

EL OZONO COMO OXIDANTE DE LIPIDOS BIOLÓGICOS:
CAUSAS Y EFECTOS

PARTE B: EFECTOS NOCIVOS

Rafael F. Sala Rey y Giuseppe L. Squadrito¹

En el artículo anterior [1] se describió la química del ozono dando énfasis a la reacción con compuestos insaturados tales como los ácidos grasos presentes en la membrana celular. En el presente artículo se presenta información sobre los efectos nocivos de este oxidante, así como algunos mecanismos protectivos.

Los oxidantes fotoquímicos han probado causar peligrosos efectos en la salud humana, la flora, fauna y hasta sobre los materiales de construcción. Varios estudios han contribuido a puntualizar los efectos sobre la salud a concentraciones entre 200 y 400 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Tales concentraciones ocurren en los ambientes polucionados de las ciudades.

Analizaremos seguidamente los efectos del ozono:

1. *Efectos sobre plantas y materiales*

Los efectos negativos en la vegetación se han observado a concentraciones inferiores a 200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. La acción del ozono sobre las plantas puede explicarse por su alta reactividad hacia las olefinas. Y aunque la superficie

1 Pontificia Universidad Católica del Perú - Sección Química

de las hojas (cutícula) está recubierta de compuestos con pocos dobles enlaces (ceras), el ozono llega a penetrar a la planta mediante los estomas (orificios de respiración). Una vez dentro de la planta, el ozono puede afectar todos los niveles de la organización biológica, especialmente a nivel subcelular predisponiendo a las plantas a ataques fatales por insectos y/o enfermedades [2].

El ozono es muy reactivo hacia los elastómeros como las gomas naturales y polímeros sintéticos del butadieno, isopreno y estireno. La reacción del ozono con el doble enlace de estas moléculas produce ruptura de cadena, promueve la polimerización cruzada y vuelve quebradizo al elastómero.

El ozono puede también dañar fibras, tintes y pinturas. El efecto más importante sobre las fibras es su cambio de apariencia y de color, lo que ocurre antes que el deterioro de la estructura misma de la fibra [3].

2. *Efectos sobre el hombre y los animales*

El ozono alcanza niveles potencialmente dañinos en ciertos procesos industriales. Se han observado estos niveles en ozonizadores para el tratamiento de aguas, en equipos para el control de hongos y bacterias, en los aparatos de soldadura con arco eléctrico y en equipos eléctricos de alto voltaje tales como aparatos de rayos X, espectrógrafos, aisladores eléctricos, bujías de motores y lámparas de rayos ultravioleta. Jaffe [4] presentó un estudio completo de los efectos del ozono y otros oxidantes fotoquímicos, sobre el hombre y los animales, un resumen del cual se presenta en las Tablas 1 y 2.

Los efectos tóxicos del ozono se atribuyen a su acción oxidante sobre la membrana celular, siendo dos eventos los causantes principales: la peroxidación de lípidos y la oxidación de proteínas de la membrana.

El ozono produce una respuesta celular severa en los tejidos pulmonares alterando la permeabilidad de la pared celular y conduciendo, según la exposición, a un edema. El ataque directo a las proteínas celulares está aún en estudio [5].

3. *Efectos de la peroxidación de lípidos*

La peroxidación de lípidos ha sido identificada como la reacción deteriorativa básica en el mecanismo celular del proceso de envejecimiento, en el daño celular y pulmonar ocasionado por oxidantes en el aire, en algunas fases de arteriosclerosis, en hepatotoxicidad de hidrocarburos halogenados, en el daño al hígado inducido por etanol y en la toxicidad del oxígeno.

Las proteínas y enzimas en solución acuosa, cuando son sometidas a peroxidación de lípidos, desarrollan reacciones de polimerización, ruptura de la cadena polipéptida y cambios químicos en sus aminoácidos. La polimerización produce un incremento de varias veces el peso molecular de la enzima o proteína original. Este entrecruzamiento de aminoácidos y enzimas de las proteínas en la membrana celular y organelas altera considerablemente su actividad biológica.

Tabla 1 Efectos biológicos del ozono a exposiciones cortas

Concentración (ppm)	Período de exposición	Efectos
0,01	Instantáneo	Límite olfatorio para humanos sensibles
<0,02	Instantáneo	Ozono reconocido por 9 de 10 personas. Percepción del olor disminuye rápidamente
0,05	Instantáneo	Olor reconocido por todas las personas. La percepción dura aprox. 13 min.
0,05-0,10	Instantáneo	Olor pronunciado y desagradable. Irritación inicial de las mucosas (nariz y garganta)
0,20-0,50	3 hrs.	Efectos en parámetros de visión de voluntarios. Pronunciados a 0,35 y 0,50 ppm
0,20-0,25	30 min.	Esferitosis de eritrocitos en animales y hombres
0,28	30 min.	Sequedad y escozor fuerte de la garganta y nariz
0,48-0,72	30 min.	Irritación del sistema respiratorio
0,60-0,80	2 hrs.	Cambios significativos en la función del pulmón. Dolor en el pecho, irritación de la tráquea y tos, desaparición luego de 24 hrs.
1,0	4 hrs.	Inicio de edema pulmonar, migración de leucocitos a espacios alveolares
1,50-2,00	2 hrs.	Cambios en la función pulmonar, dolor de pecho, sensación de gusto alterada. Pérdida de la coordinación, dificultad de expresión y articulación. Tos y fatiga durante dos semanas
6,8	4 hrs.	Concentración letal media (LC50) para ratones
8,2	4 hrs.	LC50 para ratas.

Tabla 2 Efectos biológicos del ozono a exposiciones prolongadas

Concentración (ppm)	Período de exposición	Efectos
0,10	1 semana (35 sem.)	Incremento de mortalidad en 20% en cobayos infectados con tuberculosis.
0,14 (ox. totales)	16 meses	Incremento de la formación de tumores pulmonares en ratones viejos.
0,20	5 hr/día (3 sem.)	Daño estructural en el tejido del miocardio de ratones y conejos.
0,25	14 semanas (expos.cont.)	Incremento de mortalidad en 30% de cobayos infectados con tuberculosis.
0,25 (ox. totales)	14 semanas	Aumento de ataques de asma en pacientes en especial en los días en que la máxima iguala o excede 0,25 ppm.
0,50	6 hr/día; 6 días/sem. 12 semanas	Reducción significativa del volumen de respiración forzada, obstrucción e irritación de bronquios y bronquiolos.
0,30 - 0,80 (prom. 0,55)	Exposición ocupacional crónica	Dolor de cabeza severo, fatiga, irritación de la garganta y constricción del pecho en soldadores de arco eléctrico.
0,80 - 1,70 (prom. 1,20)	Exp. ocup. crónica	Olor desagradable, irritación de mucosas, dificultad de respirar, ronquera.
1,54	6 hr/d; 6 d/sem. 18 semanas	Incremento de mortalidad, daño crónico a los pulmones con hemorragia y fibrosis en cobayos.
3,60 - 20,0	Pocas horas	Letal para animales de laboratorio pequeños.

Las biomembranas y organelas subcelulares son uno de los sitios de mayor daño por peroxidación de lípidos. Cabe señalar que las membranas de las organelas poseen una cantidad relativamente mayor de fosfolípidos que la membrana citoplasmática. En estas membranas, los lípidos no forman una bicapa molecular sino que se encuentran "trenzados" con las proteínas de la membrana. Además, los fosfolípidos de las organelas contienen más ácidos grasos polinsaturados (PUFA) que los de la membrana citoplasmática. Estos

hechos, explican la mayor susceptibilidad a la peroxidación de las membranas de las organelas, reportándose daños en las mitocondrias, microsomas y lisosomas [6].

Es conocido que los eritrocitos son lábiles a la peroxidación de lípidos, debido a la presencia de PUFA en su membrana y a que están expuestos directamente al oxígeno molecular a nivel de los alveolos pulmonares. Goldstein [7] propuso, la presencia de peróxido de hidrógeno en eritrocitos al inhalar aire polucionado con ozono. La peroxidación de lípidos conduce a una hemólisis del eritrocito. El mecanismo probablemente involucra el daño a la estructura lipídica de la membrana y la inhibición de la actividad enzimática por la peroxidación.

4. Arteriosclerosis y oxidación de LDL

Se ha sugerido que la peroxidación de lípidos está involucrada en el desarrollo de lesiones arterioscleróticas. En la arteriosclerosis, el colesterol se acumula en las paredes de las arterias formando placas voluminosas que obstaculizan el flujo de sangre hasta formar un coágulo. Esta obstrucción provoca un ataque cardiaco o una apoplejía. El colesterol de las placas ateromatosas procede de ciertas partículas que circulan por el torrente sanguíneo, las denominadas lipoproteínas de baja densidad (LDL). Se ha establecido que cuanto más elevado es el nivel sanguíneo de LDL, más rápido es el desarrollo de la arteriosclerosis.

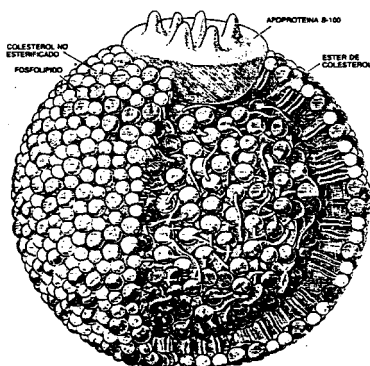


Fig. 1 LDL, el transportador principal de colesterol

La presencia de PUFA en las LDL convierte a esta partícula en un sitio potencial de ataque oxidativo. Varios investigadores proporcionan evidencias de que las LDL pueden ser oxidadas in vivo y que las formas oxidadas de LDL son las especies involucradas en la formación de lesiones arterioscleróticas tempranas; se postula que la peroxidación de lípidos de las LDL genera cambios que alteran el mecanismo de los receptores de LDL en la membrana celular, distorsionando el equilibrio entre el nivel de colesterol intercelular y el del colesterol circulante [8].

5. *Mecanismos protectivos*

La desintoxicación de especies peroxigenadas reactivas es uno de los requisitos de la vida aeróbica. El control de la formación de radicales libres dañinos generados por los agentes oxidantes (entre los que destaca el ozono) debe considerar la presencia de radicales libres fisiológicos que operan en situaciones biológicas normales, como el transporte de electrones, la producción de melanina y la fotosíntesis, entre otros. Las múltiples vías de defensa que han evolucionado forman un sistema antioxidante que incluye todos los sistemas de protección : prevención, interceptación y reparación. A continuación veremos algunos mecanismos protectivos.

5.1. *Control por estructura de la membrana.*

Hemos visto que los hidrógenos alílicos presentes en los PUFA de la membrana son susceptibles a reacciones radicalarias. Sin embargo, la estructura misma de la membrana y su interior hidrofóbico ayudan al control de la propagación de estas reacciones. La presencia de colesterol entre las colas de ácidos grasos del interior de la membrana, produce que éstas se encuentren separadas y empaquetadas con cierta rigidez. Además, la presencia de PUFA es variable, alternando con ácidos grasos saturados (los que no son reactivos). De aquí, la propagación de las reacciones radicalarias que se inician en la zona hidrofóbica de la membrana son inhibidas por la heterogeneidad química de esta zona y la separación espacial de PUFA [9].

5.2 Agentes quelatantes

La presencia de metales como el hierro y el cobre no sólo cataliza la ruptura de peróxidos, sino que también promueve el inicio de la reacción de peroxidación de lípidos, por lo que el acomplejamiento por formación de quelatos de estos metales disminuirá de dos formas la peroxidación: primero retardará la pérdida inicial del hidrógeno alílico y segundo, retardará la propagación por ruptura de peróxidos que ocurre durante la reacción en cadena. Los quelatantes biológicos incluyen a los compuestos que contienen azufre (cisteína y cisteamina) y nitrógeno (purina y pirimidina). Se ha probado que los ácidos nucleicos y el ácido úrico también poseen propiedades antioxidantes y quelatantes [10].

5.3. Antioxidantes

Los antioxidantes son las sustancias más importantes en el control y prevención de reacciones radicalarias en sistemas biológicos. Existen antioxidantes de ocurrencia natural y otros sintéticos de uso común en la industria. Algunos de ellos ejercen su efecto en medios acuosos y otros en medios no polares. El mecanismo de acción exacto varía con la reacción específica: previniendo la pérdida inicial de hidrógeno alílico, inhibiendo la ruptura de hidroperóxidos o secuestrando los radicales libres formados después de estas rupturas.

Los antioxidantes de mayor importancia en sistemas biológicos son los tocoferoles, el ácido ascórbico (Vitamina C), los compuestos que contienen tioles, y las sustancias químicas exógenas como el BHT o el BHA, incluyendo algunos compuestos que contienen selenio. El antioxidante soluble en lípidos más importante es el α -tocoferol (Vitamina E) presente en la zona hidrofóbica de la membrana celular. En medio acuoso el ácido ascórbico, junto con la glutatona, son los antioxidantes más importantes. El ácido ascórbico puede reaccionar con el radical de la Vitamina E y regenerar el tocoferol en la membrana. Los compuestos que contienen tioles (cisteína y cisteamina) son activos en ambientes polares y no polares, como sales son activos en medios acuosos, mientras que como bases libres funcionan en medio no polar. Algunos antioxidantes comunes se muestran en la Fig. 2

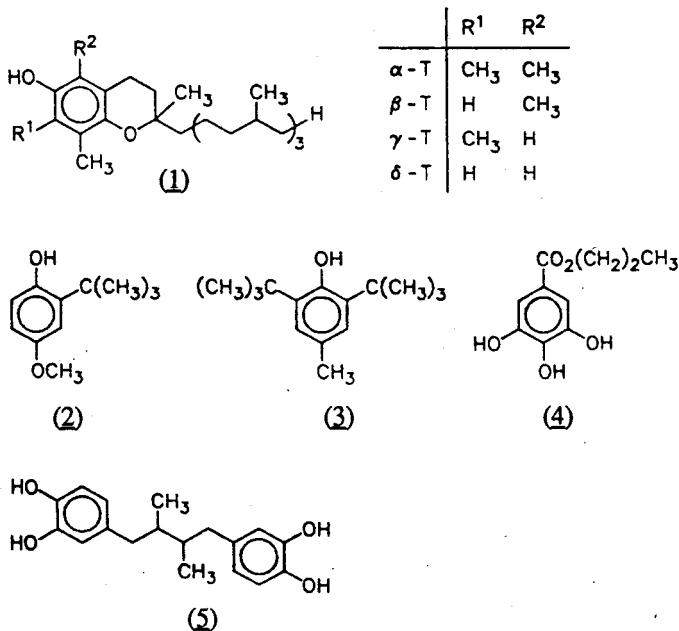


Fig. 2 Algunos antioxidantes inhibidores de reacciones de peroxidación: (1) tocoferoles; (2) BHA; (3) BHT; (4) galato de propilo; (5) NDGA ácido nordihidroguaiarcético.

Los efectos de los antioxidantes biológicos frente al ozono han sido estudiados por Giamalva y cols. [11]. Concluyeron que cuando el ozono presente en el aire es respirado, los niveles altos de antioxidantes encontrados en las células de los pulmones sirven de dos formas protectoras: Actuando como “frenos” de la propagación de la cadena antioxidante, es decir, secuestran los radicales libres producidos por la ozonólisis (la Vitamina E reacciona de esta forma en las membranas pulmonares). Además, pueden reaccionar directamente con el ozono sacrificándose para proteger otras sustancias (Vitamina C). Debido a las complejas interacciones entre los antioxidantes biológicos, el decaimiento de uno sólo de ellos producirá la caída de los otros. Así, la pérdida de ácido ascórbico, que regenera la Vitamina E, hace más susceptible a los lípidos de la membrana a la autoxidación. Otro hecho interesante es que el ácido úrico ha mostrado proteger al ácido ascórbico del daño oxidativo además de ser un secuestrante de radicales hidroxilo y peroxilo en fase acuosa [12]. Debidos a estos sinergismos, la ozonólisis directa de ácido ascórbico o

úrico produce un decaimiento en los niveles de otros antioxidantes y debilita las defensas del organismo contra el ozono y otras fuentes generadoras de radicales libres.

CONCLUSIONES

1. El ozono es una especie química muy reactiva, es fuertemente oxidante y se descompone en medio acuoso generando radicales libres.
2. La presencia de compuestos orgánicos volátiles y óxidos de nitrógeno en el smog fotoquímico de la tropósfera de ciudades, promueve el incremento del nivel de ozono troposférico.
3. Se considera que el mecanismo polar de Criegee es adecuado para la ozonólisis de olefinas, aunque existe evidencia de la generación de radicales libres.
4. Los ácidos grasos insaturados, componentes de los lípidos de la membrana celular son las sustancias más propensas a ataque oxidativo, siendo la peroxidación de estas sustancias la causa principal del proceso de envejecimiento celular. Esta reacción es catalizada por la presencia de radicales libres y es inhibida en parte por la presencia de antioxidantes biológicos.
5. El daño producido por el ozono a los lípidos biológicos involucra la actividad de radicales libres.
6. El ozono ha probado tener efectos nocivos sobre la vegetación y sobre ciertos materiales (elastómeros, tintes, etc.). Patológicamente, el ozono ataca directamente las células pulmonares alterando la permeabilidad de la pared celular. Además promueve el deterioro no sólo de los lípidos biológicos sino también de las proteínas de la membrana celular y organelas.
7. Otra zona accesible a la peroxidación de lípidos son las LDL. Aunque se han realizado estudios al respecto y su relación con la arteriosclerosis, no se ha explorado la influencia del ozono sobre estas partículas.
8. Existen mecanismos protectivos contra los efectos nocivos del ozono

como la presencia de antioxidantes biológicos (Vitamina E, ácido ascórbico, ácido úrico); agentes quelatantes de iones metálicos que catalizan la peroxidación, y la distribución aleatoria de PUFA en la estructura de la membrana celular.

BIBLIOGRAFIA

1. Sala, R.F., Squadrito, G.L., (1992) *Revista de Química*, VI, 97-108.
2. Skarby, L., Sellden, G., (1984) *Ambio*, 13, 69-72.
3. Grennfelt, P., Schjoldager, J., (1984) *Ambio*, 13, 61-68.
4. Jaffe, L.S., (1968) *Arch.Env.Health.*, 16, 241-255.
5. Knight, K.L., Mudd, J.B., (1984) *Arch.Biochem.Biophys.*, 229, 259-269
6. Demopoulos, H.B., (1973) *Fed.Proceedings.*, 32, 1859-1861.
7. Goldstein, B.D., (1973) *Arch.Env.Health.*, 26, 279-280.
8. Esterbauer, H. et al., (1990) *Chem.Res.Toxicology*, 3, 77-92.
9. Demopoulos, H.B., (1973) *Fed.Proceedings*, 32, 1903-1908.
10. Matsushita, S. et al., (1963) *Arch.Biochem.Biophys.*, 102, 446-454.
11. Giamalva, D. et al., (1985) *Biochem.Biophys.Res.Com.*, 133, 773-779
12. Meadows, J. et al., (1986) *Biochem.Biophys.Res.Com.*, 137, 536-541.