

MANUAL DE OZONOTERAPIA. Derecho reservados.  
"Propiedades biológicas de los metabolitos del ozono"

Adriana Schwartz *et al.* "Guía para el uso médico del ozono - Fundamentos terapéuticos e indicaciones", AEPROMO, 2011, 315 p. + XVIII + 11 p. láminas de color. ISBN: 978-84-615-2244-6

## Índice

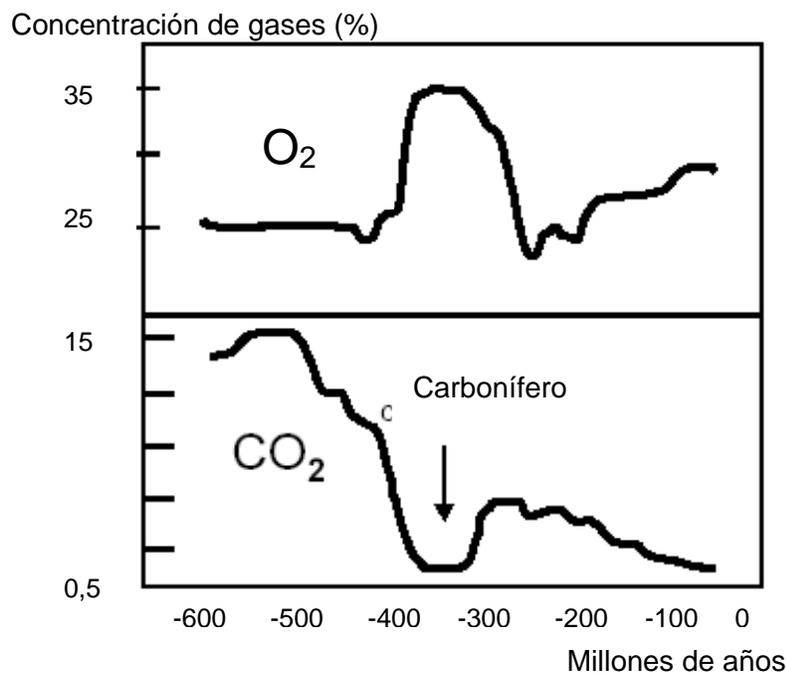
|   |    |
|---|----|
| 1. Generación de los metabolitos del ozono.....                     | 2  |
| 1.1. Introducción .....   | 2  |
| 1.2. Reacciones del ozono con los compuestos orgánicos .....        | 4  |
| 1.2.1 Carácter oxidante del ozono.....                              | 4  |
| 1.2.2 Reacción del ozono con compuestos orgánicos insaturados ..... | 5  |
| 1.2.3 Reacción del ozono con compuestos orgánicos saturados.....    | 7  |
| 1.2.4. Reacción del ozono con compuestos nitrogenados .....         | 10 |
| 1.2.5 Reacción del ozono con compuestos azufrados .....             | 10 |
| 2. Disolución del ozono en diferente fluidos .....                  | 11 |
| 2.1. Introducción .....   | 11 |
| 2.2. El agua ozonizada. Aspectos generales .....                    | 12 |
| 2.3. Tratamiento del agua potable con ozono .....                   | 12 |
| 2.3.1. Los efectos principales de ozonización del agua potable..... | 13 |
| 2.3.2. El tratamiento del agua con ozono .....                      | 14 |
| 2.4. Los aceites vegetales ozonizados.....                          | 15 |
| 2.4.1 Estabilidad de los aceites vegetales ozonizados.....          | 17 |
| 2.5. Reacción del ozono con los fluidos biológicos .....            | 18 |
| 3. Propiedades biológicas del ozono .....                           | 20 |
| 3.1. El ozono en el metabolismo del oxígeno .....                   | 20 |
| 3.2. Germicida .....  | 21 |
| 3.2.1. Uso del ozono como germicida .....                           | 21 |
| 3.2.2. Uso de los aceites ozonizados como germicida.....            | 23 |
| 3.3. Inmunomodulador.....   | 23 |
| 3.4. Efecto en la síntesis de mediadores hormonales.....            | 27 |
| 3.5. Regulador metabólico .....                                     | 28 |
| 3.6. Modulador del estrés oxidativo.....                            | 29 |
| Referencias Bibliográficas.....                                     | 34 |

# 1. Generación de los metabolitos del ozono

## 1.1. Introducción

El ozono, gas que de manera natural se ubica fundamentalmente en la en la atmósfera, se forma en la naturaleza a partir del oxígeno y la energía generada por las tormentas eléctricas. Este gas es más conocido precisamente por su papel esencial en la atmósfera como filtro de las radiaciones ultravioletas. Sus aplicaciones médicas son más recientes y se basan fundamentalmente en aprovechar su alta capacidad oxidante frente a las biomoléculas, de esta forma se genera un estrés controlado que activa las respuestas antioxidantes endógenas.

La vida en la Tierra surgió primeramente en una atmósfera reductora (Fig.1). No fue hasta la aparición de las algas con capacidad fotosintética que el oxígeno comenzó a aparecer en la atmósfera en cantidades cada vez mayores. Esto representó una presión evolutiva muy seria al crearse una atmósfera oxidante con concentraciones de  $O_2$  muy elevadas. Sin embargo, la aparición del  $O_2$  en la atmósfera de la tierra permitió el desarrollo de organismos más complejos que utilizaban esta molécula para la producción de energía de una forma mucho más eficiente.



**Fig.1.** Evolución de la composición de gases ( $O_2$  y  $CO_2$ ) de la atmósfera terrestre. -3,5 billones años: radiación intensa, moléculas orgánicas complejas, vida anaerobia; -2,5 billones años: cianobacterias, vida acuática, producción de  $O_2$ ; -1,2 billones años: atmósfera con 1% de  $O_2$ , desarrollo de vida eucariota; -500 millones años: atmósfera con 10-15% de  $O_2$ , formación de la capa de Ozono, vida marina; -65 millones de años: aparición de los primates ; -5 millones años aparición los seres humanos 21% de  $O_2$ , 160 mmHg.

La aparición del O<sub>2</sub> en la atmósfera tuvo varias consecuencias:

- ✓ El O<sub>2</sub> liberado a la atmósfera era tóxico para los anaerobios estrictos, que se confinaron a áreas restringidas
- ✓ La selección de microorganismos con cadenas respiratorias que usaran el O<sub>2</sub> como aceptor final de electrones, con mayor rendimiento energético
- ✓ Se estabilizó el O<sub>2</sub> y el CO<sub>2</sub> en la atmósfera, y por lo tanto el Carbono empezó a circular por la exosfera
- ✓ **En la atmósfera superior el O<sub>2</sub> reaccionó para formar ozono (O<sub>3</sub>)** que se acumuló hasta formar una capa que envolvió a la tierra e impidió que las radiaciones ultravioletas del sol llegaran a la tierra, pero con su ausencia disminuyó la síntesis abiótica de moléculas orgánicas

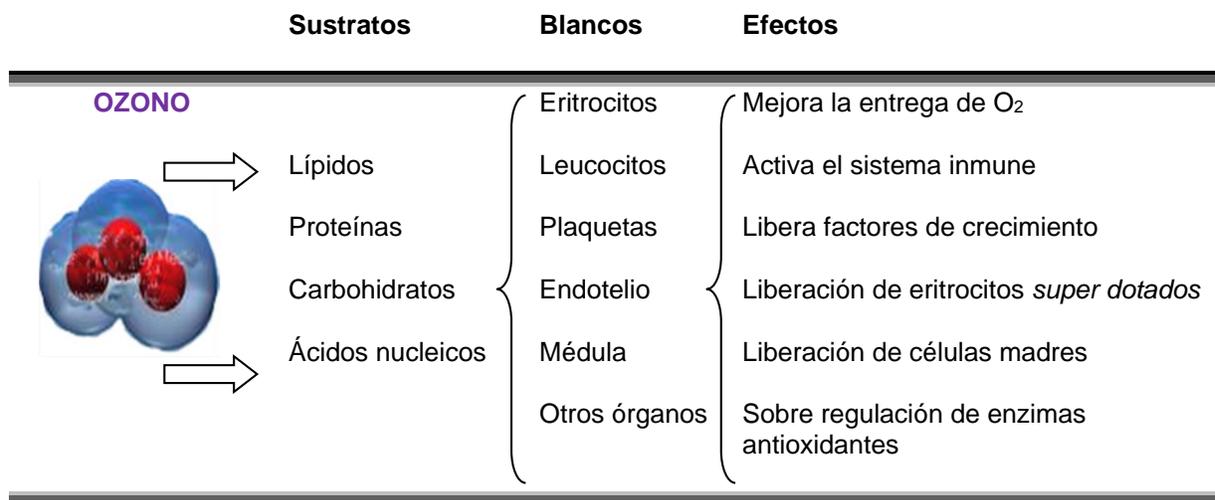
El Holandés Von Marum en 1785 nota el olor característico del ozono al experimentar con máquinas electrostáticas. También Ciukshank en 1801, pero solo hasta 1840 es clasificado por Schonbein que lo bautizó "Ozono" término de origen griego que significa "Olor"

Hoy por hoy el Ozono es conocido como el desinfectante más poderoso de la naturaleza que puede producirse industrialmente. Sus aplicaciones van desde la desinfección de agua potable, instrumentos quirúrgicos, heridas entre otros. Pero las aplicaciones médicas del ozono trascienden sus meros efectos oxidantes directos sobre diversos gérmenes. El descubrimiento de parte de los mecanismos moleculares de acción del ozono y su intervención en el control de diversos trastornos en los que está implicado el estrés oxidativo ha revolucionado su empleo en la medicina moderna. Las dificultades relativas a su generación a nivel clínico en las concentraciones necesarias se ha superado gracias a el diseño de equipos muy modernos que basan su funcionamiento en hacer pasar una descarga eléctrica por un flujo de oxígeno médico. El control espectrofotométrico de las concentraciones de ozono permite obtener un gas de calidad médica a concentraciones óptimas para su empleo en humanos.

Desde el punto de vista práctico el ozono presenta la desventaja de que debe ser generado prácticamente antes de ser utilizado, dada su baja estabilidad. La clave del éxito en la aplicación de la ozonoterapia se rige básicamente por el cumplimiento de diferentes factores básicos:

1. El profesional que lo aplica debe estar formado apropiadamente y conocer a fondo las bases teóricas que rigen este proceder
2. Se deben respetar los procedimientos y técnicas estándares ya estudiadas y probadas en la práctica médica
3. La terapia se hará siempre con equipos que generan ozono de calidad médica con un sistema riguroso de control de la calidad
4. Se respetaran las dosis recomendadas para *cada* tipo de patología de manera rigurosa

El cumplimiento de estos aspectos básicos es garantía del éxito de la ozonoterapia. El ozono puede ser clasificado desde el punto de vista farmacológico como un pro-fármaco, esto es debido a que esencialmente la cadena de reacciones que desatan sus efectos farmacológicos no está mediada por su acción *per se*, sino que sus velocidades de reacción con las moléculas biológicas y especialmente con los lípidos son tan elevadas que estos derivados oxidados son los mediadores de sus efectos finales (Fig. 2) (Re *et al.* 2008).



**Fig. 2.** Efectos fundamentales del ozono a través de su reacción con moléculas mediadoras. Modificado de V. Bocci. *Toxicology and Applied Pharmacology* **216** (2006): 493–504.

## 1.2. Reacciones del ozono con los compuestos orgánicos

Debido a que los efectos biológicos del ozono tienen lugar básicamente por medio de segundos mensajeros (productos de la reacción del O<sub>3</sub> con las biomoléculas) y no por la molécula de O<sub>3</sub> *per se*, describimos a continuación los productos de reacción del O<sub>3</sub> con diferentes moléculas o grupos químicos presentes en las biomoléculas.

### 1.2.1 Carácter oxidante del ozono

El ozono es una de las moléculas con mayor potencia oxidante, es capaz de reaccionar con una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos. La reactividad química del ozono y el oxígeno difieren marcadamente y aunque el segundo se combina con prácticamente todos los elementos, lo hace solamente a elevadas temperaturas, mientras que el ozono lo hace en condiciones de reacción mucho más nobles (Menéndez *et al.*, 2008).

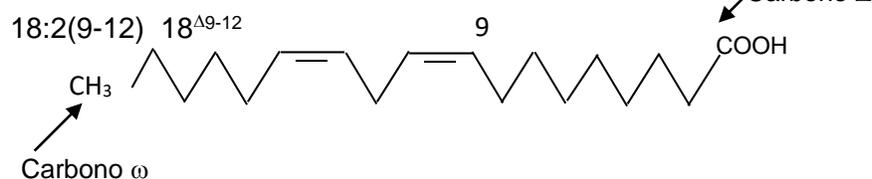
La relevancia de las potentes características oxidantes del O<sub>3</sub> y la modificación de estas en dependencia de diferentes factores (e.j. pH, temperatura, entre otros) va a tener incidencia desde el punto de vista clínico, debido a que en dependencia del microambiente donde tenga lugar la reacción estas tendrán características variadas. Por ejemplo, la aplicación rectal del O<sub>3</sub> ocurre a una temperatura aproximada de 37 °C en condiciones de elevada irrigación sanguínea, lo cual favorece la reactividad y la absorción del O<sub>3</sub> en contraste con la aplicación local en bolsas, donde la temperatura y la irrigación sanguínea son menores (Menéndez *et al.*, 2008).

## 1.2.2 Reacción del ozono con compuestos orgánicos insaturados

En este acápite se describen las reacciones del  $O_3$  fundamentalmente con los lípidos. Los ácidos grasos poli insaturados (AGPI) son los más susceptibles a la oxidación. Para su nomenclatura se han establecido diferentes reglas, se denomina el carbono del grupo ácido «carbono  $\Delta$ », y el carbono terminal del grupo  $CH_3$ , «carbono  $\omega$ ». Al numerar los C que participan en el doble enlace, solo se hace referencia al que posee la numeración menor, a ese número se le suele anteponer la letra  $\Delta$  que indica la presencia de una insaturación. Los dobles enlaces también se pueden especificar por su localización a partir del C donde se ubica el primer doble enlace, pero a partir del  $-CH_3$  (carbono  $\omega$ ).

Ejemplo: Ácido linoleico

9-12 octadecanodienoico (serie  $\omega 6$ )



En los ácidos grasos insaturados encontrados en organismos terrestres (Tabla 1), los dobles enlaces se encuentran a partir del C9, de existir varios dobles enlaces se disponen de forma no conjugadas y predomina la configuración *cis*. Los AGPI se pueden clasificar en 3 series, si se toma en cuenta que los dobles enlaces adicionales se adicionan solo entre el átomo de carbono donde se localiza el primer doble enlace (a partir del carbono  $\omega$ ) y el carbono del grupo  $-CO_2H$ , por ello las series son  $\omega 3$ ,  $\omega 6$  y  $\omega 9$ .

Los grupos principales de productos derivados de los procesos de la oxidación de los lípidos son: Hidrocarburos volátiles, Derivados de la oxidación del ácido araquidónico (AA), aldehídos, hidroperóxidos y dienos conjugados (Martínez-Sánchez *et al.* 2010).

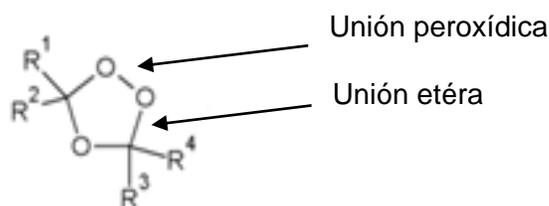
Muchos de estos productos de oxidación de los AGPI son generados cuando entran en contacto con el ozono y son mediadores de sus efectos farmacológicos. Las reacciones del ozono con los compuestos insaturados presentan una energía de activación muy baja, cercana a cero, lo que permite elevadas velocidades de reacción, con constantes de velocidad del orden de  $10^5$  a  $10^6$   $M^{-1}\cdot s^{-1}$ , por lo que son reacciones poco sensibles a variaciones de la temperatura (Menéndez *et al.*, 2008).

Un grupo de compuestos descritos durante el estudio de las reacciones de oxidación del ozono se denominaron *ozónidos*, estos compuestos intermediarios se descomponen por dos rutas diferentes una conduce a la formación de agua y un aldehído y otra da lugar a la formación de ácidos y productos poliméricos. Un estudio más detallado del mecanismo de reacción del ozono dio lugar a la descripción de una estructura denominada 1,2,4-Trioxolano u ozónido de Criegee (Fig. 3).

**Tabla 1.** Ácidos grasos insaturados más importantes para el ser humano.

| Nomenclatura*      | Nombre trivial              | Sistemático                    | Serie      |
|--------------------|-----------------------------|--------------------------------|------------|
| 16:1(9)            | Palmitoleico                | 9-hexadecenoico                | $\omega$ 7 |
| 18:1(9)            | Oleico                      | 9-octadecamonoenoico           | $\omega$ 9 |
| 18:2(9,12)         | Linoleico                   | 9,12-octadecadienoico          | $\omega$ 6 |
| 18:3(9,12,15)      | Linolénico                  | 9,12,15-octadecatrienoico      | $\omega$ 3 |
| 18:3 (6,9,12)      | $\gamma$ Linolénico         | 6,9,12-octadecatrienoico       | $\omega$ 6 |
| 20:3(8,11,14)      | Dihomo- $\gamma$ Linolénico | 8,11,14-eicosatrienoico        | $\omega$ 6 |
| 20:4(5,8,11,14)    | Araquidónico                | 5,8,11,14-eicosatetraenoico    | $\omega$ 6 |
| 20:5(5,8,11,14,17) | -                           | 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico | $\omega$ 3 |

Leyenda: \* Nomenclatura basada en: número total de átomos de carbono: número de insaturaciones (posición de la insaturación tomada a partir del carbono  $\Delta$ ).

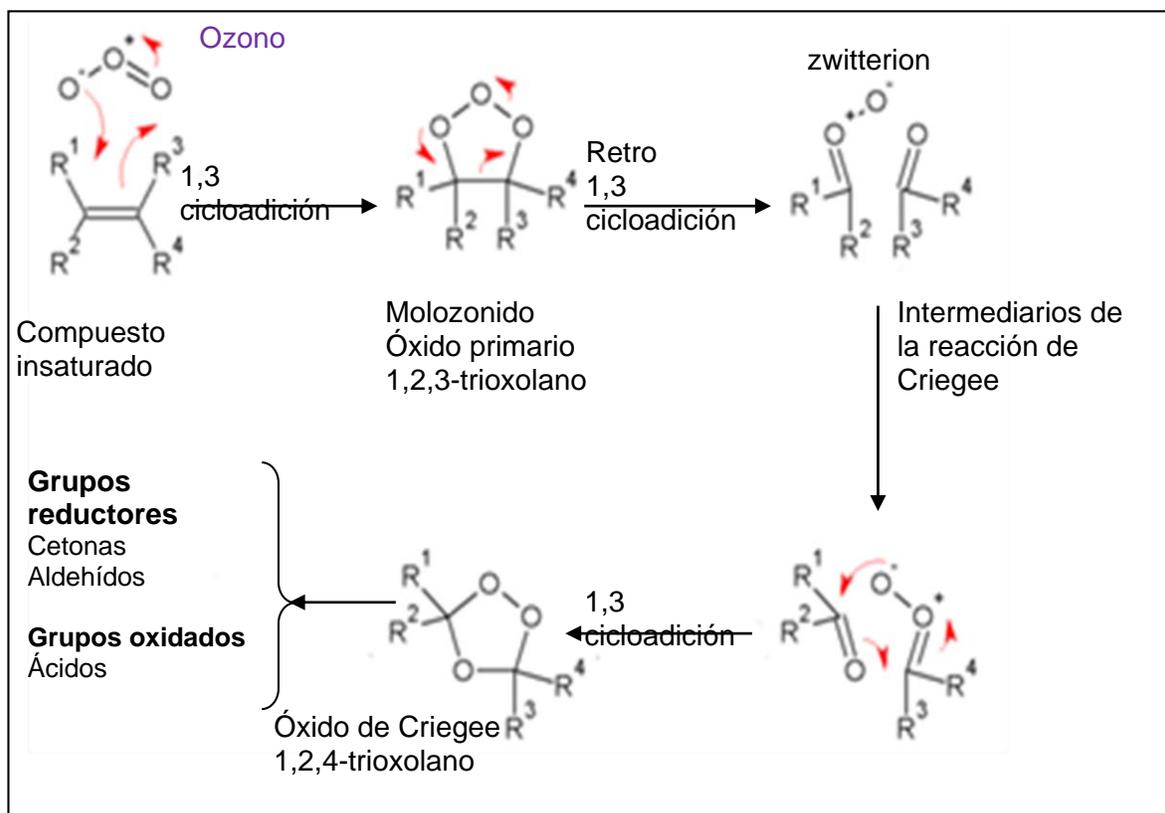


**Fig. 3.** 1,2,4-Trioxolano u ozónido de Criegee.

Diferentes técnicas analíticas permitieron dilucidar el mecanismo general mediante el cual el ozono reacciona con los compuestos insaturados (Fig. 4). Este mecanismo explica que la reacción ocurre en diferentes etapas con la formación de compuestos intermediarios sumamente inestables. En todos los casos los diferentes caminos que toma la reacción están en dependencia de las condiciones específicas en que esta tienen lugar por lo cual como resultado final pueden obtenerse diferentes productos de reacción.

De forma general, entre los productos de la reacción del ozono con los compuestos insaturados, pueden obtenerse: aldehídos, ácidos carboxílicos, hidroperóxidos, ozónidos, diperoxidos, peróxido de hidrógeno y peróxidos poliméricos. El concepto más importante del mecanismo de Criegee radica, precisamente, en la posibilidad de explicar la formación de todos los productos peroxídicos de la ozonólisis de los compuestos insaturados a partir de un único intermediario: el zwitterion de Criegee u óxido de carbonilo. Los diferentes caminos que se

presentar son competitivos y dar lugar en la mayoría de los casos, a mezclas complejas con diferentes proporciones de los productos formados. Los rendimientos de algún producto en particular dependen de las condiciones de la reacción (Menéndez *et al.*, 2008).



**Fig. 4.** Esquema del mecanismo de ataque del ozono a los compuestos insaturados.

Desde el punto de vista analítico, las reacciones del ozono con los compuestos aromáticos han sido menos estudiadas, que con los compuestos alifáticos insaturados, debido a su mayor complejidad y la formación preferente de compuestos poliméricos. No obstante, en los últimos años el interés por esta reacción se ha incrementado como resultado de la aplicación cada vez más creciente del ozono en el tratamiento de aguas residuales de diferentes orígenes, en las que los compuestos aromáticos se encuentran en concentraciones apreciables. Esa reacción es mucho más lenta que las correspondientes al ozono con las olefinas o los alquinos, ya que presentar constantes de velocidad de reacción global entre  $10^1$ - $10^2$   $M^{-1}\cdot s^{-1}$  (Menéndez *et al.*, 2008).

### 1.2.3 Reacción del ozono con compuestos orgánicos saturados

En los organismos vivos existe una gran cantidad de compuestos donde los dobles o triples enlaces no se encuentran presentes, y por ende, se les llaman compuestos saturados. Ejemplo de estas estructuras lo son: hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, carbohidratos, ácidos, aminoácidos, entre otros. Frente a estos tipos de compuestos, el ozono reacciona generalmente con la substracción de un átomo de hidrógeno en forma de radical, dejando

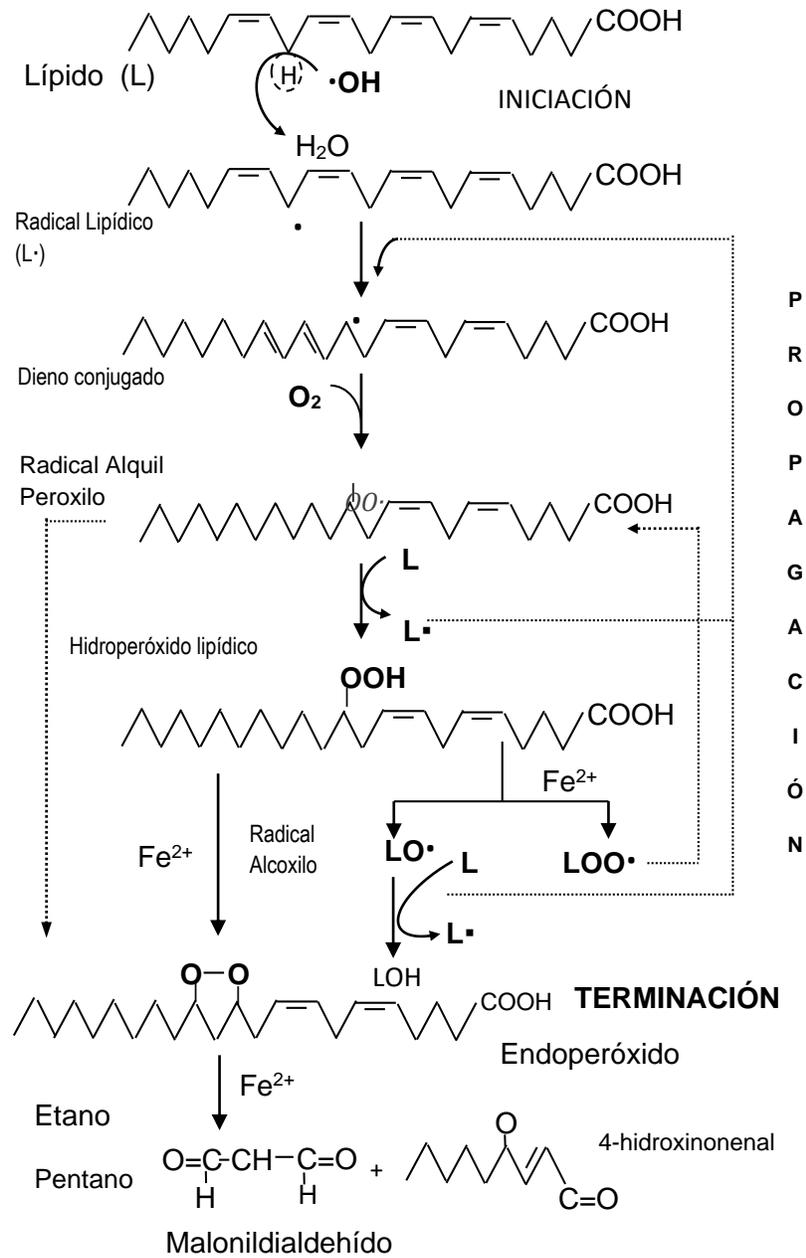
formados otros radicales orgánicos y el radical hidroxilo HO•. Estos radicales por su parte, inician un conjunto de reacciones de propagación.

La velocidad de reacción del ozono con los compuestos saturados es entre mil y un millón de veces más pequeña que con los compuestos insaturados, por lo que, en un medio determinado si existen compuestos saturados e insaturados, el ozono reaccionará preferentemente con estos últimos (Menéndez *et al.*, 2008).

Una vez formados los radicales libres, las reacciones que estos originan son inespecíficas (reaccionan con cualquier molécula) pero tienen preferencia también por aquellas insaturadas, como los AGPI. Los radicales libres de alta reactividad pueden sustraer un átomo de hidrógeno de los ácidos grasos y conducir a la reacción en cadena conocida como PEROXIDACIÓN LIPÍDICA (POL) (Martínez-Sánchez *et al.*, 2010). Los radicales libres provocan la oxidación de los AGPI y de los fosfolípidos de membrana. La POL conduce a un aumento considerable de la permeabilidad de las membranas celulares, que origina alteraciones irreversibles de las propiedades funcionales de la célula que pueden conducir a su lisis total. Los procesos de peroxidación conducen a la formación de numerosos derivados tóxicos: los hidroperóxidos, los 4-hidroxi-alquenes, el MDA y otros. La POL ocurre en mayor medida en las membranas biológicas y en las lipoproteínas. La POL puede:

- Disminuir la fluidez de las membranas biológicas
- Inactivar enzimas y receptores asociados a la membrana celular
- Aumentar la permeabilidad al Ca<sup>2+</sup>

En la Fig. 5 se muestra la cadena de reacciones responsables de la POL. En la fase de iniciación un radical de elevada reactividad, como el hidroxilo, extrae un átomo de hidrógeno de un ácido graso insaturado para producir el radical lipídico, el cual se reorganiza y forma el dieno conjugado que en su reacción con el O<sub>2</sub> da lugar al radical alquil peroxilo, con suficiente reactividad como para atacar otro lípido y conducir a la propagación de la POL. En la fase de terminación y en presencia de hierro se producen aldehídos y otros compuestos (Martínez-Sánchez *et al.*, 2010). Precisamente estructuras como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxi nonenal (4-HN) son generados durante el contacto del ozono con plasma o tejidos y no solo constituyen productos de la oxidación lipídica sino que tienen actividad biológica *per se*, por lo cual a concentraciones adecuadas se pueden considerar mediadores de los efectos benéficos del ozono. Por ejemplo, la aplicación de una auto-hemoterapia a un grupo de pacientes elevó las concentraciones de MDA de 0,2 μM a 1,2 μM, este valor retornó en plasma a su valor normal 25 min después dada la alta capacidad de los antioxidantes del plasma para amortiguar una ruptura del equilibrio redox. En estos mismos pacientes, la aplicación de un ciclo de auto-hemoterapia continuó elevando la concentración de MDA hasta un máximo de 0,6 μM tras 5 aplicaciones de auto hemoterapia mayor (15 días después) a partir de este momento los valores retornaron a las concentraciones basales (0,2 μM) y la reducción se acompañó de un incremento de la actividad de la enzima superóxido dismutasa (Bocci, 2005).



**Fig. 5.** Secuencia general de reacciones durante la peroxidación lipídica (Martínez-Sánchez *et al.*, 2010).

### 1.2.4. Reacción del ozono con compuestos nitrogenados

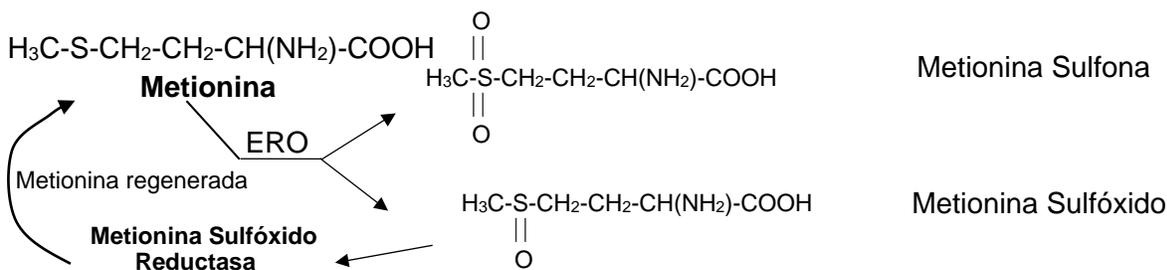
La presencia de nitrógeno fundamentalmente en forma de grupos amino, es característica de los organismos vivos. Los aminoácidos, sillares estructurales de las proteínas poseen este tipo de grupo químico. En los grupos amino existe un par de electrones libres sobre el nitrógeno el cual es blanco fundamental de las reacciones con ozono. Estas reacciones se favorecen a pH bajos.

Por cada molécula de compuesto nitrogenado, reaccionan tres moléculas de ozono hasta su fase final, a pH elevado. Así tenemos, que las aminas reacciona a velocidades superiores a los compuestos saturados e inferiores a los insaturados. El incremento de las cadenas carbonadas enlazadas al nitrógeno de las aminas, provee una mayor densidad de carga parcial negativa (por el efecto del nitrógeno) sobre el heteroátomo, lo que provoca que la velocidad de reacción del ozono con las aminas primarias resulte inferior que con las secundarias y terciarias respectivamente. Se manifiesta así el carácter electrofónico del ataque de este gas a los electrones libres del nitrógeno (Menéndez *et al.*, 2008).

### 1.2.5 Reacción del ozono con compuestos azufrados

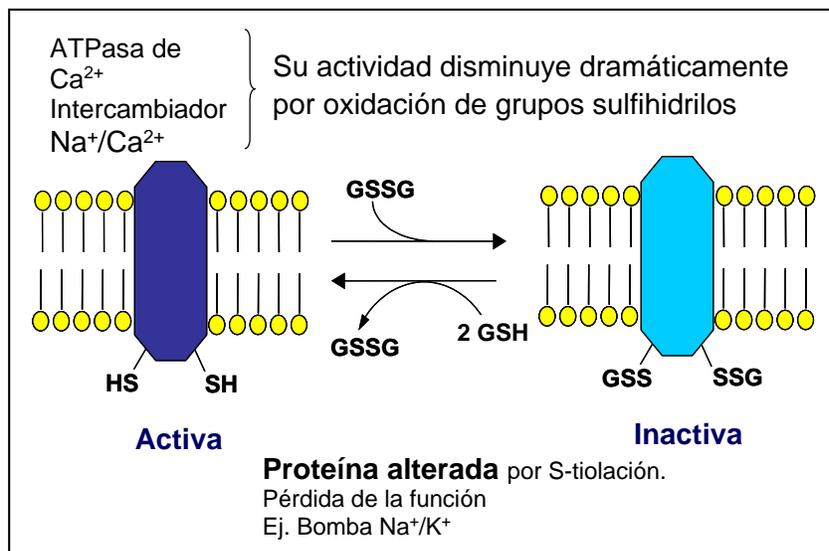
En los sistemas biológicos el azufre está presente en varios aminoácidos (metionina, cistina y cisteína), en el glutatión y otras moléculas esenciales para la vida. La oxidación de estos compuestos azufrados por el ozono conduce a la formación de sulfóxidos y sulfonas.

La oxidación de metionina produce fundamentalmente la metionina sulfona y sulfóxido. Como mecanismo de defensa, la célula cuenta con la enzima metionina sulfóxido reductasa para regenerar la metionina una vez generada por el ataque de las ERO (Fig. 6).



**Fig. 6.** Oxidación de metionina por las especies reactivas del oxígeno (ERO).

Por otra parte, la oxidación de los grupos -SH de las enzimas altera su función biológica. Por ejemplo la oxidación de la enzima ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico conduce a su inhibición (Fig. 7) y al consecuente daño celular originado por la pérdida de la homeostasia del  $\text{Ca}^{2+}$ . Su influjo al interior celular activa proteasas, endonucleasas y fosfolipasas (Martínez-Sánchez *et al.*, 2010).



**Fig. 7.** Consecuencias de la oxidación de grupos sulfhidrilos proteicos. GSH, Glutación; GSSG, Glutación disulfuro.

## 2. Disolución del ozono en diferente fluidos

### 2.1. Introducción

Actualmente, el uso del ozono para tratamientos de agua, está aumentando progresivamente en todos los países, tanto en el campo de las aguas potables, industriales y residuales, por ser un excelente esterilizador de bacterias, virus y hongos, así como por su efecto desodorante y decolorante. En consecuencia, la calidad organoléptica de las aguas (olor, color y sabor) y microbiológica tras el tratamiento con ozono, asegura un agua totalmente tolerable para la salud pública. El agua ozonizada también encuentra un gran campo de aplicación en la estomatología, con el uso del agua ozonizada durante las intervenciones estomatológicas se logra un alto grado de asepsia que repercute en una mejor recuperación de los pacientes.

Por otra parte, las propiedades germicidas del ozono no se limitan al ozono en sí, sino que se presentan también, en los productos de reacción de este gas con determinadas sustancias. Los aceites de origen vegetal (ej. coco, palma, oliva, girasol, sésamo, entre otros) se han utilizado como medio adecuado para la terapia con ozono. Los aceites ozonizados estabilizados poseen un carácter germicida y parasiticida muy marcado que los hacen útiles en el tratamiento un gran número de enfermedades. Es de destacar que frente a estos agentes no es posible el fenómeno de resistencia microbiana ya que actúan básicamente oxidando las paredes microbianas.

## 2.2. El agua ozonizada. Aspectos generales

La solubilidad del ozono en agua 10 veces superior a la del oxígeno: 49,0 mL de O<sub>3</sub> por cada 100 mL de agua comparado con 4,89 mL de O<sub>2</sub> por cada 100 mL de agua. La preparación del agua ozonizada se hace haciendo pasar el ozono por un burbujeador de vidrio aglomerado y burbujear el agua por al menos 5 min hasta lograr su saturación. Varios de los equipos modernos para uso clínico incluyen los aditamentos necesarios para producir el agua ozonizada. La solución salina fisiológica (NaCl 0,9%) no debe ser ozonizada, debido a que durante la reacción se produce ácido hipocloroso. El ácido hipocloroso puede originar inflamación y flebitis si la solución salina se usa para infusión.

La estabilidad del ozono en solución acuosa es baja, aproximadamente de 5 a 6 min después de obtenida el agua ozonizada la concentración de O<sub>3</sub> desciende en un 25 % con respecto a la concentración inicial. Cuando se requiere un agua ozonizada de una concentración elevada para fines médicos, se debe partir de una concentración de O<sub>3</sub> de 80 µg/mL que rendirá una concentración aproximada de 20 µg/mL. Esta solución es útil para el tratamiento y desinfección de heridas infectadas, para eliminar el pus, áreas necróticas y eliminar gérmenes en general. Una vez que las heridas comienzan a evolucionar se recomienda el uso de una concentración más baja, o sea partir de ozonizar el agua con una concentración de O<sub>3</sub> de 20 µg/mL para tener una concentración final de 5 µg/mL.

¿Cuán estable son las soluciones acuosas de O<sub>3</sub>? Este es el punto débil de las aguas ozonizadas. La preparación de agua bidestilada ozonizada una vez obtenida debe ser mantenida a 5 °C en un frasco de vidrio con tapa de vidrio o silicona, firmemente tapado. En estas condiciones la concentración de O<sub>3</sub> se reduce a la mitad de la concentración inicial en unas 110 h, sin embargo si se deja a 20 °C el tiempo de vida media del ozono es de solo 9 h. Si se utiliza agua mono-destilada el tiempo de vida media del O<sub>3</sub> es de menos de 1 h. Estos conocimientos tienen una repercusión práctica, e indican que para los propósitos de desinfección de heridas es aconsejado usar agua recién ozonizada y si se decide almacenarla o que el paciente la lleve a su casa, deben seguirse las recomendaciones de almacenamiento óptimas.

De manera general la solubilización del ozono en agua se ajusta a la ley de Henry (1803) que establece que el estado de saturación del gas en el agua es proporcional a su concentración. Pero la ley es válida solo si se ozoniza agua pura. Si el agua es monodestilada o contiene trazas iónicas, es prácticamente inutilizable para los fines de desinfección porque los iones facilitan la formación de sustancias potencialmente tóxicas, como el ácido hipocloroso (Bocci, 2005).

## 2.3. Tratamiento del agua potable con ozono

El consumo de agua potable constituye un vector importante de enfermedades denominadas hídricas y en determinadas ocasiones un aporte diario y prolongado en el tiempo de diversos tipos de contaminantes ya sean de origen natural, debidos principalmente a la climatología y geología del terreno como pueden ser metales pesados, hierro, manganeso entre otros, y

también podemos encontrar contaminantes que se origina por la acción del hombre como compuestos orgánicos volátiles, pesticidas, nitritos entre otros.

Para tratar y controlar las aguas destinadas a consumo humano el cloro es el agente desinfectante más empleado, pero no el único ni el mejor. El poder desinfectante del ozono es de unas 3 000 veces superior y más rápida. El tratamiento de agua potable con ozono presenta, por tanto, una serie de ventajas respecto al tratamiento con cloro.

En primer lugar, debido al fuerte poder oxidante la calidad de la desinfección con ozono es muy superior a la que se consigue con un tratamiento con cloro. De esta forma, se consiguen eliminar virus, bacterias y microorganismos en general cloro-resistentes. Gracias también a este elevado potencial de oxidación se logra precipitar metales pesados que pueden encontrarse en disolución y eliminar compuestos orgánicos, pesticidas, y todo tipo de olores y sabores extraños que el agua pudiera contener. Otra de las importantes ventajas del uso del ozono frente al cloro es la rapidez con la que actúa lo cual permite realizar tratamientos muy efectivos en pocos segundos o minutos cuando para realizar un tratamiento de desinfección con cloro es necesario un tiempo de contacto muy superior.

### 2.3.1. Los efectos principales de ozonización del agua potable

- 1) Desinfección bacteriana e inactivación viral
- 2) Oxidación de inorgánicos como hierro, manganeso, metales pesados ligados orgánicamente, cianuros, sulfures y nitratos
- 3) Oxidación de orgánicos como detergentes, pesticidas, herbicidas, fenoles, sabor y olor causados por impurezas

El mecanismo de acción del ozono en cada uno de estos casos se comporta como sigue:

#### Desinfección e inactivación viral:

La eliminación de bacterias y la inactivación viral se relacionan con la concentración del ozono en el agua y el tiempo de contacto con los microorganismos. Las bacterias son las que más rápidamente son destruidas. Las bacterias *E. coli* son destruidas por concentraciones de ozono de un poco más de 0,1 µg/mL y una duración de contacto de 15 s a temperaturas de 25 °C y 30 °C.

*Streptococcus fecalis* son destruidos mucho más fácilmente. A concentraciones de ozono de aproximadamente 0,025 mg/L, se obtiene un 99,9% de inactivación en 20 s o menos a ambas temperaturas. Los virus son más resistentes que las bacterias. Estudios pioneros por científicos de Salubridad Pública Francesa en los años 60 han demostrado que los poliovirus tipos I, II y III quedan inactivados por medio de exposición a concentraciones de ozono disuelto de 0,4 µg/mL por un período de contacto de 4 min.

#### Oxidación de inorgánicos:

En el caso del hierro, el manganeso, y de varios compuestos arsénicos, la oxidación ocurre muy rápidamente, dejando compuestos insolubles que se puede quitar fácilmente por medio de un filtro de carbón activado. Los iones de sulfuro son oxidados a iones sulfatos, una sustancia inocua.

### Oxidación de orgánicos:

El ozono es un agente muy poderoso en el tratamiento de materiales orgánicos. Los orgánicos que contaminan el agua potable son naturales (ácidos de humectación y fúmicos) o sintéticos (detergentes, pesticidas) en esencia. Algunos orgánicos reaccionan con ozono muy rápidamente hasta la destrucción, dentro de minutos o algunos segundos (fenol, ácido fórmico), mientras otros reaccionan más lentamente con ozono (ácidos de humectación y fúmicos, varios pesticidas, tricloretoano entre otros). En algunos casos, los materiales orgánicos son oxidados solamente parcialmente con ozono. Una ventaja principal de oxidación parcial de materiales orgánicos es que al oxidarse parcialmente, los materiales orgánicos se polarizan mucho más que en su forma original, produciendo materiales insolubles complejos que se pueden quitar con filtros de carbón activado.

### Eliminación de turbidez:

La turbidez del agua se elimina por ozonización a través de una combinación de oxidación química y neutralización de cargas. Las partículas coloidales que causan turbidez son mantenidas en suspensión por partículas de carga negativas que son neutralizadas por el ozono. El ozono además destruye los materiales coloidales por medio de la oxidación de materias orgánicas.

### Eliminación de olores, colores y sabores:

La oxidación de la materia orgánica, metales pesados, sulfuros y sustancias extrañas, produce la supresión de sabores y olores extraños que el agua pudiera contener, proporcionando una mejora en la calidad y el aspecto del agua, haciéndola más adecuada para su consumo y disfrute.

## **2.3.2. El tratamiento del agua con ozono**

La técnica se basa, fundamentalmente, en lograr un tiempo de contacto adecuado del agua, con la cantidad adecuada de ozono. Concentraciones de entre 0,5 mg/L y 0,8 mg/L de ozono durante unos tres o cuatro minutos son suficientes para conseguir una calidad de agua excepcional y desinfectada. Tras el tratamiento, el ozono se descompone en oxígeno tras varios minutos no dejando ningún tipo de residual, pero por consiguiente, tampoco existirá ningún residual desinfectante que pudiera prevenir el crecimiento bacteriológico. En los casos en los que sea necesario asegurar que el agua de consumo ha sido recién tratada con ozono, el sistema de ozonización se realizará en un depósito con un caudal de recirculación, en donde mediante un inyector se añadirá la producción de ozono adecuada, esta cantidad de ozono y por tanto, la concentración de ozono residual en el depósito depende, en primer lugar, de las características de producción del equipo, y en segundo lugar, del tiempo de funcionamiento y parada del mismo. Es decir, mediante el temporizador, es posible aumentar y disminuir el tiempo de producción y de parada consiguiendo en estado estacionario una mayor o menor concentración de ozono. Para sistemas más complejos de regulación y control puede instalarse una sonda de medición de ozono residual en el agua que actúe directamente sobre la producción del equipo para alcanzar el valor de consigna preestablecido como el ideal de concentración de ozono en el agua.

En función del tipo de instalación y la demanda pueden existir otras muchas posibilidades como puede ser inyectar el ozono directamente en la tubería mediante un *by-pass* o instalar el generador de ozono directamente en el grifo de consumo.

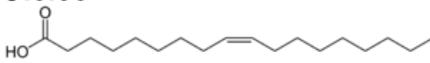
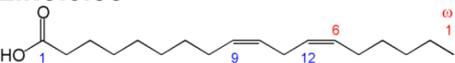
## 2.4. Los aceites vegetales ozonizados

Los aceites vegetales son un medio eficaz en el campo de la ozonoterapia. En esencia estos aceites se someten a una oxidación controlada, haciéndolos reaccionar con ozono bajo condiciones pre-establecidas con ozono. Una vez formados los productos de oxidación se emplean diferentes técnicas para estabilizarlos por un tiempo prolongado (generalmente 2 años). Los principios activos resultantes son hidroperóxidos y otros productos de la peroxidación lipídica los cuales poseen propiedades germicidas inespecífica y además inciden de manera satisfactoria sobre los procesos de cicatrización y regeneración del tejido. Es por lo anterior que encuentran una gran utilidad en el tratamiento de procesos infecciosos locales, úlceras, fistulas y otros procesos sépticos. La relativa estabilidad de los aceites con respecto al ozono gaseoso ofrece ventajas a este proceder terapéutico.

Los aceites vegetales más empleados son el de Girasol y el de Olivas, con el uso de derivados ozonizados de estos aceites se han desarrollado numerosos estudios clínicos en los que se ha demostrado sus propiedades bactericidas, fungicidas y virucidas, así como su capacidad para estimular la regeneración del tejido epitelial y ejercer otros efectos a mayor profundidad como son la reducción de las concentraciones de ácido láctico en el músculo tras la realización de un esfuerzo físico intenso.

La composición de los ácidos grasos es en general variable (Tabla 2), dentro de estos compuestos los insaturados son los que reaccionan más fácilmente con el ozono para rendir los productos de oxidación que constituyen los principios activos.

**Tabla 2.** Composición porcentual de ácidos grasos insaturados de aceites vegetales seleccionados.

| Aceite vegetal | Oleico  | Linoleico  |
|----------------|---|--|
|                |  |  |
| Oliva          | 65-85   | 4-15   |
| Girasol        | 28-35   | 60-70  |
| Soja           | 20-30   | 50-65  |
| Coco           | 5-8   | 0,9-2  |
| Teobroma       | 37-38   | 1-2  |
| Palma          | 39-46   | 7-11   |

La reacción del ozono con los compuestos insaturados ha sido la más estudiada. Ella da lugar, en mayor proporción, a la ruptura de la molécula en la posición correspondiente al doble enlace con la formación de fragmentos con grupos carbonílicos, carboxílicos y peroxílicos. Para estas reacciones se cumple el mecanismo descrito por Criegee (Menendez *et al.*, 2008).

Los diferentes pasos en que transcurre la reacción son competitivos y en la mayor parte de los casos, dan lugar a mezclas complejas con diferentes proporciones de los productos formados. Si se quisiera mejorar o incrementar preferentemente los rendimientos de algún producto en particular, es necesario tener en cuenta un conjunto de factores en el establecimiento de las condiciones de la reacción. Entre ellos, se encuentran: el uso o no de disolventes y su tipo, la presencia de otros compuestos, la temperatura de la reacción, el tipo de reactor a emplear, la agitación de la mezcla de reacción, entre otros.

Los óxidos de carbonio formados durante la reacción, pueden interactuar entre ellos y formar diperoxidos y poliperoxidos. Además, en presencia de sustancias próticas (alcoholes, aminas, ácidos, etc.) pueden dar origen a otros productos estables, que contienen al grupos hidroperóxido (Menendez *et al.*, 2008).

Todas las posibilidades de formación de compuestos oxigenados tienen lugar en menor o mayor grado, en dependencia de las condiciones en que tenga lugar la reacción de ozonización y de la naturaleza del aceite vegetal, entre las que se destacan: el aumento de la concentración de aldehídos en la mezcla de reacción y la variación de la viscosidad, que aumenta entre 5 y 10 veces con respecto al valor inicial, lo que demuestra que la etapa de polimerización desempeña un papel importante.

Los aceites vegetales ozonizados, que contienen ácido linoleico en su composición, presentaran entre los componentes volátiles de la mezcla de reacción, aldehídos y ácidos saturados de tres y seis átomos de carbono y mono-insaturados de nueve átomos de carbono, propios de la estructura del ácido y del mecanismo de ozonización. Por el contrario, como producto de la ozonización de los aceites vegetales que contengan al ácido oleico como único ácido mono insaturado en su estructura, solamente se obtendrá en su fracción volátil al aldehído saturado de nueve carbonos (nonaldehído). Estos componentes, generalmente aldehídos y ácidos, son los responsables del olor característico de esos productos.

Es necesario señalar que prácticamente todos los aceites vegetales, comerciales han sido ozonizados utilizando distintos procedimientos o condiciones de ozonización y han sido objeto de patentes. En la primera parte del siglo XX (1911) se aceptó la primera patente sobre la ozonización de un aceite vegetal (aceite de coco). Posteriormente, se patentaron otros métodos de ozonización de distintos aceites vegetales como soja, ricino y oliva. En las dos últimas patentes, se realiza la ozonización del aceite en estado puro y con fines farmacéuticos. En otra patente, se ha descrito la ozonización de distintos aceites vegetales como los de maíz, oliva y sésamo. Asimismo, se conoce que su autor realiza la ozonización de estos aceites vegetales para el tratamiento del acné y dos años más tarde, desarrolló un método para la ozonización de un aceite de origen cítrico: aceite de jojoba.

A pesar de la utilidad de este tipo de preparados, demostrada en diversos estudios clínicos, no existe un consenso sobre los índices de calidad que deben reunir, lo cual ha afectado la generalización de su uso a nivel clínico. De manera general se han establecido como índices de calidad de los aceites el índice de peróxidos, el índice de acidez, la viscosidad, la concentración de aldehídos.

### 2.4.1 Estabilidad de los aceites vegetales ozonizados

El desarrollo de métodos y estrategias para preservar los aceites vegetales ozonizados y por tanto oxidados, ha sido una tarea ardua. En general los aceites oxidados continúan rutas de descomposición muy difíciles de detener. El resultado de la oxidación de las grasas es el desarrollo de una rancidez (término utilizado para describir la oxidación de las grasas) acompañada de sabor y olores desagradables, además de cambio en las propiedades físicas (ej. incremento de la viscosidad). Aunque el deterioro de los aceites puede provenir de otras causas distintas a la oxidación como la acción de enzimas o microorganismos, la oxidación es, la causa más importante desde el punto de vista práctico. La luz, el calor y ciertas impurezas, tales como el agua y los metales, aceleran ese proceso. Se conoce que los peróxidos son los compuestos de descomposición primaria de la oxidación de las grasas y aceites. En la reacción secundaria, los productos de descomposición que resultan de la oxidación son los peróxidos, aldehídos, ácidos, entre otros.

La reacción entre un aceite vegetal y el ozono es una reacción de oxidación en la que se forman compuestos peroxídicos que elevan considerablemente el índice de peróxido del aceite tratado y por ende favorecen sus procesos de oxidación y degradación posterior. Las reacciones que ocurren después de la reacción de ozonización, en las etapas de almacenamiento y preparación de formulaciones, son tan complejas que es imposible desarrollarlas al detalle por lo que solo mencionaremos las tres más importantes: formación de ácidos, despolimerización y auto-transformación de los derivados de hidroperóxidos.

Durante la ozonización de estos aceites y después durante el almacenamiento del producto, se observa la formación de ácidos libres tanto volátiles como no volátiles, en pequeñas cantidades. Esto demuestra que tiene lugar la oxidación de una parte de los aldehídos con el ozono y el oxígeno molecular a un estado de oxidación superior, correspondiente a los ácidos grasos y una auto-oxidación de los hidroxil-hidroperóxidos.

Asimismo, durante el almacenamiento del aceite vegetal ozonizado se observa una ligera disminución de la viscosidad, como consecuencia de la despolimerización de los poli-peróxidos que se forman durante el proceso. Los compuestos formados entre el óxido de carbonilo y el compuesto prótico en el medio reaccionante, son capaces de auto-descomponerse, quedando el aldehído y el hidroperóxido en equilibrio dinámico.

Estas reacciones en su conjunto provocan que los aceites vegetales ozonizados durante su almacenamiento cambien sus propiedades químicas, físicas y microbiológicas. Por todos estos factores, el conocimiento sobre la estabilidad de los aceites vegetales ozonizados constituye una premisa fundamental para preestablecer su tiempo de vida útil con buenas condiciones de calidad (Menéndez *et al.*, 2008).

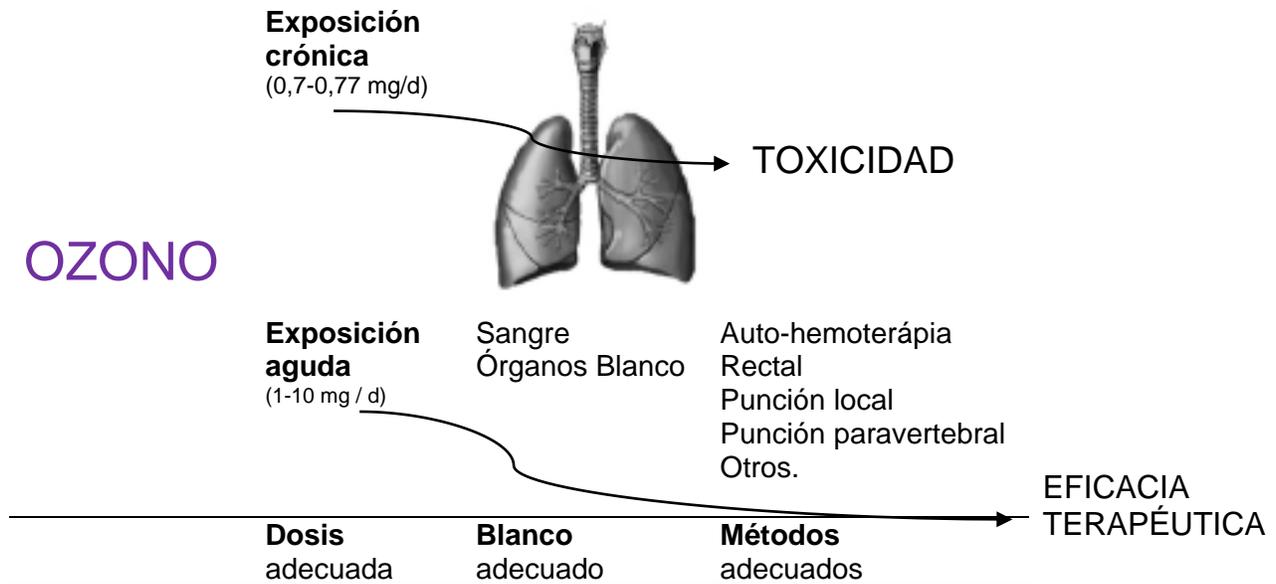
## 2.5. Reacción del ozono con los fluidos biológicos

Las propiedades terapéuticas del ozono están básicamente condicionadas por dos mecanismos independientes. 1) Su capacidad oxidante directa: su gran poder oxidante puede hacer que este reaccione directamente con paredes microbianas y ejerza sus efectos germicidas o por ejemplo que reaccione directamente con mediadores de la inflamación y el dolor o receptores de citocinas y bloquee respuestas biológicas (Re *et al.*, 2008b). 2) Efectos indirectos: estos están relacionados con los que tienen lugar tras la interacción O<sub>3</sub>-Biomoléculas, en este caso los peróxidos orgánicos, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ozónidos y aldehídos y otros productos de la oxidación generados en cantidades adecuadas y controladas activan mecanismos endógenos de respuesta al estrés que logran re-equilibrar el ambiente redox que había sido alterado por la patología de base. Mientras que el mecanismo inicial se corresponde con efectos a corto plazo del O<sub>3</sub> el segundo requiere tiempo, es por esto que para lograr la mayor parte de los efectos del O<sub>3</sub> se requiere de la aplicación de un ciclo terapéutico (Martínez-Sánchez y Re, 2010).

Con relación al segundo mecanismo el Prof. Bocci refiere que la reacción del ozono con tal variedad de compuestos moleculares presentes en los organismos vivos implica dos procesos fundamentales: una **fase inicial** de reacción en la que, a pesar de consumirse una buena parte del ozono los antioxidantes presentes en el plasma, se forma una cantidad de especies reactivas del oxígeno (ERO), capaces de disparar algunas vías bioquímicas (aunque estas ERO son neutralizadas en 0,5 a 1 min por los sistemas antioxidantes, convirtiendo el ozono en agua) y una **fase tardía** en la que se forman productos de oxidación lipídica, tales como: radicales alquil peroxilo ROO•, hidroperóxidos (R-OOH), mezclas complejas de productos finales de aldehídos de peso molecular bajo (malonildialdehído) y alquenes 4-oxo-2,3-transnonenal; y también, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (un oxidante que aunque no es un radical, se incluye dentro de las ERO). Tanto este como los POL son responsables de los efectos terapéuticos y biológicos tardíos del ozono. La presencia transitoria de concentraciones elevadas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en el citoplasma de células tratadas con O<sub>3</sub> indica que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> actúa como uno de los mensajeros químicos del ozono y que su concentración es crítica: lo que significa que ser superior a un cierto umbral para ser efectiva, pero no muy superior que cause daño. Este pequeño, transitorio y calculado estrés oxidativo que se alcanza con el ozono a dosis terapéuticas es necesario para activar un conjunto de funciones biológicas deprimidas sin causar efectos adversos. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es reconocido como un compuesto señalizador intracelular, capaz de activar una tiroxina cinasa, que fosforila al factor de transcripción nuclear NF-κB con la consecuente síntesis de diferentes proteínas. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es capaz de actuar en células sanguíneas mononucleares, en plaquetas, células endoteliales y eritrocitos. Con respecto a los POL, que también pueden alcanzar cualquier órgano, su toxicidad depende de su concentración final y el tipo de tejido donde se distribuyan, pudiendo ser perjudiciales o mensajeros fisiológicos capaces de reactivar un sistema biológico deteriorado (Niki, 2009).

Es importante recalcar que estas variadas acciones biológicas alcanzan resultados terapéuticos cuando el ozono es aplicado a dosis adecuadas por una vía no dañina para el organismo. De este modo, no se producen: reacciones adversas ni daño genotóxico y el amplio espectro de efectos que genera, hace posible su aplicación en una gran diversidad de especialidades médicas, y dentro de estas, en una disímil variedad de procesos (Fig. 8).

Paracelso (Philippus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim) (1493 - 1541)  
 ¿Hay algo que no sea veneno? Todas las cosas son veneno, y no hay nada que no lo sea.  
 Solamente la dosis determina que una cosa sea o no veneno: *dosis sola facit venenum*.



**Fig. 8.** Efectos biológicos del ozono en dependencia de la dosis, el blanco y los métodos que se apliquen.

### 3. Propiedades biológicas del ozono

#### 3.1. El ozono en el metabolismo del oxígeno

La entrega de oxígeno a los tejidos se ve favorecida tras la ozonoterapia. Estos efectos responden a diferentes mecanismos. Existen varias evidencias experimentales que soportan estos efectos. La agregación eritrocitaria de las enfermedades arteriales oclusivas es revertida por la ozonoterapia mediante cambios en las cargas eléctricas de la membrana eritrocitaria. El incremento en la velocidad de la glicólisis en el eritrocito va acompañado de un significativo aumento en el intercambio de iones sodio y potasio, los cuales son los responsables de mantener el potencial eléctrico de membrana, normalizando el intercambio de tales iones. Las enfermedades arteriales oclusivas están relacionadas con la pérdida del potencial normal de la membrana plasmática eritrocitaria. La normalización del intercambio de iones, por el ozono y sus productos, favorece la restauración del potencial normal. Por consiguiente, la regeneración de las condiciones eléctricas normales de la membrana propicia recuperar la flexibilidad y plasticidad de los eritrocitos mejorando de esta forma las propiedades reológicas de la sangre, lo cual favorece consecuentemente el transporte de oxígeno. Se conoce que, al tratar pacientes con enfermedad arterial oclusiva con ozono por autohemoterapia, se produce una ligera peroxidación de la membrana eritrocitaria que a su vez induce un incremento en la fluidez de la membrana con aumento de la deformidad y filtrabilidad. Además durante el tratamiento con O<sub>3</sub> se manifiesta una menor velocidad de eritrosedimentación, con una disminución de la viscosidad, que explica la mejoría de los indicadores hemorreológicos de estos pacientes (Menéndez *et al.*, 2008).

Por otro lado, al estudiar el efecto del ozono en el flujo sanguíneo cerebral se observó incrementos en la velocidad diastólica en la arteria media cerebral, compatibles con una disminución de la resistencia vascular, una mejoría en las propiedades reológicas y por ende un incremento del flujo sanguíneo (corroborado por los incrementos observados de flujo sanguíneo en la arteria carótida común). Algunos experimentos también han observado resultados satisfactorios en la oxigenación de músculos en reposo tras el tratamiento con O<sub>3</sub> sobre todo, en aquellos más hipóxicos.

Sin embargo, se conocen otros trabajos en los que se afirma la no ocurrencia de peroxidación de la membrana por el ataque del ozono. En estos casos, se refiere que los eritrocitos están bien protegidos por los sistemas de defensa antioxidantes, los cuales evitan que ocurra una peroxidación lipídica de su membrana. Luego, son necesarios estudios adicionales para corroborar si en esas circunstancias de verdad ocurre una muy ligera peroxidación que propicie una mejoría de las propiedades hemorreológicas.

La selectiva reactividad del ozono para la formación de POL y ERO facilita la activación directa del metabolismo eritrocitario. El primer paso de la reacción consiste en la adición electrofílica del ozono a los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados presentes en un porcentaje elevado en los fluidos y estructuras celulares del organismo. De esta forma, los peróxidos de cadena más corta formados (por la ruptura de la cadena carbonada a nivel del doble enlace) pueden penetrar al eritrocito e influir en su metabolismo de manera característica. La secuencia funcional sucede a través de un pequeño y controlado estrés oxidativo; por tanto, entran en función los sistemas de defensa antioxidante.

El aumento de la oxigenación y los efectos beneficiosos de la ozonoterapia en las enfermedades isquémicas pudiera estar asociado a la microliberación de ATP en los eritrocitos y a la vasodilatación encontrada. Específicamente, en pacientes con enfermedades infecciosas se refiere, que induce.

Durante la autohemoterapia, algunas trazas de POL presentes en la sangre ozonizada pueden activar la diferenciación a nivel eritropoyético, favorecer la formación de nuevos

eritrocitos con características bioquímicas mejoradas a los que llama "eritrocitos superdotados". Si esta hipótesis pudiera demostrarse, pudiera presumirse que la médula ósea liberará camadas de nuevos eritrocitos capaces de satisfacer los incrementados requerimientos energéticos y biosintéticos impuestos por el tratamiento (Bocci, 2005).

Aunque está hipótesis no ha sido demostrada se encuentra parcialmente soportada por los resultados de trabajos previos sobre la efectividad de la ozonoterapia en modelos de I/R. (Ajamiéd *et al.*, 2004, 2005; Martínez-Sánchez *et al.*, 2005b). Además, las mejorías clínicas observadas en los pacientes tratados con ozonoterapia no terminan al cesar el tratamiento sino que persiste por 3 a 4 meses, hecho que probablemente se relacione con la extensión de vida de esos eritrocitos superdotados presentes en la circulación.

El 2,3-DPG tiene ciertas funciones clave, entre ellas, actuar sobre la desaturación del oxígeno de la oxihemoglobina provocando una mayor cesión de este a los tejidos vecinos. El corrimiento hacia la derecha de la curva de disociación de la oxihemoglobina (la  $p_{50}$  se incrementa) puede ser observado bien por un ligero decremento del pH intracelular (acidosis) o aumento de la  $p_{CO_2}$  (efecto Bohr) y por el aumento del 2,3-DPG. Existen estudios que demuestran la ocurrencia de un aumento de este en pacientes con enfermedad arterial oclusiva tratados con ozonoterapia por autohemoterapia, sobre todo, en aquellos pacientes que inicialmente presentaban bajas concentraciones de él. Este comportamiento también se observó en ancianos tratados durante 13 semanas con ozono por vía rectal. Este compuesto se forma en la vía glicolítica cuando el 1,3-difosfoglicerato se convierte en él por mediación de la enzima 2,3-difosfoglicerato mutasa (2,3-DPGM). A su vez, el 2,3-DPG se transforma en fosfoglicerato a través de la 2,3-difosfogliceratofosfatasa (2,3-DPGP). No se conoce exactamente cómo el ozono es capaz de incrementar las concentraciones de 2,3-DPG. Normalmente, los tejidos isquémicos tratan de liberar mediadores como el factor de hipoxia inducible para corregir la hipoxia local. Habría que investigar si se liberan estos factores al ozonizar la sangre y cómo actuarían, si favoreciendo la actividad enzimática de la 2,3-DPGM o regulando su síntesis e inhibiendo la 2,3-DPGP.

## 3.2. Germicida.

Las primeras aplicaciones del ozono en el campo de la medicina estuvieron encaminadas a la desinfección de heridas e instrumental quirúrgico, aprovechando sus propiedades altamente oxidantes.

### 3.2.1. Uso del ozono como germicida

En 1915 A. Wolf explota las propiedades germicidas del ozono en el campo de la medicina. Las aplicaciones iniciales estuvieron dirigidas al tratamiento local de heridas infectadas. Posteriormente, tras el descubrimiento de los materiales plásticos resistentes a la reacción con el ozono, se hizo posible el tratamiento local de extremidades sépticas con ozono gaseoso, introduciéndolas en bolsas plásticas de fácil producción y adquisición. Con el progresivo desarrollo de la ozonoterapia, se introduce el tratamiento mediante sistemas de baja presión (sub-atmosférico) por Werkmeister en 1976. La acción germicida (bactericida, virucida y fungicida) de amplio espectro del ozono permite que la ozonoterapia sea un valioso tratamiento para la limpieza y desinfección de heridas infectadas y otros procesos sépticos locales.

Además, esta forma de aplicación puede ser combinada con otros procedimientos también derivados de las aplicaciones del gas (ozonoterapia sistémica y curaciones locales con agua y aceites vegetales ozonizados) sin el peligro de resistencia de los micro-organismos, ni de toxicidad o efectos adversos y con la ventaja de resultados curativos más precoces en afecciones en las que la evolución suele ser de semanas o incluso meses

En los tratamientos locales se pudiera plantear la ocurrencia de la inactivación de los

microorganismos por la acción directa del ozono, con la ruptura oxidativa de sus membranas. Sin embargo, el mecanismo de acción a través del cual el ozono ejerce su acción germicida sistémica es actualmente fuente de controversias. Ha sido invocado que puede ser el resultado de la formación de ERO, derivados de la interacción del ozono con diferentes compuestos orgánicos, que potencian la acción defensiva normal del organismo, así como de su efecto en la modulación del sistema inmune a través de la liberación de citocinas.

En sepsis severa con o sin shock séptico, puede ser extremadamente difícil la terapia a seguir. Los antibióticos constituyen claramente los principales medicamentos usados, pero a la vez, son con frecuencia inadecuados en pacientes inmuno-comprometidos. Además, hay que tener en cuenta la resistencia que crean los antibióticos en diferentes microorganismos.

Hasta el presente han sido reportados muchos modelos experimentales de peritonitis con el objetivo de estudiar la patogénesis de dicho proceso y encontrar nuevas formas terapéuticas. En un modelo de peritonitis letal, experimental se demostró que el tratamiento con cinco aplicaciones intra-peritoneales de ozono, de forma profiláctica, antes de generar la sepsis era capaz de aumentar la supervivencia de los animales, la cual estaba relacionada con la dosis, de ozono aplicada. A una concentración de ozono de 10 µg/mL la supervivencia fue del 56 %, mientras que a 50 µg/mL y 100 µg/mL, fue de 34 % y 23 % respectivamente en comparación con un 5 % en los animales no tratados con ozono. Además la asociación del pre-tratamiento con ozono y diferentes antibióticos demostró un aumento significativo en la efectividad de los antibióticos al comparar los resultados con los correspondientes al grupo tratado solo con antibióticos.

La enfermedad por quemaduras es un tema de interés médico porque está muy relacionado con la sepsis, los síndromes de inflamación sistémica generalizada y de disfunción múltiple de órganos, el shock y el trauma entre otros. Los resultados de un estudio experimental de quemadura en ratones con el objetivo de evaluar la efectividad del tratamiento con ozono en la evolución del daño multiorgánico mostraron que durante las quemaduras se produce un importante edema con isquemia tisular local. La falta de riego sanguíneo complica la necrosis y disminuye la velocidad de cicatrización y la posibilidad de sepsis se hace mayor. En esta investigación se demostró que el tratamiento con ozono por insuflación rectal produce una disminución en la mortalidad, un aumento en la actividad del tejido linfóide en el bazo y un menor daño hepático y renal, en comparación con los resultados de un tratamiento intra-peritoneal con suero fisiológico o Aloe.

El efecto germicida del ozono (por vía sistémica) también se ha podido demostrar en experiencias clínicas. Tal es el caso de un estudio que utilizó la ozonoterapia como coadyuvante en el tratamiento de un paciente quemado crítico. Después de 23 d de evolución en estado crítico decidió comenzar la ozonoterapia por autohemoterapia mayor y local. Con este fin, el cuerpo del paciente fue introducido en una bolsa plástica excepto la cabeza. Antes del tratamiento local en la bolsa, las heridas se limpiaron con agua ozonizada y una vez retirada la bolsa, se cubrieron con aceite ozonizado. Se realizaron cuatro tratamientos de autohemoterapia mayor y tres tratamientos con bolsa. Al inicio del tratamiento con ozono, se realizaron 12 cultivos microbiológicos de las lesiones, los cuales fueron todos positivos. Después del tratamiento con ozono, se realizaron 13 cultivos microbiológicos, todos negativos y 22 estudios bacteriológicos (de las lesiones, de la punta de los catéteres, urocultivos, esputo y exudados faríngeos), todos con resultados negativos.

Otro estudio fue el realizado en 19 pacientes poli-traumatizados, ingresados en una sala de cuidados intensivos. El tratamiento con ozono se realizó con autohemoterapia (cinco sesiones a una dosis de 9 mg). El ozono utilizado precozmente, en pacientes en estado crítico, evitó la sepsis respiratoria y en los casos que se hizo necesario el uso concomitante de antibióticos se logró un control mejor del proceso séptico (Menéndez *et al.*, 2008).

### 3.2.2. Uso de los aceites ozonizados como germicida

Los comúnmente llamados aceites ozonizados pueden prepararse en diferentes formas: líquido oleoso, emulsiones lipofílicas e hidrofílicas y cremas, ungüentos, óvulos, supositorios, cápsulas blandas, entre otros. Estas presentan actividades biológicas locales y efectos terapéuticos similares a los del ozono administrado *in vivo*. Entre las propiedades terapéuticas de esta clase de aceite ozonizado, puede resaltarse, en relación con algunos de sus efectos locales, los siguientes: Alta actividad germicida general (antimicótica, antibacteriana, antiviral). Activación de la micro-circulación local. Mejoramiento de la metabolización celular del oxígeno. Estimulación del crecimiento del tejido de granulación y epitelización y revitalización del tejido epitelial.

Esta forma de aplicación local de metabolitos del ozono es muy apropiada para muchos de los tipos de patologías tratadas tradicionalmente por la ozonoterapia, y se logran resultados similares, aunque a veces, se necesitan períodos de tratamiento algo más largos, probablemente debido al más bajo poder oxigenante o al menor efecto sistémico. Por otra parte, una de las ventajas que tienen sobre el ozono mismo es la posibilidad de aplicar la ozonoterapia "en casa", no requiriendo la presencia física de los pacientes en el lugar donde tienen que ser aplicados los tratamientos con ozono gaseoso. Esto puede también combinarse con las aplicaciones de ozono gas, durante los períodos entre sesiones de ozonoterapia.

Ejemplos de las entidades en las cuales se han logrado buenos resultados con la aplicación de aceites ozonizados son, entre otros, los siguientes:

Acné

Escaras, fistulas y heridas post quirúrgicas

Úlceras gástricas

Giardiasis

Gingivoestomatitis

Úlceras de los miembros inferiores (insuficiencia venosa o arterial)

Infecciones vulvovaginales

Quemaduras de la piel

*Herpes simplex labialis* y *genitalis* recidivantes

Otitis externa crónica

Onicomycosis

Epidermofitosis (Conductos radiculares dentales infectados)

No relacionados con procesos infecciosos:

Atenuación de arrugas

Dermatitis y manchas de la piel

Celulitis y piel deteriorada

Hiperestesia dental

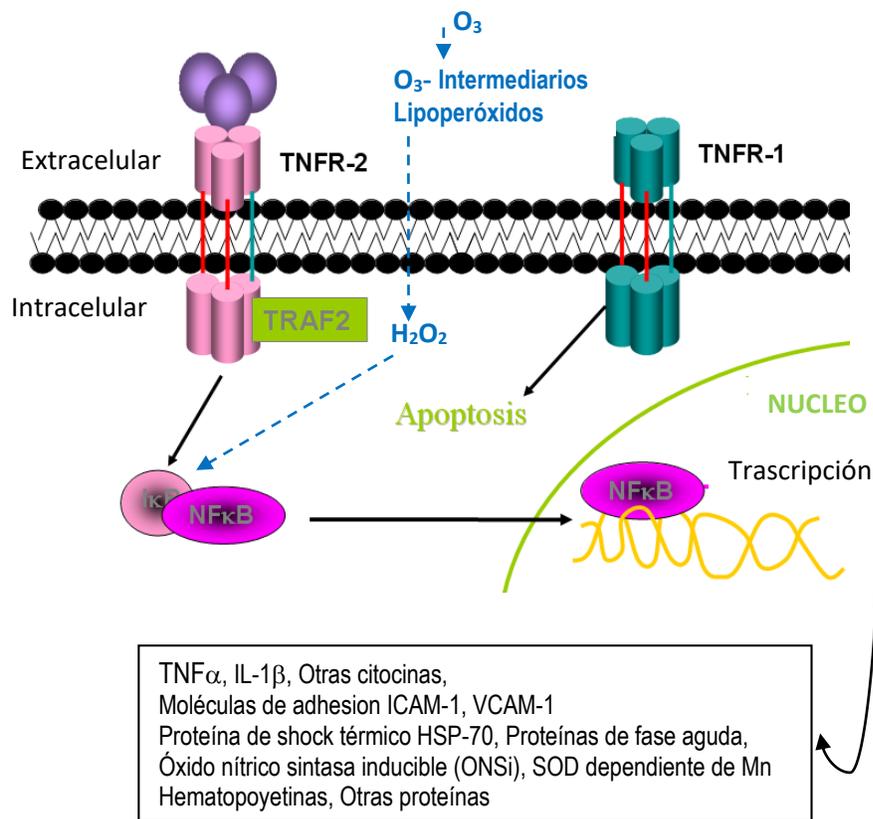
### 3.3. Inmunomodulador

El tratamiento con ozono ha sido descrito como inductor ideal de citocinas, ya que es de escasa toxicidad demostrada hasta el presente (cuando se usa en el intervalo de dosis apropiado y bajo los métodos correctos), no antigénico y produce una respuesta inmune positiva sin efectos adversos. Adicionalmente, esta acción también puede ser catalogada de tipo moduladora si se tiene en cuenta que:

- ✓La liberación de citocinas se produce de forma endógena debido a que la acción inmunológica del ozono sobre la sangre está dirigida fundamentalmente sobre los monocitos y los linfocitos T.
- ✓Se considera que durante la administración del ozono con fines terapéuticos puede incrementarse la liberación de antagonistas de las citocinas, o de citocinas como la interleucina-10 (IL-10) y el factor transformador del crecimiento tipo  $\beta 1$  (TGF $\beta 1$ ), capaces de suprimir la citotoxicidad auto-reactiva, por tanto la inducción de citocinas no sobrepasaría valores más allá de los necesarios una vez que se activen los elementos contra-reguladores, también estos de carácter y naturaleza fisiológicos.

Tras el tratamiento con  $O_3$  se generan diferentes mediadores, entre ellos el  $H_2O_2$ . Un pequeño incremento de  $H_2O_2$  en el citosol, actúa como mensajero intracelular del ozono, dispara el factor NF $\kappa$ B. El  $H_2O_2$ , activa la tirosincinasa que fosforila la I $\kappa$ B con lo que pasan las dos subunidades del citosol al núcleo y se regula la expresión génica de citocinas, proteínas de fase aguda, hematopoyetinas, moléculas de adhesión y otras proteínas (Fig. 9). La activación del  $H_2O_2$ , ha adquirido importancia en los últimos años y depende su respuesta (ya sea una *señal de muerte o de vida*) de sus concentraciones. Los linfocitos poseen elevadas concentraciones de GSH y aunque tienen menos catalasa que los eritrocitos, están bien equipados con el sistema de la GPx-GR. De ahí, la importancia de la dosis a utilizar por el ozonoterapeuta: si es muy baja, los sistemas de defensa antioxidante eliminan el efecto, pues el nivel de  $H_2O_2$ , es incapaz de activar el NF $\kappa$ B y si es muy elevada (o muy pequeño el número de antioxidantes) puede producir toxicidad por saturación de los sistemas de defensa antioxidante. De aquí que la explicación fundamental a la toxicidad encontrada cuando el ozono es inhalado (este gas es capaz de estimular a las células bronco-alveolares a liberar citocinas proinflamatorias), daño que se potencia debido a la mínima capacidad antioxidante de los fluidos del tracto respiratorio. Esto es muy diferente a lo que ocurre con la sangre que posee una potente capacidad antioxidante (Tabla 3) (Bocci, 2006; Menéndez *et al.*, 2008).

Investigaciones *in vitro* han demostrado que concentraciones de ozono comprendidas entre 10  $\mu$ g/mL y 78  $\mu$ g/mL de sangre, producen la liberación progresiva de citocinas tales como interferón (IFN)  $\beta$  y  $\gamma$ , factor de necrosis tumoral (FNT) interleucinas (IL) 1 $\beta$ , 2, 4, 6, 8 y 10, factor estimulador de colonia granulocito-macrófago (GM-CSF) y factor transformador del crecimiento (TGF)1 $\beta$ . Por tanto, el ozono es capaz de estimular las células del sistema inmune, y por tanto liberar una pequeña cantidad de citocinas inmunoestimuladoras e inmunosupresoras que son captadas por células vecinas. De esta forma se mantiene el sistema inmune en estado de alerta (Bocci, 2005).



**Fig. 9.** Un pequeño incremento de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el citosol, actúa como mensajero intracelular del ozono y dispara el factor NFκB (Menendez *et al.*, 2008).

**Tabla 3.** Comparación del contenido de antioxidantes del fluido alveolar superficial con respecto a la sangre (Bocci, 2006).

|                   | Fluido alveolar superficial | Sangre                           |
|-------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| Volumen           | 17-20 mL                    | Plasma ~ 2,71 L                  |
| Proteínas totales | ~7 mg/L Total ~130 mg       | ~75 mg/L Total ~202 g            |
| Albumina          | ~3,5 mg/L Total ~63 mg      | ~45 mg/L Total ~122 g            |
| Trasferrina       | ~0,3 mg/L                   | 2-3 mg/L                         |
| Ceruloplasmina    | ~25 µg/L                    | 140-400 µg/L                     |
| Lactoferrina      | ~0,5 µg/L                   | ?                                |
| GSH               | 300-400 µM                  | Plasma ~3 µM Eritrocitos ~2,2 mM |
| Vitamina E        | ~2 µg/L                     | ~10-20 µg/L                      |
| Vitamina C        | ~3,5 µg/L                   | ~9 µg/L                          |
| Acido urico       | ~0,05 mg/L                  | ~0,04-0,07 mg/L                  |
| Bilirubina        | ?                           | ~1,0 mg/dL                       |
| Glucosa           | ~0,4 mg/L                   | ~0,7-1,0 mg/L                    |

La proteína MX (marcadora de interferón) inducible por interferón se ha detectado durante infecciones virales, se ha demostrado que bloquea la transcripción del genoma viral. Existen evidencias de la expresión de interferón en un voluntario sano, al cual se le aplicó el ozono por autohemoterapia mayor (seis tratamientos), medido indirectamente a través de la proteína MX en células sanguíneas mononucleares. Mientras que el interferón tiene un tiempo de vida media de algunas horas después de su administración subcutánea, la proteína MX tiene un tiempo de vida media de 24 h a 36 h y puede ser detectada en células sanguíneas mononucleares 2 d después de la total desaparición del interferón en plasma. Tras el tratamiento de este paciente se encontró un progresivo, pero variable incremento de MX, probablemente debido a la liberación de interferón, lográndose alcanzar un estado antiviral (Bocci, 2005).

En estudios realizados en Cuba, empleando el modelo de IR en hígado, con respecto al factor de transcripción nuclear NF $\kappa$ B, el FNT- $\alpha$  y la proteína de shock térmico HSP-70, se apreció una fuerte expresión de la subunidad p65, el FNT- $\alpha$  y la HSP-70 en el grupo IR. Sin embargo, el tratamiento con ozono (pre-tratamiento y después + IR) moduló drásticamente la expresión de estas biomoléculas reguladoras de la función celular con respecto al grupo sometido a IR .

Durante la IR hepática, la activación de las células de Kupffer constituye un evento importante en el daño hepático. Estas células activadas secretan una gran cantidad de mediadores pro-inflamatorios como el FNT- $\alpha$  y la IL-1 que amplifican la respuesta inflamatoria generalizada, afectando órganos remotos como el pulmón. El FNT- $\alpha$  es producido a expensas de la activación del factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B (p65) y, al mismo tiempo, esta citocina es responsable de la activación de este factor generando un lazo que pudiera asociarse a los procesos inflamatorios crónicos. La activación de NF- $\kappa$ B conduce a la expresión de diferentes genes, que codifican para un amplio espectro de enzimas y proteínas, como la óxido nítrico sintasa inducible (ONSi), la SOD dependiente de Mn y la proteína de shock térmico HSP-70, entre otras, las cuales participan tanto en la citoprotección como en la muerte celular. Manipulaciones farmacológicas han evidenciado que la inhibición de FNT- $\alpha$  y la IL-1, durante la reperfusión, brindan hepatoprotección. En el estudio mencionado anteriormente se pudo comprobar cómo el pretratamiento con ozono logró modular la expresión de NF $\kappa$ B y el FNT- $\alpha$ , protegiendo las células hepáticas contra el daño por I/R. (Ajamieh *et al.*, 2004, 2005).

Se observó un efecto inhibitorio significativo en la liberación de FNT- $\alpha$  en el suero de ratones tratados con ozono, tanto por vía i.p. como rectal. Las concentraciones del FNT- $\alpha$  de los animales pre-tratados con ozono fue similar a la de los controles negativos. Este efecto inhibitorio del ozono sobre el FNT $\alpha$  puede ser una consecuencia de la estimulación de los sistemas de defensa antioxidantes inducidos por la ozonoterapia. Se conoce que las ERO están fuertemente involucradas en la inducción de los procesos inflamatorios y en la patogénesis del shock endotóxico, así como en el efecto de los agentes antioxidantes en la inhibición del NF $\kappa$ B.

En el modelo animal de peritonitis letal, donde la sepsis se induce por inyección intraperitoneal de materia fecal de una rata donante, se aplicó el pre-tratamiento con ozono por vía intraperitoneal durante 5 d (a una concentración de ozono de 10 mg/L y 80 mL- del gas/kg de peso), a razón de una aplicación diaria. La infección con la materia fecal se realizó 24 h después de la última aplicación del ozono. La sobrevivencia del grupo tratado con ozono fue de un 35 %, mientras que los animales de los grupos no tratados o tratados con aire murieron todos después de la infección. En cuanto a las citocinas proinflamatorias medidas (IL-1 $\beta$ , IL-2,

FNT- $\alpha$ ,) no se observó ningún efecto modulador en su expresión derivarlo del tratamiento con ozono, a pesar de la sobrevivencia alcanzada en este grupo. Sin embargo, cuando se utiliza este mismo modelo, pero se aplica combinado con el ozono, una mezcla formarla por el antibiótico piperacilina sódica (penicilina semi-sintética) y el tazobactan sódico (inhibidor de la beta-lactamasa) se logra incrementar la sobrevivencia en un 93 %, cuando se aplican dos dosis de esta mezcla (la primera simultáneamente con la infección y la otra, 1 h después). Además, se observó una disminución significativa de la IL-10 y el FNT- $\alpha$  (medidos en bazo e hígado). Sin embargo, la mezcla por sí sola no aumentó la sobrevivencia ni tuvo efecto sobre las citocinas medidas. Resultados similares en cuanto la modulación de citocinas proinflamatorias, se observaron al utilizar diferentes productos anestésicos después de la administración, durante 5 d, de ozono por vía intraperitoneal.

Esta característica moduladora atribuible a la ozonoterapia, se revela en algunos de los hallazgos clínicos, que aunque aparentemente paradójicos, se observan en el tratamiento a pacientes con afecciones del tipo inmunológico. Se conoce de resultados satisfactorios al aplicar este método terapéutico a pacientes caracterizados por una respuesta inmunológica exagerada, como en las enfermedades consideradas de etiología auto-inmune, así como en otros tipos de pacientes con déficit en sus funciones inmunológicas. Acerca de este último aspecto, un estudio realizado en 59 niños con inmunodeficiencia humoral reveló una estimulación de las inmunoglobulinas 1gA, IgG e IgM hasta concentraciones normales, con tres ciclos de tratamiento con ozono por vía rectal a lo largo de 1 año. Asimismo, un estudio realizado en 25 pacientes quemados muy graves, críticos y críticos extremos, los cuales además del tratamiento habitual en estos casos, recibieron autohemoterapia mayor desde su primer día de ingreso (en dosis de 12 mg) demostró una normalización de diferentes indicadores de la inmunología humoral (IgG, IgM, complemento C4 y antitrombina 3) tras las 10 sesiones de ozonoterapia recibidas. Esto es algo muy importante a destacar, porque el paciente gran quemado presenta entre sus graves complicaciones una profunda inmunodepresión, hecho que sumado a sus amplias superficies quemadas, lo hacen en extremo lábil a las infecciones que frecuentemente le producen la muerte (Menéndez *et al.*, 2008).

### 3.4. Efecto en la síntesis de mediadores hormonales

Se han registrado cambios hormonales temporales durante el tratamiento con saunas de ozono, particularmente de las hormonas del crecimiento y las beta endorfinas. Se ha postulado adicionalmente que tratamientos repetidos con saunas de ozono serian útiles para disminuir la presión arterial en pacientes hipertensos debido a que reajusta el sistema renina-angiotensina-aldosterona. Estos cambios hormonales que tienen lugar durante la ozonoterapia son breves y reversibles. En algunos casos se ha observado a nivel clínico que el ozono potencia el efecto de la hipertermia, se piensa que tanto la hipertemia como la ozonoterapia ejercen su efecto liberando una cascada hormonal CRH, ACTH, cortisol, DHEA, hormona del crecimiento y otras. Sin embargo el papel del ozono en el sistema neuro-endocrino aún no ha sido estudiado en profundidad y no se conoce cuan relevante es el tratamiento del ozono para modificar los perfiles hormonales (Bocci, 2005).

Algunas observaciones clínicas del Dr. Lamberto Re (no publicadas) han evidenciado que tras el tratamiento con autohemoterapia se produce una regulación y estabilización del ciclo

menstrual, observación que debe acompañarse de un estudio del perfil hormonal para corroborar si la terapia incide o no de manera decisiva en la cascada de regulación hormonal.

### 3.5. Regulador metabólico

Diversas observaciones preclínicas y clínicas realizadas han permitido observar la acción reguladora del ozono sobre indicadores metabólicos. Se ha apreciado en general una modulación de los indicadores inicialmente patológicos hacia valores normales. Dentro de estos se encuentran: glucosa, creatinina, hemoglobina, hematocrito, proteínas totales, lactato deshidrogenasa, colesterol, triglicéridos, lipoproteínas, enzimas hepáticas, bilirrubina, ácido úrico, ácido láctico y calcio, entre otras. No existe una explicación clara sobre los mecanismos de acción mediados por ozono que intervienen en este caso. Probablemente el re-equilibrio del sistema redox ajuste rutas metabólicas relacionadas con la estabilización de estos indicadores.

Por ejemplo, en 22 pacientes con cardiopatía isquémica se observó una disminución estadísticamente significativa del colesterol (COL) y de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en el plasma, al quinto y decimoquinto días de tratamiento con ozono con autohemoterapia, a una concentración de 50 µg/mL y 200 mL del gas, sin modificación de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y los triglicéridos (TG). Al quinto día, el COL y las LDL disminuyeron 5,5 % y 15,4 %, respectivamente, mientras que al decimoquinto día, la reducción fue del 9,7 % y 19,8 %, respectivamente. Se obtuvo una mayor disminución de las concentraciones de COL y LDL en los pacientes que recibieron mayor cantidad de tratamientos con ozono.

Un estudio del metabolismo lipídico de ratas alimentadas con dieta rica en grasa (durante 25 d) y luego tratadas con 15 inyecciones intramusculares de 0,2 mL de sangre ozonizada, con una concentración de ozono de 10 µg/mL, demostró un cambio significativo en el contenido de los lípidos del hígado, caracterizado por una disminución del colesterol total en el grupo de dieta grasa más tratamiento con ozono con respecto al grupo con dieta grasa sola. En experiencias de insuficiencia renal aguda, utilizando el modelo de cisplatino, se pudo apreciar que tanto cuando se pre-trataba con ozono y luego se inyectaba el cisplatino, como cuando se aplicaba el cisplatino y después se trataba con ozono, las concentraciones de creatinina en sangre disminuían significativamente con respecto a los animales tratados solamente con cisplatino.

Un estudio realizado en pacientes diabéticos tipo 2, con pie diabético neuroinfeccioso, los cuales fueron tratados un grupo con ozono por vía rectal y local (en la lesión) y otro con antibiótico (sistémico y local), arrojó concentraciones elevadas de glucosa en sangre al inicio del estudio. Sin embargo, después de finalizar ambos tratamientos, en el grupo tratado con ozono la concentración de glucosa disminuyó significativamente hasta los valores de referencia, no así en el grupo tratado con antibiótico (Martínez-Sánchez *et al.*, 2005<sup>a</sup>).

A un conjunto de niños con discapacidad auditiva se les determinaron las hormonas T3 (triyodo tironina), T4 (tiroxina) y el cortisol al inicio y al final de un tratamiento constituido por 20 aplicaciones de ozono por vía rectal (concentración de 40 µg/mL y volúmenes de gas entre 50 mL y 150 mL) a razón de una diaria. Al inicio del tratamiento, los pacientes presentaron T3 y T4 elevadas, por encima de las condiciones de referencia, las cuales se normalizaron al término del tratamiento. Las concentraciones de cortisol estuvieron dentro de las de referencia al inicio del tratamiento y permanecieron así, a su término (Menéndez *et al.*, 2008).

### 3.6. Modulador del estrés oxidativo

La ozonoterapia está muy vinculada al concepto de balance oxidación-reducción (ambiente redox) debido a que como parte de su mecanismo de acción genera un efecto antioxidante, siendo, paradójicamente, una terapia oxidativa empleada en enfermedades en las que está involucrado el proceso de estrés oxidativo. Además, el mecanismo general de acción de la ozonoterapia sistémica es a través de la producción de un pequeño y controlado (por las defensas antioxidantes del organismo) estrés oxidativo, el cual se conviene en un reto oxidante para la célula. La repetición sistémica de este estímulo induce en el organismo a una variedad de respuestas terapéuticas. Por tanto, la ozonoterapia está estrechamente ligada al proceso biológico conocido como estrés oxidativo (Fig. 10) (Martínez-Sánchez y Re, 2010).

La relación que existe entre la concentración de *radicales libres* y el estado de salud de los seres humanos es un hecho aceptado en la actualidad por la comunidad científico-médica. Vocablos nuevos, tales como **estrés oxidativo**, **radicales libres** y **anti-oxidante**, son cada vez más comunes y la cantidad de eventos científicos internacionales que se organizan cada año, así como artículos que aparecen tanto en revistas científicas como de divulgación popular, indican el interés cada vez más creciente sobre este tema. Esta avalancha informativa ha conducido a la aparición de miles de productos, de origen natural o sintético, que se expenden por lo general como «productos de salud» con el calificativo de «antioxidantes», con lo cual se quiere significar la capacidad de disminuir la concentración de radicales libres en el organismo humano y, por tanto, mejorar el estado de salud de quien lo consume.

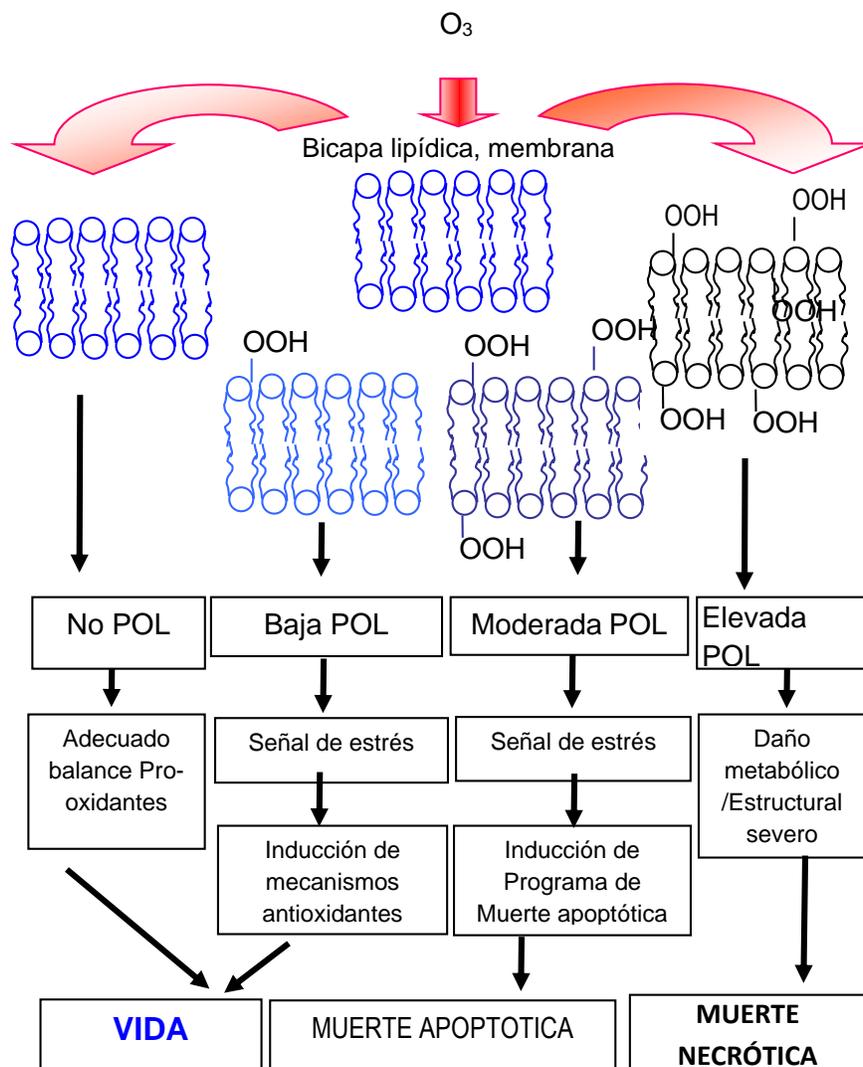
A partir de los años 90 del siglo XX el tema relacionado con los radicales libres y su participación en las patologías humanas ha tenido un gran y sostenido incremento en lo que se refiere al número de publicaciones científicas. Si bien en el periodo entre los años 1990-1998 existió una elevada proporción de trabajos referidos al tema «radicales libres» con una menor proporción en el tema «antioxidantes», a partir de esta fecha y hasta nuestros días el tema «antioxidantes» ha tenido un despegue considerable. Las razones sobre este comportamiento son variadas pero una de gran incidencia se relaciona con que en el periodo anterior a 1998 se realizaron fundamentalmente investigaciones básicas. Entre los principales hallazgos hasta esta fecha se puede señalar primero la demostración en la fase preclínica y luego en la clínica, de la participación de los radicales libres en diferentes mecanismos fisiopatológicos. En 1997 se establece la racional para el uso de terapias antioxidantes, y es a partir de este año que despegan los trabajos que buscan demostrar la efectividad de estas terapias en diferentes condiciones clínicas. El «estancamiento» en el número de investigaciones por año que suceden a partir del año 1998 para muchos expertos está estrechamente vinculada a dos factores (Núñez Sellés *et al.* 2009):

- 1) Los métodos analíticos que se emplearon en las fases de investigación básica no son fácilmente aplicables a los estudios en humanos
- 2) El personal que está a cargo directo de la salud humana no domina el significado de las variables de laboratorio referidas al estrés oxidativo. Debido al rápido avance de las investigaciones en este tema, estas materias no formaron parte de su preparación básica

Un sistema de control terapéutico y seguridad toxicológica, es de gran importancia a en las aplicaciones de la ozonoterapia sistémica. La utilización de indicadores bioquímicos específicos para controlar las dosis aplicables en términos de seguridad y efectos terapéuticos satisfactorios ha venido ganando en importancia y constituye las bases para una aplicación no empírica del ozono en Medicina. Sin embargo, todavía no existe un criterio generalizado de los

indicadores bioquímicos específicos que pueden ser útiles en la evaluación tanto de la ausencia de ocurrencia de efectos tóxicos, así como de los efectos beneficiosos aportados por la ozonoterapia sistémica.

El desbalance del sistema redox está vinculado a un gran número de patologías humanas, desde infecciosas, auto-inmunes hasta las neurodegenerativas. Muchas de gran morbimortalidad. Todo este grupo de patologías es susceptible a ser tratado con la ozonoterapia. En este campo existen numerosos resultados clínicos y experimentales que avalan su aplicación, no obstante es necesario el desarrollo de nuevos estudios clínicos controlados que afiancen esta terapia (Martínez-Sánchez, 2007).



**Fig. 10.** Relación entre la peroxidación lipídica originada por ozono y los mecanismos de transducción de señales.  $O_3$ , ozono; POL, peroxidación lipídica. (Martínez-Sánchez *et al.*, 2010).

En términos de seguridad, debe tenerse en cuenta que en las células normales existe un delicado equilibrio entre la actividad oxidante y la antioxidante. No obstante, este equilibrio puede ser perturbado por una producción excesiva de ERO o por deficiencias en los sistemas de defensa antioxidante propios del organismo o los aportados por la dieta, conduciendo hacia

un estado oxidativo. Un prolongado estado de actividad oxidante es la causa que caracteriza al establecimiento del estrés oxidativo que posteriormente conduce a serios efectos deletéreos, como ocurre en la hiperoxia. De aquí, que sea conveniente conocer la actividad pro-oxidante y antioxidante del paciente, así como su capacidad metabólica antes y durante la aplicación de la ozonoterapia. En tal aspecto, el conocimiento del estado redox brinda una base real para seleccionar la dosis de ozono en el comienzo y durante el transcurso del tratamiento y, sobre todo, para determinar analíticamente si hay una respuesta positiva a este.

El seguimiento del estado de estrés oxidativo se ha convertido en un interesante reto para los bioquímicos clínicos. El control y seguimiento (diagnóstico) del estrés oxidativo es virtualmente imposible de valorar directamente en el organismo completo o intacto. Por esta limitación es que se considera la medición de variables indirectas en las que están involucradas las concentraciones circulantes de antioxidantes (enzimáticos y no-enzimáticos), los productos de la oxidación de lípidos y proteínas, la sensibilidad a la oxidación de lipoproteínas, o las concentraciones de anticuerpos contra moléculas oxidadas.

La valoración independiente de indicadores de la actividad antioxidante o pro-oxidante no revela exactamente el estado del balance redox del organismo en un momento dado debido a que estas variables forman parte de un sistema muy complejo y en muchas oportunidades la variación individual de una variable no muestra el comportamiento del sistema en su conjunto.

Más de 50 índices son comúnmente utilizados para evaluar el estrés oxidativo, lo que ha guiado el desarrollo de más de 100 métodos (Tabla 4). Se ha reportado que el uso de procedimientos en los que se mide la capacidad de una muestra para resistir la oxidación son métodos inespecíficos y que no están dirigidos a las fuentes fisio-patológicas relevantes en el estrés oxidativo; por lo que consecuentemente, su utilidad esta limitarla a estudios comparativos (Martínez-Sánchez *et al.* 2005).

**Tabla 4.** Comparación entre diferentes grupos de bioindicadores basados en algunos criterios y requerimientos para su consideración como biomarcador.

| Requerimiento                | Acanos | Aldehídos | iP | 8-OH-dG | Amino-ácidos oxidados |
|------------------------------|--------|-----------|----|---------|-----------------------|
| Velocidad de análisis        | -      | ±         | -  | -       | -                     |
| Sensibilidad                 | ±      | ±         | ±  | ±       | ±                     |
| Facilidad de análisis        | -      | ±         | -  | -       | ±                     |
| Técnicas no invasivas        | +      | +         | -  | ±       | -                     |
| Interferencias               | -      | -         | ±  | ±       | ±                     |
| Especificidad para el efecto | ±      | ±         | +  | ±       | ±                     |
| Correlación con el daño      | +      | +         | +  | ±       | ±                     |
| Aplicabilidad en humanos     | +      | ±         | -  | ±       | ±                     |

Leyenda: iP, isoprostanos; 8-OH-dG, 8 hidroxil desoxi guanina; -, no aplicable; ±, aplicable con desventajas; +, aplicable.

De igual manera, se han propuesto complejos y sensibles procedimientos bioquímicos para la determinación de niveles mínimos de estrés oxidativo *in vivo*. Sin embargo, muchos de estos métodos también presentan especificidad relativa, son complicadamente laboriosos, muy caros y requieren de equipos complejos, por lo que deben ser empleados tornando en consideración estas características. Las industrias que producen juegos de diagnóstico para los laboratorios clínicos se han lanzado en millonarias investigaciones para tratar de desarrollar procedimientos simples y con una buena relación efectividad/costo, que les permita incorporarlos a la práctica clínica de rutina. Por último, es necesario considerar que el estudio de parámetros individuales no permite abordar totalmente el fenómeno del estrés oxidativo, debe prestarse atención a la selección de una metodología conveniente dependiendo de la situación clínica específica (Martínez-Sánchez *et al.* 2010).

Para seleccionar indicadores específicos del estrés oxidativo para la ozonoterapia, es necesario pasar revista a las diferentes reacciones químicas en las que puede intervenir el ozono al ponerse en contacto con las biomoléculas. Los sustratos críticos para el ozono son los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, sin embargo, los lípidos y las proteínas son las principales dianas en la reacción del ozono con el plasma sanguíneo, la mucosa rectal o los fluidos biológicos. La reacción con los lípidos ocurre casi exclusivamente con los dobles enlaces carbono-carbono presentes en los ácidos grasos insaturados y en los grupos funcionales laterales de las cadenas de varios residuos de aminoácidos en las proteínas. Estas reacciones producen diferentes productos de ozonización que son los que tienen la tarea de transmitir los efectos del ozono a sitios distantes en el organismo. Sin embargo, cuando las cantidades de los productos de la ozonización sobrepasan los niveles del sistema antioxidante, se produce un efecto tóxico que conduce hacia el daño tisular (Fig. 10) y el establecimiento de enfermedades. Por tanto, el efecto terapéutico depende de la medición cuidadosa de la dosis de ozono para obtener la apropiada concentración de los productos de la ozonización para obtener el efecto deseado sin riesgo de toxicidad. El mecanismo a través del cual estos productos producen el efecto terapéutico no está bien definido actualmente, pero es evidente que está implicado en esto un pulso oxidativo transitorio que actúa como un disparador metabólico celular. En otras palabras, estos productos oxidados pueden actuar como moléculas de transducción de señales para iniciar una serie de cascadas metabólicas que terminan con el nombrado "pulso metabólico" de la ozonoterapia.

Los principales productos que se originarían durante la ozonización de lípidos y proteínas son: ozónidos de Criegee, hidroxihidroperóxidos,  $H_2O_2$  y aldehídos. Los ozónidos de Criegee son catabolizados por la enzima glutatión S-transferasa (GST) usando glutatión (GSH) como agente reductor, para generar aldehídos y glutatión disulfuro (GSSG). Los aldehídos son metabolizados por la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) utilizando como cofactor el dinucleótido oxidado de dicotinamida adenina (NAW) o mediante la enzima GST como ocurre en el caso del 4-hidroxinonenal usando el GSH como cofactor. La regeneración del GSH se logra por la acción de la enzima glutatión reductasa (GR).

Los hidroxihidroperóxidos (ROOH) son metabolizados principalmente a través de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) con el GSH como cofactor). En las aplicaciones de la ozonoterapia sistémica por autohemoterapia mayor o insuflación rectal se ha reportado una estimulación significativa de la actividad de esta enzima. Sin embargo, los hidroperóxidos orgánicos son también degradados catalíticamente por la enzima GST en presencia de pequeñas cantidades de GSH. La importancia del GSH es mayor aún si tenemos en cuenta que la concentración de glutatión puede regular las acciones catabólicas de la GPx y GST sobre los ROOH. El peróxido de hidrógeno a concentraciones fisiológicas es catalizado por la enzima GPx, pero a elevadas concentraciones es la catalasa la que presenta una mayor actividad. La superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación del radical anión superóxido a peróxido de hidrógeno.

Por otra parte, la línea de defensa antioxidante no enzimática debe ser también tomada en consideración, en este contexto, el GSH tiene actividad antioxidante por si mismo debido a la gran reactividad del ozono por el residuo de cisteína en la molécula de GSH, y nutrientes antioxidantes tales como el  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico y  $\beta$ -caroteno que protegen a la célula contra la lipoperoxidación. También se ha reportado que los uratos poseen importante actividad protectora contra la oxidación. Todas estas sustancias antioxidantes, actuando como limpiadores de radicales parecen tener una importancia vital en la protección de las membranas biológicas contra la peroxidación de los lípidos. Un estudio mostró que el incremento significativo en el contenido del GSH sanguíneo era paralelo a la disminución en la actividad de peroxidación lipídica después del tratamiento con ozonoterapia sistémica por insuflación rectal a conejos normo e hipercolesterolémicos.

Las proteínas plasmáticas y de los fluidos intersticiales son también buenos sustratos para la reacción del ozono durante las aplicaciones de la ozonoterapia sistémica. En este caso, los aminoácidos libres y los de las secuencias proteicas son sensibles a la reacción con el ozono, particularmente cisteína, triptófano, metionina, tirosina, fenilalanina e histidina. Las constantes de velocidad para la reacción del ozono con estos aminoácidos son de dos a seis órdenes de magnitud mayor que con los aminoácidos leucina, valina y otros. Las proteínas oxidadas por el ozono generan un conjunto de metabolitos a saber: ozónidos de Criegee, ROOH, peróxido de hidrógeno y aldehídos, los cuales son los mismos compuestos generados por la ozonización de los lípidos, como se vio anteriormente. Por tanto, la actividad oxidativa en las proteínas puede ser evaluada mediante la determinación de hidroperóxidos proteicos, aminoácidos oxidados, grupos carbonilos proteicos, degradación de grupos tiólicos proteicos y otros.

El estrés oxidativo no puede ser definido en términos universales debido a que es un proceso biológico complejo, el cual necesita ser estimado a partir de diferentes puntos. Por tal motivo, actualmente se acepta, de manera universal, que la valoración del estado de estrés oxidativo de un individuo requiere una combinación de métodos, los cuales representan un tipo distinto de estrés oxidativo, debido a que muchas patologías pueden estar asociadas con diversos tipos de desbalance oxidativo, lo que obliga al uso de variados índices de evaluación.

La evaluación del estado de estrés oxidativo antes, durante y al final del tratamiento de ozonoterapia facilita la personalización de la terapia y asegura un resultado óptimo. Por tal razón, un sistema de control bioquímico es muy útil en la certificación del uso óptimo de las aplicaciones de la ozonoterapia. La propuesta real es que siempre que se utilice la ozonoterapia sistémica, se debe aplicar un sistema de control del estrés oxidativo.

Para la aplicación de la ozonoterapia sistémica el diagnóstico del estrés oxidativo es un aspecto importante en términos de definir el estado biológico del paciente antes de comenzar el tratamiento y, junto a los datos clínicos, tomar decisiones en cuanto a las dosis iniciales, así como para el control y seguimiento del tratamiento. A través del diagnóstico del estrés oxidativo el especialista puede apoyarse para seleccionar la vía de aplicación más adecuada, dirigir el tratamiento hacia la obtención de un pre-condicionamiento oxidativo, escoger directamente las dosis o concentraciones adecuadas de ozono que posibiliten alcanzar los beneficios anteriormente señalados a la ozonoterapia y extender o suspender el esquema de tratamiento. Si no se cuenta con la posibilidad de obtención del diagnóstico del estrés oxidativo, esto no significa que la ozonoterapia no pueda ser aplicada, sino que no se cuenta con una información relevante para personalizar el tratamiento. En este caso, es preferible utilizar dosis bajas y avanzar lentamente, según la respuesta clínica, en la dosificación. La evaluación clínica que realiza el especialista junto al diagnóstico del estrés oxidativo que da el laboratorio clínico, son los aspectos fundamentales para elaborar el protocolo de tratamiento de cada paciente.

## Referencias Bibliográficas

- Ajamieh, Hussam H, S. Menéndez, G. Martínez-Sánchez, E. Candelario-Jalil, L. Re, A. Giuliani and Olga Sonia León Fernández. (2004). Effects of ozone oxidative preconditioning on nitric oxide generation and cellular redox balance in a rat model of hepatic ischaemia–reperfusion. *Liver International* **24**: 55–62
- Ajamieh, Hussam H., Jorge Berlanga, Nelson Merino, G. Martínez-Sánchez, Anna M. Carmona, Silvia M. Cepero, Atilia Giuliani, Lamberto Re and Olga S. León. (2005). Role of Protein Synthesis in the Protection Conferred by Ozone-Oxidative-Preconditioning in Hepatic Ischaemia/Reperfusion. *Transplant International* **18**: 604–612.
- Balkanyi, A. Herpes zoster- ein komplementärmedizinisches Behandlungskonzept (2002) in *Ozon-Handbuch. Grundlagen, Prävention, Therapie*, Viebahn-Hänsler, Knoch (Hrsg), ecomed, Landsberg (1995-2006).
- Beck EG. Ozone in preventive medicine. In: International Ozone Association, ed. Proceedings Ozone in Medicine, 12th World Congress of the International Ozone Association, 15th to 18th May 1995, Lille, France. Tours : Instaprint S.A. , 1995, 55-62.
- Beck, E. G.; G. Wasser, R.; Viebahn-Hänsler. The Current Status of Ozone Therapy Empirical Developments and Basic Research. *Forsch Komplementärmed* 1998; 5: 61-75
- Bocci V. Oxygen-ozone Therapy: a Critical Evaluation. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002
- Bocci, Velio. OZONE A New Medical Drug. 2005, Dordrecht:Springer, Netherlands. Pp.12-18, 32–5, 102–3
- Bocci, V. 2006. Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma. *Toxicol Appl Pharmacol* **216**:493-504.
- Criegee, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1975**, *87*, 745-752.
- CU patent 22749
- Díaz M, Lezcano I, Alvarez I *et al.* H-NMR studies of the ozonization of methyl oleate. *Bol Soc Chil Quim* 1997; 42:349-53
- Fischbach MA, Walsh CT. Antibiotics for emerging pathogens. *Science*. 2009 **28**;325(5944):1089-93.
- Hernández F, Hernández D, Zamora Z, Díaz M, Ancheta O, Rodríguez S, Torres D. Giardia duodenalis: effects of an ozonized sunflower oil product (Oleozone) on in vitro trophozoites. *Exp Parasitol*. 2009 Mar;121(3):208-12. Epub 2008 Nov 5.
- Ledea O, Ph.D Thesis, National Center for scientific Reseach, Havana, Cuba. 2003.
- Martínez-Sánchez Gregorio, Atilia Giuliani, Gema Pérez-Davison, Olga Sonia León-Fernández (2005). Oxidized proteins and their contribution to redox homeostasis Redox Report. **10**(4):174-184.
- Martínez- Sánchez, G, S. M. Al-Dalain, S. Menéndez, L. Re, A. Giuliani, E. Candelario-Jalil, H. Álvarez, J. I. Fernández-Montequín and O. S. León (2005a). Therapeutic Efficacy of Ozone Medical Treatments In Patients with Diabetic Foot. *European Journal of Pharmacology* **523**:151-161.
- Martínez- Sánchez, G, Said Mohammed Al-Dalain, Silvia Menéndez, Atilia Guiliani and Olga Sonia León. (2005b). Ozone Treatment Reduces Blood Oxidative Stress and Pancreas Damage in a Streptozotocin-Induced Diabetes Model in Rats *Acta Farm. Bonaerense* **24** (4): 491-7
- Martínez Sánchez, Gregorio. Debate acerca del estrés oxidativo y su incidencia en las enfermedades. *Rev Cubana Farm.* [online]. Mayo-ago. 2007, vol.41, no.2 [citado 25 Diciembre 2007], p.0-0. Disponible en la World Wide Web: <[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75152007000200001&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152007000200001&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 0034-7515.
- Martínez-Sánchez G *et al.* Ambiente Antioxidantes/pro-oxidantes Salud y Enfermedad. Ed. Científico-Técnica, La Habana, Cuba 2010 (en prensa).
- Martínez- Sánchez, G y Re L. Ozone As U-Shaped Dose Responses Molecules (Hormetins). Drug-Response, 2010 (en prensa).
- Matsumoto A, Sakurai S, Shinriki N *et al.* Therapeutic effects of ozonized olive oil in the treatment of intractable fistula and wound after surgical operation. Proceedings of the 15th Ozone World Congress, London, UK, 11–15 Serptember 2001, Medical Therapy Conference (IOA 2001, Ed). Ealing, London: Speedprint MacMedia Ltd, 2001: 77–84.
- Menéndez S, Falcón L, Simón DR, Landa N. Efficacy of ozonized sunflower oil in the treatment of tinea pedis. *Mycoses*. 2002 Oct;45(8):329-32.
- Menéndez, S; González, R; Ledea O *et al.* Ozono, aspectos básicos y aplicaciones clínicas. GENIC, La Habana, 2008, pp207-265.
- Neveen SI, Geweely. Antifungal activity of ozonized Olive Oils (Oleozone). *International J of Agriculture and Biology* 2006 8(5): 670-675.
- Niki, E. 2009. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. *Free Radic Biol Med* **47**:469-484.
- Núñez Sellés, Alberto; Gabino Garrido Garrido; René Delgado Hernández; Gregorio Martínez Sánchez; Gilbero Pardo Andreu; Dagmar García Rivera; Patricia Hernández Casaña; Idania Rodeiro Guerra; Mariela Guevara García; Alina Alvarez Leon;

- Beatriz Garrido Suarez; Raymundo Miranda Leyva. *El Reto de La Terapia Antioxidante*. (2008) Editorial Científico Técnica, La Habana, Cuba ISBN 978-959-05-0525-6.
- Re Lamberto, Mohamed N. Mawsouf, Silvia Menéndez, Olga S. León, Gregorio M. Sánchez, Frank Hernández. "Ozone Therapy: Clinical and Basic Evidences of its Therapeutic Potential" *Archives of Medical Research* 2008 39:17-26.
- Re Lamberto, Gregorio Martínez-Sánchez, Giuseppe Malcangi, Alessandra Mercanti and Virginia Labate. Ozone Therapy: A Clinical Study on the Pain Management. *International Journal of Ozone Therapy* 7(1):37-44 (2008a). [www.centauro.it/O2\\_O3\\_IN/indice2008/indice\\_7\\_aprile\\_2008.htm](http://www.centauro.it/O2_O3_IN/indice2008/indice_7_aprile_2008.htm)
- Schulz S: Ein neues Tiermodell zur integralen Messung von Heilvorgängen bei kleinen Labortieren am Beispiel von ozoniertem Olivenöl [A new animal model for the integral measurement of healing processes in small laboratory animals with ozonized olive oil as example]. *Dtsch Tierärztl Wochenschr / Ger Vet Med Weekly* 1981; 88:60-64
- Sechi LA, Lezcano I, Núñez N, Espim M, Duprè I, Pinna A, Molicotti P, Fadda G, Zanetti S. Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozon). *J Appl Microbiol*. 2001 Feb;90(2):279-84.
- Silveira AM, Lopes HP, Siqueira JF Jr, Macedo SB, Consolaro A. Periradicular repair after two-visit endodontic treatment using two different intracanal medications compared to single-visit endodontic treatment. *Braz Dent J*. 2007;18(4):299-304.
- Valacchi, G.; V. Fortino and V. Bocci. The dual action of ozone on the skin. *British Journal of Dermatology* 2005 **153**, pp1096–1100.
- Zamora Rodríguez ZB, González Alvarez R, Guanche D, Merino N, Hernández Rosales F, Menéndez Cepero S, Alonso González Y, Schulz S. Antioxidant mechanism is involved in the gastroprotective effects of ozonized sunflower oil in ethanol-induced ulcers in rats. *Mediators Inflamm*. 2007;2007:65873. Epub 2007 Jan 18.
- Zamora Z, González R, Guanche D, Merino N, Menéndez S, Hernández F, Alonso Y, Schulz S. Ozonized sunflower oil reduces oxidative damage induced by indomethacin in rat gastric mucosa. *Inflamm Res*. 2008 Jan;57(1):39-43.