

Universidad Nacional
Federico Villarreal

Vicerrectorado de
INVESTIGACION

ESCUELA UNIVERSITARIA DE POSGRADO

**“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE UN ACEITE OZONIZADO DE GIRASOL
EN *PORPHYROMONAS GINGIVALIS* AGENTE CAUSAL DE LA ENFERMEDAD
PERIODONTAL, 2019”**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTORA EN ODONTOLOGÍA

AUTORA:

LI PEREYRA CARMEN DEL PILAR

ASESOR:

DR. LOZANO ZANELLY GLENN

JURADOS:

DR. MIRAVAL ROJAS EDGAR JESÚS

DRA. CRUZ GONZALES GLORIA ESPERANZA

DRA. TEMOCHE HUERTAS ABIGAIL

LIMA – PERÚ

2020

DEDICATORIA

A mi padre por enseñarme que la educación es la herramienta más poderosa para ser libre.

A Justo, por compartir esta meta profesional.

A mi hija por ser mi motivación y orgullo.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por permitirme hacer realidad un sueño personal.

Al asesor de mi tesis por su voluntad, dedicación y experiencia para la culminación del presente trabajo de investigación.

Expreso mi eterna gratitud a todas las personas que incondicionalmente me brindaron su apoyo.

Índice

Resumen.....	xi
Abstract.....	xii
Resumo.....	xiii
I Introducción.....	1
1.1 Planeamiento del problema.....	2
1.2 Descripción del Problema	3
1.3 Formulación del Problema.....	5
Problema General.....	5
Problemas Específicos.....	5
1.4 Antecedentes.....	6
1.4.1. Antecedentes internacionales.....	6
1.4.2 Antecedentes nacionales.....	10
1.5 Justificación de la investigación.....	11
1.6 Limitaciones del a investigación.....	13
1.7 Objetivos de la Investigación.....	14
1.7.1. Objetivo General	14
1.7.2. Objetivos Específicos.....	14
1.8 Hipótesis.....	15
1.8.1 Hipótesis General.....	15
1.8.2 Hipótesis Especificas	15

II	Marco Teórico.....	16
	2.1 Marco conceptual.....	16
	2.1.1 Ozono.....	16
	2.1.2 Ozonoterapia.....	17
	2.1.2.1 Ozonoterapia en Odontología.....	18
	2.1.2.2 Contraindicaciones de la Ozonoterapia.....	18
	2.1.3 Generadores de ozono.....	19
	2.1.4 Aceite Ozonizado.....	20
	2.1.4.1 Mecanismo de acción.....	21
	2.1.5 Oleozon®.....	22
	2.1.6 Enfermedad periodontal.....	24
	2.1.6.1 Microbiología de la Enfermedad Periodontal.....	25
	2.1.6.2. <i>Porphyromonas gingivalis</i> (Pg).....	26
	2.1.6.3 Clorhexina.....	30
	2.2 Marco Filosófico	32
	2.2.1 Actividad bactericida	32
	2.2.2 Ozono	33
III	Método.....	34
	3.1 Tipo de investigación	34
	3.1.1 Diseño de Investigación	34
	3.2 Población y muestra	34
	3.2.1 Población	34
	3.2.2 Muestra.....	34

3.3 Operacionalización de las variables	35
3.4 Instrumentos	36
3.5 Procedimientos.....	37
3.5.1 Material y métodos	37
3.5.1.1 Productos utilizados.....	37
3.5.1.2 Procedimiento de rehidratación de la cepa.....	37
3.5.1.3 Medio de cultivo.....	38
3.5.1.4 Sistema de Anaerobiosis.....	38
3.5.1.5 Cultivo de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	39
3.6 Análisis de datos.....	40
IV Resultados.....	41
4.1 Contratación de la hipótesis	41
4.2 Análisis e interpretación de los resultados	50
V Discusión de resultados.....	54
VI Conclusiones.....	57
VII Recomendaciones.....	58
VIII Referencias	59
IX Anexos.....	67

Índice de tablas

Tabla 1	Clasificación de enfermedades y condiciones periodontales y peri implantares ..25
Tabla 2	Efecto antibacteriano según halo de inhibición a las 72 horas.....42
Tabla 3	Resumen de la prueba hipótesis 143
Tabla 4	Prueba de comparaciones múltiples a las 72 horas.....43
Tabla 5	Efecto antibacteriano según halo de inhibición a las 120 horas.....45
Tabla 6	Resumen de la Prueba hipótesis 246
Tabla 7	Prueba de comparaciones múltiples a las 120 horas.....46
Tabla 8	Tabla cruzada según producto utilizado y sensibilidad bacteriana..... 48
Tabla 9	Pruebas de Chi cuadrado.....49
Tabla 10	Resultados de los halos de inhibición en milímetros a las 72 horas.....50
Tabla 11	Resultados de los halos de inhibición en milímetros a las 120 horas51
Tabla 12	Sensibilidad bacteriana según escala de Duraffourd52
Tabla 13	Sensibilidad bacteriana según promedios en escala de Duraffourd.....53

Índice de figuras

Figura 1	Reacción simplificada de formación de lipoperóxidos a partir de un lípido insaturado y gas de ozono.....	20
Figura 2	Estructura química de la molécula clorhexidina.....	31
Figura 3	Aceite ozonizado de girasol marca OLEOZON ® y Clorhexidina al 0,12% + cloruro de cetilpiridinio 0,05% de la marca PERIO AID.....	76
Figura 4	Cepa: <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277, Microbiologics.....	76
Figura 5	Rompimiento del sobre con cepas <i>Porphyromonas gingivalis</i>	77
Figura 6	Capsula con cepa de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	77
Figura 7	Hidratación de cepa de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	77
Figura 8	Siembra de <i>Porphyromonas gingivalis</i> en el medio de cultivo.....	77
Figura 9	Placa sembrada con <i>Porphyromonas gingivalis</i> dentro de un sobre de incubación	78
Figura 10	Sobre de incubación con indicador de anaerobiosis Anaerotest® Merck	78
Figura 11	Indicador de anaerobiosis Anaerotest® (Merck).....	78
Figura 12	Anaerocult®	78
Figura 13	Colocación del Anaerocult® humedecido con 3ml de agua.....	78
Figura 14	Sellado con un Anaeroclip ® – Merck.....	79
Figura 15	Cultivo de <i>Porphyromonas gingivalis</i> a los 5 días: colonias negras.....	79
Figura 16	Hisopo humedecido en suero fisiológico donde se recoge la cepa	80
Figura 17	Suspensión en suero fisiológico hasta lograr una turbidez al tubo 0,5 de la escala de Mc Farland	80

Figura 18	Sembrado de las <i>Porphyromonas gingivalis</i> en placas de agar Brucella sangre con hematina y menadiona por diseminación en tres direcciones.....	80
Figura 19	Perforación de 6mm con sacabocado de acero	81
Figura 20	Placa Petri con tres perforaciones	81
Figura 21	Adición de 50 μ L a cada perforación.....	81
Figura 22	Placa Petri 1	82
Figura 23	Placa Petri 2.....	82
Figura 24	Placa Petri 3	83
Figura 25	Placa Petri 4.....	83
Figura 26	Placa Petri 5.....	84
Figura 27	Placa Petri 6.....	84
Figura 28	Placa Petri 7.....	85
Figura 29	Placa Petri 8.....	85
Figura 30	Placa Petri 9.....	86
Figura 31	Placa Petri 10.....	86
Figura 32	Promedios de halos de inhibición en <i>Porphyromonas gingivales</i>	87
Figura 33	Diferencias del halo de inhibición en la distribución de los grupos a las 72 horas	88
Figura 34	Diferencias del halo de inhibición en la distribución de los grupos a las 120 horas.....	88
Figura 35	Sensibilidad bacteriana según Chi cuadrado	89

Índice de anexos

Anexo 1	Ficha de recolección de datos	68
Anexo 2	Guía de validación de expertos	69
Anexo 3	Constancia de Laboratorio Microbiológico.....	75
Anexo 4	Productos utilizados.....	76
Anexo 5	Procedimiento de rehidratación de las cepas.....	77
Anexo 6	Sistema de anaerobiosis: Sistema Anaerocult® P. Merck.....	78
Anexo 7	Cultivo de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	79
Anexo 8	Figuras de las Placas Petri.....	82
Anexo 9	Figuras de los resultados de la investigación	87
Anexo 10	Matriz de consistencia	90

RESUMEN

Objetivo: Determinar la actividad antibacteriana de un aceite ozonizado de girasol en *Porphyromonas gingivalis* agente causal de la enfermedad periodontal, 2019.

Tipo y diseño: el tipo de investigación fue experimental, prospectivo, longitudinal, analítico. La población estuvo conformada por cepas de *Porphyromonas gingivales* (CODIGO ATCC 33277), en 10 placas Petri, conformadas por 60 unidades de muestra. La selección del número de muestra se hizo del tipo no probabilístico aleatorio simple por conveniencia, empleándose una ficha de recolección de datos elaborada y validada para la presente investigación, registrándose 30 datos a los 72 y 30 datos a las 120 horas. La actividad antibacteriana se estimó según formación del halo de inhibición y sensibilidad bacteriana en la escala de Duraffourd comparada con clorhexidina 0,12% + cetilpiridinio 0,05% y aceite de girasol 100%. Estadísticamente se valoró con la prueba no paramétrica Kurskal-Wallis, la prueba de Corrección de Bonferroni y para la sensibilidad bacteriana se usó la prueba estadística de Chi cuadrado.

Resultados: el aceite ozonizado de girasol presento un halo de inhibición de 23mm como máximo y 18mm como mínimo a las 72 y 120 horas. Cualitativamente posee sensibilidad media a sumamente sensible según escala de Duraffourd, ($p < 0.001$).

Conclusión: el aceite ozonizado de girasol tiene actividad antibacteriana en *Porphyromonas gingivales* in vitro.

Palabras claves: Actividad antibacteriana, aceite ozonizado de girasol, *Porphyromonas gingivalis*.

ABSTRACT

Objective: To determine the antibacterial activity of an ozonized sunflower oil in *Porphyromonas gingivalis* causative agent of periodontal disease, 2019.

Type and design: The type of research was experimental, prospective, longitudinal, and analytical. The population consisted of strains of *Porphyromonas gingivalis* (ATCC CODE 33277), in 10 Petri dishes, made up of 60 sample units. The selection of the sample number was made of the simple random non-probabilistic type for convenience, using a data collection sheet prepared and validated for the present investigation, registering 30 data at 72 and 30 data at 120 hours. The antibacterial activity was estimated by the formation of the inhibition halo in millimeters, and bacterial sensitivity according to the Duraffourd scale compared with 0,12% chlorhexidine + 0,05% cetylpyridinium and 100% sunflower oil. Statistically, it was assessed with the non-parametric Kurskal-Wallis test, the Bonferroni Correction Test and the Chi squared statistical test was used for bacterial sensitivity

Results: the ozonized sunflower oil showed an inhibition halo of 23mm maximum and 18mm minimum at 72 and 120 hours. Qualitatively it has medium sensitivity to extremely sensitive ($p < 0.001$).

Conclusion: the ozonized sunflower oil has antibacterial activity in gingival *Porphyromonas gingivalis* in vitro.

Key words: Antibacterial activity, ozonized sunflower oil, *Porphyromonas gingivalis*

RESUMO

Objetivo: Determinar a atividade antibacteriana de um óleo de girassol ozonizado em *Porphyromonas gingivalis* agente causador de doença periodontal, 2019.

Tipo e desenho: O tipo de pesquisa foi experimental, prospectivo, longitudinal, analítico. A população consistia de estirpes *Porphyromonas gingivalis* (CÓDIGO ATCC 33277) em 10 placas de Petri, constituídos por 60 unidades da amostra. A seleção do número da amostra foi feita do tipo aleatório simples não probabilístico por conveniência, utilizando uma folha de coleta de dados preparada e validada para a presente investigação, registrando 30 dados em 72 e 30 dados em 120 horas. A atividade antibacteriana foi estimada de acordo com a formação da halo de inibição e sensibilidade bacteriana na escala Duraffourd comparada com clorexidina 0,12% + cetilpiridínio 0,05% e óleo de girassol 100%. Estatisticamente, foi avaliado com o teste não paramétrico de Kurskal-Wallis, o teste de correção de Bonferroni e o teste estatístico de Qui quadrado para sensibilidade bacteriana.

Resultados: o óleo de girassol ozonizado apresentou halo de inibição de 23 mm no máximo e 18 mm no mínimo a 72 e 120 horas. Qualitativamente tem sensibilidade de média a alta sensibilidade de acordo com a escala Duraffourd ($p < 0.001$).

Conclusão: o óleo de girassol ozonizado possui atividade antibacteriana in vitro *Porphyromonas gingivalis*.

Palavras-chave: Atividade antibacteriana, óleo de girassol ozonizado, *Porphyromonas gingivalis*

I. Introducción

Según la Organización Mundial de la Salud, la enfermedad periodontal está considerada como una enfermedad prevenible o tratada desde su inicio, considerada en el 2016 como la undécima enfermedad más prevalente a nivel mundial (Organización Mundial de la Salud, 2018). En casos avanzados, puede provocar la pérdida de dientes, su etiología principal es la presencia de periodonto patógenos.

La *Porhyromonas gingivalis* es una de las principales bacterias encontrada en la periodontitis, relacionándola con el inicio y evolución de la enfermedad periodontal. La prescripción de fármacos de manera local o sistémica está establecida en el protocolo de tratamiento. Encontrar una alternativa en el tratamiento local que posea capacidad antiinflamatoria, bactericida, y que no cause resistencia, es un ideal.

El uso de un aceite ozonizado de girasol en el tratamiento local de la periodontitis es una opción que considerar, por su capacidad germicida ampliamente demostrada, y de bajo costo. En la presente investigación se ha trabajado los siguientes aspectos:

Capítulo I: Se describe el planteamiento, descripción y antecedentes del problema, lo que me permitió formular la pregunta de investigación, los objetivos y la justificación.

Capítulo II: Marco Teórico, se realizó el marco teórico y conceptual, describiendo las variables de investigación para dar sustento al trabajo de investigación.

Capítulo III: Método, describe el tipo y diseño de investigación, se distinguen las variables, se determina la población y muestra; así como las técnicas de investigación.

Capítulo IV: Presentación de resultados, se presenta a manera de tablas y la aplicación de pruebas estadísticas, con su respectivo análisis e interpretación, para responder las hipótesis y objetivos planteados

Capítulo V: Discusión de los resultados, se compara los resultados con otras investigaciones lo que ha permitido realizar en el capítulo VI las conclusiones y en el capítulo VII las recomendaciones como aporte del trabajo de investigación. Finalmente se presenta en el capítulo VIII las referencias bibliográficas, enumerándose las fuentes de información, que han sido de utilidad para el desarrollo de este trabajo de investigación.

1.1 Planteamiento del problema

Desde hace más de 100 años, el ozono se emplea en productos medicinales, farmacéuticos y cosméticos, en diferentes formas.

En Cuba en 1993, se crea el Centro de Investigaciones del Ozono (CIO) que forma parte del Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), realiza estudios del ozono médico, comprobando propiedades no solamente por sí solo, sino también, en productos de reacción con este gas, como fueron algunos aceites vegetales, como el de girasol, oliva, coco y otros. Convirtiéndose de esta manera, vehículos ozonizados, con propiedades germicidas muy marcados (Díaz,2010). En la actualidad, la terapia con ozono médico en el Perú se encuentra aplicando en varias clínicas, inclusive en ESSALUD, en el área de Medicina Complementaria y Alternativa (IETSI,2018).

La enfermedad periodontal es causada por complejos bacterianos subgingivales organizados en un biofilm. Los periodontos patógenos que se encuentran asociados principalmente son las *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Eikenella corrodens*, *Tannerella forsythia*, y bacilos entéricos gramnegativos (Cruz, 2014).

La *Porphyromonas gingivalis* es un bacilo gram negativo anaerobio, asacarolítico, reconocido como factor predominante en la periodontitis en humanos. Además, se le relaciona en otras patologías sistémicas como factor secundario, como es en la enfermedad cardíaca aterosclerótica o neumonía por aspiración. Este patógeno es uno de lo más estudiados, su patogenicidad está atribuida por tener factores de virulencia, como las proteinasas de cisteína (gingipainas), hemaglutininas, lipopolisacáridos (LPS) y fimbrias, favoreciendo su colonización e invasión a los tejidos del huésped (Cruz, E., Ramirez, J.y Contreras,A.,2014).

El ozono médico, tiene efecto de oxidación con un notable potencial antimicrobiano y con característica desinfectante en aplicaciones clínicas de la odontología. El empleo de un aceite ozonizado de girasol en el tratamiento clínico local en la enfermedad periodontal es una opción que puede ser tomada en cuenta, por su característica bactericida.

1.2.Descripción del problema

El Ozono es un gas inestable, formado por tres átomos de oxígeno, se encuentra en la atmosfera y se descompone con facilidad, dependiendo de la temperatura y no deja residuos tóxicos (Martínez y Rubio 2007). En medicina fue utilizado en la Primera Guerra mundial, para desinfección y curación de heridas. En odontología, fue el dentista suizo E.A. Fish, el primero en emplearlo como desinfectante. Describe que lo aplicaba previamente a la realización de cirugías, y en el tratamiento de conductos radiculares (Padilla, 2016).

El ozono médico, es producido con oxígeno de uso medicinal, empleando un generador atóxico, fiable, con mediciones reproducibles y precisas de concentraciones de ozono, consiguiéndose una mezcla de ozono en oxígeno, en concentraciones de 0,5 a 5 % de ozono. Los generadores de ozono, en la Unión Europea, están considerados como productos sanitarios con la calificación II-b, debidamente registrados (WFOT, 2015). La característica principal del ozono médico es su capacidad bactericida elevada, pero su gran desventaja es su inestabilidad, por lo que se aplica inmediatamente después de ser producido. No obstante, una reacción controlada del ozono médico con los ácidos grasos, se va a obtener derivados oxidados, con características bactericidas, que pueden ser estables hasta por 2-3 años a bajas temperaturas. (Martínez, Re, Pérez-Davison y Horwart, 2012).

La enfermedad periodontal, afecta al periodonto, es considerada compleja, multifactorial y progresiva, caracterizada por la actividad bacteriana, que va a ser destructiva en el huésped, ocasionando pérdida de la inserción periodontal, del hueso y dientes. Encontrándose en casos crónicos, bolsas periodontales, que sirve de hábitat a las bacterias en algunos casos resistentes a antibióticos (Peña, Díaz, Ferrer, Aguilar, y Santos, 2015).

La *Porphyromonas gingivalis*, es un anaerobia gram - negativa, caracterizada por poseer factores de virulencia, que se relacionan con la respuesta inflamatoria en el periodonto. Inclusive a bajos niveles de colonización, alteran el microbiota bucal. Su mejor hábitat es en el surco subgingival de las piezas dentarias, ya que esta zona favorece la fermentación de aminoácidos para la producción de energía necesaria para su supervivencia en la bolsa periodontal profunda, donde la disponibilidad de azúcar es baja.

La enfermedad periodontal es de naturaleza polimicrobiana dentro del contexto de las comunidades de biopelículas subgingivales. Describen que las *Porphyromonas gingivalis* funcionen en acción concertada con otras especies, para beneficio mutuo. Es por

eso que se considera una especie "clave" en las biopelículas subgingivales (Bostanci y Belibasakis, 2012)

El tratamiento odontológico convencional de la enfermedad periodontal consiste en una terapia local y en casos severos sistémica, basada principalmente en una terapia mecánica y en el uso de bacteriostáticos y bactericidas con la finalidad de reducir y eliminar las bacterias presentes.

La presente investigación, tuvo como finalidad, determinar la actividad antibacteriana de un aceite ozonizado de girasol en *Porphyromonas gingivalis*, bacteria anaerobia, presente en el biofilm subgingival, considerado como uno de los principales periodonto patógeno, capaz de inducir a una respuesta inmuno-inflamatoria que puede ocasionar la destrucción de los tejidos periodontales, (Diaz et al 2012) contribuyendo de esta manera, a alcanzar una propuesta para el tratamiento local, simple, sencilla de bajo costo, que no afecte la resistencia antibiótica del huésped, con proyección social, y cuidando el medio ambiente.

1.3. Formulación del problema

-Problema general.

¿Cuál es la actividad antibacteriana de un aceite ozonizado de girasol en *Porphyromonas gingivalis* agente causal de la enfermedad periodontal, 2019?

-Problemas específicos.

- ¿Cuál es el efecto antibacteriano de un aceite ozonizado girasol en *Porphyromonas gingivalis* agente causal de la enfermedad periodontal en comparación a la Clorhexidina 0,12% (CHX) + Cloruro de cetilpiridinio 0,05% (CPC) a las 72 horas?

- ¿Cuál es el efecto antibacteriano de un aceite ozonizado de girasol en *Porphyromonas gingivalis* agente causal de la enfermedad periodontal en comparación a la Clorhexidina 0,12% (CHX) + Cloruro de cetilpiridinio 0,05% (CPC) a las 120 horas?
- ¿Cuál es la sensibilidad bacteriana producida por un aceite ozonizado de girasol y la Clorhexidina 0,12% (CHX) + Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% (CPC) en *Porphyromonas gingivalis* agente causal de la enfermedad periodontal?

1.4 Antecedentes

1.4.1. Antecedentes internacionales.

Montevecchi, Dorigo, Cricca y Checchi (2013) realizaron una investigación sobre la "comparación de la actividad antibacteriana de un aceite ozonizado, digluconato de clorhexidina y povidona yodada. Una prueba de difusión en disco" en el departamento de Periodoncia e Implantología, de la Facultad de Odontología, Alma Mater Studiorum. Italia. Concluyendo; que existen resultados prometedores para el aceite de oliva extra-virgen ozonizado (Novox®), en contra las *Staphylococcus aureus* (Sa) y *Porphyromonas gingivalis* (Pg), sugiriendo su uso para el tratamiento periodontal, ya que demostró una mejor eficacia antibacteriana en comparación al digluconato de clorhexidina al 0.2%. Recomendando ampliar investigaciones clínicas (Montevecchi et al.,2013)

Shoukheba y Ali (2014) evaluaron "los efectos de la aplicación subgingival de gel de aceite de oliva ozonizado en pacientes con periodontitis agresiva localizada. Un estudio clínico y bacteriológico" en el departamento de Medicina Oral, Periodoncia, Diagnóstico Oral y Radiología, de la Facultad de Odontología, Universidad de Tanta, Egipto. Concluyendo que la aplicación de ozono sirve como potencial agente antimicrobiano en el tratamiento de la enfermedad periodontal, tanto en la clínica, como en el domicilio. Además, recomiendan

estudios a largo tiempo para determinar adecuadamente la concentración de ozono eficaz sobre periodonto patógenos del tipo anaerobios (Shoukheba y Ali, 2014)

Strauss, Beza, Arias, y Melgar-Rodríguez (2014) evaluaron el " efecto antibacteriano del ozono en *Porphyromonas gingivalis*: estudio piloto in vitro". En la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, Santiago, Chile. Concluyendo. que el efecto antibacterial del ozono se puede modificar según tiempo de exposición, especie bacteriana, temperatura y concentración. El efecto dosis se cuantifico en milímetros según el diámetro del halo generado, observándose disminución en el número de UFC/ml de *Porphyromonas gingivalis* luego de la aplicación local de ozono a los 30, 48 y 60 segundos ($p < 0,05$). Observando un incremento del halo inhibitorio del crecimiento microbiano significativamente ($p < 0,01$) y positivamente ($R: 0,85$) con el tiempo de aplicación. Comprobándose además que el ozono posee un efecto antibacteriano sobre *Porphyromonas gingivalis* y este efecto depende del tiempo de exposición (Strauss et al.,2014).

Hayakumo, Arakawa, Takahashi, Kondo y Izumi (2014) investigaron sobre los " efectos del agua ozonizada en nano-burbuja en bacterias periodontopáticas y células orales", realizaron estudios in vitro en la Universidad Médica y dental de Tokio en Japón. Concluyendo que las unidades formadoras de colonias (UFC)/ml de *Porphyromonas gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* expuestas a agua ozonizada en nano burbujas (NBW3) cayeron por debajo del límite inferior de detección ($< 10 \text{ CFU/ ml} - 1$) después de 0.5 min de exposición y menores disminuciones en la viabilidad de las células del tejido oral después de 24 h de exposición a NBW3, lo que evidencia una potente actividad bactericida contra los periodontos patógenos, y además no es citotóxico para las células de los tejidos orales humanos. Recomendando El uso de NBW3 como complemento a la terapia periodontal sería prometedora (Hayakumo et al.,2014).

Peña, Díaz, Ferrer, Aguilar, y Santos (2015) realizaron un ensayo clínico-terapéutico controlado sobre la “ eficacia del Oleozon[®] en pacientes con periodontitis del adulto” del Servicio de Periodoncia en el Departamento de Estomatología del Hospital General Docente "Dr. Juan Bruno Zayas Alfonso" de Santiago de Cuba, en Cuba, en 48 pacientes, de forma aleatoria en dos grupos; 24 pacientes le aplicaron subgingivalmente el Oleozon[®] y otro control con 24 pacientes le irrigaron subgingivalmente de forma convencional con Clorhexidina, evaluando al primer y octavo día de tratamiento, la profundidad de las bolsas, el índice de sangrado y la recuperación de las características clínicas normales de la encía, validados estadísticamente mediante la prueba de CHI cuadrado: X^2 , con 95 % de confiabilidad. Encontrando: un resultado eficaz con el Oleozon[®] en el tratamiento alternativo no quirúrgico en la periodontitis (Peña et al.,2015).

Indurkar y Verma (2016) hicieron una investigación sobre el “efecto del aceite ozonizado y el gel de clorhexidina sobre la gingivitis inducida por placa: un ensayo clínico aleatorizado” en el Colegio y Hospital Dental del Gobierno, Aurangabad, Maharashtra, India. Realizaron un estudio en 20 sujetos de 18 a 65 años, por tres semanas. Concluyendo que el aceite ozonizado Ozonil[®] (60% de aceite de sésamo, 30% de aceite de girasol, 5% de aceite de ricino y aceite de tuvarak) y el gel de clorhexidina al 1 %, ambos se pueden usar como un agente eficaz para mantener y mejorar la salud gingival (Indurkar y Verma, 2016)

Pandya , Manohar , Mathur y Shankarapillai (2016) investigaron sobre la “ evaluación comparativa de dos soluciones de irrigación subgingival en el tratamiento de la enfermedad periodontal: un estudio clínico-microbiano” del departamento de Odontología, Colegio de Gobierno, Bhavnagar, Gujarat, India .La investigación fue en 10 individuos, donde se les realizo destartraje completo y se evaluó a los 30 días. Concluyendo que la terapia mecánica con o sin irrigación subgingival reduce la carga bacteriana y con el uso de la terapia de irrigación subgingival tuvo mejores resultados. Además, la irrigación subgingival con un

agente antimicrobiano durante 30 días como complemento de la terapia mecánica mejora la salud periodontal y puede tener un papel importante en la terapia periodontal. De los diferentes irrigantes subgingivales utilizados, el gluconato de clorhexidina al 0,2% es el más efectivo seguido del agua ozonizada, mientras que la solución salina es ineficaz cuando se compara con los otros dos irrigantes subgingivales (Pandya et al., 2016).

Isler , Unsal , Soysal , Ozcan, y Karaca (2018) investigaron sobre los " efectos de la ozonoterapia como complemento del tratamiento quirúrgico de la periimplantitis" en el Departamento de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de Gazí, Ankara, Turquía. El estudio se ejecutó en 41 pacientes, 19 mujeres y 22 hombres respectivamente, con periimplantitis moderada y avanzada, asignándose al azar un grupo de prueba (ozono) y otro control (agua salina estéril) para la descontaminación de las superficies del implante en SRT de periimplantitis. Los resultados clínicos y radiográficos se evaluaron durante un período de 12 meses. Concluyendo, que la descontaminación de la superficie del implante con el uso adicional de la terapia de ozono en periimplantitis clínica y radiográficamente fue significativamente mejor (Isler et al., 2018)

Pietrocola , Ceci, Preda, Poggio, y Colombo (2018) realizaron una investigación basada en " la evaluación de la actividad antibacteriana de un nuevo aceite de oliva ozonizado contra patógenos orales y periodontales" en el departamento de Medicina Molecular, Unidad de Bioquímica, de la Universidad de Pavía, Pavía, Italia. El estudio fue en *S. mutans*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. intermedia*, incubadas de 24 a 96 horas a 37°C. Probándose la capacidad antibacteriana de los compuestos con la prueba de difusión de agar de contacto directo (DCT) y concentraciones de inhibición mínima (MIC) y concentraciones de bactericida mínima (MBC). Se analizaron las diferencias mediante un análisis de varianza de una vía, ANOVA y una prueba de Tukey ($P < 0.05$). Concluyendo, que el aceite ozonizado fue un antiséptico relativamente moderado, en comparación a la clorhexidina (Pietrocola et al., 2018).

1.4.2. Antecedentes Nacionales

No se ha encontrado trabajos, similares actualizados del empleo del aceite ozonizado en la enfermedad periodontal, sin embargo, creo necesario referir:

Sánchez (2009) realizó un estudio sobre la " eficacia de los enjuagatorios con agua ozonizada en el control de los niveles de placa bacteriana y de *Streptococcus mutans* en cavidad oral " en la Universidad de Trujillo. Trujillo. Perú. El estudio fue de tipo longitudinal, prospectivo ,experimental, obteniendo resultados en la reducción de los *Streptococcus mutans* de 171.9×10^6 UFC/ml a 40.5×10^6 UFC/ml y de 178.9×10^6 UFC/ml a 29.2×10^6 UFC/ml y la placa bacteriana en la cavidad bucal en 66 escolares de 6 a 8 años de 74.3% a 45% y de 77.9% a 35.4% con el uso de enjuagatorios con agua ozonizada, corroborando su eficacia (Sánchez , 2009).

Horna (2014) realizó una investigación para comprobar la " efectividad de los enjuagatorios con agua ozonizada en el control del nivel de la placa dentobacteriana " en la Universidad de Trujillo, Trujillo, Perú. Fue una investigación de nivel aplicado, cuasiexperimental, el número de muestra fue de 108 alumnos divididos en tres grupos de 36, un grupo control, uno de aplicación de 30 segundos y 60 segundos por cuatro semanas. Concluyendo que los enjuagatorios con agua ozonizada son efectivos en relación con el tiempo de duración y periodo empleado, proponiendo su uso como agente para el control de la placa dentobacteriana (Horna, 2014).

Sosa (2015) realizó un trabajo de investigación sobre el "efecto antibacteriano in vitro del extracto alcohólico de *rosmarinus officinalis* (romero) y del agua ozonizada sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*" en la Universidad Señor de Sipán, Perú .Se investigo a dos concentraciones y 0,41 mg/ml y 0,82 mg/ml de agua ozonizada y el extracto de *R. officinalis* de 25mg/ml y 50mg /ml , como control positivo gluconato de clorhexina al

0,12%, en placas Petri sembradas y evaluadas a las 24 horas .Concluyendo que tiene efecto bactericida del *R. officinalis* de 25mg/ml y 50mg /ml sobre *S. mutans* y *E. faecalis* y es mayor cuando se le adiciona el agua ozonizada, comparativamente que con la clorhexina al 0,12% (Sosa,2015).

1.5 Justificación de la investigación

La presente investigación posee una justificación:

Teórica por encontrarse en la actualidad, investigaciones sobre el uso del ozono medico aplicados en medicina, con buenos resultados en múltiples patologías sistémicas ,debido a sus propiedades médicas y a la capacidad germicida frente a microorganismos, que pudieran ser aplicados satisfactoriamente en el área de odontología. Lo que nos permitió verificar su capacidad bactericida, sobre las *Porphyromonas gingivalis*, bacteria periodonto patogénica, presente en el biofilm de la enfermedad periodontal.

Metodológica, porque el resultado de la presente investigación permite verificar la capacidad antibacteriana de un aceite ozonizado frente a las colonias de *Porphyromonas gingivalis*, y al ser la enfermedad periodontal una patología, donde están presentes microorganismos, podría proponerse como tratamiento complementario no farmacológico convencional local.

Práctica, debido a que la enfermedad periodontal es de alta prevalencia a nivel mundial y nacional. Alcanzar una propuesta de fácil aplicación en los tejidos periodontales, por medio de un aceite ozonizado, que permita obtener resultados similares con los tratamientos farmacológicos locales convencionales, brindaran un aporte terapéutico, no antibiótica, compatible con el medio ambiente, y con la ventaja de no tener contraindicación si se emplea en la dosis médica establecida, y sobre todo de no poseer resistencia antibiótica.

Otra ventaja del aceite ozonizado es su estabilidad en comparación al gas de ozono médico, además permitirá reducir el costo de tratamiento, comparado con los agentes farmacológicos que se prescriben.

Otro punto para reflexionar sería que su uso puede trascender a otras especialidades odontológica.

Legal, porque la terapia con ozono está siendo empleado desde hace tiempo, en medicina en varios países, inclusive en nuestro país, en la especialidad de medicina alternativa, en varias afecciones médicas.

Se debe considerar que los aparatos generadores de ozono médico, posee permisos legales para su fabricación y con las autorizaciones para el uso. Asimismo, algunos productos, como aceites ozonizados, de aplicación local, cuentan los permisos farmacéuticos para ser aplicados.

1.6 Limitaciones de la investigación

La presente investigación podría haber tenido las siguientes limitaciones:

- Los conflictos éticos que pudieron estar presente en esta investigación fueron subsanados por su diseño experimental in vitro.
- Los recursos materiales e instrumentales no fueron limitaciones ya que fueron conseguidos por el investigador permitiendo el desarrollo de la presente investigación.
- La información sobre investigaciones similares en nuestro medio fueron pocas, pero fue subsanado por existir investigaciones similares realizadas en universidades y centros médicos alrededor del mundo.
- El diseño por ser experimental tuvo la necesidad de realizar un proceso microbiológico para el cultivo de las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, lo que pudo subsanarse por encontrar un laboratorio clínico privado a cargo de un médico patólogo de amplia experiencia en el medio.

1.7 Objetivos de la investigación

1.7.1 Objetivo General

Determinar la actividad antibacteriana de un aceite ozonizado de girasol en *Porphyromonas gingivalis* agente causal de la enfermedad periodontal, 2019

1.7.2 Objetivos Específicos

- Describir el efecto antibacteriano de un aceite ozonizado de girasol en *Porphyromonas gingivalis* agente causal de la enfermedad periodontal en comparación a la Clorhexidina 0,12% (CHX) + Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% (CPC) a las 72 horas.
- Describir el efecto antibacteriano de un aceite ozonizado de girasol en *Porphyromonas gingivalis* agente causal de la enfermedad periodontal en comparación a la Clorhexidina 0,12% (CHX) + Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% (CPC) a las 120 horas.
- Comparar la sensibilidad bacteriana producida por un aceite ozonizado de girasol y la Clorhexidina 0,12% (CHX) + Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% (CPC) en *Porphyromonas gingivalis* agente causal de la enfermedad periodontal.

1.8 Hipótesis

1.8.1 Hipótesis general

H₁-Existe actividad antibacteriana de un aceite ozonizado de girasol en *Porphyromonas gingivalis* agente causal de la enfermedad periodontal ,2019.

1.8.2 Hipótesis específicas

- H₁-El efecto antibacteriano de un aceite ozonizado de girasol en *Porphyromonas gingivalis* agente causal de la enfermedad periodontal es mayor que la Clorhexidina 0,12% (CHX) + Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% (CPC)a las 72 horas.
- H₁-El efecto antibacteriano de un aceite ozonizado de girasol en *Porphyromonas gingivalis* agente causal de la enfermedad periodontal es mayor la Clorhexidina 0,12% (CHX) + Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% (CPC)a las 120 horas.
- H₁-Las *Porphyromonas gingivalis* agente causal de la enfermedad periodontal son más sensibles al aceite ozonizado de girasol en comparación con la Clorhexidina 0,12% (CHX) + Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% (CPC)

II. Marco Teórico

2.1. Marco conceptual

2.1.1 Ozono

La Real Academia Española (2018) lo define;

“Del al. *Ozon*, y esta deriva del griego. ὄζειν *ózein* 'tener olor'.”

“Estado alotrópico del oxígeno, que se forma de manera natural en la atmósfera por las descargas eléctricas producidas durante las tormentas; es muy oxidante y se utiliza, entre otros usos, como índice de contaminación atmosférica. (Símbolo O₃)”.

“El ozono, es un oxígeno triatómico, presente en la naturaleza en forma de gas, inestable, en concentraciones de 1 a 10 ppm. Su peso molecular es 47,98 g/mol”.

Su energía es más elevada que el oxígeno atmosférico, y 10 veces más soluble que el agua.

2.1.2 Ozonoterapia

Es la terapia que consiste en la aplicación del ozono médico en el organismo humano, con fines terapéuticos (Perez,2009).

El ozono, es usado en medicina por tener la capacidad de estimular la producción de enzimas, promover la síntesis de proteínas intracelulares, favoreciendo la regeneración de tejidos y órganos (Lektemur y Bakar,2018).

Adicionalmente se han encontrado propiedades que pudieran ser empleadas para eliminar bacterias, hongos, desactivar virus y controlar hemorragias.

El ozono médico se genera a partir del oxígeno puro, por medio de descargas eléctricas en un condensador diseñado, generando una mezcla de oxígeno y ozono puros en una proporción de 0.05% a 5% de O₃ y 95% a 99.95% de O₂. Debido a la inestabilidad de la molécula de O₃, debe prepararse antes de su uso.

Describen que una hora después de la preparación, sólo la mitad de la mezcla sigue siendo ozono, mientras que la otra mitad se transforma en oxígeno. Por lo que es imposible almacenar el ozono médico en su forma gaseosa durante largos períodos de tiempo.

La vida media del ozono en gas es de 30 - 45 minutos a 20 °C (68 °F), y su concentración desciende al 16% de su valor inicial en 2 horas.

Se ha establecido un nivel máximo tolerable de 0.05 ppm de ozono, emitido por cualquier aparato fabricado para uso médico (Pérez, Rodríguez, Paneque, y Pérez, 2009).

El ozono es tóxico si se inhala, los ojos y pulmones son muy susceptibles, por lo que se recomienda no exponerse a largo plazo.

2.1.2.1. Ozonoterapia en odontología

Estudios han demostrado que es efectivo en bacterias Gram (+), Gram (-), virus y hongos., por lo que generalmente es utilizado como un agente antimicrobiano.

Sus indicaciones se basan por que el ozono médico, según investigaciones:

- Afecta la inmunidad celular y humoral.
- Estimula la proliferación y síntesis de inmunoglobulinas en células inmunes.
- Acelera la sensibilidad de la fagocitosis de macrófagos y activa otras funciones de macrófagos
- Es altamente efectivo contra las especies resistentes a los antibióticos.
- Ayuda a reducir la inflamación y cicatrización de heridas. Sugiriendo que la administración de ozono en dosis bajas es beneficiosa. (Lektemur y Bakar,2018).

Según el dentista alemán Fritz Kramer, lo recomendó;

1. Como desinfectante
2. Para controlar el sangrado
3. Antiséptico, limpieza de heridas.
4. Mejorar la cicatrización.

Además, describe que es seguro, sólo en uso intraoral, en agua y en aceites (Gupta y Deepa , 2016).

2.1.2.2. Contraindicaciones de la Ozonoterapia

Según Lektemur y Bakar, "enumeran las siguientes:

- Embarazo
- Hipertiroidismo.
- Deficiencia de glucosa -6-fosfato-deshidrogenasa.
- Anemia severa.

- Miastenia severa
- Hemorragia activa.
- Intoxicación aguda por alcohol". (Lektemur y Bakar,2018).

2.1.3 Generadores de ozono

Existe tres sistemas para generar gas ozono:

- **Sistema ultravioleta:** produce bajas concentraciones de ozono, usado en estética, saunas y para purificación de aire.
- **Sistema de plasma frío:** utilizado en la purificación de aire y agua.
- **Sistema de descarga de corona:** produce altas concentraciones de ozono.

Es el sistema más común usado en medicina y odontología, de fácil manejo y posee una producción de ozono controlada.

Para controlar la descomposición de O₃ en oxígeno, puede asociarse con un vehículo con propiedades acuosas para promover la conversión más rápidamente o con un vehículo con propiedades más viscosas para retardar la conversión (Gupta y Basal 2012).

2.1.4 Aceite ozonizado

Las primeras evidencias sobre el uso clínico de los aceites ozonizados se registran en la literatura científica desde 1859.

Se forma a partir de una reacción química, de adición del ozono en compuestos insaturados, en el burbujeo con ozono de aceites vegetales en condiciones de reacción controladas.

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) presentes en los aceites vegetales son los más sensibles a ser ozonizados como el de girasol, oliva, maíz y otros.

Obteniéndose lipoperóxidos, ozónidos (óxidos cuyo oxígeno O₂ se ha sustituido por un grupo ozono O₃), aldehídos, cetonas entre otras.

Martínez- Sánchez (2012) explica: “Los lipo-peróxidos se forman esencialmente a partir de los AGPI y un radical de alta reactividad. En la fase de iniciación un radical como el hidroxilo extrae un átomo de hidrógeno de un ácido graso insaturado para producir el radical lipídico, el cual se reorganiza y forma un dieno conjugado que en su reacción con el O₂ da lugar al radical peróxido, con suficiente reactividad como para atacar otro lípido y conducir a la propagación de la peroxidación lipídica. En la fase de terminación y en presencia de hierro se producen aldehídos y otros compuestos. Además de peróxidos simples se pueden formar formaldehído, peróxidos complejos, di peróxidos y poli-peróxidos, la pérdida de la insaturación de los lípidos se correlaciona con un incremento de la viscosidad del aceite durante la reacción” (pag.124).

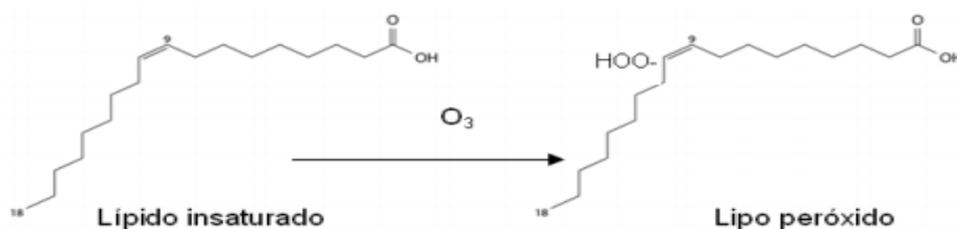


Figura 1. Reacción simplificada de formación de lipoperóxidos a partir de un lípido insaturado y gas de ozono. Copyright 2012 por Martínez- Sánchez. Reimpreso con permiso.

·El tiempo y concentración de ozonización depende si se va a emplear de forma tópica u oral.

- **Vía Oral:** 100 mL de aceite se burbujea con una concentración de ozono de 20 µg/mL, por 10 min, o a una concentración mayor 40 µg/mL por 5 min.
- **Vía Tópica:** 100 mL de aceite y se burbujea con una concentración de ozono de 20-24 µg/mL por 15 min o a una concentración de 40-50 µg/mL por 8 min. " (Martinez-Sanchez ,2012).

Según datos recientes, el aceite ozonizado conserva su actividad a temperatura ambiente durante 3 meses y en refrigeración (4-8 °C) durante 2 años (Álvarez y Wolfshon, 2017).

2.1.4.1 Mecanismo de acción

Hasta la fecha el mecanismo de acción biológico exacto de los aceites ozonizados es aún desconocido, se cree que al contacto de los triozonidos estables al entrar en contacto con el exudado de heridas, a 37 °C se descomponen y forman ozono, peróxido de hidrogeno y lipoperóxidos, responsables de la regeneración y desinfección, de liberación lenta.

El efecto antibacteriano, se obtiene por;

- Afectación a nivel citoplasma.
- Destruyen los microorganismos debida a la oxidación directa.
- Citotoxicidad inactivando enzimas para su supervivencia.
- Liberación de factores de crecimiento como PDGF, TGE-*B*

(Martínez- Sánchez, 2012).

2.1.5 Oleozon®

En la década del 90, en Cuba, comienza un trabajo de terapias naturales para ser incorporadas al Sistema Nacional de Salud Cubano, con el objetivo principal de desarrollar terapias en los diferentes niveles de la atención médica y estomatológica.

De acuerdo con la clasificación de la Oficina de Medicina Alternativa del Instituto Nacional de Salud (Bethesda MD, EE. UU), junio del 1995, se referencian más de 60 terapias no convencionales, alternativas o complementarias. La Ozonoterapia se enmarca en el subgrupo de tratamientos biológicos y farmacológicos, específicamente, dentro de los agentes oxidantes, junto con el peróxido de hidrogeno.

En el Centro de Investigaciones del Ozono, adscrito al Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), en Cuba, se realizan investigaciones sobre las terapéuticas del ozono, específicamente del aceite de girasol ozonizado, Oleozon®.

Investigaciones, in vitro e in vivo, han demostrado acción antibacteriana. Su empleo en lugar del ozono gaseoso presenta la ventaja de poseer estabilidad, pudiéndose emplearse en tratamiento ambulatorios.

La interacción del ozono con aceites de origen vegetal genera la formación de una mezcla de compuestos químicos, como los ozónidos, hidroxihidroperóxidos y aldehídos, responsables del carácter germicida.

El Oleozon® es un producto germicida, natural, de amplio espectro, testeado para pruebas toxicológicas, teratogénicas e histológicas con resultados satisfactorios. Está compuesto por aceite girasol ozonizado: 8-12.8 g de hidroxihidroperóxidos de triglicéridos insaturados como oxígeno activo.

Debido a su acción germicida estimulante de la regeneración tisular, su buena tolerancia, así como la ausencia de efectos secundarios en su empleo, el Oleozon® ha sido aplicado en el tratamiento de varias patologías.

Estudios de estabilidad del Oleozon® Tópico se realizaron según los requisitos establecidos por el Centro Estatal de Control de Medicamentos (CECMED) para medicamentos nuevos y de esta forma se diseñaron estudios a 25° C por 6 meses y de vida de estante de 2 – 8 °C por 18 meses, cuyos resultados permitieron que se otorgaran los registros sanitarios de ambos medicamentos.

Según investigaciones, refieren que son efectivas en el tratamiento de patologías que incluyen las infecciones virales, micóticas, parasitarias y bacterianas (Álvarez y Wolfshon, 2017).

2.1.6 Enfermedad periodontal

La enfermedad periodontal es considerada como una infección crónica, producida por ciertas bacterias provenientes del biofilm. Las bacterias son esenciales para el inicio de la enfermedad, pero los factores predisponentes del hospedador y microbianos son los que influyen patogénicamente. Se considera, que el microbiota bacteriana periodonto patógeno es necesaria pero no suficiente, se requiere además un hospedador susceptible (Bascones-Martinez y Figuero-Ruiz,2004).

La nueva clasificación, para las enfermedades periodontales, fue presentada en el EUROPERIO 2018, por la Federación Europea de Periodontología y la Academia Americana de Periodontología. Clasificándolas en cuatro grupos:

1. Salud periodontal, enfermedades y condiciones gingivales.
2. Periodontitis.
3. Desarrollo y condiciones adquiridas en manifestaciones periodontales de enfermedades sistémicas.
4. Enfermedades y condiciones periimplantarias.

La particularidad en esta clasificación se encuentra en la Periodontitis, donde se observa la unificación de la denominación, incluyendo a la periodontitis agresiva, crónica, en una sola. En la actual clasificación se clasifica, basada en la gravedad (según estadio I, II, III, IV) y complejidad del manejo clínico, así como en la extensión y distribución.

Tabla 1.

Clasificación de enfermedades y condiciones periodontales y peri implantares

Periodontal Diseases and Conditions										
Periodontal Health, Gingival Diseases and Conditions Chapple, Mealey, et al. 2018 Consensus Rept link Trombelli et al. 2018 Case Definitions link			Periodontitis Papapanou, Sanz et al. 2018 Consensus Rept link Jepsen, Caton et al. 2018 Consensus Rept link Tonetti, Greenwell, Kornman. 2018 Case Definitions link			Other Conditions Affecting the Periodontium Jepsen, Caton et al. 2018 Consensus Rept link Papapanou, Sanz et al. 2018 Consensus Rept link				
Periodontal Health and Gingival Health	Gingivitis: Dental Biofilm-Induced	Gingival Diseases: Non-Dental Biofilm-Induced	Necrotizing Periodontal Diseases	Periodontitis	Periodontitis as a Manifestation of Systemic Disease	Systemic Diseases or conditions affecting the periodontal supporting tissues	Periodontal Abscesses and Endodontic-Periodontal Lesions	Mucogingival Deformities and Conditions	Traumatic Occlusal Forces	Tooth and Prosthesis Related Factors
Peri-Implant Diseases and Conditions Berglundh, Armitage et al. 2018 Consensus Rept link										
Peri-Implant Health		Peri-Implant Mucositis			Peri-Implantitis			Peri-Implant Soft and Hard Tissue Deficiencies		

Fuente. Caton et al. Copyright 2018 por *Journal of Clinic of periodontology*. Reimpreso con permiso.

Además, se considera el estado de salud peri implantar, mucositis periimplantar y periimplantitis.

2.1.6.1 Microbiología de la Enfermedad Periodontal

En el biofilm subgingival, se encuentran las bacterias anaerobias gramnegativos prevalentes e importantes, como el *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermedia* (Pi) y *Tannerella forsythensis* (Tf).

Estas bacterias, van a tener su importancia en el comienzo y desarrollo de la periodontitis, induciendo a la formación de la bolsa periodontal, destrucción del tejido conectivo y reabsorción del hueso alveolar, en relación con el mecanismo inmuno patogénico (Bascones-Martinez y Figuero-Ruiz, 2005).

2.1.6.2. *Porphyromonas gingivalis* (Pg)

(Coy Kendall et al. 1980) Shah and Collins 1988

Es un cocobacilo Gram-negativo, 1 - 3,5 μ m de largo por 0,5 - 0,8 μ m de ancho ,no móvil, anaerobio estricto, sacarolítico, perteneciente al filo Bacteroidetes.

***Porphyromonas gingivalis* y su asociación con enfermedad periodontal.**

Porphyromonas gingivalis es un anaerobio oral gramnegativo involucrado en la periodontitis, considerado oportunista, presente en el biofilm maduro (Yilmaz, 2008). Tiene la capacidad de invadir localmente los tejidos periodontales y evadir los mecanismos de defensa del huésped, a través de factores de virulencia que evaden respuestas inmunológicas e inflamatorias del huésped. Sus principales factores de virulencia es su capsula, lipopolisacáridos, gingipainas y fimbrias.

Bostanci y Belibasakis (2012) afirma: “*Porphyromonas gingivalis* es la especie más asociada con la forma crónica de periodontitis, y puede detectarse en hasta el 85% de los sitios de la enfermedad (Yang *et al.*, 2004). Se detecta raramente o en cantidades bajas en sitios sanos. La presencia de *Porphyromonas gingivalis*. en una bolsa periodontal puede predecir la progresión inminente de la enfermedad (Van Winkelhoff *et al.*, 2002) y se encuentra una correlación positiva significativa entre los números de *Porphyromonas gingivalis* y la profundidad de la bolsa (Kawada *et al.*, 2004). Después del tratamiento periodontal, una reducción de los números de *Porphyromonas. gingivalis* se asocia con la resolución de la enfermedad en el sitio afectado (Haffajee *et al.*, 1997; Fujise *et al.*, 2002). Además, la implantación experimental de *Porphyromonas gingivalis* en modelos animales induce una respuesta inflamatoria y pérdida de hueso periodontal (Evans *et al.*, 1992; Hajishengallis *et al.*, 2011).” (pag.1).

Características estructurales y de crecimiento de *Porphyromonas gingivalis*.

La *Porphyromonas gingivalis* es una especie gramnegativa no motil, pigmentada en negro, que requiere para su crecimiento, condiciones anaeróbicas, presencia de vitamina K y hemina en su medio nutriente. Su energía metabólica la obtiene por fermentación de aminoácidos, característica para su supervivencia en bolsas periodontales profundas, donde los azúcares son escasos.

Su ubicación en el biofilm es cerca al tejido gingival, por ser un colonizador tardío. Su pigmentación negra se asocia con la agregación hemo en su superficie celular.

Incursión del huésped por *Porphyromonas gingivalis*

Una de sus características principales es invadir células y tejidos gingivales evadiendo la capacidad inmunológica del huésped, donde puede replicarse.

Esta capacidad es dada por sus fimbrias, al unirse con la integrina $\beta 1$ de la superficie de las células del huésped, provocando reordenamiento del citoesqueleto de actina permitiendo la invasión intracelular, sin signos de apoptosis o muerte celular programada.

Entonces puede secretar activamente una enzima que hidroliza el trifosfato de adenosina (ATP), suprimiendo así la apoptosis dependiente de ATP (Yilmaz *et al.*, 2008), permitiendo su supervivencia y propagación en las células hospedadoras, afectando las vías del ciclo celular, lo que podría constituir un mecanismo de expansión de expansión del epitelio de la bolsa gingival.

La *Porphyromonas gingivalis* no es un agresor de la respuesta inflamatoria, sino es un oportunista que puede comunicarse con el huésped y alterar sus mecanismos de defensa.

Estrategias de supervivencia de las *Porphyromonas gingivalis*

Principalmente las *Porphyromonas gingivalis* tiene la capacidad de desregular la capacidad inmunológica innata celular.

Bostanci y Belibasakis, (2012), nos refiere “Además de tener la capacidad de estimular la producción de interleucina (IL) -8 por las células epiteliales (Sandros *et al.*, 2000; Asai *et al.*, 2001; Kusumoto *et al.*, 2004), también puede inhibir la producción de IL-8. , resultando en una quimiotaxis PMN impedida, un fenómeno conocido como 'parálisis de quimio quinas' (Darveauet *al.* , 1998)”(pag.1-9), incapacitando la primera línea de defensa de los tejidos periodontales.

Factores de virulencia de las *Porphyromonas gingivalis*

Los factores de virulencia de las *Porphyromonas gingivalis* son varios y se consideran así, por provocar efectos nocivos en las células del huésped, los principales asociados son:

- **Lipopolisacáridos (LPS)**, como toda especie bacteriana gram-negativas, está recubierta por un LPS único a diferencia de otras especies.

Los LPS son un componente de la membrana externa que puede estimular las respuestas proinflamatorias y de reabsorción ósea, como se demostró en animales experimentales (Chiang *et al.*, 1999; Nishida *et al.*, 2001).

- **Capsula (CPS)**, conocida también como antígeno CPS o K (Schifferle y *otros*, 1989; Holt y *otros*, 1999; Farquharson y *otros*, 2000; Aduse-Opoku y *otros.*, 2006; Brunner *et al.*, 2010), según reportes pueden encontrarse hasta seis serotipos diferentes de capsula, con la capacidad de generar respuestas de anticuerpos Ig G sistémicos.

Cuando las *Porphyromonas gingivalis* son encapsuladas son altamente invasivas y causan una infección de propagación, mientras que las cepas no encapsuladas solo inducen abscesos localizados (Laine y van Winkelhoff, 1998).

Asimismo, son más resistentes a la fagocitosis por los leucocitos polimorfonucleares cuando las cepas son encapsuladas comparativamente a las cepas no encapsuladas (Sundqvist *et al.*, 1991).

- **Las fimbrias** son protuberancias filamentosas, delgadas, de la superficie celular que suministran adherencia a proteínas salivales, matriz extracelular, células eucarióticas y bacterias de esta o de otras especies, permitiéndoles adherirse a bacterias colonizadoras tempranas o en el biofilm en desarrollo.

Pueden ser de tipo I, consideradas principales, que tienen la función de colonizar y las del tipo II, consideradas menores, poseen capacidad proinflamatoria.

Hay registros de periodontitis experimentales, reportando a la inducción de destrucción ósea, la inducción de citoquinas proinflamatorias y producción de metaloproteinasas de matriz (MMP) como IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α y MMP-9, por algunas células del huésped

- **Las gingipainas.** son un grupo de cisteínas proteinasas de la superficie celular de las *Porphyromonas gingivalis* y representan el 85% de la actividad proteolítica total de las mismas (Potempa *et al.*, 1997). Según su especificidad de sustrato, se dividen en :

- Arginina-X que van a degradar los componentes de la matriz extracelular, incluidos los factores de unión de integrina-fibronectina, citoquinas, inmunoglobulina y complemento.
- Rgp A, son complejos que contiene un dominio proteolítico y de adhesión,
- Rgp B, son complejos que contiene solo el dominio proteolítico (Curtis et al, 2001).

Los gingipainas poseen múltiples efectos sobre los componentes moleculares de la respuesta inmune, siendo capaz de alterarlas, Además, participan en la unión de las *Porphyromonas gingivalis* en las células del huésped, ya que se ha demostrado que los complejos Rgp median la adherencia en las células epiteliales gingivales y los fibroblastos gingivales (Chen *et al.*, 2001; Grenier *et al.*, 2003; Andrian *et al.*, 2004). Así como, afectan la permeabilidad vascular y el sangrado en el sitio periodontal. Considerándoseles responsables del edema e infiltración de neutrófilos (Bostanci y Belibasakis, 2012)

2.1.6.3 Clorhexina

Es una biguanida, posee una alta actividad antibacteriana en estudios *in vitro* y buena afinidad en mucosas orales.

2.3.1 Características químicas

Diomedi et al. (2017) afirma: “es una molécula simétrica que consistente en dos anillos, cuatro clorofenil y dos grupos biguanidas, conectados por una cadena central de decametileno (clorofenil biguanida)” (p.161).

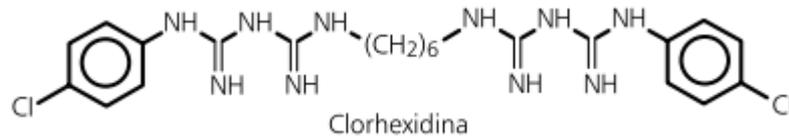


Figura 2: Estructura química de la molécula clorhexidina. Copyright 2017 por Diomedi et al. Reimpreso con permiso.

El digluconato es la más soluble de las clorhexidinas, es incolora inodora, de sabor amargo, estable a temperatura ambiente y entre 5 y 8 de pH. Necesita estar protegido frente a la luz.

Dentro de sus características también se considera que es compatible con los amonios cuaternarios. El mecanismo de acción es por difusión en las membranas celulares, de forma rápida en bacterias como levaduras. En concentraciones alta produce precipitaciones de ácidos nucleicos y proteínas.

La clorhexidina tiene un efecto bactericida de nivel intermedio, en bacterias anaerobios y aerobios, gram positivas como negativas. (Diomedi et al, 2017).

Desventajas

“En odontología se ha reportado:

- Tinción dentaria, debido a la precipitación o unirse a cromógenos aniónicos de la dieta.
- Alteraciones al gusto.
- Descamación de la mucosa oral en raras ocasiones.
- Tumefacción de la glándula parótida.

Nunca debe emplearse en pacientes con antecedentes alérgicos a la Clorhexina, cirugía oftalmológica o en la preparación preoperatoria de la piel de cara”. (Diomedi et al, 2017).

2.2 Marco filosófico

2.2.1. Actividad bactericida

Los seres vivos se dividen en; bacterias (Bacteria), arqueas (Archaea) y eucariontes (Eukarya). El término "bacteria" se aplicó a todos los microorganismos procariotas.

Las bacterias son microorganismos unicelulares de tamaño de algunos micrómetros de largo (entre 0,5 y 5 μm) y con diversas formas; esferas, barras y hélices. (Anónimo., 2017)

El primero en ver las bacterias, fue el holandés, Anthony van Leeuwenhoek en 1683, quien nació en la ciudad de Delft, hijo de comerciantes, observándolos en un rudimentario microscopio, de una sola lente, con la capacidad de ampliar hasta tres veces su tamaño, empleada por los vendedores de telas (El País, 2016).

La acción de algunos agentes: físicos o químicos, terminados en "cida", que significa matar y proviene del latín "caedere", van a producir el efecto de bactericida.

La actividad bactericida se refiere al agente con la capacidad de destruir o inactivar bacterias.

2.2.2. Ozono

El ozono se encuentra en la estratosfera en su forma natural, protege a los seres humanos de los rayos de ultravioleta procedentes del sol. Fue descubierto en 1840, por el químico suizo Christian F. Schönben, en su laboratorio, mientras observaba una descarga eléctrica, percibió un nuevo gas, transparente, llamándolo OZONO por su intenso aroma, su nombre significa olor en griego.

En 1860, el físico Jean –Louis Soret descubrió que una molécula de ozono está formada por tres átomos de oxígeno(O₃).

La historia de la terapia con ozono comenzó en Alemania. El precursor del uso del ozono fue Werner Von Siemens, en 1857, quien construyó el primer tubo de inducción para la

destrucción de microorganismos. En la segunda década del siglo XX, el químico Justus Baron Von Liebig, alemán, fue el primero en estudiar las aplicaciones del ozono para uso humano. El ozono fue utilizado por primera vez en medicina en 1870 por Landler. Los médicos alemanes comenzaron a usarlo en pacientes con heridas e infecciones. Producían el ozono y lo hacían burbujear directamente en la sangre del paciente, o indirectamente, la sangre era tomada del paciente y después la reintroducían con la finalidad de oxigenar los tejidos, su efectividad se determinaba por los testimonios del paciente (Díaz, 2014).

No fue hasta 1932 que la comunidad científica estudió seriamente el ozono, cuando el Dr. E. A. Fisch, dentista suizo, utilizó el agua ozonizada como desinfectante. Dr. Fisch tuvo la primera idea de utilizar el ozono como gas o agua ozonizada en su práctica (Fish, 1936).

Actualmente el tratamiento con Ozono, llamado Ozonoterapia, ha cobrado mayor relevancia, además, se han desarrollado aparatos generadores de ozono médico, y se ha diseñado ensayos preclínicos (en animales) y ensayos clínicos (en humanos).

La Ozonoterapia es una forma de Medicina Natural y Tradicional, es la forma terapéutica que emplea el ozono en la Medicina Biológica alternativa. Su aplicación, se ha comprobado en diversas enfermedades. Desde el punto de vista científico, es considerada una nueva forma de tratamiento respaldada por instituciones y organizaciones científicas (Kindelán, 2012).

III. Método

3.1 Tipo de investigación

El diseño metodológico del presente estudio fue: experimental, prospectivo, longitudinal, analítico (Hernández, Sampieri y Batista, 2016).

- Experimental: Porque se realizó con intervención del investigador.
- Prospectivo : La toma de datos se hizo según lo planificado en el proyecto.
- Longitudinal: La lectura de las variables se realizaron a las 72 y 120 horas.
- Analítico : Por tener dos variables de interés .

Además, posee un enfoque, cuali - cuantitativo y un grado de abstracción: aplicado

3.1.1. Diseño de Investigación

La presente investigación fue experimental.

3.2 Población y muestra

3.2.1 Población:

Estuvo constituida por un número de bacterias de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, Microbiologics, cultivadas para el presente estudio.

3.2.2 Muestra: No probabilística aleatorio simple por conveniencia, conformada por 60 unidades.

3.3. Operacionalización de las Variables

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIÓN	INDICADOR	TIPO	ESCALA
<u>Variable Independiente</u> Actividad antibacteriana de un aceite ozonizado de girasol	OLEOZON [®]	Aceite girasol ozonizado: 8-12.8 g de hidroxihidroperóxidos de triglicéridos insaturados como oxígeno activo.	Tiempo de Exposición	72 horas 120 horas	Cualitativa Cualitativa	Nominal Nominal
<u>Variable Dependiente</u> <i>Porphyromonas gingivalis</i> agente causal de la enfermedad periodontal	Bacterias, Gram negativa anaerobias estrictas.	Cepas de colonias de <i>Porphyromonas gingivalis</i> en Placas Petri (CODIGO ATCC 33277)	Formación del halo de inhibición Sensibilidad bacteriana	Milímetros Diámetro de halo de inhibición, según la escala de Duraffourd: - Nula (-) ≤ 8 mm. - Sensible (=+): 9 - 14 mm. - Media (muy sensible = ++): 15-19 mm. - Sumamente sensible (S.S.= +++): ≥ 20 mm.	Cuantitativa Cualitativa	De Razón Ordinal
<u>Variables Intervinientes</u> Clorhexidina 0.12% + CPC 0,05% Aceite de Girasol 100%	PERIO AID [®] 0,12% Intensive care (Control positivo) IDEAL (Control negativo)	Clorhexidina al 0.12% (CHX) + cloruro de cetilpiridinio al 0,05 % (CPC) Aceite girasol 100%	Tiempo de Exposición Tiempo de Exposición	72 horas 120 horas 72 horas 120 horas	Cualitativa Cualitativa	Nominal Nominal

3.4 Instrumentos

Para la presente investigación se construyó una **ficha de recolección de datos**, la cual fue validada por expertos.

En la ficha de recolección de datos se registró los datos de cada placa Petri, con cepas de colonias de *Porphyromonas gingivalis*, (CODIGO ATCC 33277), efectuando 3 unidades de muestra en cada placa Petri.

- Las unidades de muestra están conformadas por:
 - aceite ozonizado de girasol de la marca OLEOZON[®].
 - aceite de girasol al 100% de la marca IDEAL
 - clorhexidina al 0,12% (CHX) + cloruro de cetilpiridinio 0,05% (CPC) de la marca PERIO AID[®] Intensive care del lado izquierdo de la ficha.
- En el lado derecho de la ficha de recolección de datos, se registró:
 - Formación del halo de inhibición en milímetros a las 72 y 120 horas.
 - Efecto de sensibilidad bacteriana, a las 72 y 120 horas, según:

ESCALA DE DURAFFOURD: " Escala de medición, para indicar en forma cualitativa los resultados de sensibilidad o resistencia bacteriana a través de las mediciones de halos de inhibición in vitro:

 - Nula (-): para un diámetro inferior o igual a 8 mm.
 - Sensibilidad limite (sensible = positivo): para un diámetro comprendido entre 8 a 14 mm.
 - Media (muy sensible=positivo, positivo): para un diámetro entre 15 a 19 mm.
 - Sumamente sensible (positivo, positivo, positivo): para un diámetro igual o superior a 20 mm" (Aigaje-Sierra y Zurita-Solís 2017) (Alzamora, L., Morales, L., Armas, L., y Fernández, G. ,2001).

Registrándose 60 lecturas, 30 a las 72 horas y 30 a las 120 horas. (Anexo 1)

3.5 Procedimientos

3.5.1 Material y métodos

3.5.1.1 Productos utilizados

- **Aceite ozonizado de girasol como solución tópica, cada 100 mL contiene 95 ml:**
Aceite de girasol (equivalente a 8 – 12,8 g de hidroxihidroperóxidos de triglicéridos insaturados como ozono activo) en un vehículo c.s. (Oleozone[®] – Laboratorio Dalmer, Cuba)
- **Clorhexina al 0,12% (CHX) + cloruro de cetilpiridinio al 0,05 % (CPC)** (Perio-Aid[®] Intensive care) como ingredientes activos (Laboratorio Dentaaid).
- **Aceite de girasol Premiun,100% pureza** (Marca Ideal).
- **Cepa liofilizada:** *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, Microbiologics. (Anexo 4)

3.5.1.2 Procedimiento de rehidratación de la cepa

- La cepa liofilizada, de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 viene en un sobre (kwik Stik) que es abierto en el momento del procesamiento.
- El envase contiene un hisopo y una ampolla que contiene el medio de rehidratación.
- La ampolla se rompió y se dejó que el líquido descienda hasta donde se encontraba la cepa liofilizada, rehidratándose por un minuto, posteriormente se sembró en los medios de cultivo y se colocaron en los sobres de anaerobiosis, para que desarrolle en la placa Petri individualmente, incubándose a 36 °C por 3 a 5 días hasta observar el crecimiento. (Anexo 5)

3.5.1.3 Medio de cultivo

- Se prepararon frascos con 100 mL de agar Brucella (Oxoid), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, añadiéndose:
 - 1 mL de hematina al 0.01% por cada 100 mL de medio, luego se autoclavó a 121 °C, 1 kg/cm² (15 lb/pulgada 2) por 15 minutos en una autoclave horizontal. Terminado ese proceso, el medio preparado se dejó enfriar a una temperatura de 50 a 60 °C.
 - Posteriormente se añadió 100 µL de fitomenadiona 10 mg/ 1 mL (Konakion MM – Roche) y 5 mL de sangre de carnero (Arez).
 - Distribuyendo 20 mL en placas de poliestireno estéril.
- Se incubó una placa Petri de cada lote para comprobar la esterilidad del material preparado.
- Las placas Petri se utilizaron dentro de los primeros siete días de haberse preparado.

3.5.1.4 Sistema de anaerobiosis

Se empleó el sistema Anaerocult[®] P (Merck) para proporcionar el ambiente de anaerobiosis para el crecimiento de la *Porphyromonas gingivalis*. Ejecutándose de la siguiente forma:

- El sistema consta de un sobre de polietileno denso y un sobre que contiene la mezcla para producir el ambiente anaeróbico.
- Para procesar se colocó dentro del sobre de plástico la placa sembrada, y un indicador de anaerobiosis Anaerotest[®] (Merck), añadiéndosele 3 mL de agua destilada a un sobre generador de anaerobiosis (Anaerocult[®]), instalándosele inmediatamente dentro de un sobre de incubación especial sellándolo finalmente con un clip (Anaeroclip[®] – Merck).

Observándose posteriormente de 2 a 3 horas que el indicador de anaerobiosis Anaerotest® (Merck) pasa de un color azul (oxidado) a un color blanco (reducido) que indica que se ha producido en forma satisfactoria el ambiente de anaerobiosis.

(Anexo 6)

3.5.1.5 Cultivo de *Porphyromonas gingivalis*

Realizándose de la siguiente manera:

- El sobre con cultivo crecido de *Porphyromonas gingivalis* se abrió y comprobó la presencia de la cepa indicada por un crecimiento de colonias negras y de bacilos Gram negativos en la coloración de Gram.
- Con un hisopo humedecido en suero fisiológico se recogió la cepa y se hizo una suspensión en suero fisiológico hasta lograr una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de Mc Farland.
- Con un hisopo nuevo se humedeció en la suspensión bacteriana, eliminándose el exceso de líquido en las paredes y se sembraron las placas de agar *Brucella* sangre con hematina y menadiona por diseminación en tres direcciones.
- Se repitió el mismo procedimiento para las diez placas utilizando hisopos nuevos para cada una.
- Con un sacabocado de acero con un diámetro de 6 mm se hicieron tres perforaciones equidistantes en el agar, retirándose el mismo, quedando perforaciones de 6 mm de diámetro y 4 mm de profundidad.
- Se marcaron las perforaciones con:
 - O = aceite ozonizado de girasol.
 - C = Clorhexidina 0,12% (CHX) + CPC 0,05%.
 - G = aceite de girasol 100%.

- A las perforaciones marcadas:
 - O se añadieron 50 μ L de aceite de girasol ozonizado.
 - C se añadieron 50 μ L de Clorhexidina 0,12% (CHX) + CPC 0,05%.
 - G se añadieron 50 μ L de aceite de girasol 100%, que fue el control negativo.
- Las 10 placas Petri, con los tres productos agregados, en cada placa, fueron colocadas en los sobres de anaerobiosis y se incubaron por 72 y 120 horas.
- Para observar las placas se retiraron de las bolsas, se realizó la medición de los halos de inhibición formados a las 72 horas y luego se colocaron en bolsas nuevas hasta completar el tiempo de incubación de 120 horas.
- La medición de los halos se realizó utilizando un calibrador (pie de rey).
- Obteniéndose 60 medidas. (Anexo 7)

3.5 Análisis de datos

- Se procesaron los datos considerando los objetivos, variables e hipótesis planificadas en el trabajo de investigación empleando el programa estadístico SPSS V.25 y registros de graficas en Excel.
- Las pruebas estadísticas empleadas, para contrastar las hipótesis fueron Kruskal Wallis, por existir una distribución no paramétrica y la Prueba de Corrección de Bonferroni para realizar las comparaciones múltiples entre muestras.
- La evaluación cualitativa de sensibilidad bacteriana se utilizó la escala de Duraffourd y la prueba estadística de Chi cuadrado.

IV. Resultados

4.1 Contratación de las hipótesis

4.1.1 Hipótesis general

H₁. Existe actividad antibacteriana de un aceite ozonizado de girasol en *Porphyromonas gingivalis* agente causal de la enfermedad periodontal ,2019.

H₀- No existe actividad antibacteriana de un aceite ozonizado de girasol en *Porphyromonas gingivalis* agente causal de la enfermedad periodontal ,2019.

Comprobación de hipótesis

Para comprobar la hipótesis general, la actividad antibacteriana fue estimada por la formación de halo de inhibición y sensibilidad bacteriana.

La evaluación de la formación del halo de inhibición se utilizó la prueba estadística de Shapiro-Wilk (contrastar normalidad de un conjunto de datos) pero al no encontrar una curva normal de distribución en los tres grupos se realizó la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis y la Prueba de corrección de Bonferroni para realizar las comparaciones múltiples entre muestras.

Para evaluar la sensibilidad bacteriana se empleó la escala de Duraffourd y la prueba estadística de Chi cuadrado.

4.1.2 Sub Hipotesis

- H_1 -El efecto antibacteriano del aceite ozonizado de girasol en *Porphyromonas gingivalis* agente causal de la enfermedad periodontal es mayor que la Clorhexidina 0,12% (CHX) + Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% (CPC) a las 72 horas.
- H_0 -El efecto antibacteriano del aceite ozonizado de girasol en *Porphyromonas gingivalis* agente causal de la enfermedad periodontal es menor que la Clorhexidina 0,12% (CHX) y + Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% (CPC) a las 72 horas.

Tabla 2

Efecto antibacteriano según halo de inhibición a las 72 horas

		Tamaño del halo		
		Aceite Ozonizado de Girasol	Clorhexidina 0,12%+ CPC 0,05%	Aceite de girasol 100%
Media		20.90	18.70	6.00
95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	19.86	17.94	6.00
	Límite superior	21.94	19.46	6.00
Mediana		21.00	18.00	6.00
Desv. Desviación		1.449	1.059	0.000
Mínimo		18	18	6
Máximo		23	21	6

Fuente: Elaboración en spss v.25

El análisis de semejanza a la distribución normal muestra que los halos de inhibición no se asemejan a la curva normal en los grupos donde se utilizó la Clorhexidina 0,12% + CPC 0,05% y el Aceite de girasol (Prueba de Shapiro-Wilk: $p < 0.05$), por lo que se decide realizar la comparación de grupos mediante la prueba estadística no paramétrica Kruskal Wallis.

Tabla 3*Resumen de la Prueba hipótesis 1*

	Hipótesis Nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de Tamaño de halo de inhibición es la misma entre las categorías de producto utilizado.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,000	Rechazar hipótesis nula

Nota: Se muestran las significaciones asintóticas. Nivel de significación es ,05
Fuente: Elaboración en spss v.25

En la Tabla 3 la comparación de grupos mediante la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis muestra que existen diferencias estadísticamente significativas en el tamaño del halo entre los tres grupos ($p < 0.001$). A las 72 horas.

Tabla 4*Prueba de comparaciones múltiples a las 72 horas*

Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de contraste	Error	Desv. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. ajuste.
Aceite de Girasol 100%- Clorhexidina 0,12%+CPC0,05%	11,250	3,821	2,944	,003	*,010
Aceite de Girasol 100%- Aceite ozonizado de girasol	18,750	3,821	4,907	,000	*,000
Aceite ozonizado de girasol- Clorhexidina 0,12%+CPC0,05%	7,500	3,821	1,963	,050	,149

Nota. Cada fila prueba la hipótesis nula que las distribuciones en la Muestra 1 y Muestra2 son las mismas. Se muestran las significaciones asintóticas (pruebas bilaterales). Nivel de significación es ,05.

Los valores de significación se han ajustado mediante la corrección de Bonferroni para varias pruebas.

Fuente: Elaboración en spss v.25

En la Tabla 4 se muestran pruebas de comparaciones múltiples a las 72 horas muestran que existen diferencias estadísticamente significativas en la comparación del tamaño del halo entre los grupos donde se utilizó:

- Aceite de girasol 100% y Clorhexidina al 0,12% + CPC 0,05% *($p = 0.010$).
- La comparación de los grupos donde se utilizó aceite de girasol al 100% y aceite ozonizado de girasol también muestran diferencias estadísticamente significativas *($p < 0.001$).

Sin embargo, al comparar los grupos donde se utilizó Clorhexidina al 0,12% +CPC al 0.05% y el aceite ozonizado de girasol no muestra diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.149$). (Anexo 9)

- H_1 -El efecto antibacteriano del aceite ozonizado de girasol en *Porphyromonas gingivalis* agente causal de la enfermedad periodontal es mayor que la Clorhexidina 0,12% (CHX) + Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% (CPC) a las 120 horas.
- H_0 -El efecto antibacteriano del aceite ozonizado de girasol en *Porphyromonas gingivalis* agente causal de la enfermedad periodontal es menor que la Clorhexidina 0,12% (CHX) + Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% (CPC) a las 120 horas.

Tabla 5

Efecto antibacteriano según halo de inhibición a las 120 horas

		Tamaño del halo		
		Aceite Ozonizado de Girasol	Clorhexidina 0,12%+ CPC 0,05%	Aceite de girasol 100%
Media		20.90	18.70	6.00
95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	19.86	17.94	6.00
	Límite superior	21.94	19.46	6.00
Mediana		21.00	18.00	6.00
Desv. Desviación		1.449	1.059	0.000
Mínimo		18	18	6
Máximo		23	21	6

Fuente: Elaboración en spss v.25

El análisis de semejanza a la distribución normal muestra que los halos de inhibición no se asemejan a la curva normal en los grupos donde se utilizó la Clorhexidina 0,12% + CPC 0,05% y el Aceite de girasol (Prueba de Shapiro-Wilk: $p < 0.05$), por lo que se decide realizar la comparación de grupos mediante la prueba estadística no paramétrica Kruskal Wallis.

Tabla 6*Resumen de la Prueba hipótesis 2*

	Hipótesis Nula	Prueba	Sig.	Decisión
2	La distribución de Tamaño de halo de inhibición es la misma entre las categorías de producto utilizado.	Prueba de Kruskal- Wallis para muestras independientes	,000	Rechazar hipótesis nula

Nota: Se muestran las significaciones asintóticas. Nivel de significación es ,05
Fuente: Elaboración en spss v.25

En la Tabla 6 , comparando los grupos mediante la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis muestra que existen diferencias estadísticamente significativas en el tamaño del halo entre los tres grupos ($p < 0.001$). A las 120 horas.

Tabla 7*Prueba de comparaciones múltiples a las 120 horas*

Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de contraste	Error	Desv. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. ajuste.
Aceite de Girasol 100%- Clorhexidina 0,12%+CPC0,05%	11,250	3,821	2,944	,003	*,010
Aceite de Girasol 100%- Aceite ozonizado de girasol	18,750	3,821	4,907	,000	*,000
Aceite ozonizado de girasol- Clorhexidina 0,12%+CPC0,05%	7,500	3,821	1,963	,050	,149

Nota. Cada fila prueba la hipótesis nula que las distribuciones en la Muestra 1 y Muestra2 son las mismas. Se muestran las significaciones asintóticas (pruebas bilaterales). Nivel de significación es ,05.

Los valores de significación se han ajustado mediante la corrección de Bonferroni para varias pruebas.

Fuente: Elaboración en spss v.25

En la tabla 7 al realizar pruebas de comparaciones múltiples a las 120 horas muestran que existen diferencias estadísticamente significativas en la comparación del tamaño del halo entre los grupos donde se utilizó:

- Aceite de girasol 100% y Clorhexidina al 0,12% + CPC 0,05% *($p = 0.010$).
- La comparación de los grupos donde se utilizó aceite de girasol al 100% y aceite ozonizado de girasol también muestran diferencias estadísticamente significativas * ($p < 0.001$).

Sin embargo, al comparar los grupos donde se utilizó Clorhexidina al 0,12% + CPC al 0.05% y el aceite ozonizado de girasol no muestra diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.149$). (Anexo 9)

- H₁-Las *Porphyromonas gingivalis* agente causal de la enfermedad periodontal son más sensibles al aceite ozonizado de girasol en comparación con la Clorhexidina 0,12% (CHX) + Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% (CPC)
- H₀-Las *Porphyromonas gingivalis* agente causal de la enfermedad periodontal son igual o menos sensibles al aceite ozonizado de girasol en comparación con la Clorhexidina 0,12% (CHX) + Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% (CPC).

Tabla 8

Tabla cruzada según producto utilizado y sensibilidad bacteriana

		SENSIBILIDAD					
		Media		Sumamente sensible		Total	
		n	%	n	%	n	%
Producto utilizado	Aceite Ozonizado de girasol	4	20,0%	16	80,0%	20	50,0%
	Clorhexidina 0,12% + CPCo,05%	16	80,0%	4	20,0%	20	50,0%
Total		20	100,0%	20	100,0%	40	100,0%

Fuente: Elaboración en spss v.25

Observamos que el aceite ozonizado de girasol muestra ser sumamente sensible en el 80% de las muestras analizadas y la clorhexidina 0,12%+ CPC 0,05% muestra ser medianamente sensible en el 80% de las muestras analizadas. (Anexo 9)

Tabla 9*Pruebas de Chi cuadrado*

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi- cuadrado de Pearson	14,400 ^a	1	0.000*		
Corrección de continuidad ^b	12.100	1	0.001		
Razón de verosimilitud	15.420	1	0.000		
Prueba exacta de Fisher				0.000	0.000
Asociación lineal por lineal	14.040	1	0.000		
N de casos válidos	40				

Nota: a. 0 casillas (0,0%) han esperado un recuento menor que 5.

El recuento mínimo esperado es 10,00.

b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2

Fuente: Elaboración en spss v.25

Se observa que la significancia estadística del Chi cuadrado de homogeneidad es altamente significativa *($p < 0.001$), es decir la sensibilidad antibacteriana de ambos productos no es homogénea.

Análisis e interpretación de los resultados

- Para describir el efecto antibacteriano de un aceite ozonizado de girasol en *Porphyromonas gingivalis* agente causal de la enfermedad periodontal en comparación a la Clorhexidina 0,12% (CHX) + Cloruro de cetilpiridinio 0,05% (CPC) a las 72 horas, se realizó una tabla comparativa.

Tabla 10

Resultados de los halos de inhibición en milímetros a las 72 horas

Placa Petri	Aceite Ozonizado de Girasol	CHX 0,12%+ CPC 0,05%	Aceite de girasol 100 %
1	22	18	6
2	21	18	6
3	22	19	6
4	21	21	6
5	23	18	6
6	18	20	6
7	21	19	6
8	21	18	6
9	19	18	6
10	21	18	6
PROMEDIOS	20.9	18.7	6

Fuente: Trabajo de investigación

En la tabla 10, se describe la formación del halo de inhibición en milímetros a las 72 horas:

- En el aceite ozonizado de girasol se registró una mínima de 18 mm y una máxima de 23 mm, en promedio 20.9mm.
- En la Clorhexidina 0,12% (CHX) + Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% (CPC) se registró una mínima de 18 mm y una máxima de 21 mm, en promedio 18.7mm. (control positivo).
- En el aceite de girasol al 100% se registró 6mm, observándose que no hubo variación (control negativo).

- Para describir el efecto antibacteriano de un aceite ozonizado de girasol en *Porphyromonas gingivalis* agente causal de la enfermedad periodontal en comparación a la Clorhexidina 0,12% (CHX) + Cloruro de cetilpiridinio 0,05% (CPC) a las 120 horas, se realizó una tabla comparativa.

Tabla 11

Resultados de los halos de inhibición en milímetros a las 120 horas

Placa Petri	Aceite Ozonizado de Girasol	CHX 0,12%+ CPC 0,05%	Aceite de girasol 100 %
1	22	18	6
2	21	18	6
3	22	19	6
4	21	21	6
5	23	18	6
6	18	20	6
7	21	19	6
8	21	18	6
9	19	18	6
10	21	18	6
PROMEDIOS	20.9	18.7	6

Fuente: Trabajo de investigación

En la tabla 11, se describe la formación del halo de inhibición en milímetros a las 120 horas:

- En el aceite ozonizado de girasol se registró una mínima de 18 mm y una máxima de 23 mm, en promedio 20.9mm.
- En la Clorhexidina 0,12% (CHX) + Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% (CPC) se registró una mínima de 18 mm, y una máxima de 21 mm, en promedio 18.7mm (control positivo).
- En el aceite de girasol al 100% fue de 6mm, observándose que no hubo variación (control negativo).

- Para comparar la sensibilidad bacteriana producida por un aceite ozonizado de girasol y la Clorhexidina 0,12% (CHX) + Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% (CPC) en *Porphyromonas gingivalis* agente causal de la enfermedad periodontal se realizaron 02 tablas:

En la tabla 12 se observan la sensibilidad bacteriana producida por el aceite ozonizado de girasol, la Clorhexidina 0,12% (CHX) + Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% (CPC), y el aceite de girasol al 100% en *Porphyromonas gingivalis* comparada cualitativamente según la escala de Duraffourd, de manera individual, en cada placa petri de la siguiente manera:

Tabla 12

Sensibilidad bacteriana según escala de Duraffourd

Placa Petri	Aceite Ozonizado de Girasol	CHX 0,12%+ CPC 0,05%	Aceite de girasol 100 %
1	Sumamente sensible	Media	Nula
2	Sumamente sensible	Media	Nula
3	Sumamente sensible	Media	Nula
4	Sumamente sensible	Sumamente sensible	Nula
5	Sumamente sensible	Media	Nula
6	Media	Sumamente sensible	Nula
7	Sumamente sensible	Media	Nula
8	Sumamente sensible	Media	Nula
9	Media	Media	Nula
10	Sumamente sensible	Media	Nula

Fuente: Trabajo de Investigación

Obteniéndose los siguientes resultados, según escala de Duraffourd:

- Para el aceite ozonizado de girasol 08 placas Petri revelaron ser sumamente sensibles y 02 placas Petri presentaron sensibilidad media.

- Para la Clorhexidina 0,12% (CHX) + Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% (CPC) 02 placa Petri reveló ser sumamente sensible y 08 placas Petri presentaron sensibilidad media.
- En el aceite de girasol al 100% la sensibilidad antibacteriana fue nula (control negativo) en las 10 placas Petri.
- No se consideran el tiempo ya que los resultados para las 72 y 120 horas fueron los mismos.

En la tabla 13 se observan la sensibilidad bacteriana promedio en milímetros del halo de inhibición formados en el aceite ozonizado de girasol, la Clorhexidina 0,12% (CHX) + Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% (CPC), y el aceite de girasol en *Porphyromonas gingivalis*.

Tabla 13

Sensibilidad bacteriana según promedios en escala de Duraffourd

	Nula	Sensibilidad limite	Media	Sumamente sensible
Aceite Ozonizado de Girasol				20.9mm
CHX0,12%+CPC 0,05%			18.7mm	
Aceite de girasol 100%	6mm			

Fuente: Trabajo de investigación

Observando cualitativamente ,el efecto inhibitorio in vitro, en base a los promedios obtenidos en la formacion de halos, se observó que el aceite ozonizado de girasol demostro ser sumamente sensible en comparación a la Clorhexidina 0.12% + cpc 0,05% que registró una sensibilidad media,según escala de Duraffourd.

V. Discusión de resultados

En la presente investigación se pudo encontrar que el aceite ozonizado de girasol manifestó tener actividad antibacteriana frente a las *Porphyromonas gingivalis*, según formación de halos de inhibición, in vitro.

Estos resultados coinciden con los que encontrara Montevecchi et al., al evaluar la actividad antibacteriana de un aceite de oliva extra-virgen ozonizado (Novox®), en 08 placas Petri, a diferentes diluciones, en contra las *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™.

Hallando un diámetro de inhibición del crecimiento contra *Porphyromonas gingivalis* de 30mm, sin diluir a las 48 horas, en comparación al máximo obtenido en la presente investigación que fue menor ya que alcanzó sólo 23 milímetros a las 72 y 120 horas.

Montevecchi et al (2013) refiere: “El posible mecanismo por el cual el aceite de O3 actúa como antiséptico, es la oxidación de microorganismos a través de una liberación lenta de peróxidos (Travagli et al., 2010; Valacchi et al., 2011). Sin embargo, la reacción de ozonolisis no tiene sentido si no podemos cuantificar la cantidad de peróxido que puede ser liberado por el aceite de O3. Los principales métodos cuantitativos desarrollados para determinar la calidad del aceite de O3 son: valor de peróxido, valor de ácido y valor de yodo. El valor del peróxido (IP) es el número que expresa en miliequivalentes de oxígeno activo la cantidad de peróxido contenida en 1000 g de la sustancia (British Pharmacopoeia, 2012).

El IP es un indicador de la cantidad de oxígeno activo que se puede liberar: la IP más alta, da una mayor eficacia antimicrobiana del aceite de O₃ (Díaz et al., 2006; Travagli et al., 2010)” (p. 296).

El aceite ozonizado de girasol, (Oleozon[®]) empleada en la investigación fue de 8-12,8 g de hidroxihidroperóxidos de triglicéridos insaturados como oxígeno activo, basado a lo anterior podemos deducir que posee un valor aceptado de peróxido, lo que proporcionó la característica antibacteriana, similar a la clorhexidina 0,12% + CPC 0,05%, resultado encontrado en el presente estudio.

Pietrocola et al., (2018), evaluaron un aceite de oliva ozonizado, sobre periodonto patógenos periodontales in vitro, en el cual solo consideraron *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* y *S. mutans*, evaluadas después de 24 a 96 horas a 37°C y estadísticamente con ANOVA de una vía y la prueba de Tukey. Comprobando una capacidad antibacteriana moderada, pero al compararlo con la clorhexidina concluye que es menor, tal vez porque la clorhexidina empleada fue al 2% en comparación a los resultados obtenidos en la presente investigación que al comparar el aceite ozonizado de girasol y la Clorhexina 0,12%+CPC0,05% muestra según la formación del halo de inhibición mostrado en promedio de 20.9mm versus 18.7 de la CHX0,12%+CPC0,05%, exhibiendo ser ligeramente mayor en el aceite ozonizado de girasol.

Peña et al (2015) realizó un ensayo clínico-terapéutico controlado evaluando la eficacia del Oleozon[®], al primer y octavo día encontrando un buen resultado para el grupo donde aplicaron el aceite ozonizado de girasol al igual que Indurkar y Verma (2016) evaluaron el efecto del aceite ozonizado (Ozonil[®]) y el gel de clorhexidina 1% sobre la gingivitis inducida por placa, concluyendo ambos estudios que los aceites ozonizados pueden ser empleado satisfactoriamente clínicamente, lo que puede recomendarse realizar estudios clínicos en un futuro próximo.

González -Arias y Horta-Rangel (2017) afirma “de acuerdo con los procedimientos recomendados por OMS y otras agencias como la colaboración Cochrane o la FDA de los EE. UU, no existen evidencias que validen la eficacia del ozono como un medicamento” (p.77). Sin embargo, su uso, se encuentra extendido en medicina desde hace años, en varios países con éxito.

La colaboración Cochrane es una organización sin fines de lucro la integran alrededor de 11, 500 investigadores de unos 90 países y aplican un proceso de revisión sistemático y riguroso de publicaciones sobre salud. En lo referente al ozono aun no aparecen resultados Cochrane favorables, ellos refieren al pobre rigor científico de investigaciones realizadas en Cuba, lo que sugeriría a mi parecer, realizar investigaciones futuras en el área de la salud.

Una visión que refleja con claridad las inquietudes, clínicas, científicas, académicas, éticas y de protección al paciente de los terapeutas del ozono se obtiene al comparar la definición de **fármaco** según afirma Goodman y Gilman, en “Bases Farmacológicas de la Terapéutica”: “cualquier sustancia que produce efectos medibles o sensibles en los organismos vivos y que se absorbe, puede transformarse, almacenarse o eliminarse” (Gonzales-Arias y Horta Rangel, 2017), por lo que se concluye según definición que puede ser considerado como un “farmaco”.

VI. Conclusiones

- 1- Existe actividad antibacteriana de un aceite ozonizado de girasol sobre *Porphyromonas gingivalis*, *in vitro*. Probablemente, por la formación de productos de oxidación con la reacción del ozono con los ácidos grasos y otros sustratos, que van a formar compuestos con actividad germicida.
- 2- El efecto antibacteriano según halo de inhibición formado por el aceite ozonizado de girasol en promedio fue comparativamente mayor en promedio en comparación a la clorhexidina al 0,12% + CPC 0,05% a las 72 horas. Aceptándose la hipótesis alterna.
- 3- El efecto antibacteriano según halo de inhibición formado por el aceite ozonizado de girasol en promedio fue comparativamente mayor en comparación a la clorhexidina al 0,12%+ CPC 0,05%. a las 120 horas. Aceptándose la hipótesis alterna.
- 4- La sensibilidad bacteriana encontrada en el aceite ozonizado de girasol fue 80% sumamente sensible, en comparación a la clorhexidina al 0,12% + CPC 0,05% que registró un 80% sensibilidad media, según la escala de Duraffourd. Además, se registró la significancia estadística del Chi cuadrado de homogeneidad siendo altamente significativa ($p < 0.001$), es decir la sensibilidad bacteriana de ambos productos no es homogénea. Aceptándose la hipótesis alterna. Sin embargo, cuantitativamente, al compararlos, no muestra diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.149$), según Corrección de Bonferroni.

VII. Recomendaciones

- 1- Se sugiere extender a la realización de estudios in vitro en otros microorganismos asociados a la enfermedad periodontal, para ver su efectividad antimicrobiana.
- 2- Realizar ensayos clínicos, con aceites ozonizados de girasol y oliva que según autores refieren ser lo más utilizados.
- 3- Ampliar trabajos de investigación en otras especialidades de odontología.
- 4- Tomar en cuenta el valor del peróxido (IP) de los aceites ozonizados para encontrar un valor aceptable de uso, con características germicidas ideales.
- 5- Considerar el análisis cualitativo, ya que los resultados estadísticos cuantitativos en relación con el efecto antibacteriano al comparar el aceite ozonizado de girasol y la Clorhexina al 0,12% + CPC 0,05%, no mostraron diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.149$), según Corrección de Bonferroni, a las 72 y 120 horas, siendo diferente a lo esperado por el investigador.

VIII. Referencias

- Aigaje-Sierra, A. y Zurita-Solís, M (2017). Efectividad antimicrobiana del aceite esencial de *Mintostachys mollis* (tipo) al 25, 50, 100 % frente a *Porphyromonas gingivalis*. *Revista científica Dominio de las ciencias*,3(1),3-20. Recuperado de <http://dominiodelasciencias.com/ojs/index.php/es/article/view/230>.
- Al Habashneh, R., Alsaman, W., y Khader, Y. (2015). Ozone as an adjunct to conventional nonsurgical therapy in chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *Journal of periodontology Research*, 50(1):37-43. doi: 10.1111/jre.12177.
- Alvarez, J., y Wolfshon, B. (2017). *OLEOZON. Aplicaciones Estomatológicas*. La Habana.Cuba, Editorial académica española. Recuperado de https://www.researchgate.net/profile/Bernardo_Wolfsohn2/publication/314172789_OLEOZON_Aplicaciones_Estomatologicas/links/58c1a90c45851538eb7ce25e/OLEOZON-Aplicaciones-Estomatologicas.pdf.
- Alzamora, L., Morales, L., Armas, L., y Fernández, G. (2001). Medicina Tradicional en el Perú: Actividad Antimicrobiana in vitro de los Aceites Esenciales Extraídos de Algunas Plantas Aromáticas . *Anales de la Facultad de Medicina*, 62 (2), 156 - 161.
- Anonimo (2017). *Ecured*. Retrieved from *Porphyromonas*: Recuperado de <https://www.ecured.cu/index.php?title=Bacteria&action=history>.

- Anonimo (24 Octubre de 2016). Antoni van Leeuwenhoek, el primer microbiólogo. *El Pais*. Recuperado de https://elpais.com/elpais/2016/10/24/ciencia/1477260258_805231.html.
- Association German Medical Association of Ozone application. (2009). Guidelines for the Use of Ozone in Medicine. *European Cooperation of Medical Ozone in Prevention and Therapy*, 1-14. Recuperado de <http://www.gsozonecentre.com/G1.pdf>. Retrieved from German Medical Association of Ozone Application.
- Bascones-Martínez, A., y Figuero-Ruiz, E. (2005). Las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*, 17(3), 147-156. Recuperado de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-65852005000300004&lng=es&tlng=es.
- Bostanci, N., y Belibasakis, G. (2012). Porphyromonas gingivalis : an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiology Letters*, 1-9. doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02579.x.
- Caton, J., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I., Jepsen, J., Kornman, K.... Tonetti, T. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of Clinic of Periodontology*, 45(20), 1-8. doi.org/10.1111/jcpe.12935.
- Cruz, E., Ramirez, J. y Contreras, A. (2014). La moxifloxacina como coadyuvante en el tratamiento. *Revista Clínica de Periodoncia*, 7(3), 200-208. doi.org/10.1016/j.piro.2014.06.001.
- Díaz, M. (2010). Usos y propiedades de los aceites vegetales ozonizados. La experiencia cubana. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 41, 1-12.

- Díaz,A., Vivas, R., Puerta, L., Ahumado, M., Herrera, A. y Simancas, M. (2010). Periodontitis, *Porphyromonas gingivalis* y su relación con la expresión de quorum sensing. *Revista Cubana de Estomatología*, 47(4), 404-416. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072010000400003&lng=es&tlng=es.
- Díaz, J., Yáñez. J., Melgar, S., Álvarez, C., Rojas, C y Vernal, R (2012) Virulencia y variabilidad de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y su asociación a la periodontitis. *Revista Clínica Periodoncia Implantología y Rehabilitación Oral*, 5(1); 40-5. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.4067/S0719-01072012000100007>
- Díaz,J, Parés, Y., y Díaz.A. (2014). El impacto social y económico de la ozonoterapia en la deficiencia de inmunoglobulina A. *Mediciego*, 20(1). Recuperado de <https://www.medigraphic.com/pdfs/mediciego/mdc-2014/mdcs141i.pdf>.
- Diomedey,A., Chacón, E., Delpiano, L., Hervé, B., Jemenao, M., Medel, M.,...Cifuentes, M. (2017). Antisépticos y desinfectantes:apuntando al uso racional.Recomendaciones del Comité Consultivo. *Revista chilena Infectologia*, 34(2) ,156-174. Recuperado:<https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v34n2/art10.pdf>.
- FDI World Dental Federation. (2018). *Salud y enfermedades periodontales .Guía práctica para reducir la carga mundial de. Global Periodontal Health Project*, 6-16 .Recuperado de <https://www.fdiworlddental.org/sites/default/files/media/resources/gphp-2018-toolkit-en.pdf>.
- Gonzalez-Arias, A., y Horta-Rangel, F. (2017). Ozono ,contaminación ambiental y la medicina basada en evidencia. *Revista Cubana de Física*, 34 (1),70-79. Recuperado de

[http://www.revistacubanadefisica.org/RCFextradata/OldFiles/2017/34-1/RCF%202017%20No1%20\(70\).pdf](http://www.revistacubanadefisica.org/RCFextradata/OldFiles/2017/34-1/RCF%202017%20No1%20(70).pdf).

Gupta, G., y Basal , M. (2012). Ozone therapy in periodontics. *Journal of medicine and life*, 5(1) , 59-67. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22574088>.

Gupta, S., y Deepa (2016) D. Applications of ozone therapy in dentistry. *Journal of Oral Research and review*, 8 (2) ,86-91. doi: 10.4103/2249-4987.192243.

Hayakumo, S., Arakawa, S., Takahashi, M., Kondo, K. M., y Izumi., Y. (2014). Effects of ozone nano-bubble water on periodontopathic bacteria and oral cells - in vitro studies. *Science and Tecnology of advanced materials*, 15(5). doi: 10.1088/1468-6996/15/5/055003.

Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, P (2014). *Metodología de la investigación*. México DF. ,México, Mc Graw Hill.

Horna, S. (2014). *Efectividad De Los Enjuagatorios Con Agua Ozonizada En El Control Del Nivel De La Placa Dentobacteriana*. (Tesis de Pregrado).Universidad de Trujillo, Trujillo, Perú.

How,K., Song,K., y Chan, K. (2016). Porphyromonas gingivalis: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Frontiers in Microbiology*, 7 ,53.doi: 10.3389/fmicb.2016.00053.

IETSI. (2018). *Reporte de Evidencias N°2. Ozonoterapia. Perú*.Recuperado: http://www.essalud.gob.pe/ietsi/pdfs/guias/RE_ozonoterapia_Final.pdf.

Indurkar, M., y Verma, R. (2016). Effect of ozonated oil and chlorhexidine gel on plaque induced gingivitis: A randomized control clinical trial. *J Indian Soc Periodontology*, 20(1),32-5. doi:10.4103/0972-124X.170806 .

- Isler, S., Unsal, B., Soysal, F., y G., O. (2018). The effects of ozone therapy as an adjunct to the surgical treatment of peri-implantitis. *Journal of Periodontology Implant SCI*, 48 (3),136-151.doi: 10.5051/jpis.2018.48.3.136.
- Kindelán, L., Cordies, B., y Miranda, M. (2016). Buenas prácticas clínicas de enfermería en la aplicación de ozonoterapia en pacientes con afecciones crónicas. *Revista Cubana de Enfermería*, 32, (4). Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03192016000400006 .
- Kornman, K., y Tonetti, M. (2018). Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Clinical Periodontology*,45 (20).Recuperado de <https://onlinelibrary.wiley.com/toc/1600051x/2018/45/S20>.
- Lektemur, A., y Bakar,O. (2018). *Ozone in Dentistry*.Turquia:Editorial IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.75829.
- Martinez, F., y Rubio, M. (2007). *Adaptación del concepto de Hiperzonización a una hidrolavadora y construcción del prototipo*. (Tesis de pre grado). Escuela de Ingeniería y Ciencias, Puebla, Mexico.
- Martínez-Sánchez, G., Re, L., Perez-Davison, G., y Horwat, R. (2012). Las aplicaciones médicas de los aceites ozonizados, actualización. *Revista Española de Ozonoterapia*, 121-139.Recuperado de <http://www.revistaespañoladeozonoterapia.es/index.php/reo/article/view/18/18>.
- Montevecchi, M., Dorigo, A., Cricca, M., y Checchi, L. (2013). Comparison of the antibacterial activity of an ozonated oil with chlorhexidine digluconate and povidone-iodine. A disk diffusion test. *The new microbiologica*, 289-302.Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23912871/>.

Organización mundial de la salud. (2012, Abril). Salud bucodental. Recuperado de <https://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es/>.

Organización Mundial de la Salud. (2018). *SALUD BUCODENTAL*. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>

Padilla, E. (2016). Usos terapéuticos del ozono en los servicios de salud. *Rev Cubana de Medicina Natural y Tradicional*, 1(1).

Recuperado:<http://www.revmnt.sld.cu/index.php/rmnt/article/view/17/36>.

Pandya, D. M., Mathur, L., y Shankarapillai, R. (2016). Comparative evaluation of two subgingival irrigating solutions in the management of periodontal disease: A clinicomicrobial study. *Journal of India Society of Periondontology*, 597-602. doi: 10.4103/jisp.jisp_328_16.

Patiño, N. (2017). Evaluación del efecto de la ozonoterapia sobre la diversidad y número de bacterias presentes en la cavidad oral de perros con enfermedad. (*Tesis de Maestría*). Universidad de Cuenca. Cuenca, Ecuador.

Peña, S., Díaz, L., Ferrer, S., Aguilar, M., y Santos, L. (2015). Eficacia del Oleozon® en pacientes con periodontitis del adulto. *Scielo: Medisan*, vol.19 no.11. Recuperado:http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192015001100005.

Pérez, R., Rodríguez, G., Paneque, M., y Pérez, A. (2009). La Ozonoterapia en Estomatología. *MEDISAN*, 13(4). Recuperado de http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol13_4_09/san10409.htm.

Pietrocola, G., Ceci, M., Preda, F., Poggio, C., y Colombo, M. (2018). Evaluation of the antibacterial activity of a new ozonized olive oil against oral and periodontal pathogens.

Journal of clinical and experimental dentistry, 10(11) ,103-
e1108.doi:10.4317/jced.54929.

- Ramos, D., Moromi, H., y Martinez, E. (2011). Porphyromonas gingivalis: patógeno predominante en la periodontitis crónica. *Odontol. Sanmarquina*, 14(1), 34-38.
Recuperado de
https://www.sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/odontologia/2011_n1/pdf/a11.pdf.
- Real academia española. (2018). *Diccionario de la Lengua Española*. Recuperado de <https://rae.es/?id=RNhrJGg>.
- Sanchez Barrueto, C. (2009). *Eficacia de los enjuagatorios con agua ozonizada en el control de los niveles de placa bacteriana y de streptococcus mutans en cavidad oral*. (Tesis Doctoral).Universidad de Trujillo, Trujillo, Perú.
- Santos, J., Castro,A., Carlos, J., Torres, K., Jamaluddin,A., Vieira, D., ... Leone, R (2013). Ozonoterapia en odontología: una revisión sistemática. *International Journal of Odontostomatology*, 7 (2) , 267-278.doi.org/10.4067/S0718-381X2013000200017.
- Schwartz, A., y Quintero, R. (Octubre de 2008). *La ozonoterapia frente a la legislación: hacia un análisis global*. Simposio llevado a cabo en el 1er. Congreso Mundial de Oxígeno-Ozonoterapia,avalado por la FIOOT. Mexico D.F., Mexico.
- Shoukheba, M., y Ali, S. (2014). The effects of subgingival application of ozonated olive oil gel in patient with localized aggressive periodontitis. A clinical and bacteriological study. *Tanta Dental Journal* 11, 63-73.doi.org/10.1016/j.tdj.2014.04.001.
- Sosa Flores, J. (2015). *Efecto antibacteriano in vitro del extracto alcohólico de rosmarinus officinalis (romero) y del agua ozonizada sobre streptococcus mutans y enterococcus faecalis*. (Tesis de pregrado).Universidad de Sipán, Perú.

Stella, L., y Marin, D. (2009). Metodología para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica Año XV*, 263-268. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/849/84916714049.pdf>.

Strauss, F., Beza, M., Arias, A., y Melgar-Rodriguez, S. (2014). *El efecto antibacteriano del ozono en Porphyromonas gingivalis: estudio piloto in vitro*. Conferencia llevado a cabo en el 5° Congreso Iberoamericano de Periodoncia. Cartagena, Colombia. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/282188833_Efecto_antibacteriano_del_ozono_en_Porphyromonas_gingivalis_estudio_piloto_in_vitro.

Tessier, J. (2014). Aplicaciones clínicas del Ozono en Odontología. *Dental Tribune*, 11(4), 7-17. Recuperado de <https://la.dental-tribune.com/news/aplicaciones-clinicas-del-ozono-en-odontologia/>.

Tonetti, MS., Greenwell, H., y Kornman, KS. (2018). Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Clin Periodontol.*, 45(20), 149–161. doi. org/10.1111/jcpe.12945.

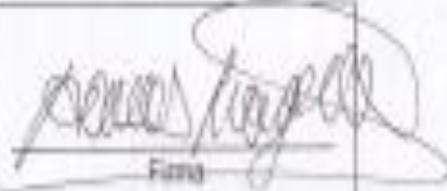
World Federation of Ozone Therapy. (2015). *Revisión WFOT sobre Ozonoterapia basada en evidencias*: Recuperado de <https://www.wfoot.org/wp-content/uploads/2016/01/WFOT-OZONE-2015-ESP.pdf>

IX. Anexos

PROMEDIO DE VALORACIÓN: 92

OPINIÓN DE APLICABILIDAD: a) Excelente b) Buena c) Regular d) Mala e) Muy mala

Nombre y Apellido	DR. JUAN MARGARITA BARRERA	DM N°	03277136
Dirección domiciliar	Av. Joaquín Manuel 108 San Jorge	Teléfono / Celular	999040565
Título profesional	CIRUJANO DENTISTA		
Grado Académico	DOCTOR (UNFV)		
Especialidad	ODONTOLOGÍA		

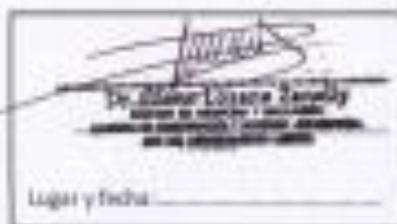

 Firma
 Lugar + fecha

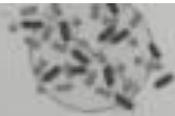
PROMEDIO DE VALORACIÓN:

90

OPCIÓN DE APLICABLES: a) Excelente b) Buena c) Regular d) Mala e) Muy buena

Nombre y Apellido:	GLENN ANDRÉS ZARULLY	DNI N°	09202257
Dirección domiciliar:	Dr. Saiz Clinicas 171 - 602 LIMA	Teléfono/ Celular	998033567
Título Profesional:	MEDICO - CIRUJANO		
Grado Académico:	Doctor en Medicina		
Mención:	Medicina		



Anexo 3. Constancia de Laboratorio Microbiológico

**LABORATORIO DE ANÁLISIS
MICROBIOLÓGICOS**

Bija. Nora Bravo Cruz *Dr. Alfredo Guillén Osseglio*
Siv Edocía 130, San Miguel, Telf. 578-5795

"Año de la Lucha contra la Corrupción y la Impunidad"

CERTIFICADO DE EJECUCIÓN

El que suscribe, Jefe del **Laboratorio de Análisis Microbiológicos** deja constancia:

Que la Magister Carmen del Pilar Li Pareyra identificada con DNI N° 06729671, egresada del Doctorado en Odontología de la Escuela de pos grado de la Universidad Nacional Federico Villarreal ha ejecutado su proyecto de investigación titulado: **"ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE UN ACEITE OZONIZADO DE GIRASOL EN PORPHYROMONAS GINGIVALIS AGENTE CAUSAL DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL, 2019"** en las instalaciones del laboratorio al cual representa, realizando las labores desde mayo del 2019 hasta julio 2019.

Se expide el presente a solicitud de la interesada, para los fines que estime conveniente.

Atentamente,

San Miguel, 18 de Julio del 2019


Alfredo Guillén Osseglio
Colegio Médico del Perú 16795

Anexo 4. Productos utilizados



Figura 3, Aceite ozonizado de girasol marca OLEOZON[®] y al 0,12% + cloruro de cetilpiridinio 0,05% de la marca PERIO AID[®] Intensive Care



Figura 4. Cera: *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, Microbiologics

Anexo 5. Procedimiento de rehidratación de las cepas

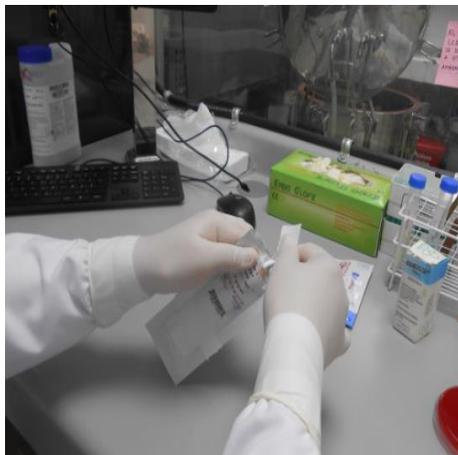


Figura 5. Rompimiento del sobre con cepas *Porphyromonas gingivalis*



Figura 6. Capsula con cepa de *Porphyromonas gingivalis*



Figura 7. Hidratación de cepa de *Porphyromonas gingivalis*



Figura 8. Siembra de *Porphyromonas gingivalis* en el medio de cultivo.

Anexo 6. Sistema de anaerobiosis: Sistema Anaerocult® P (Merck)



Figura 9. Placa sembrada con *Porphyromonas gingivalis* dentro de un sobre de incubación



Figura 10. Sobre de incubación con indicador anaerobiosis Anaerotest® (Merck)

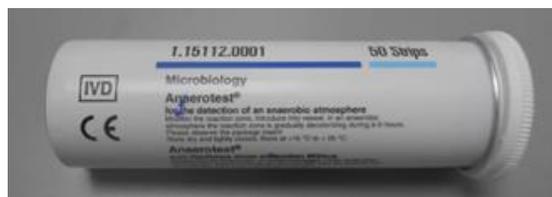


Figura 11. Indicador de anaerobiosis Anaerotest® (Merck)

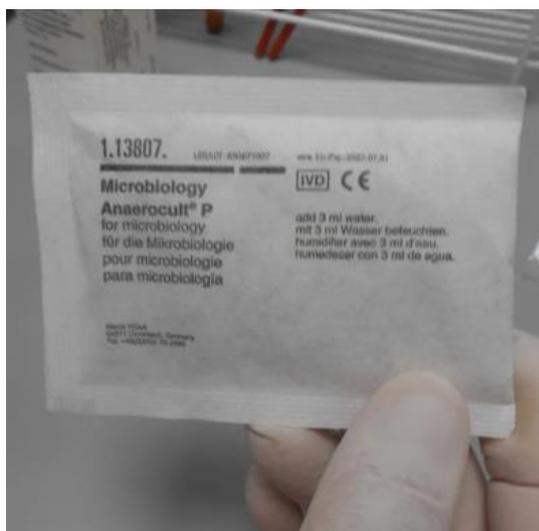


Figura 12. Anaerocult®



Figura 13. Colocación del Anaerocult® humedecido con 3ml de agua



Figura 14. Sellado con un Anaeroclip[®] – Merck



Figura 15. Cultivo de *Porphyromonas gingivalis* a los 5 días: colonias negras

Anexo 7. Cultivo de *Porphyromonas gingivalis*

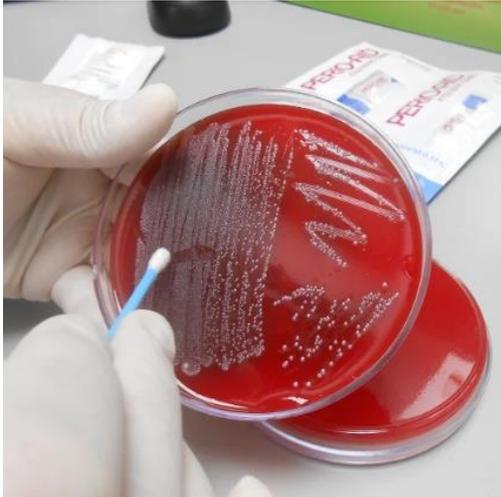


Figura 16. Hisopo humedecido en suero fisiológico donde se recoge la cepa



Figura 17. Suspensión en suero fisiológico hasta lograr una turbidez al tubo 0,5 de la escala de Mc Farland

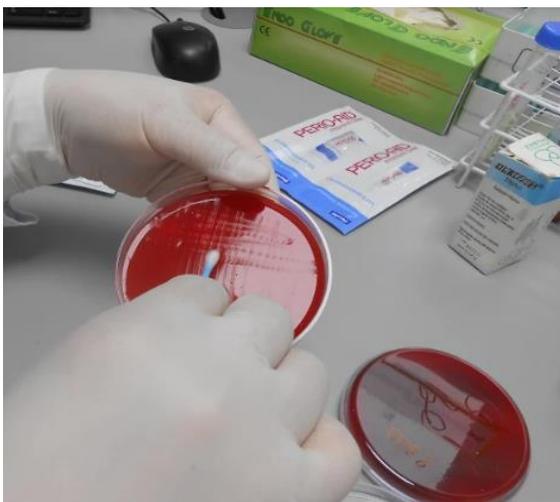


Figura 18. Sembrado de las *Porphyromonas gingivalis* en placas de agar Brucella sangre con hematina y menadiona por diseminación en tres

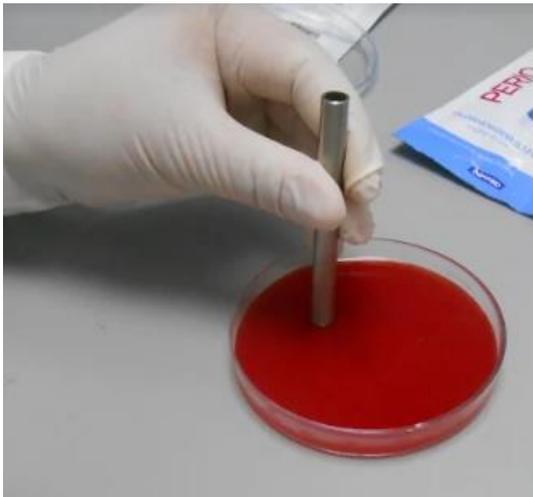


Figura 19. Perforación de 6mm con sacabocado de acero.



Figura 20. Placa Petri con tres perforaciones



Figura 21. Adición de 50 μ L de producto a cada perforación..

Anexo 8. Placas Petri

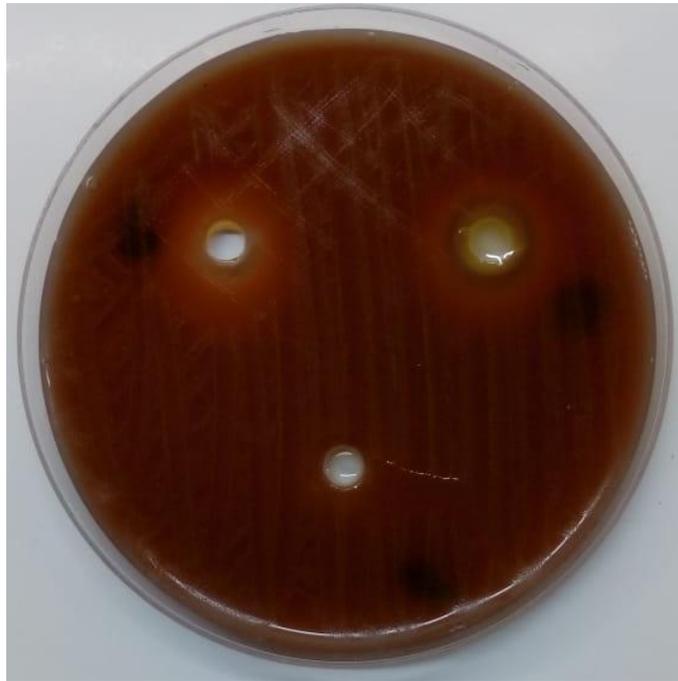


Figura 22. Placa Petri 1.
Fuente: Trabajo de investigación



Figura 23. Placa Petri 2
Fuente: Trabajo de investigación

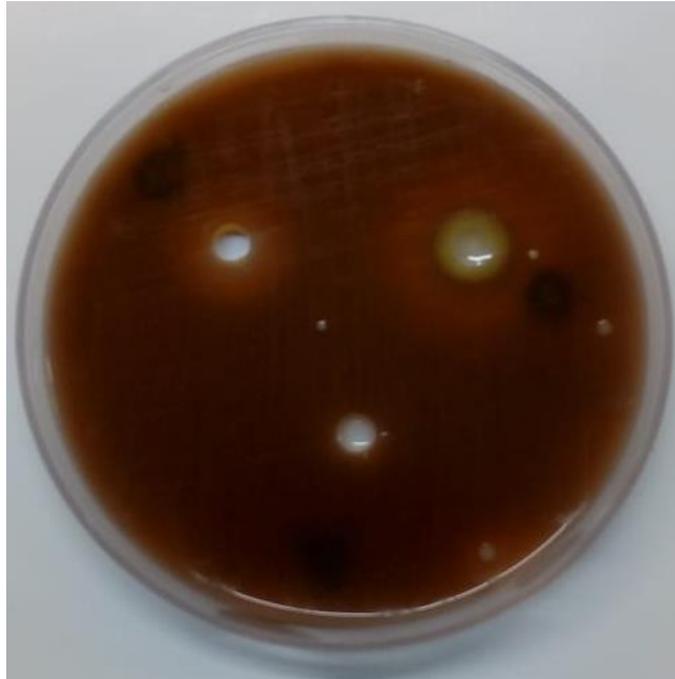


Figura 24. Placa Petri.
Fuente: Trabajo de investigación



Figura 25. Placa Petri 4
Fuente: Trabajo de investigación

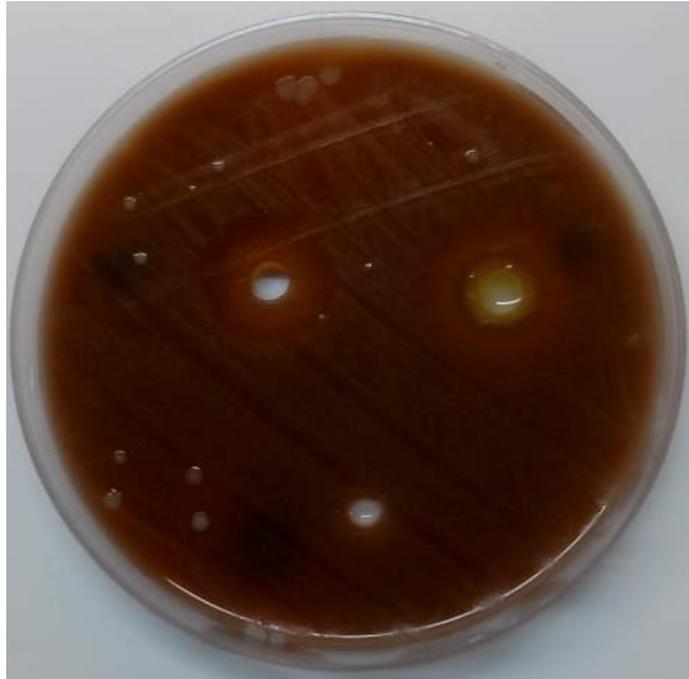


Figura 26. Placa Petri
Fuente: Trabajo de investigación



Figura 27. Placa Petri 6
Fuente: Trabajo de investigación

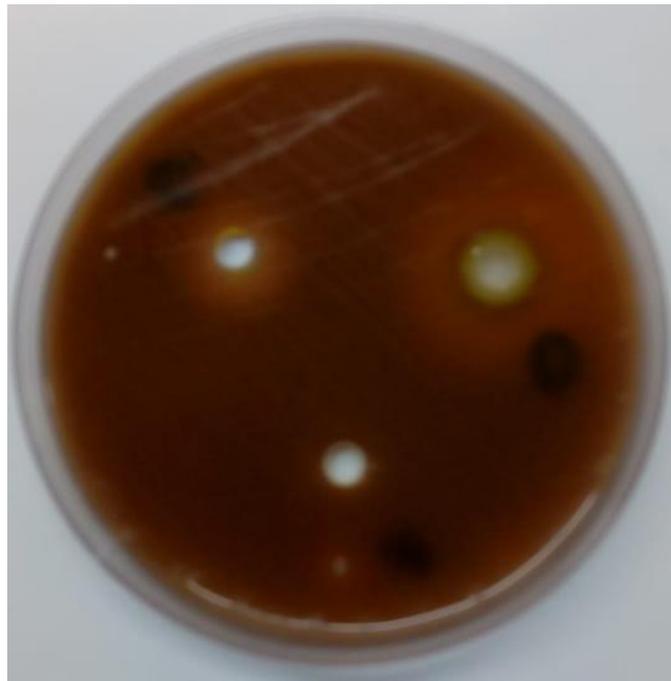


Figura 28. Placa Petri 7
Fuente: Trabajo de investigación

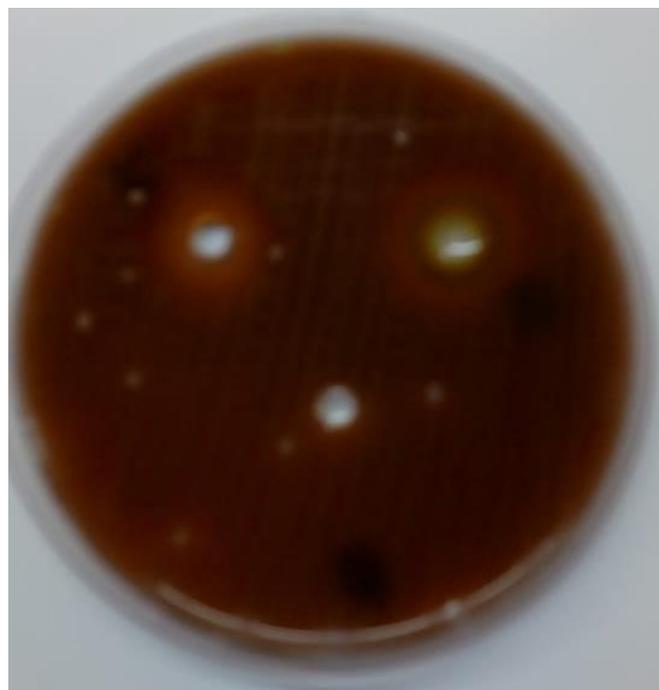


Figura 29. Placa Petri 8
Fuente: Trabajo de investigación

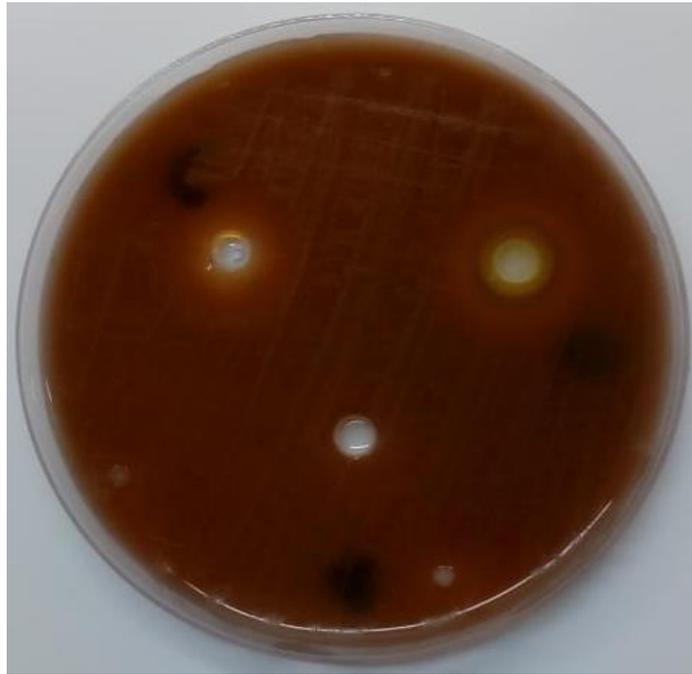


Figura 30. Placa Petri 9
Fuente: Trabajo de investigación

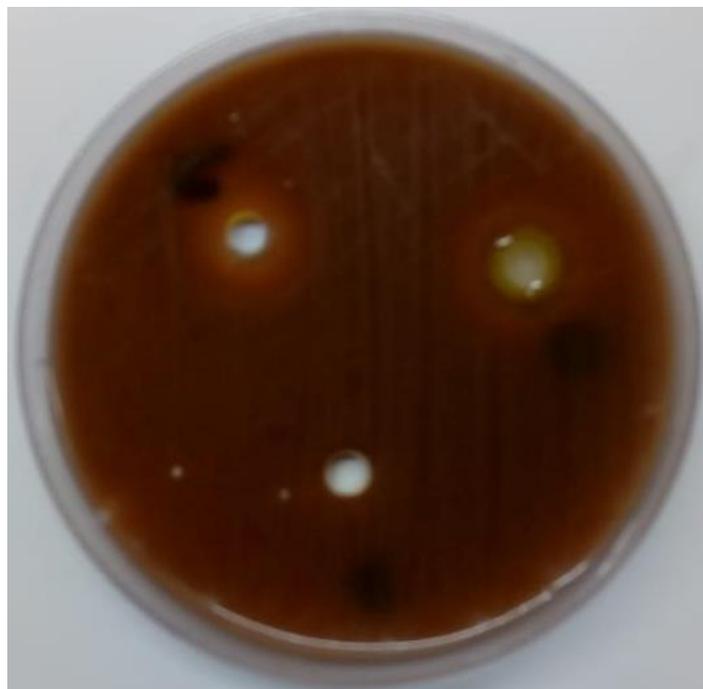


Figura 31. Placa Petri 10
Fuente: Trabajo de investigación

Anexo 9. Figuras de los resultados de la investigación

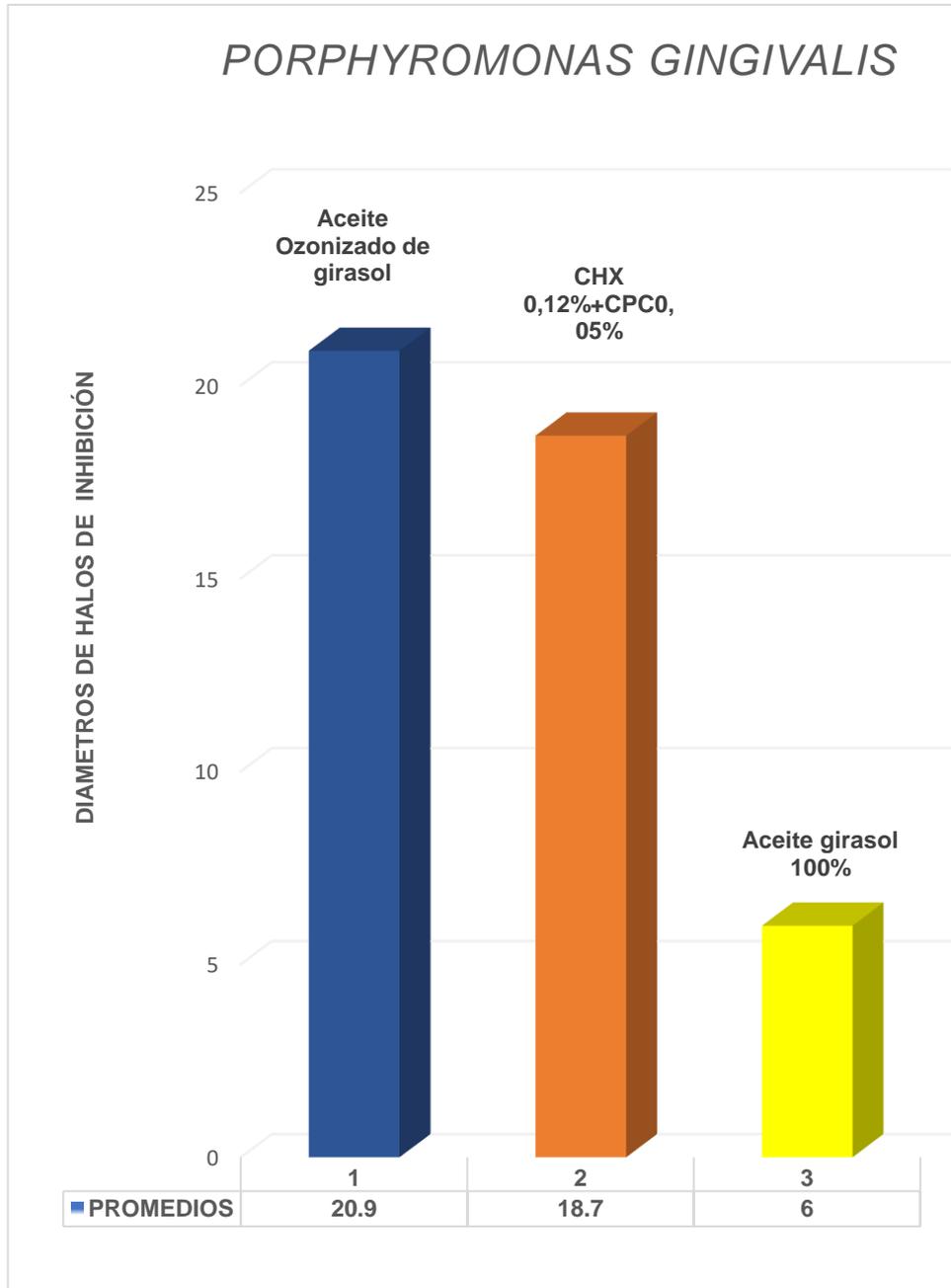


Figura 32. Promedios de halos de inhibición en *Porphyromonas gingivalis*
Fuente: Elaboración en Excel

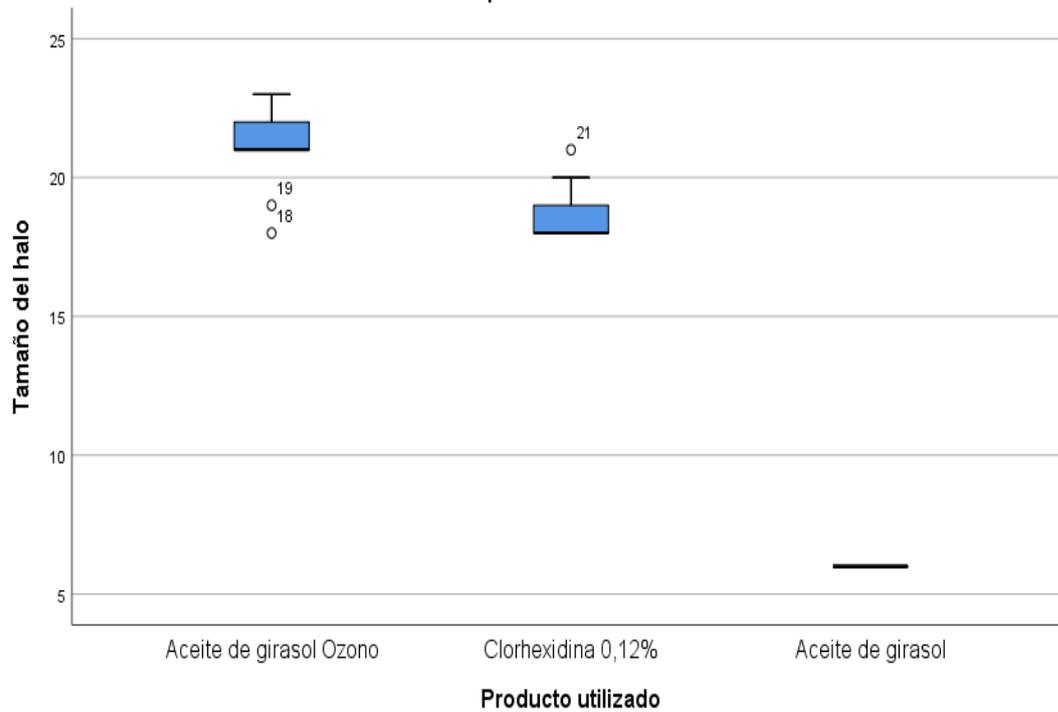


Figura 33. Diferencias del halo de inhibición en la distribución de los grupos a las 72 horas.
Fuente: Elaboración en spss v.25

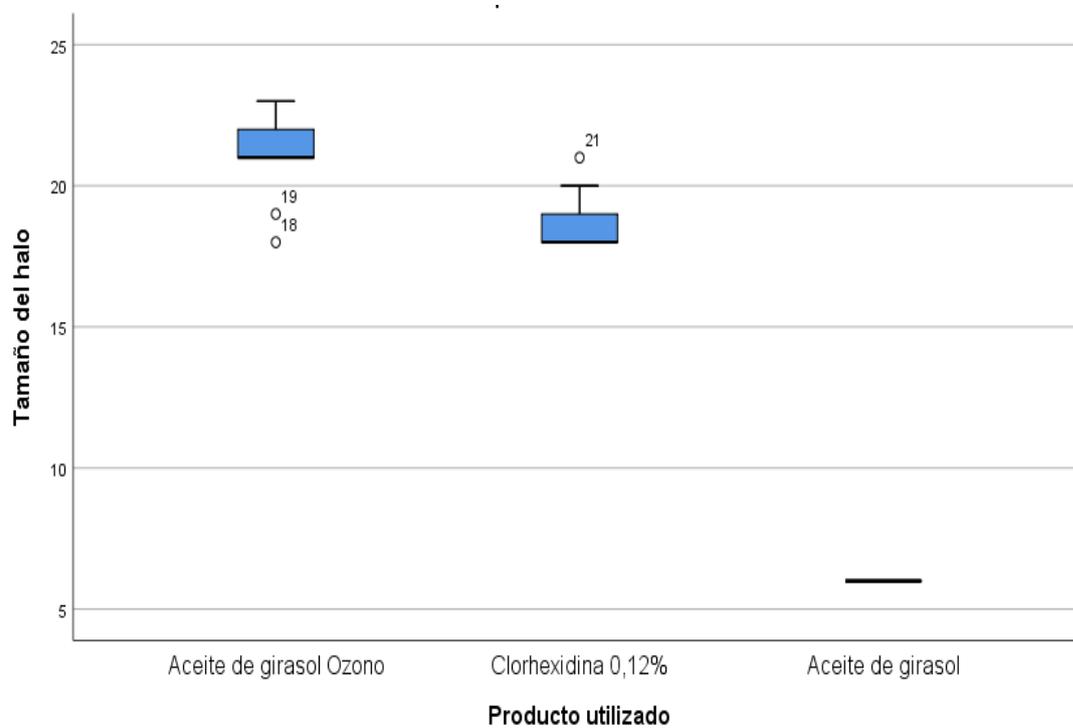


Figura 34. Diferencias del halo de inhibición en la distribución de los grupos a las 120 horas
Fuente: Elaboración en spss v.25

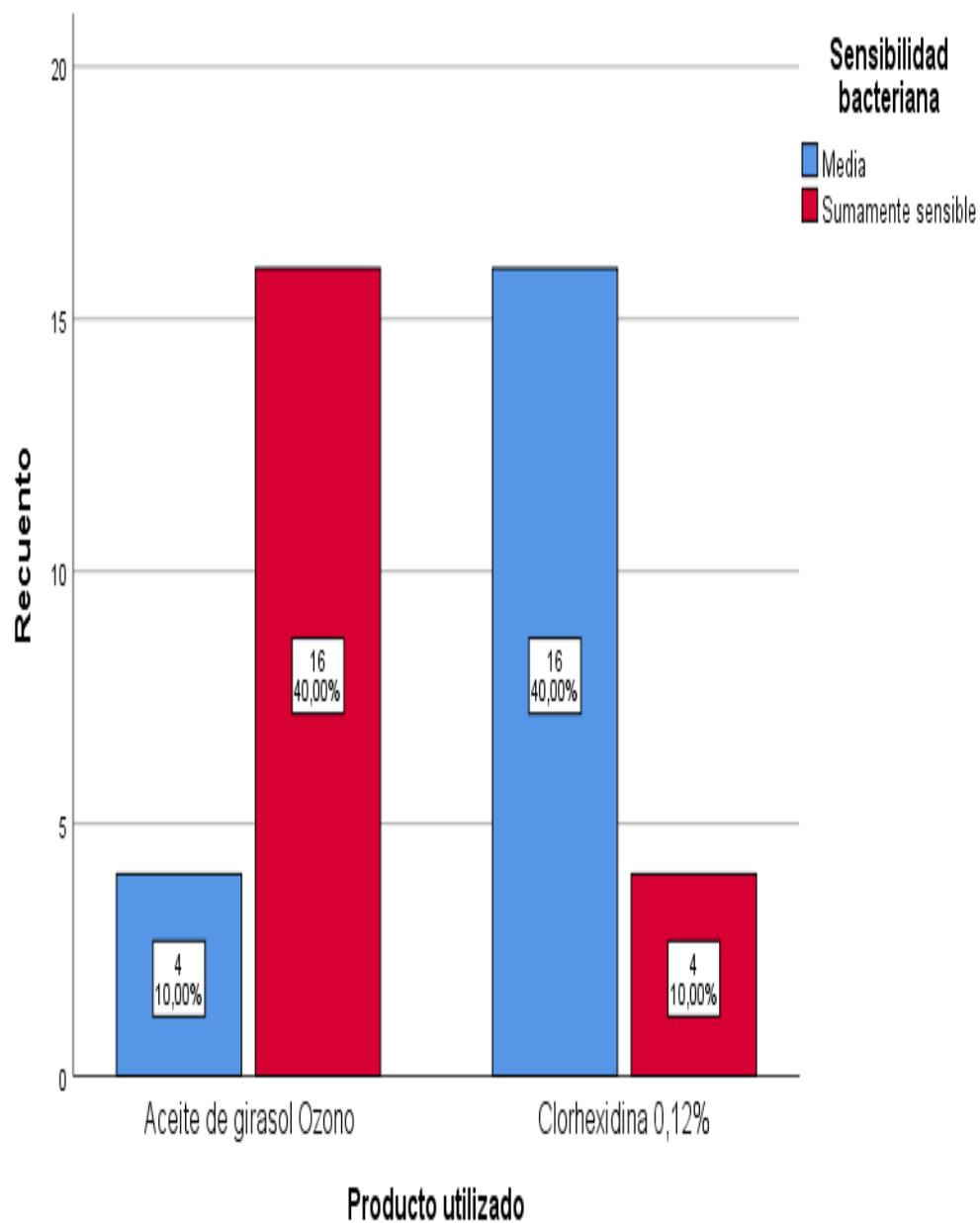


Figura 35. Sensibilidad bacteriana según Chi cuadrado.
Fuente: Elaboración en spss

Anexo 10. Matriz de consistencia

TEMA: “Actividad antibacteriana de un aceite ozonizado de girasol en *Porphyromonas gingivalis* agente causal de la periodontitis, 2019”

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGIA
<p>Problema general ¿Cuál es la actividad antibacteriana de un aceite ozonizado de girasol en <i>Porphyromonas gingivalis</i> agente causal de la enfermedad periodontal, 2019?</p> <p>Problemas específicos - ¿Cuál es el efecto antibacteriano de un aceite ozonizado de girasol en <i>Porphyromonas gingivalis</i> agente causal de la enfermedad periodontal en comparación la clorhexidina al 0,12%+CPC0,05% a las 72 horas. - ¿Cuál es el efecto antibacteriano de un aceite ozonizado de girasol en <i>Porphyromonas gingivalis</i> agente causal de la enfermedad periodontal en comparación la clorhexidina al 0,12%+CPC0,05% a las 120 horas? - ¿Cuál es la sensibilidad bacteriana producida por un aceite ozonizado de girasol y la Clorhexidina 0,12% (CHX) + Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% (CPC) en <i>Porphyromonas gingivalis</i> agente causal de la enfermedad periodontal?</p>	<p>Objetivo general Determinar la actividad antibacteriana de un aceite ozonizado de girasol en <i>Porphyromonas gingivalis</i> agente causal de la enfermedad periodontal ,2019.</p> <p>Objetivos específicos - Describir el efecto antibacteriano de un aceite ozonizado de girasol en <i>Porphyromonas gingivalis</i> agente causal de la enfermedad periodontal en comparación a la Clorhexidina al 0,12% + CPC0,05% a las 72 horas. - Describir el efecto antibacteriano de un aceite ozonizado de girasol en <i>Porphyromonas gingivalis</i> agente causal de la enfermedad periodontal en comparación a la Clorhexidina al 0,12% + CPC0,05% a las 120 horas. - Comparar la sensibilidad bacteriana producida por un aceite ozonizado de girasol y la Clorhexidina 0,12% (CHX) + Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% (CPC) en <i>Porphyromonas gingivalis</i> agente causal de la enfermedad periodontal</p>	<p>Hipótesis general H₁ .Existe actividad antibacteriana de un aceite ozonizado de girasol en <i>Porphyromonas gingivalis</i> agente causal de la enfermedad periodontal,2019. H₀. No existe actividad antibacteriana de un aceite ozonizado de girasol en <i>Porphyromonas gingivalis</i> agente causal de la enfermedad periodontal,2019.</p> <p>Hipótesis específicas H₁-El efecto antibacteriano de un aceite ozonizado de girasol en <i>Porphyromonas gingivalis</i> agente causal de la enfermedad periodontal es mayor que la clorhexidina al 0,12%+CPC0,05% a las 72 horas. H₀-El efecto antibacteriano de un aceite ozonizado de girasol en <i>Porphyromonas gingivalis</i> agente causal de la enfermedad periodontal es menor que la clorhexidina al 0,12%+CPC0,05% a las 72 horas. H₁-El efecto antibacteriano de un aceite ozonizado de girasol en <i>Porphyromonas gingivalis</i> agente causal de la enfermedad periodontal será mayor la clorhexidina al 0,12%+CPC0,05% a las 120 horas. H₀-El efecto antibacteriano de un aceite ozonizado de girasol en <i>Porphyromonas gingivalis</i> agente causal de la enfermedad periodontal es menor la clorhexidina al 0,12%+CPC0,05% a las 120 horas. H₁- Las <i>Porphyromonas gingivalis</i> agente causal de la enfermedad periodontal son más sensibles a un aceite ozonizado de girasol en comparación con la Clorhexidina 0,12% (CHX) + Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% (CPC). H₀ - Las <i>Porphyromonas gingivalis</i> agente causal de la enfermedad periodontal son igual o menos sensibles a un aceite ozonizado de girasol en comparación con la Clorhexidina 0,12% (CHX) + Cloruro de Cetilpiridinio 0,05% (CPC).</p>	<p>V. INDEPENDIENTE Actividad antibacteriana de un aceite ozonizado de girasol (Oleozone®)</p> <p>• Dimensión: Tiempo de exposición</p> <p>• Indicador: - 72 horas y 120 horas</p> <p>V. DEPENDIENTE <i>Porphyromonas gingivalis</i> agente causal de la enfermedad periodontal</p> <p>• Dimensión: Formación del halo de inhibición Sensibilidad bacteriana</p> <p>• Indicador: - Milímetros - Escala de Duraffourd</p> <p>V. INTERVINIENTES Aceite girasol 100% (IDEAL) (Control Negativo)</p> <p>• Dimensión: Tiempo de exposición.</p> <p>• Indicador: 72 horas y 120 horas.</p> <p>Clorhexina 0.12%. +cpc0,05% (PERIO-AID® Intensive Care) (Control Positivo)</p> <p>• Dimensión: Tiempo de exposición.</p> <p>• Indicador: 72 horas y 120 horas.</p>	<p>TIPO DE ESTUDIO</p> <ul style="list-style-type: none"> • Enfoque: Cual- cuantitativo • Grado Abstracción: aplicado • Experimental • Prospectivo • Longitudinal • Analítico <p>Nivel de investigación: Aplicativo Tipo de diseño: Experimental</p> <p>POBLACIÓN colonias de <i>Porphyromonas gingivalis</i> (ATCC33277)</p> <p>MUESTRA 60 unidades de muestra</p> <p>MUESTREO No probabilístico aleatorio simple por conveniencia</p> <p>METODO: M. de difusión en pozo en agar.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Análisis cuantitativo de datos • Análisis cualitativo de datos <p>TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ficha de recolección de datos • Los datos serán registrados en Excel y SPSS V. 25. • Pruebas estadísticas: <ul style="list-style-type: none"> • Kruskall Wallis • Prueba de Corrección de Bonferroni • Chi cuadrado

