

## Artículo original

# Aspectos prácticos en ozonoterapia: Estudio de la concentración de ozono en la solución salina ozonizada

**Gregorio Martínez-Sánchez**

Asesor científico, freelance, Ancona (60126), Italia

### Palabras clave

*Solución salina  
ozonizada,  
ozono terapia,  
ozono.*

### Resumen

La Solución Salina Ozonizada (O<sub>3</sub>SS por su sigla en inglés) es una de las vías de administración sistémica del ozono que ha sido utilizada desde hace más de 40 años fundamentalmente en Rusia. El protocolo de aplicación debe realizarse bajo parámetros establecidos para lograr una eficacia terapéutica e impedir efectos colaterales. El propósito de este trabajo fue estudiar las concentraciones de ozono en solución salina durante la etapa de burbujeo para establecer el tiempo óptimo de saturación y estudiar la degradación del ozono en ella en el tiempo, para definir así la necesidad de la continuidad del burbujeo durante la reinfusión al paciente. Se simuló el proceso de preparación de la O<sub>3</sub>SS utilizando un kit certificado, se trabajó a las concentraciones de 1 y 5 µg/NmL y se determinó la variación de las concentraciones de ozono en solución a través del método espectrofotométrico. Se estimó que el tiempo de burbujeo óptimo para la saturación era de 15 min y que a este tiempo se alcanza en la solución un 10 % de la concentración de ozono inicial. Se comprobó que debido a la degradación acelerada del O<sub>3</sub> en solución salina es necesario continuar con el burbujeo de ozono hasta que queden en el recipiente 50 mL de solución salina. Al carecer los generadores occidentales de emisiones de ozono en fracciones de µg/NmL, se estimó que las concentraciones de 1, 2 y 5 µg/NmL a la salida del generador serían las óptimas para aplicar las dosis bajas, media y alta que requiere la aplicación de la O<sub>3</sub>SS según el tipo de indicación.

..

---

## Keywords

Ozonized saline solution,  
ozone therapy,  
ozone.

---

## Abstract

*Ozonized Saline Solution (O<sub>3</sub>SS) in one of the systemic routes of ozone administration that has been used for more than 40 years, mainly in Russia. The application protocol must be carried out under established parameters to achieve therapeutic efficacy and prevent side effects. The purpose of this paper is to study the concentrations of ozone in saline solution during the bubbling stage to establish the optimal saturation time and to study the degradation of ozone in it in the time, thus defining the need for continued bubbling during reinfusion to the patient. The O<sub>3</sub>SS preparation process was simulated using a certified kit, working at the concentrations of 1 and 5 µg/ NmL and the variation of the ozone concentrations in solution was determined using the spectrophotometric method. The optimum bubbling time for saturation was estimated to be 15 min and at this time 10% of the initial ozone concentration is reached in the solution. It was found that due to the accelerated degradation of O<sub>3</sub> in saline solution, it is necessary to continue bubbling the ozone until 50 mL of saline solution remain in the container. As the western generators lacked ozone emissions in fractions of µg/NmL, it was estimated that the concentrations of 1, 2 and 5 µg/NmL at the generator outlet would be optimal for applying the low, medium and high doses required by the O<sub>3</sub>SS application according to the type of indication.*

### **Sugerencia sobre cómo citar este artículo:**

Martínez Sánchez, Gregorio (2020). Aspectos prácticos en ozonoterapia: Estudio de la concentración de ozono en la solución salina ozonizada. *Ozone Therapy Global Journal* Vol. 10, nº 1, pp 39-53

---

Autor para correspondencia: Prof. Dr. Gregorio Martínez-Sánchez, Asesor científico, freelance, Ancona (60126), Italia. E-mail: [gregorcuba@yahoo.it](mailto:gregorcuba@yahoo.it):

## Introducción

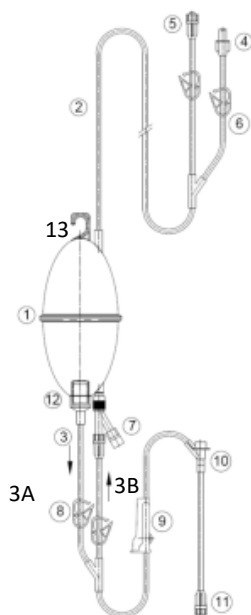
El uso de la solución salina fisiológica (NaCl 0,9%) ozonizada (O<sub>3</sub>SS) es una práctica muy extendida en Rusia y desarrollada por la escuela de ozonoterapia en la ciudad de Nizhny Novgorod (Distrito Federal del Volga).<sup>1</sup> El método, constituye una vía de aplicación sistémica del ozono para diferentes patologías y consiste en la saturación previa de la solución salina fisiológica con una mezcla de oxígeno-ozono (O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub>) a bajas concentraciones y su infusión intravenosa al paciente. Esta vía de aplicación fue aprobada por el Ministerio de Salud de la Federación de Rusia a principios de los años 80 del siglo pasado, específicamente para las ramas de ortopedia, dermatología, ginecología / obstetricia y neonatología. Desde entonces se ha implementado oficialmente en hospitales públicos.<sup>2-4</sup> Ucrania oficializó su aplicación en el 2001.<sup>5</sup> Atendiendo a diferentes razones su uso se ha ido extendiendo paulatinamente a países como España y América en general. El método original comprende el cálculo de la dosis según el peso del paciente. La metodología tiene muchas variantes de implementación y utiliza generadores de ozono graduados en µg/L, también los volúmenes de solución salina a ozonizar reportados son variables, así como los tiempos de saturación y el tiempo de burbujeo una vez que se instaura el procedimiento al paciente.

Actualmente, el empleo de la O<sub>3</sub>SS es objeto de manipulación,<sup>6</sup> con el uso de argumentos pseudocientíficos para dificultar su aplicación como terapia complementaria. Pero probablemente el interés real es comercial, con la suposición de que aquellos que la practican dejarán de usar el método de la Autohemoterapia Mayor (MAH por sus siglas en inglés) y, en consecuencia, dejarán de comprar el kit para MAH. En realidad, la O<sub>3</sub>SS y la MAH son dos formas sistémicas, cada una con sus ventajas y desventajas.<sup>7</sup> Los estudios que emplean las O<sub>3</sub>SS se están difundiendo cada vez más en las bases de datos científicas<sup>8,9</sup> y van quedando atrás los argumentos retrógrados que la califican desde “placebo” hasta “generadora de tumores”. En la actual pandemia COVID-19 se han reportado estudios tanto con el método MAH<sup>10</sup> como con el de O<sub>3</sub>SS, aunque en realidad en este caso la O<sub>3</sub>SS<sup>11</sup> presenta grandes ventajas sobre la MAH porque el proceso infeccioso mediado por el SARS CoV2 transita con alteraciones en la coagulación que pueden dificultar el uso de la MAH.<sup>12</sup>

Al retomar el método de la O<sub>3</sub>SS fuera de Rusia por distintas motivaciones, éste se intentó armonizar en un protocolo único. Una descripción general del método se presentó en la segunda y tercera edición de la Declaración de Madrid sobre la Ozonoterapia.<sup>13</sup> No obstante, la totalidad de los parámetros que rigen este procedimiento resultan complejos de implementar. El objetivo de este trabajo fue cuantificar mediante un método espectrofotométrico las concentraciones de ozono durante el proceso de saturación de la O<sub>3</sub>SS y estudiar el tiempo en que el ozono se degrada en la solución salina. Atendiendo a este estudio se proponen tiempos de saturación basado en las mediciones y además el ajuste de las dosis a los generadores que usan concentraciones en µg/mL en valores de 1 unidad.

### Materiales y Métodos

El ozono fue generado por un dispositivo médico de clase IIb CE (Ozonette<sup>®</sup>, SEDECAL<sup>®</sup>, España). El recipiente para la preparación de la solución salina mono uso, estaba hecho de materiales de grado médico, libre de ftalatos y totalmente compatible con el ozono que se clasifica como dispositivo médico clase IIb Bexozone<sup>®</sup> (Bexen medical<sup>®</sup>, España). La conexión de salida de la cámara de burbujeo (Fig. 1 punto 3) se cortó y se mantuvo cerrada la mordaza 8 (Fig. 1) para acoplar una jeringuilla de 5 mL que permitiera tomar muestras de la solución salina presente en la cámara a los diferentes tiempos de muestreo. La muestra (5 mL) se tomó por aspiración, re inserción en la cámara y sucesiva aspiración de la muestra. Una vez determinada la absorbancia de la muestra esta se re inyectó a la cámara de burbujeo. Se utilizó solución salina fisiológica estéril (NaCl 0,9%) de (Lab. S.A.L.F, Italia).



#### Descripción:

1. Cámara contenedora
2. Línea superior
3. Línea inferior de dos vías. 3A Línea descendente. 3B Línea ascendente
4. Conector Luer Lock hembra
5. Conector Luer Lock macho
6. Mordaza
7. Punto de adición en Y
8. Mordaza
9. Rodillo mordaza
10. Punto de adición en Y
11. Conector Luer Lock macho
12. Cámara de goteo con filtro
13. Gancho de sujeción al soporte para

**Figura 1.** Esquema y descripción del Dual Kit del Bexozone<sup>®</sup> (Bexen<sup>®</sup> medical, España).

Como primer paso se analizó la correspondencia de la concentración de ozono a la salida del generador prefijada en el equipo con la determinada con el método espectrofotométrico, para lo cual se empleó un espectrofotómetro Metertech UV/VIS SP8001 (Taiwán). La absorbancia se leyó a 254 nm en una cubeta de cuarzo de 1 cm y se utilizó para el cálculo el coeficiente de extinción de  $2\,987\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ <sup>14</sup> para el ozono en fase gaseosa. Se simuló el proceso de saturación de 200 mL de solución salina por 15 min con un flujo de ozono de 30 L/h en el dispositivo Bexozone® a las concentraciones de 1 y 5 µg/mL y se tomaron muestras del recipiente cada 5 min para medir la absorbancia en el espectrofotómetro y calcular las concentraciones de ozono en solución. En este caso se empleó el coeficiente de extinción  $3\,840\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ .<sup>15</sup>

Los cálculos de las concentraciones se basaron en la fórmula de Lambert-Beer, donde:

$C = D.O. / \epsilon \cdot L$ , siendo: D.O., densidad óptica;  $\epsilon$ , coeficiente de extinción molar del ozono y L, paso de luz de la cubeta (1 cm).

Se consideraron las modificaciones que ejercen sobre el coeficiente de extinción la temperatura y la presión.  $C = (D.O. / \epsilon \cdot L) \cdot (P_{NTP} / P) \cdot (T / T_{NTP})$ , siendo:  $P_{NTP}$ , la presión normal ( $1\,013 \cdot 10^5$  Pa), P la presión a la que se hacen las mediciones;  $T_{NTP}$  (Temperatura normal, 273,15 K), y T la temperatura a la cual se realizó el experimento: Para la medición de ozono gaseoso  $26,3\text{ °C} = 299,45\text{ K}$ , para la medición de ozono disuelto en solución salina  $24,5\text{ °C} = 297,65\text{ K}$ .

Procesamiento estadístico de los datos: Los valores se obtuvieron por triplicado. El análisis estadístico se inició con la prueba preliminar OUTLIERS para detectar los valores aberrantes. Se calcularon diferentes parámetros descriptivos para las variables analizadas (media y coeficiente de variación). Después se empleó el método ANOVA (una cola) seguido por la prueba de homogeneidad de varianzas (Levene) y la prueba de comparación múltiple (Rangos de Duncan). El nivel de significación estadístico empleado en todos los casos fue como mínimo de  $p^* 0,05$ . Para el estudio de la relación existente entre los valores de concentración y densidad óptica se utilizó el análisis de regresión y correlación lineal. Se tomó en cuenta, para validar la aceptabilidad del modelo escogido, los valores obtenidos para la prueba Durbin-Watson en el análisis de residuos. Se reportó el coeficiente de correlación de Pearson. Los datos se procesaron utilizando el paquete estadístico STATISTICA (versión 6) para WINDOWS.

## Resultados

### *Calibración del generador de ozono Ozonette®*

La calibración se llevó a cabo en el intervalo de 1 a 20 µg/mL. Los resultados se muestran en la Tabla 1. La correlación lineal entre la concentración prefijada en el equipo y la calculada según las determinaciones espectrofotométricas fue de 0,999. Las desviaciones de la concentración calculada con respecto a la prefijada fueron inferiores al 5%.

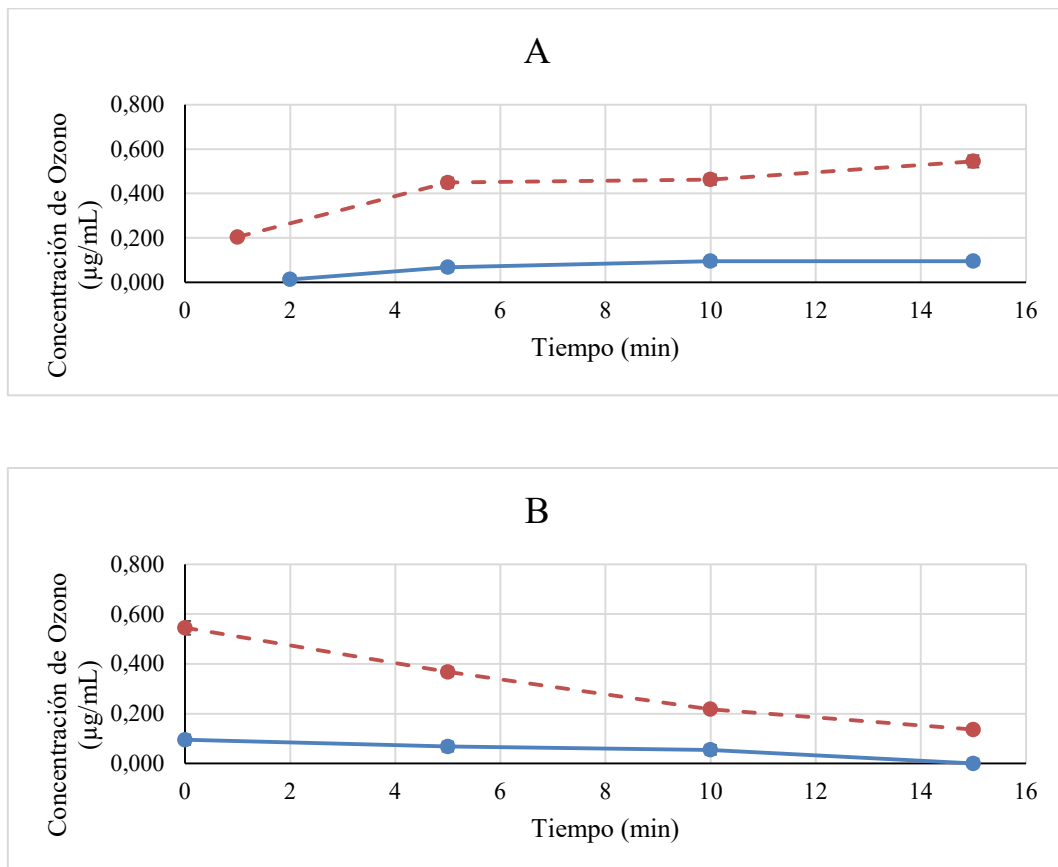
**Tabla 1.** Resultados de la calibración espectrofotométrica del generador de O<sub>3</sub> Ozonette®.

Concentración fijada en el equipo (µg/mL)	D.O. 254 nm	Concentración calculada* (µg/mL)	Desviación de la concentración prefijada con respecto a la calculada** (%)
1	0,056	0,99	-1,3
2	0,114	2,01	0,4
3	0,167	2,94	-1,9
4	0,237	4,18	4,4
5	0,294	5,18	3,6
10	0,555	9,78	-2,2
20	1,110	19,55	-2,2

Leyenda: Los resultados representan la media de tres determinaciones con un coeficiente de variación inferior al 5%. \* Los cálculos se realizaron utilizando el coeficiente de extinción de 2 987 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> a 254 nm y fue normalizado con el factor de corrección para la presión (1) y la temperatura (1,096284).

### Estudio de las variaciones de la concentración de ozono en solución salina en el tiempo

En la Fig. 2 se puede apreciar las modificaciones de la concentración de ozono en solución salina. En fase de saturación a la concentración de 1  $\mu\text{g/mL}$  la concentración máxima (10 % de la inicial) que corresponde a 0,1  $\mu\text{g/mL}$  se alcanza tras 10 min de burbujeo. Para la concentración de 5  $\mu\text{g/mL}$ , la concentración máxima (10 % de la inicial) que corresponde a 0,5  $\mu\text{g/mL}$  se alcanza tras 15 min de burbujeo. Durante la fase de saturación la pendiente de la relación logarítmica entre la concentración de ozono disuelto a 1  $\mu\text{g/mL}$  es superior (0,056) con respecto a la que se alcanza a 5  $\mu\text{g/mL}$  (0,027). Un comportamiento similar ocurre durante la degradación del ozono en solución, para 1  $\mu\text{g/mL}$  la pendiente de la recta logaritmo de la concentración vs tiempo es de -0,024 mientras que para 5  $\mu\text{g/mL}$  es de -0,041.



**Figura 2.** Concentración de ozono en la solución salina (NaCl 0,9%) en el tiempo. Línea continua concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ , línea discontinua concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ . A, fase de saturación y burbujeo constante. B, fase de descomposición del ozono tras la detención del burbujeo. Las concentraciones de ozono en solución se calcularon utilizando el coeficiente de extinción de 3 840  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  a 254 nm y se normalizaron con el factor de corrección para la presión (1) y para la temperatura (1,089694).

## Discusión

El generador de ozono utilizado en este experimento (Ozonette<sup>®</sup>, SEDECAL<sup>®</sup>, España) en el intervalo de dosis de 1 a 20 µg/mL se comportó con un nivel de precisión inferior al 5 % de variación entre la dosis seleccionada y la determinada por el método espectrofotométrico. Lo anterior lo sitúa dentro de lo establecido por ISCO3 que recomienda que los generadores no difieran de al menos 10 % entre la dosis seleccionada y la real.<sup>16</sup>

Durante el proceso de saturación de la solución salina, tanto a la concentración más baja como la más alta (1 y 5 µg/mL) se alcanzó una concentración máxima que correspondió al 10 % de la concentración de burbujeo. Lo anterior se correspondió con lo reportado por Durnovo y Jomutinnikova (2000)<sup>17</sup>, los que tras 10 min de burbujeo con una concentración de 1,5 µg/mL detectan una concentración final en solución que corresponde al 11,4% de la inicial y para la concentración de 2,5 µg/mL el 8,8 % de la concentración inicial. Los resultados no se corresponden con lo referido por otros autores, los que plantean que la concentración final en la solución salina representa aproximadamente entre el 22% y el 25 % de la concentración de saturación.<sup>18,19</sup> En un caso (Boiarivov *et al.* 2000) [18] esta diferencia puede ser debido a que el autor usó agua destilada, en lugar de solución salina, donde el ozono es más estable que en una solución que presenta sales disueltas. En el segundo caso la variación puede deberse a que el sistema de simulación experimental no correspondió exactamente con el utilizado en la clínica. Por otra parte, el tiempo para lograr la saturación fue de 10 min para la concentración más baja 1 µg/mL y de 15 min para la más alta 5 µg/mL. Este dato puede servir para estandarizar el tiempo de burbujeo a 15 min tal y como se define en la variante occidentalizada del procedimiento.<sup>20</sup>

Con respecto al tiempo en el cual se degrada el ozono a oxígeno, una vez finalizado el burbujeo, los estudios que existen son escasos. La dinámica de degradación del ozono bajo las condiciones en que se ejecuta la O<sub>3</sub>SS es importante para definir si la solución debe mantenerse o no burbujeando con ozono durante la reinfusión al paciente. Según los resultados de este estudio, después de 5 min de detenido el burbujeo, para ambas concentraciones ensayadas, la concentración de ozono que permanece en solución es el 67 % de la inicial, a los 10 min la concentración baja al 40 % para 5 µg/mL y a 57 % para 1 µg/mL. Lo anterior es indicativo de la pérdida de la presencia de ozono y la necesidad de continuar burbujeando durante la reinfusión, al menos hasta que en el recipiente queden 50 mL de solución, momento en el cual se retirará el burbujeo por razones de seguridad, tal y como lo indica la metódica.<sup>20</sup>



Otro de los problemas relacionados con la aplicación de la O<sub>3</sub>SS está relacionado con los cálculos de las concentraciones de ozono según el tipo de patología, el peso del paciente, y el hecho de que los generadores occidentales no están graduados para fracciones de µg/mL. En la tabla 2 mostramos una relación de las dosis según su uso en dependencia de las patologías a tratar. Los valores de la columna 1 se refieren a lo descrito en la 3ª edición de la Declaración de Madrid sobre la Ozonoterapia,<sup>13</sup> que fueron calculados sobre el precedente de que la cantidad de ozono que se mantienen en la solución representa el 25 % de utilizado para el burbujeo. No obstante, si se tienen en cuenta los resultados de este trabajo y los reportados por Durnovo y Jomutinnikova (2000)<sup>17</sup> y se considera en un 10 % la cantidad de ozono que se disuelve en la solución salina tras un burbujeo de 15 min a 30 L/h se pueden estimar la concentración de ozono a la salida del generador y la concentración de ozono administrada al paciente en 200 mL de solución salina (columnas 3 y 4 de la tabla 2). En la práctica clínica occidental de este procedimiento no hay cambios sustanciales, pues las concentraciones de ozono referidas son las que se estaban utilizando regularmente, solo cambiaría la necesidad de hacer cálculos ajustados al peso corporal que de todas formas resultaban en números con fracciones de µg/mL que no se podían predeterminar en los equipos generadores de ozono occidentales.

**Tabla 2.** Propuesta de concentraciones de ozono a la salida del generador para saturar la O<sub>3</sub>SS dependiendo de la indicación terapéutica.

<b>Dosis<sup>a</sup></b> <i>μg</i> /NmL	<b>Uso<sup>b</sup></b>	<b>Ozono a la salida del generador<sup>c</sup></b> ( <i>μg</i> /NmL)	<b>Concentración de ozono en la solución<sup>c</sup></b> ( <i>μg</i> /NmL)	<b>Dosis de 200 mL de salina</b> ( <i>μg</i> )
0,4 Baja	Para estimular el sistema inmune y enfermedades cardiovasculares. En obstetricia, para prevenir la toxicidad en el primer trimestre del embarazo y la hipoxia fetal en el tercer trimestre. En la prevención y el tratamiento adyuvante en el cáncer.	1	0,1	20
0,8 <i>μg</i> /NmL Media	Desintoxicación en endo-toxemia y enfermedades inflamatorias crónicas de diferentes etiologías	2	0,2	40
2 <i>μg</i> /NmL Alta	En enfermedades infecciosas (bacterianas y virales), así como en infecciones de la piel y en quemados. También, en las enfermedades autoinmunes donde se necesita un efecto inmunosupresor.	5	0,5	100

Leyenda: a, Dosis referidas en la Declaración de Madrid sobre la Ozonoterapia<sup>13</sup> sobre la experiencia anterior que consideraba la concentración de ozono disuelta en la salina como el 25 % de la utilizada en el burbujeo (salida del generador). b, Usos según la dosis referidos en la Declaración de Madrid sobre la Ozonoterapia.<sup>13</sup> c, Concentraciones propuestas según los resultados de este estudio.

Sobre el límite máximo de ozono disuelto en solución anteriormente establecido, con la finalidad de evitar flebitis 2 µg/NmL, según el cálculo actual correspondería a 20 µg/NmL. No obstante, según los resultados de la aplicación de esta terapia complementaria se ha evidenciado que el burbujeo con 5 µg/NmL es suficiente para tratar enfermedades infecciosas como la infección por SARS CoV2<sup>11</sup> y se reitera que no se deberá superar en ningún caso 8 µg/NmL. Por lo tanto, consideramos que por razones de seguridad el límite superior se podría colocar en 8 µg/NmL. Como muestra el propio estudio clínico en pacientes COVID-19,<sup>11</sup> la dosis se puede disminuir dependiendo de la evolución del paciente, en ese estudio en particular, después de dosis iniciales de 5 µg/NmL (ozono a la salida del generador) se bajó la dosis a 3 µg/NmL (ozono a la salida del generador) la cual correspondería a una dosis media/alta.

Con relación al cálculo de la dosis por peso corporal, cuando se deba reportar en un estudio, se puede calcular relacionando la cantidad de ozono administrada con el peso del paciente. Por ejemplo, un paciente que recibe 200 mL de solución salina ozonizada con la dosis alta 5 µg/NmL (ozono a la salida del generador), en realidad ha recibido 100 µg de ozono, si su peso era de 70 kg, la dosis por peso recibida será de 1,43 µg de ozono por kg de peso corporal. Teniendo en cuenta además las variaciones en los volúmenes de solución salina ozonizada en los diferentes trabajos clínicos (de 200 mL a 1 L) y el hecho que se ha demostrado que el mecanismo principal por el que actúa el ozono no requiere de grandes dosis, sino que la señal de pre-condicionamiento oxidativo se transmite de las células expuestas a las no expuestas.<sup>21</sup> Recomendamos mantener los volúmenes de solución bajos 200 a 250 mL como volumen total a administrar.

Finalmente, estimamos proponer un protocolo de trabajo para la preparación de la solución salina utilizando el dispositivo C.E. Bexozone® (Bexen® medical, España), debido a que es el dispositivo más utilizado para estos fines y que el fabricante no ofrece una guía clara para su uso en esta modalidad (Anexo 1).

## Conclusiones

El estudio de las concentraciones de ozono presentes durante el proceso de saturación de la solución salina con ozono permitió determinar que la concentración de ozono corresponde a un 10 % de la concentración de ozono a la salida del generador. Por otra parte, el estudio de la degradación del ozono en la solución salina, permitió corroborar que su degradación es lo suficientemente acelerada como para ser necesario el burbujeo contante en el momento de la reinfusión de la solución al paciente. Después del análisis de estos resultados se propone ajustar el tiempo de burbujeo a 15 min, mantener el burbujeo hasta que queden 50 mL de solución por infundir, emplear las concentraciones de ozono a la salida del ozonizador de 1, 2 y 5 µg/NmL para las dosis baja, media y alta según el campo de aplicación.

**Financiación:** El artículo no ha sido elaborado bajo ninguna fuente de financiamiento.

**Conflicto de intereses:** El autor es presidente del ISCO3 (International Scientific Committee on Ozone Therapy) y miembro del comité editorial de la revista *Ozone Therapy Global Journal*.

**Agradecimientos:** Al Dr. Vincenzo Di Dona por el préstamo del generador de ozono y los materiales para la realización de este trabajo; al Dr. Marco Papagni por permitir el acceso a su laboratorio para la ejecución experimental de este trabajo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Schwartz, A. Solución Salina Ozonizada (Sso3): Fundamentos Científicos. *Revista Española de Ozonoterapia* **2016**, 6, 111-120.
2. Peretyagin, S.; Vorobiev, A.; Smirnov, S. Oxygen-ozone mixture use in traumatology. 2007.
3. Kocheleva, I.; Ivanov, O.; Vissarionov, V. Oxygen-ozone use in dermatology and cosmetology. 2005.
4. Serov, N.; Fedorova, T.; Kachalina, T. Medical ozone use in obstetrics, gynecology and neonatology. 2007.
5. Shmakova, I.; Nazarov, E. Methods of application of ozone in medicine (guidelines). Ukraine, T.M.o.H.o., Ed. Ukrainian Centre for Scientific medical information and license work: Kiev, 2004.
6. WFOT. Study on the scientific basis of ozonized saline solution. <https://www.wfoot.org/wp-content/uploads/2015/11/WFOT-about-ozonized-saline-FINAL-signed.pdf>. 2017.
7. Schwartz, A. *Manual de Ozonoterapia Clínica*; Medizeus Soluciones Medicas S.L.: Madrid, España, 2017; pp. 651.
8. Karatieieva, S.; Makarova, O.; Yurkiv, O.; Semenenko, S.; Berezova, M. Treatment of Pyoinflammatory Complications with Individually Selected Ozone Dose in Patients with Diabetes. *Georgian Medical News* **2018**, 91-94.
9. Katiukhin, L.N. Influence of the course of treatment by injections of ozonized saline on rheological properties of erythrocytes in patients with complex pathology. *Human Physiology* **2016**, 42, 672-677, doi:10.1134/S0362119716050091.
10. Zheng, Z.; Dong, M.; Hu, K. A preliminary evaluation on the efficacy of ozone therapy in the treatment of COVID-19. *J Med Virol* **2020**, 10.1002/jmv.26040, doi:10.1002/jmv.26040.
11. Schwartz, A.; Martínez-Sánchez, G.; Menassa de Lucía, A.; Mejía Viana, S.; Alina Mita, C. Complementary Application of the Ozonized Saline Solution in Mild and Severe Patients with Pneumonia Covid-19: A Non-randomized Pilot Study. *Preprints 2020060233* **2020**.
12. Martínez-Sánchez, G.; Schwartz, A.; Di-Donna, V. Potential Cytoprotective Activity of Ozone Therapy in SARS-CoV-2/COVID-19. *Antioxidants (Basel)* **2020**, 9, doi:10.3390/antiox9050389.
13. ISCO3. *Madrid Declaration on Ozone Therapy*, 3 ed.; Madrid, G.S.L., Ed. ISCO3: Madrid, Spain, 2020; pp. 103.
14. Orphal, J. A Critical Review of the Absorption Cross-Sections of O<sub>3</sub> and NO<sub>2</sub> in the Ultraviolet and Visible. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2003**, 157, 185–209.
15. Ferre-Aracil, J.; Cardona, S.C.; Navarro-Laboulais, J. Determination and Validation of Henry's Constant for Ozone in Phosphate Buffers Using Different Analytical Methodologies. *Ozone: Science & Engineering: The Journal of the International Ozone Association* **2015**, 37, 106-118, doi:10.1080/01919512.2014.927323.
16. ISCO3. Guidelines and Recommendations for Medical Professionals Planning to Acquire a Medical Ozone Generator. Available online: (accessed on 11/03).
17. Durnovo, E.A.; N.E.Jomutinnikova. Ozonoterapia en la estomatología quirúrgica. In Proceedings of Ozono y métodos de terapia eferente en medicina, N. Nóvgorod.; pp. 37-38.
18. Boiarinov, G.A.; Riabov, S.V.; Serova, A.N. Solubilidad del ozono en el agua destilada. In Proceedings of Ozono y métodos de terapia eferente en la medicina, N. Novgorod; pp. 4-5.
19. Fernández, C.; Hidalgo, Ó.; Ramos, J.F.; Sánchez, R. Medida de la concentración del ozono en agua en dosis bajas. *Ozone Therapy Global Journal* **2019**, 9, 61-73.
20. Schwartz, A. *Manual de Ozonoterapia Clínica*; Medizeus S.L.: 2017.
21. Re, L.; Martinez-Sanchez, G.; Bordicchia, M.; Malcangi, G.; Pocognoli, A.; Morales-Segura, M.A.; Rothchild, J.; Rojas, A. Is ozone pre-conditioning effect linked to Nrf2/EpRE activation pathway in vivo? A preliminary result. *Eur J Pharmacol* **2014**, 742, 158-162, doi:S0014-2999(14)00634-7 [pii] 10.1016/j.ejphar.2014.08.029.

## **Anexo 1.** Guía de procedimiento para practicar la O3SS con el dispositivo Bexoozone® (Bexen medical®, España)

Para ver las referencias de las partes del dispositivo utilice como guía la Fig. 1. Antes de proceder a la canalización de la vena compruebe: El correcto estado del equipo y sus conexiones.

### **Operaciones preliminares. Llenado de la cámara:**

1. Sostenga la cámara por el gancho 13 al portasueros. Cierre el rodillo 9 y la mordaza 5.
2. A través del conector Luer Lock hembra 4, genere vacío hasta alcanzar 0,5-0,6 bar, conectándolo a la bomba de vacío del equipo, o aspirando con una jeringa Luer Lock, en este caso aspirar 300 mL de aire. Usar en ambos casos un filtro anti bacteriano (0,22  $\mu$ m) resistente al ozono.
3. Aspire por el punto 11, 200 mL de solución salina fisiológica (NaCl 0,9%) estéril. Para la aspiración coloque en el terminal 11 una aguja estéril (18 G · 1 ½; 1,2 mm · 38 mm). Si no basta el vacío para llegar a 200 mL, succione más aire desde el terminal 4. Cierre la mordaza 8

### **Saturación de la solución salina:**

4. Coloque el portasueros al mismo nivel que el generador (e.j. Ozonette, SEDECAL, España). Abra la mordaza 4 y conéctela a un sistema de destrucción de O<sub>3</sub>, a través de un filtro (0,22  $\mu$ m) resistente al ozono. Coloque un terminal de la línea de ozonización (Línea no incluida en el set, Luer Lock macho macho estéril) en el generador, utilice un filtro esterilizante (0,22  $\mu$ m) resistente al ozono a la salida del generador. En la otra terminal de la línea de ozonización, coloque una aguja (18 G · 1 ½; 1,2 mm · 38 mm). Ponga en función el generador en modo continuo con las siguientes especificaciones: Concentración: según la dosis (ver Tabla 2), no superar 8  $\mu$ g/mL. Flujo: 30 L/min. Tiempo: 30 min de los cuales 15 corresponderán a la fase de saturación de la solución salina y el resto se establecerá en dependencia del tiempo que se alcance para que en la cámara queden 50 mL de solución salina. Una vez activada la generación de O<sub>3</sub> inserte la aguja en el puerto 7. La mordaza 5 permanecerá cerrada. Deje saturar la solución por 15 min.

**Aplicación al paciente:**

5. Coloque un torniquete en el brazo del paciente, limpie con desinfectante la zona donde tomará la vena. Conecte la aguja epicraneana (palomilla 21 G al conector 11) y proceda a la toma de la vena (basílica, cefálica o medial). Una vez canalizada, fije la palomilla con tape adhesivo hipo alérgico en dos puntos. Retire el torniquete. Eleve el portasuero para permitir que la solución baje por gravedad. Abra el rodillo 9 y la mordaza 8 y deje fluir la solución salina desde el interior de la cámara. Continúe ozonizando (burbujeo) hasta que en la cámara queden 50 mL de solución salina, en ese momento detenga el sistema de generación y destrucción de ozono. No abandone el paciente.
6. Para la dosificación consulte la Declaración de Madrid sobre la ozonoterapia.<sup>13</sup>. Terminada la re-infusión, cierre todas las mordazas y el rodillo 9 y deseche el set en el contenedor de residuos especiales.