,9033333	0	13	39,0528571

*A11*

Cuenta	3	3	3	3	3	15
Suma	15	53,8	40,9	15	54	178,7
Promedio	5	17,9333333	13,6333333	5	18	11,9133333
Varianza	0	6,41333333	28,6233333	0	4	42,398381

*A12*

Cuenta	3	3	3	3	3	15
Suma	15	45,1	38,8	15	67	180,9
Promedio	5	15,0333333	12,9333333	5	22,3333333	12,06
Varianza	0	47,2033333	4,26333333	0	9,33333333	54,7211429

*A13*

Cuenta	3	3	3	3	3	15
Suma	15	30,6	33	15	69,6	163,2

Promedio	5	10,2	11	5	23,2	10,88
Varianza	0	1,24	17,44	0	0,52	50,1874286

*A14*

Cuenta	3	3	3	3	3	15
Suma	15	31,5	32,2	15,6	58,6	152,9
Promedio	5	10,5	10,73333333	5,2	19,53333333	10,19333333
Varianza	0	33,25	12,10333333	0,12	0,253333333	36,4306667

*A15*

Cuenta	3	3	3	3	3	15
Suma	15	29,7	30,5	15	58,1	148,3
Promedio	5	9,9	10,16666667	5	19,36666667	9,886666667
Varianza	0	18,07	3,843333333	0	6,103333333	33,5112381

*A16*

Cuenta	3	3	3	3	3	15
Suma	15	27,2	30,9	15	79	167,1
Promedio	5	9,066666667	10,3	5	26,33333333	11,14
Varianza	0	0,813333333	0,93	0	9,333333333	68,2768571

*A17*

Cuenta	3	3	3	3	3	15
Suma	15	68,7	35	15	72	205,7
Promedio	5	22,9	11,66666667	5	24	13,71333333
Varianza	0	2,41	2,333333333	0	0,64	74,9640952

*Total*

Cuenta	51	51	51	51	51	
Suma	255	542,2	569,8	255,6	1042,4	
Promedio	5	10,6313725	11,172549	5,01176471	20,4392157	
Varianza	0	27,8221961	8,21003137	0,00705882	11,6784314	

Medidas de halos de inhibición en mm .

A= aislados      E1= extracto acuoso    E2 =Metanólico    E3 = Butanólico  
E4= fenólico    N= nistatin



## ANALISIS DE VARIANZA

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R<sup>2</sup></u>	<u>R<sup>2</sup> Aj</u>	<u>CV</u>
<u>Diámetro</u>	<u>255</u>	<u>0,91</u>	<u>0,87</u>	<u>22,59</u>

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	9578,86	84	114,03	20,46	<0,0001
Aislado	446,36	16	27,90	5,01	<0,0001
Extracto	8140,43	4	2035,11	365,16	<0,0001
Aislado*Extracto	992,07	64	15,50	2,78	<0,0001
Error	947,45	170	5,57		
<u>Total</u>	<u>10526,32</u>	<u>254</u>			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,70167

Error: 5,5733 gl: 170

Aislado	Medias	n	E.E.								
A4	8,21	15	0,61	A							
A9	8,74	15	0,61	A	B						
A1	9,12	15	0,61	A	B						
A10	9,40	15	0,61	A	B	C					
A6	9,52	15	0,61	A	B	C	D				
A15	9,89	15	0,61	A	B	C	D	E			
A2	9,98	15	0,61		B	C	D	E			
A5	10,18	15	0,61		B	C	D	E			
A14	10,19	15	0,61		B	C	D	E			
A3	10,33	15	0,61		B	C	D	E	F		
A7	10,85	15	0,61			C	D	E	F	G	
A13	10,88	15	0,61			C	D	E	F	G	
A16	11,14	15	0,61				D	E	F	G	
A8	11,55	15	0,61					E	F	G	
A11	11,91	15	0,61						F	G	
A12	12,06	15	0,61							G	H
A17	13,71	15	0,61								H

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Tabla 1: Resultados análisis de susceptibilidad para antifúngicos, según especie, Chile, 2015-2016.

Especie	Antifúngico	Rangos de CMI (µg/ml)	Categorías de Susceptibilidad						Total		
			Susceptible		SDD/I**		Resistente			NA	
			n	%	n	%	n	%	n	WT%	
<i>Candida albicans</i>	AFG	[<0,03 - 0,12]	176	100%	0	0%	0	0%	0	-	176
	AMB	[0,25 - 1]	0	0%	0	0%	0	0%	174	100%	174
	CSP	[0,06 - 0,5]	175	99%	1	1/176	0	0%	0	-	176
	FLC	[0,06 - 2]	176	100%	0	0%	0	0%	0	-	176
	ITC	[0,03 - 8]	104	96%	3	3%	1	1%	0	-	108
	PSC	[0,03 - 0,25]	0	0%	0	0%	0	0%	117	89%	117
	VRC	[<0,015 - 0,25]	174	99%	1	1/175	0	0%	0	-	175
<i>Candida dubliniensis</i>	AFG	[<0,03 - 0,03]	0	0%	0	0%	0	0%	6	5/6	6
	AMB	[0,12 - 1]	0	0%	0	0%	0	0%	5	5/5	5
	CSP	[0,12 - 0,25]	0	0%	0	0%	0	0%	5	5/5	5
	FLC	[0,12 - 0,25]	0	0%	0	0%	0	0%	6	6/6	6
	ITC	[0,03 - 0,06]	0	0%	0	0%	0	0%	4	4/4	4
	PSC	0,03	0	0%	0	0%	0	0%	3	3/3	3
	VRC	[<0,015 - 0,03]	0	0%	0	0%	0	0%	6	6/6	6
<i>Candida glabrata</i>	AFG	[<0,03 - 0,12]	35	100%	0	0%	0	0%	0	-	35
	AMB	[0,25 - 1]	0	0%	0	0%	0	0%	32	100%	32
	CSP	[0,06 - 0,5]	19	19/21	1	1/21	1	1/21	0	-	21
	FLC	[2 - >32]	0	0%	33	94%	2	2/35	0	-	35
	ITC	[0,25 - 4]	0	0%	0	0%	0	0%	24	24/24	24
	PSC	[0,25 - 4]	0	0%	0	0%	0	0%	27	26/27	27
	VRC*	[0,06 - 16]	0	0%	0	0%	0	0%	34	-	34
<i>Candida guilliermondii</i>	AFG	1	1	1/1	0	0%	0	0%	0	-	1
	AMB	1	0	0%	0	0%	0	0%	1	1/1	1
	CSP	0,5	1	1/1	0	0%	0	0%	0	-	1
	FLC	>16	0	0%	0	0%	0	0%	1	0/1	1
	ITC	>16	0	0%	0	0%	0	0%	1	0/1	1
	PSC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	VRC	>8	0	0%	0	0%	0	0%	1	0/1	1
<i>Candida krusei</i>	AFG	[0,03 - 0,12]	8	8/8	0	0%	0	0%	0	-	8
	AMB	[0,5 - 2]	0	0%	0	0%	0	0%	7	7/7	7
	CSP	[0,12 - 0,25]	4	4/4	0	0%	0	0%	0	-	4
	FLC	[8 - >32]	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ITC	[0,25 - 0,5]	0	0%	0	0%	0	0%	6	6/6	6
	PSC	[0,12 - 0,25]	0	0%	0	0%	0	0%	5	5/5	5
	VRC	[0,06 - 0,25]	8	8/8	0	0%	0	0%	0	-	8
<i>Candida lusitanae</i>	AFG	[0,06 - 0,25]	0	0%	0	0%	0	0%	5	5/5	5
	AMB	[0,25 - 0,5]	0	0%	0	0%	0	0%	7	7/7	7
	CSP	[0,25 - 0,5]	0	0%	0	0%	0	0%	7	7/7	7
	FLC	[0,25 - 1]	0	0%	0	0%	0	0%	7	7/7	7
	ITC	[0,06 - 0,12]	0	0%	0	0%	0	0%	2	2/2	2
	PSC	[0,03 - 0,06]	0	0%	0	0%	0	0%	3	3/3	3
	VRC	[0,015 - 0,03]	0	0%	0	0%	0	0%	7	7/7	7
<i>Candida orthopsittosis</i>	AFG	[0,25 - 1]	0	0%	0	0%	0	0%	13	13/13	13
	AMB	[0,25 - 1]	0	0%	0	0%	0	0%	13	ND	13
	CSP	[0,25 - 1]	0	0%	0	0%	0	0%	14	13/14	14
	FLC	[0,12 - 1]	0	0%	0	0%	0	0%	14	14/14	14
	ITC	[0,03 - 0,12]	0	0%	0	0%	0	0%	8	ND	8
	PSC	[0,03 - 0,12]	0	0%	0	0%	0	0%	8	8/8	8
	VRC	[<0,015 - 0,03]	0	0%	0	0%	0	0%	14	14/14	14
<i>Candida tropicalis</i>	AFG	[<0,03 - 0,06]	15	15/15	0	0%	0	0%	0	-	15
	AMB	[0,25 - 1]	0	0%	0	0%	0	0%	16	16/16	16
	CSP	[0,12 - 0,25]	12	12/12	0	0%	0	0%	0	-	12
	FLC	[0,12 - 0,5]	16	16/16	0	0%	0	0%	0	-	16
	ITC	[0,03 - 0,25]	0	0%	0	0%	0	0%	9	9/9	9
	PSC	[0,03 - 0,12]	0	0%	0	0%	0	0%	10	10/10	10
	VRC	[0,015 - 0,06]	16	16/16	0	0%	0	0%	0	-	16
<i>Candida parapsittosis</i> a sero ustricto	AFG	[0,03 - 2]	156	100%	0	0%	0	0%	0	-	156
	AMB	[0,25 - 1]	0	0%	0	0%	0	0%	143	100%	143
	CSP	[0,12 - 2]	160	100%	0	0%	0	0%	0	-	160
	FLC	[<0,015 - >16]	156	98%	0	0%	4	4/160	0	-	160
	ITC	[<0,03 - 0,5]	0	0%	0	0%	0	0%	110	100%	110
	PSC	[<0,03 - 0,25]	0	0%	0	0%	0	0%	113	100%	113
	VRC	[<0,015 - 1]	156	95%	7	2/157	1	1/157	0	-	159
Otro*	AFG	[<0,03 - 0,5]	0	0%	0	0%	0	0%	7	ND	7
	AMB	[0,25 - 1]	0	0%	0	0%	0	0%	7	ND	7
	CSP	[0,12 - 0,5]	0	0%	0	0%	0	0%	6	ND	6
	FLC	[0,25 - 2]	0	0%	0	0%	0	0%	7	ND	7
	ITC	[0,06 - 0,25]	0	0%	0	0%	0	0%	3	ND	3
	PSC	[<0,03 - 1]	0	0%	0	0%	0	0%	3	ND	3
	VRC	[<0,015 - 0,25]	0	0%	0	0%	0	0%	7	ND	7

\* Otras especies: *Candida non-albicans* (1 cepa), *Candida kefyr* (1 cepa), *Candida lusitanae* (3 cepas), *Candida lusitanae* (14 cepas).

\*\* SDD (susceptibilidad dependiente) (AMB y CSP); I: Intermedio (FLC y VRC)

† No están definidos los puntos de corte críticos para vulnerabilidad frente a C. glabrata

NA: No se definió el punto de corte crítico para vulnerabilidad frente a C. glabrata

ND: No se definió el punto de corte crítico para vulnerabilidad frente a C. glabrata

††: No se definió el punto de corte crítico para vulnerabilidad frente a C. glabrata

†††: No se definió el punto de corte crítico para vulnerabilidad frente a C. glabrata

Fuente: Laboratorio de Microbiología, Instituto de Salud Pública de Chile

