



# UNIVERSIDAD ANDINA DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGIA



TESIS

---

**Efecto antibacteriano *invitro* del agua ozonizada frente a la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522 – Cusco, 2022**

---

**PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL**

Cirujano Dentista

**PRESENTADO POR EL BACHILLER**

Br. Delgado Tupa Rodrigo Alejandro

**ASESOR:**

Dr. Cd. Alejandro Pablo Pletickosich Picon

CUSCO – PERÚ

2022



## AGRADECIMIENTOS

Al padre supremos que guía el camino de todos incluyendo el mío con mucho amor y dedicación.

A mi amada madre que con su sola presencia y amor me guio hasta este momento tan importante, además de ser la principal impulsadora de mi vida y las buenas decisiones que eh ido tomando con el transcurso de mi carrera y mi día a día.

A mi demás familia que siempre me apoya y me da aliento para seguir creciendo.

A mi asesor el Doctor Alejandro Pablo Pletickosich, quien muy amablemente me guio durante todo este proceso que fue el desarrollo de mi tesis.

Y a todas aquellas personas que fueron muy importantes en mi formación profesional como mis docentes y amigos con los cuales compartí durante todo mi proceso de la Universidad.



## DEDICATORIA

Para mi amado padre, que en paz descansa y me guía desde el cielo con el mismo amor que me brindó en vida. Siendo un gran ejemplo de perseverancia y superación para mí. Siempre te pienso con amor y admiración.

Para mi bella madre que es la principal impulsadora de mi carrera y me inculco con los valores que me llevaron a ser la persona que soy ahora, siempre recuerdo todos tus consejos y los pongo en práctica con el mayor orgullo del mundo.



## JURADOS DE LA SUSTENTACION

### **Jurado Dictaminante**

Dr. Cd. José Eduardo Longa Ramos

Dr. Cd. Julio Lazo Álvarez

### **Jurado Replicante**

Mg. Cd. Erika Eleana Corzo Palomo

Mg. Cd. María Luisa Fluker Gallegos

### **Asesor**

Dr. Cd. Alejandro Pablo Pletickosich Picon



## ÍNDICE

<b>CARATULA</b> .....	i
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	ii
<b>DEDICATORIO</b> .....	iii
<b>JURADO DE SUSTENTACION</b> .....	iv
<b>ÍNDICE</b> .....	v
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	ix
<b>ABREVIATURAS</b> .....	xi
<b>RESUMEN</b> .....	xii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii

### **CAPITULO I**

<b>INTRODUCCION</b> .....	1
1.1 Planteamiento del problema .....	3
1.2 Formulación del problema .....	6
1.2.1 Problema general .....	6
1.2.2 Problemas específicos .....	6
1.3 Justificación .....	7
1.4 Objetivos .....	8
1.4.1 Objetivo general .....	8
1.4.2 Objetivos específicos .....	8
1.5 Delimitación del estudio .....	9
1.5.1 Delimitación espacial .....	9
1.5.2 Delimitación temporal .....	9

### **CAPITULO II**

#### **MARCO TEORICO**

2.1 Antecedentes .....	10
2.1.1 Antecedentes Internacionales .....	10
2.1.2 Antecedentes nacionales .....	17
2.1.3 Antecedentes locales .....	20



2.2 Bases teóricas .....	22
2.2.1 El ozono .....	22
2.2.2 La ozonoterapia.....	25
2.2.3 El agua ozonizada .....	29
2.2.4 Flora microbiana oral .....	33
2.2.5 <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i> .....	33
2.2.6 Factores de crecimiento bacteriano .....	35
2.3 Marco conceptual .....	37
2.4 Hipótesis de estudio .....	39
2.5 Variables .....	40
2.5.1 Variable independiente .....	40
2.5.2 Variable dependiente .....	40
2.5.3 Co- variable .....	40
2.6 Operacionalización de las variables .....	41

### **CAPITULO III**

#### **DISEÑO METODOLOGICO**

3.1 Tipo de investigación .....	42
3.1.1 Experimental .....	42
3.1.2 Comparativa .....	42
3.1.3 Prospectivo .....	42
3.1.4 Longitudinal .....	42
3.2 Población y muestra .....	43
3.2.1 Población bacteriana de <i>Aggregatibacter</i> <i>Actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522 .....	43
3.2.2 Selección de la muestra de <i>Aggregatibacter</i> <i>Actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522 .....	43
3.2.3 Población del agua ozonizada .....	43
3.2.4 Selección de la muestra de agua ozonizada .....	43
3.2.5 Distribución de la muestra .....	44
3.3 Tipo de muestreo .....	45
3.4 Criterios de inclusión y exclusión .....	45
3.4.1 Criterios de inclusión .....	45



3.4.2 Criterios de exclusión .....	45
3.5 Técnica de recolección de datos .....	45
3.5.1 Técnica de recolección de muestra .....	45
3.5.2 Instrumento .....	45
3.6 Procedimientos .....	46
3.6.1 Reconocimiento de ambientes y equipos .....	46
3.6.2 Preparación de materiales .....	46
3.6.3 Preparación de medios de cultivo .....	47
3.6.4 Viabilización de la cepa bacteriana .....	50
3.6.5 Fabricación del SIA .....	53
3.6.6 Curva de crecimiento bacteriano .....	55
3.6.7 Obtención del agua ozonizada .....	61
3.6.8 Prueba para disolución del agua ozonizada .....	62
3.6.9 Efecto antibacteriano del agua ozonizada .....	62
3.7 Recolección de datos .....	66
3.7.1 Trámites Administrativos .....	66
3.7.2 Procedimientos .....	67
3.7.3 Sistematización .....	68
3.7.4 Procesamiento de datos .....	68
3.8 Campo de investigación .....	69
3.8.1 Área de salud .....	69
3.8.2 Área específica .....	69
3.8.3 Especialidad .....	69
3.8.4 Tema .....	69

## CAPITULO IV

### RESULTADOS

4.1 Curva de crecimiento bacteriano de la cepa de <i>Aggregatibacter</i> <i>Actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522 .....	70
4.1.1 Curva de crecimiento bacteriano del control negativo de la cepa de <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522 .....	74
4.2 Efecto antibacteriano del agua ozonizada a la concentración de 0.4 g/L sobre la cepa de <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522...	78



4.3 Efecto antibacteriano del agua ozonizada a la concentración de 0.8 g/L sobre la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522... 82

## CAPITULO V

5.1 Discusión ..... 86  
5.2 Conclusiones ..... 90  
5.3 sugerencias ..... 91

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS** ..... 92

**INSTRUMENTO** ..... 97

**VALIDACION DEL INSTRUMENTO** ..... 98

## ANEXOS

**Anexo N°1** Matriz de consistencia ..... 103  
**Anexo N°2** Proveído para ingreso a la Facultad .....105  
**Anexo N°6** Proveído para pernoctación en la Facultad ..... 107  
**Anexo N°4** Registro fotográfico ..... 109





## ÍNDICE DE CUADROS Y TABLAS

<b>Tabla N°1</b> .....	<b>83</b>
Curva de crecimiento bacteriano de la cepa de <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522	
<b>Cuadro N°2</b> .....	<b>85</b>
Gráfico de la curva de crecimiento bacteriano de la cepa de <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522	
<b>Tabla N°3</b> .....	<b>87</b>
Curva de crecimiento bacteriano del control negativo de la cepa de <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522	
<b>Cuadro N°4</b> .....	<b>89</b>
Grafica de la curva de crecimiento bacteriano del control negativo de la cepa de <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522	
<b>Tabla N°5</b> .....	<b>91</b>
Efecto antibacteriano del agua ozonizada a la concentración de 0.4 g/L sobre la cepa de <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522.	



**Cuadro N°6 ..... 93**

Grafica del efecto antibacteriano del agua ozonizada a la concentración de 0.4 g/L sobre la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522.

**Tabla N°7 ..... 95**

Efecto antibacteriano del agua ozonizada a la concentración de 0.8 g/L sobre la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522.

**Cuadro N°8 ..... 97**

Grafica del efecto antibacteriano del agua ozonizada a la concentración de 0.8 g/L sobre la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522.



## ABREVIATURAS

<b>ATCC</b>	= Colección estadounidense de cultura tipográfica
<b>ABS</b>	= Absorbancia
<b>BHI</b>	= Infusión cerebro corazón
<b>CO<sub>2</sub></b>	= Dióxido de carbono
<b>NAOCL</b>	= Hipoclorito de sodio
<b>PPM</b>	= Partes por millón
<b>O</b>	= Oxígeno
<b>H<sub>2</sub>O</b>	= Agua
<b>H<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	= Agua ozonizada
<b>UV</b>	= Ultra violeta
<b>N</b>	= Nitrógeno
<b>CD</b>	= Cirujano dentista
<b>THM</b>	= Trihalometanos
<b>TOC</b>	= Columna total de ozono
<b>Mg</b>	= Mili gramo
<b>KI</b>	= Yoduro de potasio
<b>OR</b>	= Ozono residual
<b>PH</b>	= Potencial de hidrogeno
<b>NM</b>	= Nanómetros
<b>DPD</b>	= Dimetil pfenillendiamina
<b>LAP</b>	= Periodontitis agresiva localizada
<b>GB</b>	= Glóbulos blancos
<b>OMPA</b>	= Proteína termo modificable
<b>LTXA</b>	= Leuco toxina



## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue el de demostrar el efecto antibacteriano del agua ozonizada a las concentraciones de 0.4 g/L y 0.8g/L, sobre las cepas de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans ATCC 29522*, la cual es una de las principales causantes de la enfermedad periodontal. Para poder demostrar su efectividad nos vimos en la necesidad de realizar un trabajo *INVITRO* dentro de un ambiente adecuado y controlado, en este caso el laboratorio de microbiología de la Universidad Andina del Cusco. La población estuvo comprendida por 6 placas Petri, 10 tubos de ensayo tapa rosca y 32 cubetas de cuarzo; Todas esta inoculadas con la cepa ya mencionada. Para la inoculación de estas se utilizaron dos medios diferentes de cultivo: el Agar Müller Hinton (medio solido) y el caldo de cultivo BHI (medio liquido). Para poder determinar el momento en el cual se haría la aplicación del agua ozonizada, era indispensable realizar su curva de crecimiento, en el cual se utilizaron 10 cubetas de cuarzo en las cuales había medio de cultivo liquido más inculo de la cepa, los cuales fueron llevados a incubación continua a 35<sup>o</sup> centígrados para poder ser leídos en espectrofotómetro a 550 nm cada hora y así tener la noción de su desarrollo con el paso de las horas. Una vez definido el momento de aplicación del agua ozonizada se procedió a realizar el experimento, para lo cual se hizo una división de dos grupos de 11 cubetas, uno por cada concentración de agua ozonizada, 2 de blanco, 7 de muestra y 2 de control positivo; Para ser leídas en el lapso de 1 hora durante 6 horas. Las pruebas arrojaron lecturas con una disminución media de absorbancia de 0.010, teniendo como mayor diferencia que el H<sub>2</sub>O<sub>3</sub> de 0.8g/L fue sumamente mortal para la cepa y con el H<sub>2</sub>O<sub>3</sub> de 0.4g/L; Donde si bien hubo disminución de la cepa luego presento desarrollo, aunque poco significativo y anómalo con respecto a la curva de crecimiento.

**Palabras clave:** Efecto antibacteriano y agua ozonizada.



## ABSTRACT

The aim of this research was to expose the antibacterial effect of ozonized water at concentrations of 0.4 g/L and 0.8g/L, on the strains of *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522, which is one of the main causes of periodontal disease. In order to demonstrate its effectiveness, we found it necessary to carry out an IN VITRO study within a suitable and controlled environment, on this occasion, the microbiology laboratory of the Andean University of Cusco (Universidad Andina del Cusco). The sample was comprised of 6 Petri plates, 10 screw cap test tubes and 32 quartz cuvettes; all were inoculated with the aforementioned strain. Two different cultivation methods were used for its inoculation: Müller Hinton Agar (solid medium) and BHI culture broth (liquid medium). In order to determine the moment in which the application of ozonated water would be made, it was essential to carry out its growth curve, for which 10 quartz cuvettes were used in which there was a liquid culture medium plus inoculum of the strain, which were taken to continuous incubation at 350 centigrade to be able to be read in a spectrophotometer at 550 nm every hour and thus have the notion of their development over the hours. Once the moment of application of the ozonated water was defined, the experiment was carried out, for which a division of two groups of 11 cuvettes was made, one for each concentration of ozonated water, 2 blank, 7 samples and 2 controls. positives; To be read within 1 hour for 6 hours. Which yielded readings with an average decrease in absorbance of 0.010, having as the greatest difference that the H<sub>2</sub>O<sub>3</sub> of 0.8g/l was extremely deadly for the strain and with the H<sub>2</sub>O<sub>3</sub> of 0.4g/L where although there was a decrease in the strain then it presented development, although not very significant and anomalous with respect to the growth curve.

**Keywords:** ozonated water and antibacterial effect.



## CAPITULO I

### INTRODUCCION

La presente investigación refiere al tema de efecto anti bacteriano del agua ozonizada, como la capacidad de este producto para poder eliminar bacterias como la *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* debido a su potente acción oxidante, si es que se aplica en las condiciones y concentraciones apropiadas.

La característica principal de este efecto antimicrobiano reside en su gran capacidad de alterar el pH del medio donde se aplica, transformándolo en un medio sumamente alcalino, el cual es incompatible con la vida de una gran cantidad de bacterias que habitan en el ecosistema de la cavidad bucal. Es por ello que la presente investigación tiene como finalidad, determinar el efecto del agua ozonizada sobre un determinado microorganismo en la práctica clínica odontológica.

Es necesario mencionar los motivos que conllevaron a esta investigación. Una de ellas son las enfermedades de la cavidad bucal, que se inician como producto de la mala calidad de vida de cada individuo, mala higiene bucal, el temor a los chequeos preventivos y otras patologías propias que alteran los tejidos dentales.

La investigación a esta problemática se realizará con el interés de fomentar el uso de nuevos insumos, que sean de ayuda a la hora de realizar los procedimientos odontológicos, ya que en la actualidad contamos con una mayor gama de insumos, los cuales se han probado que funcionan, pero no son tomados en cuenta a la hora



de trabajar. Con respecto a la práctica científica, la investigación constó con una determinada cantidad de placas Petri y cubetas de cuarzo, previamente cultivadas con cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans ATCC 29522*, posteriormente aplicadas con agua ozonizada y de esta manera poder plasmar los datos recolectados en nuestro instrumento, el cual estará diseñado para medir la turbidez del medio de la bacteria en relación a la concentración del agua ozonizada utilizada.

En el capítulo I se realizará el planteamiento ¿habrá la posibilidad de usar un agente externo aparte del suero fisiológico al momento del lavado para mejorar y maximizar los resultados obtenidos luego de hacer el raspado y alisado radicular?, en el capítulo II explicaremos detalladamente algunos conceptos básicos como ¿qué es el ozono?, ¿por qué se decidió aplicar al *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* en este estudio específico?, en el capítulo III nos centraremos más en presentar la parte práctica misma, dando a conocer materiales y métodos utilizados, en el capítulo IV sintetizaremos toda la información recolectada en el estudio.

Y finalmente en el capítulo V haremos la comparativa con los resultados de nuestros antecedentes dando a exponer los aportes de este procedimiento.



## 1.1 Planteamiento del problema

En la actualidad se le está considerando a la enfermedad periodontal y a las bacterias que la provocan tales como la *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*, como una de las grandes causas de pérdida prematura de piezas dentales, la cual puede darse tanto a nivel de las encías como también en los elementos que conforman el tejido periodontal. Ya que cuando hablamos del ligamento periodontal, nos referimos a una de las estructuras anatómicas más importantes que integran al sistema dentario, y de este dependen muchas funciones tales como: nutrición, sensitiva, de forma, remodelado y sobre todo de estabilidad y soporte a las piezas dentales.

Además de ello se debe resaltar el gran impacto que han dejado las enfermedades periodontales en los pacientes que la padecieron y aun la padecen, al igual de los estragos tanto físicos, funcionales y emocionales, que estos dejan a su paso.

Debido a ello nos cuestionamos. ¿Cuál era la mejor forma de combatirla? ¿Cómo se puede emplear tratamientos alternativos?

Observándose la gran cantidad de tratamientos ya existentes en el medio para este mal que nos aqueja, dentro de todos los procedimientos registrados y evaluados, se notó que todos compartían un mismo actuar para detener el progreso de dichas





patologías, el cual consiste en el detartraje mecánico tanto supra e infra gingival además de una buena irrigación y lavado de las zonas dañadas, y dependiendo de la progresión de la enfermedad, podría brindar un ambiente adecuado para las regeneración de los tejidos afectados.

De esta manera se planteó otra interrogante, ¿habrá la posibilidad de usar un agente externo aparte del suero fisiológico al momento del lavado para mejorar y maximizar los resultados obtenidos luego de hacer el raspado y alisado radicular? al realizar la búsqueda de información respectiva, nos topamos con los beneficios de la ozonoterapia y la gran gama de métodos de empleo, por sus diversas presentaciones como el agua ozonizada, gas ozonizado, aceite ozonizado, y otras presentaciones, las cuales han brindado muy buenos resultados por sus notorias propiedades como: Efectos antimicrobianos, inmunoestimulantes, anti hipóxicos, analgésicos, antioxidantes y re mineralizadores.

De todas las presentaciones existentes en la ozonoterapia, rescatamos el de agua ozonizada ( $H_2O_3$ ), debido a su mejor biocompatibilidad con los tejidos del ligamento periodontal, y además de que, según algunos estudios previos, es la que presenta mejor eficacia para el control de bacterias y microorganismos presentes en



nuestras bocas. Tales como *Gram positivos*, *Gram negativos* y hongos de la *Cándida albicans*.

A demás y a diferencia del gas ozonizado presentara menores riesgos y complicaciones en lo que respecta el sistema respiratorio, es por este motivo que se podría plantear el uso del agua ozonizada como un magnificador de resultados positivos, para que refuerce el tratamiento al momento de hacer el lavado e irrigado en el detartraje de la placa presente en las enfermedades periodontales, de esta manera también mejorar los pronósticos de los mismos.

Reduciendo quizás así la necesidad, del tener que recurrir a tratamientos quirúrgicos, los cuales, si bien siguen presentando buenos resultados con respecto al manejo de la enfermedad periodontal, son de mayor complejidad, riesgo y en algunos casos traumáticos para algunos pacientes.



## 1.2 Formulación del problema

### 1.2.1 Problema general

¿Cuál será el efecto antibacteriano invitro del agua ozonizada frente a la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans ATCC 29522*?

### 1.2.2 Problemas específicos

**P.E.1** ¿Cuál será la curva de crecimiento bacteriano de la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans ATCC 29522*?

**P.E.2** ¿Cuál será el efecto antibacteriano del agua ozonizada a la concentración de 0.40g/L y 0.80g/L frente a la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans ATCC 29522* a la hora 1 de aplicación?

**P.E.3** ¿Cuál será el efecto antibacteriano del agua ozonizada a la concentración de 0.40g/L y 0.80g/L frente a la cepa de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* a la hora 3 de aplicación?

**P.E.4** ¿Cuál será el efecto antibacteriano del agua ozonizada a la concentración de 0.40g/L y 0.80g/L frente a la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans ATCC 29522* a la hora 6 de aplicación?

**P.E.5** ¿Cuál será el efecto antibacteriano del agua ozonizada a la concentración de 0.40g/L y 0.80g/L frente a la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans ATCC 29522* a la hora 24 de aplicación?

**P.E.6** ¿Cuál será el efecto antibacteriano del agua ozonizada a la concentración de 0.40g/L y 0.80g/L frente a la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans ATCC 29522* a la hora 48 de aplicación?



## 1.3 Justificación

### 1.3.1 Conveniencia

Es conveniente realizar este proyecto de investigación debido a que será la base para nuevos proyectos relacionados con el uso del H<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Siendo así quizá el nuevo material de irrigación por conveniencia en el tratamiento periodontal.

### 1.3.2 Relevancia social

La presente investigación posee relevancia social porque utilizara un producto que es de fácil acceso y además podrá ser usado como un refuerzo terapéutico en pacientes.

### 1.3.3 Implicancias practicas

La experimentación será factible de realizar en los laboratorios de ciencias básicas de la UAC y se espera que los resultados obtenidos sirvan de base para futuras investigaciones.

### 1.3.4 Valor teórico

Aquí debemos enfatizar que el presente estudio será de gran utilidad para demostrar la teoría del aprendizaje en cuanto a las propiedades antibacterianas del agua ozonizada y promover así el uso de este material en los tratamientos periodontales que son el día a día de los profesionales en odontología.

### 1.3.5 Utilidad metodológica

La metodología de este proyecto es replicable en otros que estén relacionados con la experimentación de bacterias anaerobias y aerobias además de que el instrumento usado en este experimento también puede ser aplicado en otros experimentos en los cuales haya necesidad de realizar muestras con un determinado periodo de tiempo.



## 1.4 Objetivos de la investigación

### 1.4.1 Objetivo general

Determinar el efecto antibacteriano in vitro del agua ozonizada frente a la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522.

### 1.4.2 Objetivos específicos

- O.E.1** Determinar la curva de crecimiento bacteriano de la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522
- O.E.2** Determinar el efecto antibacteriano del agua ozonizada a la concentración de 0.40 g/L y 0.80g/L frente a la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522 a la hora 1 de aplicación.
- O.E.3** Determinar el efecto antibacteriano del agua ozonizada a la concentración de 0.40g/L y 0.80g/L frente a la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522 a la hora 3 de aplicación.
- O.E.4** Determinar el efecto antibacteriano del agua ozonizada a la concentración de 0.40g/L y 0.80g/L frente a la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522 a la hora 6 de aplicación.
- O.E.5** Determinar el efecto antibacteriano del agua ozonizada a la concentración de 0.40g/L y 0.80g/L frente a la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522 a la hora 24 de aplicación.
- O.E.6** Determinar el efecto antibacteriano del agua ozonizada a la concentración de 0.40g/L y 0.80g/L frente a la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522 a la hora 48 de aplicación.



## **1.5 Delimitación del estudio**

### **1.5.1 Delimitación espacial**

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones de la facultad de ciencias de la salud, específicamente en los laboratorios de ciencias básicas, ambiente número III laboratorio de microbiología.

### **1.5.2 Delimitación temporal**

Toda la realización de la investigación tomo un aproximado de 106 horas, las cuales se distribuyeron para la obtención de la curva de crecimiento bacteriano y la realización del experimento de efecto antibacteriano del agua ozonizada.



## CAPITULO II MARCO TEÓRICO

### 2.1 Antecedentes

#### 2.1.1 Antecedentes Internacionales

**2.1.1.1** Monillo L y Rodríguez J. Con la revisión bibliográfica titulada “Ozonoterapia como adyuvante en el tratamiento periodontal no quirúrgico”., en la revista médica MEDIGRAPHIC, México (2015).

Cuyo objetivo es revisar la bibliografía médica sobre los efectos del ozono infiltrado en el tratamiento periodontal no quirúrgico, presentándose y discutiéndose acciones biológicas, ventajas, objetivos, contraindicaciones y sus diferentes usos en odontología.

Los materiales y métodos empleados serán en base a una comparativa bibliográfica. De diversos estudios previos en los cuales se demostró el efecto del ozono sobre diversos microorganismos y su bio-compatibilidad con los tejidos de la cavidad oral.

En el tratamiento periodontal es fundamental, la eliminación y control de la placa bacteriana, y se observó que un muy buen coadyuvante en este tratamiento, es la aplicación de ozono, pero en su medio acuoso (agua ozonizada). El cual es sumamente biocompatible con los tejidos del ligamento periodontal, además de ser efectivo en otras áreas odontológicas por sus efectos en virus, hongos, bacterias.

- a) La terapia con ozono ha demostrado ser eficiente no solo con la enfermedad periodontal, sino que también es sumamente biocompatible con las células epiteliales y fibroblastos.
- b) Los modos de empleo del ozono en los tratamientos periodontales son modificables y adaptables al manejo previo de la enfermedad periodontal.
- c) Debido a su gran capacidad antibacteriana frente a diferentes microorganismos, Sería de gran utilidad en el



tratamiento de otras áreas odontológicas (1).

**2.1.1.2** Ramírez A. Con la tesis de pregrado que lleva como título: “Aplicación de Ozono-Terapia en Pacientes con Periodontitis Crónica Generalizada. Estudio Clínico y Microbiológico”, en la Universidad de Murcia, España (2015).

La finalidad de este estudio fue el demostrar de una forma aplicativa los rangos de acción del ozono a sus diferentes concentraciones, y así demostrar su eficacia práctica en el área clínica odontología.

En la realización del proyecto fueron empleados una población de 32 pacientes, donde un porcentaje presentara periodontitis crónica y otro con gingivitis asociada a la placa dental, haciendo un promedio de 330 dientes, los cuales serán sometidos a distintos índices periodontales para ser evaluados antes y después de la aplicación de ozono gaseoso y así observar los cambios producidos. Se observo que los dientes que presentaban movilidad tipo 1 y tipo 2 presentaron una gran disminución de movilidad luego del tratamiento con agua ozonizada, además de una significativa reducción de microorganismos en las zonas tratadas con agua ozonizada frente a zonas donde se hizo control con suero fisiológico. Y con respecto a la escala visual analógica; marco una disminución significativa desde la tercera a la sexta semana de terapia (2).

- a) Habrá un cambio en la microflora bacteriana con respecto a los cuadrantes tratados con agua ozonizada y los cuadrantes que fueron de control. Con respecto a las





bacterias Gram Negativas.

- b) Se reducirá de manera significativa y permanente la movilidad dental ya que los valores se mantuvieron estables hasta semas después del estudio.
- c) El ozono será efectivo si se aplica por el tiempo adecuado, y de la manera adecuada, siendo más efectiva su aplicación luego de la limpieza tradicional.

**2.1.1.3** Schwartz A y Martínez G. Con el artículo científico titulado como “La Ozonoterapia y su Fundamentación Científica”, de la Revista Española de Ozonoterapia, España (2012).

La intención de este artículo fue recolectar información actual, con respecto a las experimentaciones científicas que demuestran la valides de la aplicación terapéutica del ozono. Siendo más precisos sobre su aceptación con respecto a los niveles de toxicidad en el organismo.

Para lo cual serán imprescindibles un conjunto de revisiones bibliográficas las cuales podrán cuantificar independiente información del ozono como por ejemplo propiedades físico-químicas, método de acción, indicaciones, pero sobre todo los aspectos en contra como contraindicaciones, efectos adversos y así demostrar que son mucho más grandes los beneficios que los efectos en contra que tiene sobre el cuerpo humano.

El ozono es sumamente capaz de eliminar de manera permanente una gran variedad de bacterias, de entre la cuales se pueden tomar como ejemplo las *gram positivas* y *gram negativas*. A demás de la



*Pseudomona Aeruginosa* y la *Eschericea Coli*; las cuales poseen un alto grado de resistencia a los antibióticos, evidenciando de esta manera la gran capacidad bactericida del ozono.

- a) El uso del ozono puede cambiar drásticamente el rumbo de muchas terapéuticas.
- b) El ozono se considera como un pro fármaco ya que presenta un mecanismo molecular de interacción fármaco-receptor.
- c) Según el estudio, se toma a la terapia con ozono como un producto difícil de patentar, además de que genera muy pocas riquezas debido a su bajo costo (3).

**2.1.1.4** Álvarez J. Con la tesis de especialidad titulada como: “Nivel de conocimiento de la Ozonoterapia en Estomatólogos del Municipio Playa 2015- 2016”, desde la Universidad de Ciencias Médicas de la Habana, Cuba (2017).

En la presente investigación se quiso encuestar y evaluar el nivel de conocimiento sobre el uso de ozono a un conjunto de profesionales en salud oral en el municipio de playa.

Para su realización se reunió un conjunto de 130 profesionales de 4 diferentes escuelas estomatológicas a los cuales se les aplicó una encuesta en común y teniendo como objetivo recolectar el nivel de conocimiento de cada uno de los profesionales tratando de ser los más descriptivos y transversales posibles.

Este estudio ha demostrado que una gran mayoría de estomatólogos del distrito de playa tiene conocimiento sobre el



manejo de ozono para lo que vendrían a ser tratamientos dentales de diferente índole, pero que muy pocos cuentan con el equipamiento necesario para realizarlo, y las escuelas de estomatología aledañas, no poseen los permisos de los pacientes por la carencia de información en el tema.

- a) Las principales indicaciones para el tratamiento con ozonoterapia fueron las urgencias periodontales y abscesos de forma general.
- b) El tratamiento con ozonoterapia presenta limitaciones como ambientes adecuados para la aplicación de estos y el desconocimiento de los tiempos de aplicación de la terapia (4).

**2.1.1.5** Dahdah A y col. Con la tesis de Especialidad denominada “El ozono en periodoncia, perspectivas clínicas”, desde la Universidad Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil. (2017) Cuyo objetivo es el de recopilar información sobre el uso de ozonoterapia en la periodoncia

Los materiales y métodos empleados son terceros molares, sin antagonistas y completamente rotos, recién extraídos de pacientes de 20 a 35 años de edad. Y así poder comprobar si con la irrigación se podrá conseguir limpieza mecánica en las superficies de las raíces expuestas sin generar un efecto negativo en las células del ligamento periodontal.

En este estudio, la literatura corrobora acciones positivas del ozono en la práctica odontológica, pero aún más en la rama de la



periodoncia, por tal motivo se propondrá su inclusión en el arsenal de los odontólogos.

- a) Diversos estudios previos a este, demostraron la efectividad del uso del ozono en el área de periodoncia por sus diversas propiedades.
- b) El ozono no solo tendrá la propiedad de ser bactericida sino también el de ser un gran estimulador en la regeneración tisular.
- c) Hace falta una mayor cantidad de estudios con respecto al ozono para que esta pueda ser usada de manera permanente en la rama de la periodoncia (5).

**2.1.1.6** Escribano C. Con la tesis doctoral titulada como “Aggregatibacter Actinomycetemcomitans: su susceptibilidad a los antimicrobianos”, desde la Universidad de Barcelona, España. (2017)

Por lo cual se realizó un estudio comparativo con diversos tipos de agentes antibacterianos sobre la bacteria y así determinar su susceptibilidad en tratamientos futuros.

Se emplearon cultivos de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* en medios sólidos y líquidos, para los cuales se hizo un sembrado de la boca de un paciente y luego se hizo la diferenciación bacteriana con los medios de cultivo apropiados para esta bacteria para luego ser sometidos a diversos antibióticos para determinar su susceptibilidad a estos mismos, con la intención de brindar mejor



atención en el día a día odontológico.

- a) Llegaron a la conclusión de que el medio apropiado para el desarrollo de esta bacteria es el TGY líquido el cual duplicaría el tiempo de reproducción bacteriana.
- b) El tamaño de colonias obtenidas en este trabajo fue de 0.73 mm lo cual la hace de menor tamaño al común del microbiota oral, dificultando así su estudio.
- c) Dados los resultados obtenidos con los antibióticos y antimicrobianos, es preciso señalar que esta bacteria está en constante variación por lo cual deben continuar los estudios sobre esta (6).

**2.1.1.7** Torres A. Con el artículo científico titulado como “Reducción bacteriana del agua ozonizada sobre *Actinomyces Israelli*”, desde la Universidad Central del Ecuador, Quito (2016).

Lo que se decidió realizar en esta investigación fue el comparar el efecto bactericida sobre la cepa de *Actinomyces Israelli* del agua ozonizada al 5%, hipoclorito de sodio al 5.25% y clorhexidina al 2%. Fueron empleadas 40 piezas dentales humanas uní radicales, inoculadas con *Actinomyces Israelli*, todas irrigadas a diferentes tiempos con agua ozonizada hipoclorito de sodio y clorhexidina y así comparar la reducción bacteriana que estas presentan.

El test de Tukey demostró que los tres componentes desinfectantes usados en la presente investigación (clorhexidina, hipoclorito de sodio y el agua ozonizada), presentan favorables acciones bactericidas sobre el *Actinomyces Israelli*, pero sin diferencias



considerables entre ellas, salvo el hipoclorito de sodio que además posee una propiedad corrosiva.

- a) El agua ozonizada al 5% presentó efecto bactericida similar al hipoclorito de sodio al 5.25%, sobre *A. israeli*.
- b) Tanto el Hipoclorito de Sodio como el Agua Ozonizada, podrían ser usados como agentes irrigadores en procedimientos antibacterianos ya que poseen un muy parecido grado como Germicidas (7).

## 2.1.2 Antecedentes nacionales

**2.1.2.1** Sosa J. Con la tesis de pre grado Titulada “Efecto antibacteriano in vitro del extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) y del agua ozonizada sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*”, desde la Universidad Señor de Sipán, Chiclayo, Perú (2015).

En la presente tesis se propuso determinar el efecto antibacteriano y sinérgico del extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* a las concentraciones de 25 mg/ml y 50 mg/ml y agua ozonizada al 0,4 mg/ml y 0.8 mg/ml.

Se emplearon 40 placas petri, todas contaron con el medio de cultivo Mueller Hinton, de las cuales, 20 serán sembradas con *Streptococcus Mutans* y las otras 20 con *Enterococcus Faecalis* las cuales procederán luego a ser aplicadas con el extracto de *Rosmarinus officinalis* y agua ozonizada para poder así medir halos de inhibición con respecto a las bacterias sembradas.



Los resultados de trabajo lanzaron los siguientes datos, ambas cepas de *Streptococcus Mutans* y *Enterococcus Faecalis* son sensibles a las concentraciones de 25 y 50 mg/ml de *Rosmarinus officinalis* porque se evidenciaron halos de inhibición promedio de 26 a 33 mm siendo mas altos con lo que respecta al agua ozonizada que obtuvo halos de 5 a 15 mm promedio.

- a) No encontró un efecto antibacteriano del agua ozonizada frente al *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*. Obteniéndose halos de inhibición menores a los de la clorexidina a 0,12%.
- b) Se Determinó el efecto sinérgico antibacteriano in vitro del agua ozonizada a 0,8mg/ml sobre el desarrollo de 48 *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* mediante el método de difusión en disco (8).

**2.1.2.2** Carhuayo M. La tesis de Doctorado titulada “Evaluación in-vitro de la eficacia antibacteriana de los irrigantes endodónticos de hipoclorito de sodio al 1% y agua ozonizada frente a una cepa de *Enterococcus Faecalis*”, desde la Universidad Nacional de Trujillo, Perú (2011).

Cuyo objetivo es determinar la eficacia antibacteriana del hipoclorito de sodio al 1% a una temperatura de 37 °C y del agua ozonizada 20 mg/L frente a una cepa de *Enterococcus Faecalis* in vitro

Para la elaboración de este trabajo se trabajó en base a una comparativa entre los efectos antibacterianos del agua ozonizada a 2 mg/ml frente al hipoclorito de sodio al 1% realizados con unas 20 placas Petri previamente cultivadas, las muestras se recolectarán en



un lapso de 24 y 48 horas.

El promedio de ufc de *Enterococcus Faecalis* fue de  $3.49 \times 10^6$  en tiempos de 24 y 48 horas en el caso del agua ozonizada y con el NAOCL fue de 0 respecto a las 24 horas

- a) El agua ozonizada a 20 mg/l no es tan efectiva como el NAOCL frente a *Enterococcus Faecalis*, ya que se obtuvo una formación de colonias en el lapso de 24 a 48 horas (9).

**2.1.2.3** Sánchez C. Con la tesis de maestría titulada “Eficacia de los enjuagatorios con agua ozonizada en el control de los niveles de placa bacteriana y de *Streptococcus Mutans* en la cavidad oral”, desde la Universidad Nacional de Trujillo, Perú (2009).

Cuyo objetivo es evaluar el tipo de control de placa bacteriana que ofrecen los enjuagatorios con agua ozonizada.

En el presente estudio se desarrolló con un grupo de escolares de entre 6 y 9 años, a los cuales se les aplico colutorio de agua ozonizada en grupos de 30 y 60 segundos de aplicación, en un lapso de 4 semanas aplicando el índice de Olerly para medir el nivel de placa en ambos casos.

Los niveles de placa bacteriana de 30 segundos de aplicación fueron de 74% al inicio y de 45% al final indicando una eficacia regular y con respecto al grupo de 60 segundo de aplicación marco un 77% de placa al inicio y 35% al final mejorando los resultados, pero no de manera significativa. A diferencia con el *Streptococcus Mutans* que marco una disminución de más del 85%, resaltando la alta





sensibilidad de este microorganismo.

- a) Los enjuagues con agua ozonizada resultaron 100% efectivos en los niños de 6 a 9 años del colegio Juan Velasco Alvarado.
- b) La eficacia de los enjuagues con agua resultó de menor a una regular intensidad, según el tiempo de aplicación de los enjuagues.
- c) Al grupo de alumnos que se les aplicó agua ozonizada por 60 segundos, obtuvieron una disminución de hasta 85% de placa bacteriana y *Streptococcus Mutans* (10).

### 2.1.3 Antecedentes locales

**2.1.3.1** Mosqueira A y Escobar J. Con la tesis de pre-grado “Efectividad antibacteriana in vitro del hipoclorito de sodio 5%; clorhexidina 5% y agua ozonizada; frente al *Enterococcus Faecalis*, cusco-2021”, desde la Universidad Andina del Cusco, Perú (2021). Cuyo objetivo es demostrar la eficacia del agua ozonizada frente al hipoclorito de sodio y a la clorhexidina al 5%. Para ser usados como agentes bacterianos en los tratamientos periodontales.

Los materiales y métodos empleados serán 42 placas Petri las cuales fueron inoculadas y sembradas con *Enterococcus Faecalis*, las cuales se dividirán en 4 grupos. 3 de ellos para ser aplicados con el hipoclorito de sodio, clorhexidina y agua ozonizada respectivamente, y 1 grupo de 6 placas las cuales servirán de control negativo en las comparativas.



- a) El hipoclorito de sodio y la clorhexidina resultaron ser muy efectivas como antibacterianos contra el *Enterococcus Faecalis* según las medidas de los halos y que el agua ozonizada fue relativamente menor medida contra el *Enterococcus Faecalis*.
- b) El efecto antibacteriano del agua ozonizada fue nula y poco significativa según la escala de Duraford, y según los halos de inhibición represento menos de 10 mm de inhibición en la placa.
- c) El efecto antibacteriano de la clorhexidina y del hipoclorito fue mayor con halos de inhibición de entre 25 y 30 mm dentro de las placas (11).



## 2.2 Bases teóricas

### 2.2.1 El Ozono

La atmosfera está compuesta mayoritariamente por nitrógeno (78%) y en segundo lugar por oxígeno (26%). El porcentaje restante corresponde a numerosos gases traza, entre los cuales se encuentra el ozono, en cantidades ínfimas de pocas moléculas por millón de partículas de aire (0,01%). Sin embargo, cumple un rol esencial en la conservación de la vida en el planeta tal como la conocemos, pues nos protege de la radiación ultravioleta que es el carcinógeno físico más importante para el hombre, animales y ecosistemas marinos (12).

A temperatura y presión ambientales, el ozono es un gas que desprende olores fuertes (similar al de los mariscos en estado de descomposición avanzado) y generalmente sin coloración, pero en grandes concentraciones puede volverse ligeramente azulado. Si se respira en grandes cantidades puede provocar una irritación en los ojos o la garganta, la cual suele pasar después de respirar aire fresco y rico en oxígeno durante algunos minutos (13).

#### 2.2.1.1 Características físico-químicas del ozono

La partícula de ozono está conformada por tres átomos de oxígeno. El motivo de su singularidad está en el hecho, de que las fuerzas de atracción entre átomos son muy diminutas, lo que mantiene a la partícula de ozono muy inconstante. Dicha inestabilidad crece con el aumento de los 200 oc. Por eso el ozono no puede ser guardado y tiene que ser agregado en el lugar de su manejo. Por otra parte, su difícil manejo da al ozono la particularidad de ser muy oxidante, ya que sencillamente da uno de sus átomos a diferentes compuestos oxidantes, motivo por el cual es dado como desinfectante y germicida. En la tabla 1 se observa la equiparación entre las semejanzas del ozono y las del oxígeno molecular (14).

#### 2.2.1.2 Toxicidad y normatividad del ozono

El ozono es un irritante respiratorio. La influencia sobre la salud del ozono como contaminante se basa en su toxicidad. Debido a su pequeña capacidad de disolución, el ozono penetra en las vías respiratorias e irrita las mucosas y los tejidos pulmonares.

Altas concentraciones de ozono, largas exposiciones temporales y



exhaustivos grados de actividad física durante la exposición causan graves efectos en la salud: disminución de la función pulmonar, agravamientos asmáticos, falta de aliento, dolor de pecho en respiraciones profundas, respiración silbante y tos.

La exposición a concentraciones elevadas de ozono es responsable de un aumento en la mortalidad, admisiones hospitalarias y visitas a Emergencias debido a problemas respiratorios. La exposición repetida a ozono puede hacer que la gente sea más susceptible a infecciones respiratorias, inflamaciones pulmonares y puede agravar enfermedades respiratorias preexistentes como asma, bronquitis y fibrosis pulmonar (15).

#### a) **Inhalación**

La exhibición al ozono en cortos plazos en aglutinaciones a más de unas décimas de ppmv ocasiona malestar en la cabeza, resequedad en la garganta, irritación de membranas mucosa y nariz. La exhibición en concentraciones muy elevadas puede llegar a ocasionar edemas pulmonares, lasitud, dolor de cabeza frontal, sensación de enrarecimiento del aire, constricción u opresión, acidez en la boca y anorexia. Con concentraciones mucho más superiores puede ocasionar tos, sensación de sofocación, taquicardias, vértigos, presión sanguínea baja, severos calambres en el pecho y dolor en el cuerpo. Se tiene en consideración de que más de 50 ppmv por 30 minutos podría ser letal (16).

#### b) **Contacto con la piel y los ojos**

El roce de la piel con el ozono puede llegar a ocasionar irritación y quemaduras. En elevadas aglutinaciones como 0.1 ppm el ozono puede dar irritabilidad en los ojos (17).

#### c) **Límites permitidos**

Tienden a ser sugerencias para los lugares de trabajo, se muestran niveles máximos de ozono en el ambiente

- 0.05 ppmv trabajo pesado



- 0.08 ppmv trabajo moderado
- 0.10 ppmv trabajo ligero (18).

### 2.2.1.3 Acción química del ozono en el organismo

El ozono viene a ser más activo químicamente que en compasión con el oxígeno y superior como agente oxidante.

Cuando se coloca al ozono dentro de un organismo se va a observar una primera reacción química denominada ozonolisis que desata una consecuencia de reacciones metabólicas cuyos productos obtenidos darán resultados provechosos al organismo como:

- a) Disminución de estrés oxidativo
- b) Estimula el sistema Inmunológico
- c) Mejora el metabolismo del oxígeno
- d) Es antibacteriano
- e) Posee efectos analgésicos (19).

### 2.2.1.4 Diversas aplicaciones del ozono

El ozono aparte de ser útil para la desinfección de muchos elementos. Es grandemente utilizada en las siguientes zonas:

- a) Medicina (ozonoterapia y desinfección de instrumental)
- b) Odontología
- c) Industria alimenticia
- d) Desinfección y desodorización de ambientes
- e) Industria del papel
- f) Sector agropecuario
- g) Industria química (20).



## 2.2.2 La ozonoterapia

### 2.2.2.1 Origen

Werner Von Siemens (alemán) en 1857 fue considerado el primer generador de O<sub>3</sub>, Por la segunda década del siglo XX Justus Baron y Von Liebig decidieron observar de cerca un estudio sobre sus aplicaciones en el ser humano.

Los rusos fueron los próximos en estudiar sus usos y transferir la información a los países aliados.

Cuando se evidencio por primera vez sobre el uso de ozono en la medicina, se observa en la primera guerra mundial, cuando el doctor Albert Wolft, de Berlin, lo utiliza para realizar la limpieza y desinfección de heridas sépticas de guerra. En 1932 el cirujano dentista E.A. Fisch lo utiliza en el tratamiento de úlceras e infecciones bucales. Ahí es donde se conoce al primer paciente Payr, quien junto a Aubourg en 1936 mezclan el ozono con oxígeno y lo inyectan por vía rectal para tratar fistulas y la colitis ulcerosa. La mayor exposición de ozono se dio en la segunda guerra mundial, utilizado para los tratamientos de infecciones en los heridos de guerra, pero fue reemplazado por el uso de antibióticos en los años 40, se volvió hacer efectivo con el descubrimiento del platico en 1950.

Solo hasta el transcurso de los años 1980 lo utilizaban los médicos homeópatas, después se extendió a la medicina alopática (farmacología). Así se introdujo en la medicina tradicional en Alemania, Italia, Cuba, España, Rusia, Polonia (21).

### 2.2.2.2 Principales acciones de la ozonoterapia

Cuando se introduce ozono en un ambiente cualquiera, este realizará tres acciones fundamentales:

#### a) **Acción microbicida**

Como bien sabemos, el hablar sobre los microorganismos es un tema muy amplio, estos seres vivos permanecen muchas veces sobre todo tipo de superficies, en todo tipo de fluidos o bien flotan en el aire



asociados a pequeñas motas de polvo, minúsculas gotas de agua en suspensión de todo tipo de patologías infecciosas.

El ozono será capaz de producir una oxidación letal sobre la matriz de la bacteria, sin embargo, actualmente se acepta que el gas produce alteración de la membrana por ozonolisis de los ácidos grasos insaturados de la pared bacteriana, y que actúa como microbicida, bactericida, viricida, fungicida y parasiticida (22).

- **Efecto bactericida**

El ozono ataca la pared celular de las bacterias, y rompe además su actividad enzimática al actuar sobre los grupos sulfhídricos en ciertas enzimas. A partir de este momento la bacteria pierde su capacidad de degradar azúcares y producir gases. El deshidrogenado de glucosa fosfato-6 es afectado del mismo modo que el sistema enzimático. La muerte de la bacteria puede ser debido a los cambios en la permeabilidad celular, posiblemente seguido de una lisis celular. (23).

- **Efecto viricida**

Son los virus diminutos cuerpos, hoy consideradas frontera entre los seres vivos y la materia inerte, los cuales no poseen la capacidad de vivir ni de reproducirse, si no es parasitando células a las que ocasiona su destrucción. El ozono actúa rompiendo esta cápsula viral, dejando el ácido nucleico desprotegido. Es probable además que el ozono modifique los sitios de la cápsula viral que el virus utiliza para fijarse a la superficie de las células.

Por lo contrario a las bacterias, los virus siempre son dañinos y provocan enfermedades a todo organismo al que atacan, enfermedades tan comunes como la gripe, el catarro, el sarampión, la viruela, varicela, rubéola, poliomielitis, y otras muchas son debidas a virus. El ozono actúa sobre ellas oxidando las proteínas de su envoltura y modificando su estructura, al ocurrir esto, el virus no puede anclarse a ninguna



célula hospedadora por no reconocer su punto de anclaje, y al encontrarse el virus desprotegido y sin poder reproducirse, muere. La función viricida es observable a concentraciones de ozono inferiores a la de acción bactericida (24).

- **Efecto fungicida**

Hay una variedad de hongos capaces de provocar enfermedades al ser humano, animales y plantas. Varios de ellos son capaces de ocasionar alteraciones en nuestros alimentos. Volviéndolos in consumibles, como es el caso, entre otros, de los mohos. Por ello, resulta interesante controlar y eliminar estas formas patógenas, cuyas esporas proliferan por todo tipo de ambientes.

- **Efecto esporicida**

Cuando las condiciones son muy desfavorables para los hongos y bacterias para su desarrollo, estas fabrican una gruesa capa alrededor de ellas, y paralizan su actividad metabólica permaneciendo en estado de latencia. Estas al volver a su ambiente favorable, vuelven a su forma normal y su metabolismo recupera su actividad. Estas formas de resistencia se conocen como esporas y son típicas de bacterias tan patógenas como las que provocan el tétanos, la gangrena gaseosa, el botulismo y el ántrax. El ozono a concentraciones ligeramente superiores a las usadas para el resto de las bacterias, es capaz de acabar con la resistencia de las esporas (25).

b) **Acción desodorante**

De las propiedades del ozono, esta es una de las más estudiadas y comprobadas, debido a su gran utilidad en todo tipo de locales de uso público y en el tratamiento de ciertos olores de origen industrial, será capaz de destruir los malos olores atacando directamente sobre la causa que los provoca y agregar ningún otro olor, no exceder la





concentración del ozono requerida para un determinado local, ya que si ésta se encuentra muy elevada, quedaría un residual fuerte de ozono presente en el aire y se percibiría un cierto olor característico. El ozono actúa sobre ambas causas, por un lado, oxida la materia orgánica además de atacarla por ozonólisis y por otro lado ataca a los microbios que se alimentan de ella, existe una amplia gama de olores los cuales pueden ser atacados por el ozono.

c) **Acción oxigenante**

Es con constante apreciación el enrarecimiento del aire como consecuencia de una ausencia de oxígeno, la cual conocida generalmente como aire viciado. El ozono, por su mayor poder oxigenante, contribuye a mejorar la eficiencia de las células de los organismos superiores en cuanto al aprovechamiento del oxígeno disponible, mediante la estimulación de varias enzimas que intervienen en estos procesos (26).

### 2.2.2.3 Vías de aplicación

El ozono medicinal como coadyuvante incluye un flujo de oxígeno puro en una concentración muy pequeña (99.95 partes de oxígeno por 0.05 partes de ozono siempre que sea para uso interno y 5 partes de ozono en 95 de oxígeno en aplicaciones externas). Según las patologías presentadas existen diversas formas de llevar el oxígeno hasta la zona donde es requerido. Dada la diversidad de patologías en las que se utiliza la ozonoterapia.

- a) Auto hemoterapia.
- b) Las infiltraciones subcutáneas y las inyecciones intramusculares.
- c) Las infiltraciones intradiscales, para vértebras e interarticulares.
- d) La insuflación en cavidades naturales, recto, vagina, ubres, etc.
- e) El aceite ozonizado para aplicaciones locales externas.
- f) El agua ozonizada (27).



### 2.2.3 El agua ozonizada

#### 2.2.3.1 El agua

El agua es el compuesto más abundante y más considerablemente distribuido en la naturaleza. Se encuentra en los tres estados: sólido, líquido y gaseoso. Se halla como gas en grandes cantidades en la atmósfera, constituyendo la humedad, como líquido en los océanos, ríos y lagos. Cubre las tres cuartas partes de la superficie terrestre. En estado sólido se encuentra formando nieve o hielo en las regiones polares y en las cumbres de las montañas elevadas. El agua, además, constituye gran parte de la materia viva: el cuerpo humano tiene un contenido de agua de un 65%, y es un componente esencial de muchos minerales (28).

#### 2.2.3.2 Métodos de desinfección del agua

##### a) Cloración

La cloración es un medio sencillo y eficaz para desinfectar el agua y hacerla potable. Consiste en introducir productos clorados (pastillas de cloro, lejía, etc.) en el agua para matar los microorganismos en ella contenidos. Normalmente, tras un tiempo de actuación de unos 30 minutos, el agua pasa a ser potable. Gracias al efecto remanente del cloro, continúa siéndolo durante horas o días (en función de las condiciones de almacenamiento).

El tratamiento del agua por cloración permite eliminar de forma sencilla y poco costosa la mayor parte de los microbios, las bacterias, los virus y los gérmenes responsables de enfermedades como la disentería, las fiebres tifoideas y el cólera. No obstante, es incapaz de destruir ciertos microorganismos parásitos patógenos. La cloración, por tanto, desinfecta el agua, pero no la purifica por completo (29).

##### b) Radiación de luz ultravioleta

Desde las grandes industrias hasta los sencillos equipos domésticos, la UV se ha utilizado en el tratamiento de agua. Pero ¿qué es lo que realmente hace una lámpara de rayos ultravioleta?



Todos sabemos que la luz tiene distintos espectros que son invisibles para nosotros, estos van desde la luz infrarroja hasta los rayos gamma. Dentro de estos espectros de luz hay un rango llamado UV el cual, apenas el siglo pasado, se descubrió que es para las baterías, lo que la radioactividad para nosotros. Ya que destruye la información genética de: microorganismos, bacterias y algunos virus. Entonces microorganismos que son expuestos a una frecuencia de luz, con cierta intensidad y en un tiempo específico, llegan a ser esterilizados y en algunos casos hasta rostizados. Y he aquí un dato que debemos tener presente. Los rayos UV de un esterilizador, lo que hacen es evitar que las bacterias y virus se reproduzcan, muy diferente a un biosida UV, cuyo fin es matar dichos microorganismos (30).

### **c) Ozonificación**

En el caso de las aguas potables, el ozono es típicamente empleado en una pre-desinfección para el control de algas e inactivación de bacterias y virus, y como pre- oxidación y/o oxidación intermedia de la materia orgánica e inorgánica para eliminación de compuestos que proporcionan sabor, olor y color al agua. Además, es utilizado para la eliminación de la turbidez, iones metálicos y reduce los niveles de trihalometanos (THM) y precursores orgánicos relacionados.

En el tratamiento de las aguas residuales, el ozono se emplea en la desinfección (reutilización), oxidación de compuestos inorgánicos (eliminación de sustancias tóxicas como el cianuro), oxidación de compuestos orgánicos (oxidación parcial del TOC y sustancias tóxicas) y la eliminación de partículas.

Actualmente, la ozonización también es empleada para la eliminación de contaminantes emergentes (31).

#### **2.2.3.3 Medición del ozono**

La medición de ozono, según la concepción de autores consultados, consiste en comprobar la concentración (mg/1 o g/m<sup>3</sup>) a la que se encuentra diluida en un gas o en un líquido. A esta concentración de ozono disuelta en un líquido después de un proceso de ozonificación se le denomina como ozono residual,



para lo cual, existiendo diversas técnicas de medición de concentración de ozono, tanto para fase gaseosa como para fase líquida, como es de señalarse las más significativas a opinión del autor (32).

a) **Método yodo métrico**

En el método yodo métrico, el ozono reacciona con yoduro de potasio (KI) para formar yodo, que luego es titulado con tiosulfato a un criterio de valoración de indicador de almidón con la muestra tamponada a pH 2. Sin embargo, la estequiometría de la reacción es sensible al pH, la composición y concentración del tampón, concentración de iones de yoduro, técnicas de muestreo y tiempo de reacción (33).

b) **Absorción de luz UV**

El método de absorción de luz UV más conocido como el procedimiento de fotometría UV, también es recomendable su utilización a fin de medir la concentración de ozono en un gas o líquido. Este procedimiento consiste en medir la atenuación de un haz de luz UV con longitud de onda de 254 nanómetros ( $\lambda = 10^{-9}m$ ) en una celda de absorción, el mismo que contiene una muestra del gas o líquido que se desea medir. La atenuación del haz de luz que se determina mediante la comparación de la señal proveniente del sensor de muestra y el sensor de referencia (34).

c) **Colorimetría**

Este método consiste en hacer reaccionar la muestra de agua ozonificada con el compuesto N,N-Dietil-pfenilendiamina (DPD). Al reaccionar el DPD con el ozono contenido en la muestra de agua, el agua adoptará una coloración rosa. Dicha tonalidad adoptada reaccionará en la medida que la muestra propuesta sea la adecuada a la concentración de ozono residual en la porción. La muestra debe ser comparada contra una escala de ozono residual, que está graduada a distintas tonalidades de rosa (35).

#### 2.2.4 Flora microbiana oral

El conocimiento del microbiota oral es una herramienta valiosa para la identificación



correcta de las bacterias que están involucradas en complejas biopelículas bucales. Además, nos permite entender mejor la patología bucal, y conocer si los cambios que predisponen a la enfermedad ocurren primero en el huésped o, por el contrario, a nivel microbiano. Los estudios metagenómicos del microbiota oral son clave para la creación de herramientas diagnósticas y terapéuticas que repercutirán en la calidad de vida de los pacientes, pues los avances en técnicas genómicas nos han permitido visualizar microorganismos nunca antes estudiados y que eran desconocidos hasta este momento (36).

### **2.2.5 *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans***

Es una bacteria Gram-negativa que coloniza la cavidad oral humana y es el agente causante de la periodontitis agresiva localizada (LAP), una forma agresiva de enfermedad periodontal que ocurre en los adolescentes. *A. actinomycetemcomitans* secreta una toxina proteica, leuco toxina (LtxA), que ayuda a la bacteria a evadir la respuesta inmune del huésped durante la infección. LtxA es una toxina activa de membrana que se dirige específicamente a los glóbulos blancos (GB) (37).

#### **2.2.5.1 Taxonomía**

Este microorganismo fue aislado por primera vez por Klinger en 1912, llamándolo *Bacterium Actinomycetum comitas*, para luego Lieske en 1921 lo denominó como *Bacterium Comitas*. En 1929 Topley y Wilson los denominaron *Actinobacillus Actinomycetemcomitans*.

En 2006 Neils y Mogens, según estudios de ADN encuentran gran similitud en cuatro Bacterias, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *H. paraphrophilus* y *H. Segni* conformando así un nuevo género llamado *Aggregatibacter* perteneciente a la familia Pasteurellacea (38).

#### **2.2.5.2 Constitución Celular**

##### **a) Fimbrias**

Miden alrededor de 2 micrómetros de longitud y 5 micrómetros de diámetro. Se sitúan como pequeños apéndices en la superficie celular que se relacionan con apéndices bacterianos que están asociados con la colonización bacteriana del tejido huésped (39).



b) **Vesículas**

*Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* se caracteriza por presentar abundantes vesículas membranosas extracelulares. Las cepas de este microorganismo se caracterizan por ser altamente leucotóxicas, ya que tienden a tener más vesículas. Estas vesículas contienen endotoxinas que poseen una actividad de resorción ósea y bacteriocina. Estas vesículas también presentan propiedades adhesivas y actúan como vehículos de suministro de materiales tóxicos (40).

c) **Material amorfo Extracelular**

Frecuentemente, las células se fijan mediante una matriz. La adherencia de este microorganismo aumenta dependiendo de este material y de las condiciones en que se desarrolle y localice el cultivo, gracias a esta particularidad favorece el incremento de la adhesión.

d) **Proteínas**

Por su parte, los electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) provenientes de las proteínas de las células enteras, permite diferenciar entre *A. actinomycetemcomitans* y *H. aphrophilus*, en tanto se comparan sus proteínas de membrana externa por SDS-PAGE y western-blot con compuestos de antisuero de conejo, el cual destaca la ausencia de la proteína termo-modificable (OmpA) en *H. aphrophilus*, en cambio en *A. actinomycetemcomitans*, esta proteína presenta homología N-terminal y reactividad inmunológica cruzada con las proteínas OmpA de otras bacterias Gram negativas (41).

### 2.2.5.3 Factores de virulencia

La virulencia se define como la capacidad de un microorganismo para producir una enfermedad o interferir con los procesos metabólicos o fisiológicos del hospedero. Un microorganismo virulento se caracteriza por expresar y producir metabolitos, toxinas, enzimas y componentes de la superficie o pared celular que le permiten evadir la barrera defensiva e invadir en los tejidos y células del hospedero (42).



a) **Leuco toxina**

La capacidad que tiene el *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* para eliminar leucocitos está determinada por la presencia de leuco toxina A (LtxA), que se encuentra codificada por el gen LtxA, LtxA participa en la evasión de la respuesta inmune y la invasión tisular (43).

Cuando *A. Actinomycetemcomitans* invade los tejidos inflamados libera LtxA, adquiriendo la potencialidad de invadir neutrófilos e inducir su apoptosis en bajas concentraciones y su necrosis por disrupción de la membrana celular, en altas concentraciones. Cuatro genes para la leucotoxina han sido descritos, denominados ltxA, ltxB, ltxC y ltxD, donde ltxA es el gen estructural y ltxB, C y D son genes requeridos para el transporte de la toxina; sin embargo, no se han asociado a una variable inmunogenicidad o patogenicidad (44).

b) **Toxina Distensora Citoletal (Cdt)**

La toxina Cdt es una exotoxina proteica producida por bacterias gram negativas que tiene la capacidad de detener el crecimiento de las células, alterar su morfología y eventualmente producir su muerte debido a su actividad DNAsa. Análisis microbiológicos revelan que el 77% de los pacientes diagnosticados con periodontitis agresiva presentan *A. Actinomycetemcomitans* (45).

c) **Endotoxina**

Es una toxina sumamente activa, causando reabsorción ósea, activando macrófagos para que produzcan interleuquina IL1-B y factor de necrosis tumoral, mediadores de la inflamación y reabsorción ósea (46).

#### 2.2.5.4 Susceptibilidad

En la terapia antimicrobiana local se recomienda clorhexidina al 0,12 % ó 0,2 % 2 veces al día por un periodo de 10-14 días. Para la terapia sistémica, la doxiciclina, ciprofloxacino, metro nidazol, azitromicina (500mg 1ra dosis, seguida de 4 dosis de 250mg/día) y la tetraciclina son la elección, siendo esta última utilizada en dosis de 250 mg cada 6 horas por 14 a 20 días. En lo que concierne a utilizar combinaciones de antibióticos, han dado muy buenos resultados



amoxicilina 500mg con metronidazol 250mg c/ 8 h por 7 días o ciprofloxacino con metronidazol (47).

### **2.2.6 Factores de crecimiento Bacteriano**

Varios factores afectan la tasa de crecimiento bacteria, incluyendo temperatura, pH, y los niveles de oxígeno. La tasa de crecimiento aumenta con la temperatura, generalmente por cada incremento de 10° C la tasa de crecimiento se duplica, pero las temperaturas extremas pueden ocasionar su muerte. La mayoría de las bacterias crece mejor a pH neutro. Las bacterias pueden ser aerobias, anaerobias, o facultativas, se reproducen por fisión binaria. Bajo condiciones óptimas las bacterias pueden duplicarse su número cada (20 a 30) minutos (48).

#### **2.2.6.1 Sistemas Anaerobios**

La utilización de este sistema, tiene como ventaja importante, la obtención de un gas combustible. Los procesos de tratamiento anaerobios ocurren completamente en ausencia de oxígeno y producen un sub producto utilizable (metano). Los microorganismos facultativos usan la materia orgánica como alimento para producir más organismos, ácidos volátiles (orgánicos), dióxido de carbono, sulfuro de hidrógeno, otros gases y algunos sólidos estables capaz de ser usados (49).

#### **2.2.6.2 Metabolismo bacteriano**

De vital importancia para las reacciones catabólicas y anabólicas es la acción de las enzimas, pues tienen la capacidad de aumentar la velocidad de las reacciones químicas sin alterarse, la actividad enzimática es afectada por el pH, la temperatura y la concentración de sustratos. Las bacterias necesitan nutrientes para su crecimiento especialmente nitrógeno y fósforo (50).

#### **2.2.6.3 Medios de cultivo**

Un medio de cultivo es una preparación sólida o líquida empleada para cultivar, transportar y almacenar microorganismos. Para ser efectivo el medio debe contener todos los nutrientes que el microorganismo necesita para multiplicarse. Los medios especializados son esenciales en el aislamiento y en la identificación de microorganismos, en ensayos de sensibilidad a antibióticos, análisis de





alimentos y de agua microbiológica industrial. Aunque todos los microorganismos necesitan fuente de energía, carbono, nitrógeno, fósforo, azufre y varios minerales, la composición precisa de un medio satisfactorio dependerá de la especie que se desea cultivar (51).



## **2.3 MARCO CONCEPTUAL**

### **2.3.1 Ozonización**

Es una alteración química del agua común, la cual presentará un complejo de compuestos químicos y moleculares, obtenidos a través de procesos químicos y físicos, a base de una fuente natural y utilizable en cualquier campo de la tecnología (52).

### **2.3.2 Antibacteriano**

Podría nombrarse así a una sustancia, la cual es capaz de paralizar el desarrollo y la proliferación de microorganismos patógenos, la cual puede ser producida por un ser vivo o fabricada por síntesis (53).

### **2.3.3 Espectrofotometría**

Este es un método de medición, el cual es usado para cuantificar la relación existente entre la luz y un medio líquido. Este medirá la cantidad de luz que es absorbida por el medio al ser traspasado por la anterior mencionada (54).

### **2.3.4 Absorbancia**

Se trata de la medida que refleja cómo se atenúa la radiación cuando atraviesa un elemento. La absorbancia puede expresarse mediante un logaritmo que surge a partir del vínculo entre la intensidad que sale y la intensidad que ingresa a la sustancia (55).

### **2.3.5 Densidad óptica**

La densidad óptica es una magnitud física que mide la absorción de un elemento óptico por unidad de distancia, para una longitud de onda dada (56).

### **2.3.6 Curva de crecimiento**



La curva de crecimiento típica de un organismo unicelular en laboratorio la podemos ver representada en esta gráfica. Las curvas de crecimiento son distintas según el tipo de microorganismo y según variemos las condiciones del cultivo, pero, a pesar de ello, todas ellas tienen en común una serie de fases: Latencia, logarítmica, estacionaria y muerte (57).

### **2.3.7 ATCC**

American Type Culture Collection, es una organización sin fines de lucro que recolecta, almacena y distribuye microorganismos de referencia estándar, líneas celulares y otros materiales para investigación y desarrollo (58).

### **2.3.8 Caldo BHI**

Infusión cerebro corazón, es un medio de cultivo líquido enriquecido con la finalidad de garantizar el crecimiento de un determinado tipo de organismos (59).

### **2.3.9 Agar Mueller-Hinton**

El agar Mueller-Hinton es un medio de cultivo microbiológico utilizado comúnmente para realizar la prueba de susceptibilidad a antibióticos. También es usado para aislar y mantener especies (60).

### **2.3.10 Inoculo**

La porción de gérmenes, generalmente, patógenos, que, con un vehículo cualquiera, se transfieren a un organismo o a un substrato para inocularlos. En biología, la suspensión de microorganismo que se transfiere a un ser vivo o a un medio de cultivo a través de la inoculación (61).



## 2.4 HIPÓTESIS DE ESTUDIO

**H<sub>1</sub>** La aplicación del agua ozonizada a las concentraciones de 0.4 y 0.8 g/L tendrá efecto antibacteriano in vitro en los cultivos con cepa de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522.

**H<sub>0</sub>** La aplicación del agua ozonizada a las concentraciones de 0.4 y 0.8 g/L no tendrá ningún efecto antibacteriano in vitro en los cultivos con cepa de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522.

### 2.4.1 Hipótesis específicas

**H<sub>2</sub>** El agua ozonizada a la concentración de 0.4 y 0.8g/L presentará efecto antibacteriano sobre la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522 a la hora 1 de aplicación.

**H<sub>3</sub>** El agua ozonizada a la concentración de 0.4 y 0.8g/L presentará efecto antibacteriano sobre la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522 a la hora 3 de aplicación.

**H<sub>4</sub>** El agua ozonizada a la concentración de 0.4 y 0.8g/L presentará efecto antibacteriano sobre la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522 a la hora 6 de aplicación.

**H<sub>5</sub>** El agua ozonizada a la concentración de 0.4 y 0.8g/L presentará efecto antibacteriano sobre la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522 a la hora 24 de aplicación.

**H<sub>6</sub>** El agua ozonizada a la concentración de 0.4 y 0.8g/L presentará efecto antibacteriano sobre la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522 a la hora 48 de aplicación.



## 2.5 VARIABLES

2.5.1 **Variable independiente:** Agua ozonizada

2.5.2 **Variable dependiente:** Efecto antibacteriano

2.5.3 **Co-variable:** Tiempo



## 2.6 OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

VARIABLE		DEFINICION CONCPETUAL	DEFINICION OPERACIONAL	FORMA DE MEDICION	INDICADOR	PROCEDIMIENTO DE MEDICION	ESCALA DE MEDICION	NATURALEZA DE LA VARIABLE	EXPRESION FINAL DE LA VARIABLE
<b>V. Independiente</b>	Agua ozonizada	Compuesto químico que tiene como compuesto básico H <sub>2</sub> O al cual se le adhirió ozono por ionización (62).	La variable se expresará de acuerdo a su concentración de 0.4 y 0.8 g/L según la conveniencia del investigador.	Directa	Concentración	Test e instrumento	Ordinal	Cuantitativa	0.4 g/L 0.8 g/L
<b>V. Dependiente</b>	Efecto antibacteriano	Este término hace referencia a la capacidad de una determinada sustancia para poder eliminar bacterias (63).	Estos valores se verán determinados según las lecturas de absorbancia que se obtengan en el espectrofotómetro.	Directa	Aumento y disminución de absorbancia	Ficha de recolección de datos	Ordinal	Cualitativa	Absorbancia
<b>Co. Variable</b>	Tiempo	Parámetro de la física que permite medir suceso que pudieron desarrollarse en el pasado presente y futuro (64).	Las lecturas se realizarán en lapsos de tiempo espaciado hasta completar las 48 horas.	Directa	Horas	Uso de un cronometro	Escala de medición de razón.	Cuantitativa	1 hora 3 horas 6 horas 24 horas 48 horas.



## CAPITULO III

### MÉTODO

La presente investigación es de un enfoque cuantitativo por el hecho que va a hacer la verificación de sus hipótesis mediante una medición en un procedimiento del tipo experimental, para lo cual será necesario de un instrumento correctamente diseñado para la recolección y cuantificación de los datos obtenidos en la experimentación (65).

#### 3.1 Diseño de la investigación

##### 3.1.1 Experimental:

Ya que el tesista manipula de manera intencional y en un laboratorio que brinde las condiciones adecuadas, aumentando así la validez del estudio (66).

##### 3.1.2 Comparativo

Trata de explicar lo que justamente estamos investigando, por ello va a comparar a las poblaciones investigadas, las cuales serán cuantificadas y respaldadas (67).

##### 3.1.3 Prospectivo:

La recolección de datos se dará conforme a la ocurrencia de los hechos. Todo esto será analizado en un momento futuro o finalizada la recolección de datos (68).

##### 3.1.4 Longitudinal:

Se procederá en un momento específico de tiempo y espacio. Además, se analizarán datos de las variables recopiladas en un periodo de tiempo sobre una población muestra (69).



### 3.2 Población y muestra

#### 3.2.1 Población bacteriana de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522

La investigación estará constituida por 6 placas Petri con medio de cultivo Agar Mueller Hinton enriquecida con sangre desfibrinada de conejo (Agar chocolate), 10 tubos de ensayo tapa rosca y 32 cubetas de cuarzo con caldo de cultivo BHI inoculadas con cepas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522, por lo que el muestreo es probabilístico por conveniencia.

#### 3.2.2 Selección de la muestra de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522

Se seleccionaron muestras cuyos patrones de crecimiento sean similares a las investigaciones previamente estudiadas. Teniendo en cuenta el medio ambiente, la temperatura y la presión atmosférica en la que se encuentra desarrollando el proyecto. A demás de ello también se consideró, la correcta manipulación de los medios para evitar la contaminación de los mismos.

#### 3.2.3 Población del agua ozonizada

Se tuvo coordinación con el centro de medicina alternativa Kay Pacha. La cual fue la proveedora de las muestras de agua ozonizada a las diferentes concentraciones. Además de garantizar la calidad de la misma y las adecuadas concentraciones empleadas en el proyecto.

#### 3.2.4 Selección de la muestra del agua ozonizada

Las muestras fueron seleccionadas de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión. En los cuales se empleó agua Milli Q (ultra destilada) la cual nos garantizaba que no existan agentes contaminantes en la solución, que puedan alterar el proceder del proyecto.





### 3.2.5 Distribución de la muestra

- 3.2.5.1** Grupo 1: 6 placas Petri con medio de cultivo Agar Mueller Hinton enriquecido con sangre al 10%, inoculadas con *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.
- 3.2.5.2** Grupo 2: 10 tubos de ensayo tapa rosca con medio de cultivo BHI (Brain Heart Infusion). Inoculados con cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*.
- 3.2.5.3** Grupo 3: 10 cubetas de cuarzo para la realización de la curva de crecimiento bacteriano de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* de las cuales 2 cubetas contendrán BHI puro para servir como blanco, 6 cubetas serán usadas para evaluar la curva de crecimiento y 2 cubetas serán incubadas sin co2 para servir como control positivo.
- 3.2.5.4** Grupo 4: 6 cubetas de cuarzo las cuales nos servirán para determinar la cantidad de ozono a emplear al momento de la disolución con el inculo.
- 3.2.5.5** Grupo 5: 10 cubetas de cuarzo que serán empleadas en el experimento con agua ozonizada a una concentración de 0.40 g/L. De las cuales 2 serán empleadas como blanco al contener únicamente caldo BHI, 6 cubetas la cuales contendrán agua ozonizada más inculo y 2 cubetas que tendrán inculo puro para servir de control positivo.
- 3.2.5.6** Grupo 6: 10 cubetas de cuarzo que serán empleadas en el experimento con agua ozonizada a una concentración de 0.80 g/L. De las cuales 2 serán empleadas como blanco al contener únicamente caldo BHI, 6 cubetas la cuales contendrán agua ozonizada más inculo y 2 cubetas que tendrán inculo puro para servir de control positivo.



### 3.3 TIPO DE MUESTREO

Tipo de muestreo no probabilístico por conveniencia

### 3.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

#### 3.4.1 Criterios de inclusión

**3.4.1.1** Cultivo de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* no contaminados, manipulados en las condiciones adecuadas certificadas por el laboratorio.

**3.4.1.2** Concentraciones de agua ozonizada debidamente embazadas y transportadas.

#### 3.4.2 Criterios de exclusión

**3.4.2.1** Cultivos de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* contaminados.

**3.4.2.2** Cultivos de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* que no hayan sido debidamente conservados ni refrigerados, para su debida activación.

### 3.5 TÉCNICA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

#### 3.5.1 Técnica de recolección de muestra

Se aplicará la observación y descripción del estudio *INVITRO* aplicando parámetros tales como absorbancia, turbidez y dilución de los cultivos, los cuales se harán notar al momento de aplicar el agua ozonizada a sus diferentes concentraciones sobre los cultivos de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans ATCC 29522*.

#### 3.5.2 Instrumento

El instrumento para la validación de datos del estudio, fue elaborado por el investigador presente, según los parámetros necesarios para su procesamiento y validación.



### 3.6 Procedimientos

#### 3.6.1 Reconocimiento de ambientes y equipos

Para poder tener plena seguridad al momento de realizar el proyecto, primero se tuvo una sesión de introducción y reconocimiento de ambientes, equipos y materiales de laboratorio a cargo del Blgo. Lugó Miranda Barriga, encargado de los laboratorios de ciencias básicas, el cual hizo un recorrido en los laboratorios de esterilización y de microbiología para tener pleno conocimiento del manejo de autoclaves, horno Pasteur, destiladora, incubadora, cámara de flujo laminar, conservadoras, microscopios, espectrofotómetro y vortex. Los cuáles serán esenciales en la realización del proyecto. Y es por ello que fue tan fundamental tener conocimiento del buen manejo de los ya mencionados.

#### 3.6.2 Preparación de materiales

##### 3.6.2.1 Selección de materiales

Previo a la realización del proyecto, se tuvo que preparar los materiales a emplear, por lo cual se seleccionaron 20 placas Petri, 20 tubos de ensayo tapa rosca, 3 frascos de vidrio tapa azul, 3 frascos de vidrio oscuros tapa azul, dos gradillas para tubos de ensayo y 30 tapas para cubetas.

##### 3.6.2.2 Lavado de materiales

Con una solución de agua común más detergente se realizó el lavado de los materiales previamente seleccionados, luego pasaran por un triple proceso de enjuagado; Las dos primeras con agua común y la última con agua destilada para la eliminación de sales y minerales de los recipientes.

##### 3.6.2.3 Secado de materiales

Acto seguido serán acomodados en horno Pasteur a una temperatura de 80 grados centígrados por 4 horas para su secado y así evitar alguna contaminación por el medio.

##### 3.6.2.4 Empaquetado y esterilización de materiales

Se realizará un empaquetado de los materiales previamente



descritos para su determinada esterilización según normas ya establecidas por el laboratorio.

Todos los materiales de vidrio y metal se esterilizarán en horno Seco a 180 grados centígrados por una hora y así aplicar el principio de desecado de las proteínas.

Todos los materiales plásticos y que no toleren mas de 140 grados centígrados serán esterilizados en autoclave a una temperatura de 121 grados centígrados por 15 minutos, aplicando aquí el principio de coagulación de las proteínas.

### 3.6.3 Preparación de medios de cultivo

#### 3.6.3.1 Selección de medios de cultivo

Según las especificaciones del fabricante usaremos Agar chocolate (medio solido) para la siembra de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* en placas Petri. Para el medio liquido usaremos Caldo BHI (Brain Heart Infusion) la cual es considerado el medio liquido por excelencia para bacterias anaerobias como es el caso de la *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*.

#### 3.6.3.2 Preparación del caldo BHI

Se prepararon 190 ml de Caldo BHI para lo cual se siguió las instrucciones del fabricante, en el cual especificaba que la proporción para un medio enriquecido era de 37 gramos para 1000 mililitros de agua. Aplicándose por ello una fórmula matemática (regla de tres simple). Y así obtener el peso exacto de BHI a disolver en 190 ml

$$\begin{array}{l} 37 \text{ gr} \text{ ----- } 1000 \text{ ml} \\ X \text{ gr} \text{ ----- } 190 \text{ ml} \\ \hline 37 \text{ gr} \times 190 \text{ ml} \\ \hline X \text{ gr} \times 1000 \text{ ml} \\ \hline X \text{ gr} = 7.03 \text{ gr} \end{array}$$

Elaboración propia propia del investigador



Una vez obtenidas las proporciones a utilizar para el caldo procedimos a medir en una balanza analíticas 7.03 gramos de BHI en polvo, acto seguido y con ayuda de una probeta calibrada, servimos 190 ml de agua destilada. Mezclamos los ingredientes ya mencionados en un matraz previamente destilado y homogenizamos la mezcla hasta tener una dilución completa del BHI con una coloración final ámbar.

Acto seguido se cerró con papel Kraft y cinta el matraz en el que se disolvió el medio de cultivo para su debida esterilización en autoclave a una temperatura de 121 grados centígrados por 15 minutos.

### 3.6.3.3 Preparación del Agar Mueller – Hinton enriquecido con sangre al 10%

De la misma manera en la que se realizó la proporción de regla de tres simple de caldo BHI, se procedió a sacar las proporciones exactas del Agar Mueller-Hinton teniendo en cuenta el enriquecimiento al 10% de sangre desfibrinada. Para lo cual nos volvimos a basar en las proporciones del fabricante, considerándose para 120 ml de medio de cultivo.

<b>10 % de 120 ml</b>	<b>34 gr ----- 1000 ml</b>
<b>10</b>	<b>X gr ----- 108 ml</b>
<b>----- x 120 ml = 12 ml de sangre</b>	<b>34 gr x 108 ml</b>
<b>100</b>	<b>X gr x 1000 ml</b>
<b>120-12= 108 ml de Agar</b>	<b>X = 3.672 gr</b>

Elaboración propia del investigador

Una vez obtenidas las cantidades exactas del medio procedimos a preparar los 3.672 gramos de agar, los cuales fueron medidos con ayuda de una balanza analítica; Acto seguido se dosificaron los 108 ml de agua destilada con ayuda de una probeta calibrada. Se integraron ambas sustancias en un matraz y con ayuda de una estufa eléctrica calentamos la mezcla hasta diluirlas e integrarlas hasta obtener una sustancia homogénea. La cual también paso a ser debidamente sellada con papel Kraft e hilo para su adecuada



esterilización en autoclave a 121 grados centígrados por 15 minutos; Una vez realizado el paso previo se extrajo 12 mililitros de sangre de conejo, la cual será depositada en un frasco de vidrio tapa azul estéril para su debida desfibrinación con ayuda de 4 perlas de cristal mediante un proceso de agitación durante 10 minutos.

Llegando casi al final de la preparación. Se integran los 108 mililitros de Agar Müller-Hinton con los 12 mililitros de sangre de conejo desfibrinada, acto seguido serán llevados a la estufa para la ebullición de los mismo logrando así la ruptura de los glóbulos rojos y obteniendo así el color chocolate deseado. Teniendo en cuenta que la ebullición debe ser controlada para no quemar el medio.

#### **3.6.3.4 Distribución de los medios de cultivo**

Una vez obtenidos los medios de cultivo, tanto líquidos como sólidos procederemos a almacenarlos en sus respectivos embaces.

- a) **Caldo BHI:** Este medio de cultivo al ser líquido será almacenado en tubos de ensayo tapa rosca, cada tubo con una cantidad de 3 milímetros. Para lo cual se realizó la distribución dentro de la cámara de flujo laminar. La cual garantizaba un ambiente estéril. Se procedió a la apertura los tubos tapa rosca y con ayuda de una micropipeta calibrada para 3 ml depositar las soluciones de caldo BHI. Se sellaron con sus mismas tapas y finalmente se procedieron a almacenar a 4 grados centígrados en un topper previamente desinfectado, hasta su posterior uso. EL resto del caldo se almaceno en un frasco de vidrio tapa azul e igualmente refrigerado a 4 grados centígrados evitando el congelamiento
  
- b) **Agar Chocolate:**
  - Limpieza y desinfección de la cámara de flujo laminar



- Preparación y esterilización por radiación UV de materiales tales como guantes, 6 placas Petri, agar chocolate estéril, micropipetas, cinta para film por 15 minutos.
- Se depositaron aproximadamente 20 ml del Agar chocolate en cada placa Petri
- Se sello cada placa con cinta parafilm en el contorno para lograr hermetismo.
- Finalmente se procedió a almacenar en refrigeración a 4 grados centígrados para su posterior uso.

#### **3.6.3.5 Control de calidad de los medios de cultivo**

En el caso de ambos medios de cultivo se examinaron para evidenciar la presencia de algún agente contaminante y acto seguido se procedió a incubar a 37 grados centígrados por 24 horas y descartar todo tipo de contaminación biológica.

Por tal motivo se eliminaron dos tubos tapa rosca por la presencia de fibras de algodón en la base.

### **3.6.4 Viabilización de la cepa bacteriana**

#### **3.6.4.1 Preparación de materiales**

Antes de empezar con la viabilización de la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans ATCC 29522*, debemos tener todos los materiales alistados tales como guantes estériles, los medios de cultivo debidamente atemperados al igual que el tubo que contiene a la cepa, tira de AnaerocultRA limpia, jarra de anaerobiosis carrusel para tubos de ensayo, probeta, agua destilada, mechero bunsen y plumón indeleble.

Este conjunto de materiales, previos a la reanimación bacteriana escogida, deberán ser debidamente esterilizados con radiación UV dentro de la cámara de flujo lamina por al menos 15 minutos. Lo cual nos asegurará un microecosistema totalmente estéril y libre de agentes contaminantes.



#### 3.6.4.2 Reactivación de la cepa

- Como el protocolo lo demanda. Se siguieron las instrucciones del laboratorio (Gen lab) que nos ha provisto de la cepa, la cual indicaba lo siguiente:
- Previo a la activación bacteriana. El empaque deberá ser retirado de refrigeración “sin abrirlo” y sometido al calor ambiente por al menos 30 minutos para su adecuado atemperamiento y así evitar el estrés bacteriano por cambios bruscos de temperatura.
- Se realizará una desinfección del tubo empaque con alcohol de 700, antes de introducirlo a la cámara de flujo laminar, evitando así una contaminación cruzada.
- Introduciremos el mechero Bunsen prendido a la cámara de flujo creando un ambiente con un radio de 15 a 20 cm estéril.
- Romperemos la ranura del tubo, abriremos y tomaremos uno de los dos sobres Kwick-Stick™.
- Rasgaremos la muesca y aperturamos, sacaremos la unidad de Kwick-Stick con forma de lapicero
- Retiraremos la etiqueta del sobre y la pegaremos una de las placas Petri principal a utilizar.
- Palparemos la zona superior de la unidad Kwick-Stick™ hasta ubicar la ampolla que contiene el líquido hidratante. Una vez ubicada la ampolla se procederá a hacer presión en la misma con una sola intención, para poder fracturarla, liberando así el líquido rehidratante el cual caerá a la base de la unidad empapando así el granulo liofilizado que contiene la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*. Acto seguido se darán leves golpes de la base de la unidad con una superficie dura como la misma base de la cámara de flujo laminar. Seguidamente apretaremos la base de la unidad para garantizar una correcta homogeneidad entre el granulo de la cepa y el líquido rehidratante.
- Empaparemos y saturaremos el pellet (bastoncillo de algodón) con la mezcla, el cual viene incluidos dentro de la





unidad Kwick-Stick™.

#### **3.6.4.3 Siembra de la cepa en medio sólido Agar chocolate**

Una vez bien empapado el pellet pasaremos a transferirlo a las 3 placas Petri seleccionadas, mediante el procedimiento estandarizado del laboratorio el cual sería; Siembra mediante la técnica de estriado. La cual consiste en esparcir con el pellet la mezcla sobre un tercio de la superficie del Agar, acto seguido, con el uso de un asa de siembra esterilizada con fuego, haremos estrías en el resto de la placa para poder lograr la correcta dispersión de las colonias en la placa. Para finalizar rotularemos la hora y la fecha de siembra sobre las bases de las 3 placas Petri.

#### **3.6.4.4 Inoculación de la cepa en medio líquido Caldo BHI**

En el caso de los tubos de ensayo que contenían medio líquido (caldo BHI), pasaremos a distribuir el resto de la solución bacteriana dentro de ellos (4 tubos) de la manera más uniforme posible. Para lo cual nos ayudaremos del pellet de la unidad. Cerraremos los tubos con sus respectivas tapas y de igual manera que las placas rotularemos la fecha y la hora de la siembra.

#### **3.6.4.5 Preparación del ambiente anaerobio**

Por otra parte, se preparará la tira de AnaerocultRA tal como lo explica el fabricante, la cual indica que se deben verter 35 ml de agua destilada sobre la superficie no plástica de la tira de la forma más horizontal y uniforme posible y dejaremos reposar por al menos 5 minutos para que empiece a liberar el gas dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) necesario para el ambiente anaerobio que necesita nuestra cepa.

Procederemos a traspasar todos los medios a la jarra de anaerobiosis de la manera más organizada posible para evitar derrames. En el caso de los tubos tapara rosca se distribuirán en la base de la jarra de anaerobiosis sostenidas por un carrusel para tubos. Acto seguido acomodaremos las placas Petri sobre los tubos. Ya casi para finalizar deslizaremos la tira de AnaerocultRA dentro



de la jarra de anaerobiosis. La cual dentro de 30 minutos aproximadamente saturara el ambiente de CO<sub>2</sub>. Pondremos la tapa de la jarra de anaerobiosis y la cerraremos adecuadamente asegurándonos de que este hermética con respecto al cuerpo de la misma.

#### **3.6.4.6 Incubación**

Para el correcto desarrollo de nuestra cepa bacteriana. Debimos seguir el protocolo de incubación establecido ya previamente por el laboratorio proveedor.

El cual nos indicó lo siguiente:

Garantizar el ambiente anaerobio con CO<sub>2</sub> entre el 5% Y. El cual se consiguió gracias a la tira de AnaerocultRA depositadas dentro de la jarra de anaerobiosis

Preparación de la incubadora a 350 grados centígrados.

Tiempo de incubación ideal para poder examinar colonias bien desarrolladas fueron de 7 días. Por lo cual al cuarto día se cambiaron las tiras de AnaerocultRA.

#### **3.6.5 Fabricación del SIA (Sistema de inyección de anaerobiosis)**

Poniendo de lado a la Jarra de anaerobiosis, la cual contiene las tiras de AnaerocultRA, necesitábamos solucionar la recreación del ambiente anaerobio dentro de las cubetas de cuarzo, para poder llevar a cabo nuestra curva de crecimiento bacteriano y el experimento con el agua ozonizada. Por tal motivo aplicamos el diseño del Blgo. Lugo Miranda Barriga. El cual consistía en armar una bolsa Ziploc (hermética), un sistema de venocllisis y llave triple de via tipo Y. Los cuales con ayuda de una jeringa hipodérmica y agujas G21 de 32 mm nos ayudarían a poder circular el CO<sub>2</sub> entre la bolsa Ziploc y las cubetas de cuarzo.

El armado del SIA consistió en:

- Primero, esterilizar por radiación UV dentro de la cámara de



flujo laminar los siguientes materiales: guantes estériles, puntas de micropipetas, un soporte para puntas de micropipetas, una bolsa Ziploc, un equipo de venoclisis, llave de 3 vías endovenosa tipo T jeringa hipodérmica de 60 ml, 10 agujas tipo G21, probeta calibrada y agua destilada. Por un lapso de 15 minutos.

- Con ayuda de un soporte y 4 puntas de micropipetas distribuidas en cada esquina de la porta puntas de micropipetas, armaremos una superficie elevada para nuestra tira de Anaerocult<sup>RA</sup>.
- Acto seguido hermetizaremos la rosca final del equipo de venoclisis con el interior de la bolsa Ziploc. Teniendo cuidado de que la llave de ingreso se encuentre debidamente cerrada
- Se Preparará la tira de Anaerocult<sup>RA</sup> con 35 ml de agua destilada como ya se explicó previamente, dándole 5 minutos para la liberación adecuada de CO<sub>2</sub>
- Una vez pasados los 5 minutos, se deberán llevar al interior de la bolsa ziploc el soporte previamente armado más la tira de Anaerocult<sup>RA</sup> con la parte plástica con dirección a la base del soporte.
- Automáticamente procederemos a cerrar la bolsa Ziploc, tomando en cuenta la correcta hermetización de la bolsa.
- Listos los pasos previos, se deberá conectar el extremo libre del equipo de venoclisis con la llave de tres vías tipo T por medio de las roscas de las mismas.
- Teniendo y el sistema armado, debemos saturar todo el contenido de la bolsa Ziploc con aire. Por lo cual haremos uso de la jeringa de 60 ml. Con la cual captaremos aire del medio y la inyectaremos al interior de la bolsa conectándolo por la llave de paso tipo T. Tener en cuenta que las llaves de acceso se deberán abrir ya al momento de tener bien conectada la jeringa hipodérmica con la llave, dicho esto procederemos a descargar el total de aire captado previamente con la jeringa



hipodérmica dentro de la bolsa.

- Repetiremos este paso hasta poder saturar completamente la bolsa Ziploc con aire.
- Al cabo de 30 minutos podremos tener un ambiente cargado de CO<sub>2</sub> listos para poder ser extraídos y aplicados dentro las cubetas.
- La cantidad de CO<sub>2</sub> almacenada en la bolsa será suficiente para el resto del proyecto, por lo cual debemos recalcar que será indispensable el verificar el correcto sellado de la bolsa Ziploc.

### **3.6.6 Curva de crecimiento bacteriano de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522**

En el presente proyecto buscamos establecer el efecto antibacteriano *IN VITRO* de agua ozonizada para lo cual debíamos aplicar la misma en los cultivos de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* en su medio líquido (caldo BHI). Con la cual surgió la siguiente interrogante: ¿En qué momento del desarrollo de la cepa, debemos aplicar el agua ozonizada? Por lo tanto, fue necesaria una revisión bibliográfica además de aplicar los conocimientos y experiencia del Blgo. Lugó Miranda Barriga. Con los cuales se llegó a la conclusión que, este producto debería ser aplicado en el inicio de la fase Logarítmica de desarrollo bacteriano. Lo cual vendría a ser el momento en el cual la bacteria da saltos muy acelerados en cuanto a su desarrollo. Por lo tanto, planificamos la curva de crecimiento bacteriano en medio líquido de la cepa *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522 en el lapso de tiempo de 48 horas, tal como sugiere el Doctor Escribano, C de Barcelona-España en su tesis doctoral sobre *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*, aunque nosotros decidimos extender la curva hasta las 60 horas de manera continua y así determinar si afectaría de alguna manera las condiciones atmosféricas del Cusco. En dicho procedimiento pasaremos por las 4 etapas del desarrollo bacteriano: Fase de latencia, Fase logarítmica, Fase estacionaria y



Fase de muerte.

En el desarrollo de la curva de crecimiento usaremos parámetros tales como niveles de absorbancia, turbidez del medio acuoso, longitudes de onda visuales

El desarrollo de este protocolo fue el siguiente:

### 3.6.6.1 Preparación de materiales

Los materiales a utilizar fueron: dos pares de guantes estériles, 14 cubetas de cuarzo de 1ml, 1 gradilla para tubos de ensayo, SIA, jeringa de 60 ml, 10 agujas tipo G21, micropipetas para 1ml, puntas para micropipetas de hasta 3 ml, mechero Bunsen conectado al balón de gas, 10 tapas de conos endodónticos previamente empaquetadas y auto clavadas, caldo BHI puro, 4 tubos de ensayo con inóculo de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*, 1 tira de moldimix, cinta parafilm, 1 tijera de escritorio y finalmente un plumón indeleble.

Los cuales fueron desinfectados con alcohol de 70<sup>0</sup> y esterilizados con radiación UV, dentro de la cámara de flujo laminar por al menos 15 minutos a excepción del mechero Bunsen y los tubos de ensayo con inóculo de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*.

### 3.6.6.2 Calibración de equipos

Primero se realizó una desinfección a las superficies de la cámara de flujo laminar con alcohol de 70<sup>0</sup> ya que dentro de este realizaremos toda la manipulación de nuestros materiales y debemos garantizar el medio totalmente aséptico.

Desinfectamos las superficies internas y Calibramos la incubadora de la marca BINDER a una temperatura de 35<sup>0</sup> grados centígrados, por un periodo constante para evitar que se apague y demás.

Para las lecturas de las cubetas de cuarzo utilizamos un espectrofotómetro de la marca Thermoscientific, modelo Genesys 150, la cual fue calibrada a una densidad óptica de



550 nm, específicos para la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*; a demás de ello se le instaló un carrusel para la colocación de 8 cubetas de cuarzo y así optimizar el tiempo de las lecturas.

Finalmente se utilizó un vortex para la agitación de los inoculo previo a su lectura. El cual nos brindara una distribución homogénea de la mezcla. Para ello se calibro a una velocidad media de agitación.

#### **3.6.6.3 Codificación de cubetas de cuarzo**

Es sumamente indispensable el tener un fácil reconocimiento y manejo de cada cubeta de cuarzo. Ya que será mucho tiempo ahorrado al momento de la lectura, es por ello que se decidió clasificarlos en 3 grupos: 2 cubetas usadas como blanco, 6 cubetas con inoculo de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* más CO<sub>2</sub> y 2 cubetas como control positivo a las cuales se les inyectara aire del medio.

Debido a esto rotulamos en la cara de la cubeta que contenía la muesca que indicaba la posición de lectura los siguientes símbolos. B1 y B2 para los blancos; M1, M2, M3, M4, M5 y M6 para las muestras como tales; C+1 y C+2 para los controles positivos.

#### **3.6.6.4 Preparación del inoculo en medio de cultivo liquido (caldo BHI)**

Una vez y debidamente atemperados tanto el caldo de cultivo BHI y los 4 tubos de ensayo con el inoculo de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*. Se introdujeron a la cámara de flujo laminar, homogeneizamos el inoculo de los tubos de ensayo mediante agitación manual, con ayuda de una micropipeta calibrada para 1ml se extrajo la misma cantidad de inoculo y se vertió en una cubeta y en otra cubeta 1ml de caldo BHI puro como blanco. Para ser leídos en el espectrofotómetro previamente calibrado, el cual arrojó un valor de absorbancia de 0,531. Según la tesis doctoral en la que nos basamos.



Debíamos tener una solución inicial de 0,250 de absorbancia por lo cual se procedió a diluir la solución del inóculo, básicamente a la mitad. De esta manera homogeneizamos dentro del frasco de vidrio tapa azul los 11ml de inóculo restante de los tubos de ensayo con otros 11 ml de caldo BHI puro. Se volvió a realizar una lectura en espectrofotómetro y arrojó un valor de absorbancia de 0.267, la cual era muy para el inicio de nuestra curva de crecimiento bacteriano.

#### **3.6.6.5 Preparación de blancos de control**

En las 2 cubetas previamente seleccionadas y codificadas como B1 y B2 procedimos a alicuotar en cada uno de ellas 1ml de caldo BHI puro (sin inóculo bacteriano), acto seguido y con ayuda de una pinza porta algodón estéril, cerramos ambas cubetas con dos tapas de conos endodónticos de color blanco. Finalmente las dejamos a un lado en reserva hasta su uso.

#### **3.6.6.6 Preparación de las cubetas de cuarzo**

Teniendo nuestro inóculo con su correcta concentración inicial de lectura, comenzamos la distribución en las cubetas de cuarzo. Con ayuda de una micropipeta calibrada y ensamblada con su punta respectiva, se procedió a alicuotar 1ml de la mezcla obtenida dentro de las cubetas restantes las cuales poseen la codificación M1, M2, M3, M4, M5, M6, C+1, C+2. Todo este procedimiento se realizó con la debida esterilidad brindada por el mechero bunsen, el cual ya se encontraba prendido dentro de la cámara de flujo laminar.

#### **3.6.6.7 Primer sellado de las cubetas de cuarzo**

Listas nuestras 10 cubetas de cuarzo tanto como blancos, muestras y controles positivos. Debíamos tener la seguridad de mantener nuestros volúmenes tanto gaseosos como líquidos lo más intangibles posibles, por eso se utilizó la soldadura en frío de la marca Moldimix, para ello se tomó 10 cm de la tira y la amasamos hasta lograr un color verde oscuro uniforme el cual indicaba el inicio de su uso; Reservamos hasta terminar de



cerrar las cubetas de cuarzo con las tapas de material endodóntico las cuales ya se encontraban auto clavadas. Para este paso nos apoyamos con una pinza porta algodón estéril, la cual evitaba la manipulación no necesaria de las cubetas. Teniendo ya tapas las cubetas de cuarzo se realizó el sellado de los márgenes entre las cubetas y las tapas haciendo uso del moldimix previamente preparado. Todo este proceso tardó un aproximado de 5 minutos.

#### **3.6.6.8 Inyección de ambiente anaerobio**

Tras el éxito de nuestro armado de cubetas, fue imprescindible la creación del medio anaerobio dentro de las mismas. Y debido a que fueron previamente selladas con el moldimix, realizamos 2 perforaciones en el centro de la superficie aun expuesta de las tapas de las cubetas, con ayuda de las agujas G21 previamente ubicadas dentro de la cámara de flujo laminar.

Finalizada la perforación de las 10 tapas selladas en las cubetas, tomamos nuestra jeringa de 60 ml, abrimos la llave de paso de nuestro sistema SIA y extrajimos el CO<sub>2</sub> que preparamos previamente. A cada cubeta se le inyectó un aproximado de 35 ml de CO<sub>2</sub> el cual le otorgó un ambiente anaerobio ideal para el desarrollo de la cepa. Es preciso señalar que para tener un buen enriquecimiento del medio con CO<sub>2</sub> tuvimos que introducir todo el trayecto de las agujas en las cubetas, las cuales tenían el bisel en medio de la solución bacteriana.

#### **3.6.6.9 Sellado final de las cubetas de cuarzo**

Fue imprescindible un apoyo humano al momento de realizar este procedimiento, por lo cual mientras se hacía la aplicación de CO<sub>2</sub> una persona estaba apoyando con el sellado final de las cubetas de cuarzo. El cual consistía en que con ayuda del moldimix restante. Se debían sellar las perforaciones realizadas en las tapas de las cubetas y así evitar la fuga del CO<sub>2</sub>, es por ello que mientras se aplicaba el gas de una se iba sellando la anterior preparada. Para finalizar con la preparación de las





mismas, se optó por cubrir el perímetro donde se realizó el sellado con cinta Parafilm, La cual al tener cierta propiedad elástica eliminaba cualquier posibilidad de escape de los contenidos.

#### **3.6.6.10 Lectura inicial**

Ya finalmente preparadas nuestras cubetas con sus contenidos respectivos las llevamos al espectrofotómetro para ser leídas por primera vez en serie las cuales fueron muy simétricas respectivamente una de otras. Marcado así el inicio de nuestra curva de crecimiento de manera exitosa, la cual consideraremos como hora 0.

Acto seguido se retiraron del espectrofotómetro las cubetas y se distribuyeron todas en la gradilla de tubos de ensayo la cual las soportara durante todo el proceso de la curva. Por último, se llevó todo el paquete a incubación constante a una temperatura previamente calibrada de 35<sup>o</sup> centígrados para su correcto desarrollo.

#### **3.6.6.11 Determinación de la curva de crecimiento**

Como ya anteriormente lo mencionamos se realizó una lectura seriada de las cubetas con el inóculo de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* en un lapso de 58 horas espaciadas en lecturas de cada hora. Para lo cual, previo a cada lectura tuvimos que apagar 2 minutos antes la incubadora evitando de esta manera estrés bacteriano por los bruscos cambios de temperatura. Pasamos todas las cubetas por el agitador vortex a una velocidad media de agitación asegurando la homogeneidad de la mezcla y recién es ese momento se llevaron a lectura por espectrofotometría. Toda esta información será apuntada en una tabla que luego se podrá visualizar en los anexos.

Pasadas las 58 horas de lectura continua. Se llevaron a analizar los datos en el programa estadístico de Excel. Arrojanos información relativamente distinta en comparación a la curva



desarrollada por el doctor Escribano, C. Nuestros datos evidenciaron un periodo de latencia muy breve, exactamente de 6 horas, marcando a su vez el inicio de la fase logarítmica o exponencial que denotaría mayor crecimiento bacteriano que se extendió hasta la hora 14 marcando el paso a la fase estacionaria en la cual ya hay un desarrollo más controlado de la cepa esta fue la más prolongada del proyecto durando hasta la hora 45.

Gracias a toda esta información recaudada pasamos a determinar que la hora exacta donde se aplicará el agua ozonizada será a la sexta hora que corresponde al inicio de la fase logarítmica. La cual lanzo una lectura de 0.351 de absorbancia.

Dicho todo esto, se estableció el protocolo para el experimento del efecto antibacteriano del agua ozonizada sobre de cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522.

### **3.6.7 Obtención del agua ozonizada**

Como anteriormente ya mencionamos el agua ozonizada nos fue otorgada por el centro de medicina alternativa Kay Pacha. La cual cuenta con un moderno equipo de ozonización de la marca Medical Ozone. El cual verificamos por medio de referencias y recomendaciones. Dicho equipo expresa concentraciones muy exactas y de buena calidad. Debido a que usa oxígeno puro por medio de una conexión directa a un tanque del mismo, como podrán apreciar en los anexos.

Ya teniendo bien estructurado el protocolo del experimento, Debemos tomar en cuenta ciertas propiedades desventajosas del ozono como por ejemplo la sensibilidad a la luz que tiene pudiendo alterar el producto, la baja estabilidad molecular de 30 minutos aproximados en los que empieza a haber desnaturalización de las moléculas de ozono y parámetros ventajosos tales como la buena compatibilidad del ozono con bajas temperatura de aproximadamente 4<sup>o</sup> y 7<sup>o</sup> grados centígrados, por tal motivo serán transportados en un empaque oscuro y en una cadena de frío



constante.

Para la elaboración de este producto se utilizó los siguientes materiales: 3 frascos de vidrio oscuros tapa azul debidamente esterilizados en autoclave, 600 ml de agua milli Q (ultra destilada), 3 tapones de algodón para las boquillas de los frascos, 3 bolsas Ziploc, un táper grande de Tecnopor y 4 bolsas especiales para cadena de frío en gel. Todos estos materiales fueron entregados y utilizados por el especialista del centro Kay Pacha en la producción de agua ozonizada. Según cada concentración de ozono usaremos diversos tiempos de tratamiento. Para la concentración de 0.4 g/L se ozonizaron 100 ml de agua milli Q por 10 minutos con un flujo de oxígeno de 0.5 l/h y para el caso de la concentración de 0.8 g/L se emplearon 15 minutos con un flujo de oxígeno de 1.5 l/h. Los cuales nos garantizan la concentración exacta del producto. Según los parámetros de la empresa. Seguido a esto las sellaremos dentro de las bolsas Ziploc despresurizadas y evaluar si hubo perdida del gas durante el transporte.

### **3.6.8 Prueba para la disolución del agua ozonizada**

Previo al experimento en sí. Se llevó el agua ozonizada a una breve prueba de disolución. En la cual se mezcló diferentes volúmenes de inóculo con cepa bacteriana y agua ozonizada de la concentración más alta. En la cual observamos que la relación ideal sin perder propiedades antibacterianas ni alterar de manera significativa los niveles de absorbancia serían de 1 a 9, ósea para una cubeta de cuarzo de 1ml la proporción sería de 100 µl de agua ozonizada y 900 µl de inóculo bacteriano.

### **3.6.9 Efecto antibacteriano del agua ozonizada a 0.40 g/L y 0.80 g/L sobre la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522**

A continuación, se desglosó paso a paso el proceso por el cual evidenciamos el efecto antibacteriano del agua ozonizada a sus distintas concentraciones las cuales serán medidas por espectrofotometría a una densidad óptica de 550 nanómetros específicos para la cepa. En los lapsos de tiempo de 1<sup>ra</sup>, 3<sup>ra</sup>, 6<sup>ta</sup>, 24<sup>ava</sup> y 48<sup>ava</sup> hora, tal cual lo demandan nuestros objetivos específicos.



### 3.6.9.1 Calibración de equipos

Previa desinfección de las superficies tanto internas como externas de los equipos pasamos a calibrarlos, incubadora a 35<sup>o</sup> centígrados, Agitador Vortex a velocidad media de vibrado, espectrofotómetro calibrado a lectura fija a una densidad óptica de 550 nanómetros adicionado con su carrusel para 8 cubetas.

### 3.6.9.2 Preparación de materiales

Los materiales a emplear fueron los siguientes: 2 pares de guantes estériles, 25 cubetas de cuarzo, 25 tapas de material endodóntico, gradilla para tubos de ensayo, SIA, jeringa de 60 ml, 10 agujas hipodérmicas tipo G21, 1 micropipeta de capacidad de 100µl, 1 micropipeta de capacidad para hasta 1000 µl, 1 micropipeta de hasta 5 ml, puntas para micropipetas de diferentes volúmenes, inóculo bacteriano, agua ozonizada en concentraciones de 0.4g/L y 0.8g/L, caldo BHI puro, vaso de precipitado, 2 pinzas porta algodón estéril, mechero Bunsen, soldadura en frío Moldimix, cinta parafilm, plumón indeleble y tijera para papel.

Los cuales a excepción del mechero Bunsen, los frascos con agua ozonizada y el inóculo de la cepa. Fueron esterilizados por medio de radiación UV por al menos 15 minutos para mantener un ambiente lo más estéril posible.

### 3.6.9.3 Perforación de las tapas para las cubetas

Teniendo como experiencia la curva de crecimiento, procedimos con la perforación de las tapas. Ya que en el anterior procedimiento tomo demasiado tiempo y podría alterar la concentración del agua ozonizada. Así que con ayuda de las agujas hipodérmicas G21 procedimos a realizar dos perforaciones en el medio de la tapa. Una para la inyección del CO<sub>2</sub> y la otra para la eliminación del oxígeno.

### 3.6.9.4 Codificación de las cubetas

Tuvimos dos grupos:

**Grupo 1:** Contamos con 11 cubetas de cuarzo las cuales serian



usadas con la concentración de 0.4g/L de agua ozonizada. De las cuales usamos 2 como blancos de lectura, codificados como B1 y B2; 7 cubetas como muestra con agua ozonizada, las cuales se codificaron como M1, M2, M3, M4, M5, M6 y M7; Y finalmente 2 cubetas usadas como control positivo codificadas como C+1 y C+2

**Grupo 2:** Contamos con 11 cubetas de cuarzo las cuales serían usadas con la concentración de 0.8g/L de agua ozonizada. De las cuales usamos 2 como blancos de lectura, codificados como B3 y B4; 7 cubetas como muestra con agua ozonizada, las cuales se codificaron como M8, M9, M10, M11, M12, M13 y M14; Y finalmente 2 cubetas usadas como control positivo codificadas como C+3 y C+4

#### **3.6.9.5 Determinar concentración inicial del inculo**

Basados en los resultados de la curva de crecimiento, preparamos una solución de 13 ml de cultivos mas 14 ml de caldo BHI puro obteniendo así una solución con un valor de absorbancia de 0.298 los cuales mandamos a incubar por 6 horas a una temperatura de 35<sup>0</sup> centígrados, el cual es el tiempo exacto en el cual comienza su fase logarítmica y será apto para la aplicación de agua ozonizada.

#### **3.6.9.6 Preparación de los materiales usados en el sellado de las cubetas**

Tomando también como experiencia la preparación del Moldimix en la curva de crecimiento. Se opto por amasarlo 5 minutos antes de la preparación de las cubetas y reservándose hasta el sellado de las mismas.

#### **3.6.9.7 Preparación de las cubetas**

Pasadas las 6 horas de incubación pasamos nuestro inculo y nuestras muestras con agua ozonizada a la cámara de flujo laminar, donde nos esperan nuestros materiales listos.

Seleccionamos el primer grupo de cubetas empleadas para la concentración de 0.4g/L, empezaremos alicuotando los blancos



de lectura para lo cual administraremos en las cubetas B1 Y B2 1 ml de caldo BHI puro y procederemos a cerrarlas con las tapas sin perforar. En las cubetas M1, M2, M3, M4, M5, M6 y M7 administraremos primero en cada una de ellas 100µl de agua ozonizada al 0.4g/L y posteriormente 900µl del inóculo, para finalmente cerrarlas con las tapas perforadas Finalizando este grupo tomaremos las cubetas C<sup>+1</sup> Y C<sup>+2</sup> de control positivo alicuotando 1ml de inóculo sin ningún aditamento y tapándolas al final.

Ahora el segundo grupo de cubetas reservadas para la concentración de agua ozonizada al 0.8g/L. Para lo cual tomaremos las cubetas B3 y B4 para administrarles 1 ml de caldo BHI puro; Las cubetas M8, M9, M10, M11, M12, M13 y M14 serán administradas primero con 100µl de agua ozonizada al 0.8g/L seguido a esto suministraremos 900µl del inóculo e inmediatamente cerrarlas con las tapas perforadas; Finalizando ahora este segundo grupo inocularémos 1ml de inóculo en las cubetas C<sup>+3</sup> Y C<sup>+4</sup> usadas como control positivo.

#### **3.6.9.8 Primer sellado de las cubetas**

Preparadas todas nuestras cubetas, se pasó a sellar los contornos de las mismas con Moldimix previamente preparado asegurándonos de que no haya márgenes descubiertos.

#### **3.6.9.9 Inyección del medio anaerobio**

Asegurándonos de que las bacterias tengan el medio ideal para su desarrollo, se les inyectó a todas las cubetas menos a los blancos CO<sub>2</sub>. De la misma manera que en la curva de crecimiento, un volumen de 35 ml de CO<sub>2</sub> con la ayuda de las agujas hipodérmicas y el CO<sub>2</sub> almacenados en el SIA.

Y de esta manera tener certeza de la acción del agua ozonizada y no tener datos erróneos.

#### **3.6.9.10 Sellado final de las cubetas**

Tratando de evitar la liberación del CO<sub>2</sub> inyectado. Sellamos los agujeros de las tapas instaladas en las cubetas con el moldimix



restante asegurándonos de que el medio este totalmente hermético. Una vez selladas todas las cubetas con el Moldimix, realizamos el refuerzo con cinta parafilm la cual como ya mencionamos antes. Al tener una correcta elasticidad se asegura de hermetizar espacios libres que se pudieron escapar durante el sellado con Moldimix.

#### **3.6.9.11 Lectura inicial**

Una vez listos todos nuestros materiales previamente preparados realizamos sus debidas lecturas en espectrofotómetro a una densidad óptica de 550nm los cuales mostraron valores iniciales muy simétricos. En la media del primer grupo tenemos 0.255 y en la media del segundo grupo 0.285, determinando un inicio válido del experimento.

Acto seguido ordenaremos las cubetas en la gradilla para tubos de ensayo, y las mandaremos a incubar para su respectiva lectura cada hora transcurrida.

#### **3.6.9.12 Determinación del efecto antibacteriano**

Las lecturas realizadas en ambos grupos serán registradas en el instrumento que fue diseñado por el tesista y aprobada por los expertos pertinentes.

En las cuales observamos una notoria disminución de las concentraciones de absorbancia de las cubetas, en las cuales pudimos evidencias una notoria disminución de 0.030 puntos por cada muestra empleada en el lapso de tiempo establecido.

### **3.7 Recolección De Datos**

#### **3.7.1 Trámites Administrativos**

Para la realización de esta investigación, fue indispensable el uso de los laboratorios de ciencias básicas de la Universidad Andina del Cusco, los cuales, al estar muy bien implementados, brindaban la calidad apropiada para este trabajo. Por tal motivo se realizó un seguimiento al trámite dirigido a la decana de la



facultad de Ciencias de la Salud. Para que nos otorgue el permiso pertinente de ingreso a la universidad, la cual por la situación de la pandemia se encontraba muy restringida con respecto al ingreso.

También fue fundamental la obtención de la cepa de la bacteria *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522, esta misma fue comprada y adquirida con el tesista, toda esta coordinación se procedió con la empresa Microbiologics ubicada en Miraflores-Lima. La cual importa estas cepas con la intención de proyectos de investigación.

### 3.7.2 Procedimientos

- Compra y adquisición de la cepa de la bacteria *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522.
- Tramitación del permiso de ingreso y realización de proyecto de tesis dentro los laboratorios de ciencias básicas de la facultad de Ciencias de la Salud.
- Búsqueda y coordinación de la empresa suministradora del agua ozonizada a sus diferentes concentraciones.
- Viabilización de la cepa de la bacteria *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522.
- Lectura de la curva de crecimiento bacteriano.
- Prueba piloto para observar el desenvolvimiento del agua ozonizada frente al inóculo de la bacteria *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522.
- Procedimiento experimental para determinar la acción bacteriana del agua ozonizada frente a la cepa de la bacteria *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522.
- Procesamiento y análisis final de datos.





- Realización de la tesis.

### **3.7.3 Sistematización**

Toda la información obtenida de la investigación fue sistematizada mediante la tabulación de datos dentro del programa de cálculo Microsoft Excel.

### **3.7.4 Procesamiento de datos**

Haciendo uso del programa de cálculo Microsoft Excel, hicimos una valoración de todas las lecturas obtenidas en el espectrofotómetro de la marca Thermo Scientific modelo Genesys 150, las lecturas se dieron en dos sesiones. La primera para la realización de la curva de crecimiento de la bacteria *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522 en un lapso de 60 horas y la segunda para evaluar el efecto antibacteriano del agua ozonizada sobre la misma realizando lecturas en 6 horas por intervalos de 1.

En dicho programa realizaremos un análisis de todas las curvas obtenidas. Botando gráficos de líneas aceptables para nuestros resultados. Permittiéndonos de esta manera aplicarlos en este proyecto dando veracidad al trabajo realizado en el laboratorio.



### **3.8 Campo De Investigación**

#### **3.8.1 Área de Salud**

Ciencias de la salud.

#### **3.8.2 Área Especifica**

Estomatología.

#### **3.8.3 Especialidad**

Periodoncia y microbiología bucal.

#### **3.8.4 Tema**

Antibacterianos ante microorganismos orales.



## CAPITULO IV

### Resultados de la investigación

#### Tabla N°1

#### 4.1 Curva De Crecimiento de la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522

HORAS	M3	M4	M6	PROMEDIO
0	0.298	0.299	0.300	0.299
1	0.300	0.300	0.302	0.301
2	0.302	0.302	0.304	0.303
3	0.309	0.306	0.305	0.307
4	0.317	0.319	0.320	0.319
5	0.348	0.345	0.341	0.345
6	0.371	0.370	0.364	0.368
7	0.411	0.415	0.406	0.411
8	0.476	0.480	0.469	0.475
9	0.559	0.565	0.551	0.558
10	0.616	0.622	0.613	0.617
11	0.664	0.671	0.663	0.666
12	0.713	0.721	0.716	0.717
13	0.725	0.733	0.733	0.730
14	0.728	0.740	0.740	0.736
15	0.730	0.749	0.749	0.743
16	0.736	0.751	0.749	0.745
17	0.741	0.757	0.757	0.752
18	0.747	0.764	0.765	0.759
19	0.751	0.767	0.766	0.761
20	0.751	0.767	0.772	0.763
21	0.751	0.767	0.778	0.765
22	0.751	0.769	0.783	0.768
23	0.751	0.770	0.785	0.769
24	0.751	0.772	0.790	0.771
25	0.771	0.791	0.793	0.785
26	0.772	0.793	0.798	0.788
27	0.773	0.797	0.801	0.790
28	0.771	0.801	0.808	0.793
29	0.788	0.809	0.828	0.808

30	0.788	0.816	0.839	0.814
31	0.789	0.817	0.840	0.815
32	0.793	0.823	0.842	0.819
33	0.793	0.823	0.844	0.820
34	0.793	0.823	0.845	0.820
35	0.793	0.823	0.846	0.821
36	0.794	0.823	0.847	0.821
37	0.796	0.824	0.848	0.823
38	0.797	0.824	0.849	0.823
39	0.799	0.825	0.850	0.825
40	0.800	0.825	0.852	0.826
41	0.800	0.825	0.853	0.826
42	0.801	0.825	0.855	0.827
43	0.802	0.825	0.857	0.828
44	0.803	0.825	0.859	0.829
45	0.804	0.825	0.846	0.825
46	0.804	0.826	0.850	0.827
47	0.805	0.832	0.851	0.829
48	0.805	0.832	0.855	0.831
49	0.805	0.835	0.858	0.833
50	0.807	0.836	0.860	0.834
51	0.807	0.837	0.861	0.835
52	0.807	0.837	0.860	0.835
53	0.806	0.833	0.860	0.833
54	0.801	0.831	0.858	0.830
55	0.801	0.831	0.859	0.830
56	0.802	0.832	0.856	0.830
57	0.802	0.832	0.856	0.830

Fuente propia del investigador Rodrigo Delgado

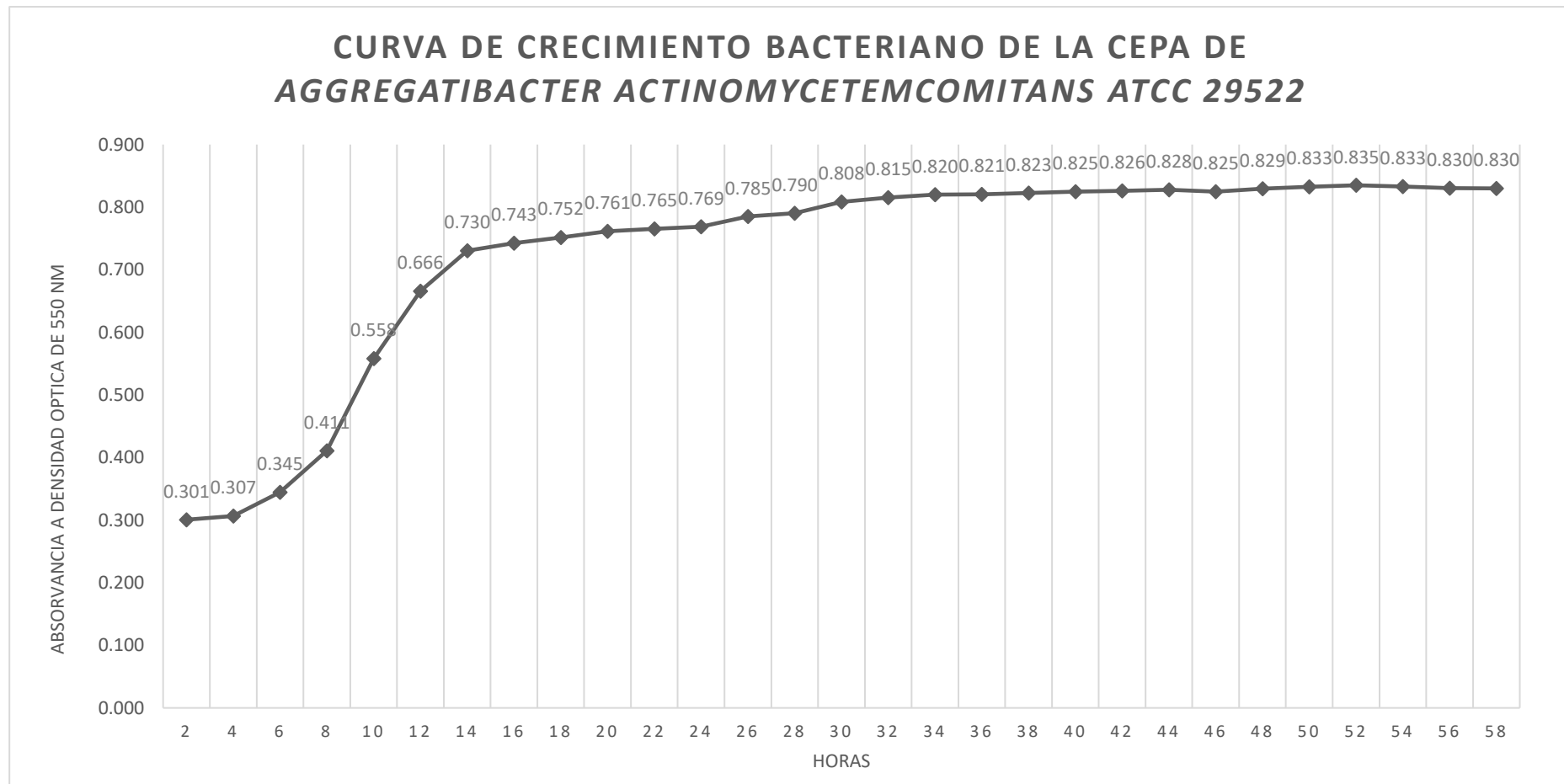


En las siguientes tablas podremos observar los resultados obtenidos en las lecturas de las cubetas de cuarzo codificadas como M3, M4 y M6 las cuales presentaron de inicio a fin un desarrollo óptimo, libre de derrames y libre de presuntos agentes contaminantes como lo fueron el caso de las cubetas M1, M2, M5.

En este cuadro podemos observar un crecimiento muy simétrico entre las 3 cubetas destacadas, por lo cual era confiable el poder hacer un promedio de todas estas tal cual se puede observar en la fila del extremo derecho este promedio nos será sumamente útil al momento de realizar nuestra gráfica de la curva.



Gráfico N°2



Fuente propia del investigador Rodrigo Delgado



En el presente grafico podemos observar la curva de crecimiento resultante de los promedios de las muestras M3, M4 y M6 en los cuales podemos observar de manera muy precisa las fases del crecimiento bacteriano correspondientes a la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans ATCC 29522*. Analizaremos todas las fases:

- Fase de latencia, a sorpresa del investigador esta fue muy breve, dándose solo en el transcurso de la primera y quinta hora, aun no hay cambios visibles notorios en el medio de las cubetas, salvo por las lecturas a 550 nm en el espectrofotómetro las cuales arrojaron un promedio de 0.350 de absorbancia.
- Fase logarítmica, esta fase marcará el desarrollo exponencial de la cepa en el medio, esta fase se vio comprendida entre la hora 6 y la hora 14 puesto que luego de ello continuo el proceso de desarrollo bacteriano, pero a un ritmo más lento. Las lecturas en esta etapa alcanzaron hasta un 0.750 de absorbancia a una densidad óptica de 550 nm. Añadiéndose a lo ya explicado, este será el punto en el cual se aplicará el agua ozonizada  $H_2O_3$  y así evidenciar si esta misma inhibirá el desarrollo de la cepa.
- Fase estacionaria, aun existirá crecimiento de la cepa, pero a una velocidad media baja exactamente de 0.012 en esta etapa hay una evidente turbidez estable la cual será de un color ámbar opaco, vimos un aumento de hasta un 1.000 de absorbancia.
- Fase de muerte, esta dará inicio una vez culminada a fase estacionaria, aproximadamente en la hora cincuenta. Ya en este punto las bacterias propias de la cepa agotaron los nutrientes del medio, en este caso el caldo BHI, y por tal motivo habrá una disminución de la concentración bacteriana.



Tabla N°3

4.1.1 Curva de crecimiento bacteriano del control negativo de la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522

HORAS	CONTROL -		
0	0.289	30	0.902
1	0.291	31	0.902
2	0.291	32	0.91
3	0.293	33	0.909
4	0.297	34	0.908
5	0.310	35	0.907
6	0.314	36	0.904
7	0.321	37	0.904
8	0.344	38	0.898
9	0.404	39	0.929
10	0.466	40	0.915
11	0.551	41	0.927
12	0.642	42	0.916
13	0.694	43	0.904
14	0.741	44	0.923
15	0.764	45	0.942
16	0.766	46	0.941
17	0.799	47	0.947
18	0.814	48	0.947
19	0.819	49	0.958
20	0.828	50	0.957
21	0.828	51	0.959
22	0.829	52	0.97
23	0.829	53	0.972
24	0.84	54	0.961
25	0.862	55	0.974
26	0.853	56	0.964
27	0.878	57	0.967
28	0.881		
29	0.896		

Fuente propia del investigador Rodrigo Delgado

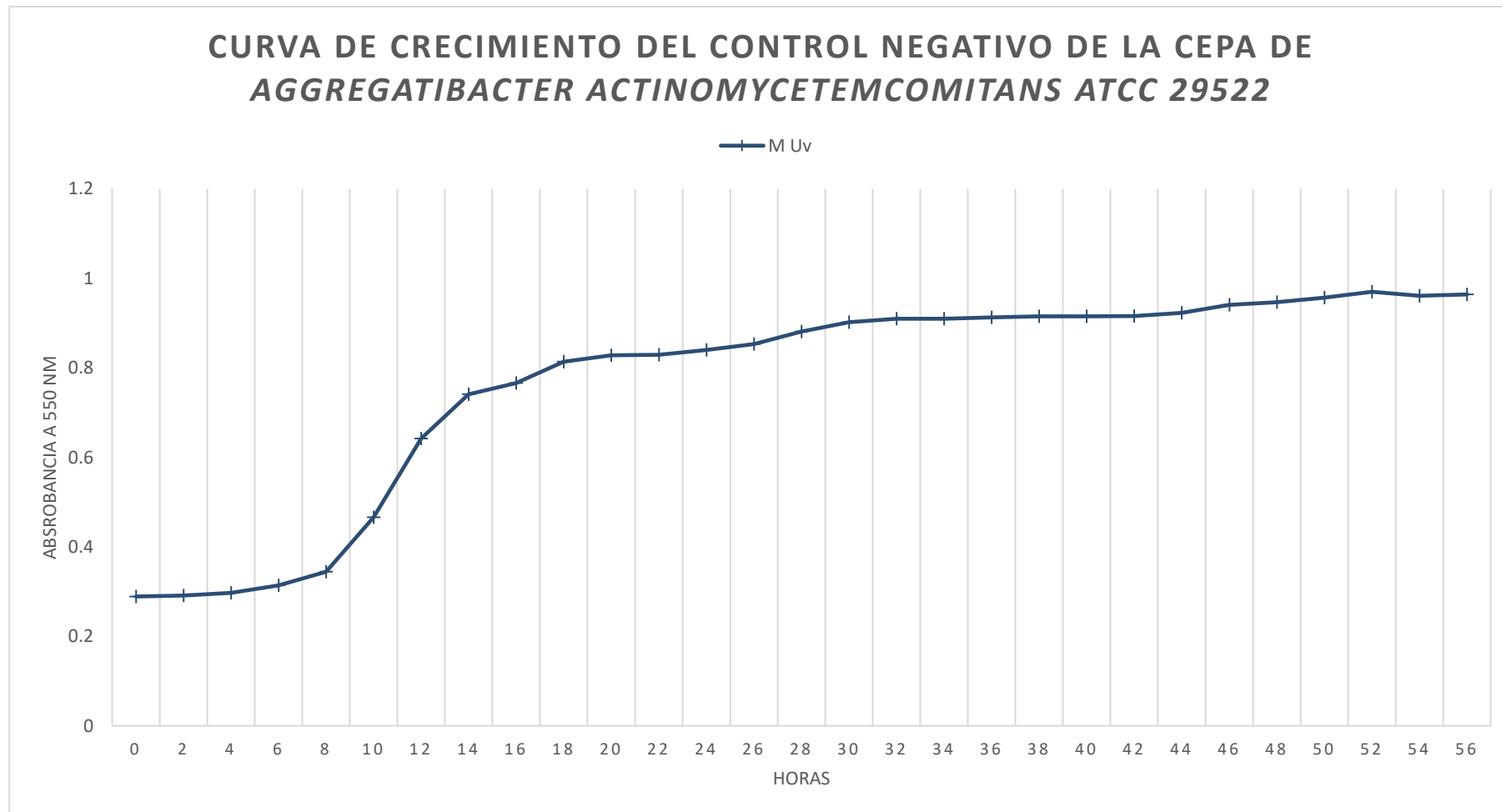


En las presentes tablas podemos observar la curva de crecimiento bacteriano correspondiente a el promedio obtenido de los dos controles negativos. A los cuales nunca se les administro el ambiente anaerobio (libre de  $\text{CO}_2$ ), estas muestras arrojaron lecturas relativamente inesperadas, puesto que estaba previsto que no haya un desarrollo bacteriano apropiado, pero, sin embargo, lo hubo. Aquí resalta la alta adaptación facultativa de la cepa al medio donde se proliferará. Y por ello también esta tan bien adaptada a la cavidad bucal, la cual es mucha más abundante en oxígeno que dióxido de carbono.





Gráfico N°4



Fuente propia del investigador Rodrigo Delgado



En el presente gráfico observamos la curva de crecimiento de los controles negativos los cuales estuvieron desarrollándose en cubetas de ambiente aerobio (libres de  $\text{CO}_2$ ). En los cuales podemos observar notorias diferencias en sus fases.

La primera vendría a ser su fase de latencia. La cual es más prolongada extendiéndose hasta las nueve horas. A comparación de las otras muestras, las cuales duraron en latencia hasta la sexta hora. Esto denota un mayor tiempo de adaptación de la cepa al medio.

La segunda diferencia notoria vendría a ser la fase logarítmica la cual, si bien manifiesta el desarrollo más acelerado de la cepa, aquí lo realiza de manera un poco más lenta y extendida empezando en la novena hora y extendiéndose hasta la hora veinte con unos valores de absorbancia aproximados de 0.800.

Podríamos decir que aquí presentamos una fase estacionaria más breve, pero más estable al mismo tiempo con una media de crecimiento bacteriano de 0.010, dando así inicio a la fase de muerte la cual ya es más parecida a la curva principal.



Tabla N°5

**4.2 Efecto antibacteriano del agua ozonizada con la concentración de 0.4 g/L sobre la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522**

	H203 A 0.4 g/L								
tiempo	B	C +	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
hora 0	0	0.311	0.253	0.251	0.255	0.263	0.259	0.262	0.259
hora 1	0	0.341	0.244	0.242	0.244	0.25	0.249	0.25	0.249
hora 3	0	0.406	0.229	0.227	0.227	0.231	0.233	0.233	0.228
hora 6	0	0.613	0.217	0.218	0.219	0.218	0.215	0.222	0.215
hora 24	0	0.790	0.232	0.234	0.237	0.232	0.229	0.235	0.229
hora 48	0	1.058	0.505	0.482	0.507	0.484	0.496	0.492	0.486

Fuente propia del investigador Rodrigo Delgado

En estas tablas podemos observar el efecto antibacteriano del agua ozonizada sobre la cepa correspondiente. Este procedimiento se vio comprendido por 7 muestras (M1, M2, M3, M4, M5, M6 y M7) con agua ozonizada con 0.4g/L de ozono, el promedio de las dos cubetas de control positivo (c+) y su respectivo blanco de lectura (B). Todas estas lecturas se realizaron en espectrofotómetro a una densidad óptica de 550 nm, en un lapso de tiempo como lo especifican nuestros objetivos de la investigación.

En estas lecturas podemos evidenciar un correcto desarrollo de nuestro control positivo, el cual le otorga veracidad a este procedimiento siendo correlativo con nuestra curva de crecimiento.

En nuestras lecturas de las muestras  $M_x$ , es evidente el efecto antibacteriano del agua ozonizada con la concentración de 0.4 g/L, habiendo una disminución media de 0.008 de absorbancia respectiva entre ellas. Siendo estos valores muy simétricos en cuanto a su

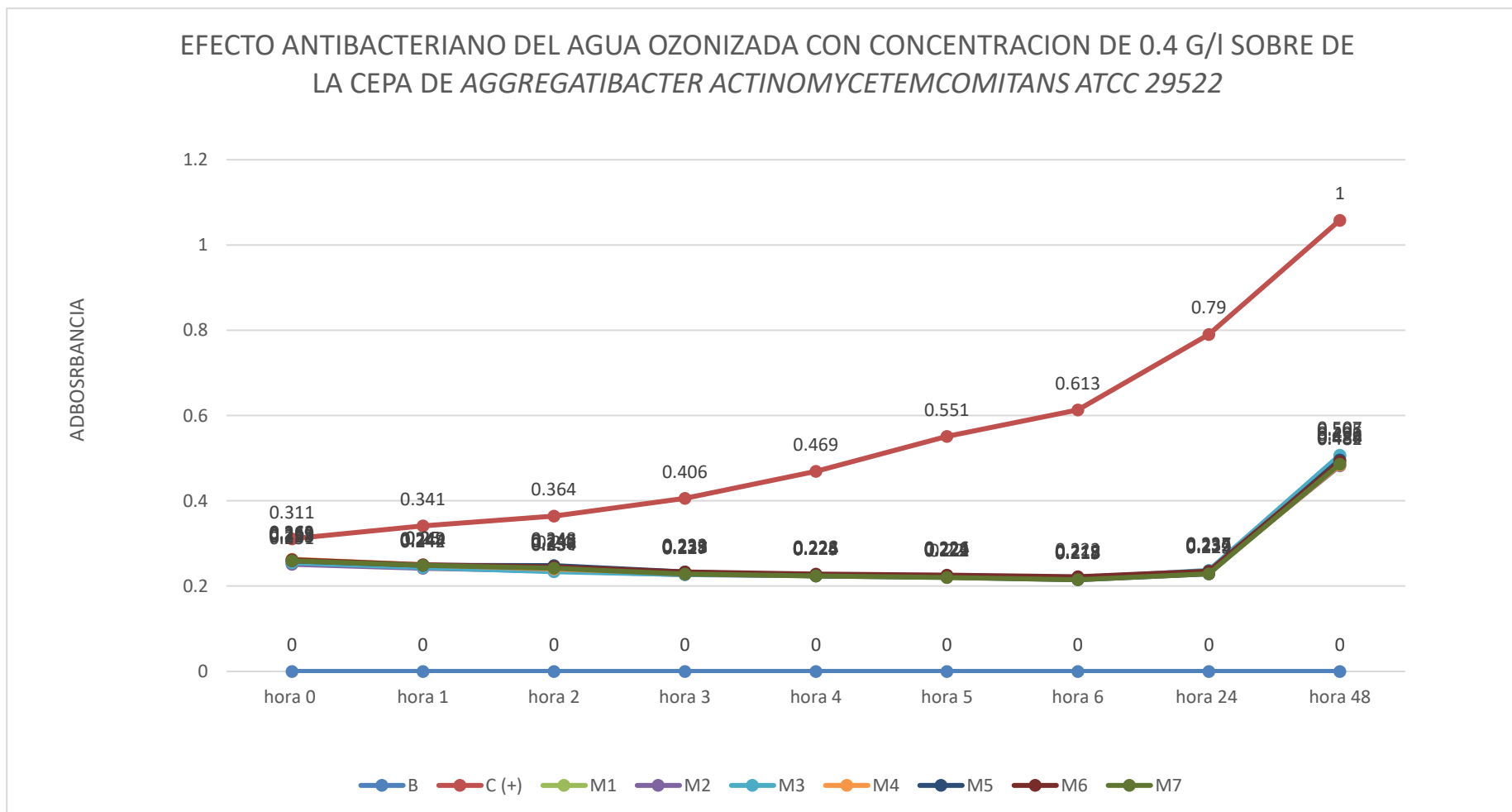


descenso. Esto hace notorio el efecto antibacteriano de esta concentración. Cabe resaltar que el ozono en medio acuoso tiene una estabilidad molecular baja por ello la aplicación del este producto fue casi inmediata a su fabricación. Dentro de las 6 primeras horas obtuvimos efecto antibacteriano. Pero a las 24 horas notamos un leve alce en la concentración de absorbancia debido a que ya había perdido su estabilidad molecular. Y a las 48 horas ya había un significativo desarrollo de la cepa en el medio, prácticamente duplicando así la lectura inicial siendo de 0.495.

Analizando estas lecturas llegamos a la conclusión de que existe efecto antibacteriano dentro de las primeras 6 horas. Generando muerte y aletargamiento de las bacterias, pero una vez perdida la integridad molecular del ozono, las bacterias que aún no habían muerto volverán a reproducirse, pero sin lograr un desarrollo óptimo.



Gráfico N°6



Fuente propia del investigador Rodrigo Delgado



En color rojo la curva del control positivo (C+1 y C+2), estas cubetas fueron incubadas con su respectivo ambiente anaerobio y sin agua ozonizada para poder garantizar el efecto antibacteriano del  $H_2O_3$  las cuales denotan un adecuado crecimiento y desarrollo, muy similar en comparación a la primera curva de crecimiento bacteriano. Alcanzando al cabo de la sexta hora un 0.613 de absorbancia frente a los 0.680 de la curva original. Y a las 48 horas un 1.058 de absorbancia. Dando así validez al experimento.

En el segundo grupo observamos unas líneas sobrepuestas de diversos colores, estas representan a las cubetas muestras (M1, M2, M3, M4, M5, M6 y M7) las cuales fueron aplicadas con 100 $\mu$ l de agua ozonizada al 0.4g/L, como es fácilmente evidenciable en el cuadro estas tienen unos trazos muy parejos. En el caso de las siete cubetas se observa una media de disminución de 0.045 de absorbancia entre las primeras lecturas y las realizadas a la sexta hora. Esto al ser contrastado con los controles positivos hace evidente un claro efecto antibacteriano, al menos dentro de nuestras seis primeras horas objetivo. Entre la sexta y la veinticuatroava hora existe un ligero aumento de concentración muy baja de aproximadamente 0.015 media de absorbancia. Pero no olvidemos que para estas alturas el ozono ya disgrega todas sus moléculas. Y ya para la hora cuarentaiocho hubo un desarrollo de la cepa, pero mucho menor si es comparada con la curva de crecimiento bacteriano original.

Finalmente, la línea de color azul corresponde a las cubetas de blanco (B1 y B2) las cuales no contiene cepa más solo caldo BHI es por ello que no presentan ninguna variación y eso es ideal porque tampoco existió contaminación en el experimento.



Tabla N<sup>o</sup>7

**4.3 Efecto antibacteriano del agua ozonizada con la concentración de 0.8 g/L sobre la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans ATCC 29522***

	H2O3 a 0.8 g/L								
	B	C(+)	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
hora 0	0	0.343	0.287	0.288	0.29	0.289	0.291	0.288	0.29
hora 1	0	0.37	0.28	0.282	0.284	0.281	0.281	0.28	0.286
hora 3	0	0.48	0.276	0.277	0.268	0.277	0.271	0.274	0.278
hora 6	0	0.671	0.259	0.261	0.262	0.261	0.26	0.256	0.262
hora 24	0	0.771	0.217	0.226	0.218	0.228	0.224	0.216	0.227
hora 48	0	0.983	0.175	0.191	0.174	0.195	0.189	0.176	0.192

Fuente propia del investigador Rodrigo Delgado

Se usaron once cubetas de cuarzo las cuales se dividieron en tres grupos:

Dos cubetas usadas de blanco (B3 y B4), las cuales tendrán un valor de lectura igual a cero todo el tiempo.

En el segundo grupo tenemos el promedio obtenido de las cubetas de control positivo (C<sup>+</sup>3 y C<sup>+</sup>4), las cuales fueron preparadas sin ningún agente del tipo antibacteriano.

El tercer y último grupo comprende a las cubetas muestra (M8, M9, M10, M11, M12, M13 Y M14) las cuales contenía 900µl de inóculo bacteriano de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans ATCC 29522* y 100µl de agua ozonizada a la concentración de 0.8 g/L, la cual arrojó unas lecturas de disminución bacterianas de hasta una media de 0.010 de absorbancia con relación a sus lecturas anteriores. Es por ello que

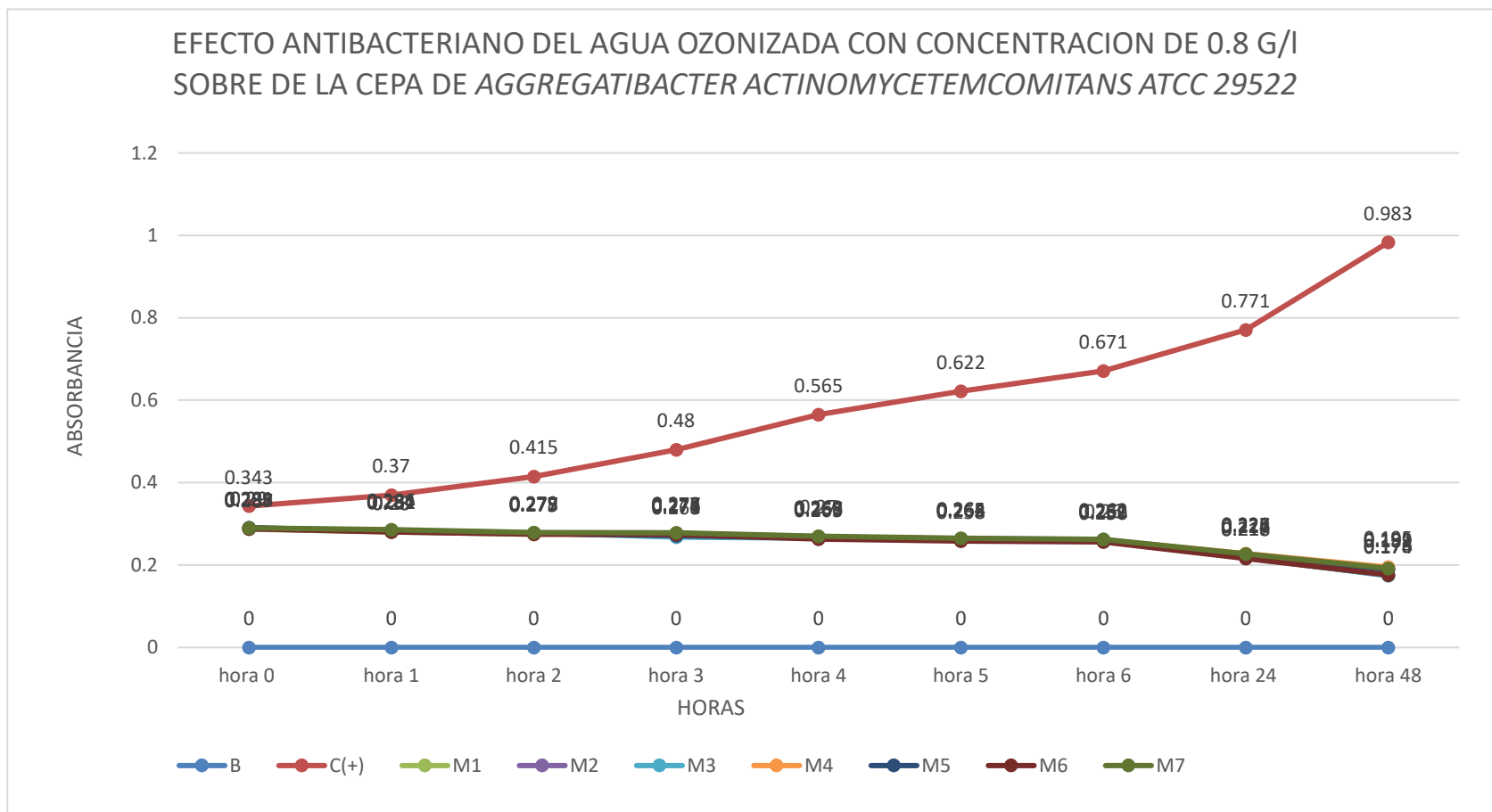


confirmamos su acción antibacteriana, pero a un ritmo muy similar al del agua ozonizada de concentración más baja. La mayor diferencia con respecto a la concentración mas baja radica en la hora 24 y 48 en las cuales continuo la disminución de absorbancia de casi de 0.100 con respecto a las lecturas de la hora 0. Gracias a este dato podemos sugerir que el agua ozonizada a la concentración de 0.8g/L es letal al aplicarse sobre la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522.





Gráfico N°8



Fuente propia del investigador Rodrigo Delgado



Esta es la gráfica que representa el efecto antibacteriano del agua ozonizada con concentración de 0.8 g/l sobre de la cepa de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522. También podemos observar los tres grupos blancos, controles positivos y muestras con agua ozonizada.

Los blancos presentaran de inicio a fin de las lecturas un valor igual a cero ya que solo presentan caldo BHI puro sin inóculo ni agentes antibacterianos.

La línea roja que se eleva progresivamente constituye al promedio de los controles positivos los cuales han presentado un desarrollo similar a la curva de crecimiento original. Lo cual da validez a nuestras muestras. Esta empezó desde los 0.343 de absorbancia hasta desarrollarse a los 0.983 de absorbancia.

Las líneas que están sobrepuestas reflejan las lecturas obtenidas de las muestras (M8, M9, M10, M11, M12, M13 Y M14), tuvo un descenso de absorbancia de hasta 0.100 con respecto a las lecturas de la hora 0.

A comparación del experimento con la concentración anterior. Esta dosis más alta de ozono no permitió que haya de nuevo un desarrollo bacteriano. Siendo sumamente letal con la cepa de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522.



## Capítulo v

### Discusión

La finalidad de este estudio fue el de demostrar el efecto antibacteriano del agua ozonizada a las concentraciones de 0.4 y 0.8 g/L frente a las bacterias que son las responsables de la enfermedad periodontal, en este caso de particular de la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522, para lo cual fue necesario realizarlo *invitro* en las instalaciones de los laboratorios de ciencias básicas de la Universidad Andina del Cusco, facultad de ciencias de la salud. Para lo cual se utilizaron 6 placas Petri, 10 tubos de ensayo tapa rosca y 32 cubetas de cuarzo. Las cuales contenían medios de cultivo líquido y sólido más el inóculo de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522. Estas serán sometidas a espectrofotometría para su lectura a una densidad óptica de 550nm siendo la unidad de medida la absorbancia dada por la turbidez de los medios.

Escibano C (2017) en donde con su tesis doctoral realizó un estudio comparativo de diferentes antibacterianos sobre la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*, en dicha investigación realizó una curva de crecimiento bacteriano en el cual presentó una fase de latencia significativamente más prolongada que la realizada en esta investigación, con una diferencia de más de 10 horas, y en el caso de la fase logarítmica fue menos brusca extendiéndose hasta las 35 horas pero siendo menos abrupta que la obtenida en nuestra investigación. Esto podemos sugerirlo quizá a por los diferentes



ambientes en los que fueron incubados, siendo las más resaltante la altura y presión atmosférica presentes en el Cusco a comparación de Escribano C, que lo realizó en España a 0 m.s.n.m. Otro posible factor sería el del medio en que se desarrolló siendo el medio TGY específico para *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* mientras que el medio BHI es más general para otras bacterias, además. Cabe resaltar que ambas curvas de crecimiento fueron realizadas por la misma metodología, midiendo absorbancia por medio de espectrofotometría a una densidad óptica de 550 nm.

Torres A (2016) en la siguiente investigación se demostró mediante el test de Turkey que tanto el hipoclorito al 5%, la clorhexidina al 2% y el agua ozonizada al 5% resultaron ser efectivos como antibacterianos frente a la cepa de *Actinomyces Israelli* la cual al igual que el *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* son bacterias anaerobias facultativas. En este caso las pruebas se realizaron en un medio sólido (placas Petri) para un recuento de UFC. En el caso del agua ozonizada al 5% o 5 g/L se demostró que tenía efecto antibacteriano ante *Actinomyces Israelli* muy similar al del hipoclorito de sodio al 5%. Aunque en este caso se usaron dosis de ozono muy altas en comparación a nuestra investigación, por lo cual se sugiere que podría ser lesiva e incompatible con los tejidos de la cavidad oral.

Sosa J (2015) en esta tesis se realizó una comparativa entre *Rosmarinus officinalis* y agua ozonizada como antibacterianos frente a *Streptococcus Mutans*, En esta investigación se usaron las mismas concentraciones de agua ozonizada que en nuestro proyecto, a pesar de ello demostraron poseer menor efecto antibacteriano debido a que



los halos de inhibición fueron menores que los generados por *Rosmarinus officinalis* hasta en una media de 5mm esto podría ser debido a que se aplicaron en diferentes medios de cultivo además de ello es muy posible que no hayan tomado en cuenta la baja estabilidad molecular del ozono y su disgregación en el aire.

Carhuayo M (2011), aquí se sometieron a evaluación el agua ozonizada a la concentración de 2g/L sobre la bacteria *Enterococcus Faecalis* en la cual no se obtuvo efecto antibacteriano. Puesto que al cabo de 48 horas se retomó el desarrollo de la cepa. En este caso podríamos hablar de una resistencia bacteriana a la solución de agua ozonizada. Pero en comparación a nuestro estudio se ve que la concentración de ozono es significativamente mayor casi 4 veces mayor, por tal motivo se sugiere que el medio de cultivo sólido no es el mejor método para hacer un efecto antibacteriano además de que se debe considerar la baja estabilidad molecular del ozono

Monillo y Rodríguez (2015) en su artículo dieron a conocer que el ozono en su medio líquido, era el que mejor biocompatibilidad presentaba con los tejidos de la cavidad bucal y por ello sirvió de guía en esta investigación al señalar el medio en el cual debíamos realizar el experimento. Además de ello resaltaron que este producto es muy amigable con las células epiteliales y fibroblastos que componen el tejido periodontal.

Ramírez A, (2015) en su investigación empleo 32 pacientes con gingivitis y periodontitis crónica, los cuales serían sometidos a ozono gaseoso y líquido. Para lo cual presencio que las piezas que presentaban movilidad tipo 1 y 2 mostraron una disminución



significativa luego de una semana aplicando agua ozonizada. Y en las piezas que se aplicó ozono en presentación gaseosa si bien hubo disminución de la placa dental también presentaron irritación de las encías, dando validez así a lo ya establecido por Monillo y Rodríguez. Reafirmando la elección de la aplicación del ozono en su medio liquido en esta investigación.

Schwartz y Martínez (2012) en su investigación hicieron una comparativa entre los beneficios y deficiencias de la aplicación de la ozonoterapia tratando de demostrar que era más beneficioso que perjudicial para la salud si se realizaba apropiadamente, en esta investigación se toparon con que este producto era difícil de patentar ya que no generaba riquezas siendo esto similar con nuestro proyecto ya que se nos fue otorgado de manera gratuita por el centro de salud alternativa Kay Pacha, ya que no representaba gasto significativo para la empresa. Y en el caso de la Centro Estomatológico Universitario Luis Vallejos Santoni de la UAC que posee los equipos y solo requieren una conexión directa al suministro de agua potable.

Dahdah A y col (2017), aquí se aplicó ozono gaseoso y liquido frente a un determinado número de terceras molares recién extraídas volviéndonos a sorprender en que la presentación gaseosa tuvo reacciones toxicas sobre las células del ligamento, mientras que la presentación liquida no se apreciaron signos de citotoxicidad, sugiriendo además un posible efecto antiinflamatorio.



## Conclusiones

1. El agua ozonizada presentó efecto antibacteriano frente a la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* causante de la enfermedad periodontal.
2. Las cepas de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522 desarrollo una curva de crecimiento continuo hasta las 52 horas antes de ingresar a su fase de muerte.
3. El efecto antibacteriano del agua ozonizada frente a la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522, a la 1ra hora de aplicación fue de 0.010 de absorbancia en ambas concentraciones.
4. El efecto antibacteriano del agua ozonizada frente a la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522, a la 3ra hora de aplicación fue de 0.020 de absorbancia en ambas concentraciones.
5. El efecto antibacteriano del agua ozonizada frente a la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522, a la 6ta hora de aplicación fue de 0.030 de absorbancia en amabas concentraciones.
6. El efecto antibacteriano del agua ozonizada frente a la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522, a la 24<sup>ava</sup> hora de aplicación, para la concentración de 0.4g/L hubo un aumento en la concentración de una media de 0.015 de absorbancia; Mientras que en el caso de la concentración de 0.8g/L siguió presentando un decrecimiento medio de 0.040 de absorbancia.
7. El efecto antibacteriano del agua ozonizada frente a la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522 a la 48<sup>ava</sup> hora de aplicación, para la concentración de 0.4g/L aumentó la concentración con una media de 0.250 de absorbancia; Y en el caso de la concentración de 0.8g/L hubo disminución media de 0.040 de absorbancia.



## Sugerencias

1. Al vicerrector de investigación de la Universidad Andina del Cusco, continuar fomentando la investigación la cual permite seguir con el desarrollo del país y la población. Pero teniendo en cuenta las necesidades de los estudiantes ya que es relativamente costoso y demanda un buen espacio en el tiempo de los mismos.
2. A la decana de la Facultad de Ciencias de la Salud UAC, seguir ampliando y mejorando sus espacios de investigación ya que fueron de suma ayuda en la realización de este proyecto. Logrando quizá estar al alcance de más investigadores que no necesariamente sean estudiantes de la misma.
3. Al director de la Escuela Profesional De Estomatología, para darse el tiempo de fomentar a sus estudiantes a investigar *invivo* con el agua ozonizada y su efecto antibacteriano dentro de sus instalaciones.
4. A los estudiantes de Estomatología, recomendar que continúen con los estudios con agua ozonizada, sometiéndola a más experimentos con diferentes bacterias propias de la cavidad bucal. Ya que este insumo resulta muy alentador y es de muy fácil acceso.





# Bibliografía

1. Ozonoterapia como adyuvante en el tratamiento periodontal no quirurgico. Morillo L, Rodriguez J. 3, CD Mexico : s.n., 2015, Revista mexicana de periodontologia, Vol. VI, págs. 136-142.
2. A, Ramirez. Aplicación de Ozono-Terapia en Pacientes con periodontitis cronica generalizada. Murcia, España : s.n., 2015.
3. Ozonoterapia y su fundamentacion cientifica. Scwhartz A, Martinez S. 1, Barcelona : Revista espaola de ozonoterapia, 2012, Vol. II, págs. 163-198. 2174- 3215.
4. J, Alvarez. Nivel de conocimiento de la ozonoterapia en estomatologos del Municipio Playa 2015-2016. La Habana : s.n., 2016.
5. col, Aniceto A y. El ozono en periodoncia perspectivas clinicas . Brasil : Universidad federal de minas , 2016.
6. C, Escribano. Aggregatibacter Actinomycetemcomitans . Barcelona : Universidad de Barcelona, 2007. págs. 291-300.
7. Reducción bacteriana del agua ozonizada sobre actinomyces israelli. Torres A, Guillen R. 2, Quito : Revista odontologica, 2016, Vol. XVIII, págs. 12-19.
8. J, Sosa. EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE Rosmarinus Officinalis (ROMERO) Y DEL AGUA OZONIZADA SOBRE Streptococcus mutans Y Enterococcus faecalis. Chiclayo : Universidad Señor de Sipan, 2015.
9. M, Carhuayo. EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE Rosmarinus Officinalis (ROMERO) Y DEL AGUA OZONIZADA SOBRE Streptococcus mutans Y Enterococcus faecalis. Trujillo : Universidad nacional de Trujillo, 2011.
10. C, Sanchez. Eficacia de los enjuagatorios con agua ozonizada. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo : s.n., 2018.
11. J, Mosqueira A y Escaobar. EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL HIPOCLORITO. Cusco : Repositorio UAC, 2021.
12. P, Newman. Introduction to stratospheric ozone. s.l. : Todara textbook, 2005.
13. B, Mordecai. The history of ozone. Isrrael : s.n., 2008.
14. American water work assosietion. Water Treatment Plant Design. tercera. s.l. : Me Graw Hill, 1998, págs. 254-270.
15. Urban air polution. Fenger J, y col. Holanda : Dordrech, 1999.
16. Ozonation of Water and Waste. Gottchalk C, Libra J.A, Saupe A. Federal Republic Germany : WILEY-VCH, 2002.
17. Fundamentos de toxicología. D, Curtis. Barcelona : INTERAMERICANA.MCGRAW-HILL, 2003. 978-84-486-0534-6.



18. Ozone and other photochemical oxidants. Who Regional Office for Europe. 2, Copenhagen : Who Regional Office for Europe, 2000, Vol. 7.2.
19. Application of ozone in the treatment of periodontal disease. A, Srikanth. 5, s.l. : J Pharm Bioallied, 2013, págs. 89-94.
20. V, Snoeyink. Química del ozono. CD Mexico : Limusa, 1999.
21. R, Viebahn-Hänsler. The use of ozone in medicine. Alemania : ODREI, 2007.
22. A, Azarpazhooh. The application of ozone in dentistry. s.l. : J Dent, 2008. págs. 104-116. Vol. 2.
23. Dhingra K. Management of gingival inflammation in orthodontic patients with ozonated water irrigation. s.l. : Int J Dent Hyg, 2011. págs. 296-302. Vol. 9.
24. microbiological effects of gas action depending on the method and the time of application using the ozonytron. Wilczyska-Borawska M, Leszczyska K, Nowosielski C. s.l. : Acad Med Stetin, 2011, Vol. II, págs. 99-103.
25. EFECTO DEL OZONO SOBRE LA POBLACIÓN MICROBIANA DEL SUELO. Bucio C, Diaz F. Guanajuato : Universidad de Guanajuato, 2016.
26. M, Parzanese. Tecnologías para la Industria Alimentaria. alimentos argentinos. [En línea] 2016. [Citado el: 23 de marzo de 2020.] [http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/tecnologia/Ficha\\_04\\_Ozono.pdf](http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/tecnologia/Ficha_04_Ozono.pdf).
27. Asociación española de profesionales médicos en ozonoterapia. aepromo. [En línea] 2015. [Citado el: 2020 de marzo de 23.] <https://aepromo.org/vias-de-administracion/>.
28. Asociación de la ONU. water for life. [En línea] UN water, 2015. [Citado el: 2020 de marzo de 24.] <https://www.un.org/waterforlifedecade/pdf/waterforlifebklt-s.pdf>.
29. Wiki water. wikiwater. [En línea] [Citado el: 2020 de marzo de 24.] <https://wikiwater.fr/e18-el-tratamiento-del-agua-por>.
30. R, Perez. Carbotecnia. [En línea] 2015. [Citado el: 24 de marzo de 2020.] [carbotecnia.info/lamparas-ultravioleta-rayos/](http://carbotecnia.info/lamparas-ultravioleta-rayos/).
31. Aplicación de la ozonización en el tratamiento de aguas: descripción y funcionamiento. Grupo de Ing Química de la Universidad de Alcalá. Alcalá : Universidad de Alcalá, 2008.
32. Ozonation of bromide-containing waters: kinetics of formation of hypobromous acid and bromate. W, Haag. s.l. : Environ, 1983, Vol. 17, pág. 261.
33. Ozone in Water Treatment: Application and Engineering. Langlais B, Reckhow D.A. Chelsea : Lewis publisher, 1991.
34. Brewer W.A. Reptacernent for tite Dobson Spectrophotometer. Seattle : Pure Appl Oeaphys, 1973. págs. 919-927. Vol. 16.
35. E, Sanchez. Manual de procedimientos de medición de ozono residual. Juitepec : Morelos, 2004.



36. Microbiota de los ecosistemas de la cavidad bucal. Cruz S, Diaz P, Arias D. 1, La Habana : Revista Cubana de Estomatología , 2017, Vol. 54. 1561-297X.
37. Aggregatibacter actinomycetemcomitans Leukotoxin: from Threat to Therapy. S, Kachlany. 6, New Jersey : Department of Oral Biology, 2010, Vol. 89.
38. Microbiología Estomatológica Fundamentos y guía práctica. M, Negroni. 2, Buenos Aires : Medica Panamericana, 2009.
39. Sriraman P, Mohanraj R, Neelakantan P. Aggregatibacter actinomycetemcomitans in Periodontal disease. s.l. : Research Journal of Pharmaceutical, 2014.
40. Aggregatibacter Actinomycetemcomitans. M, Raja. 8, s.l. : Journal of Clinical and Diagnostic Research, 2014, Vol. 8, págs. 13-16.
41. The heat-modifiable outer membrane protein of Actinobacillus actinomycetemcomitans. ME, Wilson. 59, s.l. : Infect Immun, 1991, págs. 2505-2507.
42. Virulence factors in Porphyromonas Gingivalis. Holt SC, Kesavalu L, Walker S. s.l. : GENCO SA, 2000, Vol. 20, págs. 169-238.
43. Characterization of leukotoxin from a clinical strain of Actinobacillus Actinomycetemcomitans. Diaz R, Ghofaili L.A, Patel J. s.l. : Microb Patog, 2006, Vol. 40, págs. 48-55.
44. Analysis of the Actinobacillus Actinomycetemcomitans leukotoxin gene. E.T, Lally. 26, s.l. : J Biol Chem, 1989, Vol. 264.
45. Xynogala L, Volgina A, Dirienzo JM. 2, s.l. : Oral Microbiol Immunol, 2009, Vol. 24.
46. Microbiología Estomatológica . M, Negroni. 2, Buenos Aires : Medica Panamericana, 2009.
47. Horz HP, Conrads G. Diagnosis and anti-infective therapy of Periodontitis. s.l. : Exper Rev Anti Infect, 2007.
48. M, Madigan. Brock Biología de los Microorganismos. s.l. : Pearson, 2003. 9788490352793.
49. K, Piatkin. Microbiología . s.l. : Alzofora, 2008. 1968.
50. F, Schlehel. Microbiología general. s.l. : Omega, 1997. 84-282-1030-6.
51. Microbiología. P, Harley Klein. Vol. 7, págs. 110-115.
52. "Desinfección". Calidad y tratamiento del agua. Charles, H. New York : Fredrick W. Pontius, 2017.
53. Sader, H. Scielo. [En línea] 2016. [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182002019100002.S0716-10182002019100002](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182002019100002.S0716-10182002019100002) .
54. Peres, J. upo.es. [En línea] 2019. <https://www.upo.es/depa/webdex/quimfis/docencia/quimbiotec/FQpractica4.pdf>.



55. Espectrofometría: Espectros de absorción y. Abril, N. Cordoba : Rabanales, 2016, Vol. v.
56. Medición de la absorbancia óptica de. C, Vidal L y Vargas. 1, Medellin : Ciencia y tecnica, 2014, Vol. 19. 0122-1701.
57. reproduccion y crecimiento bacteriano. ucv.ve. [En línea] 2018. [http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_farmacia/catedraMicro/08\\_Tema\\_6\\_crecimiento.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_6_crecimiento.pdf).
58. atcc.org. [En línea] 2010. <https://www.atcc.org/>.
59. B, Dickson. BD Brain Heart Infusion (BHI) Agar . [En línea] 2013. <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8800.PA-255003.08> .
60. K, Bauber. BD. [En línea] 2017. <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8774.PA-254032.08>.
61. INOCULOS BACTERIANOS. E, Tobia C y Vargas. 1, Costa Rica : Nutricion Animal, 2000, Vol. 6.
62. Valdivieso, A. iagua.es. iagua.es. [En línea] 2016. <https://www.iagua.es/respuestas/que-es-agua-ozonizada>.
63. ANTIBACTERIANOS DE ACCIÓN SISTÉMICA. PARTE I. M, Cué M y Morejon. 4, Cuba : Med Gen Integr, 2018, Vol. 14.
64. L, Saenz. DLE. diccionario de la lengua española. [En línea] 2009. <https://dle.rae.es/tiempo>.
65. R, Sampieri. Metodologia de la investigacion . Mexico DF : McGraw-Hill, 2003.
66. Question pro. Question pro. [En línea] 2020. <https://www.questionpro.com/blog/es/investigacion-experimental/#:~:text=La%20investigaci%C3%B3n%20experimental%20es%20cualquier,miden%20como%20sujeto%20del%20experimento..>
67. Tesis y masters. Tesis y masters. [En línea] 2019. <https://tesisymasters.com.ar/investigacion-descriptiva-ejemplos/>.
68. S, Rico. Prospectiva un método de investigación para diseñar escenarios. La Plata Argentina : IRI, 2014.
69. Estudios transversales. J, Maguiña. Lima : Revista de la facultad de medicina humana, 2021, Vol. 21.
70. INVESTIGACIÓN DE UN FENÓMENO NATURAL: ¿ESTUDIOS IN. Lorena B, Lombarte M. 3, Rosario, Argentina : OSTEOL, 2013, Vol. 9.
71. C, Apaza. Obtencion de agua ozonizada envasada por laboratorios La cooper. Arequipa : s.n., 2015.
72. Sampieri R, Colladod C y Lucio P. Metodologia de la investigación. Mexico D.F : McGraw-Hill, 2003.



**INSTRUMENTO**

**UNIVERSIDAD ANDINA DEL CUSCO  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA**

<b>TESIS:</b>	Efecto antibacteriano <i>invitro</i> del agua ozonizada frente a la cepa de <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522 - Cusco, 2022																	
<b>INVESTIGADOR</b>	Br. Rodrigo Alejandro Delgado Tupa																	
<b>LUGAR:</b>	Laboratorio de Ciencias Básicas– Sala de investigación N°3 Microbiología																	
<b>EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL H2O3 A CONCENTRACIONES DE 0.4 g/l y 0.8 g/l</b>																		
<b>LECTURA POR ESPECTROFOTOMETRÍA A DENSIDAD OPTICA DE 550 nm</b>																		
	<b>H2O3 a 0.4 g/L</b>									<b>H2O3 a 0.8g/L</b>								
	<b>B</b>	<b>C+</b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>	<b>M5</b>	<b>M6</b>	<b>M7</b>	<b>B</b>	<b>C+</b>	<b>M8</b>	<b>M9</b>	<b>M10</b>	<b>M11</b>	<b>M12</b>	<b>M13</b>	<b>M14</b>
<b>HORA 0</b>																		
<b>HORA 1</b>																		
<b>HORA 3</b>																		
<b>HORA 6</b>																		
<b>HORA 24</b>																		
<b>HORA 48</b>																		



## Validación del instrumento

### VALIDACION DE INSTRUMENTOS

#### I. DATOS GENERALES:

1.1. Título del trabajo de investigación: "Efecto antibacteriano *in vitro* del agua ozonizada frente a la cepa de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Cusco - 2021".

1.2. Nombre del instrumento de evaluación: Hoja de registro.

1.3. Investigador: Bach. Rodrigo Alejandro Delgado Tupa.

#### II. DATOS DEL EXPERTO:

2.1 Nombres y Apellidos: Mayday Stasey Soto Alvarez.

2.2 Especialidad:

- Máster en Análisis Biológico y Diagnóstico de Laboratorio
- Segunda Especialidad en Laboratorio de Análisis Clínicos y Biológicos.

2.3 Lugar y Fecha: Cusco, 12 de octubre del 2021.

2.4 Cargo e Institución donde labora: Bióloga, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

COMPONENTE	INDICADORES	CRITERIOS	Deficiente 0-20 %	Regular 21-40 %	Bueno 41-60 %	Muy Bueno 61-80 %	Excelente 81-100%
Forma	1.REDACCIÓN	Los indicadores e ítems están redactados considerando los elementos necesarios					X
	2.CLARIDAD	Está formulado con un lenguaje apropiado.					X
	3.OBJETIVIDAD	Está expresado en conducta observable.					X
Contenido	4.ACTUALIDAD	Es adecuado al avance de la ciencia y la tecnología.					X
	5.SUFICIENCIA	Los ítems son adecuados en cantidad y claridad.					X
	6.INTENCIONALIDAD	El instrumento mide pertinentemente las variables de investigación.					X
Estructura	7.ORGANIZACIÓN	Existe una organización lógica.					X
	8.CONSISTENCIA	Se basa en aspectos teóricos científicos de la investigación.					X
	9.COHERENCIA	Existe coherencia entre los ítems, indicadores, dimensiones y variables					X
	10.METODOLOGÍA	La estrategia responde al propósito del diagnóstico.					X

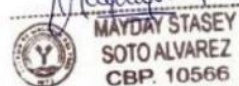
#### III. OPINION DE APLICABILIDAD:

El instrumento para recoger la información es asertivo en todos sus aspectos

#### IV. PROMEDIO DE VALORACIÓN:

#### V. LUEGO DE REVISADO EL INSTRUMENTO:

- Procede a su aplicación.  
 Debe corregirse.

  
  
MAYDAY STASEY  
SOTO ALVAREZ  
CBP. 10566



**VALIDACION DE INSTRUMENTOS**

**I. DATOS GENERALES:**

**1.1.** Título del trabajo de investigación: *“Efecto antibacteriano invitro del agua ozonizada frente a la cepa de Aggregatibacter Actinomycetemcomitans- Cusco, 2021”.*

**1.2.** Nombre del instrumento de evaluación: Hoja de registro.

**1.3.** Investigador: Bach. **Rodrigo Alejandro Delgado Tupa**

**II. DATOS DEL EXPERTO:**

2.1 Nombres y Apellidos: Blas Ovidio Coanqui Sinchiroca

2.2 Especialidad: Biólogo

2.3 Lugar y Fecha: Cusco, 16 de septiembre del 2021

2.4 Cargo e Institución donde labora: Biólogo C.S Wanchaq

COMPONENTE	INDICADORES	CRITERIOS	Deficiente 0-20 %	Regular 21-40 %	Bueno 41-60 %	Muy Bueno 61-80 %	Excelente 81-100%
Forma	1.REDACCIÓN	Los indicadores e ítems están redactados considerando los elementos necesarios					X
	2.CLARIDAD	Está formulado con un lenguaje apropiado.					X
	3.OBJETIVIDAD	Está expresado en conducta observable.					X
Contenido	4.ACTUALIDAD	Es adecuado al avance de la ciencia y la tecnología.					X
	5.SUFICIENCIA	Los ítems son adecuados en cantidad y claridad.					X
	6.INTENCIONALIDAD	El instrumento mide pertinentemente las variables de investigación.					X
Estructura	7.ORGANIZACIÓN	Existe una organización lógica.					X
	8.CONSISTENCIA	Se basa en aspectos teóricos científicos de la investigación.					X
	9.COHERENCIA	Existe coherencia entre los ítems, indicadores, dimensiones y variables					X
	10.METODOLOGIA	La estrategia responde al propósito del diagnóstico.					X

**III. OPINION DE APLICABILIDAD:**

El instrumento es viable para la aplicación del proyecto

**IV. PROMEDIO DE VALORACIÓN: 19**

**V. LUEGO DE REVISADO EL INSTRUMENTO:**

Procede a su aplicación.

Debe corregirse.





**VALIDACION DE INSTRUMENTOS**

**I. DATOS GENERALES:**

**1.1.** Título del trabajo de investigación: *“Efecto antibacteriano invitro del agua ozonizada frente a la cepa de Aggregatibacter Actinomycetemcomitans- Cusco, 2021”.*

**1.2.** Nombre del instrumento de evaluación: Hoja de registro.

**1.3.** Investigador: Bach. **Rodrigo Alejandro Delgado Tupa**

**II. DATOS DEL EXPERTO:**

2.1 Nombres y Apellidos: Jhoel Delgado Salazar

2.2 Especialidad: Mgt. Blgo. Recursos Hídricos y Medio Ambiente

2.3 Lugar y Fecha: Cusco, 23 de marzo del 2022

2.4 Cargo e Institución donde labora: Grupo GIZA S.A.C (Especialista)

COMPONENTE	INDICADORES	CRITERIOS	Deficiente 0-20 %	Regular 21-40 %	Buena 41-60 %	Muy Buena 61-80 %	Excelente 81-100%
Forma	1.REDACCIÓN	Los indicadores e ítems están redactados considerando los elementos necesarios					X
	2.CLARIDAD	Está formulado con un lenguaje apropiado.					X
	3.OBJETIVIDAD	Está expresado en conducta observable.					X
Contenido	4.ACTUALIDAD	Es adecuado al avance de la ciencia y la tecnología.					X
	5.SUFICIENCIA	Los ítems son adecuados en cantidad y claridad.					X
	6.INTENCIONALIDAD	El instrumento mide pertinentemente las variables de investigación.					X
Estructura	7.ORGANIZACIÓN	Existe una organización lógica.					X
	8.CONSISTENCIA	Se basa en aspectos teóricos científicos de la investigación.					X
	9.COHERENCIA	Existe coherencia entre los ítems, indicadores, dimensiones y variables					X
	10.METODOLOGIA	La estrategia responde al propósito del diagnóstico.					X

**III. OPINION DE APLICABILIDAD:**

El instrumento es viable para la aplicación del proyecto

**IV. PROMEDIO DE VALORACIÓN: 18**

**V. LUEGO DE REVISADO EL INSTRUMENTO:**

Procede a su aplicación.

Debe corregirse.

  
Jhoel Delgado Salazar  
BIOLOGO  
C.B.P 9017

Sello y firma del experto.





# ANEXOS



# ANEXO N<sup>0</sup>1

## MATRIZ DE CONCISTENCIA



PROBLEMA	OBJETIVO	HIPOTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA
<p>En la actualidad se le está considerando a la enfermedad periodontal y a las bacterias que la provocan tales como la <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i>, como una de las grandes causas de pérdida prematura de piezas dentales, es por ello que surge la necesidad de implementar nuevos insumos como el agua ozonizada, para poder mejorar el pronóstico de la enfermedad periodontal.</p> <p><b>Formulación del problema</b></p> <p>¿Cuál será el efecto antibacteriano <i>invitro</i> del agua ozonizada frente a la cepa de <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522?</p> <p><b>Problemas específicos</b></p> <p><b>P.E.1</b> ¿Cuál será la curva de crecimiento bacteriano de la cepa de <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522?</p> <p><b>P.E.2</b> ¿Cuál será el efecto antibacteriano del agua ozonizada a la concentración de 0.40g/L y 0.80g/L frente a la cepa de <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522 a la hora 1 de aplicación?</p> <p><b>P.E.3</b> ¿Cuál será el efecto antibacteriano del agua</p>	<p><b>Objetivo general</b></p> <p>Determinar el efecto antibacteriano in vitro del agua ozonizada frente a la cepa de <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522</p> <p><b>Objetivos específicos</b></p> <p><b>O.E.1</b> Determinar la curva de crecimiento bacteriano de la cepa de <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522</p> <p><b>O.E.2</b> Determinar el efecto antibacteriano del agua ozonizada a la concentración de 0.40 g/L y 0.80g/L frente a la cepa de <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522 a la hora 1 de aplicación.</p> <p><b>O.E.3</b> Determinar el efecto antibacteriano del agua ozonizada a la concentración de 0.40g/L y 0.80g/L frente a la cepa de <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522 a la hora 3 de aplicación.</p> <p><b>O.E.4</b> Determinar el efecto antibacteriano del agua ozonizada a la concentración</p>	<p><b>H1</b> La aplicación del agua ozonizada a las concentraciones de 0.4 y 0.8 g/L tendrá efecto antibacteriano in vitro en los cultivos con cepa de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522.</p> <p><b>H0</b> La aplicación del agua ozonizada a las concentraciones de 0.4 y 0.8 g/L no tendrá ningún efecto antibacteriano in vitro en los cultivos con cepa de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522.</p> <p><b>2.4.1 Hipótesis específicas</b></p> <p><b>H<sub>2</sub></b> El agua ozonizada a la concentración de 0.4 y 0.8g/L presentará efecto antibacteriano sobre la cepa de <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522 a la hora 1 de aplicación.</p> <p><b>H<sub>3</sub></b> El agua ozonizada a la concentración de 0.4 y 0.8g/L presentará efecto antibacteriano sobre la cepa de <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i></p>	<p><b>Variable dependiente</b></p> <p>Agua ozonizada</p> <p><b>Variable independiente</b></p> <p>Efecto antibacteriano</p> <p><b>Co-variable</b></p> <p>Tiempo</p>	<p>La presente investigación tiene un enfoque cuantitativo y que se procedió experimentalmente y con la ayuda de un instrumento el cual será la base para la recolección de datos obtenidos.</p> <p><b>La investigación será:</b></p> <p><b>Experimental</b> por que se desarrolló en un laboratorio controlado que dará validez a la investigación.</p> <p><b>Descriptiva</b> porque en todo momento se estarán explicando los procedimientos de la investigación.</p> <p><b>Prospectiva</b> porque la recolección de datos se hará según vayan ocurriendo los hechos.</p> <p><b>Transversal</b> porque toda la investigación ocurrirá en un tiempo y espacio específico.</p> <p><b>Invitro</b> Ya que todos los procedimientos se llevarán en un área controlada y supervisada.</p> <p><b>Población y muestra</b></p> <p>Estará comprendida por 6 placas Petri, 10 tubos de ensayo tapa rosca y 32 cubetas de cuarzo todas estas inoculadas con <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522</p> <p><b>Técnicas</b></p> <p>Se realizo una curva de crecimiento bacteriano con ayuda de las cubetas de cuarzo, incubadora y espectrofotómetro. La cual nos será de ayuda para poder conocer el verdadero desarrollo de la</p>



<p>ozonizada a la concentración de 0?40g/L y 0.80g/L frente a la cepa de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> a la hora 3 de aplicación?</p> <p><b>P.E.4</b> ¿Cuál será el efecto antibacteriano del agua ozonizada a la concentración de 0?40g/L y 0.80g/L frente a la cepa de <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522 a la hora 6 de aplicación?</p> <p><b>P.E.5</b> ¿Cuál será el efecto antibacteriano del agua ozonizada a la concentración de 0?40g/L y 0.80g/L frente a la cepa de <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522 a la hora 24 de aplicación?</p> <p><b>P.E.6</b> ¿Cuál será el efecto antibacteriano del agua ozonizada a la concentración de 0?40g/L y 0.80g/L frente a la cepa de <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522 a la hora 48 de aplicación?</p>	<p>de 0.40g/L y 0.80g/L frente a la cepa de <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522 a la hora 6 de aplicación.</p> <p><b>O.E.5</b> Determinar el efecto antibacteriano del agua ozonizada a la concentración de 0.40g/L y 0.80g/L frente a la cepa de <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522 a la hora 24 de aplicación.</p> <p><b>O.E.6</b> Determinar el efecto antibacteriano del agua ozonizada a la concentración de 0.40g/L y 0.80g/L frente a la cepa de <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522 a la hora 48 de aplicación.</p>	<p>ATCC 29522 a la hora 3 de aplicación.</p> <p><b>H4</b> El agua ozonizada a la concentración de 0.4 y 0.8g/L presentará efecto antibacteriano sobre la cepa de <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522 a la hora 6 de aplicación.</p> <p><b>H5</b> El agua ozonizada a la concentración de 0.4 y 0.8g/L presentará efecto antibacteriano sobre la cepa de <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522 a la hora 24 de aplicación.</p> <p><b>H6</b> El agua ozonizada a la concentración de 0.4 y 0.8g/L presentará efecto antibacteriano sobre la cepa de <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522 a la hora 48 de aplicación.</p>	<p>cepa en el medio. Por lo cual se hicieron lecturas con un lapso de tiempo de 58 horas.</p> <p>Una vez realizada la curva se prosiguió a realizar aplicación del agua ozonizada para poder determinar su efecto antibacteriano para lo cual se usaron dos concentraciones de esta 0.4g/L y 0.8g/L para ser medidos en espectrofotómetro a 550 nm en un lapso de 48 horas.</p>
--	--	---	---



**ANEXO N°2**  
**ACEPTACION DE LA FACULTAD**  
**PARA DESARROLLAR**  
**PROYECTO DE TESIS**



Cusco, 24 de marzo de 2022

**PROVEÍDO N° 119- 2022-FCSA-UAC**

**REFERENCIA:** Oficio N° 034-2022-Lab.CB-FCSalud-UAC

**A:** **DRA. HERMINIA NAVEDA**  
DIRECTORA DEL LABORATORIO DE CIENCIAS BASICAS

**VISTO:** El documento que antecede en referencia, se otorga la autorización para el ingreso y uso de los Laboratorios de Ciencias Básicas al Sr. Bach. RODRIGO ALEJANDRO DELGADO TUPA, de la Escuela Profesional de Estomatología, para su proyecto de investigación: "EFECTO ANTIBACTERIANO IN-VITRO DEL AGUA OZONIZADA FRENTE A LA CEPA DE *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* - CUSCO, 2021".

Así mismo, se adjunta el voucher de pago enviado por el recurrente correspondiente a la Escala 3, con las especificaciones de trabajo y uso de equipamiento, materiales y reactivos detalladas en el TUPA 2022 de la Universidad Andina del Cusco.

Se solicita a su despacho hacer las coordinaciones con el recurrente para el uso de los laboratorios de acuerdo al horario establecido y cumpliendo obligatoriamente todas las medidas de bioseguridad, protocolos aprobados y aforos bajo responsabilidad, así como también cumplir con todos los protocolos de ingreso ya establecidos:

1. Contar con la vacunación completa (en el caso de mayores de 40 años – tres dosis), Declaración jurada con firma y huella digital de no presentar sintomatología alguna, declaración jurada para terceros (traer los documentos en mención impresos para evitar aglomeraciones) que deberá ser entregada en físico en la puerta de ingreso al local de Qollana.
2. Mascarilla KN95 ó 02 mascarillas quirúrgicas, en su defecto una mascarilla quirúrgica y una de tela (de acuerdo a los protocolos de bioseguridad).
3. Equipo de protección personal (EPP).

**Regístrese**.....

Atentamente,  
UNIVERSIDAD ANDINA DEL CUSCO  
Facultad de Ciencias de la Salud  
  
Msc. Yanet Chazar Vargas  
DEGANA

FCS/YCV/amcfm  
C.c. – archivo.



**ANEXO N°3**  
**PROVEIDO CON ACEPTACION DE**  
**PERNOCTACION EN LA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA**  
**SALUD PARA ELABORACION DE**  
**CURVA DE CRECIMIENTO**



Universidad  
Andina  
del Cusco

Facultad de Ciencias de la Salud

"AÑO DEL FORTALECIMIENTO DE LA SOBERANÍA NACIONAL"

Cusco, 20 de abril de 2022



PROVEÍDO N° 166- 2022-FCSA-UAC

REFERENCIA: Oficio N° 049-2022-Lab.CB-FCSalud-UAC  
FICHA SINTOMATOLÓGICA  
DECLARACIÓN JURADA PARA TERCEROS

A: DRA. HERMINIA NAVEDA CAHUANA  
DIRECTORA DE LABORATORIO DE CIENCIAS BÁSICAS

**VISTO:** Los documentos que anteceden en referencia, se otorga la autorización al Bach. Rodrigo Alejandro Delgado Tupa de la Escuela Profesional de Estomatología, que se encuentra realizando su proyecto de tesis de investigación intitulado "Efecto antibacteriano in vitro del agua ozonizada frente a la cepa de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Cusco, 2022"; en la Sala de Investigación III del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de los Laboratorios de Ciencias Básicas, haciendo extensivo dicha autorización para la permanencia del Bach Rodrigo Alejandro Delgado Tupa, desde el día miércoles 20 hasta el día viernes 22 comprendiendo los horarios diurnos y nocturnos para la evaluación experimental del proyecto, en coordinación y bajo responsabilidad del especialista en laboratorio Blgo. Lugó Miranda Barriga:

Horarios	Miércoles 20	Jueves 21	Viernes 22
00:00 – 01:00			
01:00 – 02:00			
02:00 – 03:00			
03:00 – 04:00			Bach. Rodrigo Delgado
04:00 – 05:00			
05:00 – 06:00		Bach. Rodrigo Delgado	
06:00 – 07:00			
07:00 – 08:00			
08:00 – 09:00			Blgo. Lugó Miranda Bach. Rodrigo Delgado
09:00 – 10:00			
10:00 – 11:00			
11:00 – 12:00	Blgo. Lugó Miranda Bach. Rodrigo Delgado		
12:00 – 13:00		Blgo. Lugó Miranda Bach. Rodrigo Delgado	
13:00 – 14:00			
14:00 – 15:00			
15:00 – 16:00			
16:00 – 17:00			
17:00 – 18:00			
18:00 – 19:00			
19:00 – 20:00	Bach. Rodrigo Delgado	Bach. Rodrigo Delgado	
20:00 – 21:00			
21:00 – 22:00			
22:00 – 23:00			
23:00 – 24:00			

Profl. de la Cultura, Cusco 08006  
San Jerónimo – Qollana  
Central Telefónica: + 51 985 997 738  
fcs@uandino.edu.pe



Universidad  
Andina  
del Cusco

Facultad de Ciencias de la Salud

"AÑO DEL FORTALECIMIENTO DE LA SOBERANÍA NACIONAL"



El cumplimiento de todas las medidas de bioseguridad, protocolos aprobados y aforos es obligatorio y bajo responsabilidad y deben de cumplir con:

1. Presentar su cartilla de vacunación con la 3ra dosis (de no tener alguna dosis deberá presentar su prueba antigénica "negativa" con una vigencia de 5 días de antigüedad a la fecha de ingreso).
2. Presentar su ficha sintomatológica y la declaración jurada, las cuales se adjuntan al presente correo para que lo llenen, firmen y dejen en portería del Campus de Qollana al momento de su ingreso.
3. El ambiente en el que desarrollarán la actividad deberá permanecer en condiciones adecuadas de ventilación
4. Todos los asistentes deberán presentarse y usar en todo momento sus dobles barbijos quirúrgicos o una KN95, alcohol en gel.

Regístrese.....

Atentamente  
UNIVERSIDAD ANDINA DEL CUSCO  
Facultad de Ciencias de la Salud  
  
Yancy Osorio Barriga  
Especialista





# **ANEXO N<sup>0</sup>4**

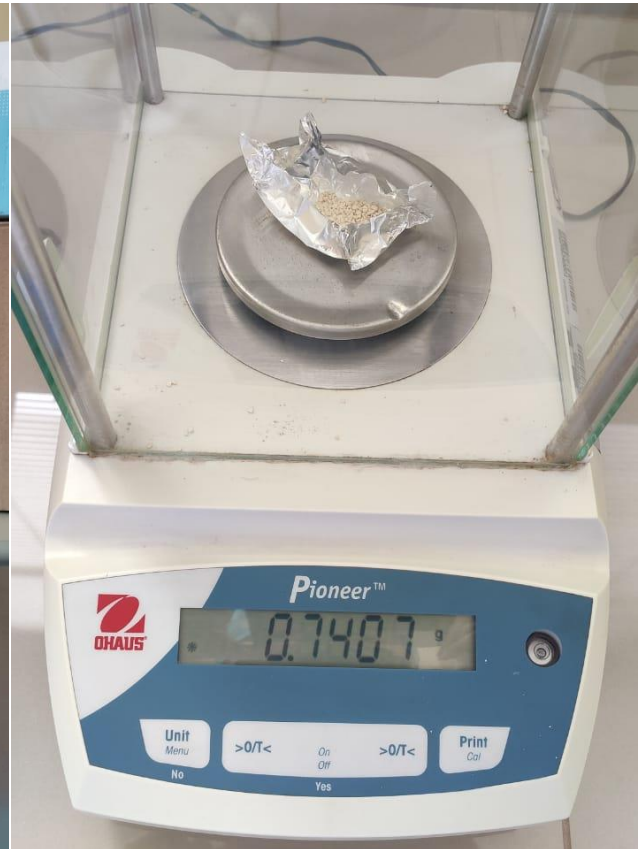
## **REGISTRO FOTOGRÁFICO**



Esterilización de materiales



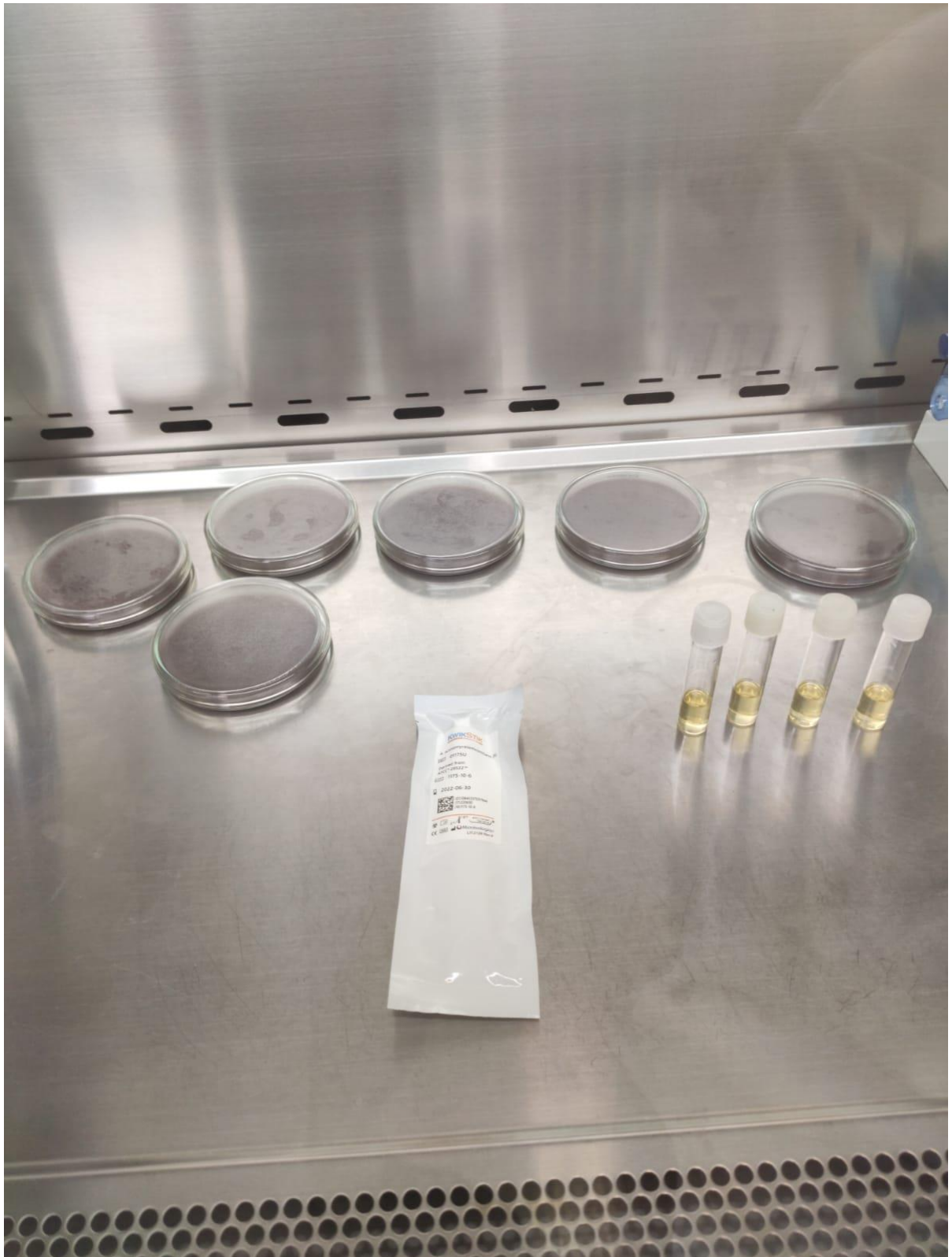
Calibración de equipos



Preparación de medios de cultivo



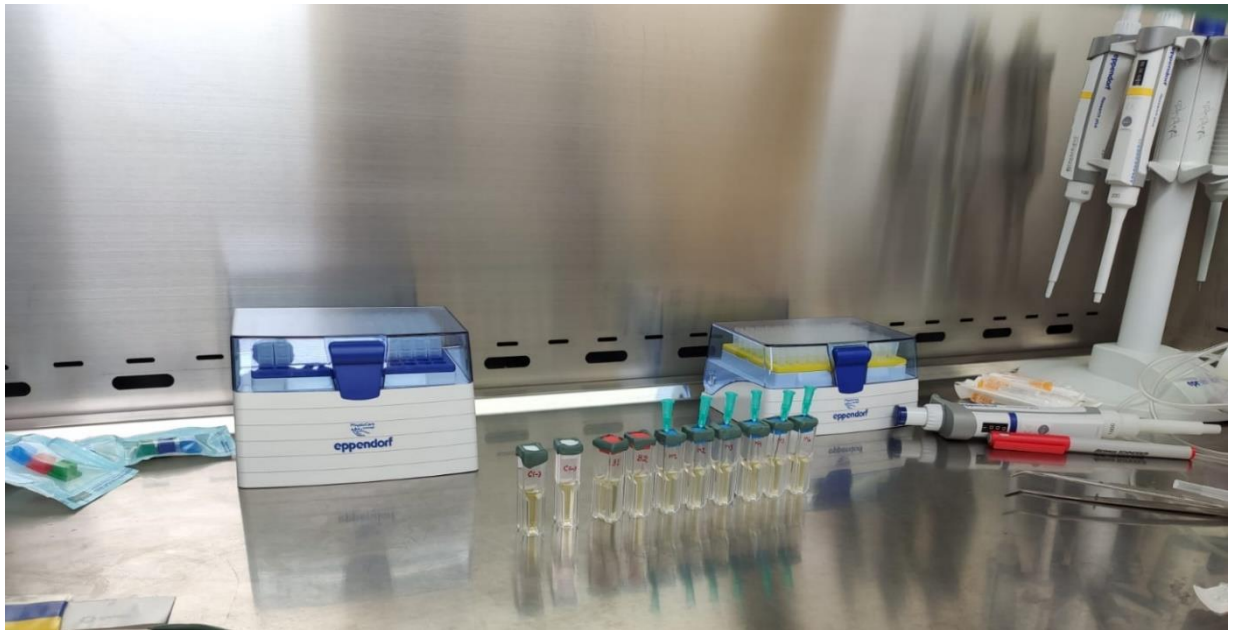
Esterilización de los medios de cultivo



Reanimación de la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522



Incubación de la cepa de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* ATCC 29522



Curva de crecimiento bacteriano

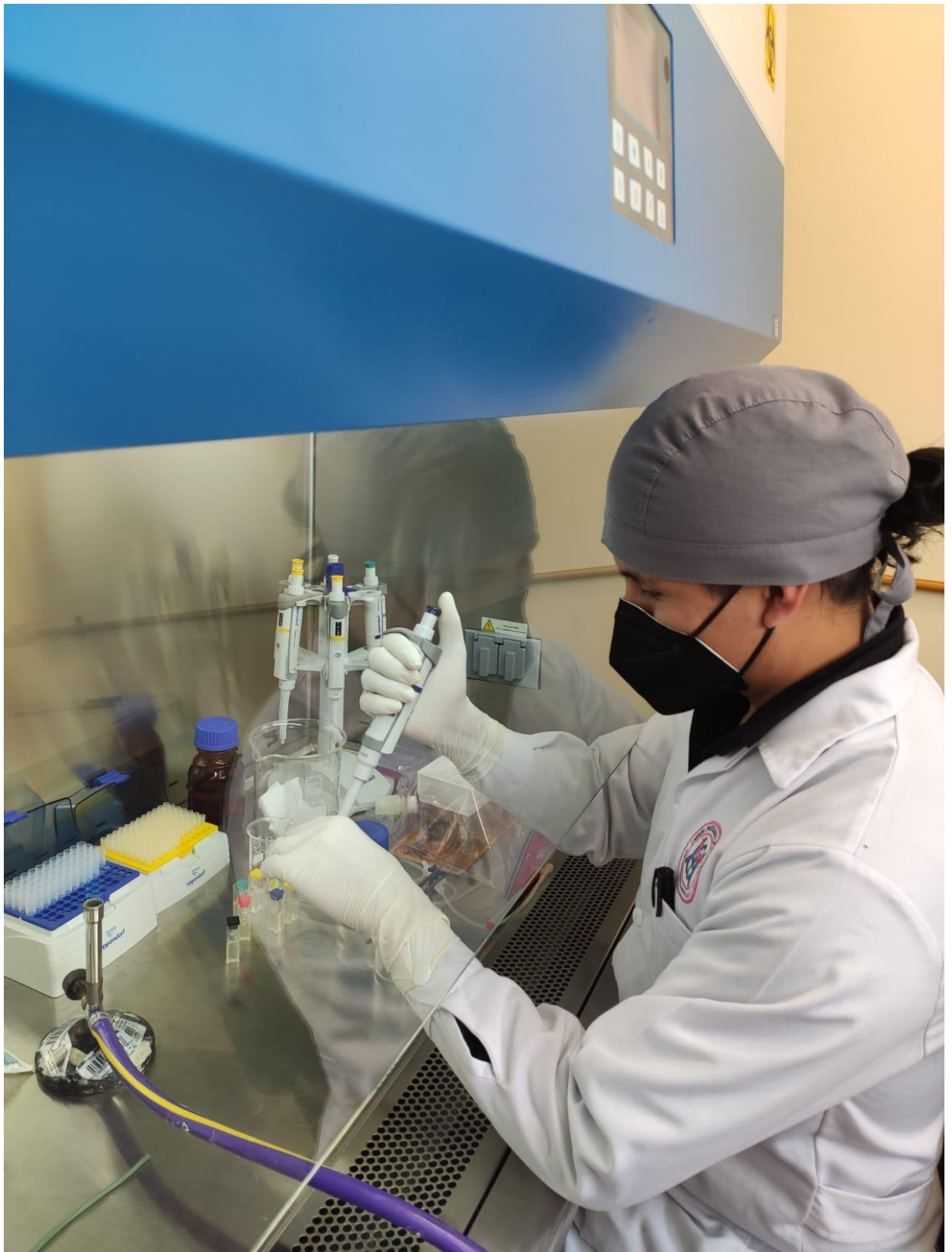


Obtención del agua ozonizada

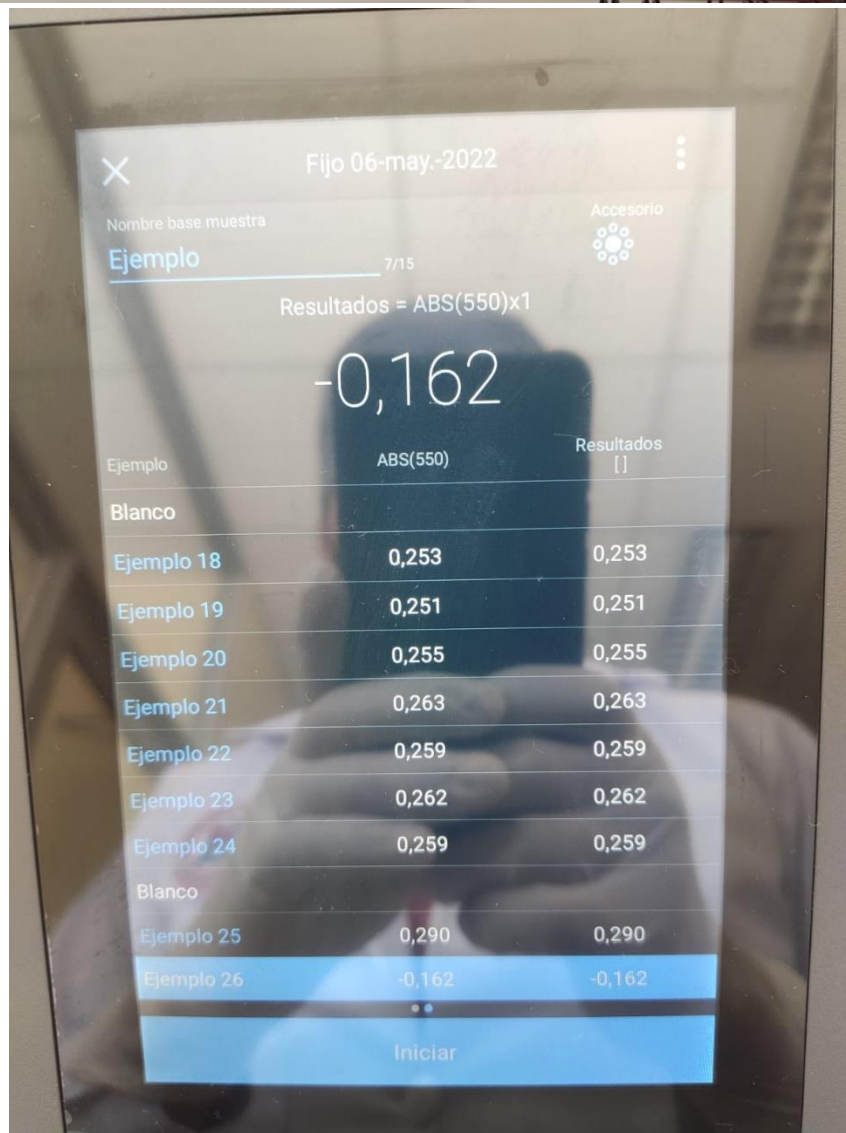
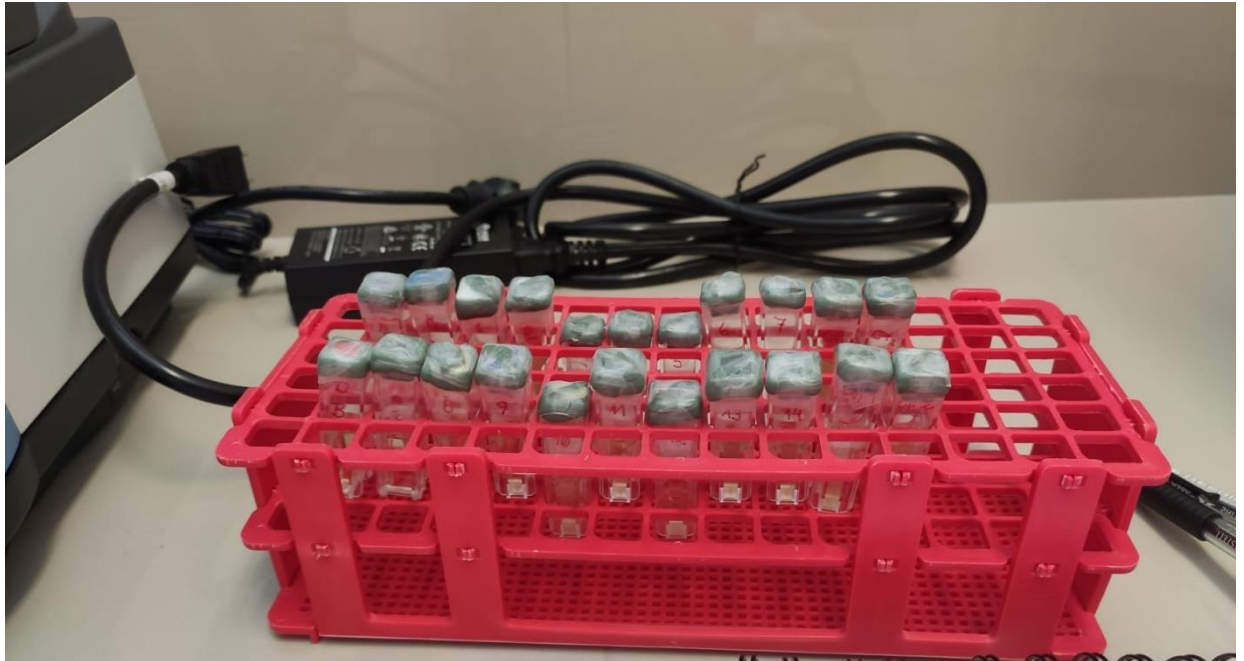


Medición de las concentraciones de Ozono





Preparación de las cubetas para aplicación del agua ozonizada



Lecturas del efecto antibacteriano del agua ozonizada