



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE PREPARADOS DE  
ACEITE DE GIRASOL OZONIZADO SOBRE LA  
CICATRIZACIÓN DE HERIDAS POSQUIRÚRGICAS Y SU  
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO***

**TESIS**

Para obtener el título de  
**Médica Veterinaria Zootecnista**

**PRESENTA**

María Alejandra Díaz Reyes

**DIRECTOR DE TESIS**

Itzcoatl Felipe Aquino Díaz

Edgar Alfonseca Silva

**Ciudad Universitaria, Cd, Mx., 2025**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **DEDICATORIA**

Mi esfuerzo y dedicación resumido en este trabajo se lo dedico principalmente a mi querida madre Paula a la cual admire en vida y que donde quiera que este, espero que se sienta orgullosa. A mi padre Javier y hermanas Luisa, Abigail sobre todo a mi gemela Mariana, que me brindaron su apoyo a medida de sus posibilidades y que sin ellos el reto hubiera sido mayor, deseo que sigan brindándome su apoyo y amor para futuros trabajos, que este logro sea uno de muchos. Menciono también a mis perros Poppy, Yomi, Yuu, Keiko y Milo que me acompañaron e inspiraron para seguir mejorando.

A aquellas amistades como Eliud Román, Cynthia Palacios, Helena Borja, Zaa Ramírez, Fernanda García y Adriana Pastrana, con las que compartí momentos increíbles y duros antes, durante y después de la carrera, tanto en la formación académica como personal, a los maestros, que me apoyaron y vieron que podría lograr grandes cosas en los ámbitos académico, deportivos y sociales. A todas ellas personas que me brindaron su amor, cariño, respeto y sabiduría, que por muchas razones no están en este momento de mi vida, les agradezco infinitamente el aportar su granito de arena en mi formación personal.

No hay palabras suficientes para expresar la emoción y gratitud con la vida que me permitieron llegar a este punto. Veo el fruto de mis esfuerzos y espero sacarles el mejor provecho.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México por todos estos años de formación como estudiante, y que más haya de darme educación, me dio la oportunidad de formarme como persona, conocer a grandes personas y darme grandes experiencias.

A Laboratorios Umanu Labs y a su representante Andrea Hernández Leal por brindar los recursos materiales y económicos para la elaboración de este trabajo.

A la par gracias al Departamento de Fisiología y Farmacología Veterinaria, sobre todo al Dr. Itzcoatl Aquino, quien es el jefe de departamento que más allá de su labor como asesor me brindo su apoyo como amigo y colega. También le doy gracias al Dr. Edgar Alfonseca jefe del Departamento de Microbiología e Inmunología, que me brindo asesoría y me tuvo paciencia para realizar este trabajo.

A la Clínica de Reproducción Canina de la FMVZ que esta a cargo del M en MVZ Rafael Eduardo Paz Benito y a su equipo, Paola Colotla, Andrea Avelar quienes son amigas y colegas con las que compartí jugar futbol representando a la Facultad, a mi amigo Héctor Brand con el que compartí clases, me ayudaron realizando las OSH.

Finalmente agradezco a las personas con sus caninos que depositaron su confianza en mí; Eliud y la Eirien, Fernanda y Sam, Biviana con Samantha, Zaa con Ayanami, Emppu, Romina y Nala, Aratzeni y Marbella, Sandy y Jackie, Lety y Kuika, y a las demás perritas participantes en este trabajo solo menciono a las pacientes Canela, Daisy, Mima, Chabela, Linda, Galia, Dobbie, Coffe, Tuka, Mabel, Polar y Mili.

# CONTENIDO

<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>II</b>
<b>AGRADECIMIENTO .....</b>	<b>III</b>
<b>CONTENIDO.....</b>	<b>IV</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
1.1 <i>Características generales del Ozono.</i> .....	2
1.2. <i>Orígenes del uso del ozono.</i> .....	3
1.3. <i>Ozonoterapia.</i> .....	4
1.4. <i>Usos terapéuticos del ozono.</i> .....	5
1.4.1. <i>Antimicrobiano de amplio espectro.</i> .....	5
1.4.2. <i>Cicatrización y circulación sanguínea.</i> .....	6
1.4.3. <i>Antiinflamatorio y analgésico.</i> .....	7
1.4.4. <i>Modulador del sistema inmunológico.</i> .....	7
1.4.5. <i>Regulador de estrés oxidativo.</i> .....	8
1.4.6 <i>Regulador del metabolismo celular.</i> .....	9
1.5 <i>Mecanismos del ozono en gas.</i> .....	10
1.6. <i>Mecanismos de aceites ozonizados.</i> .....	10
1.7. <i>Seguridad de la ozonoterapia.</i> .....	12
1.8. <i>Ventajas del aceite ozonizado.</i> .....	13
1.9. <i>Generalidades de la piel del perro.</i> .....	14
1.10. <i>Heridas en la piel.</i> .....	16
1.11. <i>Cicatrización.</i> .....	17
1.12. <i>Microorganismos asociados a heridas.</i> .....	17
1.13. <i>Otros tratamientos para la cicatrización.</i> .....	18
<b>2. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>20</b>
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>21</b>
<b>4. OBJETIVO.....</b>	<b>21</b>

<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
<b>5.1. Procedimiento in vitro. ....</b>	<b>22</b>
5.1.1 Cultivo de microorganismos. ....	23
5.1.2 Estandarización del inóculo y conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).....	24
5.1.3 Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).....	25
5.1.4. Medición de zonas de Inhibición de crecimiento por difusión en agar en 24 h. ....	26
5.1.5. Determinación de CMI por exposición de 30 segundos. ....	28
5.1.6. Determinación de CMI por exposición de 24 h. ....	28
5.1.7. Actividad microbica por tiempo de exposición a los preparados. ....	29
<b>5.2. Evaluación de la cicatrización. ....</b>	<b>30</b>
5.2.1 Tamaño de herida. ....	31
5.2.2 Bordes de heridas. ....	31
5.2.3 Reacción Inflamatoria.....	31
<b>5.3 Análisis estadístico .....</b>	<b>33</b>
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
<b>6.1 Procedimiento in vitro .....</b>	<b>34</b>
6.1.1 Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).....	34
6.1.2 Medición de las zonas de inhibición de crecimiento microbiano por difusión en agar. ....	35
6.1.3. Obtención de la CMI por 30 s de exposición. ....	39
6.1.4 Obtención de la CMI por exposición de 24 h .....	42
6.1.3. Actividad microbica por tiempo de exposición a los preparados .....	46
<b>6.2. Evaluación de la cicatrización. ....</b>	<b>50</b>
6.2.1 Tamaño de las heridas.....	50
6.2.2 Comparación de bordes de las heridas. ....	51
6.2.3 Respuesta inflamatoria.....	52
<b>7. DISCUSIÓN .....</b>	<b>63</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>75</b>

## RESUMEN

DÍAZ REYES MARÍA ALEJANDRA presenta el trabajo con el nombre “Evaluación de la eficacia de preparados de aceite de girasol ozonizado sobre la cicatrización de heridas posquirúrgicas y su actividad antimicrobiana *in vitro*” con los asesores Itzcoatl Felipe Aquino Díaz y Edgar Alfonseca Silva.

Se tiene registro del uso del ozono con fines terapéuticos desde el siglo XVII, se sabe que el ozono interactúa a través de diferentes mecanismos de acción sobre los sistemas de oxidación y antioxidantes del cuerpo, teniendo funciones cicatrizantes, antiinflamatorias y actividad antimicrobiana. Existen diferentes formas de ozonoterapia, una de las más comunes usadas en el área de dermatología es el uso del aceite de girasol ozonizado, este representa la ventaja sobre otros tipos de aplicación de ozono en cuanto a la aplicación y manejo, siendo que el ozono es un gas altamente inestable, en cambio con los aceites ozonizados crea compuestos derivados del ozono que perduran y pueden ser almacenados sin perder propiedades terapéuticas. Existe una constante búsqueda por innovar tratamientos y que sean eficaces contra las heridas en animales, la administración tópica de aceite de girasol ozonizado puede ser una alternativa por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar diferentes preparados de aceite de girasol ozonizado la actividad antimicrobiana *in vitro* realizando pruebas como la medición de zonas de inhibición de crecimiento microbiano por difusión en agar, la obtención de CMI y Actividad antimicrobiana por tiempo de exposición a los preparados en cepas de *Staphylococcus aureus*, *S. pseudintermedius*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*

, también se evaluó su actividad cicatrizante en heridas de perras sometidas a una OSH electiva, registrando largo, ancho, presencia de bordes, vascularidad, exudado, eritema y temperatura. El preparado T4 obtuvo los mejores resultados y este podría ser considerado como una alternativa de tratamiento para evitar el crecimiento microbiano en heridas asépticas, además de su efecto cicatrizante, hay otros factores que podrían modificarse y posiblemente obtener mejores resultados.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### 1.1 Características generales del Ozono.

Podemos describir al ozono (O<sub>3</sub>) como un gas inestable y altamente reactivo, el cual está formado por tres átomos de oxígeno. Se le considera el principal gas presente en la atmósfera y se le conoce por su potente capacidad oxidativa. Su vida media es de 40 min a 20 °C por lo que debe ser aplicado inmediatamente ya que por su inestabilidad no puede ser almacenado (1).

La producción de ozono para su comercialización se logra a partir de diversos procesos, entre los cuales podemos mencionar; la electrólisis del agua, métodos fotoquímicos, radioquímicos y disociación térmica, cabe mencionar que solo los métodos que han encontrado aplicación práctica son la descarga eléctrica silenciosa también conocida como “Corona” (Figura 1) y los métodos fotoquímicos. Hay que considerar que los procesos de elaboración del mismo ozono pueden ser costosos (2,3).

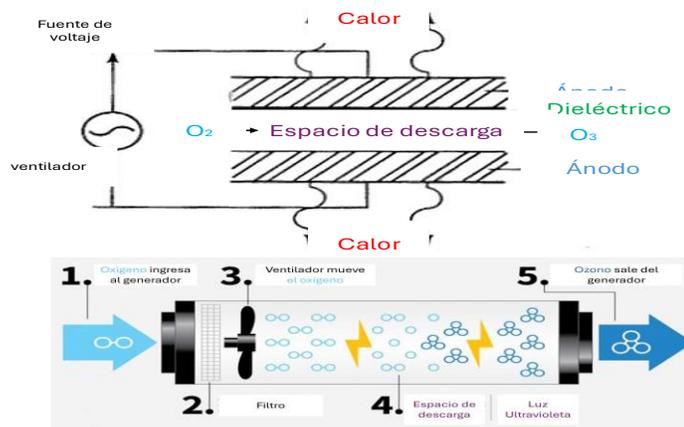


Figura 1. Método “Corona” para obtención del ozono (Adaptado de sitio web Lenntech) (4).

## 1.2. Orígenes del uso del ozono.

Cuba fue uno de los países visionarios en el uso del ozono como agente terapéutico ya que en el país se desarrolló el primer centro de investigación del ozono en el mundo (4). Se tiene registro del uso del ozono con fines terapéuticos desde el siglo XVII, también se mencionan como primeros acercamientos a su uso como terapia en heridas durante la primera guerra mundial (5,6). No se tenía conocimiento de sus mecanismos de acción, por lo que su aplicación en el área de la medicina era meramente empírica e imprecisa (7). Sin embargo, se sabe que el ozono interactúa a través de diferentes mecanismos de acción sobre los sistemas de oxidación y antioxidantes del cuerpo, los cuales consisten en balancear los metabolitos de la peroxidación y el sistema antioxidante (8,9).

La propiedad de mayor interés que se observó fue la microbicida y que de esta característica se abrieron caminos para su investigación (10). Dichas características hicieron que a finales del siglo XIX y principios del XX, el gas fuera utilizado en algunos países de Europa, como Francia, Alemania y Rusia, para la desinfección

de aguas. Los beneficios atribuidos al uso del ozono llevaron a la firma de la “Declaración de Madrid sobre la Ozonoterapia” en 2010, el cual se considera el principal documento normativo para el uso de la ozonoterapia en países como Cuba, Rusia, Italia, Portugal, Turquía, entre otros (11). Ya más enfocado a su valor en el campo de la medicina podemos decir que tiene propiedades antimicrobianas, anti hipóxicas, analgésicas, inmunoestimulantes y cicatrizantes (Figura 2) (12,13).



Figura 2. Propiedades del ozono (13,14).

### 1.3. Ozonoterapia.

La ozonoterapia la podemos definir como el uso terapéutico del ozono y sustancias ozonizadas en dosis reguladas, producidas por equipos generadores de este gas para uso médico (14). Existen diferentes formas de ozonoterapia, como tratamientos locales o sistémicos, de ahí que se deriven las diferentes formas de administración (15). Las formas más comunes usadas en el área de dermatología son hidroterapia ozonizada, aceites ozonizados, autohemoterapia ozonizada (OAHT) y emulsiones ozonizadas (16). El ozono desaparece extremadamente rápido por lo que su función es de regulador sin seguir las características farmacocinéticas, en otras palabras, no existe absorción, distribución, metabolismo y excreción (16).

Tabla 1. Ozonoterapia en el manejo y prevención de enfermedades de la piel (17).

Tipos de preparación	Efectos	Enfermedades de la piel incluidas
<b>Hidroterapia</b>	Antimicrobiano, alivia la comezón.	Infecciones, alergias, eritemas y escamosas, cicatrización y recuperación de úlceras.
<b>Aceite ozonizado</b>	Antimicrobiano, humectante, reductor del exudado.	
<b>Autohemoterapia ozonizada</b>	Defensas antioxidantes, inmunorregulador, modificador de epigenética.	Condiciones sistémicas crónicas, enfermedades autoinmunes, neuralgia, posherpética, artículos de belleza

#### 1.4. Usos terapéuticos del ozono.

##### 1.4.1. Antimicrobiano de amplio espectro.

Se ha reportado que el ozono tiene propiedades antimicrobianas de amplio espectro, eficiente y seguro (17). Cuando las bacterias son expuestas a la ozonoterapia *in vitro* se oxidan los fosfolípidos y lipoproteínas que están en la envoltura celular bacteriana atenuándose su estabilidad (18). Se ha confirmado que el ozono puede matar eficazmente a *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA), *Streptococcus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, las cuales se conocen por su alta capacidad para generar resistencia a antibióticos, también actúa sobre micobacterias, virus y hongos (6). Se han postulado teorías por el cual el ozono es efectivo contra estos agentes, uno de ellos es la propia actividad oxidante que tiene el ozono sobre las moléculas presentes en las envolturas de las bacterias como son los fosfolípidos presentes en las membranas, la lipoproteína de la membrana externa y el lipopolisacárido (LPS); en el citoplasma de los microorganismos formando peróxido de hidrogeno, de tal forma que daña al ADN y el ARN lo que altera las funciones vitales de las bacterias, sin embargo, se ha visto que las concentraciones de este metabolito no son lo suficientemente altas para

generar una degradación en los patógenos, por lo que se teoriza que el mismo peróxido estimula la formación de otros agentes oxidantes y que su función es meramente intermediaria, ya que en 2003 un estudio realizado por Bernard Babior encontró que los neutrófilos activados pueden generar ozono, lo que da la pauta para analizar la función fisiológica del ozono en el cuerpo relacionado con sistemas de inflamación principalmente (16,17,19,20).

#### 1.4.2. Cicatrización y circulación sanguínea.

El proceso de la cicatrización se basa fundamentalmente en la activación local de factores de crecimiento, reducción de la infiltración de neutrófilos y estimulación de la formación del tejido de granulación (21).

Los efectos cicatrizantes del ozono se presentan a partir de que dicho gas interactúa sobre la capa bilipídica de las células estimulando su metabolismo, produciendo cambios en las células sanguíneas como son los eritrocitos que pasan por un aumento de flexibilidad y plasticidad, paralelamente promueve la glicólisis por lo que la capacidad de oxigenación a los tejidos aumenta (18,22). Este estrés oxidativo que se refiere a la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) producido por el contacto con el ozono también estimula la eritrogenesis la cual es regulada por enzimas antioxidantes (22).

Una cualidad que resalta de estos eritrocitos es que tienen mejor capacidad de transporte de oxígeno, debido a esta característica adquirida se les conoce como “eritrocitos superdotados”, esto en función a que el ozono puede afectar la expresión genética de los factores inducibles por hipoxia (HIF), activar el factor de crecimiento

endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) lo que resulta benéfico en casos de isquemia (9,23–25).

#### 1.4.3. Antiinflamatorio y analgésico.

Los efectos antiinflamatorios y analgésicos del ozono han sido reconocidos por varios estudios en humanos, los cuales describen principalmente dos mecanismos de acción, el primero es debido a la modulación de la respuesta inflamatoria y el segundo por oxidación de metabolitos mediadores de dolor, también puede implicar la eliminación de toxinas y restauración morfológica de los tejidos. Sin embargo, se necesitan más estudios para corroborar dichos mecanismos (20). Cuando el ozono se disuelve en plasma o suero, se produce una reacción rápida, en la que se forman especies reactivas de oxígeno, como peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y productos de oxidación de lípidos (LOP) las cuales pueden regular funciones cruciales en la modulación de la reacción óxido-reducción (Redox) intracelular y el equilibrio inflamatorio (15).

#### 1.4.4. Modulador del sistema inmunológico.

Una característica poco estudiada del ozono es su capacidad como modulador del sistema inmunológico. Por un lado, el ozono aumenta el número de leucocitos y mejora la actividad fagocítica de los granulocitos aumentando su capacidad oxidativa (23). Por otro lado, hay mayor formación de monocitos y linfocitos T, los cuales crean o liberan citocinas como interleucinas (IL) e interferón (IFN) por lo que genera una citotoxicidad mediada por anticuerpos, esta actividad está regulada por la activación de neutrófilos que se da por interacción del peróxido de hidrogeno que es un metabolito de la descomposición del ozono y no del ozono propio (9,23). La

regulación de este proceso está dada por factores transcripcionales del ADN actuando en la cadena de bases nitrogenadas para aumentar o disminuir la producción de citocinas, ya sean proinflamatorias o antiinflamatorias, estos fenómenos se han comprobado en estudios sobre la aplicación del ozono en pacientes con enfermedades autoinmunes y deficientes inmunitarios (6,24).

#### 1.4.5. Regulador de estrés oxidativo.

La oxidación es un proceso bioquímico que se da cuando una molécula pierde electrones, capta oxígeno o hay una pérdida de hidrógeno (deshidrogenación) , de forma paralela se da el fenómeno de la reducción que es cuando otra molécula recibe los electrones o pierde oxígeno, su importancia radica que durante dichos procesos las células obtienen energía y si existe un aumento en la oxidación da como consecuencia la formación de radicales libres de oxígeno (RLO) y se genera lo que se conoce como “Estrés oxidativo” el cual puede desencadenar diferentes enfermedades de las que podemos mencionar el envejecimiento prematuro, la aterosclerosis, cáncer, catarata senil, insuficiencia renal aguda, diabetes mellitus, hipertensión arterial, insuficiencia hepática, cirrosis, Alzheimer, enfermedad de Parkinson, entre muchas otras patologías (26). Durante la ozonización sanguínea hay una liberación del factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) que desencadena la activación de la transcripción de elementos de respuesta antioxidante (ERA) lo que genera el incremento de antioxidantes, aumento de la cantidad de enzimas detoxificantes, inhibe la inflamación medida por citocinas, repara y remueve proteínas dañadas y protege de la apoptosis inducida por el estrés oxidativo (Figura 3) (18,27).

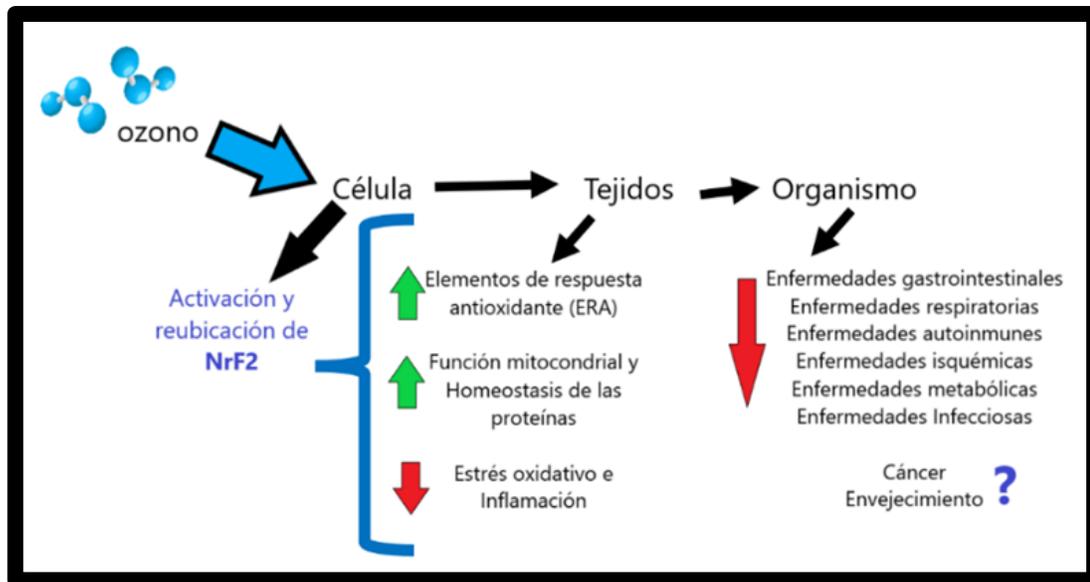


Figura 3. Principales actividades de Nrf2, su relación con el funcionamiento celular y la aparición de enfermedades (26).

#### 1.4.6 Regulador del metabolismo celular.

El ozono fomenta la glicólisis debido a que estimula el uso de la glucosa por parte de las células, también se sabe que su aplicación rectal y local produce reducción significativa de las concentraciones de glucosa por sus propiedades antioxidantes que a su vez también describe un incremento de la sensibilidad a la insulina (18).

El ozono también tiene un efecto sobre aminoácidos y el metabolismo de las proteínas ya que es muy a fin a los grupos sulfhídricos de los mismos, tiene actividad oxidante sobre los ácidos grasos insaturados, se menciona que en pacientes con cardiopatía isquémica se mostró una disminución del colesterol y de las lipoproteínas de baja densidad en el plasma cuando se aplicó un tratamiento con ozono por autohemoterapia (18).

### 1.5 Mecanismos del ozono en gas.

Se ha mencionado que los mecanismos de acción del ozono están ligados a la degradación de este y a la generación de compuestos secundarios debido a la interacción con los enlaces de carbono contenidos en la materia orgánica (28). Se sabe que con sustancias orgánicas el ozono tiene predilección hacia enlaces dobles y triples, los cuales podemos ver en compuestos como proteínas, aminoácidos y ácidos grasos insaturados y estos a su vez son parte de estructuras más complejas como lo son las membranas celulares y las capas lipoproteicas (5).

El ozono ingresa a la célula a través de la pared y la membrana plasmática en dónde se generan especies activas de oxígeno, una vez ahí, contribuye como biorregulador que libera factores de las células endoteliales y normaliza el equilibrio redox celular cuando entra en contacto con un fluido biológico, también puede alterar los niveles de citocinas como interleucina-8, factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , factor de crecimiento transformante beta, factor de crecimiento derivado de plaquetas (22,29).

### 1.6. Mecanismos de aceites ozonizados.

Para la elaboración de aceites ozonizados se emplea la inyección directa del ozono con aceites vegetales ricos en ácidos grasos insaturados, que son sustancias críticas que mantienen la actividad del ozono y de los aceites vegetales más comunes para este fin, podemos encontrar oliva, sésamo, maní, coco, soya y girasol (16).

El ozono rompe los dobles enlaces entre los átomos de carbono de las moléculas de los ácidos grasos insaturados, dando como resultado nuevas moléculas estables como cetonas, aldehídos y especies inestables u ozónidos, peróxidos y radicales (figura 4) (22). Estos últimos se les atribuye las propiedades microbicidas por lo que se pueden usar en procesos sépticos locales (4,16,30–32).

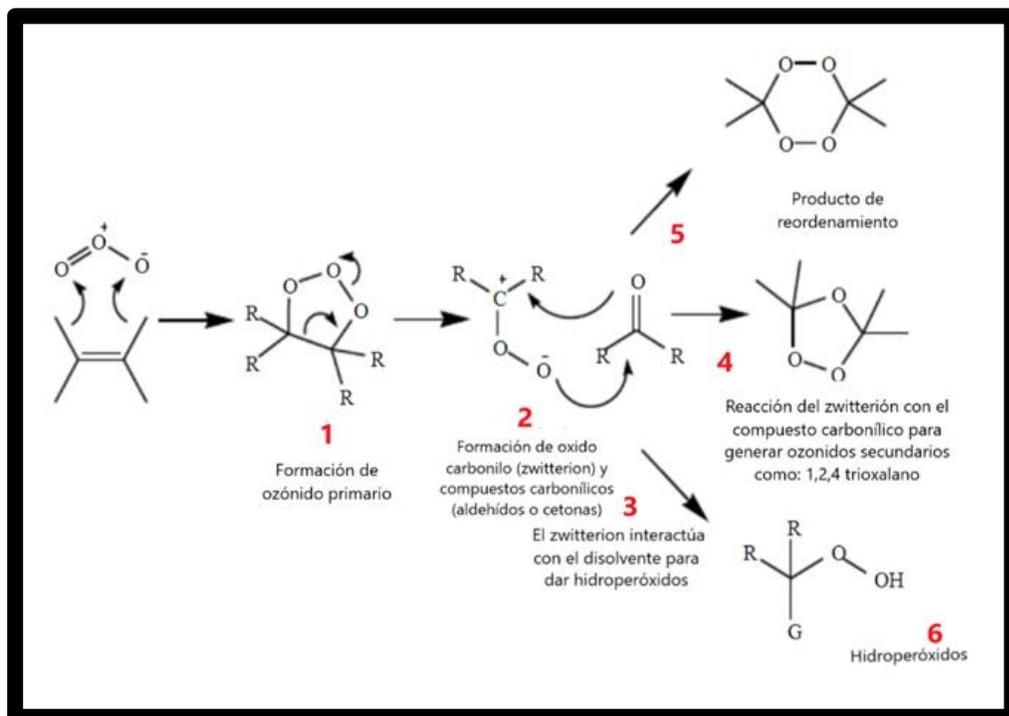


Figura 4. Ozonólisis: Reacción de un alqueno (También llamado olefina) con una molécula de ozono (30,31).

El aceite de girasol ozonizado lo constituyen una mezcla de derivados del ozono de los cuales, los principales son los hidroperóxidos que actúan como inductores fisiológicos para la expresión de factores de crecimiento, los peróxidos que promueven la respuesta inmunológica tras la liberación de oxígeno en reacciones superoxidantes, se ha descrito que la superóxido dismutasa incrementa la síntesis de colágeno por lo que acelera la cicatrización de tejidos, los radicales libres e

hidroxilos atacan la membrana lipídica, ADN y otros componentes celulares de las bacterias y hongos, los aldehídos y ozónidos actúan como desnaturizantes proteicos (Tabla 2) (21,29,33,34).

Tabla 2. Derivados del ozono (DO) comúnmente presentes en los aceites ozonizados y sus principales aplicaciones (30,31).

Grupo químico	Principio Activo	Principales aplicaciones
<b>Aldehídos (-CHO)</b>	Formaldehído	Desinfectantes y conservadores Fragancias y sabores alimenticios Síntesis de productos farmacéuticos
	Acetaldehído	
	Propionaldehído	
	Butiraldehído	
<b>Cetonas (-C=C)</b>	Acetona	Solventes
	Metil etil cetona	Biocombustibles
	Metil isobutin cetona	Fragancias y sabores alimenticios
<b>Ésteres (-COO-)</b>	Etil oleato	Disolventes
	Etil acetato	Biocombustibles
<b>Peróxidos (-O-O-)</b>	Hidroperóxido	Agentes oxidantes
	Peróxido de ácido	Desinfectantes y esterilizante
	Peróxido de alquilo	Intermediarios en síntesis de productos químicos
<b>Ozónidos</b>	1,2,3, trioxolano	Actividad antimicrobiana
	1,2,4 trioxolano	

### 1.7. Seguridad de la ozonoterapia.

Si bien el uso del ozono tiene muchas cualidades favorables como agente terapéutico, existen una variedad de retos que dificultan su uso generalizado, entre los que podemos mencionar son; la inseguridad de su uso por sus características oxidantes que llegan a ser dañinas principalmente al aparato respiratorio cuando se administra en gas por vía inhalada, por lo que siempre hay un riesgo de toxicidad en caso de un uso incorrecto, sin embargo, se ha visto que en un rango amplio de

concentraciones de ozono entre 40 y 80 mg/mL por gramo de sangre puede tener efecto terapéutico sin que se presenten efectos adversos (24). Parte de la toxicidad antes mencionada se debe al uso del ozono en concentraciones altas y a un tiempo de exposición mayor a 90 min, sin embargo, solo el 0.0007 % de los casos reportados con el uso de la ozonoterapia en humanos han presentado reacciones adversas, entre las cuales podemos mencionar náuseas, prurito y malestar estomacal, por lo que se considera una de las alternativas terapéuticas más seguras (28).

Otro punto es lo complicado de la adquisición del equipo adecuado para generar ozono y máquinas para realizar terapias que cumplan con los estándares de calidad y seguridad, lo cual va de la mano con la falta de experiencia y capacitación del personal para su correcto uso (35). Otra cuestión que considerar puede ser las malas praxis por parte de personas no preparadas en el área médica que aplican la ozonoterapia, lo que ha hecho que los investigadores y médicos sean escépticos para ofrecer y aplicar el ozono como tratamiento a diversos padecimientos, tanto en medicina humana como veterinaria (6).

A pesar de lo antes mencionado se ha visto un incremento en la realización de trabajos médicos con ozono, esto según antecedentes obtenidos de bases de datos como "Web of science" y "Pubmed" en la última década (1).

#### 1.8. Ventajas del aceite ozonizado.

Las terapias como la infiltración de ozono, insuflación, aplicación por bolsa, agua ozonizada y solución fisiológica ozonizada para tratamientos cutáneos en donde se necesita que el ozono sea extraído y aplicado *in situ* para que no pierda su eficacia

debido a la propia característica del ozono de ser altamente inestable lo hace que se eleven los costos del tratamiento (8,10,22). En cambio, el uso de aceites ozonizados crea productos derivados del ozono que perduran y pueden ser almacenados sin perder sus propiedades terapéuticas, por lo que nos brinda facilidades de manejo y reduce los costos de aplicación, si se almacena entre 4 y 25°C en un lugar seco y evitando la exposición directa a la luz solar, el aceite ozonizado puede mantener propiedades y actividades farmacológicas estables durante 2 años (8,10).

A los aceites ozonizados se les considera seguros ya que se han hecho estudios preclínicos de toxicidad, irritabilidad, mutagenicidad, teratogenicidad e inocuidad, que en comparación con los tratamientos directos con el gas el riesgo de toxicidad es mayor (10,36).

#### 1.9. Generalidades de la piel del perro.

Debido a la importancia que tiene la piel como el órgano de mayor extensión en el cuerpo se deben de conocer sus características histológicas y fisiológicas para entender la magnitud de las consecuencias ante una herida (37). La piel o también conocido como integumento es el órgano que representa la primera barrera del animal ante agentes externos (38). Se compone de tres capas, la primera de exterior a interior es la epidermis, que está constituida histológicamente por células epiteliales escamosas estratificadas queratinizadas, su grosor varía dependiendo de la región anatómica del animal, por ejemplo, en regiones con mucho pelo se ha visto que es más delgada, en cambio en regiones sin pelo como las mucocutáneas es más gruesa (39). Otra consideración histológica es que podemos subdividirla en

cinco estratos, de la misma forma de exterior a interior encontraremos al estrato corneo que está constituido por células epiteliales planas estratificadas queratinizadas en donde el 85 % está compuesta por queratinocitos y el otro porcentaje restante lo forman melanocitos con un 5 %, células de Langerhans de 3 – 8 %, células de Merkel 2 % y no hay vasos sanguíneos ni inervación propia, esta capa es la que constantemente está en recambio celular, se estima que para una renovación total se toma de 28 - 30 días; el estrato lúcido son células aplanadas anucleadas con citoplasma muy eosinofílico, este estrato solo lo vemos en zonas sin pelo como en la nariz y las almohadillas; en el estrato granuloso encontramos una sola capa de células aplanadas con gránulos de queratohialina en el citoplasma; en el estrato espinoso hay células poligonales unidas por desmosomas que en el caso particular del perro es más delgado que en otras especies domésticas, también se lleva a cabo la síntesis de queratina; y por último el estrato germinativo o basal que está formado por una capa única de células cubicas en constante mitosis (39).

La dermis está formada por tejido conectivo denso el cual está constituido mayormente por fibras de elastina y de colágeno, también encontraremos en abundancia vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. La podemos subdividir en dos estratos, reticular y papilar; la capa más profunda sería la hipodermis y su tamaño varía según la región anatómica del animal, así como características propias de cada especie, la cual está formada por adipocitos y al igual que en la dermis ésta alberga vasos sanguíneos, linfáticos y también se encuentra inervada (39).

A la piel, dadas sus capacidades de protección, metabolismo, termorregulación y sensibilidad se le tiene que prestar mucha atención ante una herida para actuar de

manera rápida y eficiente con la finalidad de reducir la pérdida de las funciones ya mencionadas (16,40).

#### 1.10. Heridas en la piel.

Se puede definir como herida a una solución de continuidad, la gran mayoría son provocadas por fenómenos externos, entre los que podemos destacar accidentes automovilísticos, caídas, choques con objetos perforantes o cortantes, rasguños, mordidas, quemaduras con pirotecnia o con productos químicos, autolesiones por lamido excesivo o rascado, por mencionar algunos casos (41).

Dependiendo de la etiología de la herida, el grado de daño al tejido, la ubicación de la lesión e incluso el comportamiento del paciente se puede complicar el procedimiento de reconstrucción (33). En términos generales, podemos hacer una clasificación de las diferentes lesiones que se pueden presentar en la piel según su etiología (42). Las de tipo primario, son aquellas que están ligadas directamente a un proceso de enfermedad, las cuales no son necesariamente patognomónicas, entre estas lesiones podemos encontrar pápulas, nódulos, placas, pústulas, vesículas, quistes, maculas, ronchas y collaretes. Por otro lado, están las lesiones secundarias que se asocian a traumatismos, en las que podemos encontrar eritemas, comedones, descamación, costras, escoriación, erosiones, úlceras, fístulas, furúnculos, fisuras, liquenificación, hiperpigmentación e hipopigmentación, cabe mencionar que las lesiones secundarias pueden evolucionar a primarias (42).

### 1.11. Cicatrización.

La forma que encuentra el organismo para restaurar el daño es a través del proceso de la cicatrización, el cual es un fenómeno dinámico que inicia inmediatamente después de la aparición de una herida, este mecanismo lo podemos dividir en cuatro fases; coagulación, inflamación, proliferación y maduración (43). La cicatrización se ve afectada por los diferentes factores extrínsecos e intrínsecos, de los cuales podemos mencionar la longitud de la herida, ubicación, edad del paciente, sexo, raza, condición corporal, alimentación, especie, en algunos casos el ambiente, así como la presencia o ausencia de enfermedades, y si hay o no contaminación en la misma herida, siendo que se considera que una herida ya está contaminada a partir de 6 horas después de pasado el evento (43,44).

### 1.12. Microorganismos asociados a heridas.

En los últimos años se ha descrito que los agentes asociados a las infecciones en la piel en su mayoría son parte de la microbiota y actúan como oportunistas, entre los que encontramos especies del género *Staphylococcus* como *S. aureus* y comúnmente en perros a *S. pseudintermedius*, además de la presencia de levaduras como *Candida* y *Malassezia pachydermatis* (38).

En el caso de las bacterias del género *Staphylococcus* han causado un gran interés debido a que recientemente se han reportado cepas resistentes a la meticilina (SRM), principalmente *S. aureus* y *S. pseudintermedius* (SARM y SPRM), lo que constituye un reto para la profesión veterinaria, ya que pueden ser una causa de morbilidad y mortalidad en animales de compañía y de abasto, además, del riesgo

zoonótico (45). Estas bacterias, son cocos gram-positivos, catalasa positivos, anaerobios facultativos que comúnmente forman agrupaciones al observarse al microscopio, y también se les considera oportunistas, siendo el *S. aureus* el patógeno más frecuente en humanos y animales, aunque en perros los principales patógenos son *S. pseudintermedius* y *S. schleiferi* (45,46).

Por otro lado, *M. pachydermatis* es una levadura lipofílica considerada comensal de la piel que podemos encontrar en regiones como patas y canales auditivos, su aparición como agente infeccioso es debido a dermatitis por hipersensibilidad (atopia, parásitos, o reacción alimentaria adversa), endocrinopatía (hipotiroidismo, hiperadrenocorticismos), o trastorno de queratinización relacionado con la raza. Las lesiones más comunes asociadas a este patógeno son alopecia, hiperpigmentación descamación grasa y liquenificación, las cuales suelen estar acompañadas por prurito que no suele responder a tratamientos con esteroides (40).

Otra levadura involucrada en procesos infecciosos en piel es *C. albicans* aunque su participación es secundaria como oportunista, comúnmente se encuentra siendo comensal de los oídos, nariz, cavidad oral y ano, que en condiciones donde el sistema inmunológico se encuentra comprometido o en presencia de enfermedades metabólicas pueden llegar a provocar las lesiones cutáneas como pústulas que evolucionan a placas exudativas húmedas y úlceras ya que se asocia (40).

#### 1.13. Otros tratamientos para la cicatrización.

Desde mediados del siglo pasado, se han utilizado principios activos aplicados en la piel, con la finalidad de evitar o controlar las infecciones (43). Un antiséptico lo podemos definir como aquellas sustancias químicas que se aplican sobre los tejidos

vivos, con la finalidad de destruir o inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos, una de sus características que podemos mencionar es que no tienen actividad selectiva ya que eliminan todo tipo de gérmenes (33,43).

La mayoría de los antisépticos no son convenientes para aplicarlos en heridas abiertas, por sus efectos citotóxicos directos sobre los queratinocitos y fibroblastos, lo cual podría retrasar o evitar los procesos de cicatrización (47). A continuación se mencionarán algunos tratamientos que se usan como cicatrizantes (Tabla 3).

Tabla 3. Antisépticos, clasificación química, características y usos (32,44,45).

<b>Grupo químico</b>	<b>Antiséptico</b>	<b>Usos, ventajas y desventajas</b>
<b>Alcoholes</b>	Etanol Isopropílico	Desinfección o limpieza de la piel Eficaz contra bacterias y virus. No usar sobre heridas ya que irrita, o en superficies extensas.
<b>Aldehídos</b>	Glutaraldehído Formaldehído	Desinfectantes de alto nivel, eficaces contra todo tipo de microorganismos, actualmente no se usan como antisépticos. Olor fuerte e irritante.
<b>Anilidas</b>	Triclocarbán	Rara vez usado en clínica, altera la permeabilidad de la membrana. Antimicrobiano y antimicótico como jabón y desodorantes. Puede producir alergia.
<b>Biguanidas</b>	Clorhexidina	Amplio espectro bactericida, limitada acción fungicida y viricida. Sitio de acción membrana citoplasmática. Efecto rápido y efecto residual de 6-8hrs, no puede mezclarse con otros antisépticos. Sabor amargo, neurotóxico.
<b>Bisfenoles</b>	Triclosán	Amplio espectro bactericida (excepto <i>Pseudomonas</i> ) poca eficacia contra hongos, se usan como jabones antisépticos. Afecta la síntesis de lípidos de la membrana bacteriana.
<b>Diamidinas</b>	Propamina	Usados en tratamientos tópicos, inhiben el consumo de oxígeno de la bacteria como <i>Pseudomonas</i> . Mejor efecto contra gran positivas y no contra gramnegativas y hongos.

<b>Agentes liberadores de halógenos</b>	Compuestos de cloro y yodo	Más usados en la clínica como antiséptico y desinfectante, bactericidas muy potentes. Pueden ser irritantes, generar alergias y toxicidad.
<b>Metales pesados</b>	Compuestos de plata, cobre y zinc	Usado para tratamiento de quemaduras, úlceras venosas, en piel infecciones interdigitales (efecto eficaz contra <i>Pseudomonas</i> ) efectos bacteriostáticos. Formas en polvo, pomada y lociones.
<b>Peroxígenos</b>	Peróxido de hidrógeno Permanganato de potasio Ozono	Son productos que liberan oxígeno, bactericidas, se degradan muy rápido. Peróxido de hidrógeno es tóxico vía oral. Efectos bactericida, esporicida, viricida y fungicida del permanganato de potasio y Ozono. En altas concentraciones pueden ser irritantes y tóxicos.
<b>Compuestos de amonio cuaternario</b>	Cloruro de benzalconio	Inoloros, incoloros, no irritantes y desodorantes, acción detergente y desinfectante. Lesionan la membrana celular. Efecto mayor en gram positivas que en gram negativas. No acción sobre micobacterias. Rápida acción
<b>Colorantes</b>	Acridinas (violeta de genciana) Trifenilmetanos, Azul de metileno	Interfieren con la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas. Son bacteriostáticos de Gram positivas.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Se puede decir que uno de los principales motivos por los cuales los propietarios recurren con su perro a una consulta veterinaria, se debe a traumatismos y en su mayoría en los que la piel se ve involucrada, por lo que el conocer la etiología de estas heridas nos puede apoyar a dimensionar el daño y con base a ello idear un plan terapéutico para la reparación y solución del daño (37,41,48,49).

En medicina veterinaria existe una constante búsqueda por innovar los procedimientos y tratamientos actuales para diferentes situaciones en las que los pacientes, dada sus diversas características anatómicas, fisiológicas, de

comportamiento, de hábitat, entre otros factores, son un reto constante en el día a día del médico veterinario para administrar un tratamiento eficaz a las dolencias por las que nuestros pacientes son llevados a consulta. La dificultad aumenta conforme a la creciente aparición de microorganismos resistentes a los antimicrobianos, por lo que es necesario la investigación de nuevas alternativas terapéuticas y una de estas opciones podría ser el ozono en aceite con indicaciones específicas en medicina veterinaria (43,49).

### **3. HIPÓTESIS**

La administración tópica del aceite de girasol ozonizado favorecerá el proceso de cicatrización de heridas posquirúrgicas y presentará un efecto antimicrobiano *in vitro* contra posibles microorganismos presentes en piel.

### **4. OBJETIVO**

Se administrará por vía tópica preparados con diferentes porcentajes de inclusión de ozono en aceite de girasol directamente en heridas posquirúrgicas de perras sometidas a OSH y se evaluará su efecto sobre la regeneración de las heridas mediante observación macroscópica, además, se evaluará la actividad antimicrobiana *in vitro* de los preparados de aceite de girasol ozonizado sobre microorganismos asociados a infecciones de heridas en piel.

### **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

Se utilizaron tres preparados a base de aceite de girasol con diferentes concentraciones de ozono y un aceite de girasol sin ozono como control

proporcionados por el laboratorio Omanu Labs. El primer preparado se identificó como “T1” el cual era aceite de girasol sin ozonizar, este fue utilizado como control para las pruebas *in vitro*. El segundo “T2” fue un ungüento que contenía, 43.8 % de aceite de girasol ozonizado al 9 %, 5 % árnica y 5 % aloe vera. El tercer preparado “T3” contenía aceite de girasol con una concentración de ozono del 5 %. El cuarto preparado “T4” era aceite de girasol con una concentración de ozono del 9 % (Figura 5). Estos preparados fueron elaborados siguiendo los estándares de calidad internos del fabricante.



Figura 5. Preparados utilizados.

### 5.1. Procedimiento *in vitro*.

Las evaluaciones *in vitro* se realizaron con cepas de *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *E. coli* y *C. albicans*. Estos microorganismos se obtuvieron del acervo del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, cuyas instalaciones y equipo fueron

utilizados para el desarrollo de este trabajo. Estos microorganismos se encontraban preservados en congelación, por lo que inicialmente se requirió de un procedimiento de reactivación.

Para el proceso de reactivación de los microorganismos, se tomó una muestra del contenedor de origen de cada microorganismo y posteriormente se colocó directamente en los medios de cultivo adecuados para cada uno. Para el caso de las bacterias *S. aureus*, *S. pseudintermedius* y *E. coli* se utilizó el medio TSA (Trypticaseína de Soya Agar, BD Bioxon) y para el caso de la levadura *C. albicans* se empleó el medio SDA (Sabouraud Glucosado Agar, BD Bioxon), ambos medios se prepararon de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Se mantuvieron en incubación durante 24 h a una temperatura constante de 37 °C, pasado este tiempo, se comprobó la viabilidad mediante la observación directa del crecimiento de las colonias, una vez confirmada la viabilidad de los microorganismos se sometieron a las pruebas de susceptibilidad con los preparados de aceite ozonizado y el aceite control. Cabe mencionar que, para la aplicación de la metodología se realizaron ensayos preliminares, debido al reto que representaron los preparados al ser semisólidos a base de aceite y para fines de este escrito solo se mencionó la metodología final.

#### 5.1.1 Cultivo de microorganismos.

Se trabajó con los microorganismo en fase de crecimiento logarítmico. Se tomó una muestra de cada microorganismo y se sembró en un agar TSA para el caso de las bacterias y SDA para el caso de *C. albicans*, mismos que fueron incubados 24 h a una temperatura constante de 37 °C, posteriormente se verificó su identidad por sus

características morfológicas y fisiológicas. Una vez que se tenía el microorganismo, este se utilizó para cada una de las siguientes evaluaciones:

1. Inhibición de crecimiento por difusión en agar en 24 h.
2. Actividad microbicida por tiempo de exposición a los preparados.
3. Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los preparados.

#### 5.1.2 Estandarización del inóculo y conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).

Se preparó un caldo nutritivo (Caldo nutritivo, BD Bioxol) siguiendo las indicaciones del fabricante, posteriormente, en un tubo de ensayo estéril se tomaron 15 mL de este caldo, con un asa bacteriológica estéril se tomaron colonias del cultivo de los microorganismos en agar y se agregaron al caldo hasta igualar 0.5 del nefelómetro de McFarland, lo que representa  $1.5 \times 10^8$  UFC. Una vez estandarizado el inóculo se identificó cada tubo de acuerdo con el microorganismo correspondiente de la siguiente forma: "SA" para la suspensión de *S. aureus*, "SP" para la de *S. pseudintermedius*, "EC" para *E. coli* y "CA" para el caso de *C. albicans* (Figura 6). Para conocer la cantidad real de microorganismos presentes en los inóculos preparados que iban a ser utilizados en las evaluaciones de inhibición de crecimiento por difusión en agar en 24 h y de la actividad microbicida por tiempo de exposición a los preparados, se realizaron diluciones decuples seriadas a partir del inóculo inicial y siembra en agar para el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).

### 5.1.3 Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).

Ya que se trabajó con diluciones, se realizaron conteos a través de observación directa de las unidades formadoras de colonias con ayuda de un microscopio estereoscópico.

De la suspensión original (SA, SP, EC y CA) de cada uno de los microorganismos se hicieron 7 diluciones decuples en microtubos de plástico estériles con una capacidad de 1500  $\mu$ L. Para realizar dichas diluciones cada tubo se identificó de la "A" a la "H" que iba de la mayor concentración de microorganismos a la de menor. Cada microtubo debía contener previamente 1350  $\mu$ L de caldo nutritivo estéril, con excepción del microtubo "A" ya que en este iban 1500  $\mu$ L del inóculo original del microorganismo en cuestión. Posteriormente del tubo "A" se tomaron 150  $\mu$ L con una pipeta y se vertían en el tubo B para su homogenización, se repetía el proceso hasta finalizar en el microtubo H.

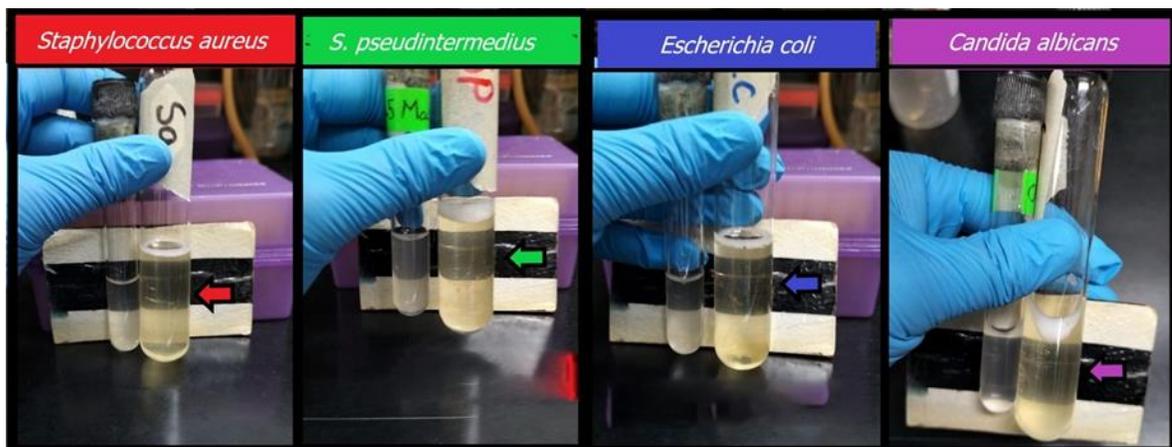


Figura 6. Inóculos de los diferentes microorganismos

Ya obtenidos todas las diluciones se tomaron de todos los microtubos 3 muestras cada una de 10  $\mu\text{L}$  y se colocaron en unas placas de agar previamente identificadas con las letras y los microorganismos que se trabajaron. Se utilizó agar TSA para las bacterias y SDA para *C. albicans*. Una vez terminada la colocación de las muestras, cada agar se puso en incubación durante 24 h a una temperatura constante de 37 °C, una vez que pasaron las 24 h se realizó el conteo de UFC (Figura 7).

Una vez estimada la concentración de microorganismos para los diferentes inóculo, se prosigió a realizar las pruebas de eficacia antimicrobiana de cada uno de los preparados.

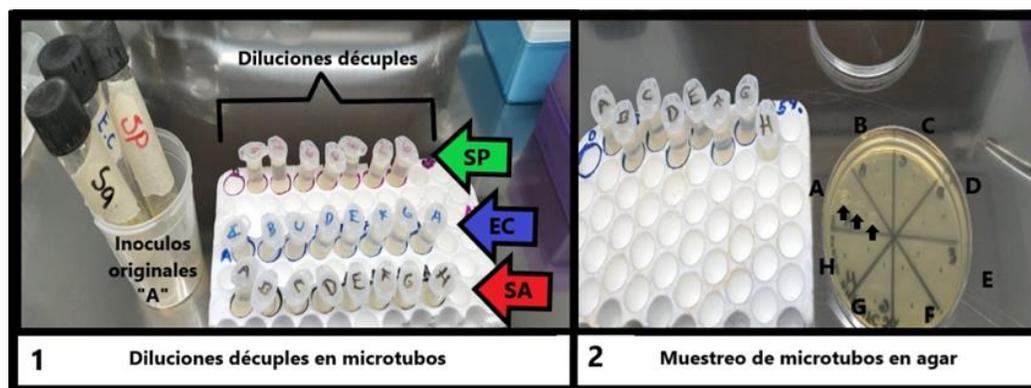


Figura 7. Conteo de unidades formadoras de colonias de las suspensiones SA, SP, EC y CA.

#### 5.1.4. Medición de zonas de Inhibición de crecimiento por difusión en agar en 24 h.

Con esta prueba se determinó si existía o no susceptibilidad a los preparados por parte de los microorganismos. Para ello en un agar Muller Hilton preparado con las indicaciones del fabricante (Agar Muller Hilton, DB Bioxol), previamente identificado

y delimitado en 2 zonas "A" y "C". En cada zona se realizaron 3 pozos con capacidad de 60  $\mu$ L, en la zona "A" se aplicó de forma homogénea tapizando toda la zona en tres direcciones diferentes con un hisopo estéril una muestra de inóculo "A" y en la zona "C" se realizó el mismo procedimiento, pero con el inóculo "C". Una vez tapizado todo el agar se llenó cada uno de los pozos con los preparados de aceite ozonizado (Figura 8). Cada uno de los agares se metió a la incubadora durante 24 h a 37 °C. Posteriormente se hizo la lectura y se midió con un vernier digital el diámetro de las zonas de inhibición de crecimiento microbiano alrededor de los pozos.

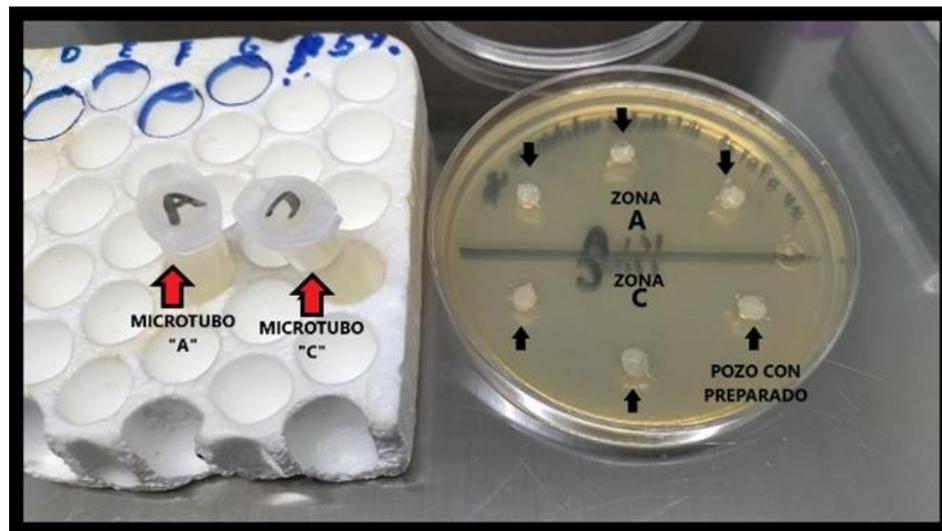


Figura 8. Inhibición de crecimiento por difusión en 24 h.

#### 5.1.5. Determinación de CMI por exposición de 30 segundos.

Se determinó a qué dilución del preparado de prueba comenzaría a observarse crecimiento con diferentes microorganismos, el valor obtenido es la concentración en  $\mu\text{g}$  de derivados del ozono (DO) por mL de preparado.

Primero se realizaron las diluciones dobles de cada preparado con solución salina fisiológica (SSF) estéril en microtubos con capacidad de 600  $\mu\text{L}$  y en total se hicieron 16 diluciones. Los microtubos se identificaron con letras del alfabeto de la "A" siendo el preparado original hasta la "O" donde el preparado estaría más diluido.

De cada uno de los microtubos se hizo una mezcla con el inóculo original "A" de cada microorganismo a una relación de 1:1 con cada una de las diluciones de los preparados de los aceites ozonizados. Una vez homogenizado con el agitador vortex, se tomaron 3 muestras de 10  $\mu\text{L}$  de cada microtubo y se sembró en agares previamente identificados de TSA para las bacterias y SDA para la levadura. Tanto los microtubos como los agares se incubaron en las mismas condiciones durante 24 h a 37 °C. De la misma forma que en la prueba anterior se usó un grupo control positivo que era una muestra del inóculo "A" del microorganismo y un control negativo que era una muestra del preparado.

#### 5.1.6. Determinación de CMI por exposición de 24 h.

Los microtubos de la anterior prueba se dejaron 24 h en incubación a 37 °C para evaluar si existe un cambio con respecto a las muestras tomadas a los 30 s después de la exposición. Después de la incubación se homogenizó cada microtubo y se tomaron 3 muestras de 10  $\mu\text{L}$  de cada microtubo para colocarlas en un agar TSA

para las bacterias y SDA para la levadura (Figura 10), el valor obtenido es la concentración en  $\mu\text{g}$  de derivados del ozono (DO) por mL de preparado.

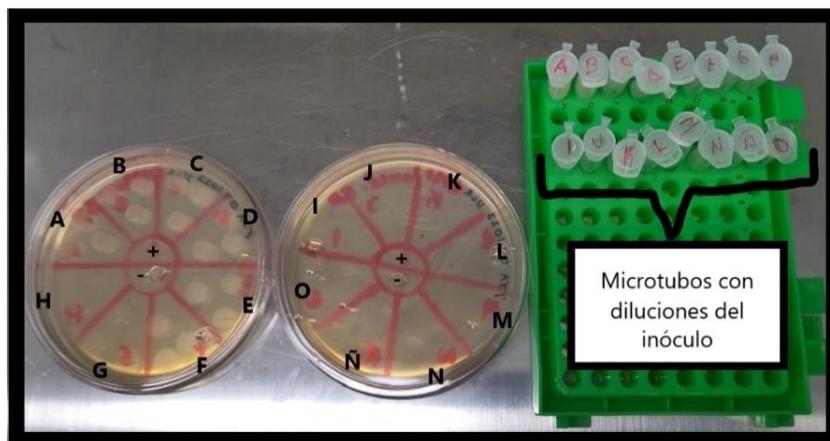


Figura 9. Microtubos y agares para la determinación de CMI.

#### 5.1.7. Actividad microbicida por tiempo de exposición a los preparados.

Una de las incógnitas era, si los productos son eficaces contra los microorganismos inmediatamente después de su aplicación y sino, cuánto tiempo era necesario dejar el preparado para que fuera eficaz. Para esta prueba se ocuparon 2 microtubos identificados como “A” y “C”. En cada uno de los microtubos se colocó 200  $\mu\text{L}$  del preparado de aceite ozonizado a probar, posteriormente se agregó 200  $\mu\text{L}$  del inóculo “A” al microtubo identificado como “A” y microtubo “C” se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de inóculo “C”, ambas mezclas se homogenizaron con ayuda de un agitador vortex y a los 30 s (Tiempo 1) se tomaron 3 muestras de 10  $\mu\text{L}$  con pipeta de cada microtubo para colocarlas en un agar TSA para las bacterias y SDA para *C. albicans*, esta toma de muestra se repitió en los tiempos de exposición de 1 h

(Tiempo 2), 6 h (Tiempo 3) y 12 h (Tiempo 4), durante este tiempo las mezclas y los agares fueron incubados por un periodo de 24 h a 37 °C. Se usó un grupo control positivo (+) que solo era una muestra del inóculo "A" y "C" y un control negativo (-) que era una muestra del preparado de prueba (Figura 9).

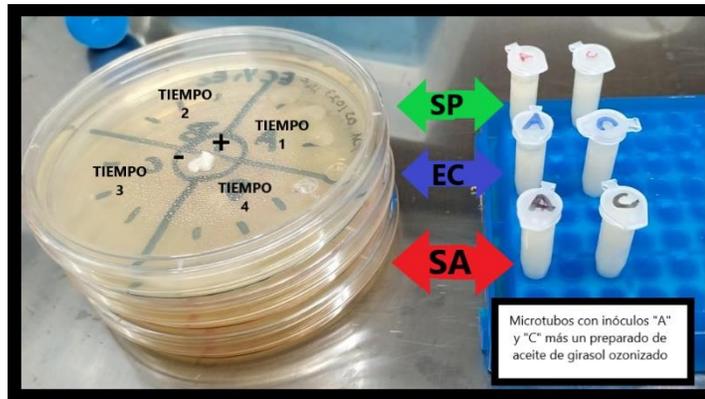


Figura 10. Evaluación de la actividad microbicida por tiempo de exposición a los preparados

## 5.2. Evaluación de la cicatrización.

Se realizó una campaña de esterilización de perras en la clínica de reproducción canina de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, con las siguientes especificaciones: perras clínicamente sanas, de 6 meses a 6 años, no gestantes ni lactantes y que no estuvieran en celo o dos meses posteriores. A los propietarios se les pidió firmar una responsiva y carta compromiso para el seguimiento de tratamiento y revisiones (Anexo 1). Se formaron 4 grupos de 5 perras cada uno. El grupo 1 se estableció como el grupo control, por lo que no se les aplicó ningún tratamiento local (T1), al grupo 2 se aplicó el preparado 2 (T2), para el grupo 3 se aplicó el preparado 3 (T3) y finalmente al grupo 4 se aplicó el preparado 4 (T4). En los cuatro grupos se aplicó un tratamiento postquirúrgico a base de amoxicilina con

ácido clavulánico a dosis de 22 mg/kg dos veces al día durante 7 días y meloxicam a dosis de 0.1 mg/kg una vez al día por 3 días (50,51). Una vez realizada la cirugía se hicieron las siguientes acciones.

Al término del procedimiento quirúrgico se realizó la evaluación del proceso de cicatrización de la herida, mediante el registró el tamaño de la herida, así como los indicadores de bordes de la herida, inflamación, vascularidad, presencia de eritema o exudado y temperatura (52).El tamaño y los indicadores de la herida se evaluaron los días 0, 7 y 10 del tratamiento.

#### 5.2.1 Tamaño de herida.

Con la ayuda de un vernier digital (Truper® CALDI-6MP) se registró el largo y ancho de las heridas en milímetros (Figura 11).

#### 5.2.2 Bordes de heridas.

Se evaluó por medio de la observación directa, y se asignó una puntuación del 1-4 según las características descritas para cada número en donde; 1= No hay bordes de heridas, 2= Bordes difusos, 3= Bordes delimitados 4= Bordes engrosados. (52).

#### 5.2.3 Reacción Inflamatoria.

Se evaluó por medio de la observación directa, considerando vascularidad, exudado y eritema de la herida y se asignó una puntuación de acuerdo con el siguiente criterio:

- Vascularidad: Se evaluó por medio de la observación directa poniendo énfasis en el cambio de coloración del área de la herida asignando las

siguientes calificaciones: 1= Coloración normal de la piel, 2= Rosa, 3 = Roja, 4 = Púrpura.

- Exudado: Se evaluó por medio de la observación directa de la herida la cual determinará si hay salida o presencia de sustancias de extravasación por el proceso inflamatorio que se llegan a eliminar por una alteración de los vasos sanguíneos o membranas celulares o por un proceso infeccioso. La puntuación fue de la siguiente forma: 1= No hay exudado 2= seroso, 3= fibroso, 4= purulento y 5= hemorrágico
- Eritema: Se evaluó por medio de la observación directa de la herida, la cual determinará la presencia de enrojecimiento de la piel derivado del aumento de la capilaridad de los vasos sanguíneos circundantes a la herida. La puntuación se asignó de la siguiente forma: 1 = Ausente, 2 = Mínimo, 3= Moderado, 4= Severo.
- Temperatura: Se evaluó a través de la comparación de fotografías térmicas con ayuda de una cámara termográfica (FLIR®)

Los preparados se aplicaron sobre la herida quirúrgica cubriéndola completamente a lo largo y hasta 1 cm alrededor, inmediatamente después del procedimiento quirúrgico y posteriormente cada 12 h durante 10 días, esta aplicación la llevaron a cabo los propietarios de cada uno de los pacientes.



Figura 11. Medición del largo de la herida con un vernier digital.

Tabla 4. Dosis recomendada del preparado.

Extensión de la herida	Cantidad aproximada de preparado
< 4 cm	0.1-0.2 mL
4 cm - 10 cm	0.2-0.3 mL
> 10 cm	0.3 a 1 mL

### 5.3 Análisis estadístico

Los resultados de las pruebas *in vitro* para el caso de la determinación del tamaño de las zonas de inhibición de crecimiento antimicrobiano se evaluaron mediante ANOVA para muestras no relacionadas y la diferencias se determinaron mediante prueba de Bonferroni, en cuanto a la evaluación de la actividad microbicida por tiempo de exposición y a la determinación de CMI se evaluaron mediante Kruskal Wallis y las diferencias mediante prueba de Bonferroni modificado.

Los resultados para la evaluación de la cicatrización que constaron de mediciones tales como largo, ancho y temperatura se evaluaron mediante ANOVA y las diferencias mediante prueba de Bonferroni, y los resultados que se determinaron a

través de escalas como fueron la observación de bordes de las heridas y evaluación de la respuesta inflamatoria se usó Kruskal Wallis y las diferencias mediante prueba de Bonferroni modificado. Las diferencias significativas se establecieron en  $P < 0.05$ . Todos los resultados se analizaron mediante el software IBM SPSS 26.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Procedimiento *in vitro*

#### 6.1.1 Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).

En la Tabla 5 se muestran los promedios de las estimaciones de las UFC por 1 mL de inóculo estandarizado de cada microorganismo en sus diferentes diluciones (Figura 12).

Tabla 5. Promedio UFC/ mL de cada microorganismo

Inóculos	Microorganismo			
	<i>S. aureus</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
A	1.35X10 <sup>8</sup> UFC	1.06X10 <sup>8</sup> UFC	1,29X10 <sup>8</sup> UFC	6.16X10 <sup>6</sup> UFC
B	1.35X10 <sup>7</sup> UFC	1.06X10 <sup>7</sup> UFC	1,29X10 <sup>7</sup> UFC	6.16X10 <sup>5</sup> UFC
C	1.35X10 <sup>6</sup> UFC	1.06X10 <sup>6</sup> UFC	1,29X10 <sup>6</sup> UFC	6.16X10 <sup>4</sup> UFC
D	1.35X10 <sup>5</sup> UFC	1.06X10 <sup>5</sup> UFC	1,29X10 <sup>5</sup> UFC	6.16X10 <sup>3</sup> UFC
E	1.35X10 <sup>4</sup> UFC	1.06X10 <sup>4</sup> UFC	1,29X10 <sup>4</sup> UFC	6.16X10 <sup>2</sup> UFC
F	4.8X10 <sup>3</sup> UFC	2.8X10 <sup>3</sup> UFC	2.4X10 <sup>3</sup> UFC	1X10 <sup>1</sup> UFC
G	2.7X10 <sup>2</sup> UFC	1.4X10 <sup>2</sup> UFC	1.1X10 <sup>2</sup> UFC	0 UFC
H	2.9X10 <sup>1</sup> UFC	1.3X10 <sup>1</sup> UFC	0.7X10 <sup>1</sup> UFC	0 UFC

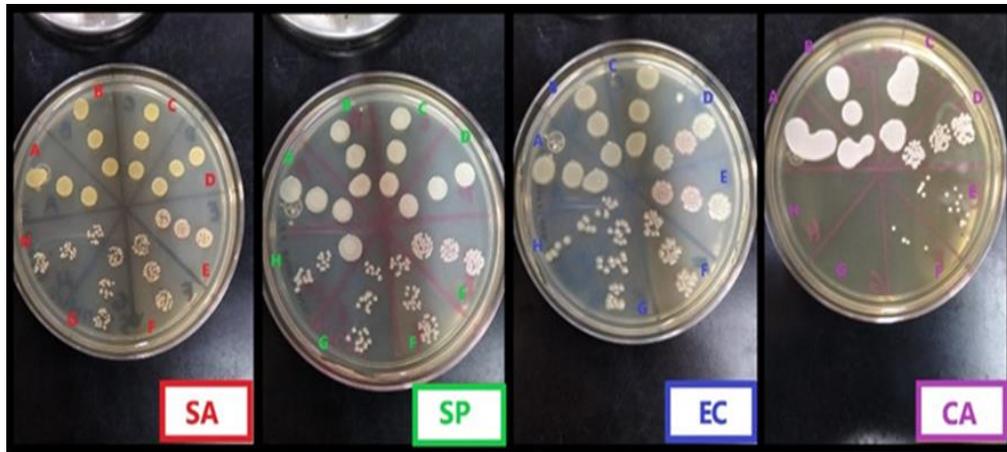


Figura 12. Conteo de UFC de las diferentes inóculos de cada microorganismo.

#### 6.1.2 Medición de las zonas de inhibición de crecimiento microbiano por difusión en agar.

En las Tablas de la 6 - 9 se muestran los promedios y las desviaciones estándar ( $\pm 1DE$ ) de la medición de los diámetros de las zonas de inhibición de crecimiento que se obtuvieron de los inóculos "A" y "C" de los diferentes microorganismo. (Figura 13).

En la Tabla 6, se puede observar que en T1 no se presentaron zonas de inhibición del crecimiento en ambos inóculos de *S. aureus*, a diferencia de los preparados T2, T3 y T4 en donde si hay zonas de inhibición, siendo T4 el que presentó mayores diámetros de zonas de inhibición de crecimiento para ambos inóculos. Para el inóculo A que corresponde a una concentración de  $1.35 \times 10^8$  UFC/mL, con los preparados T2 y T3 entre ellos no presentaron una diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ) el preparado T4 se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) con respecto a los otros preparados. Para el inóculo C que corresponde a una concentración de  $1.35 \times 10^6$  UFC/mL, todos los preparados

presentan una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) con respecto a los otros preparados.

Tabla 6. Promedio y  $\pm 1$ DE del diámetro de zonas de inhibición de crecimiento del inóculo de *S. aureus*.

<i>S. aureus</i>	Preparado			
	T1	T2	T3	T4
<b>A</b>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	7.76 $\pm$ 0.61 <sup>b</sup>	8.53 $\pm$ 1.2 <sup>bc</sup>	12.10 $\pm$ 0.52 <sup>d</sup>
<b>C</b>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	8.33 $\pm$ 0.86 <sup>b</sup>	10.73 $\pm$ 0.7 <sup>c</sup>	12.53 $\pm$ 0.35 <sup>d</sup>

A = 1.35X10<sup>8</sup> UFC/mL; C = 1.35X10<sup>6</sup> UFC/mL

T1 = Aceite de girasol sin ozonizar; T2 Ungüento con 43.8 % aceite de girasol ozonizado al 9 %, 5 % árnica y 5 % áloe vera; T3 = gel de aceite de girasol ozonizado al 5 %; T4 = aceite de girasol ozonizado al 9 %.

<sup>a-d</sup> Diferentes literales indican diferencia estadísticamente significativa ente preparados para cada inóculo de *S. aureus*,  $P < 0.05$ .

En la Tabla 7, se puede observar que en T1 no se presentaron zonas de inhibición del crecimiento en ambos inóculos de *S. aureus*, a diferencia de los preparados T2, T3 y T4 en donde si hay zonas de inhibición, siendo T4 el que presentó mayores diámetros de zonas de inhibición de crecimiento para ambos inóculos. Para el inóculo A que corresponde a una concentración de 1.35X10<sup>8</sup> UFC/mL, los preparados T2 y T3 entre ellos no presentaron una diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ) el preparado T4 se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) con respecto a los otros preparados excepto con T3. Y Para el inóculo C que corresponde a una concentración de 1.35X10<sup>6</sup> UFC/mL, todos los preparados presentan una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) con respecto a los otros preparados, aunque se observa igualdad estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ ) entre T3 y T4.

Tabla 7. Promedio y  $\pm 1$ DE del diámetro (mm) de zonas de inhibición de crecimiento del inóculo *S. pseudintermedius*.

<i>S. pseudintermedius</i>	Preparado			
	T1	T2	T3	T4
<b>A</b>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	7.73 $\pm$ 0.68 <sup>b</sup>	9.60 $\pm$ 0.88 <sup>bc</sup>	10.86 $\pm$ 0.8 <sup>cd</sup>
<b>C</b>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	8.26 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	10.26 $\pm$ 1.68 <sup>bc</sup>	11.26 $\pm$ 0.7 <sup>cd</sup>

A = 1.06X10<sup>8</sup> UFC/mL; C = 1.06X10<sup>6</sup> UFC/mL

T1 = Aceite de girasol sin ozonizar; T2 Ungüento con 43.8 % aceite de girasol ozonizado al 9 %, 5 % árnica y 5 % áloe vera; T3 = gel de aceite de girasol ozonizado al 5 %; T4 = aceite de girasol ozonizado al 9 %.

<sup>a-d</sup> Diferentes literales indican diferencia estadísticamente significativa ente preparados para cada inóculo de *S. pseudintermedius*., P < 0.05.

En la Tabla 8, se puede observar que ninguno de los preparados se formaron zonas de inhibición de crecimiento para *E. coli*. Para el inóculo A que correspondió a 1.29X10<sup>8</sup> UFC/mL todos los tratamientos son estadísticamente iguales (P > 0.05), lo mismo paso para el inóculo C que contenía 1.29X10<sup>8</sup> UFC/mL de inóculo.

Tabla 8. Promedio y  $\pm 1$ DE del diámetro (mm) de zonas de inhibición de crecimiento del inóculo *E. coli*.

<i>E. coli</i>	Preparado			
	T1	T2	T3	T4
<b>A</b>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>			
<b>C</b>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>			

A = 1.29X10<sup>8</sup> UFC; C = 1.29X10<sup>6</sup> UFC

T1 = Aceite de girasol sin ozonizar; T2 Ungüento con 43.8 % aceite de girasol ozonizado al 9 %, 5 % árnica y 5 % áloe vera; T3 = gel de aceite de girasol ozonizado al 5 %; T4 = aceite de girasol ozonizado al 9 %.

<sup>a</sup> Diferentes literales indican diferencia estadísticamente significativa ente preparados para cada inóculo de *E.coli*., P < 0.05.

En la Tabla 9, se puede observar que en T1 no se presentaron zonas de inhibición del crecimiento en ambos inóculos de *C. albicans*, a diferencia de los preparados T2, T3 y T4 en donde si hay zonas de inhibición, siendo T4 el que presentó mayores diámetros de zonas de inhibición de crecimiento para ambos inóculos. Para el inóculo A que corresponde a una concentración de 6.16X10<sup>6</sup> UFC/mL, se observó una diferencia estadísticamente significativa (P < 0.05) entre todos los preparados, sin embargo, entre T3 y T4 se observa una igualdad estadísticamente significativa

( $P > 0.05$ ) entre ellos. Y Para el inóculo C que corresponde a una concentración de  $6.16 \times 10^4$  UFC/mL, todos los preparados presentan una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) con respecto a los otros preparados.

Tabla 9. Promedio y  $\pm 1$ DE del diámetro (mm) de zonas de inhibición de crecimiento del inóculo *C. albicans*.

<i>C. albicans</i>	Preparado			
	T1	T2	T3	T4
A	$0 \pm 0^a$	$10.06 \pm 0.35^b$	$13.93 \pm 0.7^c$	$14.93 \pm 1.17^{cd}$
C	$0 \pm 0^a$	$10.93 \pm 0.37^b$	$14.66 \pm 0.32^c$	$15.96 \pm 0.55^d$

A =  $6.16 \times 10^6$  UFC; C =  $6.16 \times 10^4$  UFC

T1 = Aceite de girasol sin ozonizar; T2 Ungüento con 43.8 % aceite de girasol ozonizado al 9 %, 5 % árnica y 5 % áloe vera; T3 = gel de aceite de girasol ozonizado al 5 %; T4 = aceite de girasol ozonizado al 9 %.

<sup>a-d</sup> Diferentes literales indican diferencia estadísticamente significativa ente preparados para cada inóculo de *C. albicans*.,  $P < 0.05$ .

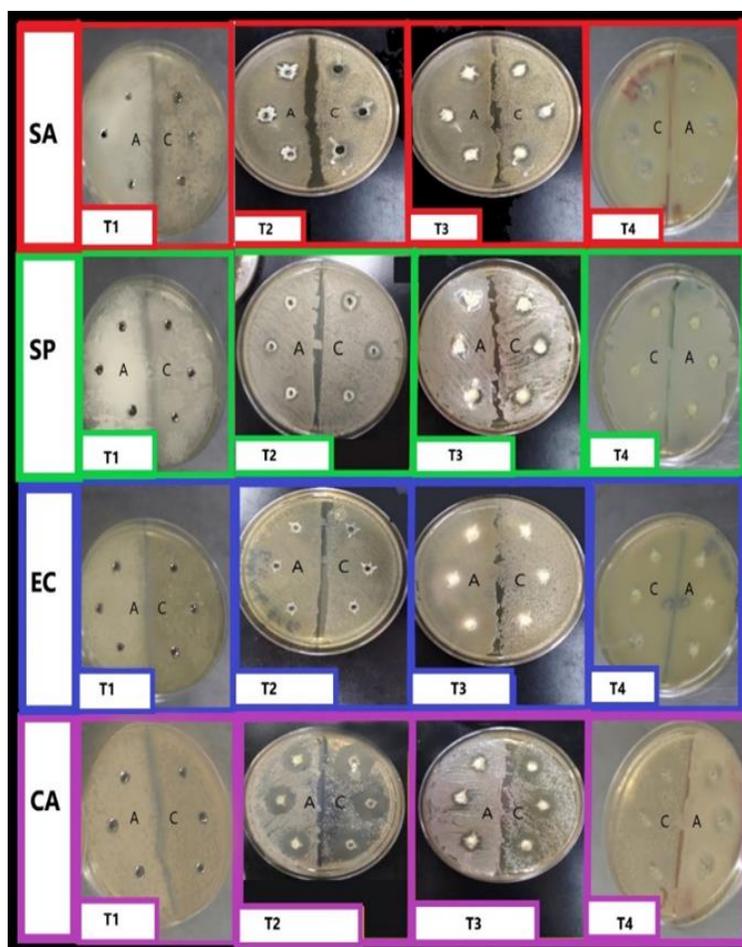


Figura 13. Zonas de inhibición de crecimiento por microorganismo y preparado.

### 6.1.3. Obtención de la CMI por 30 s de exposición.

En las tablas 10 – 13 se observan las CMI que se expresan en  $\mu\text{g}$  de derivados de ozono (DO) por mL de preparado para cada uno de los microorganismos que fueron expuestos 30 s a las diferentes concentraciones de los preparados, siendo que en la mayoría de los casos no se pudo determinar, a excepción que en *C. albicans* y el preparado T4, donde si hay una CMI que corresponde a 90,000  $\mu\text{gDO/mL}$  (Tabla 13).

Tabla 10. Determinación de la CMI ( $\mu\text{gDO/mL}$ ) de los derivados de ozono (DO) presentes en los preparados para *S. aureus* a una concentración de  $1.35 \times 10^8$  UFC/mL, a los 30 s de exposición.

Diluciones de los preparado %	Preparado			
	T1	T2	T3	T4
100 %	3	3	3	3
50 %	3	3	3	3
25 %	3	3	3	3
6.25 %	3	3	3	3
3.13 %	3	3	3	3
1.56 %	3	3	3	3
0.78 %	3	3	3	3
0.39 %	3	3	3	3
0.19 %	3	3	3	3
0.09 %	3	3	3	3
0.04 %	3	3	3	3
0.02 %	3	3	3	3
0.01 %	3	3	3	3
0.006 %	3	3	3	3
0.003 %	3	3	3	3
0.001 %	3	3	3	3
<b>CMI</b>	Nd	Nd	Nd	Nd

T1 = Aceite de girasol sin ozonizar; T2 Ungüento de 43.8 % aceite de girasol ozonizado 9 %, 5 % árnica y 5 % áloe vera; T3 = Gel de aceite de girasol ozonizado 5 %; T4 = Aceite de girasol ozonizado 9 %.

0-3= Número de cepas que presentaron crecimiento después de los tratamientos;

CMI Expresada en concentración de  $\mu\text{g}$  de derivados de ozono (DO) por mL de preparado; Nd= No determinada

Tabla 11 Determinación de la CMI ( $\mu\text{gDO/mL}$ ) de los derivados de ozono (DO) presentes en los preparados para *S. pseudintermedius* a una concentración de  $1.06 \times 10^8$  UFC/mL, a los 30 s de exposición.

Diluciones de los preparado %	Preparado			
	T1	T2	T3	T4
100 %	3	3	3	3
50 %	3	3	3	3
25 %	3	3	3	3
6.25 %	3	3	3	3
3.13 %	3	3	3	3
1.56 %	3	3	3	3
0.78 %	3	3	3	3
0.39 %	3	3	3	3
0.19 %	3	3	3	3
0.09 %	3	3	3	3
0.04 %	3	3	3	3
0.02 %	3	3	3	3
0.01 %	3	3	3	3
0.006 %	3	3	3	3
0.003 %	3	3	3	3
0.001 %	3	3	3	3
<b>CMI</b>	Nd	Nd	Nd	Nd

T1 = Aceite de girasol sin ozonizar; T2 Ungüento de 43.8 % aceite de girasol ozonizado 9 %, 5 % árnica y 5 % áloe vera; T3 = Gel de aceite de girasol ozonizado 5 %; T4 = Aceite de girasol ozonizado 9 %.

0-3= Numero de cepas que presentaron crecimiento después de los tratamientos;

CMI Expresada en concentración de  $\mu\text{g}$  de derivados de ozono (DO) por mL de preparado; Nd= No determinada

Tabla 12. Determinación de la CMI ( $\mu\text{gDO/mL}$ ) de los derivados de ozono (DO) presentes en los preparados para *E. coli* a una concentración de  $1.29 \times 10^8$  UFC/mL, a los 30 s de exposición.

Diluciones de los preparado %	Preparado			
	T1	T2	T3	T4
100 %	3	3	3	3
50 %	3	3	3	3
25 %	3	3	3	3
6.25 %	3	3	3	3
3.13 %	3	3	3	3
1.56 %	3	3	3	3
0.78 %	3	3	3	3
0.39 %	3	3	3	3
0.19 %	3	3	3	3
0.09 %	3	3	3	3
0.04 %	3	3	3	3
0.02 %	3	3	3	3
0.01 %	3	3	3	3
0.006 %	3	3	3	3
0.003 %	3	3	3	3
0.001 %	3	3	3	3
<b>CMI</b>	Nd	Nd	Nd	Nd

T1 = Aceite de girasol sin ozonizar; T2 Ungüento de 43.8 % aceite de girasol ozonizado 9 %, 5 % árnica y 5 % áloe vera; T3 = Gel de aceite de girasol ozonizado 5 %; T4 = Aceite de girasol ozonizado 9 %.

0-3= Número de cepas que presentaron crecimiento después de los tratamientos;

CMI Expresada en concentración de  $\mu\text{g}$  de derivados de ozono (DO) por mL de preparado; Nd= No determinada

Tabla 13. Determinación de CMI ( $\mu\text{gDO}/\text{mL}$ ) de los derivados de ozono (DO) presentes en los preparados para *C. albicans* a una concentración de  $6.16 \times 10^7$  UFC/mL, a los 30 s de exposición.

Diluciones de los preparado %	Preparado			
	T1	T2	T3	T4
100 %	3	3	3	0
50 %	3	3	3	2
25 %	3	3	3	3
6.25 %	3	3	3	3
3.13 %	3	3	3	3
1.56 %	3	3	3	3
0.78 %	3	3	3	3
0.39 %	3	3	3	3
0.19 %	3	3	3	3
0.09 %	3	3	3	3
0.04 %	3	3	3	3
0.02 %	3	3	3	3
0.01 %	3	3	3	3
0.006 %	3	3	3	3
0.003 %	3	3	3	3
0.001 %	3	3	3	3
<b>CMI</b>	Nd	Nd	Nd	90,000 $\mu\text{gDO}/\text{mL}$

T1 = Aceite de girasol sin ozonizar; T2 Ungüento de 43.8 % aceite de girasol ozonizado 9 %, 5 % árnica y 5 % áloe vera; T3 = Gel de aceite de girasol ozonizado 5 %; T4 = Aceite de girasol ozonizado 9 %.

0-3= Número de cepas que presentaron crecimiento después de los tratamientos;

CMI Expresada en concentración de  $\mu\text{g}$  de derivados de ozono (DO) por mL de preparado; Nd= No determinada

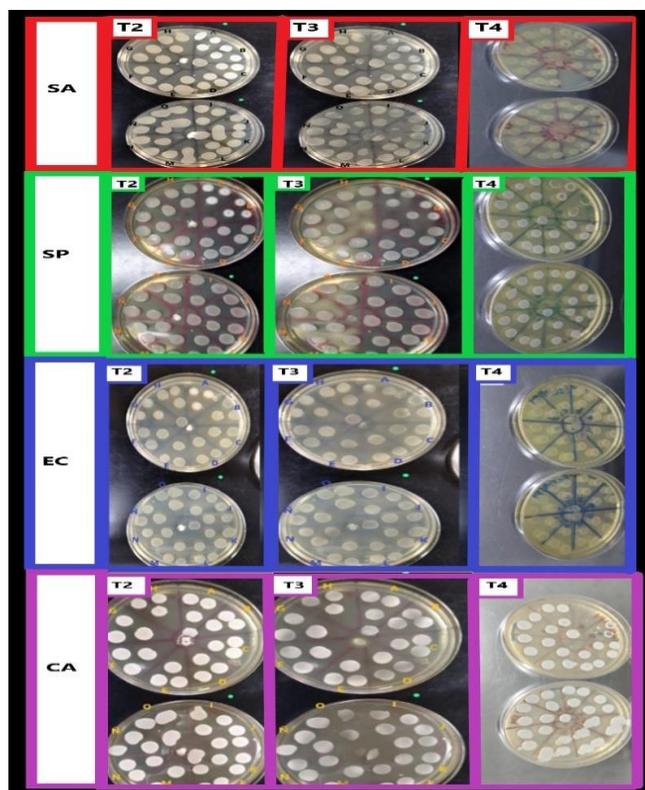


Figura 14. Concentración mínima inhibitoria por exposición de 30 s.

#### 6.1.4 Obtención de la CMI por exposición de 24 h

En las siguientes tablas se muestran si hay o no crecimiento de los diferentes microorganismos de la suspensión "A" que fueron expuestos a los productos. En las diferentes diluciones con la finalidad de observar cual es la concentración mínima inhibitoria (CMI).

En las Tablas 14 – 17 se observan las CMI que se expresan en  $\mu\text{g}$  de derivados de ozono (DO) por mL de preparado para el caso de cada microorganismo, los cuales fueron expuestos 24 h a las diferentes concentraciones de los preparados. Cabe mencionar que para todos los casos T1 no se determinó CMI.

En el caso de *S. aureus* se determinó la CMI para el preparado T2 que corresponde a 2,463.7 $\mu\text{gDO/mL}$ , para T3 fue 3,125  $\mu\text{gDO/mL}$ , y para T4 se determinó en 5,625  $\mu\text{gDO/mL}$  (Tabla 14).

Las CMI determinadas en *S. pseudintermedius* fueron para el caso de T2 de 9,855  $\mu\text{g/mL}$ , para T3 se observó en 3,125  $\mu\text{gDO/mL}$  y en T4 fue de 5,625  $\mu\text{gDO/mL}$  (Tabla 15).

Para *E. coli* solo se determinaron las CMI para los tratamientos T3 que fue de 25,000  $\mu\text{gDO/mL}$  y T4 que corresponde a 22,500  $\mu\text{gDO/mL}$ , en el caso de T2 si bien no se determinó la CMI se observó una disminución significativa del crecimiento de *E. coli* (Tabla 16).

Finalmente, en el caso de *C. albicans* las CMI en T2 fue de 9,855  $\mu\text{gDO/mL}$ , T3 fue de 1,565  $\mu\text{gDO/mL}$ , y para T4 se observó en 2,817  $\mu\text{gDO/mL}$ (Tabla 17).

Tabla 14. Determinación de CMI ( $\mu\text{gDO/mL}$ ) de los derivados de ozono (DO) presentes en los preparados para *S. aureus* a una concentración  $1.35 \times 10^8$  UFC/mL de a las 24 h de exposición.

Diluciones de los preparado %	Preparado			
	T1	T2	T3	T4
100 %	3	0	0	0
50 %	3	0	0	0
25 %	3	0	0	0
6.25 %	3	0	0	0
3.13 %	3	3	3	3
1.56 %	3	3	3	3
0.78 %	3	3	3	3
0.39 %	3	3	3	3
0.19 %	3	3	3	3
0.09 %	3	3	3	3
0.04 %	3	3	3	3
0.02 %	3	3	3	3
0.01 %	3	3	3	3
0.006 %	3	3	3	3
0.003 %	3	3	3	3
0.001 %	3	3	3	3
<b>CMI</b>	Nd	2,463.7 $\mu\text{gDO/mL}$	3,125 $\mu\text{gDO/mL}$	5,625 $\mu\text{gDO/mL}$

T1 = Aceite de girasol sin ozonizar; T2 Ungüento de 43.8 % aceite de girasol ozonizado 9 %, 5 % árnica y 5 % áloe vera; T3 = Gel de aceite de girasol ozonizado 5 %; T4 = Aceite de girasol ozonizado 9 %.  
 0-3= Número de cepas que presentaron crecimiento después de los tratamientos;  
 CMI Expresada en concentración de  $\mu\text{g}$  de derivados de ozono (DO) por mL de preparado; Nd= No determinada

Tabla 15. Determinación de CMI ( $\mu\text{gDO/mL}$ ) de los derivados de ozono (DO) presentes en los preparados para *S. pseudintermedius* a una concentración de  $1.06 \times 10^8$  UFC/mL, a las 24 h de exposición.

Diluciones de los preparado %	Preparado			
	T1	T2	T3	T4
100 %	3	0	0	0
50 %	3	0	0	0
25 %	3	0	0	0
6.25 %	3	3	0	0
3.13 %	3	3	3	3
1.56 %	3	3	3	3
0.78 %	3	3	3	3
0.39 %	3	3	3	3
0.19 %	3	3	3	3
0.09 %	3	3	3	3
0.04 %	3	3	3	3
0.02 %	3	3	3	3
0.01 %	3	3	3	3
0.006 %	3	3	3	3
0.003 %	3	3	3	3
0.001 %	3	3	3	3
<b>CMI</b>	Nd	9,855 $\mu\text{gDO/mL}$	3,125 $\mu\text{gDO/mL}$	5,625 $\mu\text{gDO/mL}$

T1 = Aceite de girasol sin ozonizar; T2 Ungüento de 43.8 % aceite de girasol ozonizado 9 %, 5 % árnica y 5 % áloe vera; T3 = Gel de aceite de girasol ozonizado 5 %; T4 = Aceite de girasol ozonizado 9 %.  
 0-3= Número de cepas que presentaron crecimiento después de los tratamientos;  
 CMI Expresada en concentración de  $\mu\text{g}$  de derivados de ozono (DO) por mL de preparado; Nd= No determinada

Tabla 16. Determinación de CMI ( $\mu\text{gDO/mL}$ ) de los derivados de ozono (DO) presentes en los preparados para *E. coli* a una concentración de  $1.29 \times 10^8$  UFC/mL a las 24 h de exposición.

Diluciones de los preparado %	Preparado			
	T1	T2	T3	T4
100 %	3	3	0	0
50 %	3	3	0	0
25 %	3	3	3	0
6.25 %	3	3	3	3
3.13 %	3	3	3	3
1.56 %	3	3	3	3
0.78 %	3	3	3	3
0.39 %	3	3	3	3
0.19 %	3	3	3	3
0.09 %	3	3	3	3
0.04 %	3	3	3	3
0.02 %	3	3	3	3
0.01 %	3	3	3	3
0.006 %	3	3	3	3
0.003 %	3	3	3	3
0.001 %	3	3	3	3
<b>CMI</b>	Nd	Nd	25,000 $\mu\text{gDO/mL}$	22,500 $\mu\text{gDO/mL}$

T1 = Aceite de girasol sin ozonizar; T2 Ungüento de 43.8 % aceite de girasol ozonizado 9 %, 5 % árnica y 5 % áloe vera; T3 = Gel de aceite de girasol ozonizado 5 %; T4 = Aceite de girasol ozonizado 9 %.  
 0-3= Número de cepas que presentaron crecimiento después de los tratamientos;  
 CMI Expresada en concentración de  $\mu\text{g}$  de derivados de ozono (DO) por mL de preparado; Nd= No determinada

Tabla 17. Determinación de CMI ( $\mu\text{gDO/mL}$ ) de los derivados de ozono (DO) presentes en los preparados para *C. albicans* a una concentración de  $6.16 \times 10^6$  UFC/mL las 24 h de exposición.

Diluciones de los preparado %	Preparado			
	T1	T2	T3	T4
100 %	3	0	0	0
50 %	3	0	0	0
25 %	3	0	0	0
6.25 %	3	3	0	0
3.13 %	3	3	0	0
1.56 %	3	3	3	3
0.78 %	3	3	3	3
0.39 %	3	3	3	3
0.19 %	3	3	3	3
0.09 %	3	3	3	3
0.04 %	3	3	3	3
0.02 %	3	3	3	3
0.01 %	3	3	3	3
0.006 %	3	3	3	3
0.003 %	3	3	3	3
0.001 %	3	3	3	3
<b>CMI</b>	Nd	9,855 $\mu\text{gDO/mL}$	1,562.5 $\mu\text{gDO/mL}$	2,817 $\mu\text{gDO/mL}$

T1 = Aceite de girasol sin ozonizar; T2 Ungüento de 43.8 % aceite de girasol ozonizado 9 %, 5 % árnica y 5 % áloe vera; T3 = Gel de aceite de girasol ozonizado 5 %; T4 = Aceite de girasol ozonizado 9 %.  
 0-3= Número de cepas que presentaron crecimiento después de los tratamientos;  
 CMI Expresada en concentración de  $\mu\text{g}$  de derivados de ozono (DO) por mL de preparado; Nd= No determinada

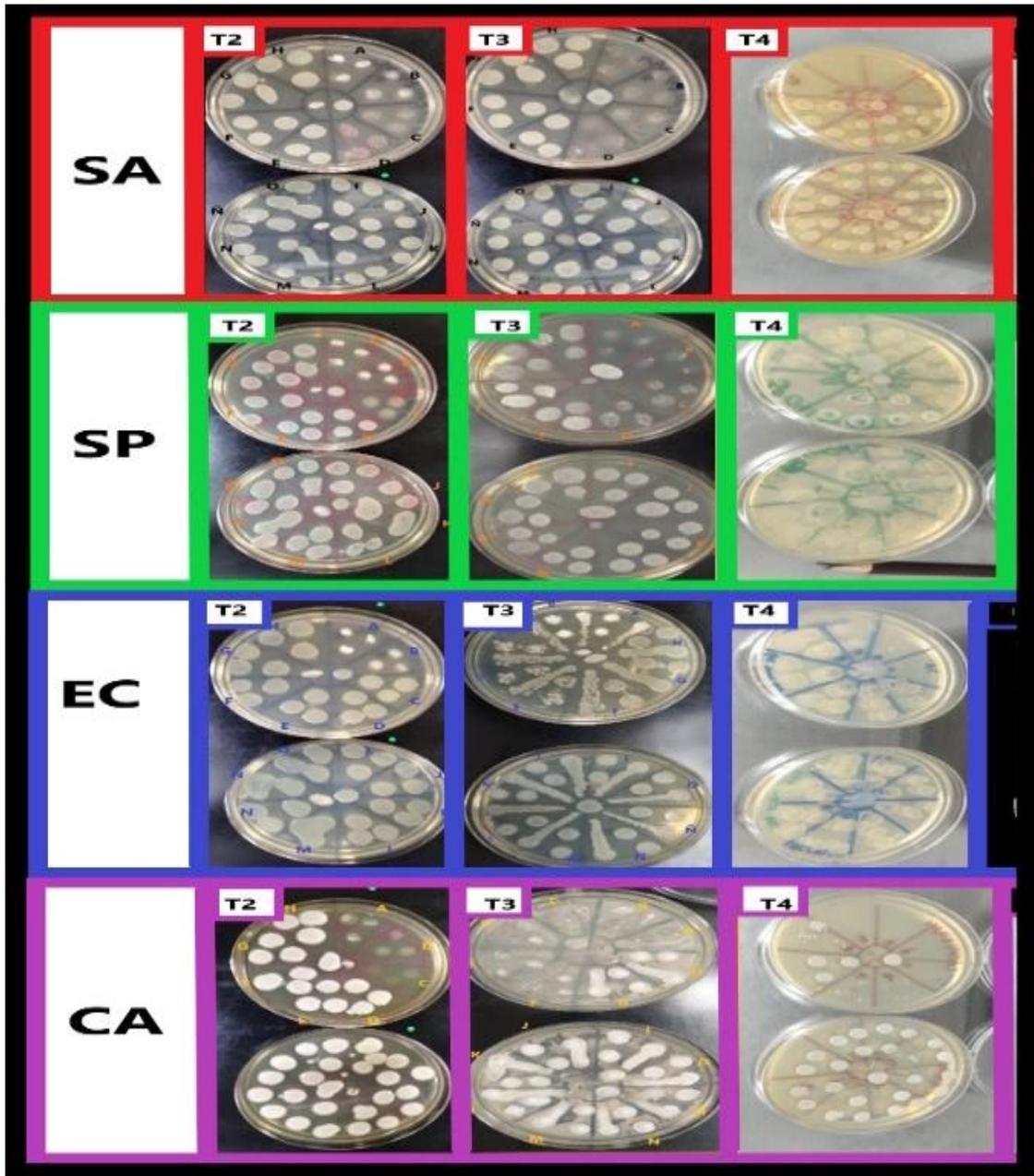


Figura 15. Concentraciones mínimas inhibitorias por exposición de 24 h a los preparados.

### 6.1.3. Actividad microbicida por tiempo de exposición a los preparados

En las Tablas de la 18 - 21 se muestra la actividad microbicida en los diferentes intervalos de tiempo de exposición a cada uno de los preparados según la concentración del inóculo A y C de los diferentes microorganismo (Figura 16).

En la Tabla 18 se observa que hay 2 concentraciones diferentes de inóculo de *S. aureus*. En el inóculo A, el preparado T1 que corresponde al control siempre se observa crecimiento de *S. aureus*, y a los 30 s de exposición en todos preparados hay crecimiento. A partir de la hora de exposición se puede observar inhibición de crecimiento en el preparado T4, mientras que en los preparados T2 y T3 se observa inhibición de crecimiento a partir de las 6 h de exposición. Para el caso del inóculo C se observa crecimiento a los 30 s para todos los preparados y comienza a observarse inhibición a partir de la hora de exposición.

Tabla 18. Medianas de la actividad microbicida de *S. aureus* por exposición continua a los diferentes preparados.

Inóculo	Tiempo	Preparados			
		T1	T2	T3	T4
A	30 s	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>
	1 h	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
	6 h	1 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
	24 h	1 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
C	30 s	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>
	1 h	1 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
	6 h	1 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
	24 h	1 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>

A =  $1.35 \times 10^8$  UFC/mL; C =  $1.35 \times 10^6$  UFC/MI

T1 = Aceite de girasol sin ozonizar; T2 Ungüento 43.8 % de aceite de girasol ozonizado 9 %, 5 % árnica y 5 % áloe vera; T3 = Gel de aceite de girasol ozonizado 5 %; T4 = Aceite de girasol ozonizado 9 %.

0 = No hay crecimiento de *S. aureus*; 1 = Hay crecimiento de *S. aureus*.

<sup>a-d</sup> Diferentes literales indican diferencia estadísticamente significativa ente preparados para cada inóculo de *S. aureus*. (P<0.05)

En la Tabla 19 se observa que hay 2 concentraciones diferentes de inóculo de *S. pseudintermedius*. En el inóculo A, el preparado T1 que corresponde al control siempre se observa crecimiento de *S. pseudintermedius*, a los 30 s de exposición y en todos preparados hay crecimiento. A partir de la hora de exposición se puede observar inhibición de crecimiento en los preparados T3 y T4, mientras que en el preparado T2 se observa inhibición de crecimiento a partir de las 6 h de exposición. Para el caso del inóculo C se observa crecimiento a los 30 s para todos los preparados y comienza a presentarse inhibición a partir de la hora de exposición.

Tabla 19. Medianas de la actividad microbicida de *S. pseudintermedius* por exposición continua a los diferentes preparados.

Inóculo	Tiempo	Preparados			
		T1	T2	T3	T4
A	30 s	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>
	1 h	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
	6 h	1 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
	24 h	1 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
C	30 s	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>
	1 h	1 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
	6 h	1 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
	24 h	1 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>

A = 1.06X10<sup>8</sup> UFC/mL; C = 1.06X10<sup>6</sup> UFC/mL

T1 = Aceite de girasol sin ozonizar; T2 Ungüento 43.8 % de aceite de girasol ozonizado 9 %, 5 % árnica y 5 % áloe vera; T3 = Gel de aceite de girasol ozonizado 5 %; T4 = Aceite de girasol ozonizado 9 %.

0 = No hay crecimiento de *S. pseudintermedius*; 1 = Hay crecimiento de *S. pseudintermedius*.

<sup>a-d</sup> Diferentes literales indican diferencia estadísticamente significativa ente preparados para cada inóculo de *S. pseudintermedius* (P<0.05)

En la Tabla 20 se observa que hay 2 concentraciones diferentes de inóculo de *E. coli*. En el inóculo A, el preparado T1 que corresponde al control siempre se observa crecimiento de *E. coli*, a los 30 s de exposición en todos preparados hay crecimiento. A partir de la hora de exposición se puede observar inhibición de crecimiento en el preparado T4, mientras que en los preparados T2 y T3 se observa inhibición de crecimiento a partir de las 6 h de exposición. Para el caso del inóculo

C se observa crecimiento a los 30 s para todos los preparados y comienza a observarse inhibición a partir de la hora de exposición.

Tabla 20. Medianas de la actividad microbicida de *E. coli* por exposición continua a los diferentes preparados.

Inóculo	Tiempo	Preparados			
		T1	T2	T3	T4
A	30 s	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>
	1 h	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
	6 h	1 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
	24 h	1 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
C	30 s	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>
	1 h	1 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
	6 h	1 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
	24 h	1 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>

A = 1.29X10<sup>8</sup> UFC/mL; C = 1.29X10<sup>6</sup> UFC/mL

T1 = Aceite de girasol sin ozonizar; T2 Ungüento 43.8 % de aceite de girasol ozonizado 9 %, 5 % árnica y 5 % áloe vera; T3 = Gel de aceite de girasol ozonizado 5 %; T4 = Aceite de girasol ozonizado 9 %.

0 = No hay crecimiento de *E. coli*; 1 = Hay crecimiento de *E. coli*.

<sup>a-d</sup> Diferentes literales indican diferencia estadísticamente significativa ente preparados para cada inóculo de *E. coli* (P<0.05)

En la Tabla 21 se observa que hay 2 concentraciones diferentes de inóculo de *C. albicans*. En el inóculo A, el preparado T1 que corresponde al control siempre hay crecimiento de *C. albicans*, a los 30 s de exposición en todos preparados hay crecimiento. A partir de la hora de exposición se puede observar inhibición de crecimiento con el preparado T4, mientras que en los preparados T2 y T3 se observa inhibición de crecimiento a partir de las 6 h de exposición. Para el caso del inóculo C se observa crecimiento a los 30 s para todos los preparados y comienza a presentarse inhibición a partir de la hora de exposición.

Tabla 21. Medianas de la actividad microbicida de *C. albicans* por exposición continua a los diferentes preparados.

Inóculo	Tiempo	Preparados			
		T1	T2	T3	T4
A	30 s	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>
	1 h	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
	6 h	1 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
	24 h	1 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
C	30 s	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>
	1 h	1 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
	6 h	1 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
	24 h	1 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>

A =  $6.16 \times 10^6$  UFC/mL; C =  $6.16 \times 10^4$  UFC/mL

T1 = Aceite de girasol sin ozonizar; T2 Ungüento 43. 8% de aceite de girasol ozonizado 9 %, 5 % árnica y 5 % áloe vera; T3 = Gel de aceite de girasol ozonizado 5 %; T4 = Aceite de girasol ozonizado 9 %.

0 = No hay crecimiento de *C. albicans*; 1 = Hay crecimiento de *C. albicans*.

<sup>a-d</sup> Diferentes literales indican diferencia estadísticamente significativa ente preparados para cada inóculo de *C. albicans* (P<0.05)

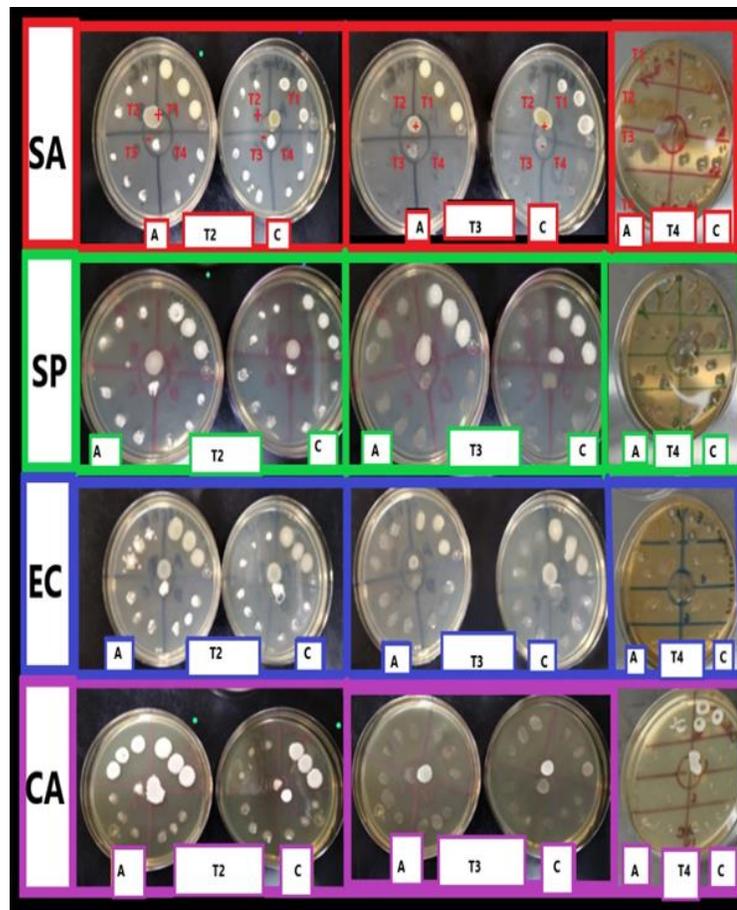


Figura 16. Inhibición del crecimiento antimicrobiano por tiempo de exposición a los 30 s, 1 h, 6 h y 24 h.

## 6.2. Evaluación de la cicatrización.

### 6.2.1 Tamaño de las heridas.

A continuación, se presenta el promedio y  $\pm 1$ DE del largo (Tabla 22) y ancho (Tabla 23) de las heridas correspondientes al día 0, 7 y 10. En la Figura 15 se muestra a través de fotografías la evolución de las heridas.

En la Tabla 22 se observa una reducción en cuanto al largo de las heridas con los diferentes preparados llegando a valores de 0 mm en los preparados T3 y T4 a partir del día 7. En el día 0 en todos los tratamientos no se presentó diferencia estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ ). Al día 7 en el preparado T2 se puede observar que hay diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) con respecto a los otros tratamientos, sin embargo, hay que resaltar que para el día 7 en el preparado T4 se registraron valores de 0 mm. Finalmente, para el día 10 entre todos los tratamientos no se presenta diferencia estadísticamente significativa aun cuando no en todos los casos se registran 0 mm ( $P > 0.05$ ).

Tabla 22. Promedios y  $\pm 1$ DE del largo (mm) de las heridas.

Día	Preparados			
	T1	T2	T3	T4
<b>Día 0</b>	44.98 $\pm$ 27.28 <sup>a</sup>	46.31 $\pm$ 14.21 <sup>a</sup>	44.65 $\pm$ 10.74 <sup>a</sup>	29.32 $\pm$ 17.86 <sup>a</sup>
<b>Día 7</b>	6.95 $\pm$ 5.66 <sup>a</sup>	35.18 $\pm$ 14.18 <sup>b</sup>	12.26 $\pm$ 16.49 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
<b>Día 10</b>	2.97 $\pm$ 4.19 <sup>a</sup>	2.7 $\pm$ 4.35 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>

Día 0= Día que se llevó a cabo la cirugía; Día 7 =Día 7 posterior a la cirugía; Día 10= Día 10 posterior a la cirugía  
T1 = No se colocó ningún tratamiento tópico; T2 = Ungüento 43.8 % de aceite de girasol ozonizado 9 %, 5 % árnica y 5 % áloe vera; T3 = gel de aceite de girasol ozonizado 5 %; T4 = aceite de girasol ozonizado 9 %.  
<sup>a-b</sup> Diferentes literales indican diferencia estadísticamente significativa entre preparados para cada día evaluado.  $P < 0.05$ .

En la Tabla 23 se observa la reducción del ancho de las heridas con los diferentes preparados llegando a valores de 0 mm en los tratamientos T3 y T4 a partir del día

7. En los días 0 y 7 no se presentó diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos T1, T2 y T3 ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, en el día 7 ya se presentaba diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) para T4 con un registro de 0 mm con respecto a T1 y T2, aunque no presentó diferencia estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ ) con T3. Finalmente, para el día 10, todos los tratamientos no presentaron diferencia estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ ), aunque únicamente en T3 y T4 todos los registros fueron de 0 mm.

Tabla 23. Promedios y  $\pm 1$ DE del ancho (mm) de las heridas

Día	Preparados			
	T1	T2	T3	T4
<b>Día 0</b>	6.72 $\pm$ 11.22 <sup>a</sup>	7.25 $\pm$ 2.92 <sup>a</sup>	5.97 $\pm$ 1.69 <sup>a</sup>	6.21 $\pm$ 1.05 <sup>a</sup>
<b>Día 7</b>	5.13 $\pm$ 0.77 <sup>a</sup>	4.88 $\pm$ 3.13 <sup>a</sup>	2.78 $\pm$ 2.24 <sup>ab</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>
<b>Día 10</b>	1.05 $\pm$ 2.36 <sup>a</sup>	1.18 $\pm$ 1.18 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>

Día 0= Día que se llevó a cabo la cirugía; Día 7 =Día 7 posterior a la cirugía; Día 10= Día 10 posterior a la cirugía  
T1 = No se colocó ningún tratamiento tópico; T2 Ungüento 43.8 % de aceite de girasol ozonizado 9 %, 5 % árnica y 5 % aloe vera; T3 = gel de aceite de girasol ozonizado 5 %; T4 = aceite de girasol ozonizado 9 %.  
<sup>a-c</sup> Diferentes literales indican diferencia estadísticamente significativa entre preparados para cada día evaluado.  $P < 0.05$ .

### 6.2.2 Comparación de bordes de las heridas.

En la tabla 24 se registraron los puntajes asignados de acuerdo con la escala utilizada para la evaluación de los bordes de las heridas. En el día 0 en todos los grupos los bordes son delimitados obteniéndose un puntaje de 3, para el día 7 se ve una disminución de la presencia de los bordes de las heridas presentándose como difusas obteniendo un puntaje de 2, y tampoco se observó una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre los grupos, finalmente para el día 10 no se presentó diferencia estadísticamente significativa entre los puntajes de los grupos, aunque se observaron resultados similares entre los grupos T1 con T4 en casos

donde los bordes están ausentes obteniendo puntajes de 1 y T2 con T3 en los cuales los bordes siguen estando presentes pero difusos con puntajes de 2.

Tabla 24. Medianas del puntaje de los bordes en los días 0, 7 y 10 para cada preparado.

Día	Preparados			
	T1	T2	T3	T4
<b>Día 0</b>	3 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>
<b>Día 7</b>	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>
<b>Día 10</b>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>

Día 0= Día que se llevó a cabo la cirugía; Día 7 =Día 7 posterior a la cirugía; Día 10= Día 10 posterior a la cirugía

T1 = No se colocó ningún tratamiento tópico; T2 Ungüento 43.8 % de aceite de girasol ozonizado 9 %, 5 % árnica y 5 % aloe vera; T3 = gel de aceite de girasol ozonizado 5 %; T4 = aceite de girasol ozonizado 9 %.

Escala: 1=No hay bordes; 2= Bordes difusos; 3= Bordes delimitados; 4= Bordes engrosados

<sup>a-c</sup> Diferentes literales indican diferencia estadísticamente significativa entre preparados para cada día evaluado. P < 0.05.

### 6.2.3 Respuesta inflamatoria.

En las siguientes tablas se registraron los puntajes relacionados con la respuesta inflamatoria, las cuales fueron; vascularidad (Tabla 25), exudado (Tabla 26), eritema (Tabla 27) y temperatura (Tabla 28) correspondientes a los días 0, 7 y 10.

En la Tabla 25 se puede observar la evolución en cuanto a la vascularidad de las heridas, en donde se puede apreciar que en todos los tratamientos hay una disminución en cuanto a la coloración de la piel alrededor de la herida conforme pasaron los días obteniendo un puntaje de 1 para el día 10. Cabe resaltar que en el grupo T3 para el día 7 hay una diferencia estadísticamente significativa (P < 0.05) con respecto a los grupos T1 y T4, en los cuales la piel ya tiene una vascularidad

normal a diferencia de los demás grupos obteniendo un puntaje de 1. Para el día 10 no se presentó diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) entre los grupos.

Tabla 25. Medianas del puntaje de la vascularidad de las heridas en los días 0,7 y 10 para cada preparado.

Día	Preparados			
	T1	T2	T3	T4
<b>Día 0</b>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>
<b>Día 7</b>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>ab</sup>	2 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup>
<b>Día 10</b>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>

Día 0= Día que se llevó a cabo la cirugía; Día 7 =Día 7 posterior a la cirugía; Día 10= Día 10 posterior a la cirugía

T1 = No se colocó ningún tratamiento tópico; T2= Ungüento 43.8 % de aceite de girasol ozonizado 9 %, 5 % árnica y 5 % áloe vera; T3 = gel de aceite de girasol ozonizado 5 %; T4 = aceite de girasol ozonizado 9 %.

Escala: 1= Normal; 2= Rosa; 3= Rojo; 4= Morado

<sup>a-c</sup> Diferentes literales indican diferencia estadísticamente significativa entre preparados para cada día evaluado.  $P < 0.05$ .

En la Tabla 26 se observa la mediana del puntaje obtenido de la presencia y tipo de exudado durante la aplicación de los preparados en los días 0, 7 y 10. En general se observa como el exudado pasa de hemorrágico en el día 0 con un puntaje de 5 hasta que no existe presencia de exudado para el día 10 con un puntaje de 1, cabe resaltar que en el grupo T4 en el día 7 ya no hay presencia de exudado obteniendo un puntaje de 1 y es el unico caso en donde se presenta una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) con respecto a los demas grupos.

Tabla 26. Medianas del puntaje de exudado presente en las heridas en los días 0,7 y 10 para cada preparado.

Día	Preparados			
	T1	T2	T3	T4
<b>Día 0</b>	5 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>
<b>Día 7</b>	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	1 <sup>b</sup>
<b>Día 10</b>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>

Día 0= Día que se llevó a cabo la cirugía; Día 7 =Día 7 posterior a la cirugía; Día 10= Día 10 posterior a la cirugía

T1 = No se colocó ningún tratamiento tópico; T2 = Ungüento 43.8 % de aceite de girasol ozonizado 9 %, 5 % árnica y 5 % áloe vera; T3 = gel de aceite de girasol ozonizado 5 %; T4 = aceite de girasol ozonizado 9 %.

Escala: 1= No hay exudado; 2= Seroso; 3 = Fibroso 4= Purulento; 5= Hemorrágico

<sup>a-c</sup> Diferentes literales indican diferencia estadísticamente significativa entre preparados para cada día evaluado.  $P < 0.05$ .

En la Tabla 27 se muestran las medianas de las puntuaciones asignadas en los diferentes grupos. En el día 0, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $P > 0.05$ ) siendo que, las puntuaciones que más se asignaron fueron de 2 y 3, que corresponden a la presencia de eritema mínimo y eritema moderado. En el día 7, en todos los grupos se observó una disminución de la presencia de eritema a excepción del grupo T3 que, al contrario, presentó un aumento obteniendo una puntuación de 3, presentando una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) con el resto de los grupos. Finalmente, para el día 10 en todos los grupos a excepción del T3 ya no se observó presencia de eritema en las heridas obteniendo puntuaciones de 1, aunque a pesar de esto, no presentó diferencia estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ ).

Tabla 27. Medianas de la puntuación del eritema de las heridas en los días 0,7 y 10 para cada preparado.

Día	Preparados			
	T1	T2	T3	T4
<b>Día 0</b>	3 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a*</sup>
<b>Día 7</b>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>ab</sup>	3 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup>
<b>Día 10</b>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>

Día 0= Día que se llevó a cabo la cirugía; Día 7 =Día 7 posterior a la cirugía; Día 10= Día 10 posterior a la cirugía  
T1 = No se colocó ningún tratamiento tópico; T2 = Ungüento 43.8 % de aceite de girasol ozonizado 9 %, 5 % árnica y 5 % áloe vera; T3 = gel de aceite de girasol ozonizado 5 %; T4 = aceite de girasol ozonizado 9 %.  
Escala: 1= No hay eritema; 2= Mínimo; 3= Moderado; 5= Severo  
<sup>a-c</sup> Diferentes literales indican diferencia estadísticamente significativa entre preparados para cada día evaluado.  $P < 0.05$ .

En la Tabla 28 se puede observar el resultado de la temperatura registrada en los diferentes días por cada tratamiento, siendo el día 0 en el que se registraron las temperaturas más bajas. En cada uno de los días se muestra que los preparados no tienen una diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ) entre ellos.

Tabla 28. Promedios y  $\pm 1$ DE de la temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) de las heridas.

Día	Preparados			
	T1	T2	T3	T4
<b>Día 0</b>	35.06 $\pm$ 1.74 <sup>a</sup>	32.65 $\pm$ 1.27 <sup>a</sup>	34.21 $\pm$ 2.15 <sup>a</sup>	34.48 $\pm$ 0.54 <sup>a</sup>
<b>Día 7</b>	37.94 $\pm$ 1.13 <sup>a</sup>	37.63 $\pm$ 0.62 <sup>a</sup>	37.1 $\pm$ 0.82 <sup>a</sup>	37.9 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>
<b>Día 10</b>	37.44 $\pm$ 1.16 <sup>a</sup>	37.85 $\pm$ 0.69 <sup>a</sup>	37.11 $\pm$ 0.98 <sup>a</sup>	37.76 $\pm$ 0.77 <sup>a</sup>

Día 0= Día que se llevó a cabo la cirugía; Día 7 =Día 7 posterior a la cirugía; Día 10= Día 10 posterior a la cirugía

T1 = No se colocó ningún tratamiento tópico; T2 = Ungüento 43.8 % de aceite de girasol ozonizado 9 %, 5 % árnica y 5 % áloe vera; T3 = gel de aceite de girasol ozonizado 5 %; T4 = aceite de girasol ozonizado 9 %.

<sup>a</sup> Diferentes literales indican diferencia estadísticamente significativa entre preparados para cada día evaluado. P < 0.05.

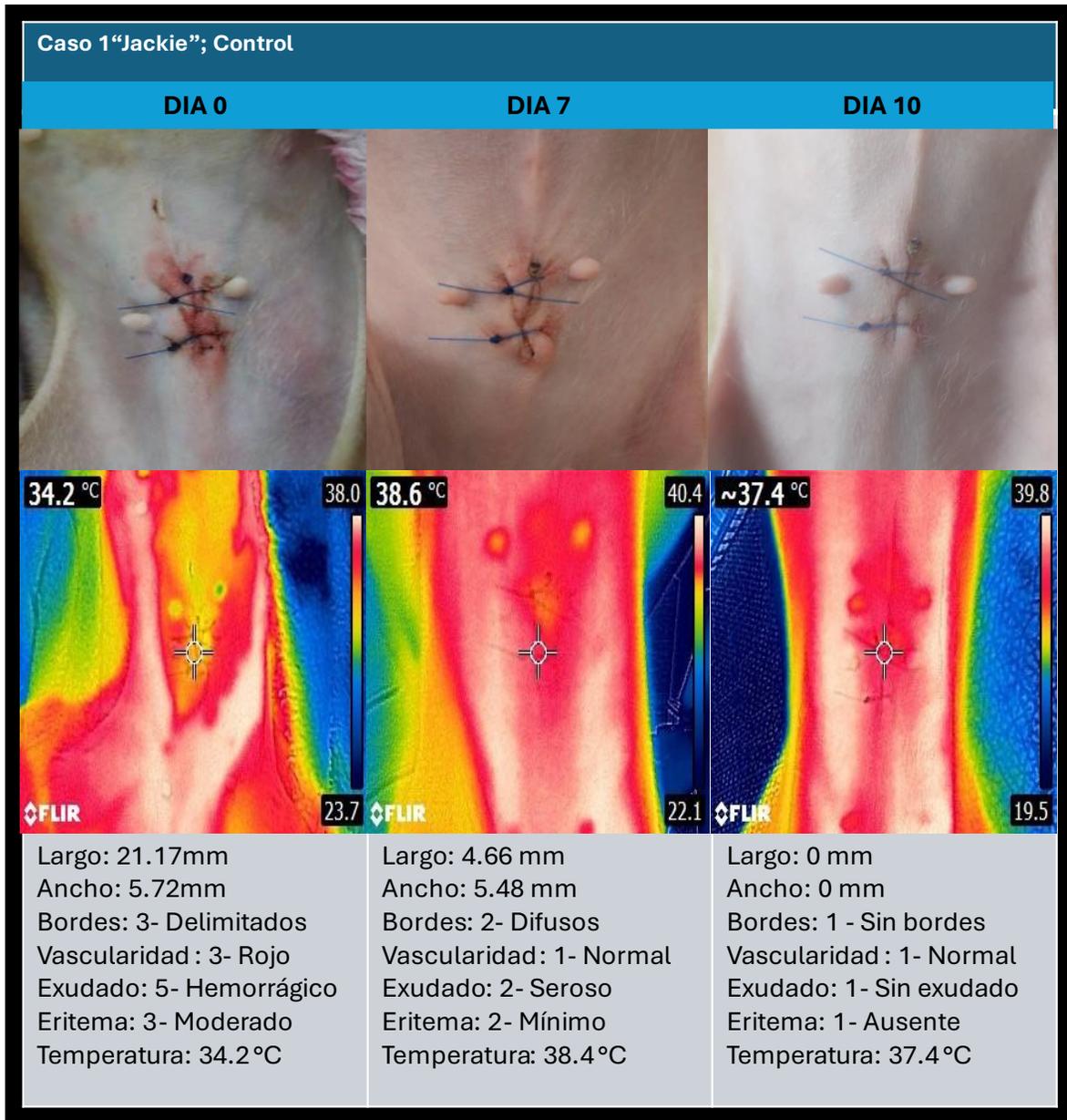


Figura 17. Evaluación de la cicatrización del control (T1).

Se puede observar de izquierda a derecha como evoluciona la herida desde el día 0 hasta el día 10 de uno de los casos que fue evaluado como grupo control el cual no tuvo ningún tipo de preparado (T1). Se obtuvieron las medidas en mm de largos, anchos en donde se ve una reducción. También se observan los cambios en cuanto a las características de los bordes, vascularidad, exudado, eritema y registro de la temperatura.



Figura 18. Evaluación de la cicatrización del preparado T2.

Se puede observar de izquierda a derecha como evoluciona la herida desde el día 0 hasta el día 10 de uno de los casos que fue evaluado como grupo T2. Se obtuvieron las medidas en mm del largo y ancho en donde se ve una reducción. También se observan los cambios en cuanto a las características de los bordes, vascularidad, exudado, eritema y registro de la temperatura.

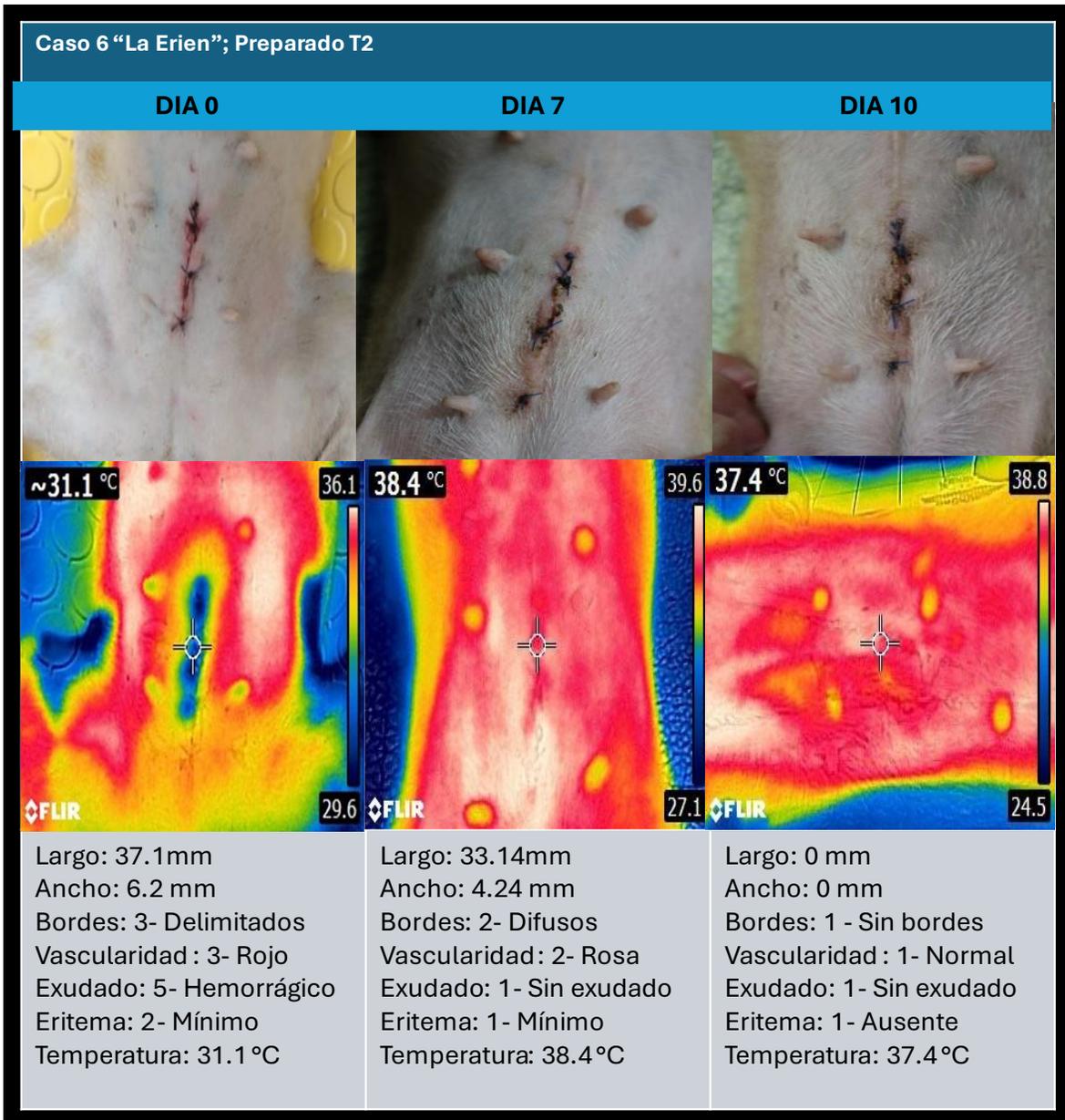


Figura 19. Evaluación de la cicatrización del preparado T2.

Se puede observar de izquierda a derecha como evoluciona la herida desde el día 0 hasta el día 10 de uno de los casos que fue evaluado como grupo T2. Se obtuvieron las medidas en mm del largo y ancho en donde se ve una reducción. También se observan los cambios en cuanto a las características de los bordes, vascularidad, exudado, eritema y registro de la temperatura.

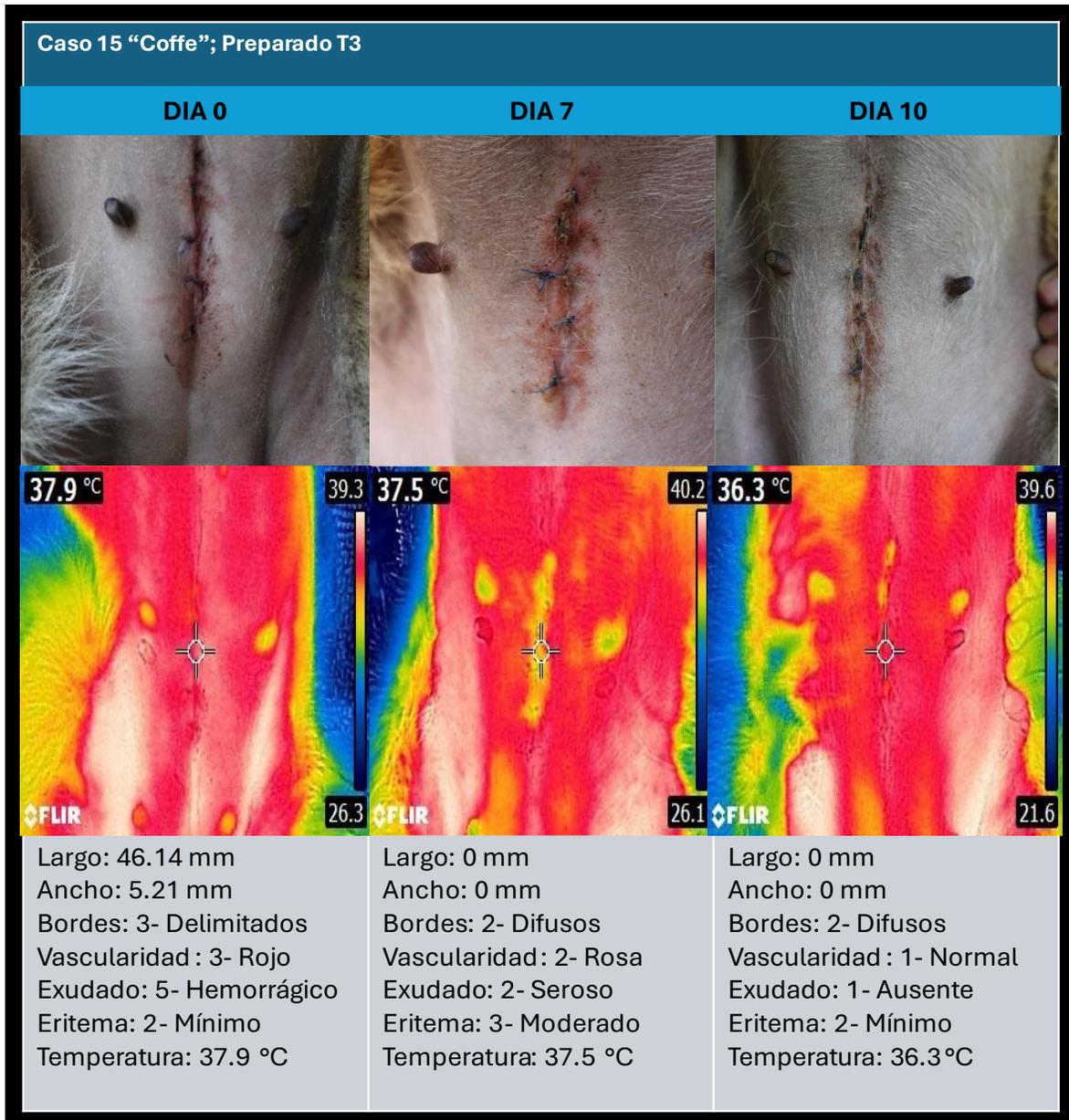


Figura 20. Evaluación de la cicatrización del preparado T3.

Se puede observar de izquierda a derecha como evoluciona la herida desde el día 0 hasta el día 10 de uno de los casos que fue evaluado como grupo T3. Se obtuvieron las medidas en mm del largo y ancho en donde se ve una reducción. También se observan los cambios en cuanto a las características de los bordes, vascularidad, exudado, eritema y registro de la temperatura

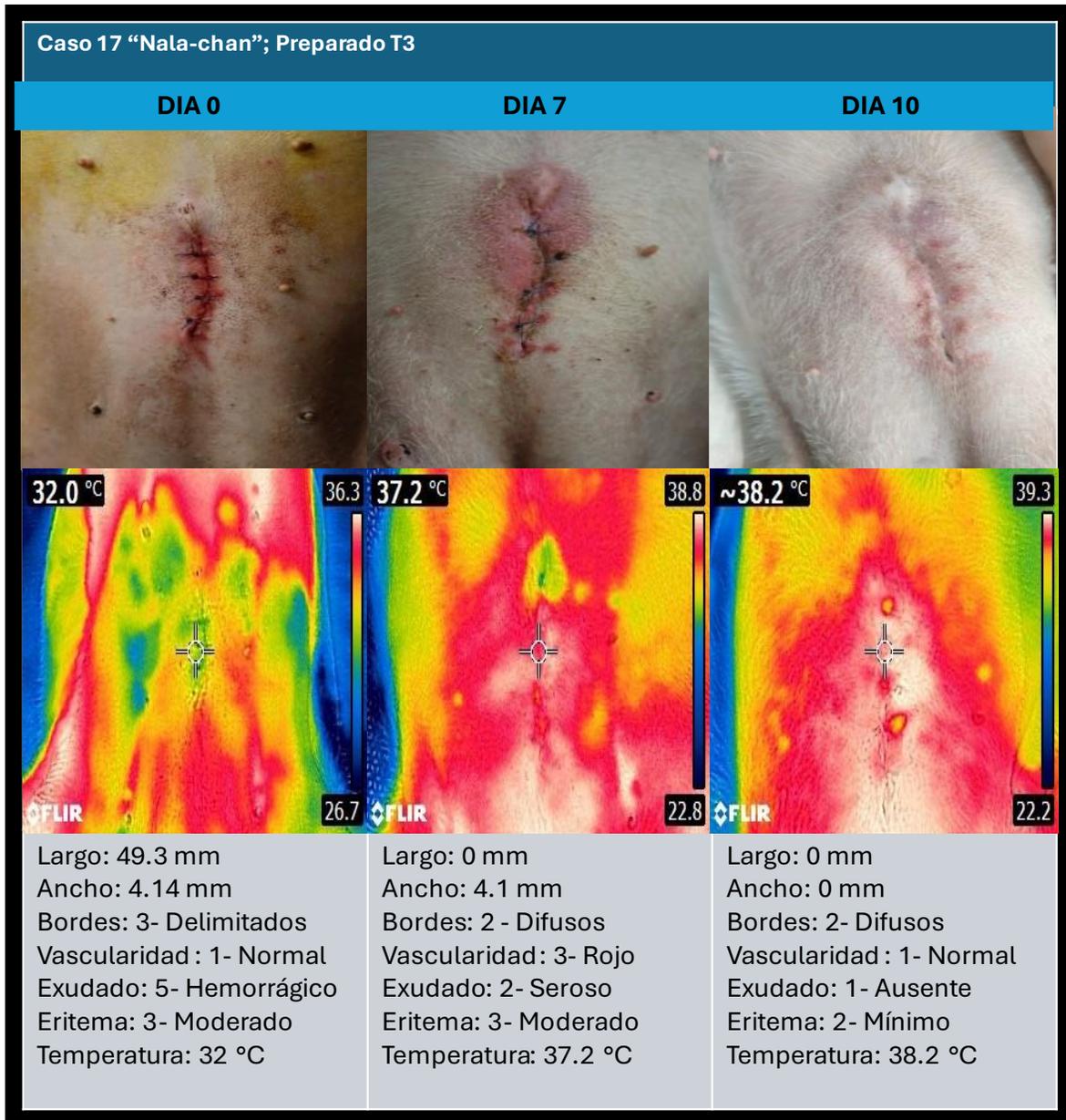


Figura 21. Evaluación de la cicatrización del preparado T3.

Se puede observar de izquierda a derecha como evoluciona la herida desde el día 0 hasta el día 10 de uno de los casos que fue evaluado como grupo T3. Se obtuvieron las medidas en mm del largo y ancho en donde se ve una reducción. En el día 7, en este caso se presentó una reacción alérgica la sutura, aun con esto la evolución de la herida fue favorable, ya que para el día 10 se observaron puntuaciones menores en cuanto a las características de los bordes, vascularidad, exudado y eritema.



Figura 22. Evaluación de la cicatrización del preparado T4.

Se puede observar de izquierda a derecha como evoluciona la herida desde el día 0 hasta el día 10 de uno de los casos que fue evaluado como grupo T4. Se obtuvieron las medidas en mm del largo y ancho en donde se ve una reducción. También se observan los cambios en cuanto a las características de los bordes, vascularidad, exudado, eritema y registro la temperatura

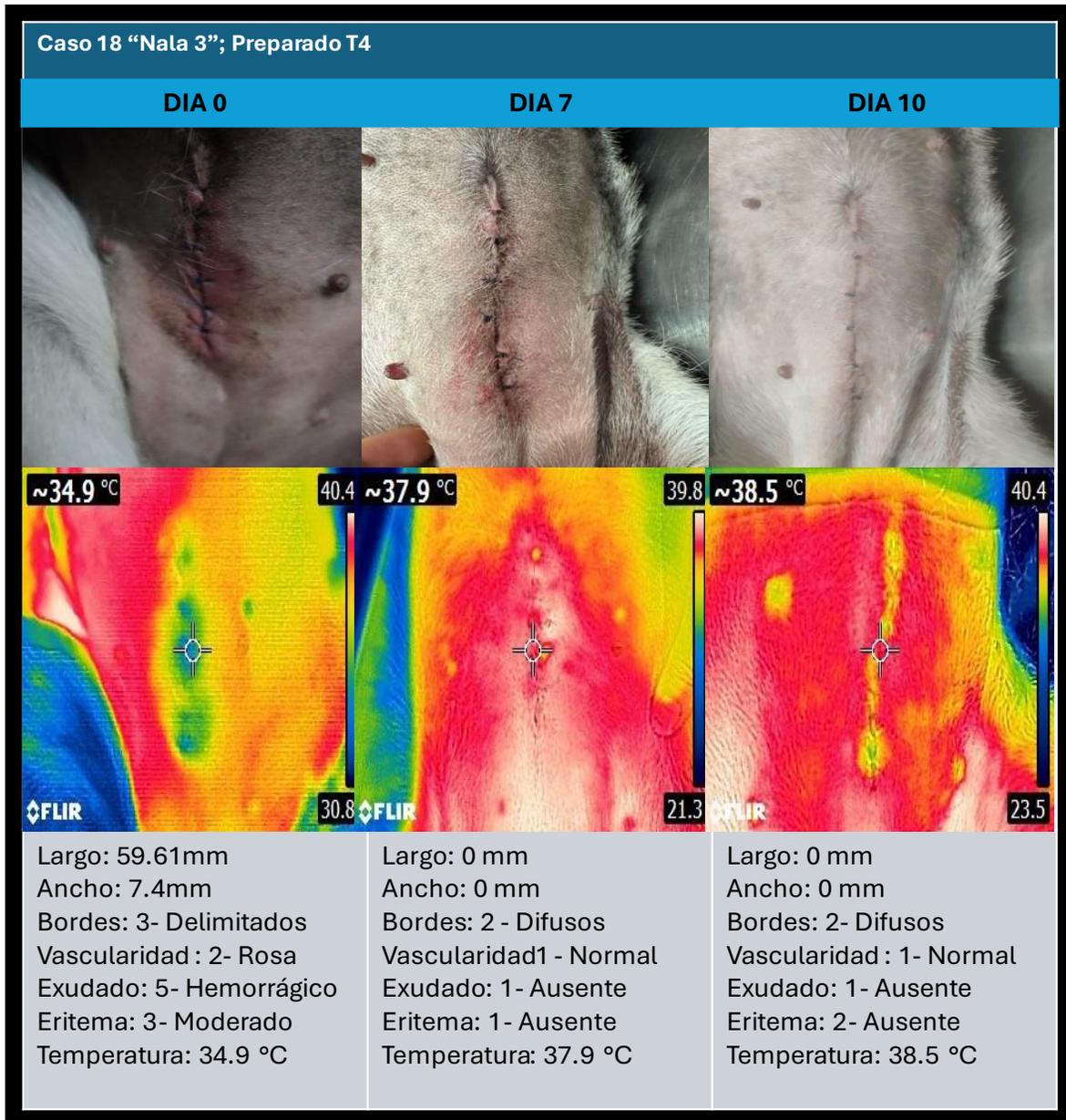


Figura 23. Evaluación de la cicatrización del preparado T4.

Se puede observar de izquierda a derecha como evoluciona la herida desde el día 0 hasta el día 10 de uno de los casos que fue evaluado como grupo T4. Se obtuvieron las medidas en mm del largo y ancho en donde se ve una reducción. También se observan los cambios en cuanto a las características de los bordes, vascularidad, exudado, eritema y registro la temperatura

## 7. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue la evaluación de diferentes preparados a base de aceite de girasol ozonizado para determinar su actividad microbicida *in vitro* y cicatrizante *in vivo*, para lo cual se realizaron diferentes evaluaciones, ya que la literatura menciona que dichos aceites presentan propiedades antimicrobianas y cicatrizantes, sin embargo, no se ha establecido una concentración de ozono o sus derivados que pueda ser aplicada por vía tópica en perros (16,17).

Inicialmente se realizó la determinación de zonas de inhibición de crecimiento antimicrobiano por difusión en agar a las 24 h, el objetivo de esto fue demostrar si se presenta inhibición del crecimiento microbiano, tal como se menciona en la literatura para diferentes preparados a base de aceites ozonizados, y en caso de presentar inhibición, poder determinar la susceptibilidad a los preparados y si en estos hay diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) (16,17,53). En el caso de *S. aureus*, *S. pseudintermedius* y *C. albicans* se pudo observar que hay presencia de zonas de inhibición total del crecimiento a la exposición de todos los preparados (T2 – T4), excepto en el control sin ozono (T1), cabe destacar que en donde se observaron las zonas de inhibición de mayor tamaño fue en el preparado T4 que contine el mayor porcentaje de DO, similar a lo reportado en otros estudios que demostraron eficacia inhibitoria de aceites ozonizados para el caso de los microorganismos antes mencionados, por otra parte, *E. coli* fue el único microorganismo para el cual no se observaron zonas de inhibición de crecimiento, en otros estudios si se ha reportado eficacia contra *E. coli* cuando se somete a ozono en gas o aceites, y esta disparidad de los resultados obtenidos con respecto

a lo reportado con la literatura se puede relacionar a las diferencias de las metodologías aplicadas, ya que en algunos casos se utilizaron materiales que permitían una mejor difusión en el agar o diferentes concentraciones de microorganismos, por mencionar algunos (34,54).

En cuanto a la determinación de la CMI para *S. aureus*, *S. pseudintermedius* y *E. coli*, estas no se pudieron determinar a los 30 s de exposición, el único microorganismo para el cual se determinó la CMI a los 30 s de exposición al preparado T4 fue *C. albicans*, siendo de 90,000 µgDO/mL, por lo que los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con otras referencias en las que se reporta eficacia de los aceites ozonizado contra *C. albicans*, en un estudio se menciona que se requiere de al menos 250 mg O<sub>3</sub>/g de aceite, lo que equivale a una ozonización de aceite del 25 % para inhibir el crecimiento de *C. albicans*, sin embargo, con el preparado utilizado en T4 con 9% de ozono se presentó inhibición del crecimiento de *C. albicans* (19).

La determinación de CMI a las 24 h de exposición a los preparados para los diferentes microorganismos, se realizó con la finalidad de determinar si el tiempo de exposición podría ser un factor para la presentación del efecto inhibitorio, siendo este factor previamente reportado en otros estudios en los que mencionan eficacia antimicrobiana después de horas e incluso días de exposición. En un estudio se observó inhibición del 99.10% del crecimiento microbiano de *C. albicans*, *S. aureus* y *E. coli* a los 14 días y que se mantuvo por 28 días cumpliendo con los estándares de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), sin embargo, en este estudio se requirió de un menor tiempo de exposición para presentar una inhibición similar (53).

Tal como se observó en este estudio, el tiempo de exposición si fue un factor determinante para la actividad antimicrobiana de los preparados evaluados, además de la concentración de DO, siendo el T4 con 9% de ozono el único que presentó la inhibición a los 30 s y el que presentó la mayor inhibición a las 24h.

En este estudio se incrementó el tiempo de exposición para determinar la CMI, para *S. aureus* la CMI a las 24 h de exposición con un inóculo de  $1.35 \times 10^8$  UFC/mL expuesto al preparado T2 fue de 2,463.7  $\mu\text{gDO/mL}$ ; para T3 se determinó en 3,125  $\mu\text{gDO/mL}$  y para T4 fue de 5,625  $\mu\text{gDO/mL}$ . Para *S. pseudintermedius* se determinó que con un inóculo de  $1.06 \times 10^8$  UFC/mL para el preparado T2 la CMI fue de 9,855  $\mu\text{gDO/mL}$ ; para T3 se estableció en 3,125  $\mu\text{gDO/mL}$ ; y para T4 de 5,625  $\mu\text{gDO/mL}$ . En el caso de *E. coli* en un inóculo de  $1.29 \times 10^8$ , para T2 no se pudo determinar; para T3 se determinó en 25,000  $\mu\text{gDO/mL}$ ; para T4 de 22,500  $\mu\text{gDO/mL}$  y finalmente con inóculo de *C. albicans* de  $6.16 \times 10^6$  UFC la CMI para T2 fue de 9,855  $\mu\text{gDO/mL}$ ; para T3 se estableció en 1,562.5  $\mu\text{gDO/mL}$ ; y para T4 fue de 2,817  $\mu\text{gDO/mL}$ . Debido a lo anterior, se puede considerar una diferencia del efecto inhibitorio del crecimiento de los diferentes microorganismos expuestos a los preparados, y este efecto dependerá del tiempo de exposición a los principios activos en este caso los derivados del ozono, tal como se ha visto con la actividad antimicrobiana de otros fármacos como los betalactámicos, macrólidos y tetraciclinas que se han clasificado como tiempo dependientes (55) .El que los preparados a base de aceite de girasol ozonizado presenten un efecto dependiente del tiempo, también se observó al realizar la evaluación de la actividad microbicida en la que los microorganismos se expusieron a los preparados en diferentes tiempos,

en este caso se observó que en diferentes inóculos de *S. aureus* ( $1.35 \times 10^8$  y  $1.35 \times 10^6$  UFC/mL) así como en inóculos de *E. coli* ( $1.29 \times 10^8$  y  $1.29 \times 10^6$  UFC/mL) para los preparados T2 y T3 se necesitaron al menos 6 h de exposición para presentar su actividad microbicida, mientras que para T4 con mayor concentración de DO solo se necesitó de 1 h. Para el inóculo de *S. pseudintermedius* ( $1.06 \times 10^8$  y  $1.06 \times 10^6$ ) el de *C. albicans* ( $6.16 \times 10^6$  y  $6.16 \times 10^4$  UFC/mL) al exponerlos al preparado T2 se necesitó de 6 h para presentar la actividad microbicida, mientras que para T3 y T4 se requirió de 1 h. Cabe resaltar, que en al inicio de este estudio se esperaba que en *C. albicans* no se presentara crecimiento a los 30 s de exposición como había sucedido con el resto de los microorganismos, sin embargo, la determinación de la CMI si se pudo realizar a los 30 s y a las 24 h, así como con los diferentes inóculos del microorganismo.

Existe información publicada acerca de la actividad antimicrobiana de diferentes preparados a base de aceite ozonizado, y por ello también rangos muy variables en cuanto a las CMI reportadas en la literatura, en general se observó que esta variabilidad se puede relacionar con las diferencias en las formas farmacéuticas, las concentraciones de derivados de ozono presentes en los preparados, así como en las cepas y concentraciones de microorganismos evaluados, por ejemplo, no se ha reportado diferencia entre la eficacia inhibitoria contra bacterias Gram positivas o Gram negativas, ya que para hacerlo otros autores mencionan que hay que retomar muchos más datos de la actividad antimicrobiana por las características propias de las bacterias (20). En este trabajo se observó que si hay una mayor eficacia en la inhibición de *S. aureus* y *S. pseudintermedius* cuando son expuestos

a concentraciones altas de derivados de ozono presentes en los preparados ante la misma cantidad de microorganismos expuestos y que esta eficacia puede incrementar con el tiempo de exposición, a diferencia de *E. coli*, en la que se presentó baja o casi nula actividad sin importar la concentración, aunque si con el tiempo de exposición. Se ha reportado que bacterias Gram positivas como *S. aureus* presentan una CMI de 2,350 – 50,000 µgDO/mL y *S. pseudintermedius* una CMI de 74,600 – 250,000 µgDO/mL, y en Gram negativas como *E. coli* una CMI de 1,800 - 250,000 µgDO/mL, estas diferencias en la CMI pueden estar relacionadas con la cantidad y variedad de derivados de ozono presentes en los preparados, los cuales pueden ser cetonas, aldehídos, peróxidos y radicales que varían dependiendo de condiciones como la calidad del aceite, método de obtención del ozono, exposición del aceite al ozono y almacenamiento de los preparados, entre otros, por lo que la CMI obtenidas en este trabajo son diferentes a la mencionadas en literatura, pero si se obtuvo el efecto antimicrobiano reportado (19,20,34,53). Para *C. albicans* también existe disparidad en la literatura en cuanto a la susceptibilidad del microorganismo a los preparados a base de aceite ozonizado, ya que mencionan CMI de 50,000 – 250, 000 µgDO /mL lo que puede atribuirse a las mismas razones ya antes mencionadas. En este trabajo, para *C. albicans* se observó inhibición de su crecimiento con los preparados T2, T3 y T4 a los 30 s y a las 24 h de exposición, siendo T4 el preparado que presentó mayor actividad a los 30 s de exposición, y se determinó una CMI de 90,000 µgDO/mL a los 30s de exposición y una CMI de 2,817 µgDO/mL a las 24 h de exposición (53).

De acuerdo con los resultados de este estudio y la información reportada en la literatura, podemos considerar que los preparados a base de aceite ozonizado evaluados en este trabajo fueron eficaces al inhibir el crecimiento de *S. aureus*, *S. pseudointermedius*, *E. coli* y *C. albicans*, siendo T4 el que mejores resultados presentó en las diferentes evaluaciones *in vitro* contra estos microorganismos. Sin embargo, como ya se mencionó el tiempo de exposición a los preparados también juega un papel importante para la inhibición del crecimiento y actividad microbicida, aún para T4.

En las pruebas *in vitro* realizadas, el preparado T4 presentó diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) en la mayoría de las pruebas realizadas, siendo este el que contenía el mayor porcentaje de ozonización siendo de un 9%. La literatura menciona que la relación del grado de ozonización de los aceites está ligado directamente a su eficacia antimicrobiana, esto es debido a la formación de los compuestos relacionados a la actividad del ozono sobre los ácidos grasos insaturados y no directamente de la presencia de ozono en los compuestos y como ya se mencionó anteriormente algunos trabajos incluyen la medición de la cantidad de dichos compuestos como índices de viscosidad, índices de peróxido, índice de yodo e índice de acidez, por lo que es difícil hacer una comparación directa entre las características de los preparados de este estudio y otros reportados en la literatura, razón por la cual es importante la evaluación de cada producto antes de su aplicación terapéutica (16,20,53).

Aunque se espera que en los preparados con mayor grado de ozonización se obtengan mejores resultados, en este estudio entre los preparados T2 y T3 se

observaron diferencias, a pesar de que T3 solo contenía 5% de ozonización, en la diferentes pruebas presentó mejores resultados que T2 el cual contenía 9% de ozonización, esto posiblemente se debe a que T2 también contenía otros ingredientes además del aceite de girasol ozonizado, presentando la siguiente formulación: 43.8% de aceite de girasol ozonizado al 9 %, de árnica 5 % y áloe vera 5 %, por lo que no se presentó ninguna ventaja con la inclusión de estos ingredientes y por el contrario se presentó una disminución en la eficacia de T2, el cual a pesar de tener el mismo porcentaje de ozonización que T4 no obtuvo resultados similares.

Otro objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de los preparados a base de aceite ozonizado sobre la cicatrización, esto se realizó en heridas postquirúrgicas en perras clínicamente sanas, sometidas a un procedimiento de esterilización (OSH), administrando el tratamiento por 10 días. Todos los procedimientos y revisiones se llevaron a cabo dentro de las instalaciones de la Clínica de Reproducción Canina de la FMVZ- UNAM, en donde los médicos encargados realizaron dichos procedimientos, procurando así que las técnicas quirúrgicas y material no fueran un factor que interviniera en los parámetros a evaluar. Inicialmente se registraron las mediciones y características de las heridas de todos los pacientes al finalizar el procedimiento de OSH (día 0). Los rangos de tamaño del largo de las heridas registrados fueron de 13.65 – 76.5 mm, el rango del ancho fue de 4.14 – 7.9 mm, la mayoría de los bordes se observaron delimitados, la vascularidad inicial se encontraba aumentada presentando un enrojecimiento de la piel en la mayoría de los casos, el exudado en todos los casos se presentó exudado hemorrágico, e incluso se presentó un caso el que la herida fue realizada sobre

tejido de cicatrización debido a un procedimiento realizado con anterioridad por lo que los bordes iniciales ya se encontraban engrosados y no se presentó diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) entre los grupos en todos los parámetros mencionados a comparar en el día 0. En cuanto a la temperatura, en todos los pacientes se registró un valor menor en comparación al día 7 y 10, esto se puede atribuir al manejo del tejido y a su exposición al ambiente externo durante el procedimiento de OSH. Es por lo anterior, que podemos considerar que, debido a la aleatoriedad en la selección de los casos y técnicas quirúrgicas empleadas, se contribuyó a que los preparados fueran evaluados bajo las condiciones más controladas posibles.

Para el día 7, se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos. En cuanto al largo de las heridas en todos los grupos se observó una disminución, sin embargo, en el grupo de T2 el promedio del largo de las heridas se registró el mayor tamaño de todos los grupos, el cual fue de 35.18 mm, por otro lado, en el grupo de T4 se registraron valores de 0 mm desde este día y hasta el final del estudio. En comparación con el grupo control (T1) en el que el promedio de la longitud fue de 6.95 mm, en el grupo T2 el largo de las heridas presentó una mayor longitud para el día 7, ya en el día 10 las heridas en la mayoría de los casos se encontraban sin bordes, en los grupos T2 y T3 aún se presentaron casos en donde las heridas se observaron con bordes, por otra parte, al día 7 el preparado aplicado en T2 presentó una menor eficacia en comparación al control (T1), lo cual se considera un resultado inesperado, ya que los trabajos relacionados a la descripción de las propiedades del aceite de girasol ozonizado, mencionan que este

presenta una buena eficacia para los procesos de cicatrización, además de que esté preparado también contenía otros ingredientes que se han reportado con actividad antiinflamatoria o cicatrizante como el árnica y aloe vera (56,57). Cabe la posibilidad, que la eficacia de los ingredientes presentes en el preparado disminuyera debido a una posible saturación de ozono en los principios activos o a la diferencia en la elaboración de los preparados, en un trabajo realizado en ratas donde se aplicó aceite de aloe vera ozonizado se evaluó el efecto cicatrizante de estos principios activos, reportando un mayor conteo de macrófagos y longitud de epitelización, esto es importante de señalar debido a que en el mercado existen algunos preparados con principios activos en combinación con aceites ozonizados y cada combinación debe ser evaluada para garantizar la eficacia esperada (58).

En cuanto a la medición del ancho, si bien se registra una disminución en todos los grupos al día 7, no se presenta diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) entre los grupos T2 y T3 con respecto T1, por otro lado, en T4, para el largo y ancho ya se registraban valores de 0 mm desde el día 7 hasta el final del estudio, lo que podría indicar que con una mayor cantidad de ozonización en el preparado se puede favorecer la cicatrización, tal como se ha mencionado en otros estudios en cuanto a la actividad de los aceites ozonizados, como se reportó en un trabajo en el que se aplicó un tratamiento similar en heridas de gatas sometidas a una OSH electiva, y en sus resultados se observó una reducción de la cicatriz con el uso de aceite ozonizado y lo compararon con el uso de aceite sin ozonizar y SSF 0.9%, tal como en este estudio, con la aplicación del aceite ozonizado en la herida, se presentó una mejoría en el proceso de cicatrización, sin embargo en ese estudio no se reportó la

cantidad de ozono presente en el aceite, por lo que no se podría repetir el resultado bajo sus condiciones de evaluación, tal como se realizó la descripción de los aceites ozonizados utilizados en este estudio (59).

El evaluar los bordes de las heridas, nos permitió determinar si hay un proceso anormal en la cicatrización, aunque el proceso inflamatorio de una herida es esperado, lo ideal es que este comience a disminuir con forme pasa el tiempo y reduce los tiempos de cicatrización. En los grupos T1, T2 y T3, en la mayoría de los casos se observaron bordes difusos, mientras que en el grupo T4 en todos los casos ya no se observaron bordes visibles, para el día 10 solo en algunos casos en T2 y T3 aún se notaban bordes difusos. Si bien, se esperaba una disminución de los bordes en todos los grupos, se observó diferencia estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ ) en los grupos T2, T3 y T4 con respecto al grupo T1, tal como se esperaría del efecto de regeneración celular y antiinflamatorio el cual se ha mencionado con el uso de aceites ozonizados (58,59).

En cuanto a la vascularidad de los grupos T1 y T4, al día 7 se observaron casos en los que la piel presentó su coloración normal, por el contrario, en T2 y T3 en la mayoría de los casos aún se presentaba una tonalidad rosa, lo que podría relacionarse con el efecto de vasodilatación descrito por el uso de aceites ozonizado (9,23–25). Para el día 10 ya la tonalidad de la piel era normal en todos los casos.

En cuanto a la temperatura, no se observó diferencia estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ ) entre los tratamientos al día 7 y 10, por lo que se podría descartar un efecto inflamatorio local no deseado por el uso de los tratamientos.

Al día 7 en T1, T2 y T3 se observó exudado seroso, lo que se puede asociar a una cicatrización incompleta, mientras que para el grupo T4 ya no había presencia de exudado, en el día 10 ya no había presencia de exudado en ninguno de los grupos.

En el caso de la evaluación de la presencia de eritema en el día 7 en todos los grupos se observó una disminución, excepto en el grupo T3, en el que se observó un eritema moderado, esto se puede asociar a que los propietarios de algunos de los pacientes permitieron que las perras se autolesionaran en la zona de la herida, no obstante, se decidió continuar con la aplicación de los preparados considerando que la irritación no complicó la cicatrización de la herida inicial, en el día 10 en T1, T2 y T4 ya no se observó presencia de eritema mientras que en T3 el eritema era mínimo.

Un dato importante para señalar es que en los grupos T2, T3 y T4, algunos propietarios reportaron que en los días 3 – 5 observaron enrojecimiento alrededor de las heridas, sin embargo, los pacientes no presentaron inflamación, dolor, comezón o alguna otra signología. Durante la evaluación correspondiente, la temperatura se registró en valores normales por lo que se descartó inflamación o una reacción alérgica.

Es posible que el enrojecimiento se deba a los efectos vasodilatadores reportados con el uso de aceites ozonizados debido el ozono estimula la producción de óxido nítrico en las células endoteliales lo que provoca la relajación de los vasos sanguíneos dando lugar a un efecto vaso dilatador (18,22). Solo en un caso en el grupo T3 se presentó una reacción alérgica a la sutura, sin embargo, se decidió no

excluir del trabajo ya que en los días evaluados y en los resultados obtenidos no representó un resultado que afectará al grupo.

Si bien, en la literatura se menciona que a mayor porcentaje de inclusión de ozono se presentarán mejores resultados en las pruebas *in vitro*, hay que considerar los riesgos que puede llegar a presentar cuando es aplicado en la piel, por lo que es necesario corroborar la eficacia así como la seguridad del preparado, por lo que en este estudio se tomaron en cuenta estas condiciones, finalmente el preparado T4, obtuvo los mejores resultados en la pruebas *in vitro*, así como en la evaluación de la cicatrización, por lo que se podría considerar como una alternativa para evitar el crecimiento bacteriano en heridas asépticas y mejorar el proceso de cicatrización de estas, siempre y cuando sea utilizado tal como se evaluó en este estudio.

## **CONCLUSIÓN**

En la búsqueda de compuestos que cumplan con características importantes como la inocuidad y eficacia antimicrobiana, así como cicatrizante, en este estudio se optó por la evaluación de preparados a base de aceite ozonizado. Lo anterior, en consideración a los efectos reportados en la literatura, sin embargo, las condiciones de evaluación difieren de un reporte a otro. En este estudio, se evaluaron diferentes concentraciones de ozono en aceite de girasol, así como otros ingredientes en el preparado. De acuerdo con los resultados obtenidos, hay diferencia en el efecto antimicrobiano dependiendo de la concentración de ozono, tiempo de exposición, concentración de microorganismos y la presencia de otros ingredientes en la

formulación. En cuanto a la cicatrización, también hay diferencia en el efecto terapéutico dependiendo de la concentración de ozono y los ingredientes presentes en la formulación. El preparado T4 presentó los mejores resultados tanto en las pruebas *in vitro* como en las de la evaluación de la cicatrización, con una concentración de 9% de ozono. Los preparados T2 y T3 si presentaron eficacia *in vitro* y sobre las heridas, pero esta fue menor en comparación a T4 y en algunos caso no fue superior al control. Si bien, T4 obtuvo los mejores resultados y este podría ser considerado como una alternativa de tratamiento para evitar el crecimiento microbiano en heridas asépticas, además de su efecto cicatrizante, hay otros factores que podrían modificarse y posiblemente obtener mejores resultados, algunos ejemplos podrían ser, modificar la concentración de ozono, la calidad del aceite, el almacenamiento, otros ingredientes en la formulación, el método de elaboración, etc.

## REFERENCIAS.

1. Scwhartz A, Martínez G. La Ozonoterapia y su fundamentación científica. Revista Española de Ozonoterapia. 2012;2:163–98.
2. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. Wiley; 2001.
3. Kirk-Othmar. Encyclopaedia of Chemical Technology 2nd Ed. 2001;410–32.
4. Menéndez Cepero SA. Ozono aspectos básicos y aplicaciones clínicas. Centro de Investigaciones del Ozono; 2008.
5. Schwartz A, Martinez G, Nikolaevna C, Viktorovich O, Re L. Guia para el uso médico del ozono. Fundamentos terapéuticos e indicaciones. Madrid: AEPROMO; 2011.

6. Scwhartz Adriana- Martínez Sánchez Gregorio. La ozonoterapia y su fundamentación científica. 2012.
7. Zeng J, Lu J. Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases. Vol. 56, International Immunopharmacology. Elsevier B.V.; 2018. p. 235–41.
8. Viebahn-Haensler R, León Fernández OS. Ozone in Medicine. The Low-Dose Ozone Concept and Its Basic Biochemical Mechanisms of Action in Chronic Inflammatory Diseases. *Int J Mol Sci.* 2021 Jul 23;22(15):7890.
9. Liu L, Zeng L, Gao L, Zeng J, Lu J. Ozone therapy for skin diseases: Cellular and molecular mechanisms. *Int Wound J.* 2023 Aug 16;20(6):2376–85.
10. Martínez G, Re L, Gema D. Las aplicaciones médicas de los aceites ozonizados, actualización. *Revista Española de Ozonoterapia.* 2012;2:121–39.
11. Martínez-Sánchez G, Re L, Perez-Davison G, Delaporte RH. Las aplicaciones médicas de los aceites ozonizados, actualización artículo original. 2012.
12. Mostafa B, Zakaria M. Evaluation of Combined Topical Ozone and Steroid Therapy in Management of Oral Lichen Planus. *Open Access Maced J Med Sci.* 2018 May 18;6(5):879–84.
13. Borges GÁ, Elias ST, da Silva SMM, Magalhães PO, Macedo SB, Ribeiro APD, et al. In vitro evaluation of wound healing and antimicrobial potential of ozone therapy. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery.* 2017 Mar 1;45(3):364–70.
14. Artanaisi. Gaceta Oficial No. 17 / 2015 - EXTRAORDINARIA - Págs. (291 - 293). 2015; Available from: <http://www.gacetaoficial.cu/-Calle>
15. Oros NV, Repciuc C, Ober C, Mihai M, Oana LI. Combined Oxygen-Ozone Therapy for Mesh Skin Graft in a Cat with a Hindlimb Extensive Wound. *Animals.* 2023 Feb 1;13(3).
16. Zeng J, Lu J. Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases. Vol. 56, International Immunopharmacology. Elsevier B.V.; 2018. p. 235–41.
17. Babior BM, Takeuchi C, Ruedi J, Gutierrez A, Wentworth P. Investigating antibody-catalyzed ozone generation by human neutrophils [Internet]. 2003. Available from: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0530251100](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0530251100)
18. de la Caridad Gavilán Hernández T. Potencialidades terapéuticas de la ozonoterapia en el Instituto de Hematología e Inmunología [Internet]. 2022. Available from: <https://orcid.org/0000-0003-4258-385X>
19. Skalska K, Ledakowicz S, Perkowski J, Sencio B. Germicidal properties of ozonated sunflower oil. *Ozone Sci Eng.* 2009 May;31(3):232–7.

20. Slavinskienė GE, Grigonis A, Ivaškienė M, Sinkevičienė E I, Andruleviči V, Utė E , et al. A Comparative Study of the Chemical Properties and Antibacterial Activity of Four Different Ozonated Oils for Veterinary Purposes. 2024; Available from: <https://doi.org/10.3390/vetsci>
21. Stable-García Y, Zamora Rodríguez Z, Fernández García A. Efecto cicatrizante de los aceites ozonizados sobre lesiones de la piel Healing effect of ozonized oils on skin injuries. Vol. 52, Biol.; vol.
22. Pell -Eva J., Schlaghaufer CD, Arteca RN. Ozone-induced oxidative stress: Mechanisms of action and reaction. *Physiol Plant*. 1997 Jun 28;100(2):264–73.
23. Kucuksezer UC, Zekiroglu E, Kasapoglu P, Adin-Cinar S, Aktas-Cetin E, Deniz G. A stimulatory role of ozone exposure on human natural killer cells. *Immunol Invest*. 2014;43(1):1–12.
24. Bocci V, Valacchi CG, Corradeschi F, Fanetti G. Studies on the biological effects of ozone: 8. Effects on the total antioxidant status and on interleukin-8 production. 1998.
25. Gabrielson EW, Yu XY, Spannhake2 EW. Comparison of the Toxic Effects of Hydrogen Peroxide and Ozone on Cultured Human Bronchial Epithelial Cells.
26. Elejalde Guerra JI. *Anales de medicina interna*. [Internet]. Vol. 18, *Anales de Medicina Interna*. Arán Ediciones, S.A; 2001 [cited 2024 May 8]. 50–59 p. Available from: [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0212-71992001000600010&lng=es&nrm=iso&tlng=es](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992001000600010&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
27. Galiè M, Covi V, Tabaracci G, Malatesta M. The Role of Nrf2 in the Antioxidant Cellular Response to Medical Ozone Exposure. *Int J Mol Sci*. 2019 Aug 17;20(16):4009.
28. Gabrielson EW, Yu XY, Spannhake EW. Comparison of the toxic effects of hydrogen peroxide and ozone on cultured human bronchial epithelial cells. *Environ Health Perspect*. 1994 Nov;102(11):972–4.
29. Anzolin A, da Silveira-Kaross N, Bertol C. Ozonated oil in wound healing: what has already been proven? *Med Gas Res*. 2020;10(1):54.
30. Bonetti Filho-Idomeo. *Aceites ozonizados: Un análisis cualitativo y cuantitativo*. 2011.
31. Georgiev VF, Batakliiev TT, Anachkov MP, Rakovski SK. Study of Ozonated Olive Oil: Monitoring of the Ozone Absorption and Analysis of the Obtained Functional Groups. *Ozone Sci Eng*. 2015 Jan 2;37(1):55–61.
32. Moureu S, Violleau F, Ali Haimoud-Lekhal D, Calmon A. Ozonation of sunflower oils: Impact of experimental conditions on the composition and the antibacterial activity of ozonized oils. *Chem Phys Lipids*. 2015 Feb;186:79–85.

33. Elías P, Ferri FR. La desinfección como práctica útil en la lucha contra las infecciones animales [Internet]. 2005. Available from: [http://ourworld.compuserve.com/homepages/Academia\\_Veterinaria/news26.htm09/05/200510:47:50](http://ourworld.compuserve.com/homepages/Academia_Veterinaria/news26.htm09/05/200510:47:50)
34. Sechi LA, Lezcano I, Nunez N, Espim M, Dupre I, Pinna A, et al. Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozone). *J Appl Microbiol.* 2001 Feb 5;90(2):279–84.
35. Business Industry Reports. OpenPR Worldwide Public Relations . 2021. Sólido crecimiento visible para el mercado de generadores de ozono con descarga de corona 2021-2025 | Toshiba, OZONIA (Suez), Wedeco (Xylem), Mitsubishi Electric, Primozone, Metawater, MKS, Oxyzone, DEL.
36. Jordan L, Beaver K, Foy S. Ozone treatment for radiotherapy skin reactions: is there an evidence base for practice? *European Journal of Oncology Nursing.* 2002 Dec;6(4):220–7.
37. Mario Cruz-Amaya J. Principios básicos del manejo de las heridas Basic principles in the management of injuries. Vol. 2, zootec. 2008.
38. Goicoa A, Rejas J. Piodermias caninas. 1ra impresión. Zaragoza, España: Grupo asis; 2019.
39. Clarena Castellanos GI, Rodríguez GT, Arturo Iregui CC. Estructura histológica normal de la piel del perro (estado del arte) [Internet]. 2005. Available from: <https://ciencia.lasalle.edu.co/mv>
40. S. Coyner K. *Clinical Atlas of Canine and Feline Dermatology.* Washinton, USA: Wiley; 2019.
41. Kosachenco DB, Autônomo MV, Bárbara D, Médico A, Autônomo V, Mentz F. Therapeutic effect of Ozone Therapy in wound healing in dogs: Cases report Dra. Camila Calliari. *Revista Española de Ozonoterapia.* 2018;8(1):197–210.
42. Nast A, Griffiths CEM, Hay R, Sterry W, Bologna JL. The 2016 International League of Dermatological Societies' revised glossary for the description of cutaneous lesions. *Br J Dermatol.* 2016 Jun;174(6):1351–8.
43. Guarín-Corredor1 C, Quiroga-Santamaría1 P, Stella N, Msc2 LP, Resumen |. Proceso de Cicatrización de heridas de piel, campos endógenos y su relación con las heridas crónicas Wound healing process of skin, endogenous fields related and chronic wounds. 2013.
44. Fossum TWelch. *Small animal surgery.* Elsevier Mosby; 2013. 1619 p.
45. Ríos AM, Baquero MR, Ortiz G, Ayllón T, Smit L, Rodríguez-Domínguez M, et al. Staphylococcus multirresistentes a los antibióticos y su importancia en medicina veterinaria Antibiotic multiresistant Staphylococcus and their importance in veterinary medicine Introducción. Vol. 35, *Clin. Vet. Peq. Anim.* 2015.

46. Griffeth GC, Morris DO, Abraham JL, Shofer FS, Rankin SC. Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin. *Vet Dermatol*. 2008 Jun 28;19(3):142–9.
47. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1999 Jan;12(1):147–79.
48. Arturo Iregui CC. Patrones histológicos de las enfermedades inflamatorias de la piel (Parte II) [Internet]. 2006. Available from: <https://ciencia.lasalle.edu.co/mv>
49. Chávez-Serna E, Andrade-Delgado L, Martínez-Wagner R, Altamirano-Arcos C, Espino-Gaucín I, Nahas-Combina L. Experience in the management of acute wounds by dog bite in a hospital of third level of plastic and reconstructive surgery in Mexico. *Cirugia y Cirujanos (English Edition)*. 2019;87(5):528–39.
50. Kraft W, Escobar JE. Dosificación de medicamentos para perros y gatos [Internet]. Ed. Acribia; 2001. Available from: <https://books.google.com.mx/books?id=28R2AAAACAAJ>
51. Donald Plumb. *Veterinary Drug Handbook*. 6th ed. Wiley- Blackwell; 2008.
52. De F, Chonillo F, Manzo CG. Ozone in the healing process of surgical wounds in dogs and cats. Vol. 5, *Journal of Asia Pacific Studies*. 2019.
53. Palacios Janeth A, Murcia Rubiano Fernando II. Microbiological assessment of a antibacterial, repairing ozonized oil through an antimicrobial efficacy test. Vol. 50, *Revista Cubana de Farmacia*. 2016.
54. cercenado E, Saavedra-Lozano J. El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales (I). *Anales de Pediatría Continuada*. 2009 Aug;7(4):214–7.
55. Sumano H, Ocampo L, Guitierrez L. *Farmacología Veterinaria*. 4ta ed. México, CDMX: Aranda S.A C.V; 2015.
56. Ferreira de Oliveira D, Andrade Martins J, Souza e Costa J, Rocha Oliveira C. Skin Phytotherapy and Pharmacological Aspects: a Brief Review. *Brazilian Journal of Natural Sciences*. 2022 Nov 25;4(3).
57. Johri A, Kumar A, Singh D, Tiwari K, Arora N, Mrigesh M. Clinical uses of aloe vera in veterinary medicine. 2023;10(05):198–200. Available from: [www.indianfarmer.net](http://www.indianfarmer.net)
58. Tamba US, Arifin MT, Nur M, Muniroh M, Susilanigsih N. The role of ozonated Aloe vera oil in full-thickness skin defects: Macrophage count and epithelization length parameter. *Research*. 2020 Oct 9;9:1218.
59. de Souza RC, Dias RAG, Jesus M de L de S, Barreto CO de A, de Andrade ES, Machado MC de A. Efects of sunflower oil on the treatment of surgical

wound in cats submitted to elective ovariohysterectomy. Veterinaria e Zootecnia [Internet]. 2022;29. Available from: <https://link.gale.com/apps/doc/A698272610/IFME?u=anon~9abf9d99&sid=googleScholar&xid=c627b6b7>

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN:**

"Estudio de un preparado cicatrizante para perras sanas."

Yo \_\_\_\_\_ siendo el responsable de \_\_\_\_\_ el cual es un perro de raza \_\_\_\_\_, con \_\_\_\_\_ de edad; doy mi consentimiento para que participe en un estudio médico veterinario que consiste en la aplicación tópica de un gel cicatrizante sobre la herida posquirúrgica a una OSH/ esterilización.

Se me ha explicado que, aunque es un procedimiento seguro, que no causará efectos indeseables en (nombre del perro) \_\_\_\_\_ durante el estudio pudieran presentarse complicaciones o riesgos como: Inflamación en la zona periférica de la herida, irritación, comezón, sangrados, etc.

Estoy consciente de esto y excluyo de toda responsabilidad a la clínica \_\_\_\_\_ y al personal médico que participa en el procedimiento.

Acepto la participación en este estudio y con mi firma certifico que he leído y comprendo el texto aquí impreso, dando mi autorización para que se lleve a cabo.

Firma del responsable: \_\_\_\_\_

México, D.F., a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ deI 202\_\_.

Anexo 1 Carta de consentimiento informado para participar en el proyecto.