

Estudio de la grasa de teobroma ozonizada usando la Resonancia Magnética Nuclear protónica y análisis microbiológico

Por, Maritza F. Díaz Gómez^{1*}, Goitybell Martínez Téllez¹, José A Gavín Sazatornil², Rosa I. Meneau Hernández¹ e Irán Fernández Torres¹

¹ Centro de Investigaciones del Ozono. Ave. 15 y calle 230, Siboney, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. Apartado 6412. Teléfono (537) 271-1157. Fax (537) 271-0233.
mail: maritza.diaz@cnic.edu.cu.

² Universidad de La Laguna 38207, Tenerife, España.

RESUMEN

Estudio de la grasa de teobroma ozonizada usando la Resonancia Magnética Nuclear protónica y análisis microbiológico.

Se realizó un estudio de la ozonización de la grasa de teobroma el cual fue seguido a diferentes dosis de ozono y fueron determinados los índices de peróxidos y su actividad antimicrobiana. Los productos de reacción fueron identificados por la espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN ¹H). Los principales valores de intensidad de las señales fueron usados para el seguimiento de la reacción entre el ozono y la grasa de teobroma. La reacción fue seguida hasta un valor de índice de peróxidos de 1 544 mmol-equiv/kg. Las intensidades de las señales de los protones olefínicos desaparecen con un gradual incremento de la concentración de ozono. Los ozónidos de Criegee obtenidos a dosis de ozono de 87,4 mg/g fueron 3,7 veces mayores que los obtenidos al inicio de la reacción. El mayor espectro de acción de la actividad antimicrobiana fue obtenido a mayor índice de peróxidos. Estos resultados sugieren que la técnica espectroscópica de RMN ¹H proporciona una valiosa información acerca del grado de ozonización de la grasa de teobroma, la cual presenta una amplia actividad antimicrobiana contra la *Candida albicans*.

PALABRAS-CLAVE: Grasa de teobroma ozonizada - Índice de peróxido - Microbiología - Ozono - RMN ¹H.

SUMMARY

Study of ozonized theobroma fat using Proton Nuclear Magnetic Resonance and microbiological analysis.

Ozonation of theobroma fat at different applied ozone dosages was carried out and peroxide indexes along with antimicrobial activity were determined. The reaction products were identified using Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (¹H NMR). The principal signal intensity values were used for following the reaction course between ozone and theobroma fat. The reaction was followed up to peroxide index values of 544 mmol-equiv/kg. The intensities of olefinic proton signals decreased with the gradual increase in ozone concentration until disappearing completely. The Criegee ozonides obtained at 87.4 mg/g of ozone doses were approximately 3.7 times higher than at the beginning of the reaction. The highest action spectrum of antimicrobial activity was obtained with the higher peroxide index. These results suggest that the ¹H NMR spectroscopic technique provides valuable information about of the ozonization grade of theobroma fat which produces an affective antimicrobial activity against *Candida albicans*.

KEY-WORDS: ¹H NMR - Microbiology - Peroxides index - Ozone - Ozonized theobroma fat.

1. INTRODUCTION

La grasa de teobroma ha sido utilizada ampliamente en las industrias alimenticia y farmacéutica como materia prima en la elaboración de bombones y supositorios vaginales, debido a que su punto de fusión de (33-35 °C) se encuentra muy cercano a la temperatura del cuerpo humano. (B.P., 2000a; Saavedra, 1997).

Al reaccionar el ozono con las grasas y aceites vegetales se forman una serie de productos oxigenados como peróxidos, ozónidos, aldehídos, ácidos carboxílicos entre otros (Bailey, 1978). Estas especies formadas pudieran ser las responsables de la actividad microbiológica que presentan los aceites vegetales ozonizados (Díaz, 2001; Lezcano, 1996).

Las propiedades químico-físicas de las grasas y aceites vegetales refinados son de gran importancia para su caracterización siendo de particular importancia la determinación del índice de peróxidos, el cual puede ser considerado como un parámetro químico de calidad (Hernández, 2004; Martínez, 2006). También, otro método utilizado en la caracterización estructural de las grasas y aceites vegetales lo constituye la técnica espectroscópica de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN ¹H), la cual permite identificar los productos formados durante la ozonización, de una forma rápida y sencilla (Díaz, 2003; 2005a).

Para predecir la probabilidad de tratar exitosamente una infección con un determinado agente antimicrobiano, es necesaria la determinación de su actividad antimicrobiana *in vitro* y de esta forma determinar la potencia del agente en solución y la sensibilidad del microorganismo a concentraciones conocidas del medicamento (Sechi, 2001). Se ha comprobado que sustancias ozonizadas como el aceite de girasol y el aceite de teobroma, poseen propiedades antimicrobianas *in vitro* contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis* y hongos dermatofitos (Contreras, 1989; Lezcano, 1998).

Es objetivo de este trabajo la obtención de la grasa de teobroma ozonizada a diferentes índice de

peróxidos y el seguimiento del grado de ozonización mediante la técnica espectroscópica de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN ^1H) y su evaluación microbiológica frente a la *Candida albicans*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

Se utilizó grasa de teobroma, obtenida de la Empresa de derivados del cacao "Rubén David Suárez Abella", Baracoa, Cuba. Los reactivos ácido acético glacial, cloroformo, yoduro de potasio, almidón y tiosulfao de sodio son calidad puro para análisis de la firma MERCK Alemana.

2.2. Procedimiento general de ozonización

La grasa de teobroma virgen (150 g) fue introducida en un reactor de burbujeo a una temperatura de 45 °C. La reacción de ozonización se realizó con las siguientes dosis de ozono aplicadas: 26,1; 29,6; 35,6 y 87,4 mg/g.

2.3. Generación de ozono

El ozono fue generado en un ozonizador TRAILIGAZ (Labo, Francia) 12-02, mediante el paso del oxígeno a través de este a un flujo constante de 30 L/h y un voltaje de 170 V. La concentración inicial de ozono fue de 71,3 mg/L, determinada mediante un equipo medidor de ozono OZOMAT de la firma ANSEROS, Alemania.

2.4. Determinación del índice de peróxidos (IP)

Se pesaron 0,5 g de muestra y se mezclaron con una disolución de ácido acético glacial-cloroformo 3:2 v/v. Se añadió 0,5 mL de una solución saturada de yoduro de potasio. La mezcla se dejó reposar durante dos minutos, se añadieron 30 mL de agua destilada y se valoró lentamente con una disolución de tiosulfato de sodio 0,1 M, agitando de forma continua hasta la casi desaparición del color amarillo. Se añadió 5 mL de una disolución indicadora de almidón y se continuó la valoración hasta la desaparición del color azul.

El IP fue calculado de la expresión:

$$IP=100 v / m;$$

donde v es el volumen en mL y m es la masa en g de la muestra pesada. El IP se expresa en mmol-equivalente de oxígeno activo por kg de muestra (B.P., 2000b). Los valores se calcularon por triplicados media \pm desviación estándar.

2.5. Mediciones de espectros de RMN ^1H

Los espectros de RMN ^1H se midieron en un espectrómetro Bruker 400 MHz Avance con transformada de Fourier. Se utilizó cloroformo deuterado CD_3CL como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Se utilizó un ancho de barrido de 5 KHz, pulsos de 60° (5 μs), 32 KBytes de memoria interna, ocho acumulaciones y 2 s de espera para la repetición del pulso. La señal de los protones metílicos fue utilizada como referencia para la obtención de las intensidades de cada señal del espectro.

2.6. Análisis microbiológico

Se determinó la actividad antimicrobiana de la grasa de teobroma ozonizada a diferentes índices de peróxidos frente a la cepa de levadura *Candida albicans* ATCC 10231. Se determinaron las Concentraciones Mínimas Inhibitorias por la técnica de difusión de agar (NCCLS, 1992) y las Concentraciones Mínimas Fungicidas por la técnica de macrodilución (NCCLS, 1997), expresando los resultados como mg de la sustancia evaluada por mL de medio de cultivo. Cada experimento fue realizado por triplicado.

3. RESULTADOS

3.1. Ozonización de la grasa teobroma ozonizada y determinación del IP

Las 4 muestras de grasa de teobroma ozonizada a diferentes dosis de ozono aplicadas, muestran los moles de doble enlace consumidos durante el tiempo de ozonización y el índice de peróxidos crecientes en un rango de 877 a 1 544 mmol-equiv/kg, según el avance de la reacción (Tabla 1).

Tabla 1
Parámetros relacionados con la ozonización de la grasa de teobroma *

MUESTRA	DOA (mg/g)	TIEMPO (Horas)	Moles de dobles enlaces	IP (mmol-equiv/kg) (M \pm DS)
Grasa de teobroma virgen	0		0,218	0
Grasa de teobroma ozonizada 1	26,1	1,83	0,1086	877 \pm 11
Grasa de teobroma ozonizada 2	29,6	2,08	0,0643	1 037 \pm 7
Grasa de teobroma ozonizada 3	35,6	2,50	0	1 495 \pm 1
Grasa de teobroma ozonizada 4	87,4	6,13	0	1 544 \pm 8

Abreviaturas: DOA: Dosis de ozono aplicada; IP: índice de peróxidos para tres determinaciones; M \pm DS: Media \pm Desviación estándar.

3.2. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear protónica (RMN ¹H) de la grasa de teobroma virgen y ozonizada. Valor de intensidad de las señales

En el espectro de RMN ¹H representativo de la grasa de teobroma virgen se muestra en la figura 1a, donde se puede observar la señal singlete en $\delta = 7,26$ ppm pertenece al cloroformo deuterado (CD₃CL), una señal en $\delta = 5,34$ ppm correspondiente a los protones olefínicos $-\text{CH}=\text{CH}-$, un multiplete en $\delta = 5,27$ ppm correspondiente a los protones metínicos $-\text{CH}-\text{OCO}$ de la molécula de glicerol y una señal doblete de doblete en $\delta = 4,15$ ppm y $\delta = 4,28$ ppm de los protones metilénicos $-\text{CH}_2-\text{OCO}$ del glicerol. A campos altos también pueden ser observadas una señal multiplete en $\delta = 2,77$ ppm del grupo metilénico que se encuentra entre los protones olefínicos $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$, un triplete en 2,31 ppm del grupo metileno en posición α con respecto al grupo carbonilo $-\text{CH}_2-\text{CO}$, un multiplete en $\delta = 2,01$ ppm correspondiente a los grupos metilénicos que se encuentran a ambos lados de los protones olefínicos $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$, un multiplete en $\delta = 1,60$ ppm perteneciente al grupo metilénico que se encuentra en posición β con respecto al grupo carbonilo $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}$, una señal en $\delta = 1,27$ ppm correspondiente a los grupos metilénicos $(-\text{CH}_2)_n$ de las cadenas de los ácidos grasos y una señal triplete en $\delta = 0,88$ ppm, correspondiente a los grupos metilos terminales $-\text{CH}_3$ de las cadenas acílicas.

El espectro de RMN ¹H de la grasa teobroma ozonizada con IP de 877 mmol-equiv/Kg se muestra en la figura 1b. El espectro mantiene las mismas señales comentadas para la figura 1a, pero producto de la ozonización aparecen nuevas señales como un triplete a $\delta = 9,76$ ppm típico de aldehídos, un multiplete en $\delta = 5,15$ ppm pertenecientes a los protones metínicos de los ozónidos y un multiplete en $\delta = 2,41$ ppm pertenecientes a los protones metilénicos de los ozónidos e hidroperóxidos.

Los valores de intensidad de las señales de los espectros de RMN¹H de las muestras obtenidas durante el proceso de ozonización de la grasa de teobroma ozonizada se muestran en la tabla 2. Se puede observar una desaparición de las señales de los protones olefínicos $-\text{CH}=\text{CH}-$ y de los gru-

pos metilénicos unidos a protones olefínicos como $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ y $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ a medida que aumenta la dosis de ozono aplicada. Con el avance de la reacción de ozonización aparecen tres nuevas señales como ozónidos, aldehídos e hidroperóxidos con su correspondiente incremento de intensidades.

3.3. Estudio microbiológico

Los valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Fungicida (CMF), frente al microorganismo *Candida albicans*, de la grasa de teobroma ozonizada se muestran en la tabla 3. A medida que aumenta el índice de peróxidos se puede observar una disminución tanto de la CMI como de la CMF.

Tabla 3
Comportamiento microbiológico de la grasa de teobroma ozonizada a diferentes índice de peróxidos, frente al microorganismo *Candida albicans**

IP (mmol-equiv/kg)	CMI (mg/ mL)	CMF (mg/ mL)
877	15	46,9
1 037	7,5	23,4
1 495	5	23,4
1 544	2	17,5

* IP: índice de peróxidos; CMI: Concentración Mínima Inhibitoria; CMF: Concentración Mínima Fungicida.

4. DISCUSIÓN

Durante la ozonización de la grasa de teobroma podemos observar que a medida que aumentan las dosis de ozono aplicadas y el tiempo de ozonización, la cantidad de moles de dobles enlaces que quedan sin reaccionar van disminuyendo de forma gradual con respecto a la grasa de teobroma virgen (Tabla 1) hasta alcanzar el valor de 0 moles. Este resultado coincide con lo reportado en la Tabla 2 donde los valores de intensidades de las señales de los protones olefínicos $-\text{CH}=\text{CH}-$ y de los gru-

Tabla 2
Valores de intensidad de las señales obtenidas mediante RMN ¹H de las muestras de grasa de teobroma virgen y grasa de teobroma ozonizada*

DOA		0	26,1	29,6	35,6	87,4
Grupos	$\delta^1\text{H}$	Intensidad de las señales de RMN ¹ H				
$-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$	2,01	4,6	2,8	0	0	0
$-\text{CH}_2-\text{CO}$	2,41	0	2,9	3,0	3,6	4,4
$-\text{CH}=\text{CH}-$	2,77	0,2	0	0	0	0
$-\text{CH}-\text{Ozónidos}$	5,15	0	1,1	2,3	3,3	4,1
$-\text{CH}=\text{CH}-$	5,35	5,31	2,4	1,9	0	0
R-COH	9,75	0	0,5	0,7	0,8	1,0

*Abreviaturas: DOA: Dosis de ozono aplicadas (mg/g); $\delta^1\text{H}$: Desplazamiento químico (ppm).

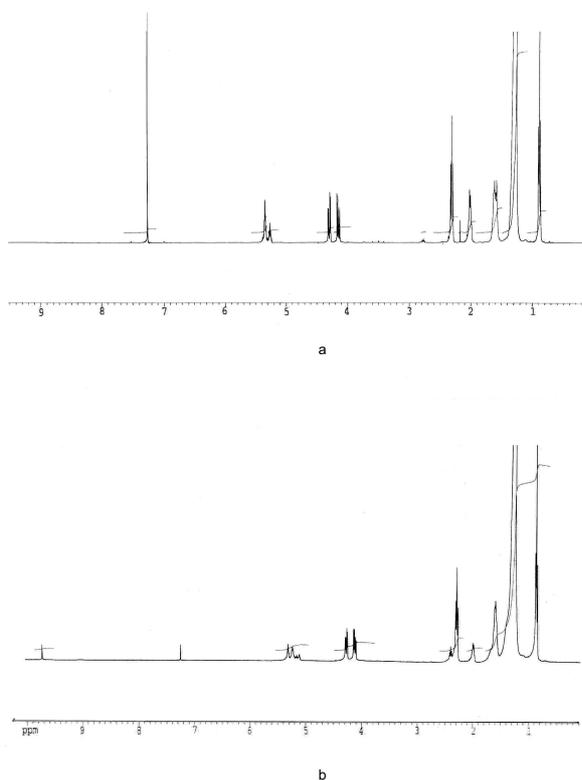


Figure 1

a) Espectro de RMN ^1H a 400 MHz de la grasa de teobroma virgen. b) Espectro de RMN ^1H a 400 MHz de la grasa de teobroma ozonizada IP 877 mmol-equiv/kg.

pos metilénicos que se encuentran a ambos lados de los protones olefínicos $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$ disminuyen hasta alcanzar el valor cero. Ocurre a su vez, un aumento en los índices de peróxidos, debido a que aumentan los compuestos oxigenados lo cual coincide con lo reportado por (Díaz, 2005 b,c) para la reacción del ozono con los ácidos grasos insaturados. Sin embargo, para las muestras 3 y 4 donde se han consumido todos los dobles enlaces se aprecia un aumento de los índices de peróxidos, lo cual puede deberse a que el ozono continúa reaccionando con los compuestos peroxídicos ya formados durante el transcurso de la reacción (Díaz, 2005d; Ledea, 2003).

El mecanismo de Criegee, que describe el proceso de ozonización para los compuestos insaturados, plantea que durante esta reacción se forman especies peroxídicas, aldehídos, ozónidos, peróxido de hidrógeno e hidroxihidroperóxidos entre otros (Criegee, 1975). Los espectros de RMN ^1H de la grasa de teobroma ozonizada muestran algunas señales de estos compuestos como ozónidos, aldehídos e hidroperóxidos las cuales son similares a las detectadas en aceite de coco ozonizado (Díaz, 2005b). Esta similitud pudiera ser debida a que la grasa de teobroma y el aceite de coco virgen presentan como ácidos grasos insaturados mayoritarios el oleico 35 y 11 %, respectivamente (Gunstone, 1994). El ácido oleico presenta una insaturación en el carbono 9, ocurriendo fundamentalmente por esta insaturación

la reacción del ozono con esta grasa y/o aceite (Bailey, 1978; Díaz, 2005e). Sin embargo, al comparar las señales de los compuestos oxigenados del espectro de RMN ^1H de la grasa de teobroma ozonizada con el espectro reportado en la literatura del aceite de girasol ozonizado, este último presenta otras señales como por ejemplo en la zona de los protones olefínicos $\delta = 5,55$ ppm, lo que pudiera ser debido a que el aceite de girasol virgen presenta un contenido mayoritario de ácido linoleico (60 %) el cual presenta dos insaturaciones en el carbono 9 y en el carbono 12, (Firestone, 1996) que al ozonizarse son los responsables de esta nueva señal (Díaz, 2005a).

En la muestra grasa de teobroma ozonizada 1, correspondiente a una dosis de ozono aplicada de 26,1 mg/g y un índice de peróxido de 877 mmol-equiv/kg, se pueden observar todas las señales encontradas para la grasa de teobroma virgen, a excepción de la señal triplete en $\delta = 2,77$ ppm, del grupo metilénico que se encuentra entre los protones olefínicos $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ y que en este caso corresponde al ácido linoleico, el cual se encuentra en muy baja proporción aproximadamente 2 % en la grasa de teobroma virgen (Gunstone, 1994) y reacciona muy rápidamente con el ozono, desapareciendo la señal del espectro de RMN ^1H y su valor de intensidad se hace igual a cero. Sin embargo, la señal multiplete en $\delta = 2,01$ ppm correspondiente a los grupos metilénicos que se encuentran a ambos lados de los protones olefínicos $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$, disminuye su valor de intensidad 1,6 veces con respecto a la grasa de teobroma virgen, pero no desaparece, lo cual pudiera ser debido a que pertenece fundamentalmente al ácido oleico que se encuentra en mayor proporción en la grasa de teobroma virgen (Gunstone, 1994).

En las muestras de grasa de teobroma ozonizadas 2, 3 y 4, correspondientes a las dosis de ozono aplicadas de 29,6; 35,6 y 87,4 mg/g y con índices de peróxidos 1 037, 1 495 y 1 563 mmol-equiv/kg respectivamente, se pueden observar las nuevas señales de los compuestos formados durante la reacción de ozonización. Se detectó una señal metilénica en $\delta = 2,41$ ppm, perteneciente a los protones de los hidroperóxidos y ozónidos $-\text{CH}_2-\text{CO}$, otra señal en $\delta = 5,15$ ppm, correspondiente a los protones metínicos de los ozónidos $-\text{CH}-\text{ozónidos}$ y una señal triplete en $\delta = 9,76$ ppm $\text{R}-\text{COH}$, perteneciente a los protones de los aldehídos. Estas dos últimas señales en $\delta = 5,15$ ppm y en $\delta = 9,76$ ppm, también fueron detectadas en los espectros obtenidos durante la ozonización de sustancias patrones como el linoleato de metilo (Díaz, 2003).

La señal de los protones metínicos de los ozónidos, que aparece después de la ozonización, tiene un comportamiento ascendente, a medida que se aumenta la dosis de ozono aplicada. Los ozónidos constituyen uno de los productos de reacción obtenidos mediante el mecanismo de (Criegee, 1975) y presentan actividad germicida frente a varios microorganismos (Díaz, 2001), por lo que forman parte de los principios activos de las grasas y aceites ozonizados.

Al aumentar la dosis de ozono aplicada, las muestras 3 y 4 de grasa de teobroma ozonizada tienen favorecidas la formación de ozónidos, aldehídos y los valores de intensidad de la señal metilénica en $\delta = 2,41$ ppm, perteneciente a los protones de los hidroperóxidos y ozónidos $\text{CH}_2\text{-CO}$, a pesar que se han consumido todos los dobles enlaces (Tabla 2). Esto pudiera deberse a que el ozono continua reaccionando con los compuestos peroxídicos ya formados durante el transcurso de la reacción (Díaz, 2005d; Ledea, 2003).

La grasa de teobroma ozonizada a medida que aumenta el índice de peróxidos presenta un comportamiento de inhibir o eliminar el crecimiento del microorganismo *Candida albicans* lo cual puede ser observado en la tabla 3. La CMI disminuye 7,5 veces y la CMF 2,7 veces al comparar las grasas de teobroma ozonizadas muestra 1 con IP 877 con la muestra 4, IP 1 544 mmol-equiv/kg. Este resultado es una evidencia de que los compuestos oxigenados formados durante la ozonización, son los responsables del efecto antimicrobiano de esta grasa de teobroma ozonizada.

5. CONCLUSIONES

- Al avanzar la reacción de ozonización de la grasa de teobroma, aumenta el índice de peróxidos, debido a la formación de compuestos oxigenados como ozónidos, hidroperóxidos y aldehídos, lo cual fue detectado y cuantificado mediante la técnica espectroscópica de RMN¹H.
- La grasa de teobroma ozonizada tiene efecto antimicrobiano frente a la *Candida albicans*, por lo que pudiera utilizarse en la preparación de supositorios vaginales.

BIBLIOGRAFÍA

- Bailey PS. 1978. Ozonization in Organic Chemistry, Vol. 1 y 2. Academic Press, New York, USA.
- British Pharmacopeia. 2000a. Monographs. Vaginal preparation. Vol II.
- British Pharmacopeia. 2000b. Peroxide Value, Appendices 1A, 1B.
- Contreras R, Gómez M, Menéndez S, Moleiro J, Roura G, Fernández DY, Eng L. 1989. Efecto de la sustitución del aceite de oliva por aceite de girasol en la actividad antimicrobiana del aceite ozonizado. Rev. CENIC C. Quím. 20, 121-124.
- Criegee R. 1975. Mechanism of Ozonolysis, 14 Ed., Angewandte Chemie Int, England.
- Díaz M, Lezcano I, Molerio J, Hernández F. 2001. Spectroscopic characterization of ozonides with biological activity. Ozone Sci. Eng. 23, 35-40.
- Díaz M, Hernández F, Ledea O, Molerio J, Sazatornil J. 2003. ¹H NMR study of methyl linoleate ozonation. Ozone Sci. Eng. 25, 121-126.
- Díaz M, Gavin J, Ledea O, Hernández F, Alaiz M, Garcés R. 2005a. Spectroscopic characterization of ozonated sunflower oil. Ozone Sci. Eng. 27, 247-253.
- Díaz M, Núñez N, Quincose D, Díaz W. 2005b. Study of three systems for ozonation of coconut oil. Ozone Sci. Eng. 27, 1-5.
- Díaz M, Gavín JA. 2005c. Ozonización del aceite de girasol. Seguimiento de la reacción por Resonancia Magnética Nuclear protónica. Rev. CENIC C. Quím. 36, 165-168.
- Díaz M, Gavín JA, Gómez M, Curtielles V, Hernández F. 2005d. Study of Ozonated Sunflower Oil Using ¹H NMR and Microbiological Analysis. Ozone Sci. Eng. 28, 1-5.
- Díaz M, Hernández R, Martínez G, Vidal G, Gómez M, Fernández H, Garcés R. 2005e. Comparative study of ozonized olive oil and ozonized sunflower oil. Ozone in Medicine III.3.20 (1-7). Proceedings IOA 17th World Congress, Ozone & Related Oxidants Innovative & Current Technologies, Stranbourg, France.
- Firestone D, Reina RJ. 1996. Authenticity of vegetable oils. In Food Authentication. p. 198, Ed., Ashurst P.R. and Dennis M.J., Chapman and Hall, London.
- Gunstone FD, Harwood JL, Padley FB. 1994. The Lipid Handbook, p. 60, 2nd Ed., Chapman & Hall, New York.
- Hernández R, Martínez G, Díaz M. 2004. Aspectos químico-físicos del aceite de girasol ozonizado. Rev. CENIC C. Quím. 35, 159-162.
- Ledea O. 2003. Estudio de la Composición Química del Aceite de Girasol Ozonizado OLEOZON®. Tesis Presentada en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Químicas. Ciudad de La Habana, Cuba.
- Lezcano I, Nuñez N, Gutiérrez M, Molerio J, Gómez M, Díaz W. 1996. Actividad in vitro del aceite de girasol ozonizado (OLEOZON) frente a diferentes especies bacterianas. Rev. CENIC C. Biol. 27, 46-49.
- Lezcano I, García G, Martínez G, Moleiro J, Zamora Z, Fernández C, González A, Castañeda D. 1998. Efectividad de la manteca de cacao ozonizada para el tratamiento de la candidiasis vaginal. Rev. CENIC C. Biol. 29, 206-208.
- Martínez G, Díaz M. 2006. Desarrollo y validación del método de oxidación ferrosa en xilenol naranja para la determinación de hidroperóxidos en aceite de girasol ozonizado. Rev. CENIC C. Quím. 37, 11-15.
- NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1992. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents. (Approved Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test). 1-7.
- NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. (Approved Standard M8-44). 13-24.
- Saavedra MI, López-Jiménez JA, Pérez-Llamas F, Zamora S. 1997. Características físico-químicas de diferentes tipos de grasas y aceites vegetales utilizados en la elaboración de bombones. Nutr. Hosp. XII, 270-273.
- Sechi LA, Lezcano I, Nuñez N, Espim M, Dupré I, Pinna A, Mollicotti P, Fadda G, Zanetti S. 2001. Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozone). J. Appl. Microbiol. 90, 279-284.

Recibido: Marzo 2006
Aceptado: Septiembre 2006