



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA

MAESTRÍA EN ENDODONCIA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA  
SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE  
INFECCIONES ENDODÓNTICAS**

Autor:

**M.E. KAREN MINERVA LÓPEZ LARA**

Tesis presentada para optar por el título de Maestro en Endodoncia

---

Agosto 2024, Maestría en Endodoncia, UASLP, México.

Directora..... MsC. Ana María González Amaro

Codirectora ..... Dra. María Verónica Méndez González



**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA  
SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE  
INFECCIONES ENDODÓNTICAS**

Autor:

**M.E. KAREN MINERVA LÓPEZ LARA**

Tesis presentada para optar por el título de Maestro en Endodoncia

---

Agosto 2024, Maestría en Endodoncia, UASLP, México.

Directora..... MsC. Ana María González Amaro

Profesor- Investigador

Maestría en Endodoncia

Facultad de Estomatología, UASLP

Codirectora .....Dra. María Verónica Méndez González

Profesor- Investigador

Maestría en Endodoncia

Facultad de Estomatología, UASLP

**Evaluación del efecto antimicrobiano de la ozonoterapia sobre microorganismos aislados e identificados en infecciones endodónticas by Karen Minerva López Lara is licensed under [CC BY-ND 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nd/4.0/)**



## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por darme todo en la vida. Por mantenerme saludable, fuerte, entusiasta y con la posibilidad de tener metas cada vez más grandes.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONACYT) por financiar parte de mi formación como estudiante de posgrado.

A mi institución educativa, por abrirme sus puertas durante ocho años, por darme la oportunidad de especializarme en el área que más me apasiona, permitiéndome adquirir las herramientas necesarias para completar mi realización personal y profesional.

A mis maestros, por inspirarme y generarme admiración, me permitieron visualizar el profesionista que anhelo ser a futuro. Les agradezco por confiar en mí y entregarme con paciencia los conocimientos que ustedes tuvieron que generar en base a la experiencia.

A mi asesora de tesis, por realizar con dedicación este último proyecto en su carrera como docente de la Facultad de Estomatología. Deseo que todos los años de trabajo que ha cosechado le brinden frutos en esta nueva etapa de su vida y le agradezco por permitirme cerrar su estancia con broche de oro.

## DEDICATORIAS

A mis padres, por educarme con amor y valores, por apoyarme a lo largo de todo mi trayecto estudiantil, por alentarme a incursionar en una nueva aspiración académica, por la paciencia que tuvieron al ver que el vuelo para alcanzar mis metas era lento pero constante, por enseñarme a ser perseverante y a trabajar duro por lo que anhelo, por los consejos y el cariño que me transmiten todos los días. Este también es su triunfo, ya que ninguno de mis éxitos hubiera sido posible sin ustedes.

A mis hermanos, porque una vida sin su compañía sería más que solitaria. Le agradezco a Dios por haberme entregado dos ejemplos de lucha y superación. Ustedes siempre serán mi hogar.

A Adán, por complementarme con todas las cualidades de las cuales carezco, por crecer y madurar conmigo, por siempre buscar el progreso tomándome de la mano, por apoyarme y ser una de las piezas fundamentales en la culminación de mis logros.

A Luna, por enseñarme lo que es el amor incondicional. No hay lugar más seguro en el mundo que estar contigo, ojalá pudieras ser eterna.

**“Tus problemas pueden convertirse en inaudibles ruidos de fondo detrás de las ruidosas claras voces de los que te aman y aprecian”- Taylor Swift.**

# EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS

Autor:

**M.E. KAREN MINERVA LÓPEZ LARA**

Maestría en Endodoncia

Facultad de Estomatología

Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Agosto 2024

---

**Objetivo:** Evaluar la técnica de ozonoterapia en la eliminación de microorganismos provenientes de infecciones endodónticas.

**Metodología:** Se tomaron 25 muestras de dientes con diagnóstico de necrosis pulpar y diente previamente tratado según la Asociación Americana de Endodoncia para obtener microorganismos presentes en infecciones endodónticas primarias y secundarias. Se realizó la adaptación y esterilización de un equipo de ozonoterapia de precio accesible, así como la obtención de un cultivo puro de cada microorganismo sembrado para su identificación con técnica convencional que incluye la identificación macroscópica por medio del microscopio estereoscópico, identificación microscópica por medio de la tinción de gram en el microscopio óptico e identificación enzimática por medio de las pruebas API. Se preparó una escala de McFarland de 0.5 de cada uno de los microorganismos, los cuales fueron expuestos al ozono en estado líquido y gaseoso en un tiempo de 120 s, 100 µL de la solución ozonizada fue sembrada en placas de CDC anaeróbico con 5% de sangre de cordero e incubadas durante 24 h en la cámara de anaerobiosis.

**Resultados:** Se observó la erradicación y disminución de las unidades formadoras de colonias de cada microorganismo ozonizado en un tiempo de 120 s independientemente del estado del ozono aplicado.

**Conclusión:** Este estudio demostró que el ozono tiene la capacidad de suprimir la viabilidad celular de bacterias y levaduras comúnmente encontradas en infecciones endodónticas primarias y secundarias.

**Palabras clave:** Ozono, microorganismos, endodoncia, desinfección, ozonoterapia

# ÍNDICE

|                                                                 |        |
|-----------------------------------------------------------------|--------|
| INTRODUCCIÓN .....                                              | - 1 -  |
| 1. MARCO TEÓRICO .....                                          | - 2 -  |
| 1.1. Microorganismos en endodoncia: .....                       | - 2 -  |
| 1.2. Irrigación en endodoncia .....                             | - 5 -  |
| 1.3. Hipoclorito de sodio.....                                  | - 6 -  |
| 1.4. Ozono.....                                                 | - 8 -  |
| 2. JUSTIFICACIÓN .....                                          | - 23 - |
| 2.1. Pregunta de investigación .....                            | - 23 - |
| 3. OBJETIVOS .....                                              | - 24 - |
| 3.1. Objetivo general .....                                     | - 24 - |
| 3.2. Objetivos específicos .....                                | - 24 - |
| 4. HIPÓTESIS .....                                              | - 25 - |
| 5. METODOLOGÍA .....                                            | - 26 - |
| 5.1. Lugar de realización .....                                 | - 26 - |
| 5.2. Diseño del estudio.....                                    | - 26 - |
| 5.3. Tipo de estudio.....                                       | - 26 - |
| 5.4. Criterios de selección .....                               | - 26 - |
| 5.4.1. Criterios de Inclusión .....                             | - 26 - |
| 5.4.2. Criterios de Exclusión .....                             | - 26 - |
| 5.4.3. Criterios de Eliminación .....                           | - 27 - |
| 5.5. Definición conceptual y operacional de las variables ..... | - 27 - |
| 5.5.1. Variables Independientes .....                           | - 27 - |
| 5.5.2. Variables Dependientes.....                              | - 28 - |

|                                                 |        |
|-------------------------------------------------|--------|
| 5.5.3. Grupos de estudio .....                  | - 28 - |
| 5.6. Consideraciones Éticas.....                | - 29 - |
| 5.7. TÉCNICA O FASE EXPERIMENTAL.....           | - 31 - |
| 6. RESULTADOS.....                              | - 41 - |
| 6.1. Estandarización del dispositivo .....      | - 41 - |
| 6.2. Identificación de los microorganismos..... | - 41 - |
| 6.3. Resultados de la prueba de ozono.....      | - 64 - |
| 7. DISCUSIÓN .....                              | - 87 - |
| 8. CONCLUSIONES .....                           | - 94 - |
| 8.1. PERSPECTIVAS.....                          | - 94 - |
| 9. REFERENCIAS.....                             | - 95 - |

## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                                                     |        |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Tabla 1. Bacterias identificadas en infecciones endodónticas según Siqueira en el 2003 .....                        | - 3 -  |
| Tabla 2. Resultados tinción gram.....                                                                               | - 42 - |
| Tabla 3. Prevalencia de microorganismos .....                                                                       | - 63 - |
| Tabla 4. Microorganismos utilizados y cantidad de colonias presentes posterior a la ozonoterapia durante 120 s..... | - 85 - |

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

|                                                                       |        |
|-----------------------------------------------------------------------|--------|
| Gráfica 1. Prevalencia de microorganismos .....                       | - 64 - |
| Gráfica 2. Número de colonias posterior a la ozonificación 120 s..... | - 86 - |

## INTRODUCCIÓN

La terapia endodóntica exitosa es aquella donde se emplean las herramientas necesarias para la desinfección, conformación y obturación tridimensional del sistema de conductos radiculares. Durante décadas se han empleado diferentes herramientas de irrigación para lograr la más adecuada y minuciosa asepsia del conducto principal y accesorios.

El hipoclorito de sodio (NaClO) es considerado la solución irrigante estándar de oro en endodoncia. Sin embargo, durante una extrusión tiene propiedades tóxicas al entrar en contacto con los tejidos perirradiculares, provocando la oxidación del tejido circundante, hemólisis, ulceración, destrucción de fibroblastos, células endoteliales y la prevención de la migración de neutrófilos. Por lo que se debe tener extremo cuidado al momento de la irrigación, especialmente en pacientes con ápice abierto o con presencia de reabsorción dentinaria; En esto casos, utilizar un sistema de irrigación seguro y eficaz, le dará al clínico la confianza de trabajar sin riesgos, y con la certeza de que se habrá eliminado de forma adecuada el tejido contaminado de bacterias.

Una nueva alternativa es la aplicación de ozono en el cuidado bucal y surge como una modalidad de tratamiento en la endodoncia que tiene un papel eficaz en el tratamiento de las enfermedades orales, pudiendo reaccionar con compuestos orgánicos e inorgánicos. Sus potentes efectos bactericidas, antiinflamatorios y analgésicos se han utilizado ampliamente en el campo de la medicina, incluyendo la odontología. Debido a esto, el objetivo de este proyecto es elaborar la adaptación de un sistema de ozonoterapia para evaluar el efecto antimicrobiano del ozono sobre microorganismos aislados e identificados de infecciones endodónticas.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Microorganismos en endodoncia:

La infección bacteriana del sistema de conductos radiculares ocurre cuando la pulpa esta necrótica o fue extirpada para un tratamiento previo. Aunque se han detectado más de 700 especies bacterianas en infecciones endodónticas, un grupo seleccionado de 20 a 30 especies se detecta con frecuencia y puede considerarse como el microbiota central. Las especies anaerobias obligadas son más abundantes en las comunidades bacterianas intrarradiculares de los dientes con periodontitis apical primaria, mientras que tanto los anaerobios facultativos dominan las comunidades en la periodontitis apical postratamiento.(1)

Las bacterias identificadas en infecciones endodónticas mediante análisis molecular y de cultivo se dividen en seis grupos bacterianos o filos de la siguiente manera: *Actinobacterias*, *Fusobacterias*, *Proteobacterias*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Spirochaetes* (Tabla 1). Siqueira y col., en el 2003 menciona que una recopilación de los datos mostrados en su laboratorio sobre el uso de métodos genéticos moleculares para la identificación microbiana en 100 casos de infecciones endodónticas primarias ha revelado que las especies de los tres últimos filos son mucho más prevalentes. La lista de supuestos patógenos endodónticos cambia con frecuencia y se expande a medida que se describen nuevas especies o antiguas son renombradas.(2)

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS  
AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”

**Tabla 1. Bacterias identificadas en infecciones endodónticas según Siqueira en el 2003**

| <i>Spirochaetes</i>     | <i>Fusobacteria</i>  | <i>Actinobacteria</i>    | <i>Firmicutes</i>         | <i>Proteobacteria</i>        | <i>Bacteroidetes</i>  |
|-------------------------|----------------------|--------------------------|---------------------------|------------------------------|-----------------------|
| <i>Treponema</i>        | <i>Fusobacterium</i> | <i>Actinomyces</i>       | <i>Streptococcus</i>      | <i>Neisseria</i>             | <i>Prevotella</i>     |
| <i>denticola</i>        | <i>nucleatum</i>     | <i>Israelii</i>          | <i>oralis</i>             | <i>mucosa</i>                | <i>intermedia</i>     |
| <i>socranskii</i>       | <i>periodonticum</i> | <i>gerencseriae</i>      | <i>mitis</i>              | <i>Elkenella</i>             | <i>nigrescens</i>     |
| <i>malophilum</i>       | <i>Leptotrichia</i>  | <i>naeslundii</i>        | <i>sanguis</i>            | <i>corrodens</i>             | <i>denticola</i>      |
| <i>amylovorum</i>       | <i>buccalis</i>      | <i>odontolyticus</i>     | <i>anginosus</i>          | <i>Acinetobacter</i>         | <i>melaninogenica</i> |
| <i>medium</i>           |                      | <i>radicidentis</i>      | <i>constellatus</i>       | <i>baumannii</i>             | <i>oris</i>           |
| <i>lecithinolyticum</i> |                      | <i>Propionibacterium</i> | <i>intermedius</i>        | <i>Pseudomonas</i>           | <i>loeschei</i>       |
| <i>pectinovorum</i>     |                      | <i>propionicus</i>       | <i>mutans</i>             | <i>aeruginosa</i>            | <i>buccae</i>         |
| <i>vincentii</i>        |                      | <i>acnes</i>             | <i>sobrinus</i>           | <i>Escherichia</i>           | <i>oralis</i>         |
|                         |                      | <i>Slackia</i>           | <i>Enterococcus</i>       | <i>coll</i>                  | <i>tanneriae</i>      |
|                         |                      | <i>exigua</i>            | <i>faecalis</i>           | <i>Actinobacillus</i>        | <i>dentalis</i>       |
|                         |                      | <i>Eggerthella</i>       | <i>Gemella</i>            | <i>actinomycetemcomitans</i> | <i>Porphyromonas</i>  |
|                         |                      | <i>lenta</i>             | <i>morbilorum</i>         | <i>Haemophilus</i>           | <i>gingivalis</i>     |
|                         |                      | <i>Cryptobacterium</i>   | <i>Lactobacillus</i>      | <i>aphrophilus</i>           | <i>endodontalis</i>   |
|                         |                      | <i>curtum</i>            | <i>cateniforme</i>        | <i>Campylobacter</i>         | <i>Capnocytophaga</i> |
|                         |                      | <i>Corynebacterium</i>   | <i>Eubacterium</i>        | <i>gracilis</i>              | <i>gingivalis</i>     |
|                         |                      | <i>matruchotii</i>       | <i>nodatum</i>            | <i>rectus</i>                | <i>ochracea</i>       |
|                         |                      | <i>Rothia</i>            | <i>sulci</i>              | <i>showae</i>                | <i>Tannerella</i>     |
|                         |                      | <i>dentocariosa</i>      | <i>saphenum</i>           |                              | <i>forsythensis</i>   |
|                         |                      | <i>Olsenella</i> spp.    | <i>minutum</i>            |                              |                       |
|                         |                      | <i>Atopobium</i> spp.    | <i>Mogibacterium</i>      |                              |                       |
|                         |                      |                          | <i>timidum</i>            |                              |                       |
|                         |                      |                          | <i>neglectum</i>          |                              |                       |
|                         |                      |                          | <i>Peptostreptococcus</i> |                              |                       |
|                         |                      |                          | <i>anaerobius</i>         |                              |                       |
|                         |                      |                          | <i>micros</i>             |                              |                       |
|                         |                      |                          | <i>Fingoldia</i>          |                              |                       |
|                         |                      |                          | <i>magna</i>              |                              |                       |
|                         |                      |                          | <i>Filifactor</i>         |                              |                       |
|                         |                      |                          | <i>alocis</i>             |                              |                       |
|                         |                      |                          | <i>Pseudoramibacter</i>   |                              |                       |
|                         |                      |                          | <i>alactolyticus</i>      |                              |                       |
|                         |                      |                          | <i>Dialister</i>          |                              |                       |
|                         |                      |                          | <i>pneumosintes</i>       |                              |                       |
|                         |                      |                          | <i>Veillonella</i>        |                              |                       |
|                         |                      |                          | <i>parvula</i>            |                              |                       |
|                         |                      |                          | <i>Selenomonas</i>        |                              |                       |
|                         |                      |                          | <i>sputigena</i>          |                              |                       |
|                         |                      |                          | <i>Centipeda</i>          |                              |                       |
|                         |                      |                          | <i>periodontii</i>        |                              |                       |
|                         |                      |                          | <i>Staphylococcus</i>     |                              |                       |
|                         |                      |                          | <i>epidermidis</i>        |                              |                       |
|                         |                      |                          | <i>aureus</i>             |                              |                       |

Según Blome y col., en el 2008 la densidad de población bacteriana en infecciones primarias varía de  $10^3$  a  $10^8$  células por conducto, mientras que Munson y col., en el 2002 mencionan que el número medio de especies bacterianas por conducto varía de 10 a 30 especies, sin embargo, los estudios han sugerido que estos números puede alcanzar una media de casi 100 especies o incluso más. Entre estas encontramos varios gramnegativos (*Fusobacterium nucleatum*, especies de *Dialister*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, especies de *Prevotella*, *Tannerella forsythia*, especies de *Treponema*) y bacterias grampositivas (*Parvimonas micra*, *Filifactor alocis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Olsenella uli*,

*especies de Actinomyces, especies de Streptococcus, especies de Propionibacterium y Cutibacterium acnes*).(1)

En infecciones secundarias se ha demostrado una alta variabilidad en la estructura de las comunidades bacterianas intraconducto, las infecciones suelen ser mixtas, pero los estudios muestran una microbiota menos diversa que los dientes con enfermedad primaria, especialmente aquellos con obturaciones radiculares aparentemente adecuadas, por el contrario, los dientes con tratamientos previos inadecuados presentan a su vez una riqueza bacteriana similar a los dientes con infecciones primarias. Según Antunes y col., en el 2015 los niveles bacterianos totales en conductos previamente tratados asociados con periodontitis apical oscilan entre  $10^3$  y  $10^7$  equivalentes celulares. Gomes y col., en el 2008 mencionan que *Enterococcus faecalis* es una de las especies más prevalentes encontradas en los conductos de dientes con periodontitis apical postratamiento. En términos de abundancia relativa esta especie puede representar una amplia gama de menos de 1% al 100% del total de bacterias debido a su capacidad para sobrevivir bajo duras condiciones ambientales. Por otro lado, también podemos encontrar otros microorganismos en periodontitis apical postratamiento como son especies de *Streptococcus*, especies de *Actinomyces*, *C. acnes*, *P. alactolyticus*, *Arachnia propionica* (*Propionibacterium propionicum*), especies de *dialister*, *F. nucleatum*, *P. micra* y especies de *Prevotella*.(1)

Mencionando en general, los *Streptococcus* son un género de microorganismos cocos grampositivos anaerobios facultativos asociados con diferentes formas de enfermedades perirradiculares constituyendo una parte importante de la microbiota ubicada en la porción coronal del conducto radicular. En cuanto al género *Actinomyces* abarca un grupo heterogéneo de bacilos grampositivos anaerobios facultativos descritos por su interés para la microbiología endodóntica en abscesos apicales crónicos.(2,3) Referente al género *Porphyromonas* son bacilos gramnegativos anaerobios donde la especie *endodontalis* y *gingivalis* parecen jugar

un papel importante en la etiología de diferentes formas de lesiones perirradiculares, incluidos abscesos perirradiculares agudos.(2) Mencionando al género *Clostridium* son bacterias grampositivas anaeróbicas, aunque muchas especies pueden tolerar el oxígeno en diversos grados, son formadoras de endosporas y aunque son numerosas solo unas pocas de estas especies son patógenas.(4) Esta literatura es referente en cuanto a microorganismos reportados en infecciones primarias, en cuanto a infecciones secundarias los más reportados son *Candida albicans* y *Enterococcus faecalis*. Hablando específicamente del género *Candida* la especie *albicans* es la más común con una presencia de 30-45% de adultos sanos, y es el principal agente de infecciones orales por hongos. Alberti y col., en el 2021 demostraron en un metaanálisis la presencia de infección por *Candida* reportando una tasa de prevalencia 9,3% en infecciones secundarias.(5) El género *Enterococcus*, comprende microorganismos cocos grampositivos anaerobios facultativos. *Enterococcus faecalis* es más comúnmente aislado y persistente en los conductos radiculares.(6,7) Molander, Sundqvist y col., en 1998, Siqueira y col., en el 2004, y Fouad y col., en el 2005 han informado que es de particular interés en casos de periodontitis persistente.(8,9)

## **1.2. Irrigación en endodoncia**

Los microorganismos y sus derivados son la principal causa de enfermedades pulpares y perirradiculares, y en las infecciones secundarias son el primordial desencadenante de fracaso, quedando presentes después del tratamiento de endodoncia, ya que el tejido pulpar residual, las bacterias y los restos de dentina pueden persistir en las irregularidades del sistema de conductos radiculares, incluso después de una preparación mecánica meticulosa. Por lo tanto, se han recomendado varias sustancias irrigantes para su uso en combinación con la preparación del conducto, conduciendo a la eliminación de sustancias infectadas y la prevención de infecciones postoperatorias. La preparación del conducto radicular agranda el conducto principal promoviendo la eliminación mecánica de la dentina

infectada y al mismo tiempo favorece la penetración de los irrigantes a través de los conductos laterales, mejorando el proceso de descontaminación. Sin embargo, un porcentaje significativo de la superficie del conducto radicular permanece intacto, independientemente de los instrumentos utilizados. Tales áreas no alcanzadas pueden proteger a los microorganismos de los protocolos de desinfección del conducto radicular.(1,2,3)

Las soluciones desinfectantes o irrigantes intraoperatorias tienen tres funciones principales: lubricar durante la instrumentación, eliminar los restos de barrillo dentinario y disolver la biopelícula bacteriana y los tejidos pulpaes restantes. Las tres funciones son cruciales para lograr un conducto radicular permeable y libre de niveles patógenos de microorganismos.(13)

Los irrigantes endodónticos deben tener una actividad antimicrobiana efectiva, pero también deben exhibir relativamente poca citotoxicidad hacia el tejido mucoso periapical y oral, además si estos aportan una acción antiinflamatoria podría ser ventajoso especialmente en casos de periodontitis apical persistente.(8)

Para mejorar el éxito del tratamiento, nuevos protocolos de desinfección como el uso de irrigación ultrasónica pasiva, terapia fotodinámica y técnicas de riego continuo, se han tratado de implementar. Junto con estas técnicas, la terapia de ozono se ha estudiado con el objetivo de reducir la carga bacteriana y mejorar el éxito del tratamiento endodóntico. Debido a su potente acción bactericida, el ozono se ha probado como una alternativa o complemento al uso de NaClO.(14)

### **1.3. Hipoclorito de sodio**

En el año 1914, durante la Primera Guerra Mundial, Dakin introdujo el uso de la solución de hipoclorito de sodio (NaClO) en concentraciones de 0,5 al 0,6 % para la antisepsia de heridas. En 1919, Coolidge lo recomendó como irrigante, y en 1936 Walker introdujo su uso al 5% como irrigante del conducto radicular.(15)

La solución se aplica en el sistema de conductos radiculares durante la preparación mecánica y el protocolo de irrigación final en una concentración que varía del 0,5 al 5,25 %. La justificación para usar NaClO como irrigante durante el tratamiento endodóntico, se basa en su capacidad para disolver tejido pulpar vital y necrótico, su eficacia como desinfectante contra bacterias grampositivas, gramnegativas, y hongos, así como sus propiedades lubricantes. Debido a esto, el NaClO es generalmente recomendado para este procedimiento dental, es seguro y efectivo si la solución permanece dentro del sistema de conductos radiculares. Sin embargo, si entra en contacto con los tejidos blandos vitales, puede producir efectos tóxicos graves como hemólisis, ulceración y necrosis tisular. En la literatura, se han informado algunos casos de accidentes con NaClO durante el tratamiento dental, especialmente durante los procedimientos de endodoncia.(16)

Inmediatamente después de un accidente con NaClO, algunos pacientes sienten un dolor intenso y muestran hinchazón en la cara, además, debido a la vasodilatación, puede ocurrir hemorragia en el tejido intersticial (equimosis) y edema. Otros síntomas descritos incluyen úlceras en la piel, hinchazón que se expande hacia la región periorbitaria o hacia el esternón, olor a cloro en la nariz, irritación de la garganta y dificultad para respirar. Aunque en la mayoría de los casos, estos signos y síntomas se resuelven en un mes, los pacientes pueden experimentar parestesia persistente o pérdida permanente de la función sensorial cuando el accidente con NaClO infligió daño a los nervios. Los patrones de distribución típicos de la equimosis ocurren cuando NaClO ingresa al sistema venoso e involucran el ángulo de la boca, la región periorbitaria o el cuello hasta el esternón. Los factores que juegan un papel en la extrusión del irrigante apical son variables, entre las condiciones clínicas que aumentan el riesgo de extrusión del irrigante se encuentran la reabsorción de la raíz apical y un ápice abierto.(17)

En la raíz apical existe una constricción que en general es de 0,5 a 1,5 mm coronal al foramen apical, y se considera que es la parte del conducto radicular de menor

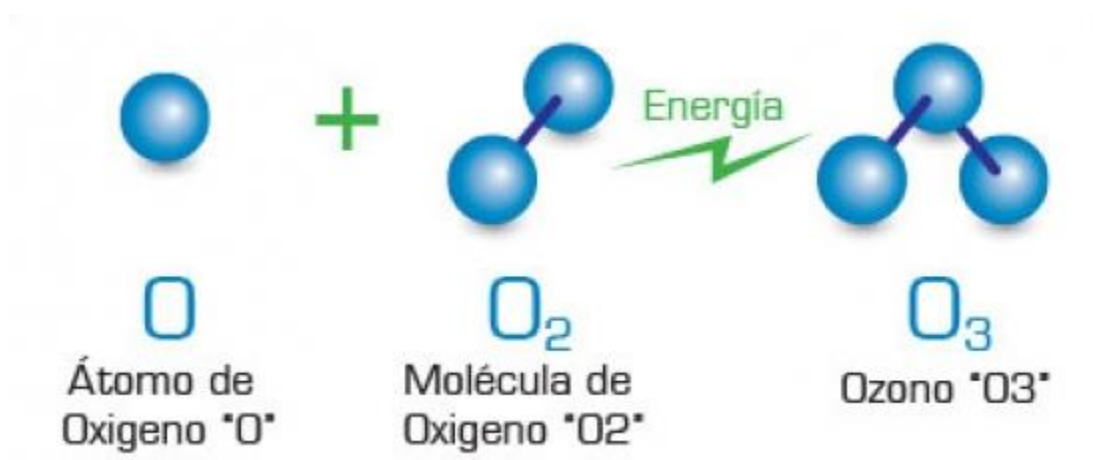
diámetro. Este es el punto de referencia más utilizado como terminación apical para dar forma, limpiar y obturar. La reabsorción de las raíces apicales asociada con la periodontitis, caries, trauma apical y la sobreinstrumentación agrandan la constricción apical, lo que da como resultado ápices abiertos.(18)

Por lo tanto, se han hecho esfuerzos para desarrollar técnicas novedosas para proporcionar desinfección y seguridad en la irrigación del sistema de conductos radiculares, el uso de la intervención del ozono en sustitución del NaClO se ha sugerido en estas condiciones clínicas por su menor citotoxicidad, y en casos de bacterias resistentes e infecciones persistentes cuando se utilizó previamente NaClO.(7,8,9)

#### **1.4. Ozono**

En 1839, Christian Friedrich Schönbein notó por primera vez la aparición de un gas con olor fuerte y lo llamó ozono, que significa emitir un olor en griego. En la década de 1930, el Dr. EA Fisch utilizó por primera vez el ozono en el tratamiento dental. En 1940 se introdujo la palabra ozono.(19)

El ozono, también llamado trióxígeno es una molécula que se encuentra en la naturaleza y consta de tres átomos de oxígeno ( $O_3$ ). El ozono es una forma energética más alta que el oxígeno atmosférico normal ( $O_2$ ), posee un peso molecular de 47,98 g/mol y es formado cuando el dioxígeno es excitado por descargas eléctricas o radiación ultravioleta.(19,21) (Figura 1).



*Figura 1. Formula química del Ozono*

La ozonoterapia se ha utilizado en medicina desde el siglo XIX, ya que posee propiedades antisépticas, oxidantes poderosas y selectivas, antimicrobianas contra bacterias, hongos, virus y protozoos, además de ser bien tolerado por los tejidos humanos. El gas ozono no tiene ningún color, pero tiene un olor acre a temperatura ambiente.(10,11,12)

La terapia con ozono se basa en la suposición de que el ozono ( $O_3$ ) se disocia rápidamente en agua y libera una forma reactiva de oxígeno que puede oxidar las células bacterianas, por lo que tiene eficacia antimicrobiana. El ozono ( $O_3$ ) se encuentra entre los oxidantes más potentes conocidos con un potencial oxidativo de 2,07 voltios, casi el doble del potencial oxidante del cloro. Existen tres sistemas para la generación de ozono: El sistema ultravioleta, el sistema de plasma frío y el sistema de descarga de corona.(19,22,24) Hay varias formas de utilizar el ozono con fines médicos: se ha recomendado para esterilizar la sangre utilizada en transfusiones previniendo la infección cruzada por VIH, en la aplicación de aceites y agua ozonizada para heridas y quemaduras, en plantas de tratamiento de agua reemplazando gradualmente al cloro, en piscinas, piscicultura, preparación de alimentos, plantas embotelladoras, secadores de manos, purificación de aire y en la desinfección de áreas médicas.(25)

En 2009, se demostró que el ozono acuoso y el ozono gaseoso esterilizan adecuadamente herramientas quirúrgicas y dentales, ampliando su uso a los campos médicos. A la luz de la pandemia de SARS-CoV-2, se volvió a evaluar la capacidad del ozono para esterilizar los respiradores N95. Se descubrió que, en concentraciones efectivas para matar el virus de la influenza, los respiradores N95 estaban adecuadamente esterilizados de contaminantes bacterianos y su tasa de filtración o integridad no se veía afectada. Además, la inclusión de ozono acuoso en un depósito de escariador ultrasónico tiene el potencial de controlar microorganismos en aerosol y posiblemente partículas virales en el aire.(26)

Si bien numerosos estudios han evaluado de forma independiente el impacto de las propiedades antimicrobianas del ozono tanto en el aire como en el agua utilizando una variedad de microorganismos, en la literatura existe un vacío en la evaluación comparativa de ambos métodos de tratamiento. Epelle y col., en el 2022 realizaron una comparativa del gas ozono y el ozono acuoso mostrando que con la ozonización acuosa, la tendencia general observable es la mejora en la eficiencia de inactivación microbiana con la duración del contacto. Esta inactivación es atribuible a la presencia de micro y nanoburbujas de ozono, que tienen un tiempo de residencia más largo en soluciones acuosas en comparación con las macroburbujas que tienden a elevarse rápidamente hasta la interfaz aire-agua y colapsar. Este tiempo de residencia más largo puede atribuirse a su mayor área interfacial gas-líquido, flotabilidad reducida y resistencia a la coalescencia. Esto se traduce en una mayor capacidad de oxidación y, a su vez, en la eficiencia de desinfección.(27)

### **Vida media del Ozono**

Bocci y col., en el 2006 mencionaron que termodinámicamente, la molécula del ozono es un compuesto altamente inestable que se descompone en oxígeno puro con una vida media corta de 40 min a 20°C, mientras que Silva y col., en el 2020 mencionaron que la vida media del ozono se altera con el cambio de temperatura. A temperatura ambiente (25°C) tiene una vida media de 15 min en el

agua, y de 2 a 3 días en el aire. Por otra parte, Vierbahn y col., en 1999 determinó la vida media del ozono en agua desionizada, agua destilada y agua bidestilada a 20 °C siendo está de 20, 80 y 600 min, respectivamente.(19,21) Mogahed y col., en el 2018 mencionaron que la vida media del  $O_3$  en agua destilada es de 20 a 30 min a 20 °C antes de volver a convertirse en molécula de oxígeno. Sin embargo, el  $O_3$  gaseoso es más estable con una vida media de aproximadamente 12 h en el aire atmosférico. La temperatura, el pH y los materiales oxidables por ozono son tres factores principales que impactan en gran medida la tasa de descomposición del  $O_3$  y su vida media.(24)

De manera que el ozono (independientemente del medio en el que se utilice) es muy inestable y vuelve a su estado natural de oxígeno con el tiempo. Si bien la temperatura y la humedad son factores clave que afectan la estabilidad del ozono en el aire, el pH, la conductividad, la temperatura, la presión y el tipo de difusor utilizado son claves en la estabilidad del Ozono en el agua. Como se mencionó anteriormente Epelle y col., en el 2022 mencionan que el tamaño de las burbujas de ozono generadas afecta la estabilidad del ozono en la fase acuosa, comparando que los métodos de burbujeo convencionales, generan burbujas más grandes y, en consecuencia, una vida media corta del ozono, por lo tanto, en su investigación era importante garantizar que el ozono se mantuviera en los niveles deseados durante la duración requerida del tratamiento, sin tener que generar ozono nuevamente. Esta estabilidad es a su vez un determinante clave de la eficacia de la desinfección, por ende, discute brevemente el papel de las nanoburbujas en la mejora de la transferencia de masa de ozono a la fase acuosa y, en consecuencia, la estabilidad para una acción antimicrobiana sostenida. (27)

### **Efecto del ozono sobre la materia orgánica**

Mediante interacciones electrófilas con sistemas aromáticos activados, tioéteres, olefinas y aminas, generando al mismo tiempo radicales hidroxilo altamente reactivos capaces de oxidar la mayoría de las moléculas orgánicas

presentes en el agua. (28) Wang y col., en el 2007 nos menciona que el ozono puede romper la estructura de la materia orgánica natural y propiciar la transformación de los compuestos de alto peso molecular en otros de bajo peso como ácidos carboxílicos, carbohidratos y aminoácidos. (29) Sin embargo, este estudio fue realizado en efluentes secundarios.

### **Efecto antimicrobiano**

La actividad antimicrobiana es el foco principal de los estudios sobre la aplicación de ozono en endodoncia. El ozono conduce a la destrucción del organismo principalmente por daño a los lípidos, glicoproteínas o determinados aminoácidos que están presentes en la membrana citoplasmática de los microorganismos, y, en segundo lugar, cambios en los contenidos intracelulares debido al efecto oxidante secundario que conduce a la pérdida de la función de las proteínas. De tal manera que el ozono actúa como un fuerte antioxidante que ejerce un efecto desinfectante al romper la membrana celular del microorganismo. Todas las funciones vitales de las bacterias se detienen después de unos segundos de aplicación de ozono. (14,16)

El efecto antimicrobiano está fuertemente asociado con el protocolo de aplicación utilizado: depende de la dosis, el tiempo y la cepa, concentraciones más altas y períodos más prolongados de aplicación de ozono permiten mejores resultados de desinfección. Se podría inferir que el ozono tiene diferentes efectos antimicrobianos según los grupos de bacterias (grampositivas y gramnegativas). La composición de las bacterias gramnegativas contiene lipopolisacáridos (LPS) en la pared celular y fosfolípidos en la membrana citoplasmática, por lo que este grupo parece más susceptible al ozono ya que su interacción se produce directamente sobre estas estructuras (Figura 2 y 3). Esto se comprueba en el estudio de Nagayoshi y col. donde se encontró que el agua ozonizada fue muy efectiva contra bacterias grampositivas y gramnegativas de tal manera que las bacterias gramnegativas, como *Porphyromonas endodontalis* y *gingivalis* son más sensibles al agua

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”

ozonizada que las bacterias grampositivas, como *Streptococcus oralis* y el hongo *Candida albicans*.(14,19)

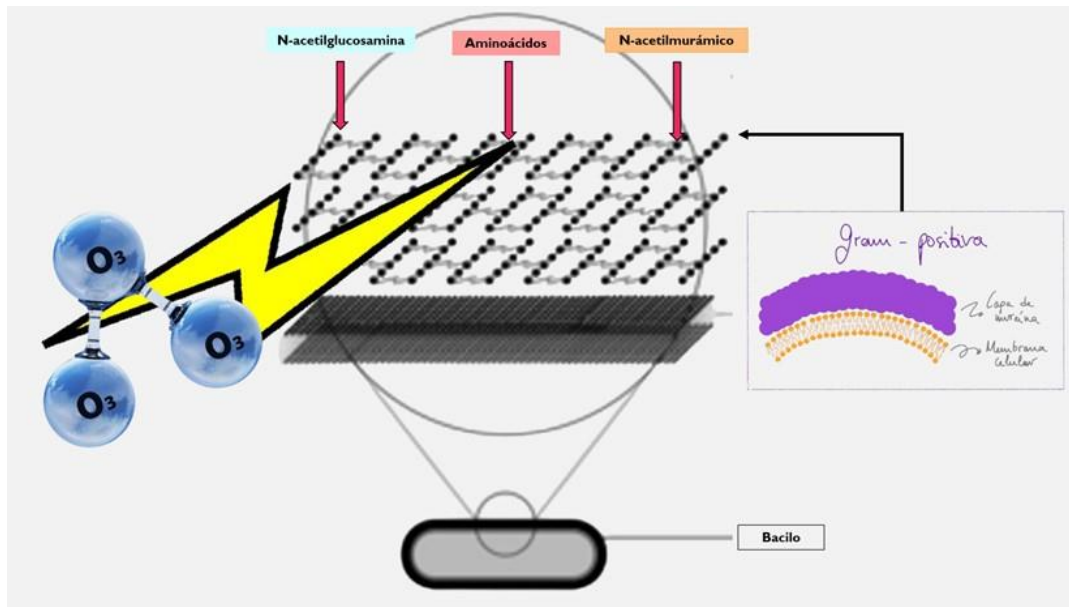


Figura 2. Estructura de las bacterias grampositivas y método de acción del ozono

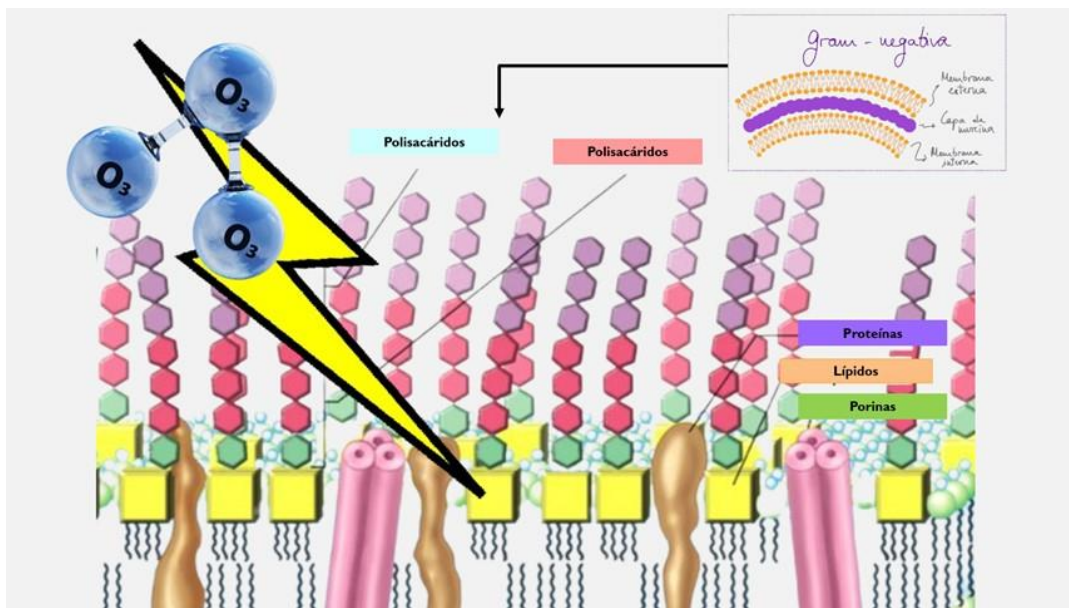
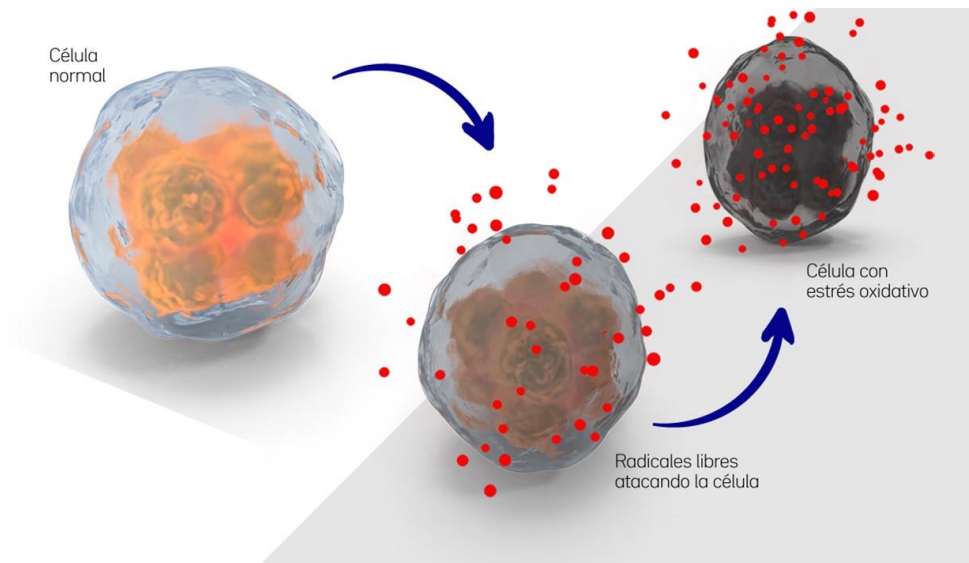


Figura 3. Estructura de bacterias gramnegativas y método de acción del ozono

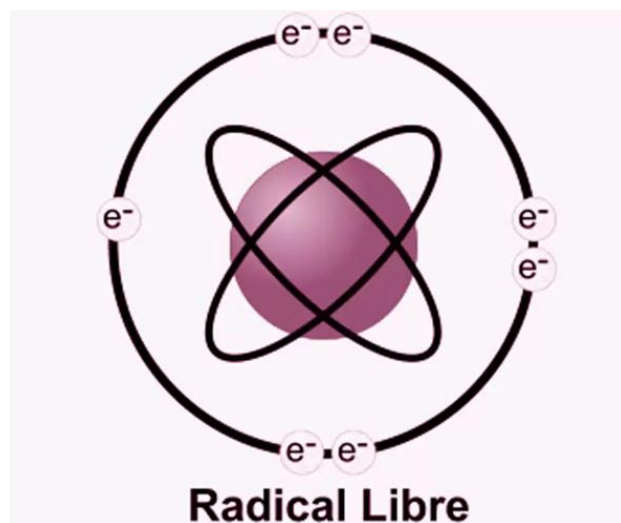
Thote y col., en el 2018 describieron la acción antimicrobiana del ozono de la siguiente manera 1. El ozono genera una reacción directa a nivel molecular cuando se libera, 2. Destruye indirectamente las bacterias por medio de la liberación de radicales libres, 3. La oxidación iniciada por ozono conducirá a la destrucción de la pared celular y la membrana citoplasmática del microorganismo, 4. Se aumentará la permeabilidad de la membrana celular permitiendo que la molécula de ozono pueda invadir fácilmente el interior de la célula, 5. El ozono oxida la glicoproteínas, los glucolípidos y bloquea las enzimas.(21)

Nogales y col., en el 2016 mencionan que una adecuada comprensión del mecanismo de acción del ozono mejora la correlación entre los resultados de los estudios y su aplicación clínica. Como variación del oxígeno, una de las mayores características del ozono es su poder oxidativo, el cual genera estrés oxidativo, siendo responsable de que las especies reactivas de oxígeno (ROS) se conviertan en radicales libres como oxígeno singlete, peróxido de hidrógeno y aniones superóxido. Debido a esta producción de radicales libres, el ozono tiene un notable efecto antimicrobiano. Los aniones de oxígeno singlete, peróxido de hidrógeno y superóxido oxidan el ácido graso poliinsaturado de la membrana de la pared celular provocando la alteración de la bacteria (Figura 4-6).(30)

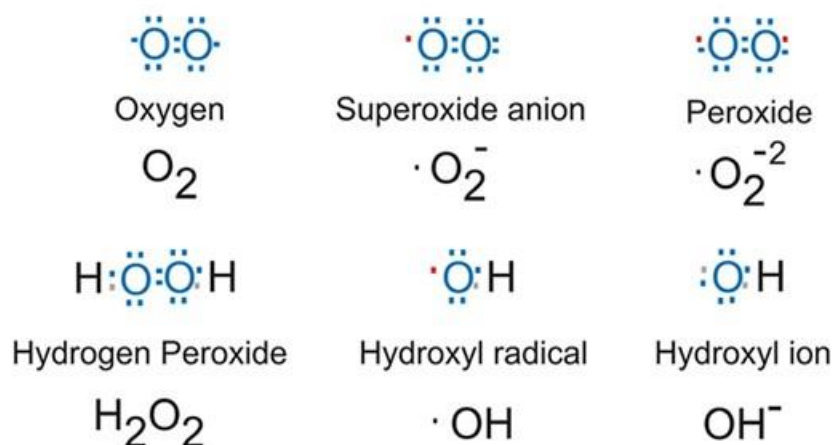
“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”



**Figura 4. Especies reactivas de oxígeno (ROS) actuando sobre la célula microbiana provocándole un daño permanente**



**Figura 5. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son generalmente moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de capa de electrones de valencia no apareada**



**Figura 6. Especies reactivas de oxígeno (ROS)**

Epelle y col., en el 2022 mencionan que la inactivación microbiana a través del ozono puede ocurrir directa o indirectamente. La inactivación directa implica la acción oxidante del ozono mismo, mientras que la activación indirecta implica la reacción de los radicales hidroxilo libres, que se generan por la descomposición del ozono. Si bien se cree que el primero es el mecanismo dominante en el aire, ambas inactivaciones tienen efectos significativos sobre la eficiencia de la desinfección resultante durante la ozonización acuosa (particularmente a un pH de 7 aproximadamente).(27)

Megahed y col., en el 2018 menciona que la concentración mínima bactericida de ozono es todavía un área de debate, citando que Hamelin y Chung, señalaban la cantidad de 1 ppm, mientras que otros estudios han recomendado valores entre 3 y 30 ppm para ozono gaseoso, por lo que es una tarea ardua el estandarizar un equipo de precio accesible a tal diversidad de concentraciones. El poder letal total del ozono ocurre principalmente durante los primeros 4 min de exposición y posteriormente comienza a descomponerse, donde la concentración acuosa se reduce a la mitad en 4 a 5 min, incluso con agua de alta calidad y bajas concentraciones de material orgánico.(24) Así mismo, Kishen y col., en el 2012 mencionaron que la duración óptima de la aplicación y la concentración de ozono gaseoso siguen siendo un tema

de debate y pueden conducir a resultados inconsistentes de su eficacia antibacteriana.(9)

### **Efecto en células eucariotas (Impacto en el ser humano)**

La molécula del ozono es bien tolerada por las células epiteliales orales y fibroblásticas gingivales humanas, teniendo una acción específica y selectiva para las células microbianas. Sin embargo, debido a que las membranas de los ojos y los pulmones están muy débilmente protegidas por enzimas antioxidantes estos tejidos requieren protección de los niveles de dosificación que se utilizan en los protocolos de ozono dental, ya que el contacto directo con el ozono causa un efecto tóxico en los pulmones además de otros efectos secundarios como tos, náuseas, vómitos, dolor de cabeza, rinitis, irritación en las vías respiratorias, y dificultad para respirar, esto debido a que el ozono es un oxidante muy fuerte, por lo que se debe eliminar el exceso de gas ozono y evitar que se escape al área clínica. En caso de intoxicación por ozono, el paciente debe colocarse en decúbito supino y puede ser tratado con vitamina E y N-acetilcisteína.(22,31,32)

Failor y col., en el 2022 nos mencionan que las exposiciones breves y controladas han demostrado una eficacia potencial en el tratamiento de infecciones y enfermedades periodontales.(26) De tal manera que al ozono en cantidades moderadas se le atribuyen efectos inmunoestimulantes, antihipóxicos, biosintéticos, cicatrízales y analgésicos (30,31,32), no obstante, en la literatura se necesitan más estudios para evaluar el efecto del ozono hacia las células humanas.

### **Uso del ozono en odontología**

El ozono tiene muchas aplicaciones en la práctica dental como en blanqueamientos, dientes hipersensibles, terapia endodóntica, remineralización de caries radicular, desinfección del agua de la unidad dental, entre otros.(21)

Barczyk y col., en el 2023 publicaron la relación de aplicaciones intraorales y extraorales de la ozonoterapia en las especialidades odontológicas, mencionando

que de manera intraoral es utilizado en odontología conservadora y preventiva, endodoncia, prótesis, periodoncia, cirugía dental e implantología y ortodoncia. Además, el ozono se utiliza no sólo en tratamientos dentales y procedimientos estéticos, sino también para desinfectar la línea de agua de la unidad y el propio consultorio dental.(33)

El ozono que se utiliza en odontología se presenta en tres formas, a saber, agua ozonizada, ozono mezclado con aceite, principalmente aceite de oliva y gas ozono. El ozono en forma gaseosa tiene la capacidad de profundizar y alcanzar la superficie de la dentina cariada, los túbulos dentinarios e incluso los conductos radiculares accesorios donde la aplicación local de antibióticos o desinfectantes no puede llegar.(31)

El ozono puede tener otras aplicaciones clínicas además de la irrigación del conducto radicular, a diferencia del hipoclorito y la clorhexidina, que no tienen usos terapéuticos en odontología; esto justificaría la inversión económica en equipos de ozonización.(34)

### **Aplicación del ozono en endodoncia**

Nairy col., en el 2006 mencionaron que el principal objetivo del tratamiento de endodoncia es erradicar o reducir esencialmente la carga microbiana del sistema de conductos radiculares que convencionalmente se logra mediante instrumentación quimicomecánica seguida de llenado del conducto para evitar la recolonización.(8) En endodoncia, la ozonoterapia se ha propuesto como medicación intraconducto o irrigante del conducto radicular.(22)

Los protocolos de desinfección que se mencionan durante la preparación del conducto radicular consisten en lubricar con aceites ozonizados, irrigar con solución ozonizada y posteriormente secar, seguido de insuflaciones de 60 s de gas ozonizado en cada conducto antes de la obturación. Según los requisitos del tratamiento, el ozono se aplica durante 60, 120, 180 o 240 s mediante un sistema

de suministro de ozono en el tratamiento de endodoncia.(31,35) Sin embargo, Hems y col., en el 2005 y Epelle y col., en el 2022 mencionan que en la literatura falta un análisis de la interdependencia entre la concentración de ozono empleada y el tiempo de exposición para diferentes clases de organismos, ya que la tendencia generalmente observada es el aumento de la eficiencia de eliminación de bacterias con el aumento de la duración de la ozonización, así como de la concentración de ozono. Epelle y col., concluyen en su artículo “Desinfección bacteriana y fúngica mediante ozonización en el aire” que un tiempo de exposición de 4 min es necesario para lograr una eliminación microbiana completa, demostrando la necesidad de mantener un equilibrio informado entre la concentración de ozono y la duración de la exposición.(36,37)

Realizando una detenida revisión de la comparativa entre el ozono y el hipoclorito de sodio Nagayoshi y col., mencionan que, en combinación con la sonicación, el ozono acuoso da una reducción similar en las unidades formadoras de colonias que NaClO al 2,5 %.(6) De igual manera, Hubbezoglu y col., en el 2014 evaluaron la acción antimicrobiana del ozono acuoso con diferentes concentraciones frente al NaClO al 5,25% durante 180 s. Según los resultados del presente estudio, una alta concentración de ozono acuoso inducida por una técnica ultrasónica ofrece la misma eficacia antibacteriana que NaClO.(21,38) Ajeti y col., en el 2018 nos dicen que una mayor concentración de ozono elimina las bacterias mucho más rápido y es 1000 veces más potente que cualquier otro agente desinfectante. Una molécula de ozono equivale a 3000-10000 moléculas de cloro, por lo que actúa contra los microorganismos unas 3500 veces más rápido. El ozono es muy eficaz en cepas resistentes a antibióticos, y su efecto aumenta en el pH ácido.(35)

Para finalizar, si mencionamos a los microorganismos con mayor resistencia en endodoncia, el ozono ha mostrado un efecto antibacteriano significativo en los conductos radiculares contra *E. faecalis* en estado planctónico. En un estudio realizado por Huth y col., en el 2006 la acción del ozono estuvo influenciada según

la especie, dosis y el tiempo de aplicación eficaz contra diferentes bacterias, incluso cuando eran organizados en biopelícula.(22,23) Hems y col., en el 2005 evaluaron el potencial del ozono en estado líquido y gaseoso como agente antibacteriano usando *Enterococcus faecalis* como especie de prueba. Llegaron a la conclusión de que el ozono en solución era antibacteriano contra la *E. faecalis* en estado planctónico después de un tratamiento de 240 s. Huth y col., en el 2009 reportaron un estudio que demostró que el ozono gaseoso y acuoso eran tan efectivos como el NaClO y la Clorhexidina, pudiendo eliminar completamente la biopelícula bacteriana dentro del conducto radicular ex vivo.(9,39) Huth y col., evaluaron la eficacia antimicrobiana del ozono acuoso y gaseoso como antiséptico alternativo contra patógenos endodónticos en suspensión y en un modelo de biopelícula. *E. faecalis*, *Candida albicans*, *Peptostreptococcus micros* y *Pseudomonas aeruginosa* se cultivaron en cultivo planctónico o en biopelículas monoespecies en conductos radiculares durante 3 semanas. Se concluyó que el ozono gaseoso y acuoso altamente concentrado era eficaz en función de la dosis y el tiempo contra los microorganismos probados en suspensión y en el modelo de prueba de biopelícula.(40)

No obstante, Bezruk y col., en el 2005 concluyeron que los resultados de los estudios sobre la eficacia del ozono contra los patógenos endodónticos han sido inconsistentes y hay poca información sobre el momento de aplicación y la concentración más apropiada.(8) Así mismo, muchos autores reconocen que la ozonoterapia debería utilizarse como enfoque complementario, a menudo en combinación con el tratamiento convencional, pero no como alternativa.(33)

### **Dispositivos de ozono en el mercado**

La aplicación de ozono en la cavidad bucal de forma segura y controlada ha sido un desafío para los fabricantes. Los tipos de equipos en el mercado han sido sistemas grandes, voluminosos y cerrados, que requieren que el punto de aplicación se encuentre sellado debido a los mayores niveles de ozono liberado durante la

aplicación. Estos sistemas además requieren períodos de descanso para evitar el sobrecalentamiento llegando a ser más costosos de mantener y reparar. Sin embargo, el trabajo pionero para llevar el ozono al consultorio ha sido invaluable para fomentar nuevos desarrollos hacia generadores de ozono más fáciles y efectivos, que permitan una gama más amplia de aplicaciones en odontología. El gas ozono administrado en la zona de tratamiento con exactitud y precisión con total seguridad mediante una máquina compacta, sencilla y elegante es uno de los avances más interesantes que se han introducido recientemente en la terapia de endodoncia.(25)

CurOzone USA Inc. (Ontario, Canadá) desarrolló HealOzone que aminut distribuye KaVo Dental (KaVo, Biberach, Alemania), para uso en odontología. Millar y Hodson compararon la seguridad de dos sistemas generadores de ozono: Ozicure (que ya no está disponible) y HealOzone, los dos equipos se compararon en función de la cantidad de ozono que se escapó durante la aplicación del gas. Los investigadores encontraron que el dispositivo Ozicure, cuando se usaba sin la succión adecuada, permitía que el ozono alcanzara concentraciones superiores a los niveles permitidos y, por lo tanto, no debía usarse. Además, se descubrió que el generador HealOzone era seguro de usar siguiendo las recomendaciones del fabricante. Otro dispositivo es la unidad de ozono dental CMU3 de Lime Technologies, la cual utiliza un flujo libre de ozono sin restricciones ya que no requiere un sello. Esto hace que sea mucho menos complicado administrar ozono a los dientes y tejidos bucales que anteriormente presentaban un desafío para sellar con HealOzone. El CMU3 utiliza una concentración más baja de ozono y, por lo tanto, un protocolo de exposición ligeramente más prolongado. Lime Technologies también vende aceites ozonizados para su uso como medicamentos para el conducto radicular.(41)

En una revisión sistemática realizada por Silva y cols., en el año 2020 nos presentan diferentes dispositivos utilizados para saber si es comparable el uso de la ozonoterapia a las técnicas químico-mecánicas convencionales que utilizan NaClO,

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS  
AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”

entre los dispositivos utilizados se encuentran HealOzone 2130 C (Kavo, Biberach, Germany), Prozone (W&H Dental Werk Burmoos GmbH, Burmoos, Austria), Ozone-generating equipment (TeknO3zone Company, Izmir, Turkey), Ozonosan photonic (Dr Hansler, Iffezheim, Germany) y healOzone Compact X4 device (Curozone GmbH, Wiesbaden, Germany), con todos estos dispositivos se concluye que el ozono reduce las bacterias de manera significativa.(19)

## **2. JUSTIFICACIÓN**

El uso de hipoclorito de sodio nos ofrece una gran cantidad de ventajas en la terapia endodóntica, sin embargo, se debe tener especial cuidado en su manejo ya que la extrusión al espacio perirradicular conlleva efectos tóxicos y dolorosos para el paciente. Condiciones clínicas como la reabsorción dentinaria y ápice abierto conducen a la ausencia de constricción apical aumentando la probabilidad de un accidente por hipoclorito por lo que se proponen nuevas modalidades de tratamiento en la desinfección del sistema de conductos radiculares, una de estas es el uso de ozono, el cual se considera seguro para el organismo, tiene efecto antimicrobiano y puede alcanzar zonas de difícil acceso.

Actualmente se ofrecen en el mercado equipos de ozono para uso odontológico, sin embargo estos aparatos llegan a ser costosos, por lo que se propone la utilización de un aparato de ozono doméstico de precio accesible que pueda ser utilizado durante la desinfección en la terapia endodóntica.

### **2.1. Pregunta de investigación**

¿La técnica de ozonoterapia será efectiva para eliminar los microorganismos provenientes de infecciones endodónticas?

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo general**

Evaluar el efecto antimicrobiano de la ozonoterapia sobre microorganismos aislados e identificados de infecciones endodónticas

#### **3.2. Objetivos específicos**

Adaptar el equipo de ozonoterapia para la elaboración de ozono puro y comprobar su desinfección

Estandarizar el tiempo de ozonoterapia empleada en la eliminación de microorganismos

Obtener, cultivar e identificar microorganismos provenientes de infecciones endodónticas

Probar la técnica de ozonoterapia en gas y en líquido sobre los microorganismos identificados

## **4. HIPÓTESIS**

Hipótesis de investigación (Hi):

La ozonoterapia es efectiva para eliminar los microorganismos provenientes de infecciones endodónticas

Hipótesis nula (Ho):

La ozonoterapia no es efectiva para eliminar los microorganismos provenientes de infecciones endodónticas

## **5. METODOLOGÍA**

### **5.1. Lugar de realización**

Clínica de la Maestría en Endodoncia de la UASLP

Laboratorio de microbiología de la Maestría en Endodoncia de la UASLP

### **5.2. Diseño del estudio**

Experimental *in vitro*

### **5.3. Tipo de estudio**

Descriptivo

Prospectivo

Transversal

### **5.4. Criterios de selección**

#### **5.4.1. Criterios de Inclusión**

- Toma de muestra de dientes con diagnóstico de pulpa no vital según la Asociación Americana de Endodoncia (Con y sin lesión periapical)
- Toma de muestra de dientes con diagnóstico de diente previamente tratado según la Asociación Americana de Endodoncia (Con y sin lesión periapical)

#### **5.4.2. Criterios de Exclusión**

- Dientes con diagnóstico de pulpa vital irreversible según la Asociación Americana de Endodoncia

### 5.4.3. Criterios de Eliminación

- Toma de muestra que al ser sembrada en agar CDC no se obtenga crecimiento
- Tomas de muestras contaminadas

## 5.5. Definición conceptual y operacional de las variables

### 5.5.1. Variables Independientes

| Variable         | Clasificación | Definición conceptual                                                                                           | Definición operacional                                                                                                        |
|------------------|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Estado del ozono | Líquido       | Gas incoloro e inestable formado por tres átomos de oxígeno disuelto en aceites vegetales o líquidos portadores | Generación de ozono en forma de gas y su colocación en un medio líquido con la finalidad de ser utilizado como antimicrobiano |

| Variable         | Clasificación | Definición conceptual                                       | Definición operacional                                                                    |
|------------------|---------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| Estado del ozono | Gas           | Gas incoloro e inestable formado por tres átomos de oxígeno | Generación de ozono en forma de gas con la finalidad de ser utilizado como antimicrobiano |

### 5.5.2. Variables Dependientes

| Variable     | Clasificación | Definición conceptual                                                                                            | Definición operacional                  | Escala            |
|--------------|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------|
| Desinfección | #UFC/mL       | Quitar a algo la infección o la propiedad de causarla, destruyendo los gérmenes nocivos o evitando su desarrollo | Se evaluará por medio del conteo de UFC | Continua de razón |

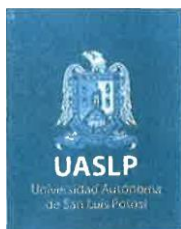
### 5.5.3. Grupos de estudio

| Grupo | Control con solución salina estéril | Ozono gaseoso<br>Número de microorganismos | Ozono líquido<br>Número de microorganismos |
|-------|-------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|
| 1     | 6                                   |                                            |                                            |
| 2     |                                     | 31                                         |                                            |
| 3     |                                     |                                            | 31                                         |

## **5.6. Consideraciones Éticas**

- A- Se envió el presente trabajo al proceso de evaluación del comité de ética en investigación de la Facultad de estomatología en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, el cual fue aprobado con la siguiente clave CEI-FE-056-023.
- B- El grado de riesgo del estudio según la ley general de salud en materia de investigación es de bajo riesgo.
- C- Se otorgó el consentimiento de cada paciente para la donación microorganismos presentes en el conducto radicular.
- D- Se realizó el manejo de residuos biológico infecciosos y ambientales de acuerdo a la norma NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002.
- E- Se realizaron todos los protocolos de bioseguridad bajo la supervisión de los asesores responsables del proyecto de acuerdo a la norma NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, especialmente los protocolos de bioseguridad referentes a la pandemia.
- F- No se contó con financiamiento, todos los materiales utilizados fueron adquiridos por la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- G- La difusión esperada de los resultados será por medio de la impresión del documento de tesis.

"EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS  
AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS"



CONITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN  
Facultad de Estomatología, UASLP

San Luis Potosí, S.L.P. 7 DE SEPTIEMBRE DE 2023

M.E. Karen Minerva López Lara  
**Maestría en Endodoncia**  
**Facultad de Estomatología, UASLP**  
P R E S E N T E

Por este conducto me dirijo a Usted en referencia a su trabajo de investigación *titulado "Evaluación de ozonoterapia en la desinfección y disgregación del biofilm en el sistema de conductos radiculares"* Asignado con la clave: **CEI-FE-056-023**.

Dicho trabajo fue evaluado en los *aspectos del marco ético-legal y bioseguridad* por los miembros del H. Comité de Ética en Investigación: M. en C. Ana María Guadalupe González Amaro, Dra. Yolanda Hernández Molinar, Dra. Norma Verónica Zavala Alonso, Dra. Claudia Edith Dávila Pérez, Dra. Rita Elizabeth Martínez Martínez, Dr. José Arturo Garrocho Rangel, M en C. Alan Martínez Zumarán y CMF Víctor Mario Fierro Serna. De dicha evaluación y de forma colegiada, el Comité ha dictaminado que su protocolo de investigación ha sido **APROBADO POR UNANIMIDAD** pudiendo llevarlo a cabo en los tiempos que Usted ha considerado necesarios para su ejecución.

El Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Estomatología se rige con la clave CONBIOÉTICA-24-CEI-001-20190213 de acuerdo con las directrices nacionales para la integración y funcionamiento de los Comités de Ética e Investigación emitidas por la Comisión Nacional de Bioética (CONBIOÉTICA).

Le solicitamos nos haga llegar los informes correspondientes del **AVANCE** de su proyecto de investigación, así como un **INFORME FINAL** para nuestro archivo, recordándole además que este proyecto podrá ser monitoreado en cualquier momento por este Comité.

ATENTAMENTE

[www.uaslp.mx](http://www.uaslp.mx)

  
**DRA. RITA ELIZABETH MARTÍNEZ MARTÍNEZ**  
**PRESIDENTE DEL H. COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN**  
**FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA, UASLP**

## 5.7. TÉCNICA O FASE EXPERIMENTAL

### Estandarización del dispositivo

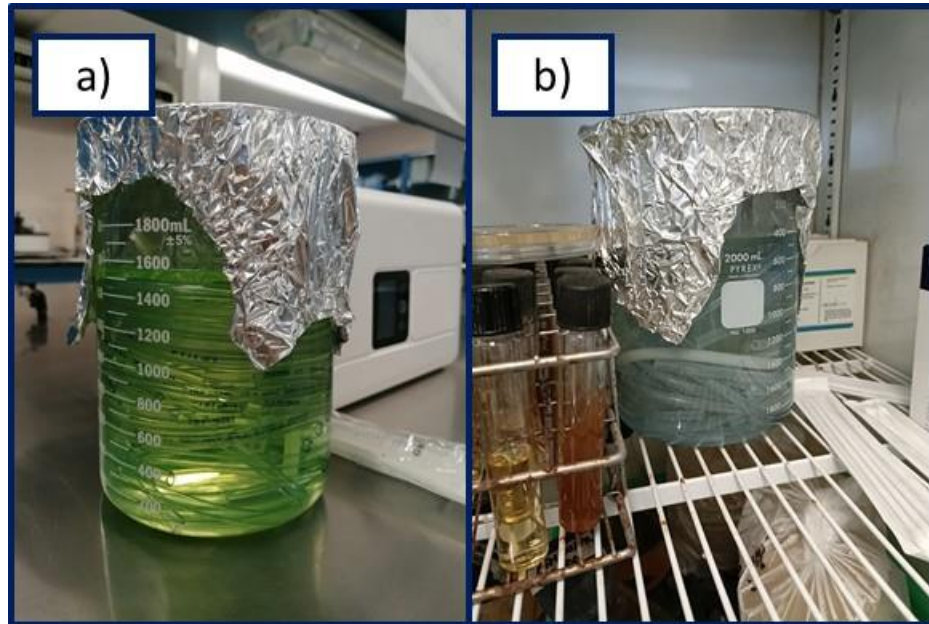
El dispositivo de ozonoterapia fue obtenido por compra en línea a precio accesible (Figura 7).



*Figura 7. Dispositivo de ozonoterapia adquirido*

Para la adaptación del equipo se cortaron mangueras de plástico a una longitud en la que se pudieran colocar en tubos de vidrio con fondo plano soportados por gradilla. Estas mangueras fueron esterilizadas en glutaraldehído al 2% durante 12 h, posterior a esto se sumergieron en solución salina estéril durante 24 h en refrigeración (Figura 8). A la entrada de aire del dispositivo de ozonoterapia se le colocó dos hojas de papel filtro Whatman circular grado 42 y 110 mm de Diámetro. Esto con la finalidad de poder filtrar los contaminantes del aire, se dejó aproximadamente 30 min funcionando el equipo para poder purgar la salida de ozono. Posteriormente, se ozonificó solución salina estéril en tiempos de 120, 180 y 240 s.

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”



**Figura 8. a) Esterilización de mangueras con glutaraldehído durante 12 h, b) Mangueras sumergidas en solución salina estéril durante 24 h en refrigeración**

De cada uno de estos tubos se tomaron 100  $\mu$ L de solución y se sembró en agar nutritivo, incubando a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 24 h en la estufa bacteriológica (Figura 9).



**Figura 9. Placas de agar nutritivo colocadas en la estufa bacteriológica**

### **Obtención de las muestras**

Para la obtención, cultivo e identificación de microorganismos provenientes de infecciones endodónticas se realizó toma de muestra de conductos radiculares en pacientes que tuvieran diagnóstico de pulpa no vital y diente previamente tratado según la Asociación América de Endodoncia (AAE) con y sin lesión periapical de la siguiente manera:

1. Se aisló el órgano dentario de la manera habitual, colocando dique de hule y grapa alrededor del diente bajando las aletas del dique, posteriormente se colocó el arco de young alrededor del dique para extender el aislamiento.
2. Se procedió a realizar el acceso en el órgano dentario.
3. Se colocó un algodón estéril dentro de la cavidad.
4. Se limpió el dique de hule del órgano dentario a la periferia realizando un círculo que se iba extendiendo conforme avanzaba utilizando un algodón estéril ligeramente embebido en hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}$ ) al 5.25% durante un min.
5. Después se limpió el dique de hule del órgano dentario a la periferia realizando un círculo que se iba extendiendo conforme avanzaba utilizando un algodón estéril ligeramente embebido en agua oxigenada ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) al 30% durante un min.
6. Para finalizar la desinfección del campo operatorio se limpió el dique de hule del órgano dentario a la periferia realizando un círculo que se iba extendiendo conforme avanzaba utilizando un algodón estéril ligeramente embebido en Tiosulfato de sodio al 10% durante un min.
7. Se retiró el algodón y se colocó una o dos gotas de medio de cultivo Tioglicolato.
8. Se colocó una punta de papel estéril dentro del conducto radicular durante un min en dientes con diagnóstico de pulpa no vital o que presentaran supuración (Esto se repitió tres veces), mientras que en dientes con diagnóstico de diente previamente

tratado con ayuda de una lima Hedstroem se tomó gutapercha presente en la obturación.

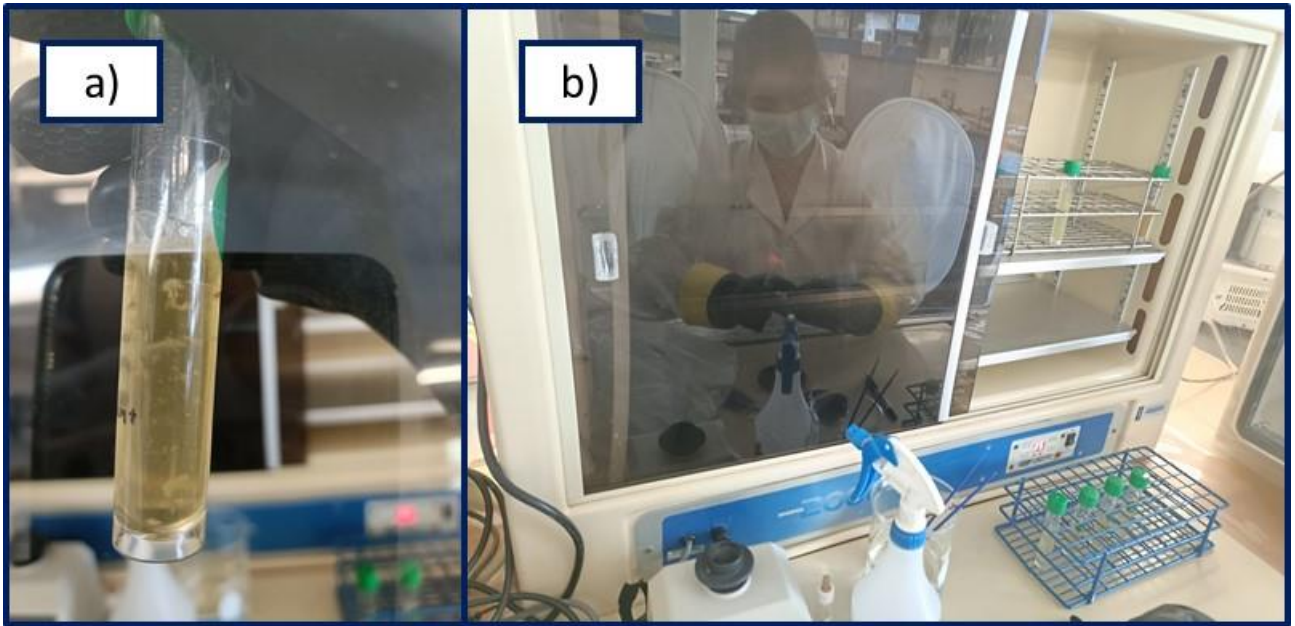
9. Se retiró la punta de papel del conducto (o la gutapercha entrelazada en la lima Hedstroem) cerca del mechero y se abrió el tubo de ensayo que contenía el medio de cultivo con Tioglicolato, se flameó la boquilla del tubo para después colocar el material dentro.

10. Se llevó la muestra a incubar a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  en condiciones anaeróbicas con 85% de Nitrógeno, 5% de Dióxido de carbono y 10% de Hidrogeno en la cámara de anaerobiosis durante 24 h.

### **Identificación de los microorganismos**

Pasadas 24 h de incubación se realizó el sembrado de la muestra antes tomada en agar CDC anaeróbico con 5% de sangre de cordero (BD BBL) dentro de la cámara de anaerobiosis utilizando un asa estéril para poder ver el desarrollo de microorganismos en la placa de 24-48 h (cultivo primario). Posterior a este tiempo, se realizan subcultivos para la obtención de cultivos puros (Figura 10). Las muestras donde no se observó crecimiento fueron descartadas.

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”



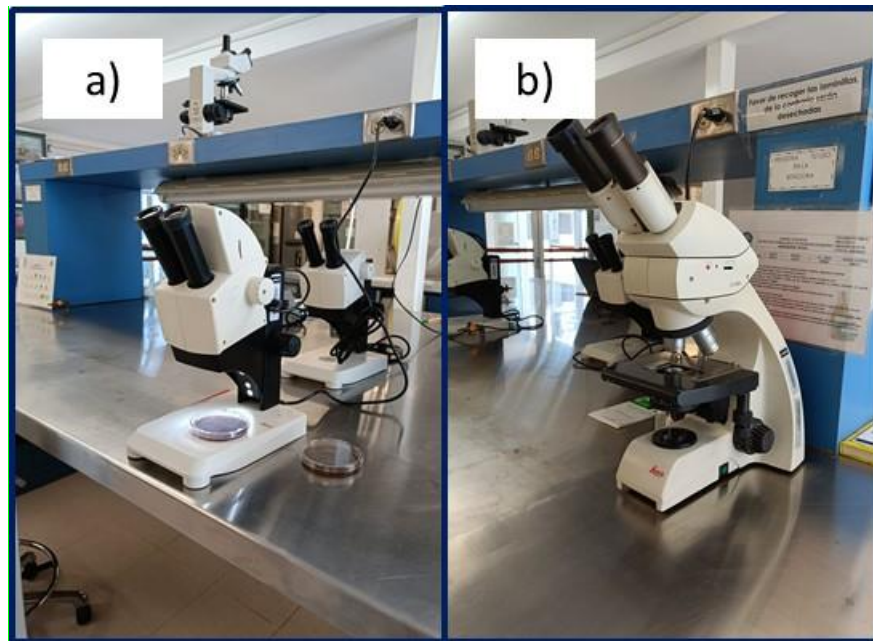
**Figura 10. a) Toma de muestra 24 h después, b) Sembrado en placa Agar CDC en cámara de anaerobiosis**

Una vez obtenido el cultivo puro se observa macroscópicamente las colonias por medio del microscopio estereoscópico y la morfología microscópica por medio de la tinción de gram en el microscopio óptico (Figura 11 y 12).

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”**

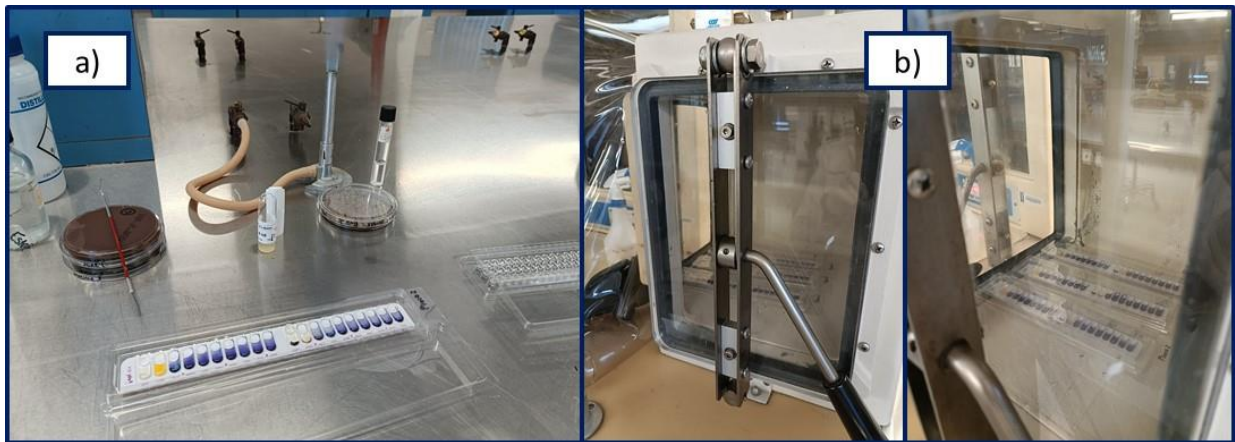


**Figura 11. Realización de tinción gram**



**Figura 12. a) Microscopio estereoscópico, b) Microscopio óptico**

Para la identificación de los microorganismos se utilizan las pruebas enzimáticas API 20 A para anaerobios, API 20 STREP para *Streptococcus* tanto anaerobios como anaerobios facultativos y API 20C AUX para levaduras siguiendo las instrucciones del fabricante. Las pruebas API fueron colocadas en la cámara de anaerobiosis para su incubación de 24 a 72 h (Figura 13).



**Figura 13. a) Prueba API, b) Colocación dentro de la cámara de anaerobiosis**

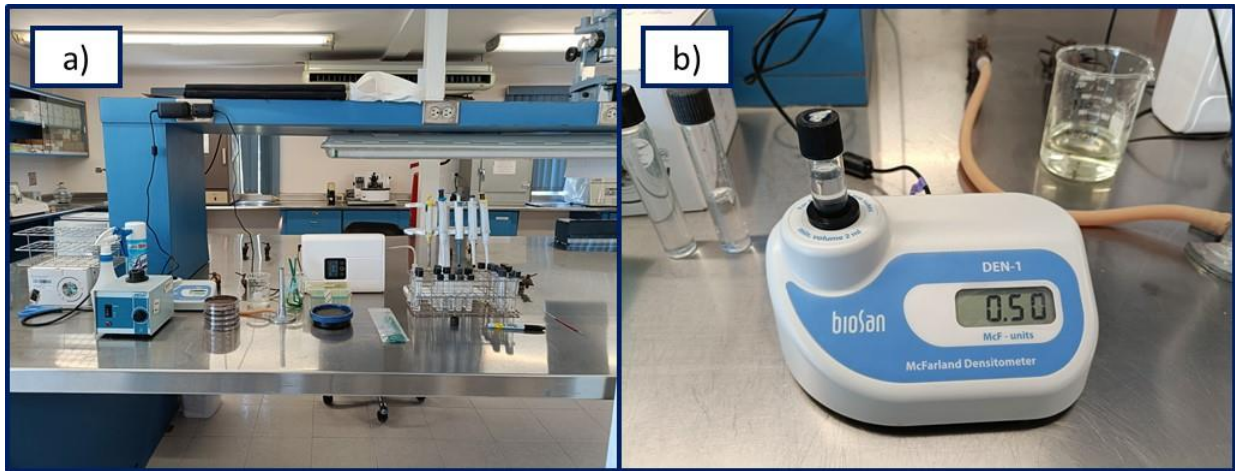
### **Prueba del ozono sobre microorganismos a un tiempo de 240 s**

Según lo propuesto por Mehta y col., en el 2018 se utilizó un tiempo de 240 s en la ozonificación de las muestras tanto en gas como en líquido realizando el siguiente procedimiento:

Se desinfectó el área de trabajo, se purgó el aparato de ozonoterapia durante 30 min, se cambió el filtro Whatman de la entrada de aire y se colocó una manguera estéril en la salida de ozono (Esta fue renovada entre cada microorganismo), así como un mechero en la zona de trabajo. Se realizó una prueba control utilizando 2 mL de solución salina estéril con 240 s de ozonización, la cual se sembró en placa agar CDC (Grupo 1).

Se tomaron las placas de agar CDC anteriormente sembradas. En tubos de vidrio con fondo plano y tapón de polipropileno que contenían agua destilada estéril se

preparó una escala de McFarland de 0.5 de cada microorganismo con ayuda del densitómetro (Densimat; bioMérieux, Florencia, Italia) (Figura 14).



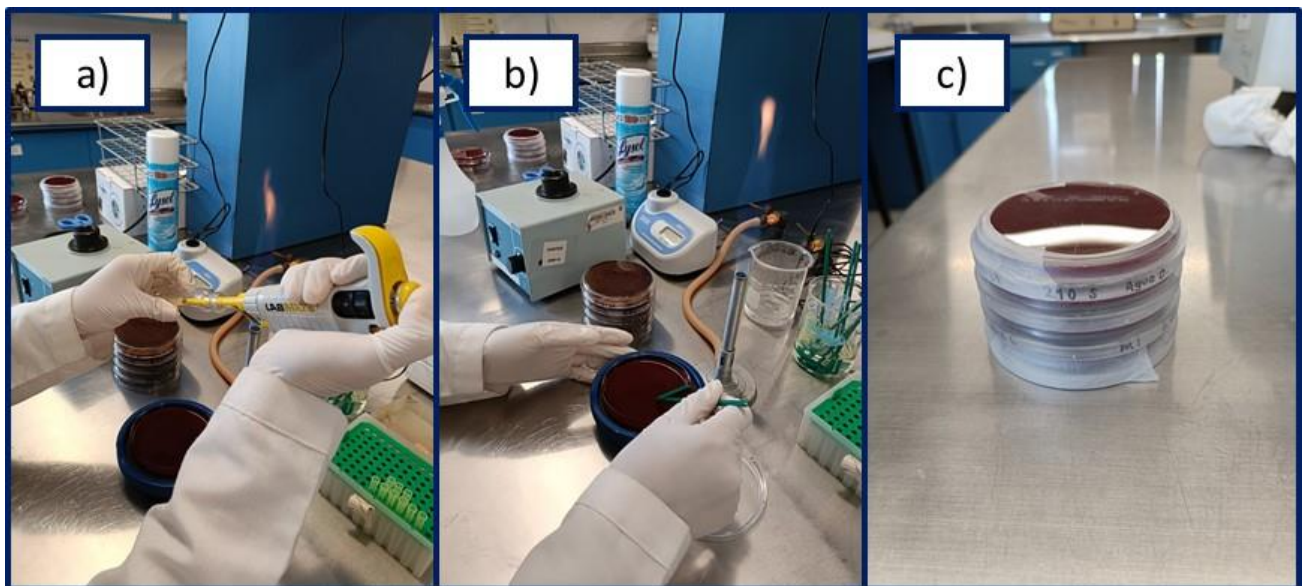
**Figura 14. a) Área de trabajo para prueba de microorganismos con la ozonoterapia, b) Densitómetro con una escala de McFarland de 0.5**

Para la preparación de la prueba de líquido y gas se tomaron 8 tubos de vidrio estériles, 4 contenían 2 mL de solución salina estéril para ozono líquido (Grupo 3) y 4 estaban vacíos para ozono gaseoso (Grupo 2). A cada uno de los tubos se les colocó 2 mL de la escala de McFarland de 0.5 de cada uno de los microorganismos a probar y se ozonificaron durante 240 s (Figura 15). Posteriormente se tomaron de cada tubo 100  $\mu$ L y se sembraron en placas de agar CDC, se sellaron con papel Parafilm y fueron incubadas en la cámara de anaerobiosis durante 24 h (Figura 16).

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”



*Figura 15. Equipo de ozono en funcionamiento*



*Figura 16. a y b) Sembrado posterior a la ozonificación, c) Sellado de las placas con papel Parafilm*

Debido al no desarrollo de microorganismos obtenido a los 240 s se decidió disminuir el tiempo de contacto con el ozono según lo propuesto por Case y col., en el 2012 a 120 s.

### **Prueba del ozono sobre microorganismos a un tiempo de 120 s**

Se comenzó por desinfectar el área de trabajo, purgar el aparato de ozonoterapia durante 30 min, cambiar el filtro Whatman de la entrada de aire, colocar una manguera estéril en la salida de ozono (Esta fue renovada entre cada microorganismo), así como un mechero en la zona de trabajo. Se realizó una prueba control utilizando 2 mL de solución salina estéril con 120 s de ozonización, la cual se sembró en placa agar CDC (Grupo 1).

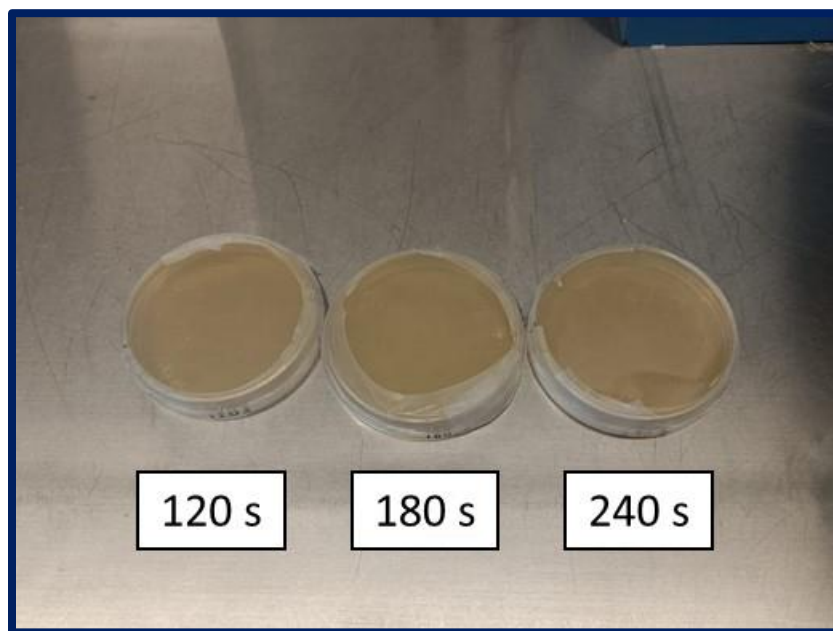
Se tomaron las placas de los microorganismos sembrados en CDC que mostraban completo desarrollo, y se realizó en tubos de vidrio con fondo plano y tapón de polipropileno que contenían agua destilada estéril una escala de McFarland de 0.5 de cada microorganismo con ayuda del densitómetro.

Para la preparación de la prueba de líquido y gas se tomaron tubos de vidrio estériles, la mitad contenían 2 mL de solución salina estéril para ozono líquido (Grupo 3) y la otra mitad estaban vacíos para ozono gaseoso (Grupo 2). A cada uno de los tubos se les colocó 2 mL de la escala de McFarland de 0.5 de cada uno de los microorganismos a probar y se ozonificaron durante 120 s. Posteriormente se tomaron de cada tubo 100  $\mu$ L y se sembraron en placas de agar CDC, se sellaron con papel Parafilm y fueron incubadas en la cámara de anaerobiosis durante 24 h.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Estandarización del dispositivo

A las 24 h de incubación se observaron las placas de agar nutritivo (Grupo 1) y se comprobó que no presentaron desarrollo de microorganismos en ninguno de los tres tiempos lo que indica la esterilidad del procedimiento (Figura 17).



*Figura 17. Placas de agar nutritivo (Grupo 1) 24 h después*

### 6.2. Identificación de los microorganismos

La identificación de los microorganismos como se mencionó anteriormente se realizó en forma convencional, la cual consiste en los siguientes pasos:

- Tinción de gram
- Observación macroscópica y microscópica
- Pruebas enzimáticas (API 20 A, API 20 STREP, API 20 AUX)

## Tinción gram

Los resultados de la tinción de gram para cada microorganismo se anexan a continuación (Tabla 2):

**Tabla 2. Resultados tinción gram**

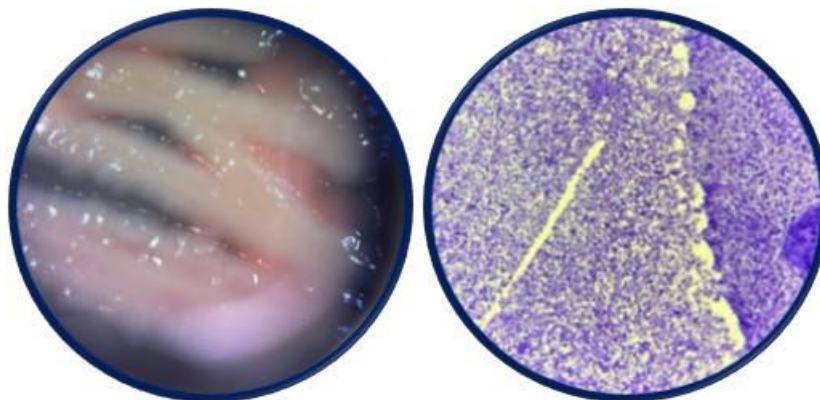
| No. de microorganismo | Cocos grampositivos | Cocos gramnegativos | Bacilos grampositivos | Bacilos gramnegativos | Levaduras |
|-----------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------|
| 1                     |                     |                     | ✓                     |                       |           |
| 2                     | ✓                   |                     |                       |                       |           |
| 3                     |                     |                     | ✓                     |                       |           |
| 4                     | ✓                   |                     |                       |                       |           |
| 5                     |                     |                     | ✓<br>Esporulados      |                       |           |
| 6                     | ✓                   |                     |                       |                       |           |
| 7                     | ✓                   |                     |                       |                       |           |
| 8                     | ✓                   |                     |                       |                       |           |
| 9                     | ✓                   |                     |                       |                       |           |
| 10                    |                     |                     | ✓                     |                       |           |
| 11                    |                     |                     | ✓                     |                       |           |
| 12                    | ✓                   |                     |                       |                       |           |
| 13                    |                     |                     | ✓                     |                       |           |
| 14                    |                     |                     | ✓                     |                       |           |
| 15                    | ✓                   |                     |                       |                       |           |
| 16                    |                     |                     |                       | ✓                     |           |
| 17                    |                     |                     | ✓<br>Esporulados      |                       |           |
| 18                    | ✓                   |                     |                       |                       |           |
| 19                    |                     |                     | ✓                     |                       |           |
| 20                    |                     |                     | ✓                     |                       |           |
| 21                    | ✓                   |                     |                       |                       |           |
| 22                    | ✓                   |                     |                       |                       |           |

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS  
AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”

|              |    |  |    |   |   |
|--------------|----|--|----|---|---|
| 23           | ✓  |  |    |   |   |
| 24           | ✓  |  |    |   |   |
| 25           | ✓  |  |    |   |   |
| 26           | ✓  |  |    |   |   |
| 27           | ✓  |  |    |   |   |
| 28           | ✓  |  |    |   |   |
| 29           | ✓  |  |    |   |   |
| 30           | ✓  |  |    |   |   |
| 31           |    |  |    |   | ✓ |
| <b>Total</b> | 19 |  | 10 | 1 | 1 |

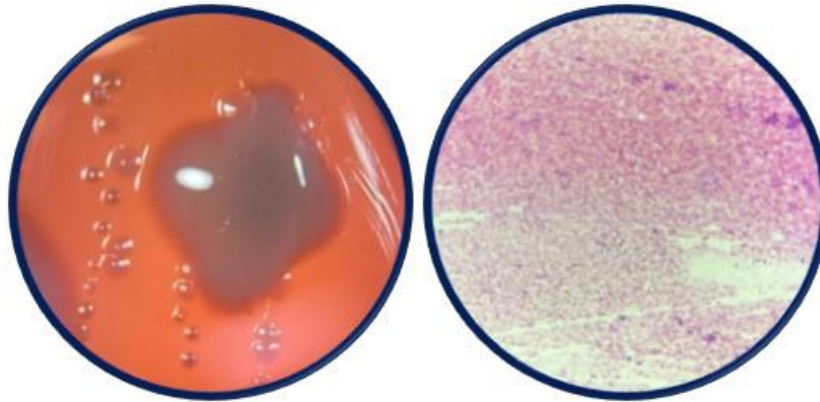
### Imágenes macroscópicas y microscópicas de los microorganismos

Las imágenes de los microorganismos identificados se anexan a continuación. En el lado derecho imágenes macroscópicas (40X) y en lado izquierdo imágenes microscópicas (100X) (Figura 18-48).

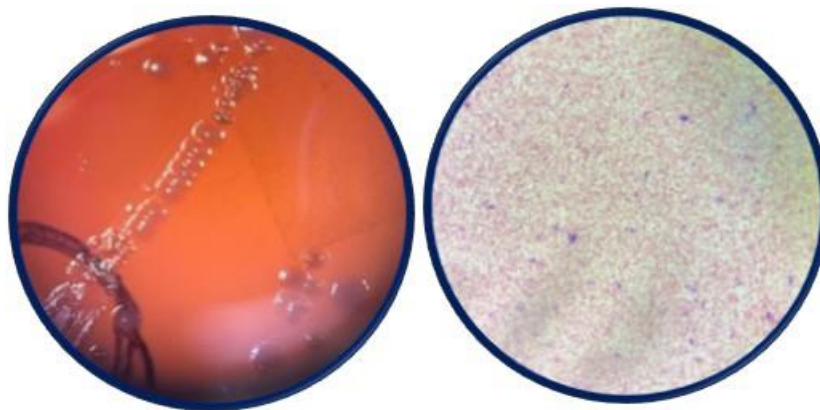


**Figura 18. Microorganismo 1: *Bifidobacterium* spp.**

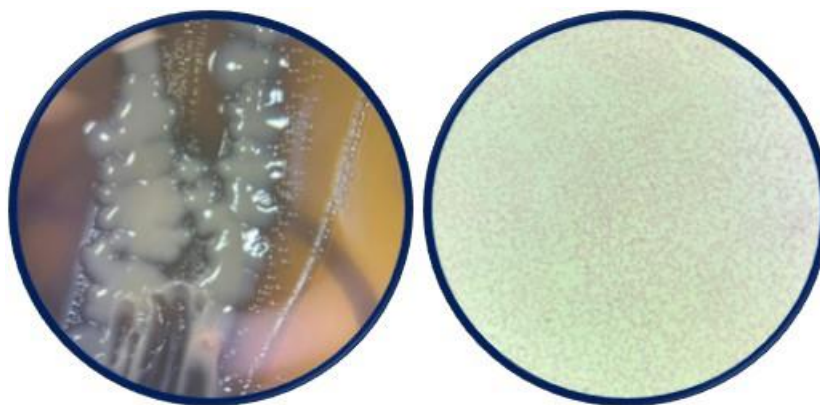
“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”



**Figura 19. Microorganismo 2: *Streptococcus uberis***

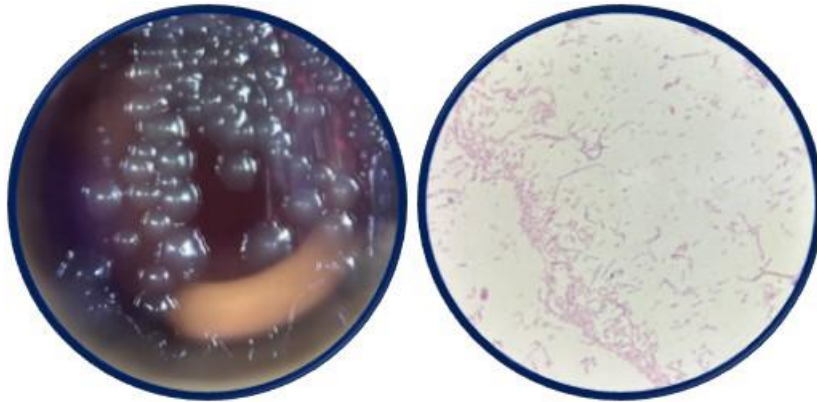


**Figura 20. Microorganismo 3: *Bifidobacterium* spp.**

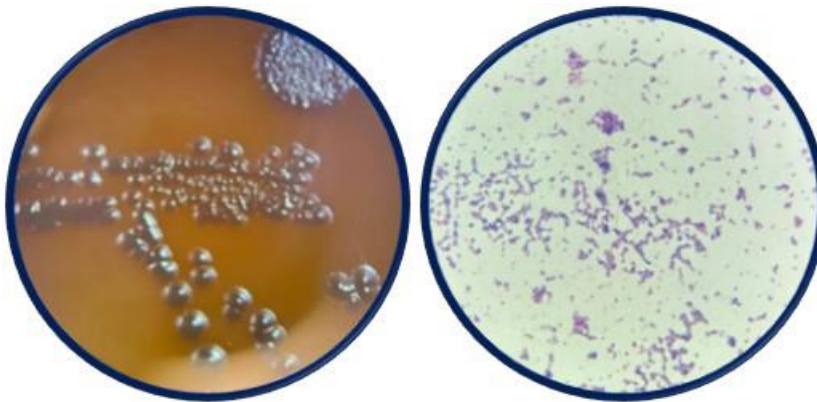


**Figura 21. Microorganismo 4: *Streptococcus intermedius***

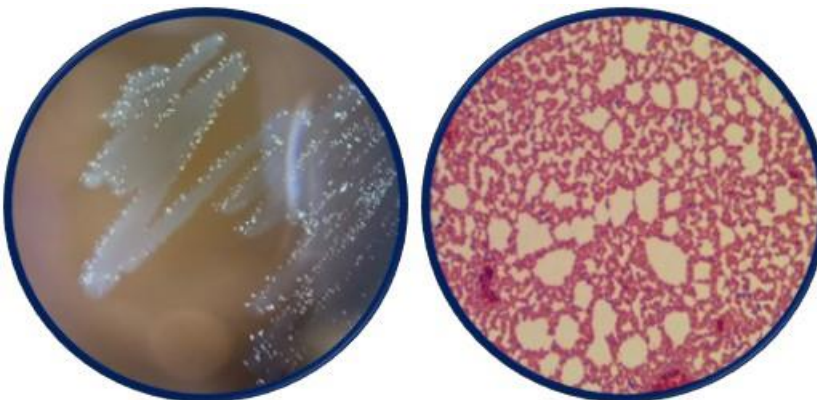
“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”



**Figura 22. Microorganismo 5: *Clostridium beijerinckii/butyricum***

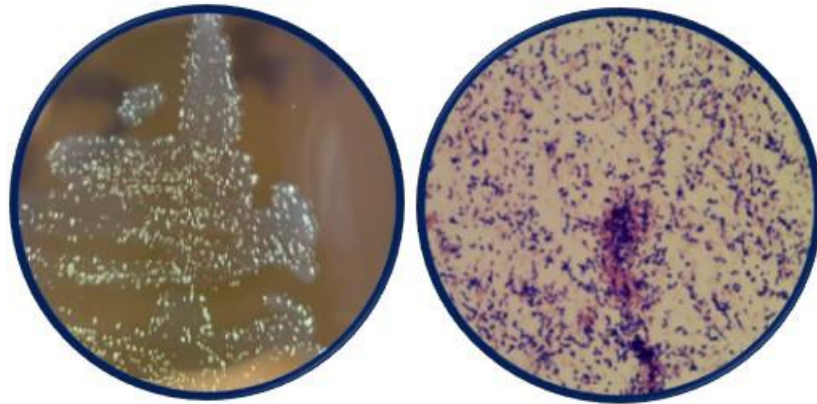


**Figura 23. Microorganismo 6: *Streptococcus intermedius***

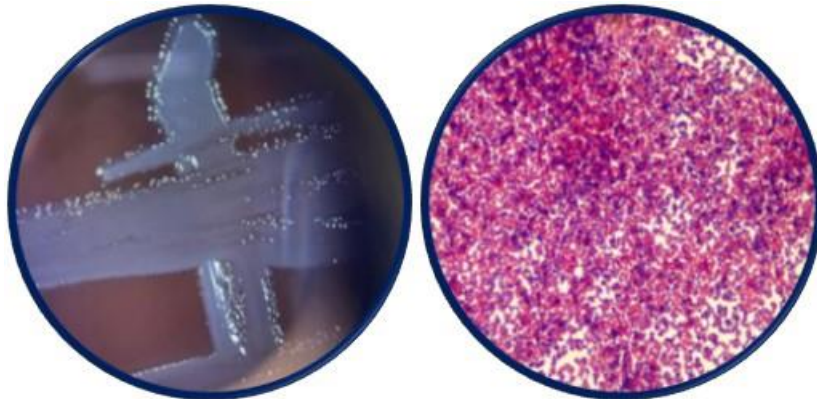


**Figura 24. Microorganismo 7: *Enterococcus faecium***

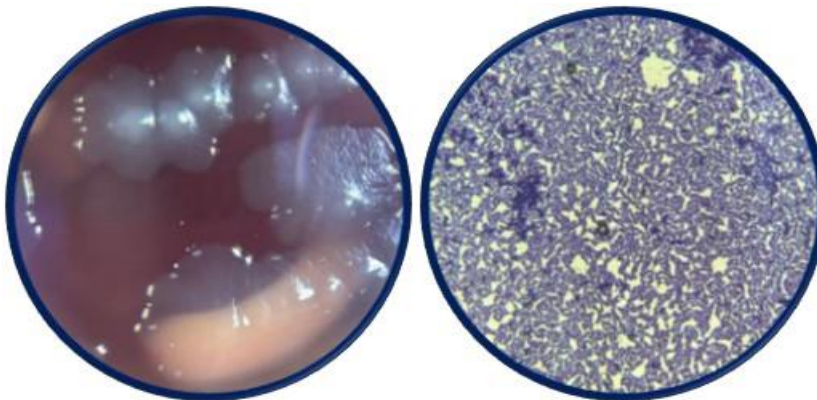
“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”



**Figura 25. Microorganismo 8: *Enterococcus faecalis***

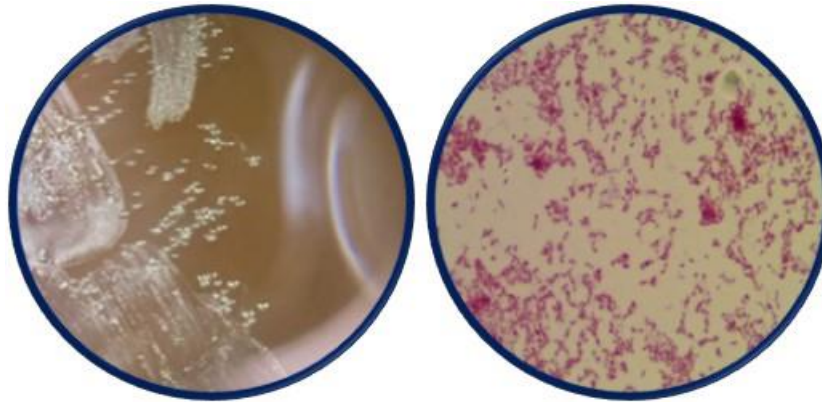


**Figura 26. Microorganismo 9: *Enterococcus faecalis***

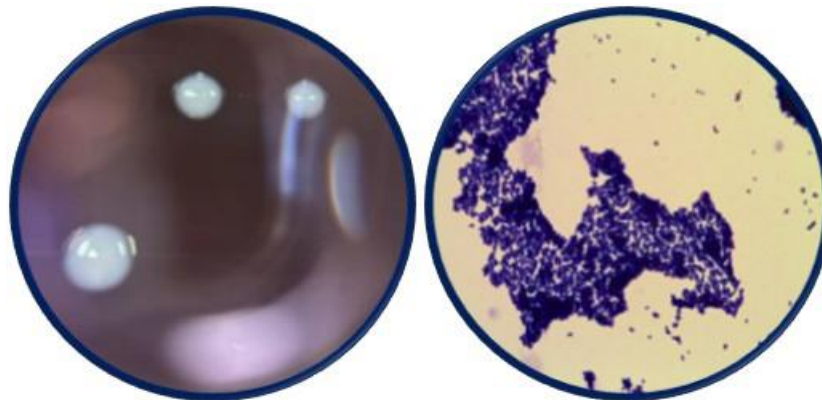


**Figura 27. Microorganismo 10: *Bifidobacterium* spp.**

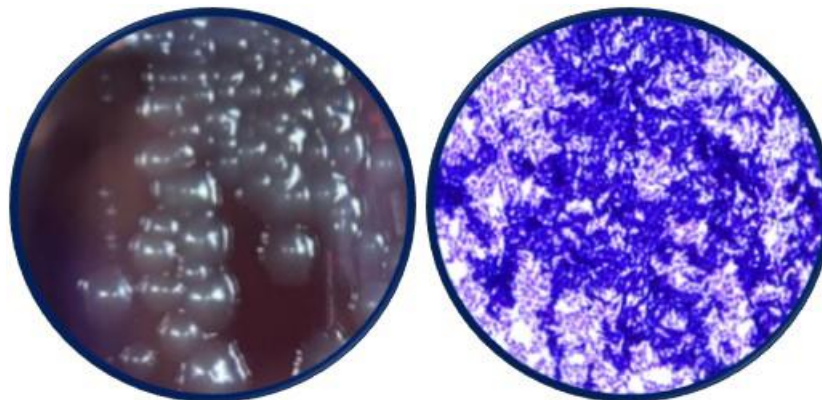
“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”



**Figura 28. Microorganismo 11: *Actinomyces naeslundii***

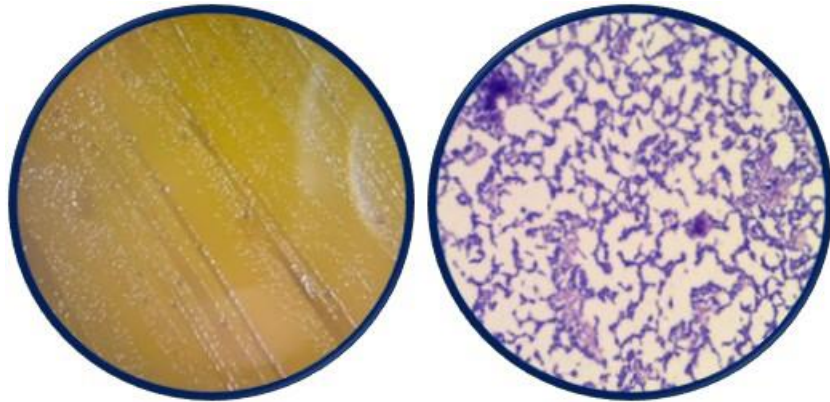


**Figura 29. Microorganismo 12: *Enterococcus faecium***

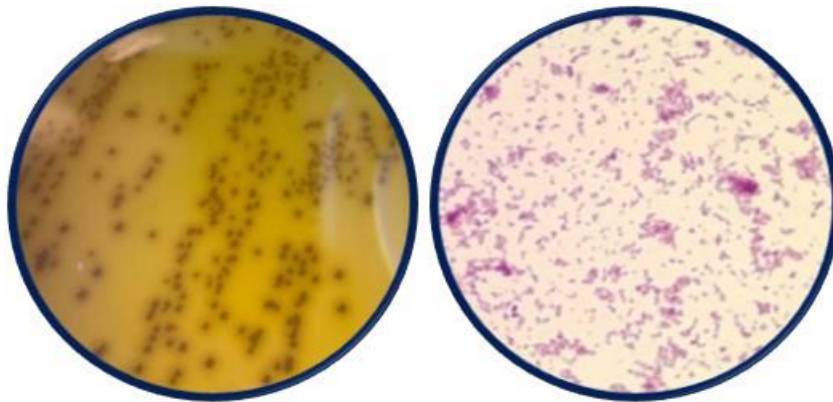


**Figura 30. Microorganismo 13: *Clostridium beijerinckii/butyricum***

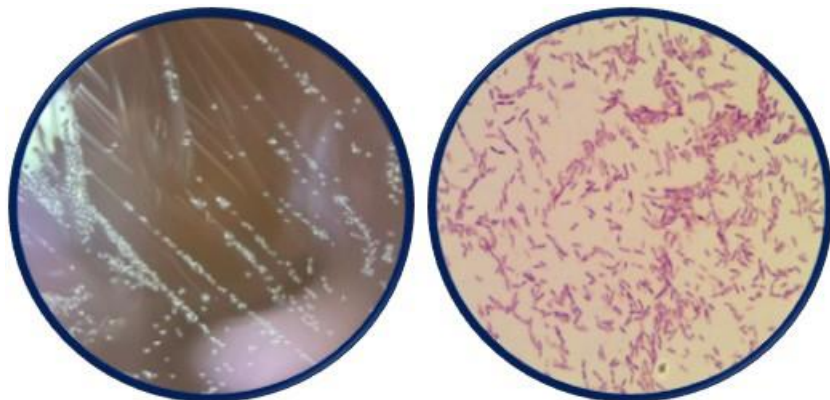
“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”



**Figura 31. Microorganismo 14: *Clostridium beijerinckii/butyricum***

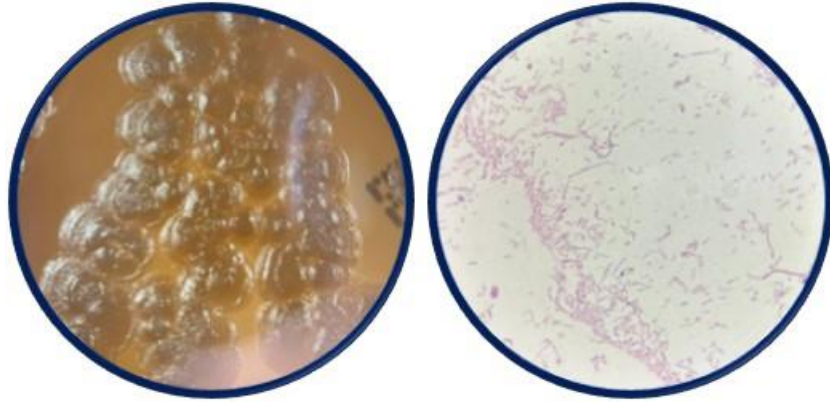


**Figura 32. Microorganismo 15: *Streptococcus mitis***

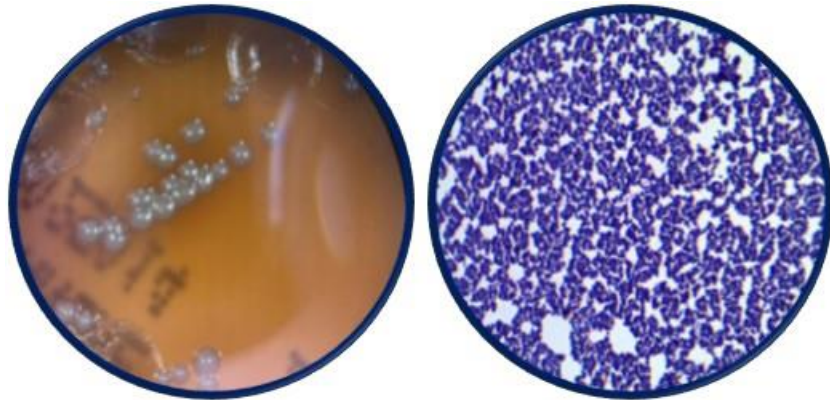


**Figura 33. Microorganismo 16: *Porphyromonas asaccharolytica***

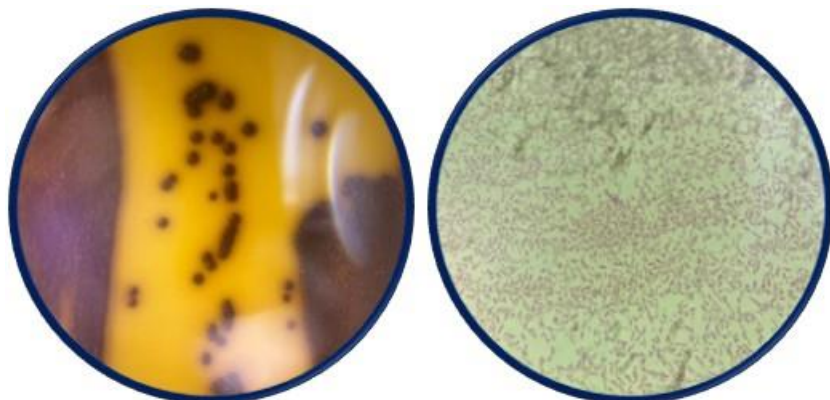
“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”



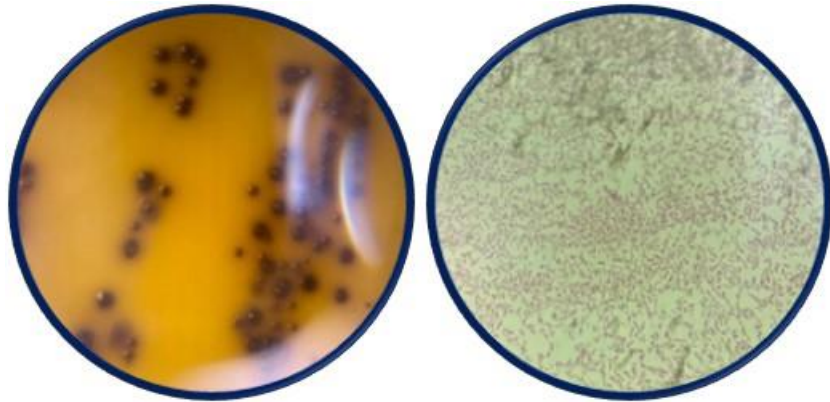
**Figura 34. Microorganismo 17: *Clostridium sordellii***



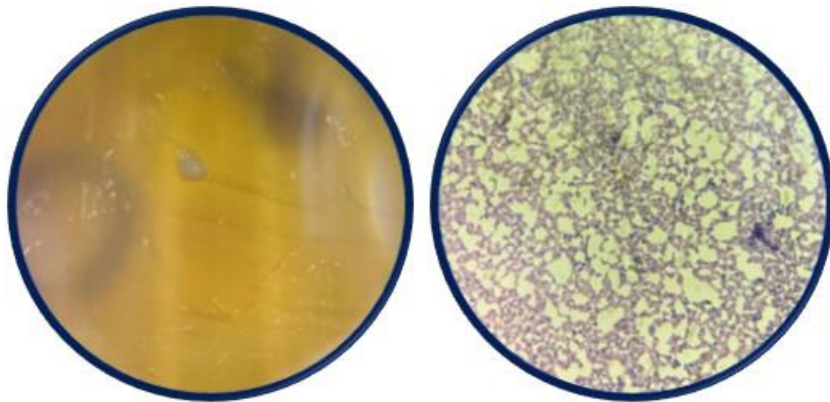
**Figura 35. Microorganismo 18: *Enterococcus durans***



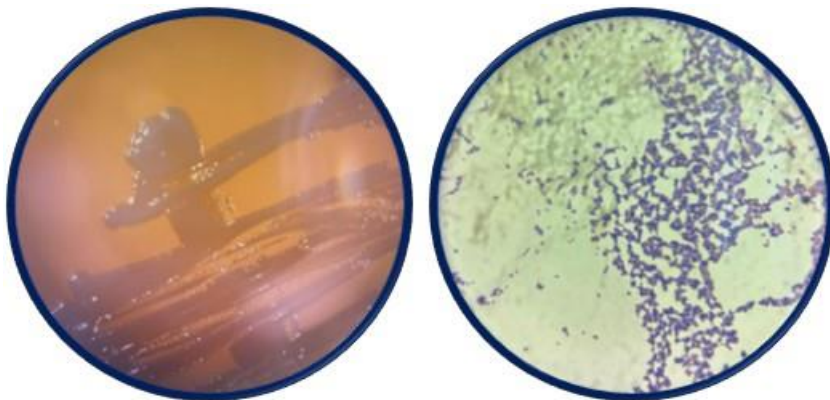
**Figura 36. Microorganismo 19: *Lactobacillus acidophilus***



**Figura 37. Microorganismo 20: *Lactobacillus acidophilus***

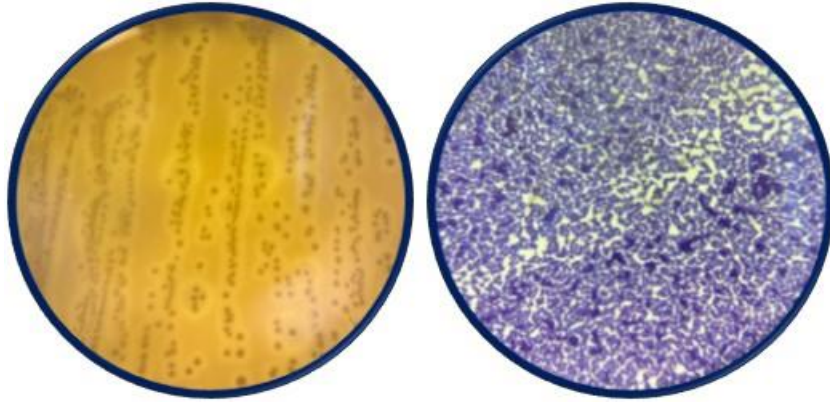


**Figura 38. Microorganismo 21: *Streptococcus salivarius***

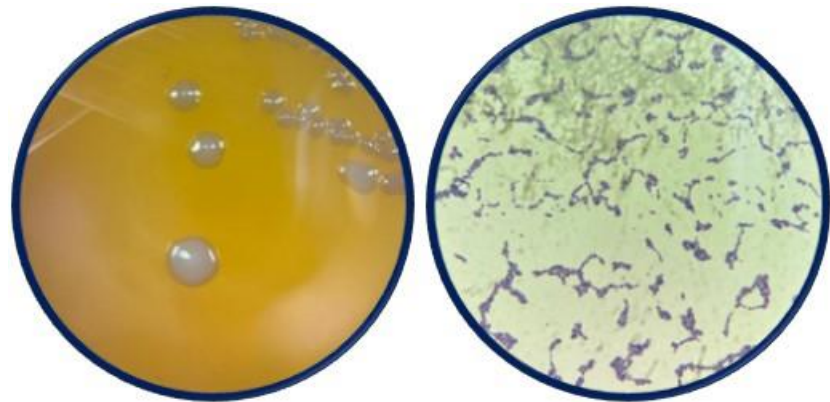


**Figura 39. Microorganismo 22: *Aerococcus viridans***

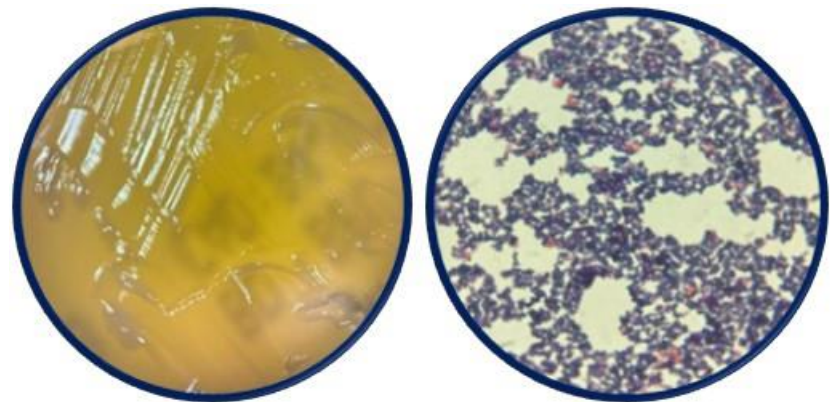
“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”



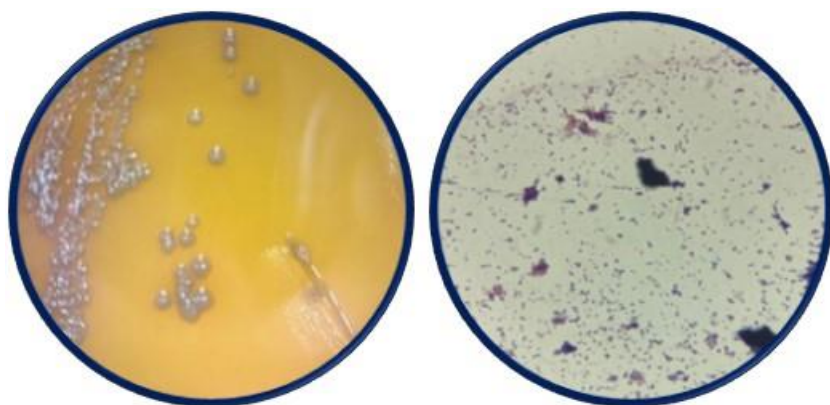
**Figura 40. Microorganismo 23: *Streptococcus anginosus***



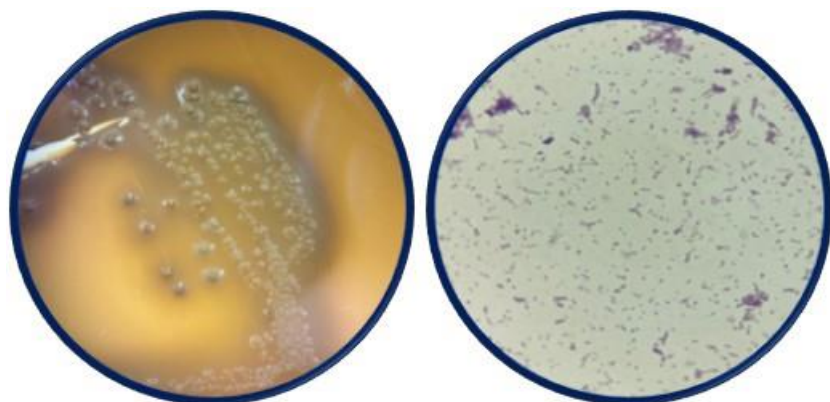
**Figura 41. Microorganismo 24: *Streptococcus uberis***



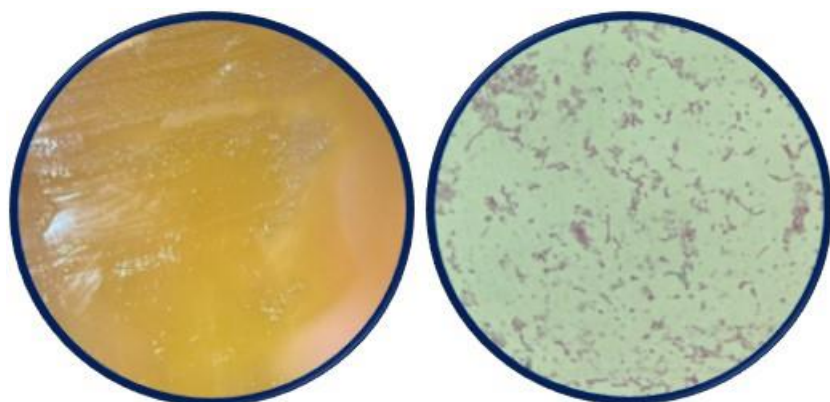
**Figura 42. Microorganismo 25: *Streptococcus uberis***



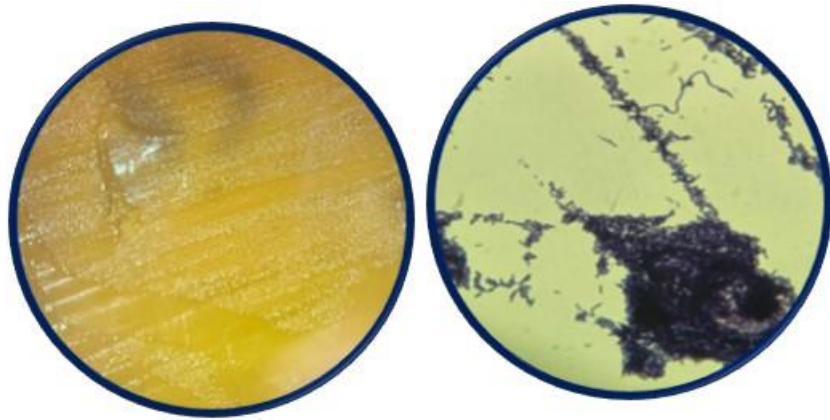
**Figura 43. Microorganismo 26: *Streptococcus uberis***



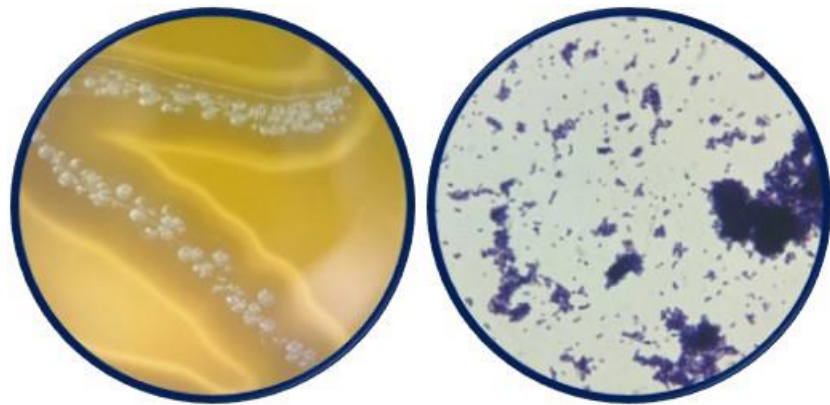
**Figura 44. Microorganismo 27: *Aerococcus viridans***



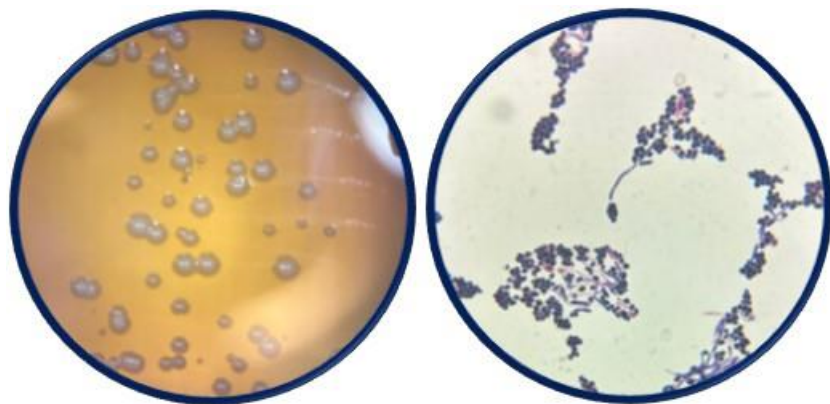
**Figura 45. Microorganismo 28: *Aerococcus viridans***



**Figura 46. Microorganismo 29: *Globicatella sanguinis***



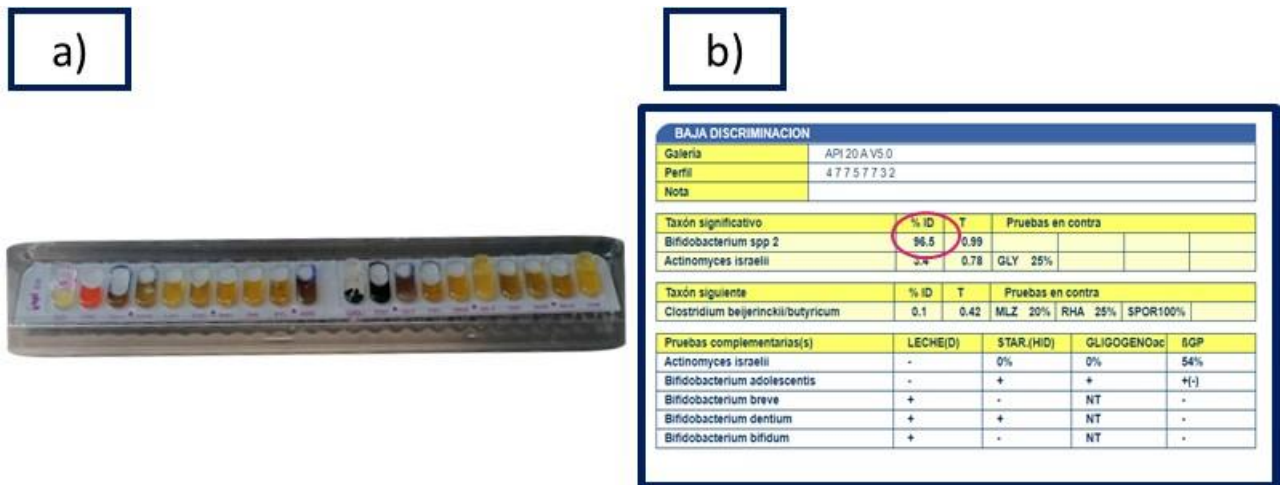
**Figura 47. Microorganismo 30: *Aerococcus viridans***



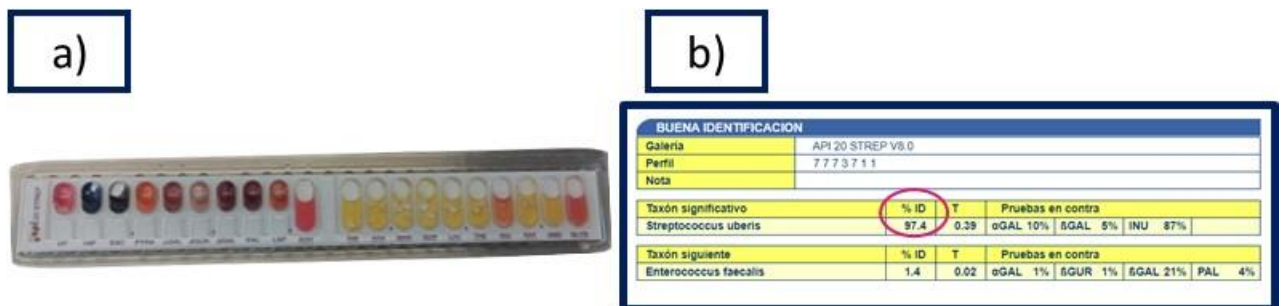
**Figura 48. Microorganismo 31: *Candida albicans***

## Pruebas API

Los resultados de las pruebas API para cada microorganismo se anexan a continuación (Figura 49-72) y se resumen en la siguiente tabla (Tabla 3, gráfica 1):



**Figura 49. a) Microorganismo 1: Bifidobacterium spp. (96.5%), b) Resultado obtenido de API WEB**



**Figura 50. a) Microorganismo 2: Streptococcus uberis (97.4%), b) Resultado obtenido de API WEB**

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”

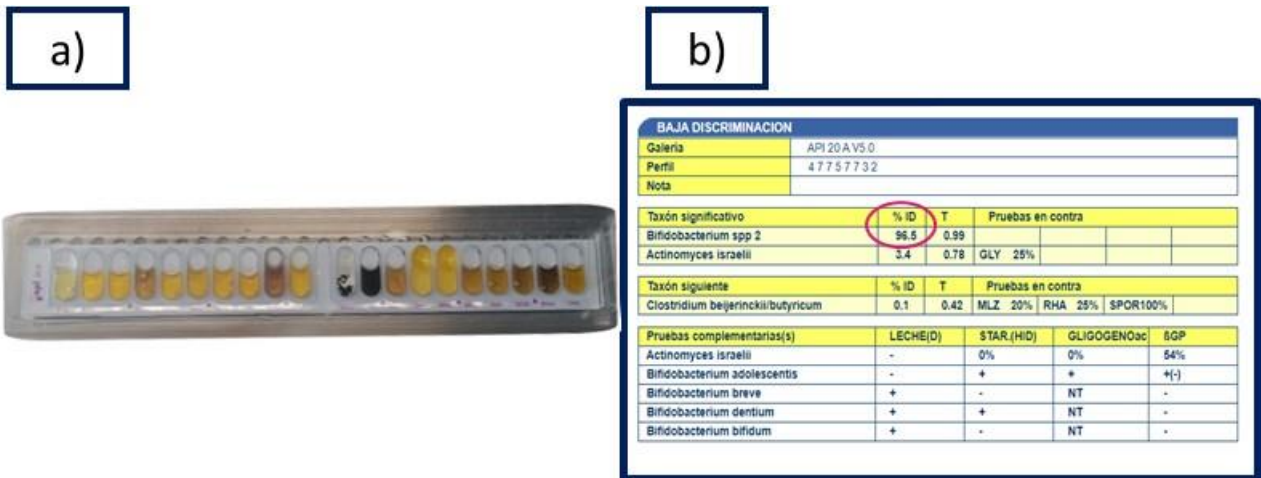


Figura 51. a) Microorganismo 3: *Bifidobacterium* spp. (96.5%), b) Resultado obtenido de API WEB

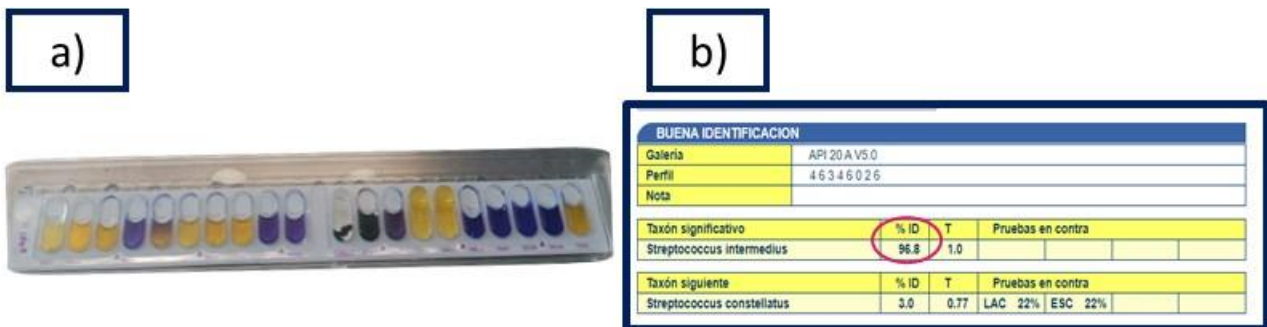


Figura 52. a) Microorganismo 4 y 6: *Streptococcus intermedius* (96.8%), b) Resultado obtenido de API WEB

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”

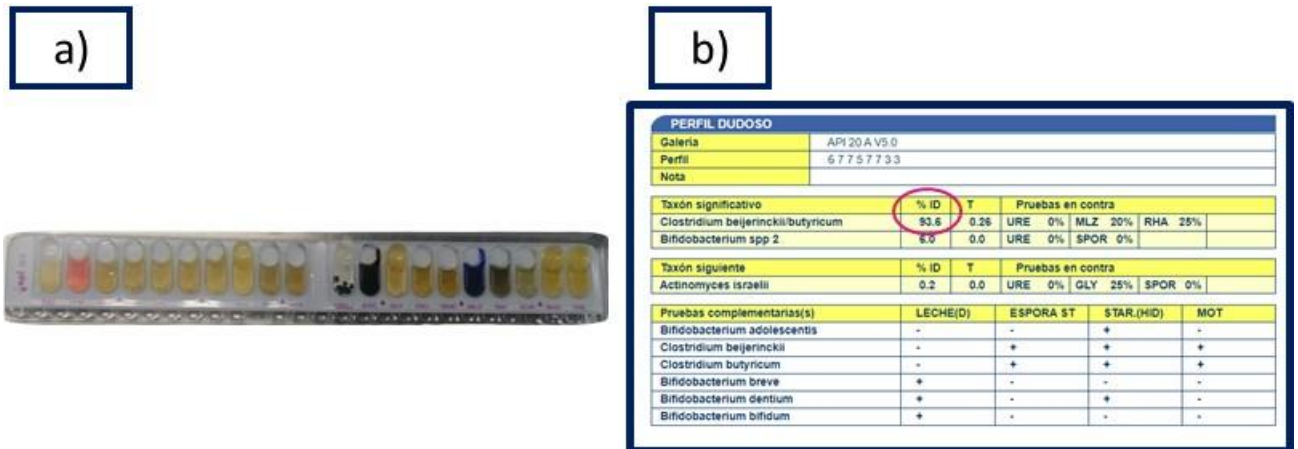


Figura 53. a) Microorganismo 5: *Clostridium beijerinckii/butyricum* (93.6%), b) Resultado obtenido de API WEB

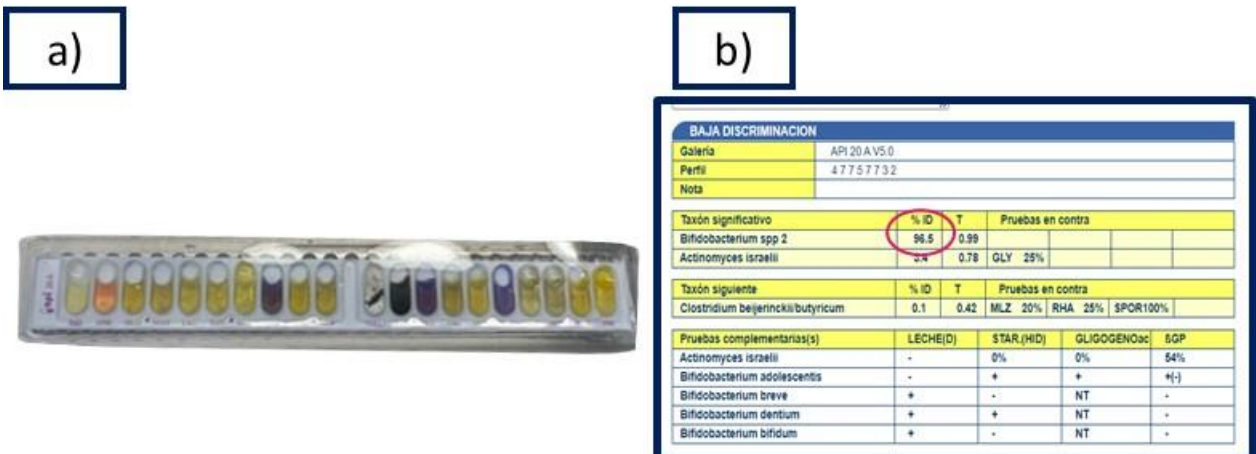


Figura 54. Microorganismo 10: *Bifidobacterium* spp. (96.5%), b) Resultado obtenido de API WEB



Figura 55. a) Microorganismo 11: *Actinomyces naeslundii* (83.4%), b) Resultado obtenido de API WEB

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”



Figura 56. Microorganismo 7 y 12: *Enterococcus faecium* (98.9%), b) Resultado obtenido de API WEB

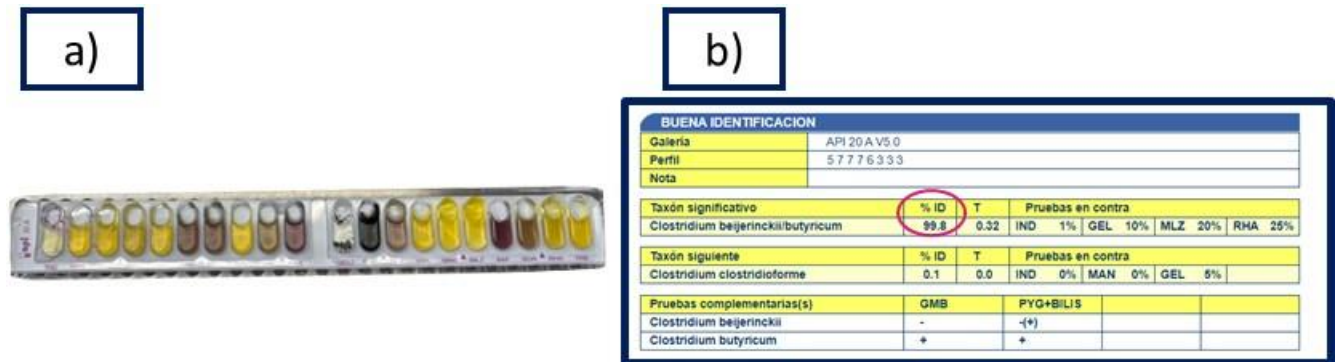


Figura 57. a) Microorganismo 13 y 14: *Clostridium beijerinckii/butyricum* (98.9%), b) Resultado obtenido de API WEB

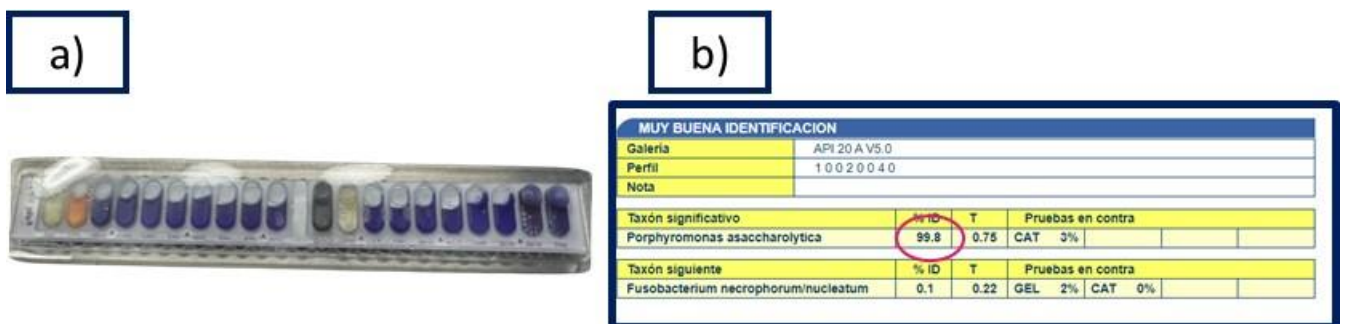


Figura 58. a) Microorganismo 16: *Porphyromonas asaccharolytica* (99.8%), b) Resultado obtenido de API WEB

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS  
AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”

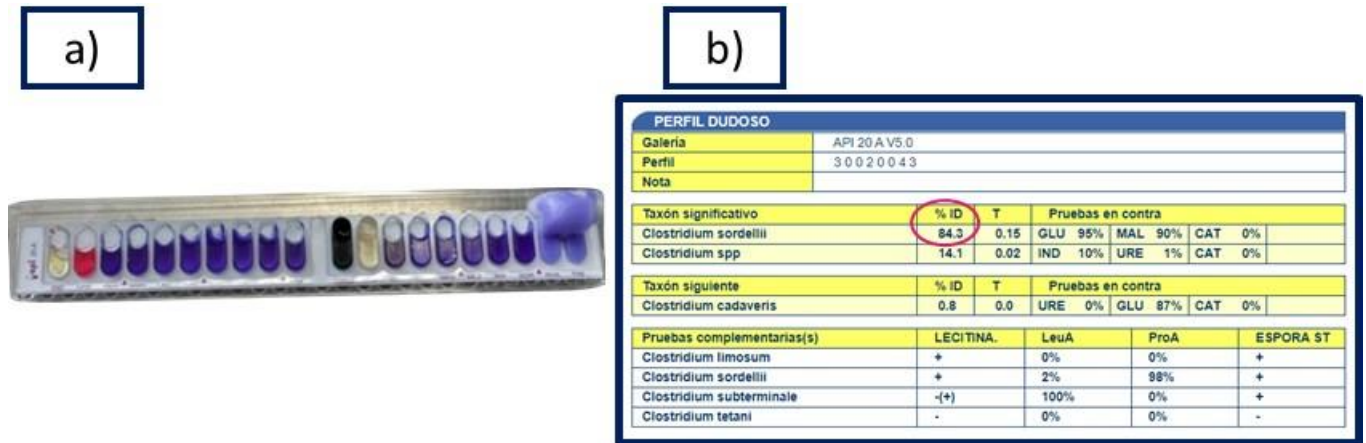


Figura 59. a) Microorganismo 17: *Clostridium sordellii* (84.3%), b) Resultado obtenido de API WEB

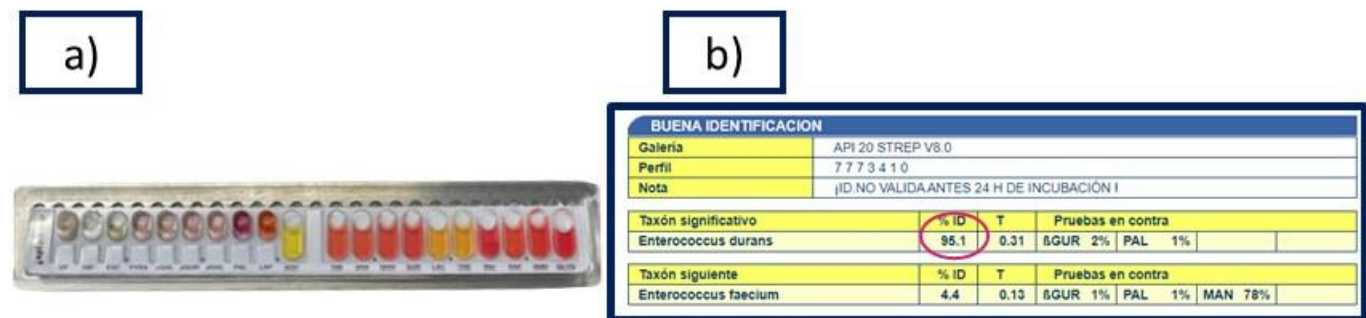


Figura 60. a) Microorganismo 18: *Enterococcus durans* (95.1%), b) Resultado obtenido de API WEB

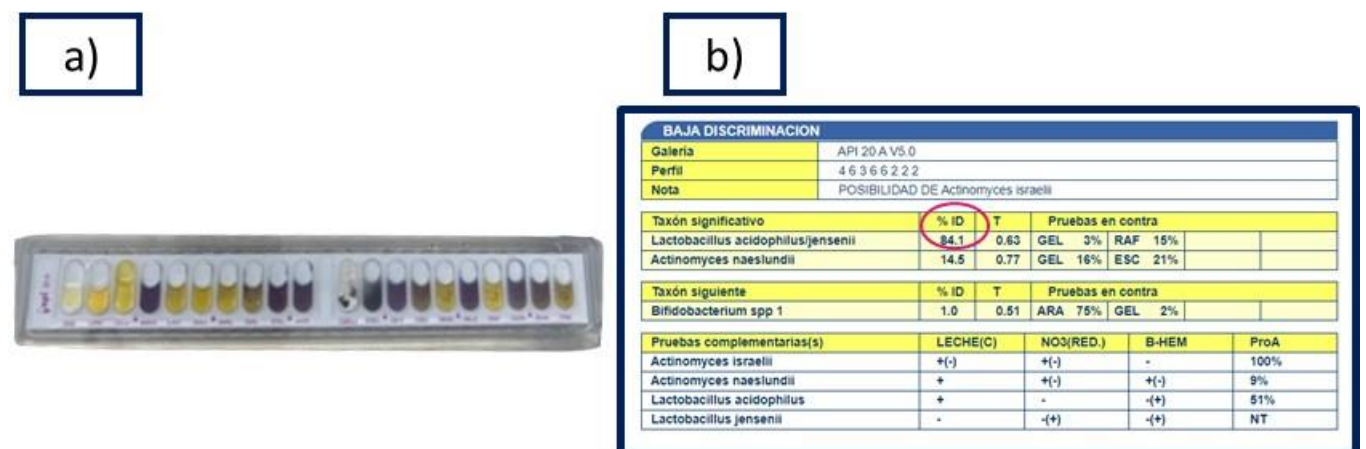


Figura 61. a) Microorganismo 19 y 20: *Lactobacillus acidophilus* (84.1%), b) Resultado obtenido de API WEB

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”

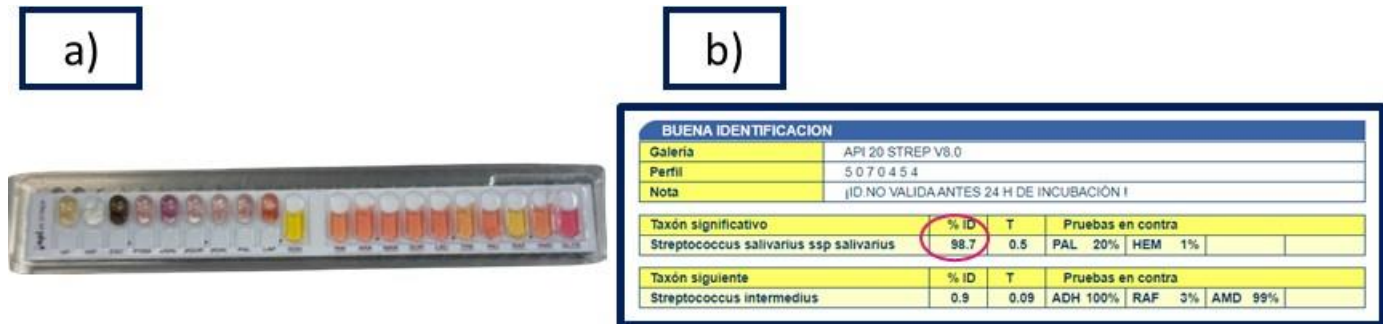


Figura 62. a) Microorganismo 21: *Streptococcus salivarius* (98.7%), b) Resultado obtenido de API WEB

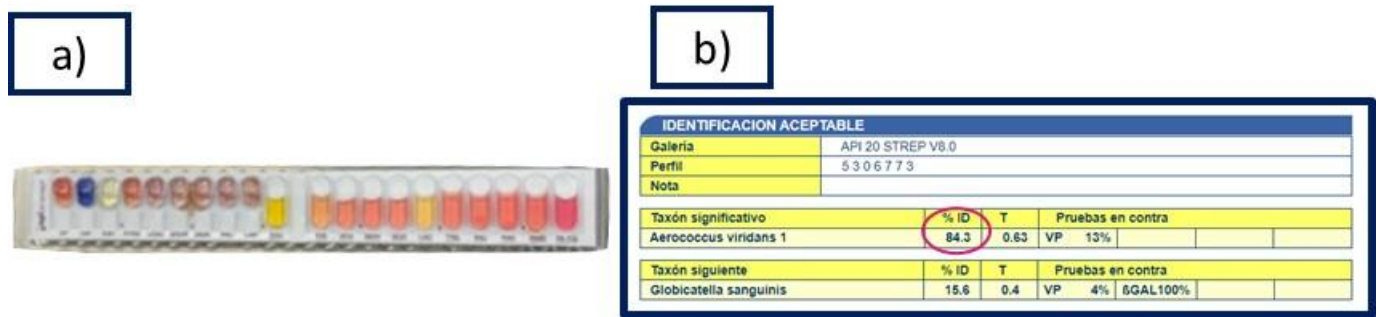


Figura 63. a) Microorganismo 22: *Aerococcus viridans* (84.3%), b) Resultado obtenido de API WEB

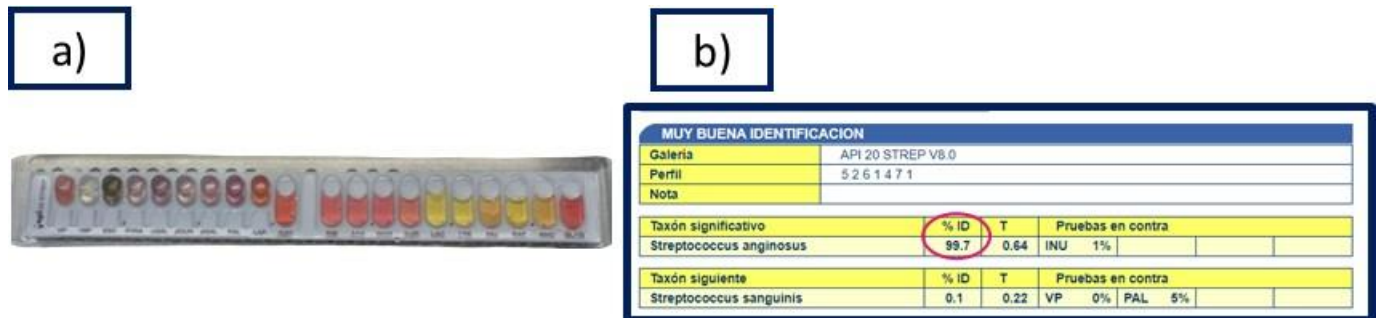


Figura 64. a) Microorganismo 23: *Streptococcus anginosus* (99.7%), b) Resultado obtenido de API WEB

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”

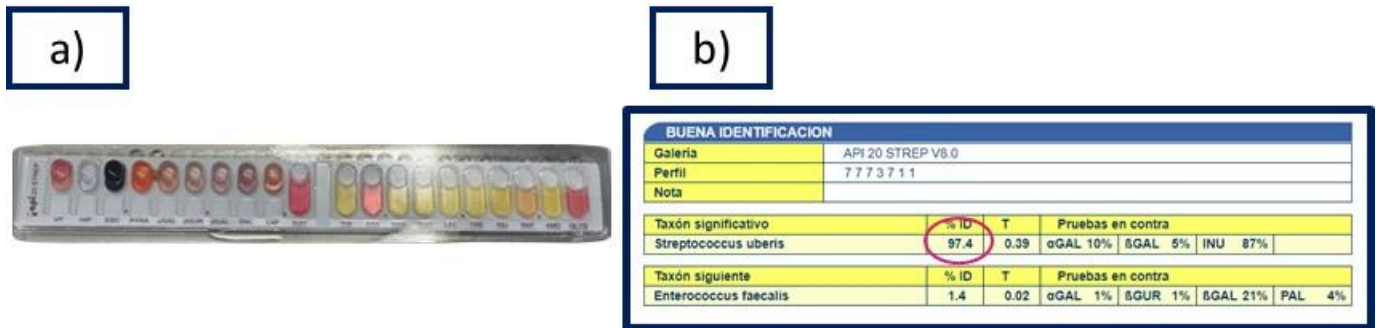


Figura 65. a) Microorganismo 24: *Streptococcus uberis* (97.4%), b) Resultado obtenido de API WEB

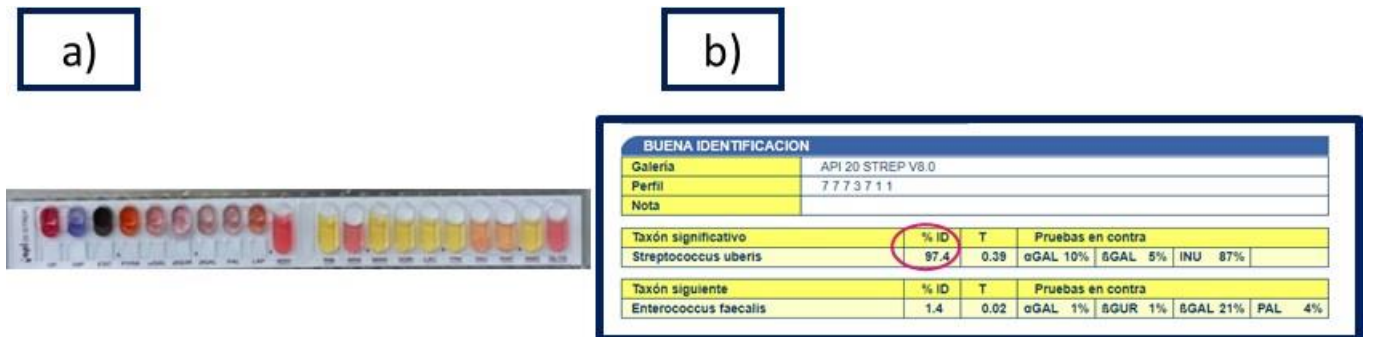


Figura 66. a) Microorganismo 25: *Streptococcus uberis* (97.4%), b) Resultado obtenido de API WEB

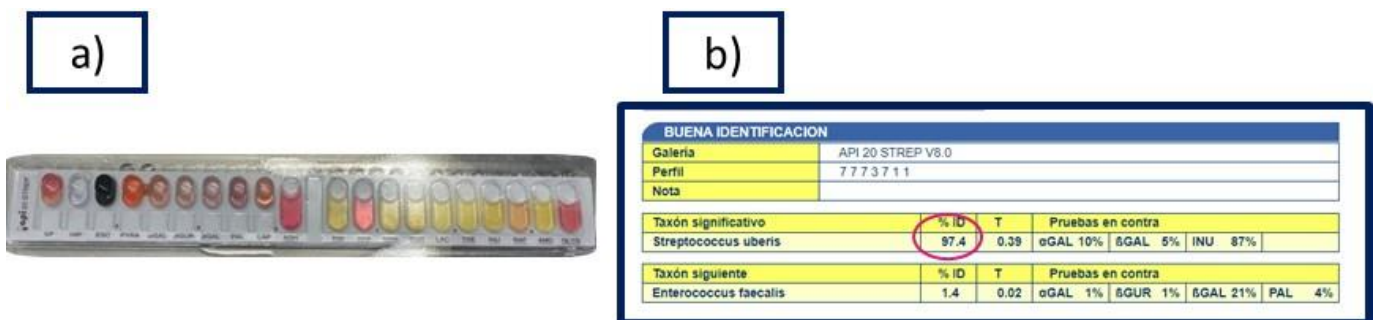


Figura 67. a) Microorganismo 26: *Streptococcus uberis* (97.4%), b) Resultado obtenido de API WEB

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”



Figura 68. a) Microorganismo 27: *Aerococcus viridans* (94.4%), b) Resultado obtenido de API WEB

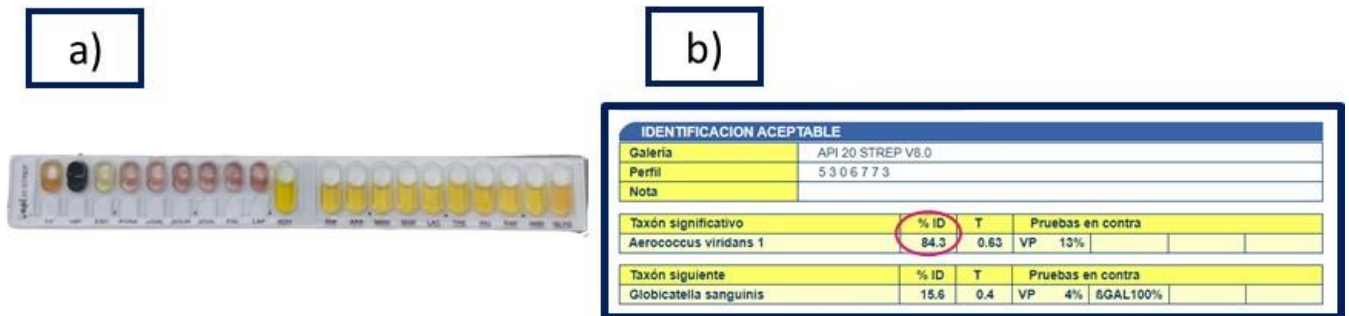


Figura 69. a) Microorganismo 28: *Aerococcus viridans* (84.3%), b) Resultado obtenido de API WEB

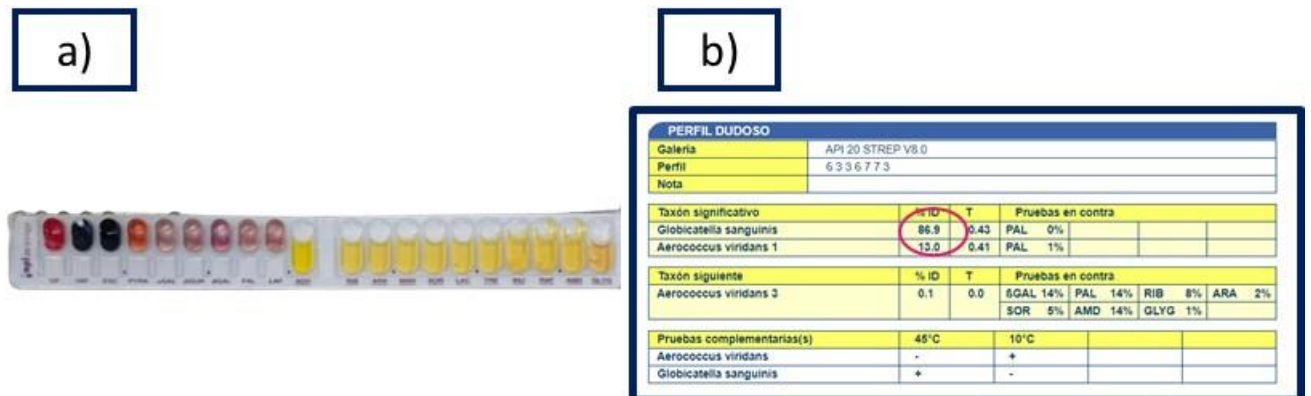


Figura 70. a) Microorganismo 29: *Globicatella sanguinis* (86.9%), b) Resultado obtenido de API WEB

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”



**Figura 71. a) Microorganismo 30: Aerococcus viridans (94.4%), b) Resultado obtenido de API WEB**



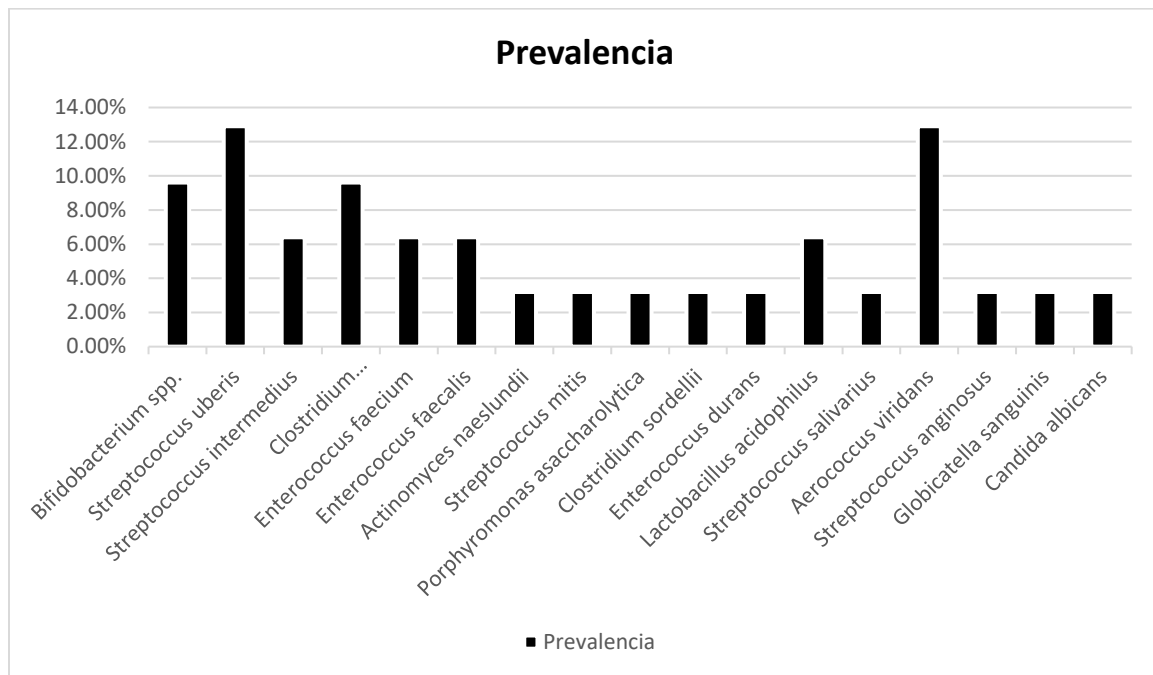
**Figura 72. a) Microorganismo 31: Candida albicans (96.9%), b) Resultado obtenido de API WEB**

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”

*Tabla 3. Prevalencia de microorganismos*

| Microorganismo                            | grampositivo | gramnegativo | Porcentaje |
|-------------------------------------------|--------------|--------------|------------|
| <i>Bifidobacterium spp.</i>               | ✓            |              | 9.6%       |
| <i>Streptococcus uberis</i>               | ✓            |              | 12.9%      |
| <i>Streptococcus intermedius</i>          | ✓            |              | 6.4%       |
| <i>Clostridium beijerinckii/butyricum</i> | ✓            |              | 9.6%       |
| <i>Enterococcus faecium</i>               | ✓            |              | 6.4%       |
| <i>Enterococcus faecalis</i>              | ✓            |              | 6.4%       |
| <i>Actinomyces naeslundii</i>             | ✓            |              | 3.2%       |
| <i>Streptococcus mitis</i>                | ✓            |              | 3.2%       |
| <i>Porphyromonas asaccharolytica</i>      |              | ✓            | 3.2%       |
| <i>Clostridium sordellii</i>              | ✓            |              | 3.2%       |
| <i>Enterococcus durans</i>                | ✓            |              | 3.2%       |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i>          | ✓            |              | 6.4%       |
| <i>Streptococcus salivarius</i>           | ✓            |              | 3.2%       |
| <i>Aerococcus viridans</i>                | ✓            |              | 12.9%      |
| <i>Streptococcus anginosus</i>            | ✓            |              | 3.2%       |
| <i>Globicatella sanguinis</i>             | ✓            |              | 3.2%       |
| <i>Candida albicans</i>                   | ✓            |              | 3.2%       |

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”**

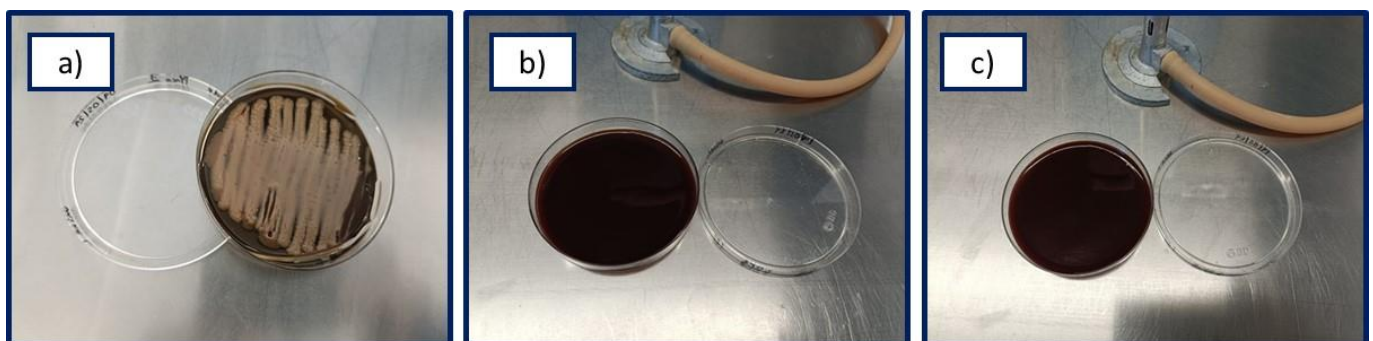


**Gráfica 1. Prevalencia de microorganismos**

### 6.3. Resultados de la prueba de ozono

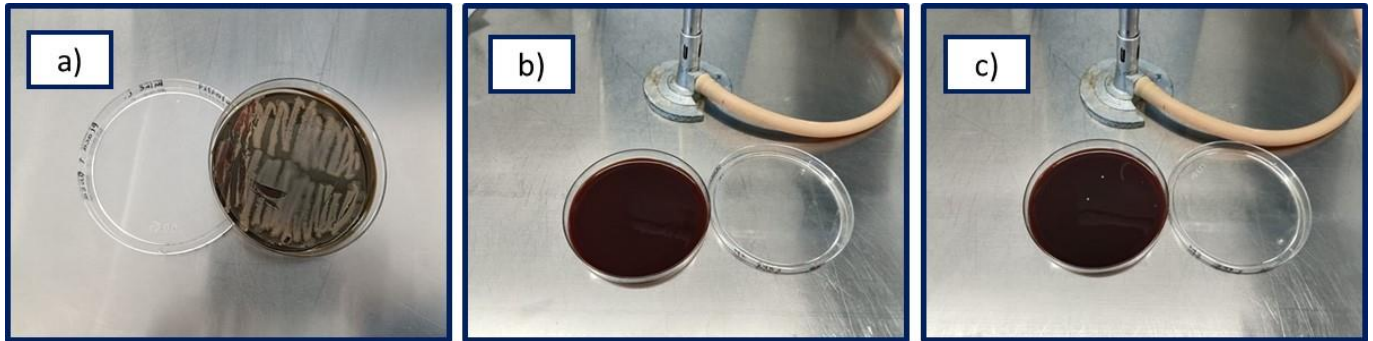
No se observó desarrollo de microorganismos a las 24 h, observándose los mismos resultados a las 72 h tanto en ozono líquido como en gas.

En la figura 73-76 se anexan los resultados de la ozonoterapia aplicada 240 s.

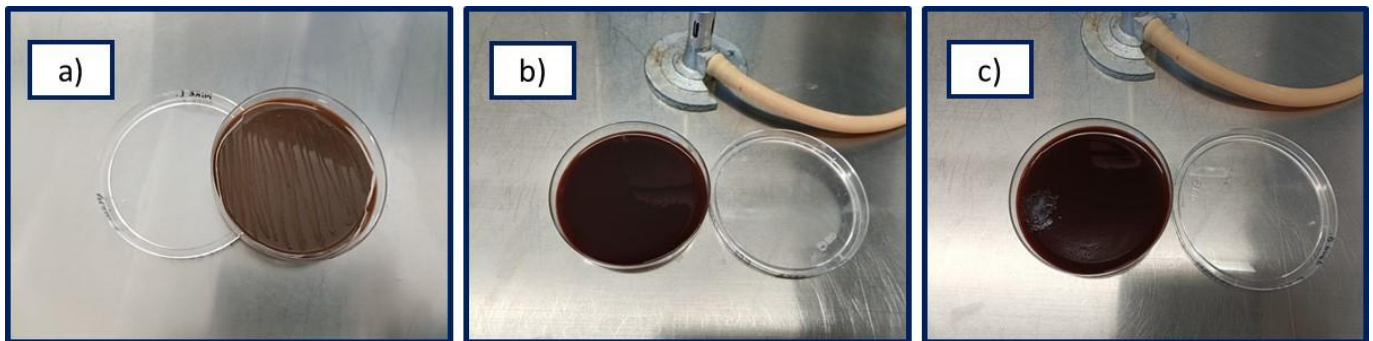


**Figura 73. a) Microorganismo 1: Bifidobacterium spp., b) Después de ozonificación en forma de gas a 240 s, c) Después de ozonificación en forma de líquido a 240 s**

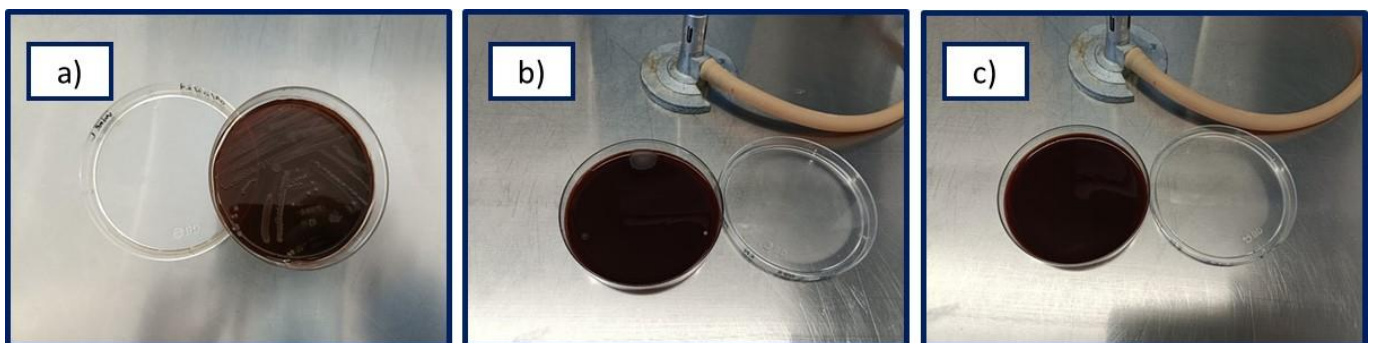
“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”



**Figura 74. a) Microorganismo 2: *Streptococcus uberis*, b) Después de ozonificación en forma de gas a 240 s, c) Después de ozonificación en forma de líquido a 240 s**



**Figura 75. a) Microorganismo 5: *Clostridium beijerinckii/butyricum* b) Después de ozonificación en forma de gas a 240 s, c) Después de ozonificación en forma de líquido a 240 s**

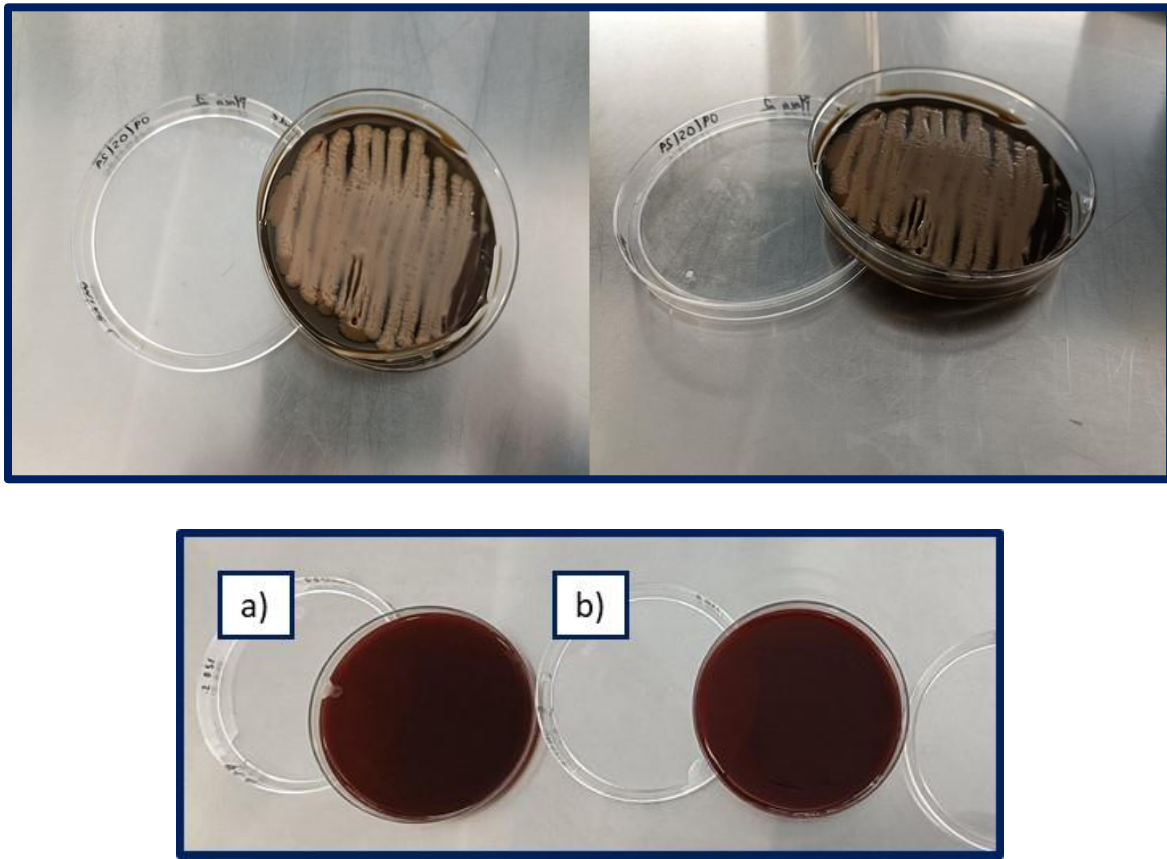


**Figura 76. a) Microorganismo 6: *Streptococcus intermedius*, b) Después de ozonificación en forma de gas a 240 s, c) Después de ozonificación en forma de líquido a 240 s**

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”

En la figura 77-95 se anexan los resultados de la ozonoterapia aplicada a 120 s.

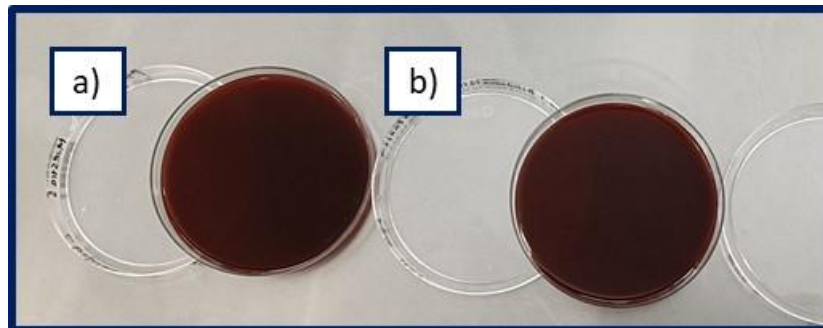
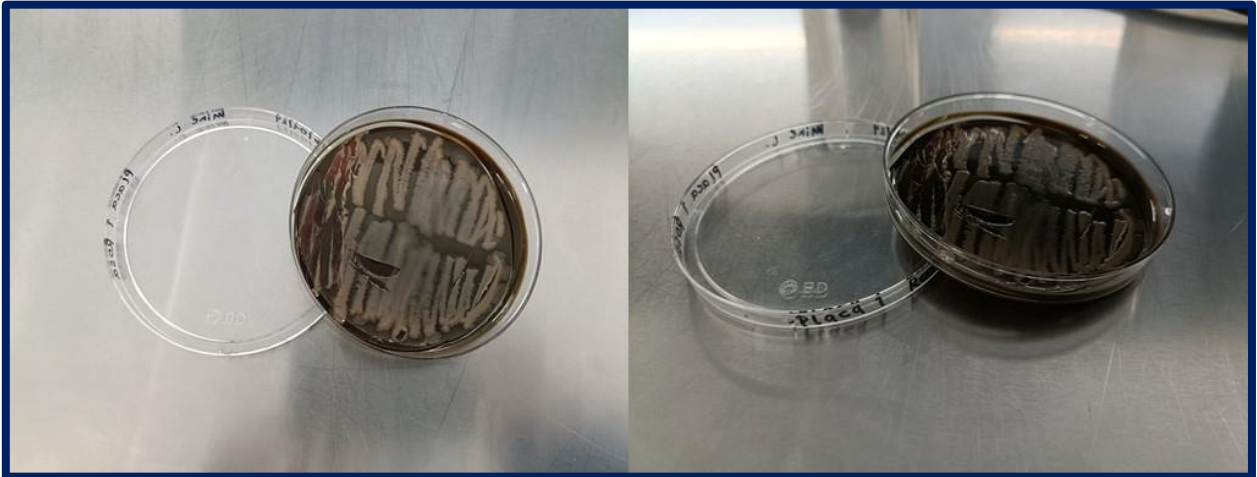
Microorganismo 1: *Bifidobacterium spp.*



**Figura 77. Placas CDC sembradas posterior a ozonificación a) 120 s en forma de gas, b) 120 s en forma acuosa**

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”

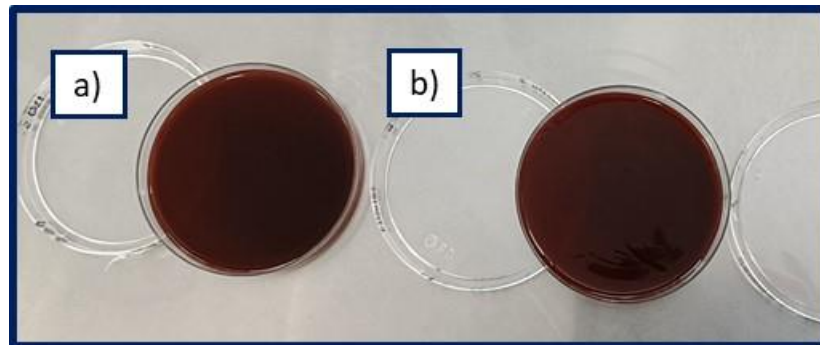
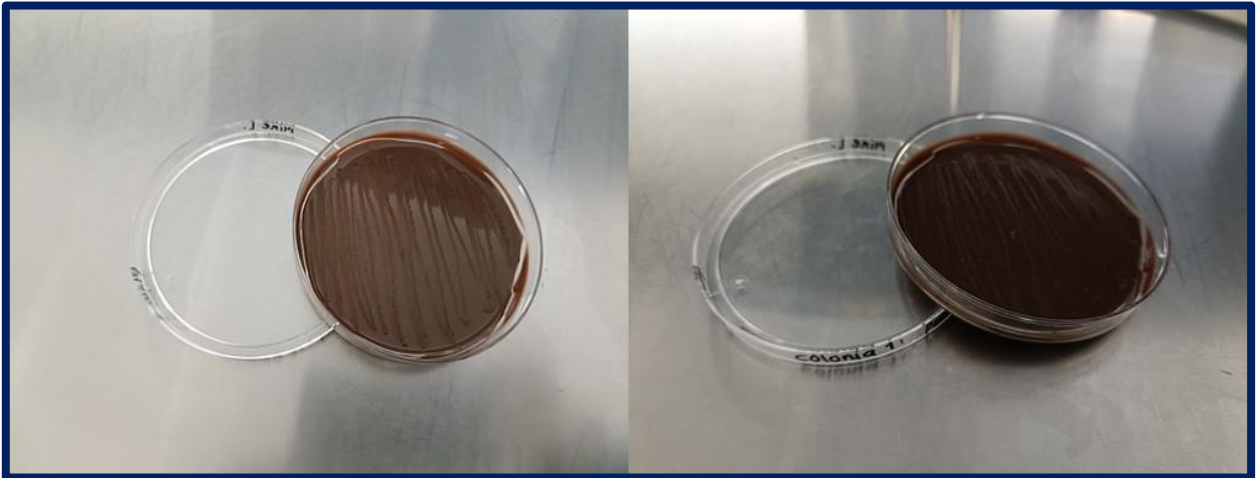
Microorganismo 2: *Streptococcus uberis*



**Figura 78. Placas CDC sembradas posterior a ozonificación a) 120 s en forma de gas, b) 120 s en forma acuosa**

"EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS"

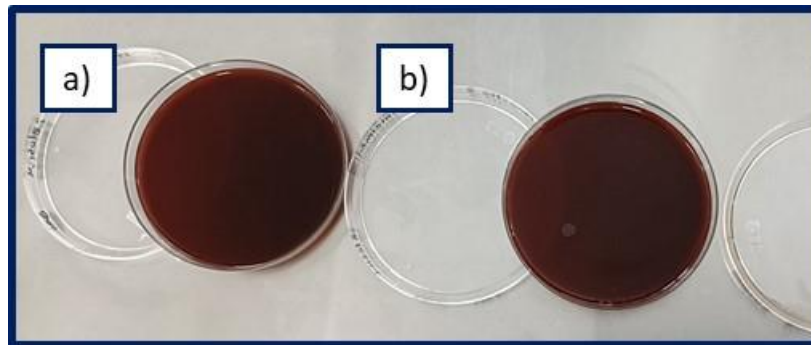
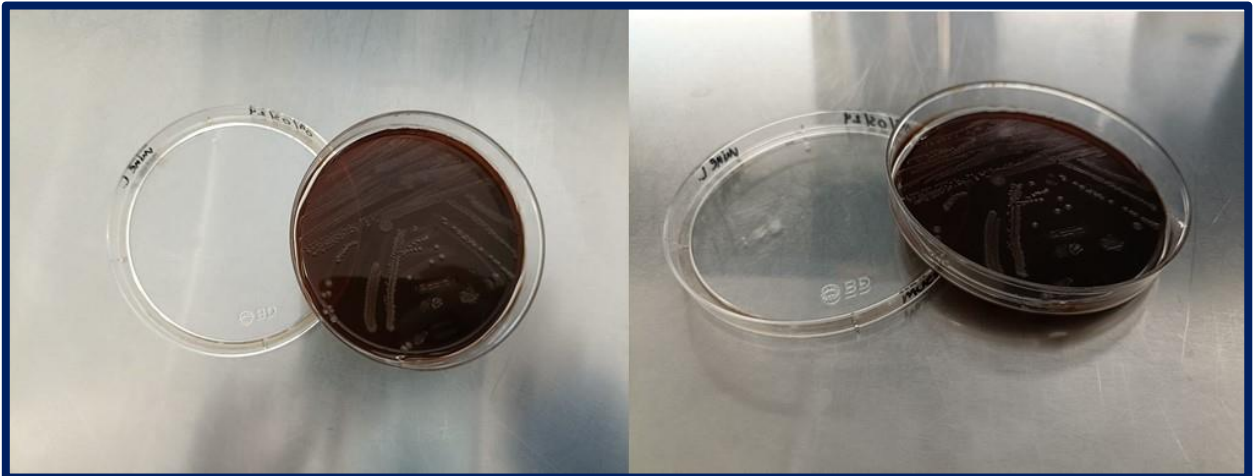
Microorganismo 5: *Clostridium beijerinckii/butyricum*



**Figura 79. Placas CDC sembradas posterior a ozonificación a) 120 s en forma de gas, b) 120 s en forma acuosa**

"EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS"

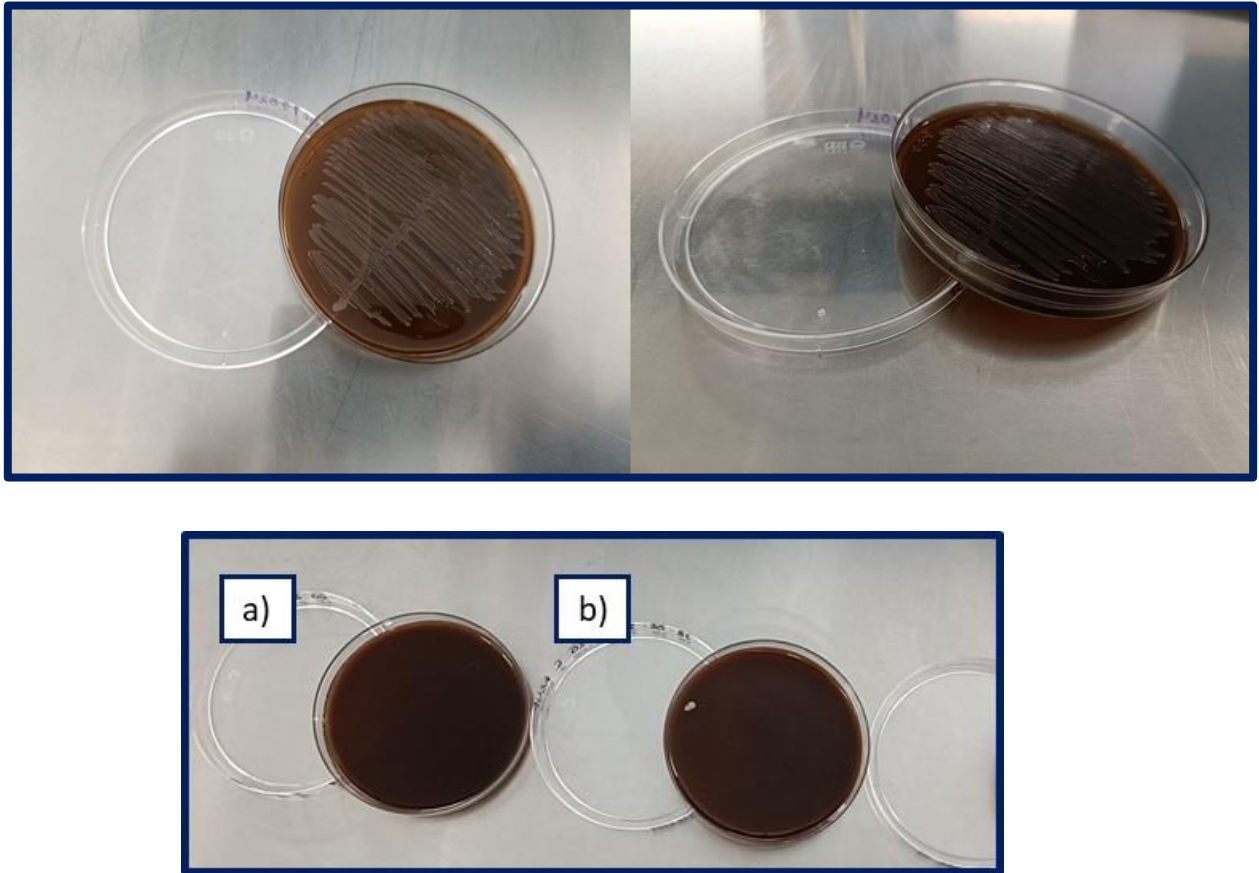
Microorganismo 6: *Streptococcus intermedius*



**Figura 80.** Placas CDC sembradas posterior a ozonificación a) 120 s en forma de gas, b) 120 s en forma acuosa

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”

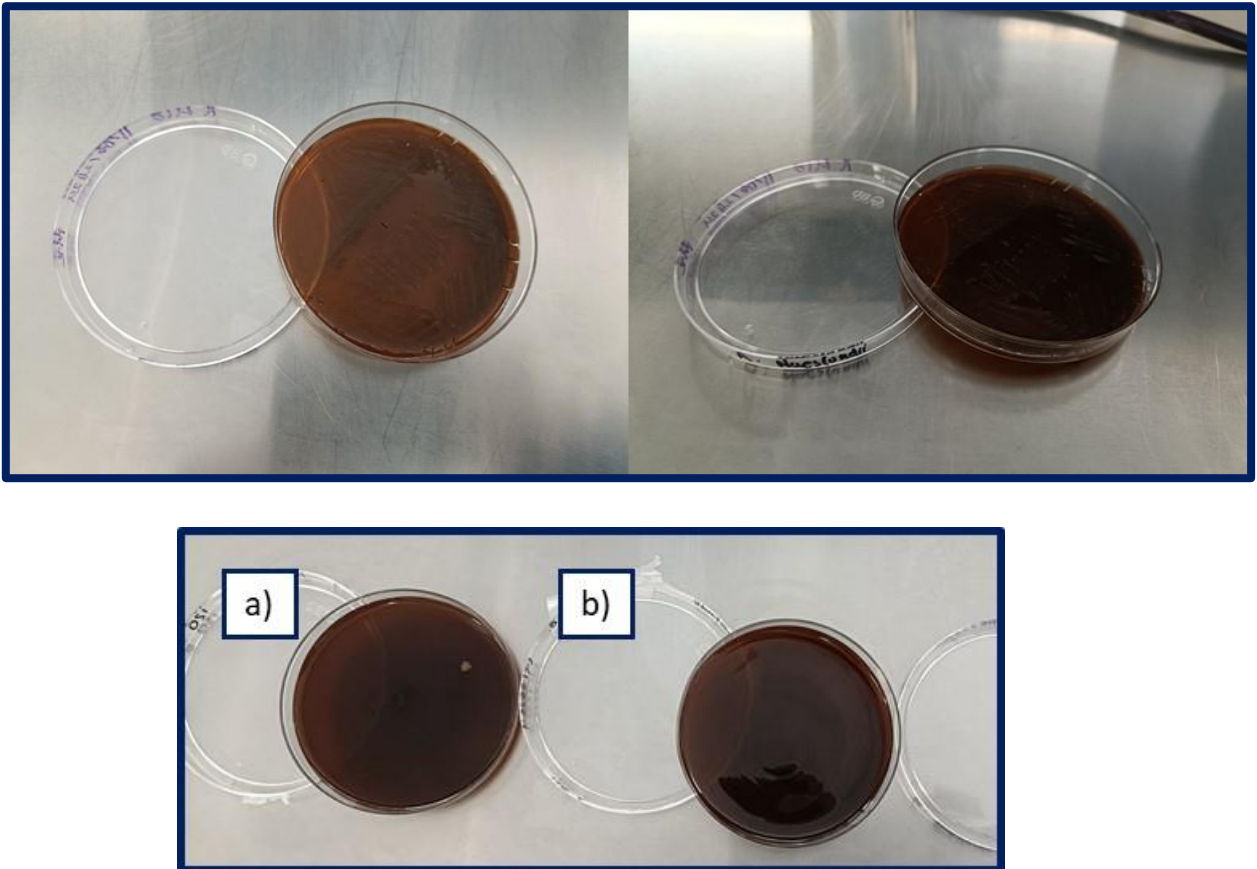
Microorganismo 8: *Enterococcus faecalis*



**Figura 81. Placas CDC sembradas posterior a ozonificación a) 120 s en forma de gas, b) 120 s en forma acuosa**

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”

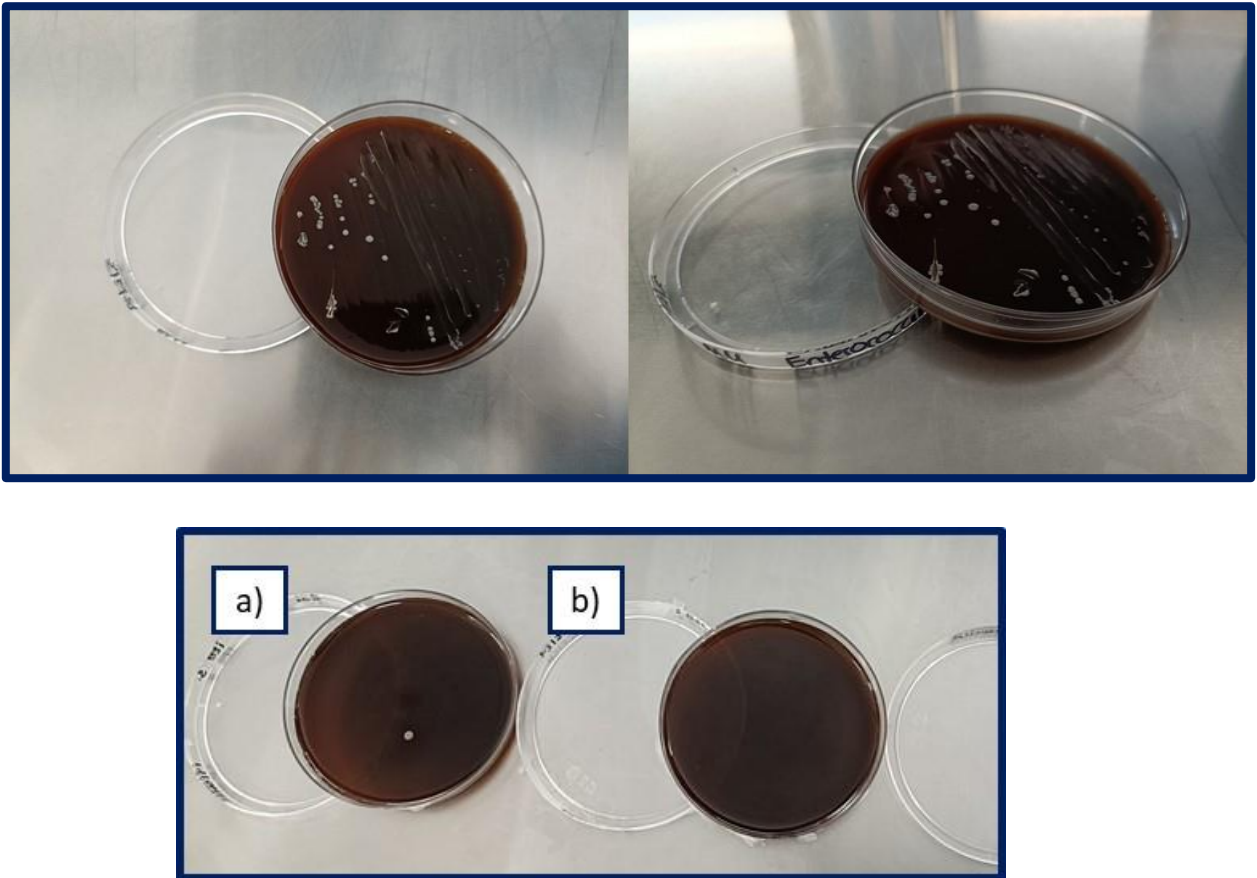
Microorganismo 11: *Actinomyces naeslundii*



**Figura 82. Placas CDC sembradas posterior a ozonificación a) 120 s en forma de gas, b) 120 s en forma acuosa**

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”

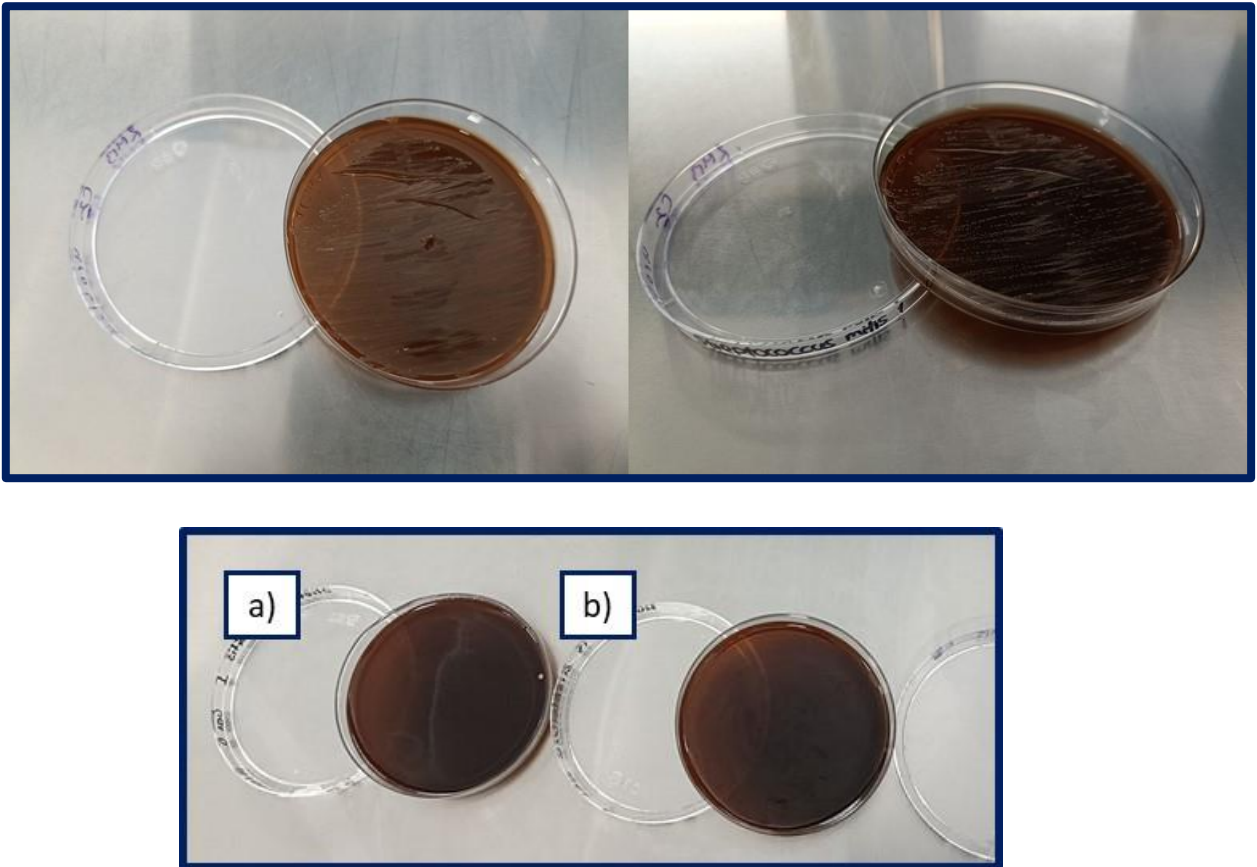
Microorganismo 12: *Enterococcus faecium*



**Figura 83. Placas CDC sembradas posterior a ozonificación a) 120 s en forma de gas, b) 120 s en forma acuosa**

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”

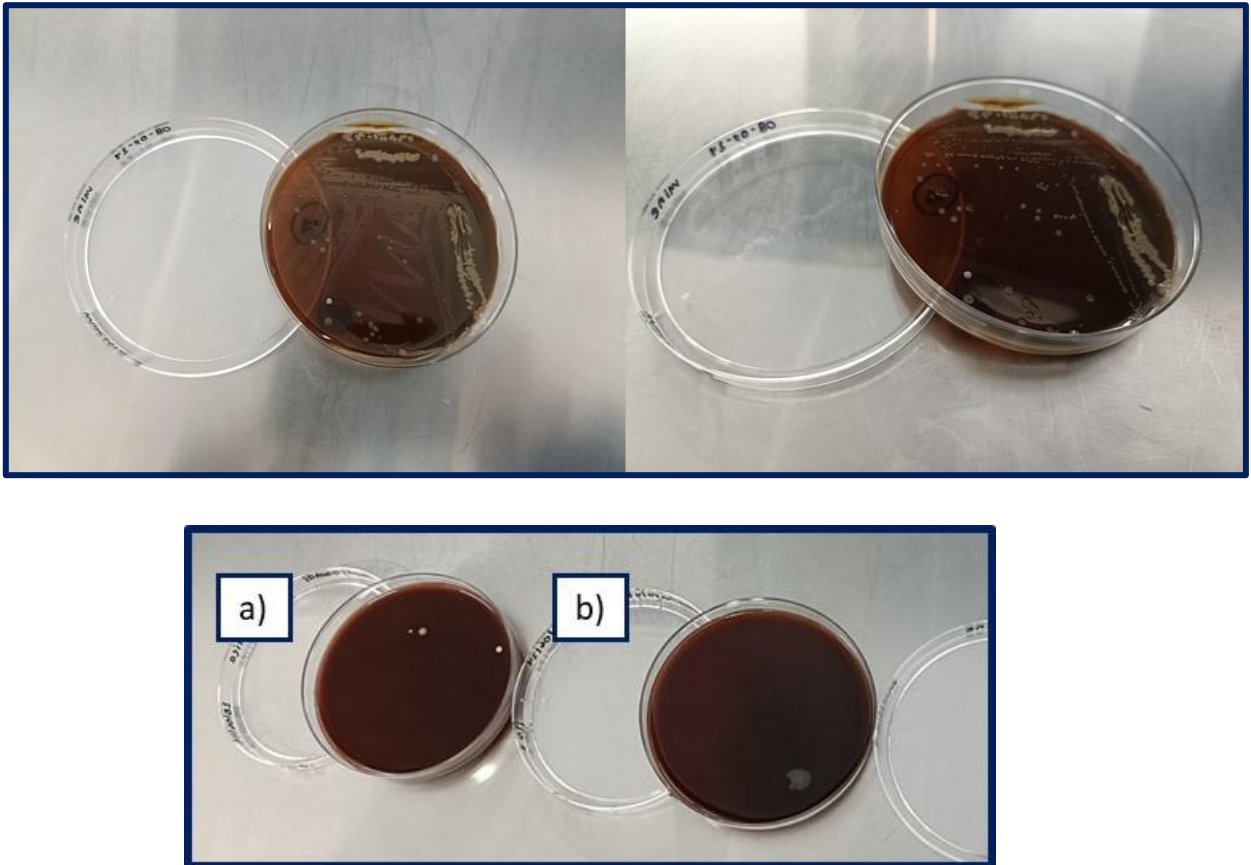
Microorganismo 15: *Streptococcus mitis*



**Figura 84. Placas CDC sembradas posterior a ozonificación a) 120 s en forma de gas, b) 120 s en forma acuosa**

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”

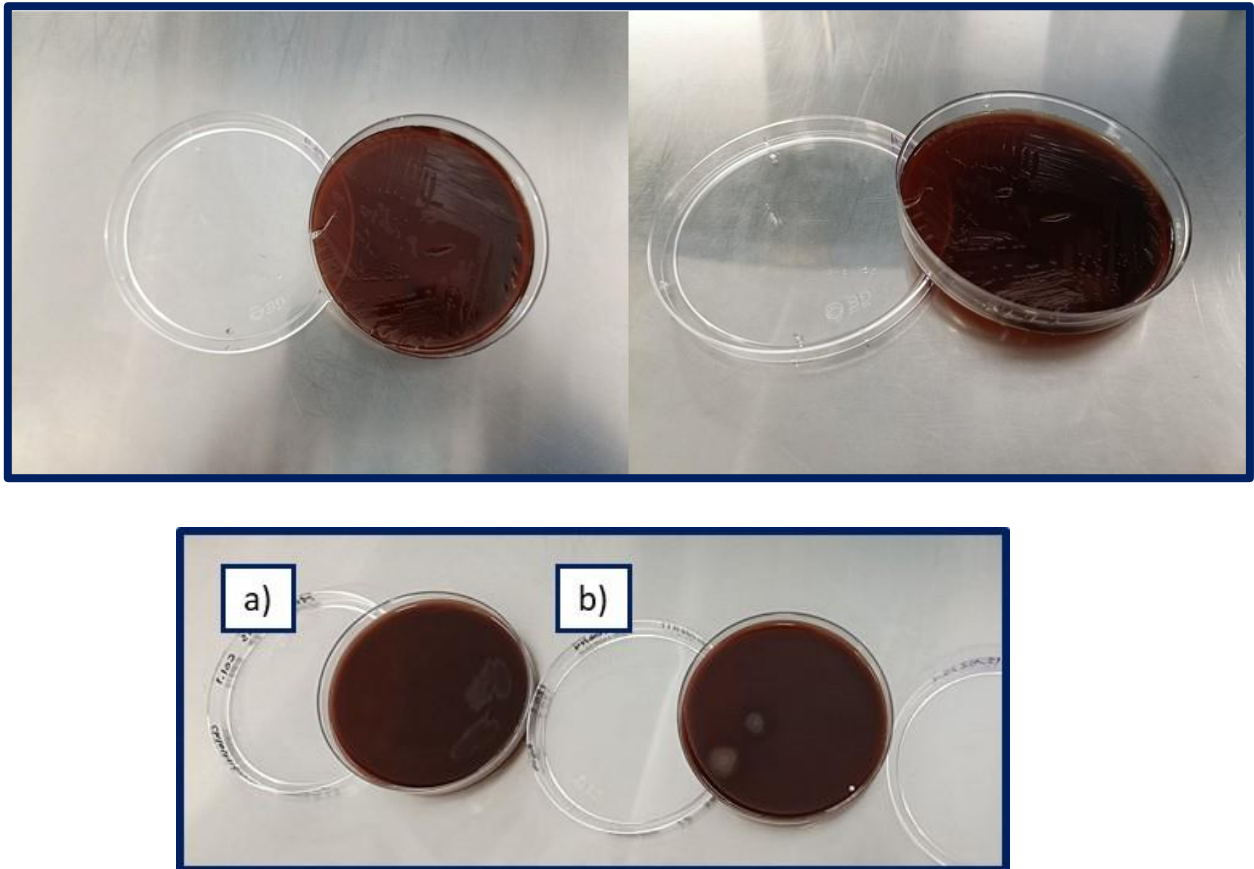
Microorganismo 16: *Porphyromonas asaccharolytica*



**Figura 85. Placas CDC sembradas posterior a ozonificación a) 120 s en forma de gas, b) 120 s en forma acuosa**

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”

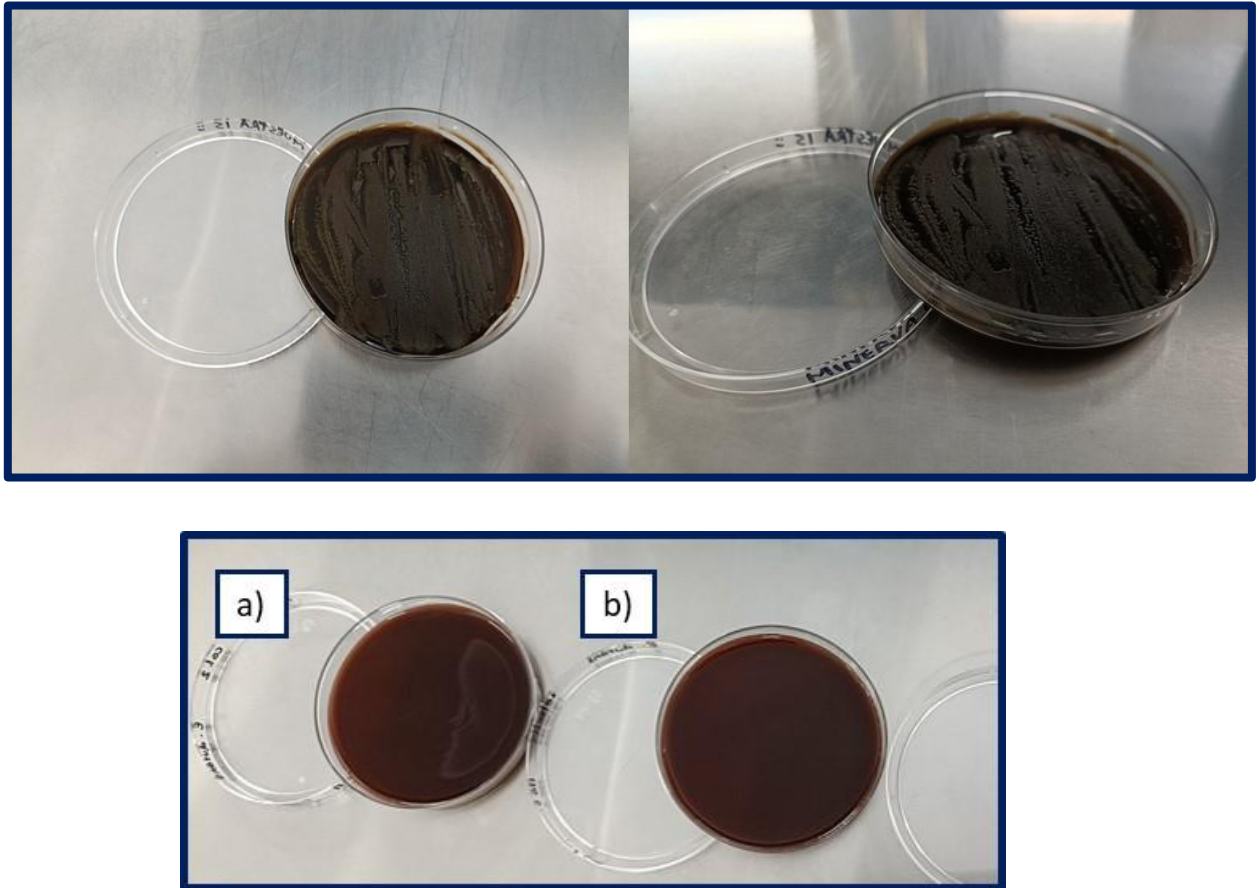
Microorganismo 17: *Clostridium sordellii*



**Figura 86. Placas CDC sembradas posterior a ozonificación a) 120 s en forma de gas, b) 120 s en forma acuosa**

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”

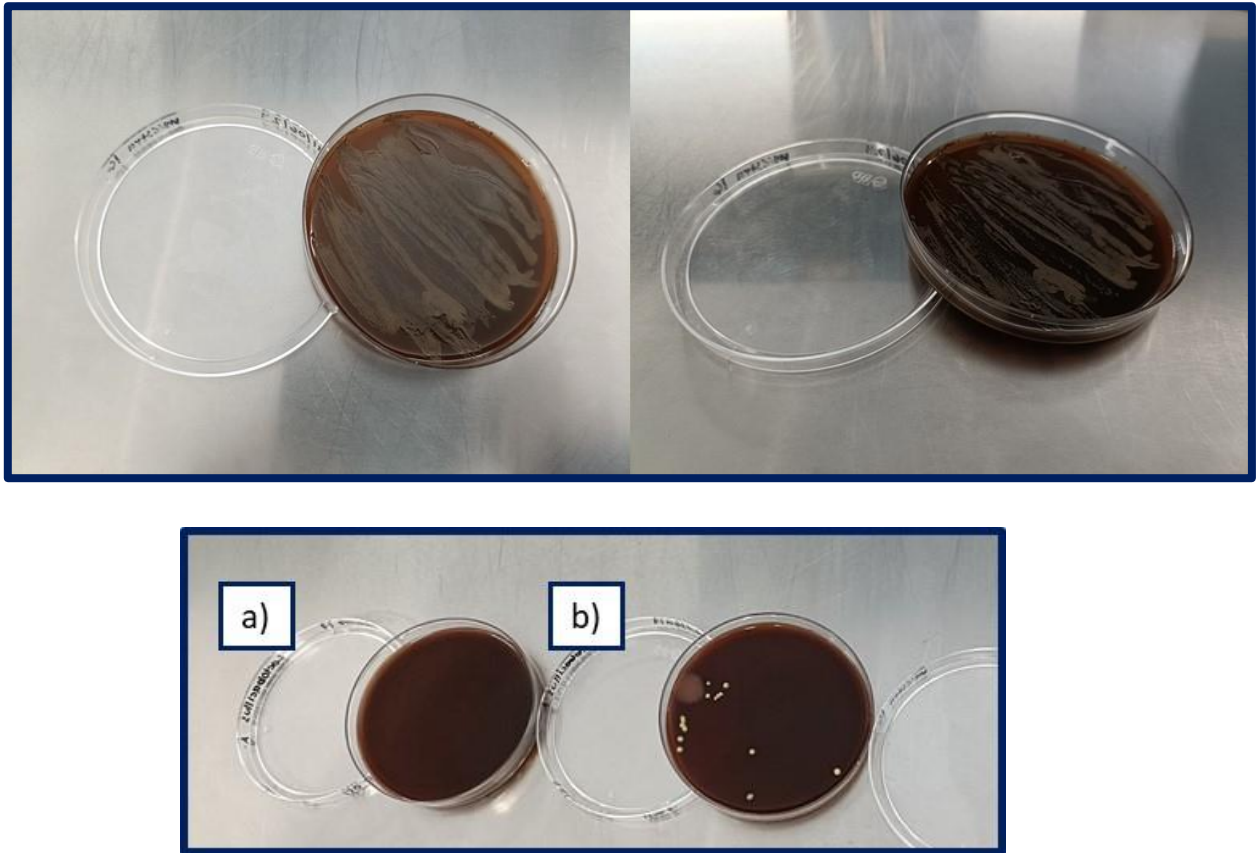
Microorganismo 18: *Enterococcus durans*



**Figura 87. Placas CDC sembradas posterior a ozonificación a) 120 s en forma de gas, b) 120 s en forma acuosa**

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”

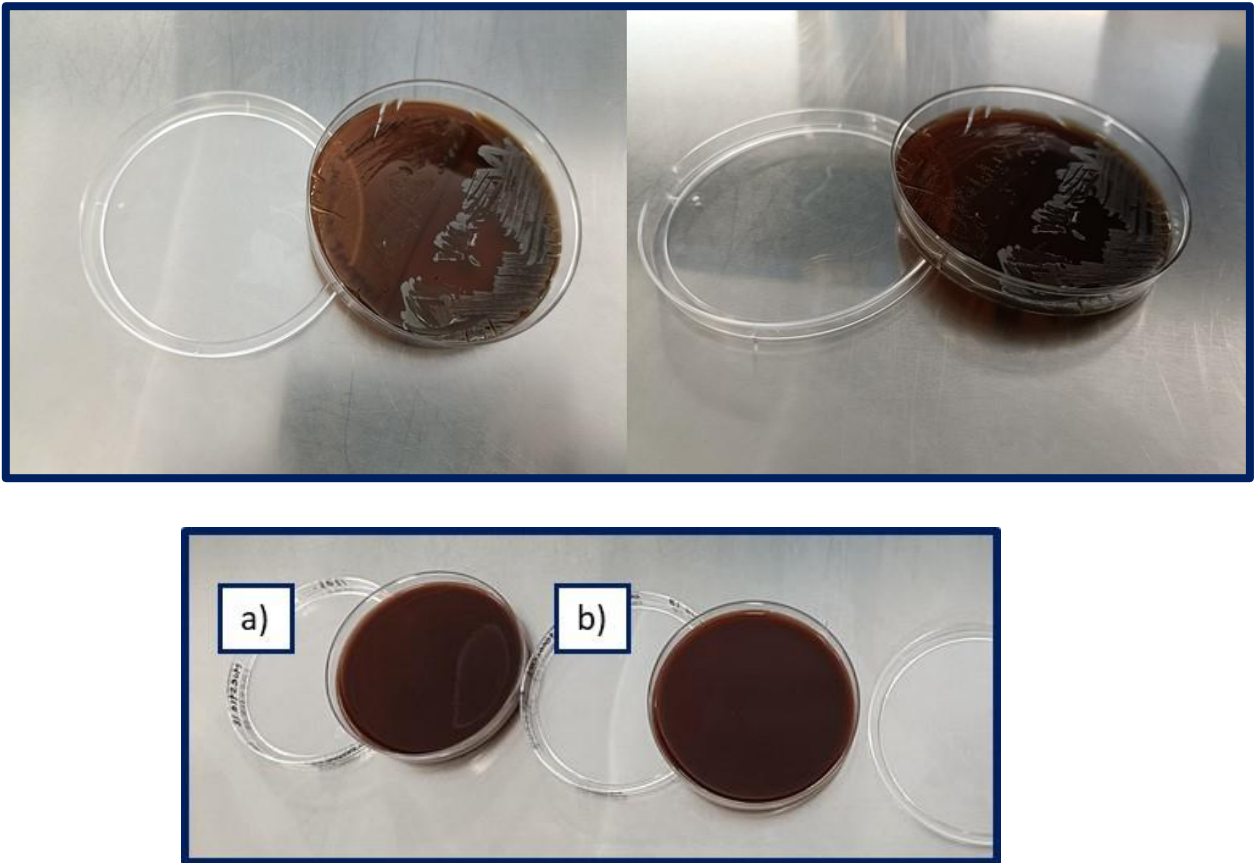
Microorganismo 19: *Lactobacillus acidophilus*



**Figura 88. Placas CDC sembradas posterior a ozonificación a) 120 s en forma de gas, b) 120 s en forma acuosa**

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”

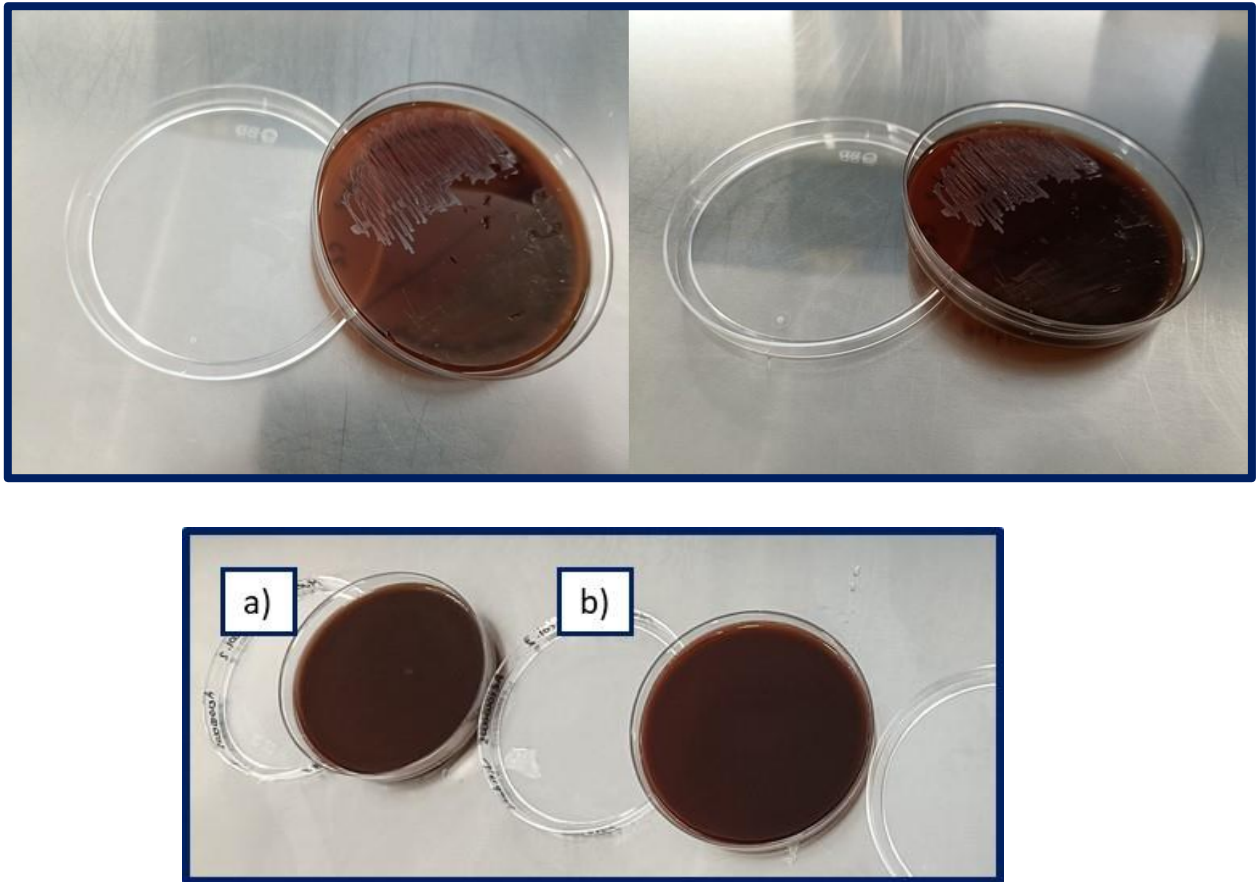
Microorganismo 21: *Streptococcus salivarius*



**Figura 89. Placas CDC sembradas posterior a ozonificación a) 120 s en forma de gas, b) 120 s en forma acuosa**

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”

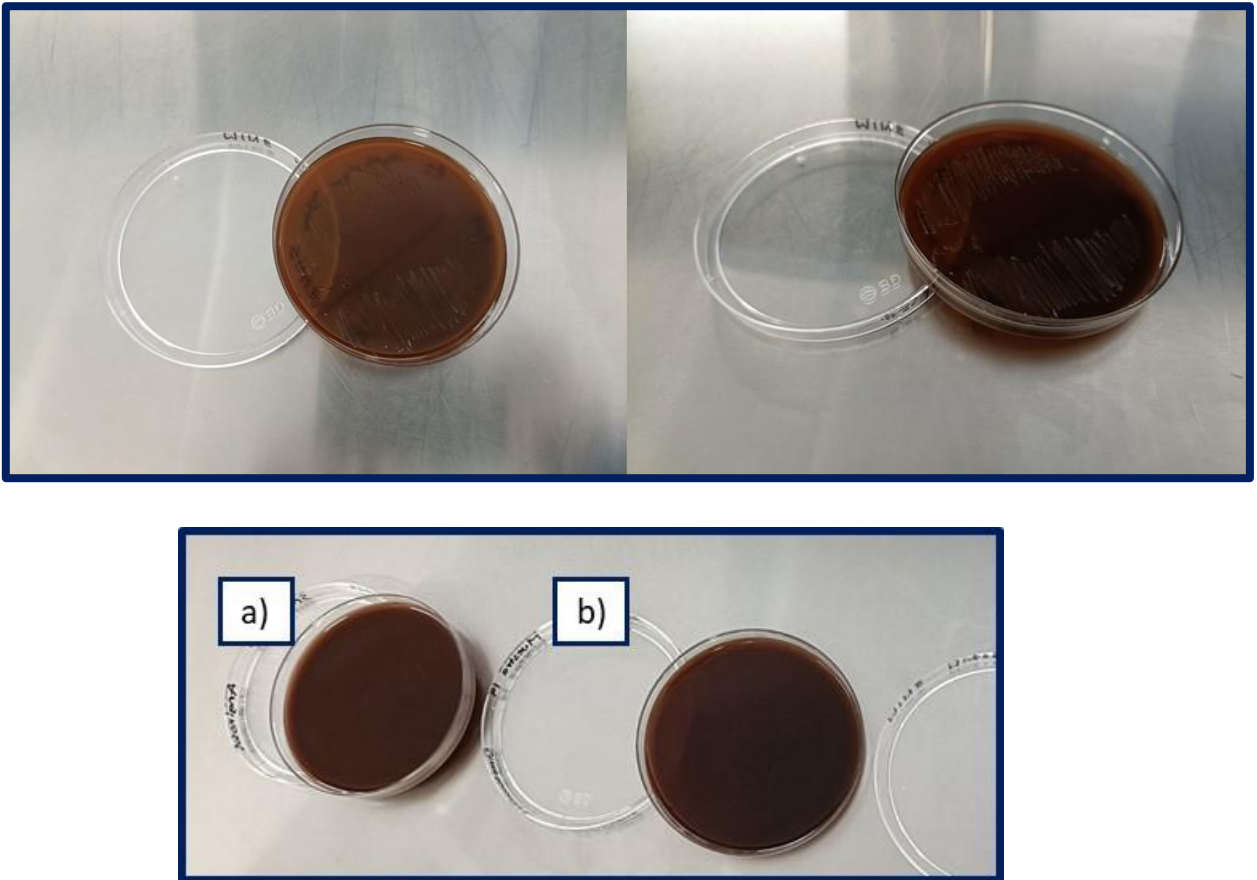
Microorganismo 22: *Aerococcus viridans*



**Figura 90. Placas CDC sembradas posterior a ozonificación a) 120 s en forma de gas, b) 120 s en forma acuosa**

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”

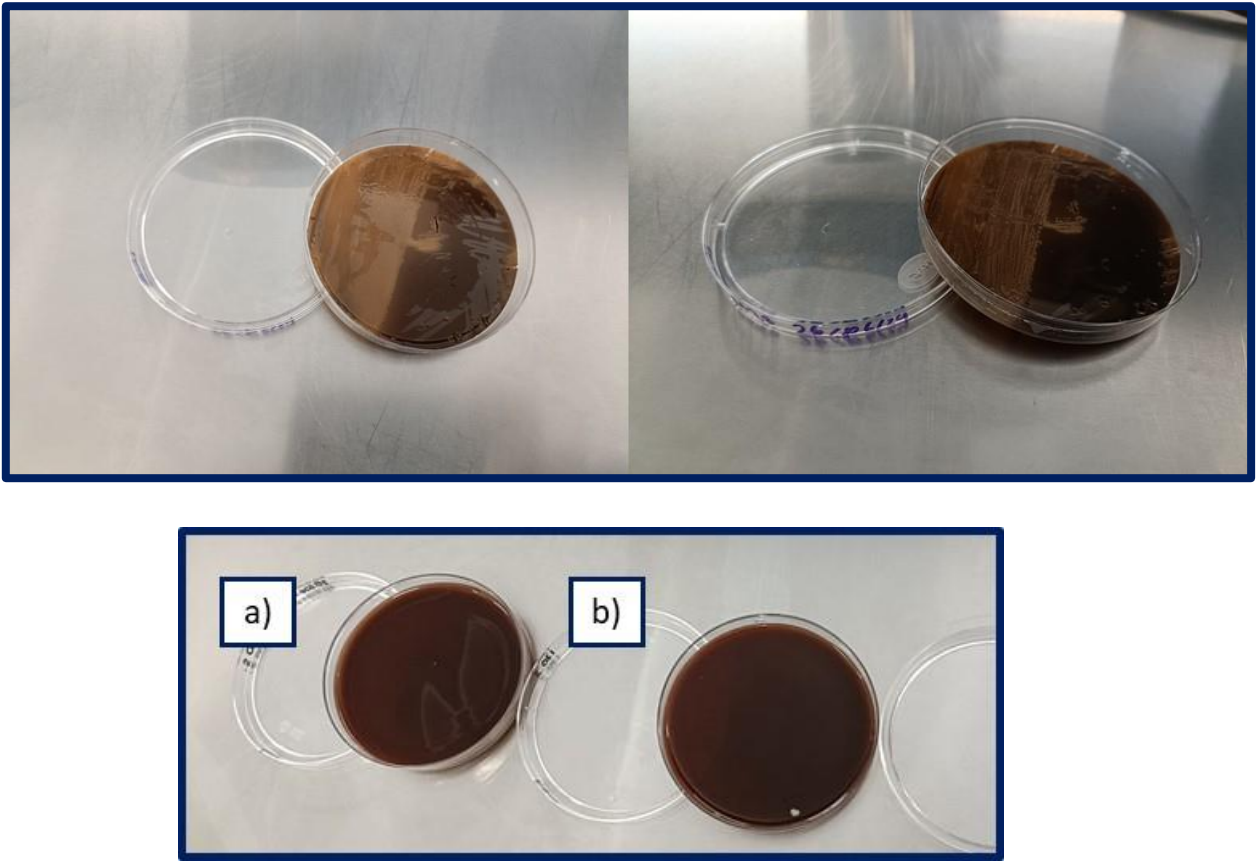
Microorganismo 23: *Streptococcus anginosus*



**Figura 91. Placas CDC sembradas posterior a ozonificación a) 120 s en forma de gas, b) 120 s en forma acuosa**

"EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS"

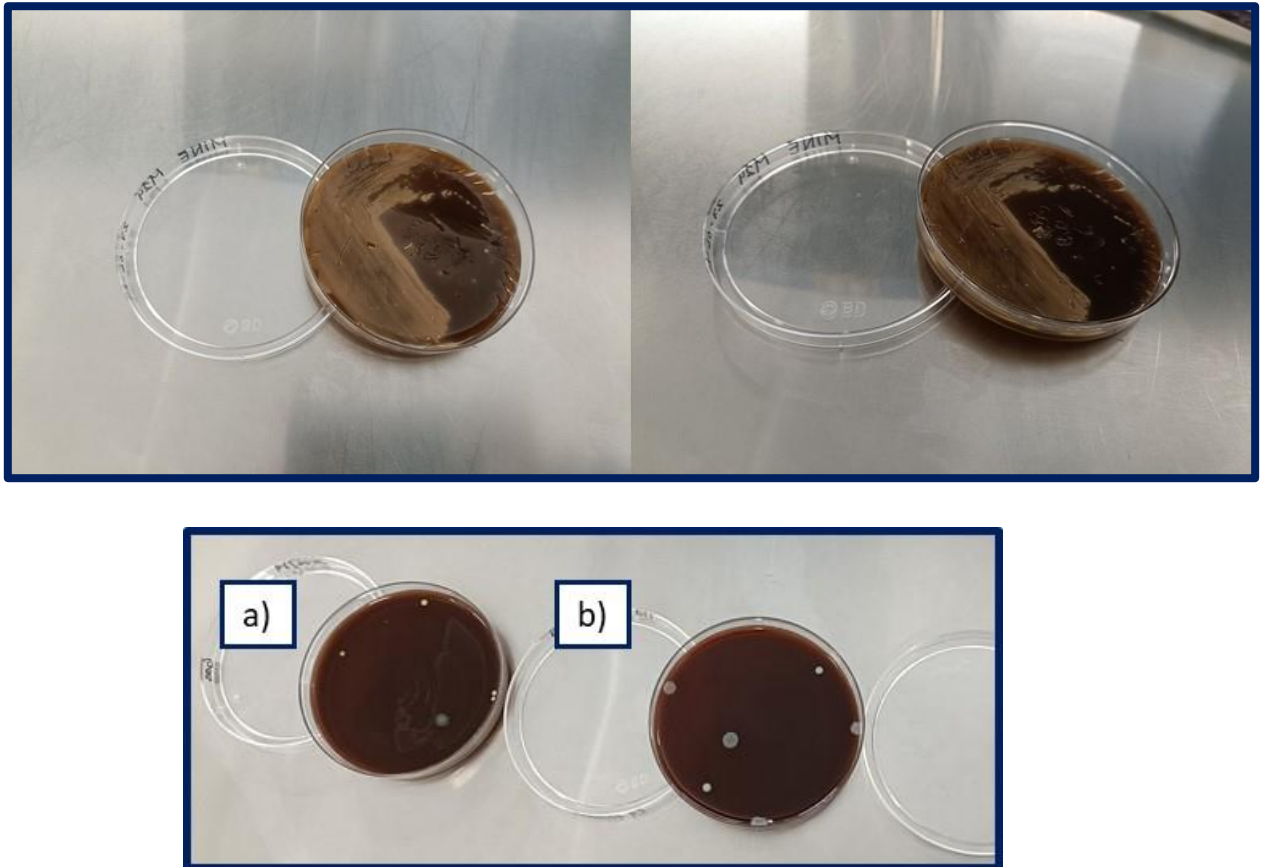
Microorganismo 27: *Aerococcus viridans*



**Figura 92. Placas CDC sembradas posterior a ozonificación a) 120 s en forma de gas, b) 120 s en forma acuosa**

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”

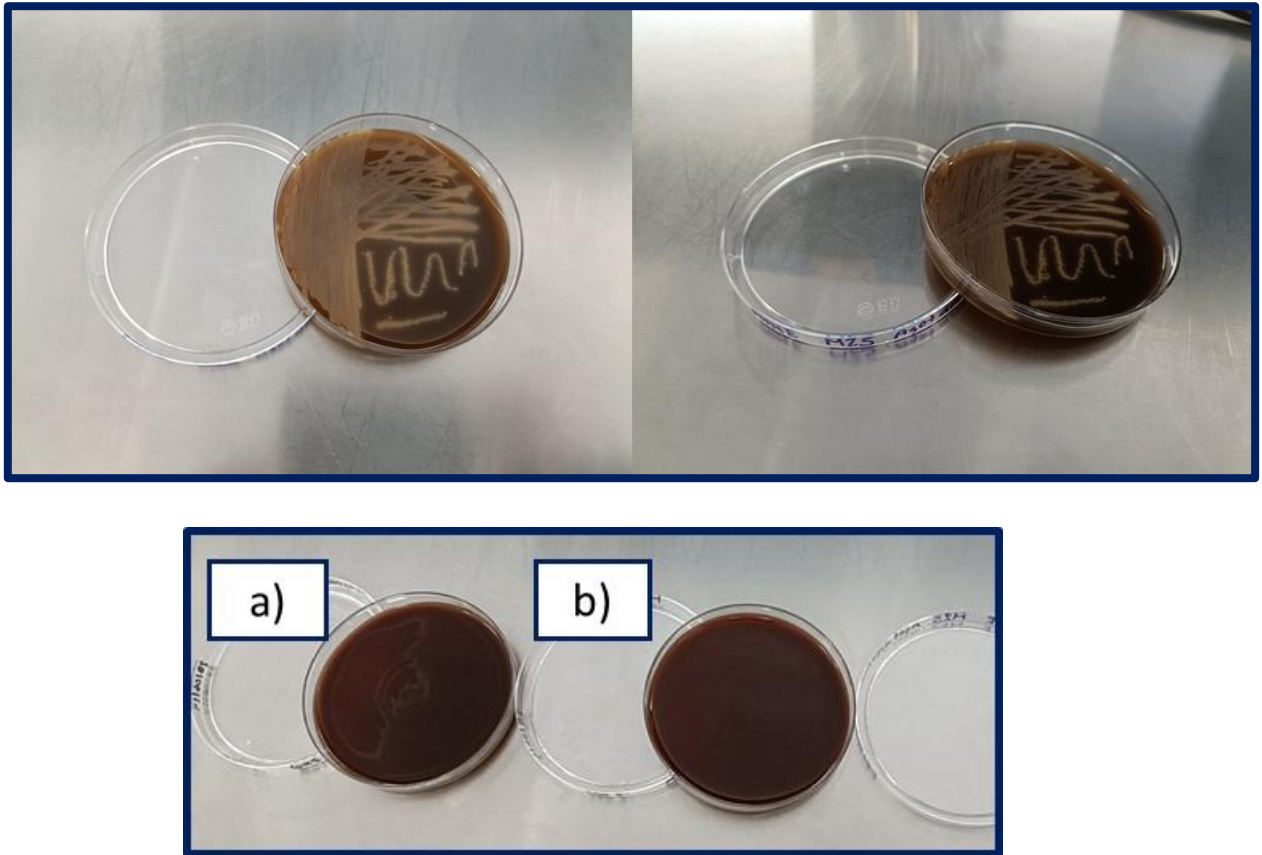
Microorganismo 29: *Globicatella sanguinis*



**Figura 93. Placas CDC sembradas posterior a ozonificación a) 120 s en forma de gas, b) 120 s en forma acuosa**

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”

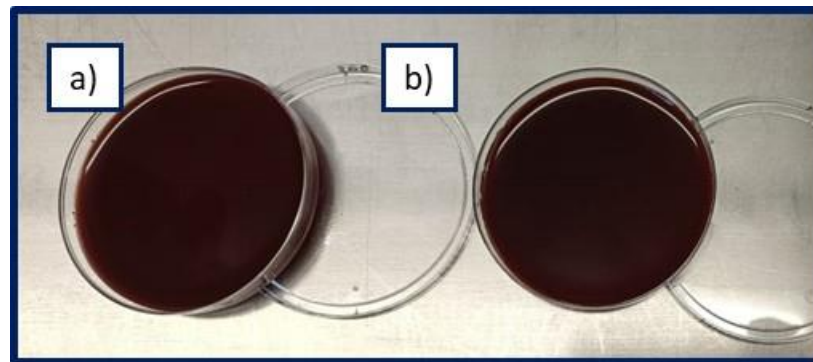
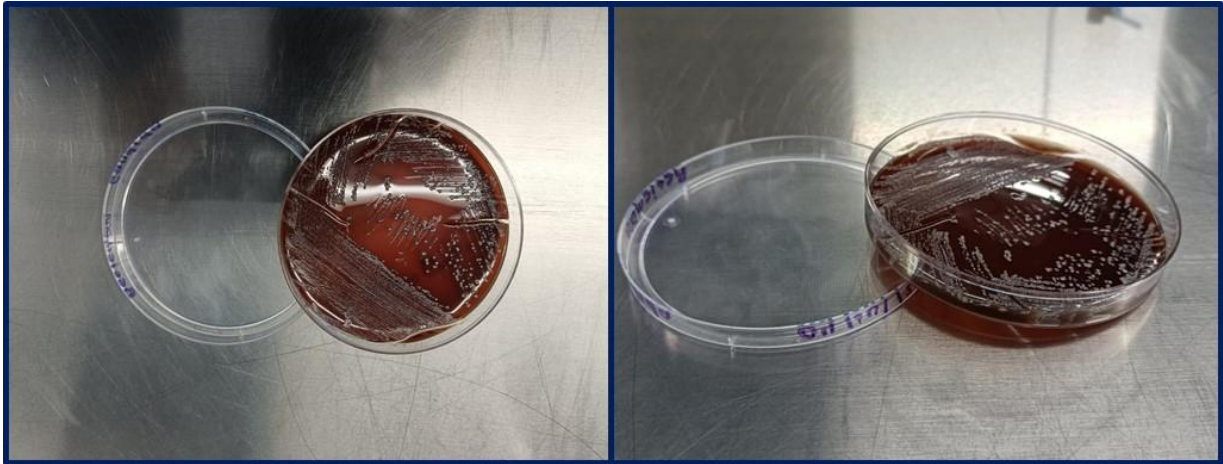
Microorganismo 30: *Aerococcus viridans*



**Figura 94. Placas CDC sembradas posterior a ozonificación a) 120 s en forma de gas, b) 120 s en forma acuosa**

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”

Microorganismo 31: *Candida albicans*



**Figura 95. Placas CDC sembradas posterior a ozonificación a) 120 s en forma de gas, b) 120 s en forma acuosa**

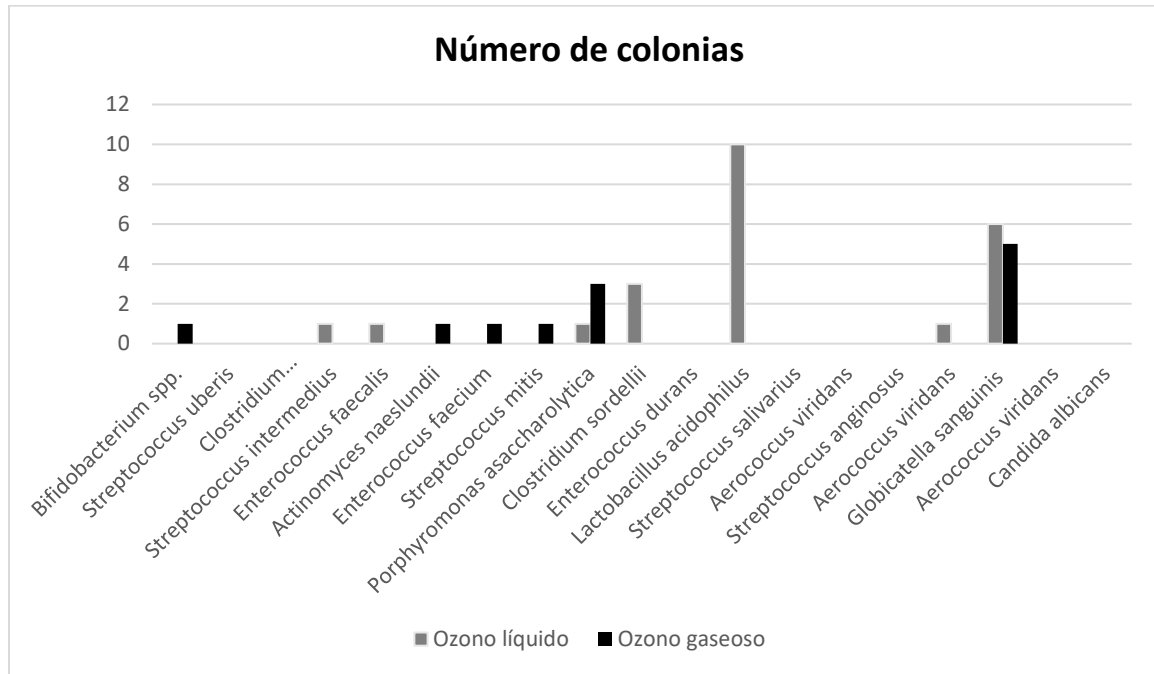
“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”

El conteo de UFC’S en las placas posterior al ozono tanto en líquido como en gas se resumen en la tabla inferior: (Tabla 4, Gráfica 2)

**Tabla 4. Microorganismos utilizados y cantidad de colonias presentes posterior a la ozonoterapia durante 120 s**

| Número de microorganismo | Nombre de microorganismo identificado     | Número de colonias con Ozono líquido (120 s) | Número de colonias con Gas (120 s) |
|--------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------|
| 1                        | <i>Bifidobacterium spp.</i>               | 0                                            | 1                                  |
| 2                        | <i>Streptococcus uberis</i>               | 0                                            | 0                                  |
| 5                        | <i>Clostridium beijerinckii/butyricum</i> | 0                                            | 0                                  |
| 6                        | <i>Streptococcus intermedius</i>          | 1                                            | 0                                  |
| 8                        | <i>Enterococcus faecalis</i>              | 1                                            | 0                                  |
| 11                       | <i>Actinomyces naeslundii</i>             | 0                                            | 1                                  |
| 12                       | <i>Enterococcus faecium</i>               | 0                                            | 1                                  |
| 15                       | <i>Streptococcus mitis</i>                | 0                                            | 1                                  |
| 16                       | <i>Porphyromonas asaccharolytica</i>      | 1                                            | 3                                  |
| 17                       | <i>Clostridium sordellii</i>              | 3                                            | 0                                  |
| 18                       | <i>Enterococcus durans</i>                | 0                                            | 0                                  |
| 19                       | <i>Lactobacillus acidophilus</i>          | >10                                          | 0                                  |
| 21                       | <i>Streptococcus salivarius</i>           | 0                                            | 0                                  |
| 22                       | <i>Aerococcus viridans</i>                | 0                                            | 0                                  |
| 23                       | <i>Streptococcus anginosus</i>            | 0                                            | 0                                  |
| 27                       | <i>Aerococcus viridans</i>                | 1                                            | 0                                  |
| 29                       | <i>Globicatella sanguinis</i>             | 6                                            | 5                                  |
| 30                       | <i>Aerococcus viridans</i>                | 0                                            | 0                                  |
| 31                       | <i>Candida albicans</i>                   | 0                                            | 0                                  |

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE MICROORGANISMOS AISLADOS E IDENTIFICADOS DE INFECCIONES ENDODÓNTICAS”**



**Gráfica 2. Número de colonias posterior a la ozonificación 120 s**

## 7. DISCUSIÓN

El objetivo de este proyecto fue probar una opción diferente a las convencionales para la eliminación de microorganismos del conducto radicular con infección primaria o secundaria. Según Barczyk y col., en el 2023 la ozonoterapia aplicada en el área endodóntica se considera una técnica moderna e innovadora.(42) Holliday y col., en el 2017 menciona que el ozono ha surgido como un nuevo agente antimicrobiano potente y fiable contra bacterias, hongos, protozoos y virus.(13)

En el mercado existen diferentes equipos que producen ozono para uso específico durante el tratamiento de endodoncia. Silva y col., en 2020 presentaron una revisión sistemática al respecto donde se evaluó la reducción de la carga microbiana en pacientes sometidos a tratamiento endodóntico. En la literatura revisada se utilizaron equipos de ozonoterapia que poseen poca portabilidad al ser artefactos espaciosos y de alto costo, además de que los fabricantes recomiendan mantenimiento preventivo cada 3, 6 y 12 meses resultando en un costo adicional.(19)

Tandan y col., en el 2012 citan equipos disponibles en el mercado, mencionando que algunos dispositivos fueron descontinuados y suspendidos de su licencia de uso al no considerar que tuvieran un diseño adecuado para poder regular la cantidad de ozono emitida.(41) Actualmente no se cuenta con alguna información por parte de la secretaria de salud mexicana acerca de la regulación de los equipos de ozonoterapia, pero en la revisión de literatura se ubica un artículo publicado por el Ministerio de Sanidad de la Dirección General de Salud Pública, Calidad e Innovación en España donde se menciona que el ozono es considerado un biocida generado in situ, por lo que su comercialización y uso están regulados por el Reglamento 528/2012, de 22 de mayo de 2012, el cual es relativo a la comercialización y el uso de los biocidas. El ozono generado a partir de oxígeno, cae dentro del alcance de la aplicación del artículo 93 de dicho Reglamento, de manera que, habiéndose presentado al menos un expediente a la fecha indicada en

dicho artículo, los dispositivos que lo generan con intención biocida pueden seguir comercializándose siguiendo la normativa nacional. Además, que esta Norma consta de una clasificación de uso, en la que se menciona el empleo sobre alimentos. En la búsqueda de un equipo basado en el mismo principio de generación de ozono se llegó a la elección de utilizar un equipo para empleo doméstico, realizando una modificación para su aplicación como biocida de microorganismos encontrados en infecciones endodónticas. Por lo que se realizó la esterilización de todos los aditivos del equipo demostrando con ello la obtención de la producción de un ozono químicamente puro, ya que las pruebas control aseguraron que no se presentó contaminación ambiental en las muestras.(43)

Realizando el análisis de los resultados obtenidos con este dispositivo de bajo costo y accesible al público se obtuvieron resultados semejantes a los equipos de alto costo, mala portabilidad y con necesidad de mantenimiento constante.

Con respecto al tiempo de exposición del ozono sobre la eliminación de microorganismos endodónticos Mehta y col., en el 2018, Case y col., en el 2012, Ihsan y col., en el 2014, Pinheiro y col., en el 2018 utilizando los equipos comerciales refieren diferentes tiempos en la ozonificación, sin embargo no existe una unificación en cuanto tiempo real para su uso. En la presente investigación se tomó el menor tiempo establecido por Peter Case y col., basado en un menor tiempo de exposición en caso de presentar capacidad citotóxica, menor tiempo de trabajo y capacidad antimicrobiana semejante a tiempos más largos.(6,7,34,38)

En cuanto al estado físico de ozono tanto líquido como gas, autores como Moraes y col., en el 2021 mencionan que la ozonoterapia se ha utilizado en medicina para diferentes patologías en ambos estados. Los autores mencionan en su estudio conteos bacterianos pre y post irrigación con técnicas de PCR encontrando no diferencias significativas.(22) Estos hallazgos concuerdan con los resultados de la presente investigación, ya que no se observó variaciones con respecto a la

desinfección entre ambos tipos de ozono empleados a pesar de que las técnicas de identificación fueron diferentes.

Las infecciones endodónticas primarias se presentan cuando los microorganismos ingresan a la cavidad pulpar a través de una lesión cariosa profunda, obturaciones desadaptadas, fracturas en el diente, a través de vasos sanguíneos desde la región apical o desde el periodonto. Mientras que la principal causa del fracaso endodóntico es la persistencia de microorganismos en el sistema de conductos radiculares, esta recontaminación puede deberse a restauraciones coronales u obturaciones de conductos insuficientes, así como la falta de asepsia durante el tratamiento de conducto primario. Tennert y col., en el 2014 nos mencionan que en la literatura existen diferentes estimaciones sobre el pronóstico del tratamiento de conducto oscilando entre aproximadamente el 62% y el 98%, dependiendo de los parámetros pre, intra y posoperatorios.(44) Los parámetros preoperatorios indican que la predicción sobre la respuesta del organismo ante el tratamiento disminuye dependiendo el diagnóstico clínico pulpar y periapical con la que se dictamine el órgano dentario a tratar, uno de estos parámetros es la presencia de microorganismos, los cuales pueden ganar resistencia contra los agentes desinfectantes y medicamentos endodónticos, aumentando el desafío de eliminarlos por completo. Por esta razón se seleccionaron pacientes con presencia de tales condiciones clínicas, debido a que dentro de la práctica el endodoncista se enfrenta a diversas condiciones pulpares y periapicales infecciosas provocadas por una múltiple variedad de microorganismos.

Fuhrmann y col., en el 2014 hablan sobre la detección de microorganismos en infecciones endodónticas, citando especies grampositivas y gramnegativas, con predominación de anaerobios obligados, mencionando que en su investigación por medio de PCR pudieron aislar 33 especies bacterianas aeróbicas y anaeróbicas de infecciones primarias y secundarias, siendo más frecuentes las bacterias grampositivas anaeróbicas. La mayoría de los conductos radiculares mostraron una

infección polimicrobiana que contenía bacilos gramnegativos y cocos anaeróbicos facultativos grampositivos. *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus mutans* fueron los aislados con mayor frecuencia (19%).(44) De estos datos se coincide con Fuhrmann que los microorganismos presentes en el conducto radicular en su mayoría fueron grampositivos y que la mayor parte de las bacterias localizadas fueron anaerobias. Los microorganismos con mayor prevalencia fueron *Streptococcus uberis* y *Aerococcus viridans* con un 12.9%. Estas bacterias han sido descritas como probables agentes patógenos oportunistas y nosocomiales. Jiang y col., informaron una infección odontogénica grave debido a *Aerococcus viridans* mientras que Wad y col., en el 2016 realizaron un estudio donde de las 33 cepas aisladas la cepa bacteriana predominante fue *Aerococcus viridans* con una participación significativa en infecciones apicales agudas y periodontitis. Esta bacteria aunque no forma parte de la flora orofaríngea, se ha aislado en infecciones odontogénicas, suele confundirse con *Streptococcus* o *Staphylococcus* y se describe como tal debido a sus características culturales y morfológicas muy similares, sin embargo, ha sido escasamente reportada en la literatura.(45) *Streptococcus uberis* es un patógeno oportunista en el ganado lechero, adaptado a condiciones ambientales desafiantes y capaz de una flexibilidad nutricional basada en múltiples opciones metabólicas. Se ha debatido la identificación de *Streptococcus uberis* en humanos, Dzink y col., en 1989 lo identificaron en tejidos periodontal, lo que sugiere que puede representar un comensal oral en lugar de un patógeno en humanos por lo que en combinación con otras bacterias ha sido utilizado como probiótico destinado a contrastar el crecimiento de patógenos periodontales. La vía de entrada al ser humano suele a través de carnes y productos lácteos.(46)

Autores como Poptani y col., en el 2013 y recientemente Ahmed y col., en el 2024 nos mencionan que las especies de *Enterococcus* prevalecen en las infecciones persistentes y se ha descubierto que *Enterococcus faecalis* es más común que otras bacterias. Mientras que si hablamos de hongos en infecciones endodónticas también su presencia parece ser más prevalente en dientes con fracaso del

tratamiento de conducto. *Candida albicans* es el hongo más común en los conductos radiculares de dientes infectados, en nuestra investigación *Enterococcus Faecalis* y *Faecium* tuvo una prevalencia de 6.4% cada uno, mientras que *Candida albicans* tuvo 3.2%. Estos datos pueden explicarse ya que los pacientes con diagnóstico de diente previamente tratado fueron minoría a comparación de los pacientes con diagnóstico de necrosis pulpar. Cabe destacar que efectivamente se pudo comprobar que estos microorganismos se encuentran localizados más comúnmente en dientes con infecciones secundarias, ya que solo pudimos identificarlos en casos de retratamiento.(47,48)

Gliga y col., en el 2023 demostró la presencia de *Bifidobacterium spp.* en el conducto radicular con lesión periapical y biopelícula extraradicular en porcentajes altos que van del 60,8% al 77,7%.(3) En el presente estudio también se encontró un valor significativo de *Bifidobacterium spp.* dentro del conducto radicular.

Zargar y col., en el 2019 mencionan que los principales patógenos que causan infecciones endodónticas secundarias pueden variar de un país a otro, una de las principales razones de estas diferencias es que se han utilizado a lo largo del tiempo diversos métodos para la identificación de patógenos. Estos autores mencionan en tiempo pasado como una de las técnicas el método de cultivo, basado en las características fenotípicas y bioquímicas de los microorganismos, tomando como opción ideal en la identificación las técnicas de biología molecular como lo es la secuenciación del ADNr mediante PCR.(49) Sin embargo, en este artículo no se hace alusión de que para poder aislar un cultivo puro de cada microorganismo es necesario un sembrado mediante método de cultivo, ya que la detección de genes mediante PCR es una método muy sensible que puede llevar a una sobreestimación de las especies recuperadas. Además, el ADN de microorganismos no viables en el sistema de conductos radiculares o la difusión del ADN desde la cavidad bucal hasta la raíz del conducto puede dar lugar a resultados falsos positivos, tal como lo menciona Tennert y col., en el 2014 estos datos subrayan la importancia de métodos

de cultivo para la identificación de microorganismos viables como se realizó en este estudio. Así mismo, si tocamos el punto del complicado reconocimiento de microorganismos exigentes podemos mencionar que en la presente investigación se pudo identificar el microorganismo *Porphyromonas asaccharolytica*, un cocobacilo gramnegativo anaerobio moderado, por lo que se demuestra que con un adecuado manejo de las muestras se pueden identificar microorganismos difíciles de cultivar, esto mismo se puede opinar de los microorganismos identificados del género *Clostridium* en 4 de las muestras.(44) El Género *Clostridium* son bacterias grampositivas anaeróbicas aunque muchas especies pueden tolerar el oxígeno en diversos grados, formadoras de endosporas que comprenden aproximadamente 180 especies. Sin embargo, sólo unas pocas son patógenas. Ribeiro y col., en el 2002 menciona en su estudio que entre los microorganismos recuperados mediante método de cultivo de dos pacientes con necrosis pulpar se encontraba *Clostridium butyricum*.(4,50) Este microorganismo es localizado en la flora intestinal de animales y humanos, por lo que una aplicación industrial de *Clostridium* es el uso de esporas como probiótico.

En este proyecto se probaron los microorganismos aislados e identificados en forma pura con la finalidad de ver si algunos eran más resistentes que otros, cabe mencionar que faltan estudios para evaluar si existe sinergia entre ellos y si esta cualidad les otorga mayor resistencia contra el ozono.

Según Epelle y col., en el 2022 el ozono en comparación con otros agentes desinfectantes de aplicación popular es uno de los pocos que puede utilizarse para la descontaminación tanto en forma gaseosa como acuosa, y esta es una de las razones de su amplia aplicabilidad. El ozono gaseoso suele generarse mediante radiación ultravioleta (UV) o descarga eléctrica en un dispositivo cerrado, al mezclarlo en un medio acuoso se esperaría que su función sea más reducida en comparación con el gas. Rice y col. en el 2009 mencionan que la homogenización de la concentración del ozono acuoso depende en gran medida de la dispersión

eficiente del gas en el agua, lo que a menudo provoca un alto uso del gas. No obstante, esto sería incorrecto si destacamos que el análisis del tamaño de las burbujas de ozono generadas es de suma importancia para la transferencia de masa de ozono a la fase acuosa y, en consecuencia, la estabilidad para una acción antimicrobiana sostenida, además de que una generación efectiva de radicales hidroxilo inducida por el colapso de las microburbujas de ozono mejora la desinfección acuosa, particularmente por el radical  $\text{OH}^-$  generado, el cuál es un oxidante más potente que el propio ozono.(51) En la presente metodología no se controló el tamaño de la burbujas de ozono generadas durante la ozonificación en fase acuosa pero se deduce al ver los resultados que las nanoburbujas con la técnica empelada fueron generadas, ya que independientemente del microorganismo a tratar, la ozonoterapia aplicada tanto en gas como en líquido tuvo la capacidad de poder disminuir la viabilidad celular.

## **8. CONCLUSIONES**

A pesar de la de información encontrada sobre el tema que demuestra la seguridad y resultados positivos de la ozonoterapia, el ozono continúa utilizándose como una modalidad alternativa, adicional e incierta en endodoncia. Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que el ozono en estado líquido y gaseoso tiene efectos antimicrobianos contra patógenos presentes en infecciones endodónticas primarias y secundarias en un período de tiempo de 120 s. El conteo de unidades formadoras de colonias mostró un 80% con nula viabilidad celular mientras que el 20% presento una viabilidad celular mínima, confirmando así que un dispositivo generador de ozono accesible al público y enfocado a la desinfección doméstica con las adaptaciones adecuadas puede utilizarse en la desinfección contra bacterias y levaduras presentes en infecciones endodónticas. Sin embargo, se necesitan estudios de citotoxicidad en células orales y en biofilm para su uso dentro del conducto radicular.

### **8.1. PERSPECTIVAS**

Probar la ozonoterapia en infecciones polimicrobianas

Probar la ozonoterapia sobre biofilm mono especie

Probar la ozonoterapia sobre biofilm multiespecie

Analizar citotoxicidad del ozono sobre células humanas

## 9. REFERENCIAS

1. Siqueira JF, Rôças IN. Present status and future directions: Microbiology of endodontic infections. Vol. 55, International Endodontic Journal. John Wiley and Sons Inc; 2022. p. 512–30.
2. Siqueira JF. Taxonomic Changes of Bacteria Associated with Endodontic Infections. 2003.
3. Gliga A, Săndulescu M, Amza O, Stănescu R, Imre M. Review Dental pathologies of endodontic origin and subsequent bacterial involvement-a literature review [Internet]. 2023. Available from: [www.germs.ro](http://www.germs.ro)
4. Dürre P. Physiology and Sporulation in Clostridium . Microbiol Spectr. 2014 Aug 15;2(4).
5. Alberti A, Corbella S, Taschieri S, Francetti L, Fakhruddin KS, Samaranayake LP. Fungal species in endodontic infections: A systematic review and meta-analysis. Vol. 16, PLoS ONE. Public Library of Science; 2021.
6. Case PD, Bird PS, Kahler WA, George R, Walsh LJ. Treatment of root canal biofilms of enterococcus faecalis with ozone gas and passive ultrasound activation. J Endod. 2012 Apr;38(4):523–6.
7. Mehta D, Choksi P, Vaidya R, Mistry K, Sanghvi Z, Patel P. Comparative Evaluation of Antibacterial Efficacy of 5% Sodium Hypochlorite, 940 nm Diode Laser, and Gaseous Ozone against Enterococcus faecalis Biofilm formed on Tooth Substrate: A Scanning Electron Microscope Study . Journal of Operative Dentistry & Endodontics. 2018 Jun;3(1):1–6.
8. Huth KC, Quirling M, Maier S, Kamereck K, Alkhayer M, Paschos E, et al. Effectiveness of ozone against endodontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. Int Endod J. 2009 Jan;42(1):3–13.

9. Bitter K, Vlassakidis A, Niepel M, Hoedke D, Schulze J, Neumann K, et al. Effects of Diode Laser, Gaseous Ozone, and Medical Dressings on Enterococcus faecalis Biofilms in the Root Canal Ex Vivo. Biomed Res Int. 2017;2017.
10. Gomes BPFA, Vianna ME, Zaia AA, Almeida JFA, Souza-Filho FJ, Ferraz CCR. Chlorhexidine in endodontics. Braz Dent J. 2013 Mar;24(2):89–102.
11. Siqueira Junior JF, Rôças I das N, Marceliano-Alves MF, Pérez AR, Ricucci D. Unprepared root canal surface areas: Causes, clinical implications, and therapeutic strategies. Braz Oral Res. 2018;32:1–19.
12. Slaughter RJ, Watts M, Vale JA, Grieve JR, Schep LJ. The clinical toxicology of sodium hypochlorite. Vol. 57, Clinical Toxicology. Taylor and Francis Ltd; 2019. p. 303–11.
13. Holliday R, Alani A et al. Traditional and Contemporary Techniques for Optimizing Root Canal Irrigation. 2017.
14. Mendes J. Efectividad y aplicación del ozono en odontología - revisión en endodoncia. Ozone Therapy Global Journal . 2020;10(1):197–205.
15. Siqueira JF, Rô C , As IN, Santos SRLD, Lima KC, Magalhã FAC, De Uzeda M. Efficacy of Instrumentation Techniques and Irrigation Regimens in Reducing the Bacterial Population within Root Canals. 2002.
16. Goswami M, Chhabra N, Kumar G, Verma M, Chhabra A. Sodium hypochlorite dental accidents. Paediatr Int Child Health. 2014 Feb;34(1):66–9.
17. Jäggi M, Magni E, Eggmann F, Elayouti A, Connert T, Weiger R. Apical pressure generated using conventional syringe irrigation in immature teeth—an in vitro study. Materials. 2021 May 2;14(10).

18. Yamaguchi M, Noiri Y, Itoh Y, Komichi S, Yagi K, Uemura R, et al. Factors that cause endodontic failures in general practices in Japan. BMC Oral Health. 2018 Apr 27;18(1).
19. Silva EJNL, Prado MC, Soares DN, Hecksher F, Martins JNR, Fidalgo TKS. The effect of ozone therapy in root canal disinfection: a systematic review. Vol. 53, International Endodontic Journal. Blackwell Publishing Ltd; 2020. p. 317–32.
20. Dioguardi M, Di Gioia G, Illuzzi G, Laneve E, Cocco A, Troiano G. Endodontic irrigants: Different methods to improve efficacy and related problems. Vol. 12, European Journal of Dentistry. Wolters Kluwer Medknow Publications; 2018. p. 459–66.
21. Thote A, Ikhar A, b a, Chandak M, Nikhade P. OZONE AN ENDODONTIC BLISS: A REVIEW. Int J Adv Res (Indore). 2018 Mar 31;6(3):951–6.
22. Moraes MM, Coelho MS, Nascimento WM, Nogales CG, de Campos FUF, de Jesus Soares A, et al. The antimicrobial effect of different ozone protocols applied in severe curved canals contaminated with *Enterococcus faecalis*: ex vivo study. Odontology. 2021 Jul 1;109(3):696–700.
23. Boch T. Effect of gaseous ozone on *Enterococcus faecalis* biofilm—an in vitro study. Clin Oral Investig. 2016 Sep 1;20(7):1733–9.
24. Megahed A, Aldridge B, Lowe J. The microbial killing capacity of aqueous and gaseous ozone on different surfaces contaminated with dairy cattle manure. PLoS One. 2018 May 1;13(5).
25. Holland A. Ozone in endodontics. Endod Prac. 2010 Feb;6–10.
26. Failor KC, Silver B, Yu W, Heindl JE. Biofilm disruption and bactericidal activity of aqueous ozone coupled with ultrasonic dental scaling. JADA Foundational Science. 2022;1:100003.

27. Epelle EI, Emmerson A, Nekrasova M, Macfarlane A, Cusack M, Burns A, et al. Microbial Inactivation: Gaseous or Aqueous Ozonation? *Ind Eng Chem Res.* 2022 Jul 13;61(27):9600–10.
28. Aguilar-Alarcón P, Zhrebker A, Rubekina A, Shirshin E, Simonsen MA, Kolarevic J, et al. Impact of ozone treatment on dissolved organic matter in land-based recirculating aquaculture systems studied by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Science of the Total Environment.* 2022 Oct 15;843.
29. Muñoz J. OM. Effect of ozone on the removal of dissolved organic matter from a secondary effluent efeito do ozono na remocao de matéria orgânica dissolvida de um efluente secundário resumo. 2012.
30. Nogales CG, Ferreira MB, Montemor AF, Rodrigues MF de A, Lage-Marques JL, Antoniazzi JH. Ozone therapy as an adjuvant for endodontic protocols: Microbiological – Ex vivo study and cytotoxicity analyses. *Journal of Applied Oral Science.* 2016 Nov 1;24(6):607–13.
31. Sen S, Sen S. Ozone therapy a new vista in dentistry: Integrated review. Vol. 10, *Medical Gas Research.* Wolters Kluwer Medknow Publications; 2020. p. 189–92.
32. Dennis R, Cashion A, Emanuel S, Hubbard D. Ozone Gas: Scientific Justification and Practical Guidelines for Improvised Disinfection using Consumer-Grade Ozone Generators and Plastic Storage Boxes. *The Journal of Science and Medicine.* 2020;2(1).
33. Barczyk I, Masłyk D, Walczuk N, Kijak K, Skomro P, Gronwald H, et al. Potential Clinical Applications of Ozone Therapy in Dental Specialties—A Literature Review, Supported by Own Observations. Vol. 20, *International Journal of Environmental Research and Public Health.* MDPI; 2023.

34. Pinheiro SL, da Silva CC, da Silva LA, Cicotti MP, Bueno CE da S, Fontana CE, et al. Antimicrobial efficacy of 2.5% sodium hypochlorite, 2% chlorhexidine, and ozonated water as irrigants in mesiobuccal root canals with severe curvature of mandibular molars. *Eur J Dent*. 2018 Jan 1;12(1):94–9.
35. Ajeti N, Pustina-Krasniqi T, Apostolska S, Xhajanka E. The effect of gaseous ozone in infected root canal. *Open Access Maced J Med Sci*. 2018 Feb 1;6(2):389–96.
36. Epelle EI, Macfarlane A, Cusack M, Burns A, Thissera B, Mackay W, et al. Bacterial and fungal disinfection via ozonation in air. *J Microbiol Methods*. 2022 Mar 1;194.
37. Hems RS. An in vitro evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. *IEJ*. 2005;38(1):22–9.
38. Hubbezoglu I, Zan R, Tunc T, Sumer Z. Antibacterial efficacy of aqueous ozone in root canals infected by *Enterococcus faecalis*. *Jundishapur J Microbiol*. 2014;7(7).
39. Hems RS, Gulabivala K, Ng YL, Ready D, Spratt DA. An in vitro evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*. 2005;38(1).
40. Mohammadi Z. An Update on the Management of Endodontic Biofilms Using Root Canal Irrigants and Medicaments. Vol. 9, *IEJ Iranian Endodontic Journal*. 2014.
41. Tandan M, Gupta S, Tandan P. Ozone in Conservative Dentistry & Endodontics: A Review. Vol. 8, *International Journal of Clinical Preventive Dentistry*. 2012.
42. Barczyk I, Masłyk D, Walczuk N, Kijak K, Skomro P, Gronwald H, et al. Potential Clinical Applications of Ozone Therapy in Dental Specialties—A

Literature Review, Supported by Own Observations. Vol. 20, International Journal of Environmental Research and Public Health. MDPI; 2023.

43. Sanidad Ambiental Salud Laboral Ministerio De Sanidad DY. SECRETARIA GENERAL DE SANIDAD DIRECCIÓN GENERAL DE SALUD PÚBLICA, CALIDAD E INNOVACIÓN SUBDIRECCIÓN GENERAL [Internet]. Available from:  
<https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov->
44. Tennert C, Fuhrmann M, Wittmer A, Karygianni L, Altenburger MJ, Pelz K, et al. New bacterial composition in primary and persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings. *J Endod.* 2014;40(5):670–7.
45. WAD K, Dembélé R, Konaté A, Leye F, Seck A, Touré B, et al. Characterization and Antimicrobial Susceptibility of *Aerococcus* and *Enterococcus* Strains Isolated from Apical Periodontitis in Ouagadougou, Burkina Faso. *Journal of Dentistry and Oral Care Medicine.* 2016 Aug;2(3).
46. Di Domenico EG, Toma L, Prignano G, Pelagalli L, Police A, Cavallotti C, et al. Misidentification of *Streptococcus uberis* as a Human Pathogen: A Case Report and Literature Review. *International Journal of Infectious Diseases.* 2015 Apr 1;33:e79–81.
47. Poptani B, Sharaff M, Archana G, Parekh V. Detection of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in previously root-filled teeth in a population of Gujarat with polymerase chain reaction. *Contemp Clin Dent.* 2013 Jan 1;4(1):62–6.
48. Ahmed S, Jehad Hassan S, Gajdhar S, Saleh Alhazmi L, Yahya Khalifah R, Alhusain Alrifai J, et al. Prevalence of *Enterococcus faecalis* and *Candida*

albicans in endodontic retreatment Cases: A comprehensive study. Saudi Dental Journal. 2024 Apr 1;36(4):539–45.

49. Zargar N, Amin Marashi M, Ashraf H, Hakopian R, Beigi P. Identification of microorganisms in persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings: bacterial culture and molecular detection [Internet]. Vol. 11. 2019. Available from: <http://ijm.tums.ac.ir>
50. Ribeiro Sobrinho AP, De Melo Maltos SM, Farias LM, De Carvalho MAR, Nicoli JR, De Uzeda M, et al. Cytokine production in response to endodontic infection in germ-free mice. Oral Microbiol Immunol. 2002 Dec;17(6):344–53.
51. Epelle EI, Emmerson A, Nekrasova M, Macfarlane A, Cusack M, Burns A, et al. Microbial Inactivation: Gaseous or Aqueous Ozonation? Ind Eng Chem Res. 2022 Jul 13;61(27):9600–10.