

Comportamiento antibacteriano de partículas de cobre frente a microorganismos obtenidos de úlceras crónicas infectadas y su relación con la resistencia a antimicrobianos de uso común

NALDY FEBRÉ^{1,a}, VIVIANA SILVA^{2,b}, ANDREA BÁEZ^{3,c},
HUMBERTO PALZA^{4,d}, KATHERINE DELGADO^{4,e},
ISABEL ABURTO^{5,f}, VICTOR SILVA^{6,g}

Antibacterial activity of copper salts against microorganisms isolated from chronic infected wounds

Background: The antimicrobial activity of copper (Cu^{+2}) is recognized and used as an antimicrobial agent. **Aim:** To evaluate the antimicrobial activity of copper against microorganisms obtained from chronic cutaneous wound infections. **Material and Methods:** Five chemical products that contained copper particles in their composition were tested (zeolite, silica, acetate, nitrate and nanoparticle of copper). The antimicrobial activity against antibiotic resistant strains usually isolated from chronic cutaneous wound infections was determined for two of the products with better performance in copper release. **Results:** The minimal inhibitory and minimal bactericidal concentrations of copper acetate and nitrate were similar, fluctuating between 400-2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$. **Conclusions:** The studied copper salts show great potential to be used to control both gram positive and gram negative, antibiotic resistant bacteria isolated from wound infections.

(Rev Med Chile 2016; 144: 1523-1530)

Key words: Anti-Bacterial Agents; Anti-Infective Agents; Copper; Drug Resistance, Microbial; Skin Ulcer.

Las úlceras cutáneas crónicas constituyen un problema sanitario relevante a nivel mundial, se calcula que entre 1% al 2% de la población padecerá sus consecuencias durante su vida¹. En Latinoamérica, alrededor del 1% de la población general presenta úlceras abiertas y cicatrizadas; 25% de ellas corresponden a úlceras venosas activas². En Chile, las estadísticas disponibles muestran que aproximadamente 160.000 pacientes son portadores de algún tipo de herida o úlcera, constituyéndose en un problema de salud

pública³. Se define úlcera crónica a “una lesión de piel mantenida en el tiempo, que implica pérdida de la epidermis, parte de la dermis e incluso hipodermis”, encontrándose en este grupo a las úlceras venosas, úlceras isquémicas, pie diabético, úlceras por presión, quemaduras y heridas quirúrgicas infectadas⁴.

Todas estas injurias repercuten en la calidad de vida de las personas afectadas, tanto en el ámbito familiar y psicológico, como en el laboral y económico. La atención profesional no opor-

¹Universidad Mayor, Escuela de Enfermería, Facultad de Ciencias, Directora proyecto FONDEF.

²Universidad Mayor, Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Ciencias, Santiago, Chile.

³Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

⁴Universidad de Chile, Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

⁵Fundación Instituto Nacional de Heridas, Santiago, Chile.

⁶Universidad Mayor, Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Ciencias, Director alterno proyecto FONDEF y consultor de la American Society for Microbiology (ASM).

^aEnfermera, Magister en Enfermedades infecciosas, Doctora en Ciencias de la Salud.

^bTecnólogo Médico.

^cLicenciada en Estadística, Doctora en Economía Aplicada.

^dIngeniero Civil Químico, Ingeniero Civil en Biotecnología, Doctor en Ciencias de la Ingeniería, Mención Ciencias de los Materiales.

^eIngeniero Civil Químico, Doctor en Ciencias de la Ingeniería.

^fEnfermera.

^gTecnólogo Médico, Magister en Microbiología e Inmunología, Doctor en Ciencias.

Recibido el 30 de mayo de 2016, aceptado el 14 noviembre de 2016.

Correspondencia:

Naldy Febré

Sazié 2212, 6° piso, Santiago, Chile, Facultad de Enfermería, Universidad Andrés Bello.

tuna, produce períodos de incapacidad laboral prolongados, tratamientos costosos, hospitalizaciones reiteradas y cirugías que pueden llegar a la amputación; la ulceración del pie afecta entre un 15% a 20% de todos los individuos con diabetes y precede hasta un 85% de las amputaciones en este grupo⁹⁻¹² la tasa de mortalidad asociada a una infección generalizada en un paciente diabético alcanza un 5%⁵⁻⁸.

Diversos estudios han demostrado que las cepas que afectan a los pacientes portadores de pie diabético incluyen *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* spp, *Enterococcus* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, y bacterias coliformes, así como *Peptostreptococcus*, sugiriendo que infecciones polimicrobianas pueden repercutir en aspectos como la virulencia y llevar a que estos microorganismos en comunidad dificulten la recuperación y cicatrización de la lesión^{13,14}.

La actividad antimicrobiana de iones de cobre, específicamente de Cu^{+2} es reconocida en la literatura desde el año 1993, y su actividad sobre los microorganismos es función de su concentración, actuando como un agente bacteriostático en concentraciones entre 25 a 150 μM o bactericida en concentraciones superiores a esta. El Cu^{+2} interviene directamente: 1) inhibiendo la síntesis de proteínas; 2) alterando la membrana celular del microorganismo causando peroxidación, ya que induce daño oxidativo de lípidos que son claves en el intercambio de moléculas del medio intra y extracelular; 3) alterando o destruyendo los ácidos nucleicos de bacterias y virus¹⁵⁻¹⁷.

Nanopartículas de cobre metálico (NPCu) y nanopartículas de óxidos de cobre (NPCuO) son activas contra diferentes agentes patógenos de infecciones asociadas a la atención de salud (IAAS)¹⁸. Con el propósito de crear materiales multifuncionales, diversas investigaciones han comprobado que incorporar nanopartículas de cobre en matrices orgánicas inertes frente a la contaminación bacteriana, produce un material compuesto antimicrobiano¹⁷⁻²⁴. Estudios que evaluaron la efectividad del cobre sobre *S. epidermidis*, recuperados de implantes de silicona utilizados para el aumento mamario, concluyen que los implantes con aditivos de cobre impiden la adhesión del *S. epidermidis*²⁵⁻²⁸.

Es por lo anterior, que la presente investigación tiene como objetivo determinar el comportamiento antibacteriano de partículas de cobre frente a

microorganismos obtenidos de úlceras crónicas infectadas y para así determinar su relación con la resistencia a antimicrobianos de uso común.

Materiales y Métodos

Se planteó un estudio prospectivo iniciándose con la creación de un banco de cepas aisladas de muestras clínicas de pacientes portadores de heridas cutáneas crónicas infectadas (se consideró infección cuando existió un recuento mayor o igual a 100.000 bacterias por gramo de tejido obtenido de úlcera). El tamaño muestral se obtuvo en base a la prevalencia de heridas y úlceras en la población adulta en Chile (8 millones de personas), equivale a 2%, Nivel de confianza de 99%, estimándose un error de muestreo del 3% y se utilizó como fuente de datos la encuesta epidemiológica del Ministerio de Salud, año 2000²⁹. Los pacientes fueron invitados a participar en la Fundación Instituto Nacional de Heridas (INH). Los criterios de inclusión del estudio fueron los siguientes: paciente mayor a 18 años, portador de una úlcera cutánea crónica infectada (úlcera venosa, úlcera hipertensiva o pie diabético), cuya infección no fuera resistente a antimicrobianos, no haber estado hospitalizado en los últimos seis meses, y aceptar mediante una firma el consentimiento informado.

Cada muestra clínica representativa de la infección fue obtenida por un profesional de enfermería entrenado, previo lavado por arrastre con suero fisiológico estéril o agua bidestilada, se frotó con tórula estéril el centro y los bordes internos en zigzag en aproximadamente 10 puntos de referencia de la superficie comprometida, depositando la tórula en medio de transporte Stuart⁴, siendo transportada al Laboratorio de Investigación Microbiológica de la Universidad Mayor, en un plazo inferior a dos horas. Cada tórula fue sembrada en placas de Petri con agar Sangre de cordero, agar chocolate y Agar MacConkey, las cuales fueron incubadas a 35-37°C por 24 h. Paralelamente, se realizó un frotis en portaobjeto sometido a tinción de Gram para su observación y análisis microscópico. Luego del periodo de incubación, las placas se analizaron morfológicamente (macro y microscópicamente) para evidenciar cultivo mono o polimicrobiano. Las especies bacterianas se identificaron por pruebas fisiológicas, enzimáticas y/o bioquímicas, empleando galerías comerciales API

(Biomerieux[®]). La sensibilidad antimicrobiana fue evaluada mediante el método de difusión en agar o Kirby Bauer en medio Muller Hinton, evaluando los siguientes antimicrobianos, para *S aureus* (cefotaxima, cotrimoxazol, ampicilina-sulbactam, tetraciclina), *Enterobacterias* (cefalotina, cefuroximo, ceftazidima, gentamicina, amikacina) y para bacilos no fermentadores (BNF) (ceftazidina, imipenem, amikacina, gentamicina, ampicilina/sulbactam).

En el Laboratorio de Polímeros de la Universidad de Chile, se realizó un estudio de caracterización morfológico y de liberación de iones Cu^{+2} de Acetato de cobre monohidratado, Nitrato de cobre trihidratado, Zeolita funcionalizada, Silica Funcionalizada y Nanopartícula de cobre.

Para ello, se testeó la estabilidad en agua de nanopartículas de cobre metálico, nanopartículas de óxidos de cobre (Cu^2O o CuO), sales de cobre y un material nano/micrométrico inerte que soporta nanoestructuras en base a cobre. Se cuantificó la concentración de Cu^{+2} a través de ensayos de espectrofotometría UV, de manera de determinar la cantidad de partículas o compuestos de cobre necesarias para obtener las concentraciones deseadas.

Se caracterizaron las diferentes partículas de cobre evaluadas mediante difracción de rayos X, microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM), y espectrometría de masas (ICP-MS). Una vez caracterizadas, fueron seleccionadas aquellas que presentaron el mejor comportamiento (mayor nivel de liberación de cobre en un periodo de 48 h), para ser empleadas en los ensayos *in vitro* de concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM) por método de macrodilución. Para esto, los productos en polvo fueron diluidos en caldo Muller Hinton hasta alcanzar las concentraciones finales de uso, de 200 $\mu\text{M}/\text{ml}$ a 2.000 $\mu\text{M}/\text{ml}$ en tubos tapa rosca, conteniendo 9,9 ml de solución. El inóculo de cada cepa fue generado a partir de cultivos frescos en agar sangre. Colonias fueron diluidas en suero fisiológico estéril hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0,2 en espectrofotómetro a 600 nm, inoculando 50 μl a cada tubo. La incubación fue a 37°C por 24h con agitación constante a 200 rpm. La lectura de CIM fue determinada como el tubo con la menor concentración del producto que no evidenció crecimiento (tubo translúcido o sin turbidez) a ojo de los observadores. La CBM

se determinó sembrando desde los tubos que no evidenciaban crecimiento, 100 μl en agar Muller Hinton, incubándose a 37°C por 24 h, determinándose como CBM la placa obtenida de la menor concentración del producto en la que no se presentó crecimiento bacteriano.

Se emplearon cepas ATCC como control de calidad para los test de identificación bacteriana y ensayos de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar y por dilución en caldo (*P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. aureus* ATCC 25923), siguiendo las recomendaciones del *Clinical Laboratory Standard Institute* CLSI³⁰.

Se cumplieron las normas éticas internacionalmente exigidas, y el presente proyecto fue aprobado por el comité de ética de la Universidad Mayor y comité de Bioseguridad.

Resultados

Durante el periodo inicial del estudio comprendido entre marzo a junio del 2014, fueron evaluados un total de 71 pacientes que presentaron los criterios de infección de úlcera cutánea crónica (IUCC). La distribución numérica y porcentual según tipo de lesión y de cepas recuperadas se observa en la Tabla 1, donde destaca que el 71,6% (111/155 cepas) correspondieron a los pacientes portadores de úlceras venosas infectadas. Cabe destacar que la distribución de los cultivos recuperados el 54,2% de los muestras analizadas correspondieron a infecciones polimicrobianas.

Mediante espectrofotometría UV observamos que Acetato de cobre y Nitrato de cobre presentan liberación temprana y sostenida de Cu^{+2} , hasta las 48 h de evaluación (Tabla 2).

Se determinó el perfil de susceptibilidad de las cepas aisladas por método de difusión en agar,

Tabla 1. Distribución numérica y porcentual según tipo de lesión y número cepas recuperadas de úlceras crónicas infectadas (n = 155 cepas)

Tipo de Lesión	n cepas	%
Úlcera hipertensiva	6	3,9
Úlcera pie diabético	38	24,5
Úlcera venosa	111	71,6
Total	155	100,0

Tabla 2. Liberación de Cu⁺² en períodos de cero a 48 h de las cinco partículas de cobre utilizando espectrofotometría UV

Tiempo [h]	Partículas					
	Zeolita funcionalizada [mg/L]	Sílica funcionalizada [mg/L]	Nano Cu [mg/L]	Acetato de Cu [mg/L]	Nitrato de Cu [mg/L]	Óxido de Cu [mg/L]
0	00,00	00,00	0,00	000,00	000,00	0,00
4	55,15	33,86	0,15	748,72	643,53	0,11
24	24,06	24,49	0,89	540,46	505,96	0,73
48	13,84	29,39	1,38	697,61	607,75	0,66

Tabla 3. Perfil de Sensibilidad de las cepas de *S. aureus* aisladas de úlceras crónicas infectadas seleccionadas

Muestra	Identificación por especie	Ciprofloxacino	Cefoxitina	Cotrimoxazol	Ampicilina-Sulbactam	Tetraciclina
M10	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	S
M39	<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	S
M54	<i>S. aureus</i>	R	S	S	S	S
M27	<i>S. aureus</i>	S	S	S	S	S
ATCC 25923	<i>S. aureus</i>	S	S	S	S	S

S: Sensible R: Resistente.

a seguir se seleccionaron cepas resistentes para evaluar el comportamiento antimicrobiano de las partículas de cobre seleccionadas (Nitrato de cobre tri-hidratado y Acetato de cobre monohidratado), resultados observados en las tablas 3 a 6.

De las cuatro cepas de *S. aureus* aisladas de úlceras infectadas, destaca que 3 de las 4 cepas presentaron resistencia a quinolonas y betalactámicos (Tabla 3). De acuerdo a las indicaciones del CLSI se propuso la utilización de cefoxitina para determinar multi-resistencia del *S. aureus*, definiéndose a estas cepas como resistentes a meticilina de la comunidad (SAMR-C).

El perfil de resistencia de las cinco cepas de enterobacterias aisladas desde úlceras crónicas infectadas, destaca una sensibilidad para Amikacina en 4 de 5 cepas, seguido de ceftazidima con una sensibilidad en 2 cepas analizadas. Frente a cefalotina, las enterobacterias presentaron 4 cepas resistentes y uno con resistencia intermedia. Las bacterias Gram negativas son consideradas multi-resistentes si son resistentes a tres o más familias de antimicrobianos, de acuerdo a esta premisa en la

Tabla 4, observamos que 4 de las 5 cepas analizadas son multiresistentes.

La susceptibilidad *in vitro* de cepas de bacilos no fermentadores (BNF) aislados desde úlceras crónicas infectadas más la cepa ATCC (n = 5 cepas) se presenta en la Tabla 5, donde destaca que la resistencia a las quinolonas (ciprofloxacino) y betalactámicos (ceftazidima) está presente en las 4 cepas clínicas, siendo consideradas además multiresistentes.

La Tabla 6 muestra los resultados de la CIM y CBM de las dos partículas de cobre seleccionadas. La CIM para Acetato de cobre tiene un promedio de 826,6 µg/ml, con rangos de 400 a 1.200 µg/ml y moda de 1.000 µg/ml. Para el nitrato de cobre tri-hidratado la CIM promedio es de 1.133,3 µg/ml, con rangos de 400 a 1.800 µg/ml y moda de 1.000 µg/ml, para la cepa de *S. aureus* M10 considerada resistente, la CIM y CBM de cobre fluctuó entre 400 y 600 µg/ml respectivamente, por su parte la cepa *E. coli* M19C1 sensible solo a amikacina presentó CIM y CBM entre 800µg/ml a 1.400 µg/ml.

Tabla 4. Perfil de Sensibilidad de las cepas de Enterobacterias aisladas de úlceras crónicas infectadas seleccionadas

Muestra	Identificación por especie	Ciprofloxacino	Cefalotina	Cefuroximo	Ceftazidima	Gentamicina	Amikacina
M19-C1	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	S
M21-C1	<i>E. coli</i>	S	I	I	S	R	S
M64-C3	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	S	S
M17-C2	<i>Providencia rettgeri</i>	R	R	R	R	R	S
M45-C1	<i>Proteus mirabilis</i>	R	R	S	S	R	R

S: Sensible I: Intermedio R: Resistente.

Tabla 5. Perfil de Sensibilidad de las cepas de Bacilos no Fermentadores aisladas de úlceras crónicas infectadas seleccionadas

Muestra	Identificación por especie	Ciprofloxacino	Ceftazidima	Imipenem	Amikacina	Gentamicina	Ampicilina Sulbactam
M8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	S	S	/
M59	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	S	S	/
M65-C3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	S	R	R	/
M16	<i>Acinetobacter baumannii</i>	R	R	S	I	R	S
ATCC 27853	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	S	S	S	S	/

S: Sensible I: Intermedio R: Resistente.

Tabla 6. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y Concentración Bactericida Mínima (CBM) de Nitrato de cobre tri-hidratado y Acetato de cobre monohidratado sobre cepas bacterianas ATCC y aisladas de pacientes con úlceras crónicas infectadas

Cepa	CIM		CBM	
	Nitrato de cobre 3 H ₂ O	Acetato de cobre H ₂ O	Nitrato de cobre 3 H ₂ O	Acetato de cobre H ₂ O
<i>S. aureus</i> M10	400 µg/ml	400 µg/ml	600 µg/ml	400 µg/ml
<i>S. aureus</i> M27	1.400 µg/ml	1.000 µg/ml	1.600 µg/ml	1.600 µg/ml
<i>S. aureus</i> M-39	1.000 µg/ml	600 µg/ml	1.000 µg/ml	1.000 µg/ml
<i>S. aureus</i> M-54	1.000 µg/ml	1.200 µg/ml	1.400 µg/ml	1.600 µg/ml
<i>E. coli</i> M19-C1	1.000 µg/ml	800 µg/ml	1.200 µg/ml	1.400 µg/ml
<i>E. coli</i> M21-C1	1.400 µg/ml	1.000 µg/ml	1.800 µg/ml	1.600 µg/ml
<i>E. coli</i> M64-C3	1.200 µg/ml	600 µg/ml	2.000 µg/ml	1.000 µg/ml
<i>P. rettgeri</i> M17-C2	1.400 µg/ml	1.000 µg/ml	1.800 µg/ml	1.600 µg/ml
<i>P. mirabilis</i> M45-C1	1.200 µg/ml	1.000 µg/ml	1.600 µg/ml	1.600 µg/ml
<i>P. aeruginosa</i> M8	1.800 µg/ml	1.000 µg/ml	2.000 µg/ml	1.400 µg/ml
<i>P. aeruginosa</i> M59	1.200 µg/ml	1.000 µg/ml	1.600 µg/ml	1.200 µg/ml
<i>P. aeruginosa</i> M65-C3	1.000 µg/ml	600 µg/ml	1.600 µg/ml	1.000 µg/ml
<i>A. baumannii</i> M16	1.000 µg/ml	600 µg/ml	1.400 µg/ml	1.000 µg/ml

Discusión

Las úlceras cutáneas crónicas ofrecen un nicho ecológico ideal para la multiplicación microbiana, por la pérdida de integridad cutánea, hipoxia tisular y por contaminación de la lesión expuesta. Siendo la infección de estas, uno de los factores que retrasa su cicatrización, llegando a complicaciones que pueden ser osteomielitis, bacteriemia o celulitis^{31,32}.

De acuerdo a los datos obtenidos en la presente investigación, a partir de 155 cepas recuperadas de pacientes que presentaron los criterios de IUCC, destaca que el 71,6% (111 cepas) correspondieron a los pacientes portadores de úlceras venosas, concordando con lo descrito en la literatura, la que considera a ésta lesión la más frecuente en extremidades, afectando al 1% de la población general y al 3% de los mayores de 80 años^{32,33}.

Algunos microorganismos presentes en las úlceras crónicas son capaces de formar matriz de polisacáridos y unirse en forma de biopelícula (biofilms) protegiéndolos de los antimicrobianos transformándolos en resistentes debido a su organización *in vivo*³⁴. La infección suele ser de tipo polimicrobiana, siendo *S. aureus* el agente que con más frecuencia se aísla^{31,35,36}. El 75% de las cepas de *S. aureus* recuperados en la presente investigación fueron resistentes a quinolonas, betalactámicos, cefoxitina, evidenciando alta frecuencia de cepas SAMR (Tabla 3). Para las enterobacterias recuperadas la resistencia a amikacina alcanzó un 20%; destacamos que todas las cepas analizadas no presentaron sensibilidad a cefalotina.

En bacilos no fermentadores (BNF), la susceptibilidad *in vitro* de cepas clínicas aisladas desde úlceras crónicas infectadas muestran resistencia a las quinolonas (ciprofloxacino) y betalactámicos (ceftazidima), además observamos que las cuatro cepas de *P. aeruginosa* son multirresistentes.

De acuerdo a la literatura, el cobre (Cu) como un metal de transición se produce en la naturaleza en varios estados de oxidación, comúnmente utilizado en forma de sulfato, el sulfato de cobre (I) o sulfato cuproso, es una sal insoluble y poco estable por lo que es menos frecuente que el sulfato de cobre (II), una sal soluble en agua que puede presentarse como sulfato cúprico (CuSO_4) o sulfato cúprico pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), este último es, en la práctica, el de preferencia para ser utilizado como antibacteriano en diversos ámbitos³⁷.

La caracterización realizada de las cinco partículas de cobre, permitió determinar que cuatro de ellas presentan un contenido de cobre similar (26 a 36%), solo dos (acetato de cobre monohidratado y nitrato de cobre Tri-hidratado) presentan liberación inmediata, elevada y prolongada, hasta por lo menos 48 h que duró la medición (Tabla 2). La CIM promedio para acetato de cobre fue igual a 826,6 $\mu\text{g/ml}$ y para el nitrato de cobre trihidratado la CIM promedio fue de 1.133,33 $\mu\text{g/ml}$. Se destaca que, esta cantidad en aplicación tópica en el ser humano es cercana a la recomendación de ingesta diaria establecida por la Junta de Nutrición y Alimentos del Instituto de Medicina, cifra que alcanza a los 900 microgramos/día.

En conclusión, la presente investigación establece la caracterización morfológica de las partículas de cobre y su capacidad de liberación, determinando que ambos compuestos, acetato monohidratado y nitrato trihidratado de cobre, son capaces de eliminar bacterias resistentes.

En la última década ha existido un aumento tanto en la proporción y en número absoluto de patógenos bacterianos que presentan multi-resistencia a los agentes antimicrobianos, organizaciones tales como Centro de Enfermedades Infecciosas de Atlanta (CDC), el Centro Europeo para la prevención y control de enfermedades (ECDC) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), están considerando las infecciones causada por bacterias resistentes a múltiples fármacos (MDR) como una enfermedad global emergente y un importante problema en salud pública.

De acuerdo a lo anterior, la necesidad de encontrar nuevos productos antibacterianos ha llevado a una serie de iniciativas, entre las que destaca la “promoción de la investigación y el desarrollo de nuevas estrategias antimicrobianas y agentes antibacterianos”³⁸.

Es materia de futuros estudios, evaluar si con estos dos compuestos estudiados en el presente trabajo se obtienen resultados similares *in vivo*; lo que permitiría proponer a este grupo de investigación, una aplicación diferente a la utilización del cobre en áreas hospitalarias, atención primaria y ambulatorias³⁹⁻⁴⁰.

Agradecimientos: Los autores agradecen a la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT), Ministerio de Educación Chile, por financiar el proyecto FONDEF-

IDEA número de folio: CA13i10225, cuyos datos parciales son presentados en este documento.

Referencias

1. Mustoe T. Understanding chronic wounds: a unifying hypothesis on the pathogenesis and implications for therapy. *Am J Surg* 2004; 187 (5A): 65-70.
2. Beebe-Dimmer J, Pfeifer J, Engle J, Schottenfeld D. The Epidemiology of Chronic Venous Insufficiency and Varicose Veins. *Ann Epidemiol* 2005; 15 (3): 175-84.
3. Aburto I, Morgado P. Gestión en manejo avanzado de heridas y úlceras en Chile. *Rev Chil Heridas & Ostomias* 2010; 1: 5-12.
4. Aburto I, Morgado P. guía clínica curación avanzada de las úlceras de pie diabético. Ministerio de Salud. Gobierno de Chile. Programa de salud cardiovascular. Santiago. 2005 (consultado en enero de 2012). http://www.redsalud.gov.cl/archivos/saludcardiovascular/Guia_clinica_Curacion_Pie_Diabético.pdf
5. Gardner SE, Frantz RA, Doeberling BN. The validity of the clinical signs and symptoms used to identify localized chronic wound infection. *Wound Repair Regen* 2001; 9 (3): 178-186.
6. Oyibo SO, Jude EB, Tarawnweh Y, Nguyen HC, Armstrong DG, Harkless LB. The effects of ulcer size and site, patient's age, sex and type and duration of diabetes on the outcome of diabetic foot ulcers. *Diabet Med* 2001; 18: 133-8.
7. Gottrup F. Management of the diabetic foot: surgical and organizational aspects. *Horm Metab Res* 2005; 37 Suppl 1: 69-75.
8. Iribarren O, Passi G, Aybar N, Ríos P, González L, Rojas M, et al. Pie diabético: Evolución en una serie de 121 pacientes. *Rev Chil Cir* 2007; 59 (5): 37-341.
9. Bergin SM, Wraight P. Apósitos para heridas y agentes tópicos con plata para el tratamiento de la úlcera del pie diabético (Revisión Cochrane traducida). En: La Biblioteca Cochrane Plus, 2007, Número 4. Oxford: Update Software Ltd. Disponible en: <http://www.update-software.com>
10. Van Hessel P, Gashe BA, Ahmad J. Colloidal silver as an antimicrobial agent: fact or fiction? *J Wound Care* 2004; 13 (4): 154-5.
11. Ministerio de Salud. Gobierno de Chile. Encuesta Nacional de salud ENS 2009-2010, (consultado el 24 de marzo de 2012), disponible en <http://www.minsal.gob.cl/portal/url/item/bcb03d7bc28b64dfe040010165012d23.pdf>
12. Calderón A. Perfil de pacientes en curación avanzada de úlceras de pie diabético, en el consultorio Pudahuel poniente de la Región Metropolitana de Santiago. *Rev Chil Heridas & Ostomias* 2011; 2: 78-82.
13. Thomas S, McCubbin P. An in-vitro analysis of the antimicrobial properties of 10 silver-containing dressings. *J Wound Care* 2003; 12 (8): 305-8.
14. Aburto I, Juliet C, Salas C. El efecto de la polimihexanida con betaína en el biofilm en las úlceras venosas. 2010. Consultado el 15 marzo de 2012 disponible en (<http://www.inheridas.cl/wpcontent/uploads/Revision-Resumen-Prontosan.pdf>).
15. Perelshtein I, Applerot G, Perkas N, Wenhrschuetz-Sigl E, Hasmann A, Guebitz G, et al. CuO-cotton nanocomposite: Formation, morphology, and antibacterial activity. *Surface & Coatings Technology* 2009; 204: 54-7.
16. Ameer A, Arham A, Mohammad O, Mohammad SK, Sammi H, Adnan M. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. *Int J Nanomedicine* 2012; 7: 6003-9.
17. Faúndez G, Troncoso M, Navarrete P, Figueroa G. Antimicrobial activity of copper surfaces against suspensions of *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni*. *BMC Microbiol* 2004; 4: 19.
18. Itoh S, Kim HW, Nakagawa O, Ozumi K, Lessner SM, Aoki H, et al. Novel role of antioxidant-1 (Atox1) as a copper-dependent transcription factor involved in cell proliferation. *J Biol Chem* 2008; 283 (14): 9157-67.
19. Borkow G, Gabbay J, Dardik R, Eidelman AL, Lavie Y, Grunfeld Y, et al. Molecular mechanisms of enhanced wound healing by copper oxide-impregnated dressings. *Wound Rep Regen* 2010; 18: 266-25.
20. Cioffi N, Torsi L, Ditarantano G, Tantalillo L, Ghibelli L, Sabbatini L, et al. Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties. *Chem Mater* 2005; 17 (21): 5255-62.
21. Zhang W, Zhang YH, Ji JH, Zhao J, Yan Q, Chu PK. Antimicrobial properties of copper plasma-modified polyethylene. *Polymer* 2006; 47: 7441-5.
22. Palza H, Gutiérrez S, Delgado K, Salazar O, Fuenzalida V, Ávila J, et al. Toward tailor-made biocide materials based on polypropylene/copper nanoparticles. *Macromolecular Rapid Communications* 2009; 31 (6): 563-7.
23. Delgado K, Quijada R, Palma R, Palza H. Polypropylene white embedded copper metal or copper oxide nanoparticles as a novel plastic antimicrobial agent. *Lett Appl Microbiol* 2011; 53 (1): 50-4.
24. Zhang E, Li F, Wang H, Liu J, Wang C, Li M, Yang K. A new antibacterial titanium-copper sintered alloy: Preparation and antibacterial property. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2013; 33 (7): 4280-7.
25. Achard ME, Stafford SL, Bojil NJ, Chartres J, Bernhardt

- PV, Schembri MA, et al. Copper redistribution in murine macrophages in response to *Salmonella* infection. *Biochem J* 2012; 444: 51-7.
26. Gosau M, Bürgers R, Vollkommer T, Holzmann T, Prantl L. Effectiveness of antibacterial copper additives in silicone implants. *J Biomater Appl* 2013; 28 (2): 187-98.
 27. Amachawadi RG, Scott HM, Alvarado CA, Mainini TR, Vinasco J, Drouillard JS, et al. Occurrence of the transferable copper resistance gene *tcuB* among fecal enterococci of US feedlot cattle fed copper-supplemented diets. *Appl Environ Microbiol* 2013; 79: 4369-75.
 28. Rowland J, Niederweis M. A multicopper oxidase is required for copper resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 2013; 195: 3724-33.
 29. Ministerio de Salud, Chile. Departamento de Epidemiología & Departamento de Promoción de la Salud. [internet]. 2000 [citado el 27 de mayo de 2016]; disponible en: http://www.ine.cl/canales/chile_estadistico/calidad_de_vida_y_salud/calidadvida/finalnacional.pdf
 30. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). M02-A10. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test; approved standard. Tenth edition. Pennsylvania, 2009.
 31. Franks P, Barker J, Collier M, et al. Management of Patients with Venous Leg Ulcer: Challenges and Current Best Practice. *J Wound Care* 2016; 25 Suppl 6: S1-S67.
 32. European Wound Management Association (EWMA). Position Document: identifying criteria for wound infection. London: MEP Ltd, 2005.
 33. O'Meara S, Al-Kurdi D, Ologun Y, Ovington LG, Martyn-St James M, Richardson R. Antibiotics and antiseptics for venous leg ulcers (Review) *Cochrane* 2014 [citado el 27 de marzo de 2016]; disponible en: http://www.cochrane.org/CD003557/WOUNDS_antibiotics-and-antiseptics-to-help-healing-venous-leg-ulcers.
 34. Stickler DJ. Susceptibility of antibiotic-resistant Gram-negative bacteria to biocides: a perspective from the study of catheter biofilms. *J Appl Microbiol* 2002; 92 s: 163s-70s.
 35. Gottrup F, Apelqvist J, Bjarnsholt T, Cooper R, Moore Z, Peters EJ, et al. EWMA Document: Antimicrobials and Non-healing Wounds-Evidence, Controversies and Suggestions. *J Wound Care* 2013; 22 (5 Suppl.): S1- S92.
 36. Stickler DJ. Susceptibility of antibiotic-resistant Gram-negative bacteria to biocides: a perspective from the study of catheter biofilms. *J Appl Microbiol* 2002; 92 s: 163s-70s.
 37. Grass G, Rensing C, Solioz M. Metallic copper as an antimicrobial surface. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77 (5): 1541-7.
 38. Roca I, Akova M, Baquero F, Carlet J, Cavalieri M, Coenen S, et al. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes New Infect* 2015; 6: 22-9.
 39. Prado JV, Vidal AR, Durán TC. [Application of copper bactericidal properties in medical practice]. *Rev Med Chile* 2012; 140: 1325-1332.
 40. Rivero P, Brenner P, Nercelles P. Impacto del cobre en la reducción de infecciones intrahospitalarias, mortalidad y gasto en antimicrobianos en una unidad de cuidados intensivos de adultos. *Rev Chil Infectol* [internet]. 2014 jun [citado el 27 de mayo de 2016]; 31 (3): 274-9. disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0716-10182014000300004&lng=es