



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

1 de 1

Neiva, Noviembre 13 de 2018

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Ciudad

El (Los) suscrito(s):

Yohana Danitza Velandia Martinez, con C.C. No. 1094247822, autor(es) de la tesis y/o trabajo de grado o titulado Desarrollo y análisis de efectividad de un biodesinfectante a base de aceites esenciales frente a coliformes termotolerantes en aguas residuales generadas de lavanderías hospitalarias: una alternativa medioambientalista presentado y aprobado en el año 2018 como requisito para optar al título de Magister en Ingeniería y Gestión Ambiental;

Autorizo (amos) al CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN de la Universidad Surcolombiana para que con fines académicos, muestre al país y el exterior la producción intelectual de la Universidad Surcolombiana, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo de grado en los sitios web que administra la Universidad, en bases de datos, repositorio digital, catálogos y en otros sitios web, redes y sistemas de información nacionales e internacionales “open access” y en las redes de información con las cuales tenga convenio la Institución.
- Permita la consulta, la reproducción y préstamo a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato Cd-Rom o digital desde internet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer, dentro de los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia.
- Continúo conservando los correspondientes derechos sin modificación o restricción alguna; puesto que de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación del derecho de autor y sus conexos.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores”, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma:

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



CÓDIGO	AP-BIB-FO-07	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	1 de 3
---------------	---------------------	----------------	----------	-----------------	-------------	---------------	---------------

TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO: DESARROLLO Y ANÁLISIS DE EFECTIVIDAD DE UN BIODESINFECTANTE A BASE DE ACEITES ESENCIALES FRENTE A COLIFORMES TERMOTOLERANTES EN AGUAS RESIDUALES GENERADAS DE LAVANDERÍAS HOSPITALARIAS: UNA ALTERNATIVA MEDIOAMBIENTALISTA.

AUTOR O AUTORES: YOHANA DANITZA VELANDIA MARTINEZ

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
VELANDIA MARTINEZ	YOHANA DANITZA

DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
EDUARDO	PASTRANA

ASESOR (ES):

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre

PARA OPTAR AL TÍTULO DE: MAGISTER EN INGENIERÍA Y GESTIÓN AMBIENTAL

FACULTAD: INGENIERIA

PROGRAMA O POSGRADO: INGENIERIA AMBIENTAL

CIUDAD: NEIVA

AÑO DE PRESENTACIÓN: 2018

NÚMERO DE PÁGINAS:48

TIPO DE ILUSTRACIONES (Marcar con una X):

Diagramas___ Fotografías_X Grabaciones en discos___ Ilustraciones en general___ Grabados___
Láminas___ Litografías___ Mapas___ Música impresa___ Planos___ Retratos___ Sin ilustraciones___
Tablas o Cuadros X

SOFTWARE requerido y/o especializado para la lectura del documento:

Vigilada mieducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO

CÓDIGO	AP-BIB-FO-07	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	2 de 3
---------------	---------------------	----------------	----------	-----------------	-------------	---------------	---------------

MATERIAL ANEXO:

PREMIO O DISTINCIÓN (En caso de ser LAUREADAS o Meritoria):

PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:

	<u>Español</u>	<u>Inglés</u>		<u>Español</u>	<u>Inglés</u>
1.	<u>Bactericida</u>	<u>bactericide</u>	6.	_____	_____
2.	<u>Dosis</u>	<u>dosage</u>	7.	_____	_____
3.	<u>Numero más probable</u>	<u>most probable number</u>	8.	_____	_____
4.	<u>Agua residual</u>	<u>wastewater</u>	9.	_____	_____
5.	_____	_____	10.	_____	_____

RESUMEN DEL CONTENIDO: (Máximo 250 palabras)

La efectividad de un biodesinfectante a base de aceites esenciales de *Ocimum sp.* (Albahaca), *Thymus sp.* (Tomillo) y *Syzygium sp.* (Clavo) o en mezclas es comparando con Hipoclorito de Sodio comercial, y su efecto sobre coliformes termotolerantes en agua residual industrial de una lavandería hospitalaria. Además se evaluó cuál de los aceites esenciales es el más efectivo actuando de forma individual o combinada, estableciendo un relación entre sí, analizando si existían diferencias significativas bajo la aplicaron de ocho tratamientos: tres de aceites individuales, uno del hipoclorito de sodio, tres por combinación de dos aceites y uno por combinación de los tres aceites; con un tiempo de contacto para cada tratamiento de diez minutos, el estudio revela que el mejor efecto antimicrobiano del desinfectante se logró con el hipoclorito de sodio, en segunda instancia el tomillo, el clavo de forma individual y la combinación entre ellos (<1,8 NMP/ 100 mL) en cada uno; tanto que los tratamientos que contenían alguna concentración de albahaca, no presentaron comportamiento antimicrobiano.

ABSTRACT: (Máximo 250 palabras)

The present work was carried out in the Water, Food and Systems Analysis Laboratory called Agualimsu SAS, located in the city of Neiva, Colombia; The effectiveness of a biodesinfectant based on essential oils of *Ocimum spp.* (basil), *Thymus spp.* (thyme) and *Syzygium spp.* (clove) vs. Commercial sodium hypochlorite, on thermotolerant coliforms in industrial wastewater from a hospital laundry. In addition, it was evaluated which of the essential oils is the most effective individually or in combination. Eight treatments were applied: three of



DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO

CÓDIGO	AP-BIB-FO-07	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	3 de 3
--------	--------------	---------	---	----------	------	--------	--------

individual oils, one of sodium hypochlorite, three by oil combination and one by combination of the three oils; with a contact time for each treatment of ten minutes. The study revealed that the best antimicrobial effect of the disinfectant was achieved with sodium hypochlorite, thyme, clove and the combination between clove and thyme (<1.8 NMP / 100 ml) in each, in contrast to the treatments contained concentration of basil, did not have any antimicrobial behavior.

APROBACION DE LA TESIS

Nombre Presidente Jurado: MsC. Luz Marina Botero Rojas.

Firma:

Nombre Jurado: MsC. Constanza Vargas Castellanos.

Firma:

Nombre Jurado: MsC. Luz Marina Botero Rojas.

Firma:

**DESARROLLO Y ANÁLISIS DE EFECTIVIDAD DE UN BIODESINFECTANTE A
BASE DE ACEITES ESENCIALES FRENTE A COLIFORMES TERMOTOLERANTES
EN AGUAS RESIDUALES GENERADAS DE LAVANDERÍAS HOSPITALARIAS: UNA
ALTERATIVA MEDIOAMBIENTALISTA.**

YOHANA DANITZA VELANDIA MARTÍNEZ

**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE INGENIERÍA
MAESTRÍA EN INGENIERÍA Y GESTIÓN AMBIENTAL
NEIVA, COLOMBIA
2018**

DESARROLLO Y ANÁLISIS DE EFECTIVIDAD DE UN BIODESINFECTANTE A BASE DE ACEITES ESENCIALES FRENTE A COLIFORMES TERMOTOLERANTES EN AGUAS RESIDUALES GENERADAS DE LAVANDERÍAS HOSPITALARIAS: UNA ALTERNATIVA MEDIOAMBIENTALISTA.

YOHANA DANITZA VELANDIA MARTINEZ

Trabajo de grado, requisito Académico para optar el título de Magíster en Ingeniería y Gestión Ambiental

Director:

PHD. EDUARDO PASTRANA BONILLA

PROFESOR TITULAR

**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE INGENIERÍA
MAESTRÍA EN INGENIERÍA Y GESTIÓN AMBIENTAL
NEIVA, COLOMBIA
2018**

Dedicatoria

Esta investigación la dedico a mi mamá, mi tía Marlene y Mery, y a mi abuelita, por enseñarme a no darme por vencida; ellas son mi gran pilar, y a mi tío Leonel que me acompañará siempre desde el cielo.

A Fernando Peñaranda, por creer en mí, y ayudarme cada día a cumplir este objetivo.

Agradecimientos

Al supremo científico, Dios, que me regaló su sabiduría que emana del cielo, y que siempre me acompaña en la adversidad.

Al Dr. Eduardo Pastrana Bonilla, por moldear mi idea de investigación, y enseñarme que el límite es el cielo.

Resumen

La efectividad de un biodesinfectante a base de aceites esenciales de *Ocimum sp.* (Albahaca), *Thymus sp.* (Tomillo) y *Syzygium sp.* (Clavo) o en mezclas es comparando con Hipoclorito de Sodio comercial, y su efecto sobre coliformes termotolerantes en agua residual industrial de una lavandería hospitalaria. Además se evaluó cuál de los aceites esenciales es el más efectivo actuando de forma individual o combinada, estableciendo un relación entre sí, analizando si existían diferencias significativas bajo la aplicaron de ocho tratamientos: tres de aceites individuales, uno del hipoclorito de sodio, tres por combinación de dos aceites y uno por combinación de los tres aceites; con un tiempo de contacto para cada tratamiento de diez minutos, el estudio revela que el mejor efecto antimicrobiano del desinfectante se logró con el hipoclorito de sodio, en segunda instancia el tomillo, el clavo de forma individual y la combinación entre ellos (<1,8 NMP/ 100 mL) en cada uno; tanto que los tratamientos que contenían alguna concentración de albahaca, no presentaron comportamiento antimicrobiano.

Palabras clave: Aguas residuales; Bactericida, dosificación; número más probable.

Abstract

The present work was carried out in the Water, Food and Systems Analysis Laboratory called Agualimsu SAS, located in the city of Neiva, Colombia; The effectiveness of a biodesinfectant based on essential oils of *Ocimum* spp. (basil), *Thymus* spp (thyme) and *Syzygium* spp (clove) vs. Commercial sodium hypochlorite, on thermotolerant coliforms in industrial wastewater from a hospital laundry. In addition, it was evaluated which of the essential oils is the most effective individually or in combination. Eight treatments were applied: three of individual oils, one of sodium hypochlorite, three by oil combination and one by combination of the three oils; with a contact time for each treatment of ten minutes. The study revealed that the best antimicrobial effect of the disinfectant was achieved with sodium hypochlorite, thyme, clove and the combination between clove and thyme (<1.8 NMP / 100 ml) in each, in contrast to the treatments contained concentration of basil, did not have any antimicrobial behavior.

Keywords: Bactericide, dosage, most probable number, wastewater.

Contenido

ANEXOS.....	11
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN.....	12
1.1 Problema de investigación.....	13
1.2 Justificación.....	15
1.3 Objetivos.....	16
1.3.1 Objetivo general.....	16
1.3.2 Objetivos específicos.....	16
Capítulo 2 MARCO TEÓRICO.....	17
2.1 ACEITES ESENCIALES	17
2.1.1 Concepto.....	17
2.1.2 Aceite esencial de Albahaca	18
2.1.3 Aceite esencial Tomillo.....	19
2.1.4 Aceite esencial Clavo	20
2.2 EXTRACCIÓN DE AE POR HIDRODESTILACIÓN.....	21
2.3 COMBINACIÓN DE ACEITES	22
2.4 APLICACIONES	22
2.5 COLIFORMES TERMOTOLERANTES.....	23
CAPÍTULO 3 METODOLOGÍA	25
3.1 RECOLECCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL.....	25
3.2 EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES	26
3.2.1 Alistamiento de materiales:.....	26

3.2.2	Pesaje de material vegetal:	26
3.2.3	Montaje:	27
3.3	PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO	28
3.4	Toma de muestra y análisis de coliformes termotolerantes	29
3.5	Preparación de los tratamientos	30
3.6	Aplicación de tratamientos y análisis de coliformes termotolerantes	31
3.7	Tratamientos de los Diseños experimentales.....	34
3.8	Análisis estadístico:.....	34
CAPÍTULO 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		35
4.1	Coliformes termotolerantes con contaminación alta y media.....	35
4.2	Aplicación de tratamientos a coliformes termotolerantes.	35
4.3	Diseño experimental en el software Design-Expert.....	37
4.4	ANOVA para el modelo factorial 1f1, coliformes termotolerantes – tratamientos.....	37
CONCLUSIONES		39
REFERENCIAS		41
ANEXOS.....		46
Anexo 1. Tabla de Número más probable con combinaciones de resultados tubos positivos.....		46

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos individuales y combinados de aceites esenciales.....	36
Tabla 2. Ejemplos seleccionados para tres combinaciones de tubos positivos de cinco diluciones	49
Tabla 3. Resultados de los tratamientos con aceites esenciales Vs. Hipoclorito de sodio frente a coliformes termotolerantes.....	70
Tabla 4. ANOVA para el modelo factorial de tratamientos con respuesta de coliformes termotolerantes	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Albahaca morada- <i>Ocimum gratissimum</i> Fuente: L Virgili G.(2017)	41
Figura 2. Planta de Tomillo	42
Figura 3. Planta de Clavo.....	43
Figura 4. Tomillo para extracción de aceite esencial.....	44
Figura 5. Albahaca para extracción de aceite esencial.....	45
Figura 6. <i>Syzygium aromaticum</i> molido dos veces.....	45
Figura 7. Pesaje de material vegetal de especies.....	45
Figura 8. Balón aforado con material vegetal de especies.....	45
Figura 9. Método de hidrodestilación	46
Figura 10. Aceite esencial extraído por hidrodestilación	46
Figura 11 Tubos de caldo laurilsulfato con campana de Durham.....	48
Figura 12. Lavadora industrial (izquierda) y área de clasificado (derecha).	48
Figura 13. Turbidez y gas en laurilsulfato (izquierda) sin inocular (derecha)	48
Figura 14. Controles analíticos.....	48
Figura 15. Gráfica modelo Interacción factores aceites esenciales bajo la respuesta logaritmo de coliformes termotolerantes.	48

ANEXOS

Anexo 1. Tabla de Número más probable con combinaciones de resultados tubos positivos... 131

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN

El uso de diferentes aceites esenciales como el de *Ocimum sp.* (Albahaca), *Thymus sp.* (Tomillo) *Syzygium sp.* (clavo) como un biodesinfectante frente a las bacterias coliformes termotolerantes, provenientes del vertimiento de aguas residuales de lavandería de ropa hospitalaria, fundamentado en que los aceites esenciales poseen compuestos químicos bactericidas que ayudan a eliminar flora la indeseada; sin embargo, han sido usados ampliamente en la industria alimenticia, pero según búsqueda bibliográfica no se han usado en desinfección de aguas residuales, y los desinfectantes usados en la actualidad son el hipoclorito de sodio, el ácido hipocloroso, dióxido de cloro, ozono, yodo, permanganato, sales de amonio entre otros; siendo estos compuestos químicos, cancerígenos y tóxicos, además de ser altamente peligrosos para las personas que a diario los manipulan. (Rodríguez, 2007).

Se busca fabricar un biodesinfectante a base de aceites esenciales que puedan tener un amplio espectro o aumentar su efectividad, por lo anterior, se propone una alternativa medioambientalista que ayude a mitigar los impactos provenientes de los compuestos químicos utilizados en las plantas de tratamiento de aguas residuales hospitalarias (en este caso).

La investigación de esta problemática ambiental se realizó por el interés de dar a conocer nuevas alternativas de desinfección a la comunidad científica y también a las empresas, que de por su actividad posean coliformes termotolerantes en sus vertimientos.

Para llevar a cabo tal propósito, se realizaron muestreos de aguas residuales de la empresa SMART BUSSINES, se llevó al laboratorio y se aplicó la técnica de número más probable, con el fin de determinar cuál aceite esencial era más efectivo, determinando así si existían diferencias significativas entre ellos.

Este trabajo presenta los siguientes capítulos:

En el capítulo I se presenta el planteamiento de la investigación, el problema, los objetivos, la justificación, los alcances y limitaciones de la misma, además del marco teórico.

En el capítulo II se abordan los aspectos teóricos relacionados con los aceites esenciales, la limpieza y desinfección de ropa de clínicas, y descripciones de las características de la albahaca, tomillo y clavo.

En el capítulo III se describe la metodología usada en el laboratorio, incluyendo preparación y extracción de los aceites esenciales por arrastre de vapor, así como la técnica microbiológica de número más probable usada para la determinación de coliformes termotolerantes. En el capítulo IV se ofrecen los resultados, discusión e interpretación de los mismos, y finalmente se presentan las conclusiones y recomendaciones de la tesis.

1.1 Problema de investigación

En la actualidad, existe la resolución 0631 de 2015 según el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible), aplicable para vertimientos puntuales, a cuerpos de aguas superficiales y a los sistemas de alcantarillado público, esta resolución posee parámetros microbiológicos (coliformes termotolerantes) y fisicoquímicos específicos (acidez Total, alcalinidad total, dureza cálcica y total, color real, compuestos de fósforo y nitrógeno, algunos iones de metales y metaloides, DQO Y DBO entre muchos otros) según su actividad; pero en el área de los coliformes termotolerantes, aún no se ha establecido un valor límite máximo. Por lo tanto, al no existir éste, las diversas empresas vierten al ambiente desmedidamente una alta concentración de estos microorganismos.

La mencionada resolución aplica para actividades como: agroindustria, ganadería, minería, hidrocarburos, productos alimenticios y bebidas, fabricación y manufactura de bienes, servicios y otras actividades, dentro de estas actividades encontramos las compañías encargadas de la limpieza y desinfección de ropa y sábanas hospitalarias, y sus vertimientos

contiene grandes concentraciones de microorganismos patógenos, por contener sangre proveniente de heridas, enfermedades, cortes, entre otros, por lo tanto es necesario que las plantas grandes, diseñen, e implementen una planta de tratamiento de agua residuales (PTAR) para el tratamiento de sus vertimientos, en muchas PTAR se utiliza en la etapa de desinfección el hipoclorito de sodio en cualquiera de sus presentaciones (líquido, gas, o sólido), y al no realizar alguna rotación del desinfectante, los microorganismos desarrollan resistencia, convirtiéndose en una gran amenaza para poder combatir enfermedades, así perdiendo este su efectividad. De la anterior problemática, nace el interés de desarrollar y analizar un biodesinfectante a base de compuestos orgánicos biológicamente activos, extraídos de especies de plantas que presentan capacidad de eliminar bacterias. (Mcdonnell, 1999)

El estudio tiene como objetivos comparar, in vitro, la efectividad de un biodesinfectante a base de aceites esenciales de tomillo, albahaca y clavo Vs. el hipoclorito de sodio sobre Coliformes termotolerantes en aguas residuales generadas por lavanderías hospitalarias de contaminación intermedia, logrando así analizar si hay diferencias o no estadísticamente significativas entre el biodesinfectante y el hipoclorito de sodio.

Para poder así desarrollar las preguntas de investigación:

- ¿Qué aceite esencial se aplicaría, para ejercer mayor efectividad bactericida en los coliformes termotolerantes?
- ¿Cómo se establece la existencia de alguna diferencia significativa entre el biodesinfectante y el hipoclorito de sodio, respecto a la eliminación de coliformes termotolerantes?

1.2 Justificación

Los científicos se esfuerzan cada día por tratar de denominar y caracterizar la inmensidad de hierbas, arbustos, flores, frutos y semillas, para dar utilidad según sus propiedades, y resolver problemas cotidianos en la industria; por ello es necesario investigar y desarrollar una responsabilidad conservacionista a través de un desarrollo sostenible basada en la fabricación de nuevos productos, en beneficio del país donde se produce.

En nuestro país existen plantas aromáticas, usadas ampliamente en las diferentes industrias de alimentos, limpieza, fármacos, cosméticos, pero aun con el potencial que tiene Colombia, importa los aromas y esencias en países como Brasil y México, sin sacar provecho, pudiendo figurar entre ellos. Por tal motivo, se planteó fabricar un producto a base de aceites esenciales que sea provechoso al proceso de desinfección, aplicable a las aguas residuales de tipo hospitalario, y además sea amigable con el medio ambiente.

Aunque, hay un gran camino por recorrer en el ámbito del uso de biodesinfectante, en la mayoría de procesos de desinfección se usan productos cancerígenos, peligrosos y lo peor perjudiciales para el medio ambiente, por ejemplo, el cloro reacciona con los específicamente compuestos orgánicos sintéticos como los trihalometanos aunque se ha identificado a otros SPD tales como los ácidos haloacéticos. (Rodríguez, 2007). Esta es una pequeña investigación en comparación a todo el saber existente de los biodesinfectante, como por ejemplo ¿cuál aceites esenciales de plantas aromáticas posee un amplio espectro bactericida? ¿Es posible usarlos para la desinfección de superficies, ambientes y manipuladores? ¿Sería efectivo en aguas para riego? entre otras incógnitas que la comunidad científica con el desarrollo tecnológico y creación de nuevos proyectos de investigación irán resolviendo.

“La capacidad de los aceites para neutralizar los gérmenes es, hoy día, un hecho indiscutible”

(L' Aromathérapie Exactlyment por Dr. Peronel)

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Fabricar un biodesinfectante a base de aceites esenciales de albahaca, tomillo y clavo, y determinar si tiene acción bactericida en coliformes termotolerantes en aguas residuales de lavanderías hospitalarias.

1.3.2 Objetivos específicos

- Evaluar cuál aceite esencial aplicado ejerce mayor efectividad sobre los coliformes termotolerantes.
- Establecer una relación entre un biodesinfectante a base de aceites esenciales frente al hipoclorito comercial.
- Analizar si hay o no diferencias significativas de efectividad entre el biodesinfectante y el hipoclorito de sodio respecto al crecimiento de coliformes termotolerantes.

Capítulo 2 MARCO TEÓRICO

2.1 ACEITES ESENCIALES

2.1.1 Concepto

Los aceites esenciales (AE), son líquidos complejos que se obtienen a partir de diversas partes de las plantas como son: flores, yemas, semillas, hojas, ramas, corteza, hierbas, madera, frutos y raíces. (Diofanor Acevedo, 2013), por ejemplo: el aceite de albahaca proviene de las hojas y tallos, y el de la rosa proviene de los pétalos, otros aceites como el anís se produce en la semilla, y los cítricos en la cáscara, por lo anterior te das cuenta que el AE puede ser extraído de cualquier estructura anatómica vegetal, los AE son secretados y almacenados en estructuras especializadas de la planta.

En el año 1987, se realizó la primera investigación acerca de las propiedades antibacterianas que poseen los AE en un estudio del *Bacillus anthracis*, cuando se notó las propiedades del orégano, canela china, canela cingalesa, hierba angélica y el geranio alferiano (Richards, 2017). Décadas después descubrieron las propiedades antibacteriales y antifúngicas de algunos AE actúan como mecanismo de defensa contra patógenos de la planta, e incluso ayuda a ahuyentar insectos y animales indeseables (Sánchez, 2016) es decir, no solo dan un aroma favorable, sino tiene una función específica dentro de la planta.

Se pueden extraer de diversas compuestas plantas como: Anís Verde, Hinojo, Limón, Naranja. Hojas: Romero, Menta, Geranio, Árbol de té, Citronela, Salvia, Melisa y Geranio. Flores: Manzanilla, Mejorana, Jazmín, Rosas, Lavanda, Orégano, Tomillo y Clavo de Olor, en donde encontramos compuestos que le otorgan propiedades antioxidantes y bactericidas, por ejemplo: En el orégano, se ha identificado compuestos como el timol, γ -terpineno, cariofileno, oxido de cariofileno, trans- α -bergamoteno, eugenol. (Diofanor Acevedo, 2013). Recientemente, existen varios grupos funcionales importantes de aceites esenciales, incluidos aldehídos (cital, citronelal, cinamaldehído, benzaldehído, vainillina), alcoholes (geraniol, citronelol, mentol, linalool, terpineol,

borneol), ésteres (benzoatos, acetatos, salicilatos, cinamatos), cetonas (alcanfor, carvona, mentona, pulegona, tujona), óxidos (cineol), éteres fenólicos (anetol, safrol), fenoles (eugenol, timol, carvacrol), hidrocarburos (cimeno, myrcene, sabinene, storene), terpenos (limoneno, felandreno, pineno, canfeno, cedreno) y ácidos (benzoico, cinámico, mirístico, isovalérico). Todos los aceites esenciales consisten en uno o más de estos componentes como elemento clave y juegan un papel vital como antimicrobianos. (Eze, 2016), aunque faltan muchos por descubrir.

2.1.2 Aceite esencial de Albahaca

Es una planta originaria de las regiones tropicales y subtropicales del mundo, el género *Ocimum* proviene del antiguo nombre griego para la albahaca porque era una planta forrajera, es una arbusto de hasta 3 metros de altura, las hojas son de color verde intenso con aroma intenso, con flores pequeñas (*ver Figura 1*), y agrupadas en espigas situadas en el extremo de las ramas. (Virgili, 2017).



Figura 1: Albahaca morada- *Ocimum gratissimum* Fuente: L Virgili G.(2017).

Las plantas de género *Ocimum spp.* , es una hierba que se encuentra en toda la India, perteneciente a la familia Lamiaceae, (Khaliqa, Waseemb, Lonc, & Hassan, 2018) contiene alrededor de 200 especies de y hierbas y arbustos. La mayoría de las especies son nativas de regiones templadas tropicales y cálidas del mundo. (Lal, 2014) Es rica en compuestos fenólicos y usos medicinales, comúnmente llamado 'Tulsi' en hindi (Khaliqa, Waseemb, Lonc, & Hassan, 2018) contiene eugenol metil-eugenol, linalool, metilo chevicol, germacrene A y D, elemicina, β -elmene, (Z) -ocimina) (Lal, 2014) y este varía según la especie (LalSaran, y otros, 2017), además carbohidratos, Fibra, fósforo, calcio, proteína, hierro, betacaroteno, vitaminas B1 y B2 (Costa A. S., y otros, 2015) (Costa A. , y otros, 2016). Al poseer tantas especies existe una alta diferenciación entre ellas, se han realizado estudios genéticos encontrando que la diversidad genética es más alta para el contenido de aceite 56.09% seguido de la altura de la planta 18.94% y la más baja rango fue registrado para el número de ramas 7.55% (Singh, Lal, Maurya, & Chanotiya, 2017) , por lo anterior, se al extraer aceite in vitro, el rendimiento es diferente.

2.1.3 Aceite esencial Tomillo

El género *Thymus* (Figura 2.) pertenece a la familia *Lamiaceae* tiene alrededor de 215 especies, posee compuestos fenólicos, la mayoría de sus propiedades se deben a los aceites esenciales. Los aceites volátiles poseen antimicrobianos, actividades antitusivas, digestivas, expectorantes y carminativas. (Behbahani, y otros, 2013)



Figura 2. Planta de Tomillo Fuente: (Aza., 2005)

Se ha usado cromatografía de gases, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y espectrometría de resonancia nuclear magnética para investigar la volatilidad compuestos del aceite, y se encontró que el Carvacrol fue identificado como el compuesto principal en el aceite, representado por 80.9% del constituyentes totales, seguidos por p-cimeno (7.7%) (Bukvicki, y otros, 2018).

La nanoemulsión parcia amplificar la actividad antibacteriana del aceite esencial contra *E.coli* al aumentar su capacidad de alterar la integridad de la membrana celular. (R, L, H, A, & DJ, 2016). La especie de *Thymus algeriensis*, es un potencial conservante antifungico de queso blando, con una capacidad de preservación de 30 días a 4°C. (Bukvicki, y otros, 2018) También se ha desarrollado encapsular el aceite realizando una nanoemulsión y así mejorar el rendimiento funcional (Jema, y otros, 2017).

2.1.4 Aceite esencial Clavo

El clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) es un especie que pertenece a la familia *Myrtaceae*, se obtiene de un árbol perenne que florece dos veces al año. Los botones tienen un color inicial de color pálido (Figura 3.) y luego se va convirtiendo de color rojizo a marrón oscuro. (Gonzales & Malo, 2013) , el aceite esencial es un líquido amarillento, olor característico e intenso, sabor picoso y fresco, soluble en alcohol no en agua (Ciarlotti F, 2015) dice que contiene eugenol en un 83.6%, acetato de eugenilo en un 11.6% y cariofileno al 4,2% (Aguilar A, 2013). El mecanismo de acción es dado por sus compuestos fenólicos de la membrana del microorganismo reaccionando con los fosfolípidos y así cambian la permeabilidad de la membrana celular causando la muerte. (Aguilar A, 2013).



Figura 3. Planta de Clavo Fuente: (Roger, 1995)

Se ha demostrado las propiedades antimicrobianas en patógenos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (A.Heredia, y otros, 2018) también presenta actividad antifúngica frente a *Fusarium graminearum* presentes en el arroz. (Santamarina, Roselló, M, & Blázquez, 2016) También contra el patógeno *Porphyromonas gingivalis* causando contracción celular y lisis (Zhang, y otros, 2017).

2.2 EXTRACCIÓN DE AE POR HIDRODESTILACIÓN

Según la variedad del material vegetal, parte de la planta a emplear y estabilidad del aceite esencial que se pretenda obtener, se emplean diversos procedimientos físicos y químicos de extracción, donde su correcta aplicación será lo que determine la calidad del producto final entre los que encuentran: Destilación por arrastre de vapor, extracción con disolventes, extracción por fluidos supercríticos, extracción por microondas entre otros. Para el proyecto se utilizó el método de hidrodestilación.

El proceso de extracción por hidrodestilación es llamado en algunas veces como “destilación por arrastre de vapor, extracción por arrastre, hidrodestilación, hidrodifusión o hidroextracción (C., 2007). Su principio consiste en llevar el agua contenida en un recipiente

a la temperatura de ebullición, el material vegetal se encuentra en suspensión acuosa, los vapores generados son condensados y recogidos en la trampa de Clevenger. El material vegetal va en un balón, encima de una plancha calentadora, al calentarse el material vegetal se liberan los componentes volátiles entre los que se encuentra el aceite esencial, esta mezcla es llevada a un condensador donde se enfría lo que hace que caiga en la trampa de Clevenger.

(CALAO, 2014).

2.3 COMBINACIÓN DE ACEITES

Existen varios estudios donde se ha investigado el aumento del potencial bacteriano o fungicida al mezclar los aceites esenciales. Se han mezclado el aceite esencial de hinojo, romero y alcaravea con etilcelulosa para hacer láminas para empacar alimentos y evaluar las propiedades antimicrobianas contra bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) y Gram-negativas (*Escherichia coli*). (Kwiatkowski, Giedrys-Kalemba, Mizielińska, & Bartkowiak, 2016). También se ha evaluado el efecto inhibitor para *Fusarium oxysporum* con la mezcla de cuatro aceites esenciales de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), hierba de limón (*Cymbopogon citratus*), menta (*Mentha x piperita*) y eucalipto (*Eucalyptus globulus*) (AbhishekSharma, SasirekaRajendran, Sharma, & BishwajitKundu, 2017). Cabe señalar, que no los AE no solo se han mezclado con AE entre si, si no también con diferentes nanoparticulas como el oro, zinc, quitosano, platino, hierro, cobre y nanotubos de carbono, combinándolos para evaluar su actividad antimicrobiana (Gaspar, y otros, 2017) (Jogee, Ingle, & Rai, 2017) (Van Long, Joly, & Dantigny, 2016) (Rai, Ingle, Birla, Yadav, & Santos, 2016)

2.4 APLICACIONES

Hoy en día, los aceites esenciales (AE) han adquirido interés científico, porque además de ser compuestos de origen natural, tienen propiedades bactericidas y fúngicas; haciéndose popular en diferentes áreas como: la ciencia médica, la industria alimentaria, conservación de alimentos y fungicidas. (El Asbahani, 2015).

Los AE han sido usados de muchas formas a saber:

1. Conservación de alimentos: Se ha usado en tomate inoculado con *Escherichia coli* enterotoxigénica, mantenimiento de sus propiedades antioxidantes (María L. Luna Guevara, 2015) también en queso cottage, ricota y aceite de oliva (Asensio, 2013). También se ha conservado la carne de cuy (Vilcapoma & Oscar, 2016), y usando también nanoemulsiones (Prakasha, Baskaran, Paramasivam, & Vadivel, 2017)
2. Odontología: Se comprobó la efectividad de inhibición de los extractos de tomillo y romero frente a *Streptococcus mutans*, principal agente causante de caries dental. (Echanique, Eduardo, Salazar, & Jacqueline, 2016)
3. Agrícola: Se ha usado la actividad biofungicida del aceite de la cascara de la mandarina contra hongos como *Penicillium digitatum* y *P. italicum*, puesto que estos microorganismos han causado mundialmente pérdida económica en el sector citrícola durante la etapa de poscosecha. (Velásquez, Álvarez, Tamayo, & Carvalho, 2014)
4. Desinfección de hortalizas: Con el fin de evitar las posibles enfermedades transmitidas por alimentos, se ha realizado desinfección de repollo, repollo morado, lechuga y espinacas. (Chuquitarco, 2014) .

2.5 COLIFORMES TERMOTOLERANTES

El grupo de los coliformes consiste en varios géneros de bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. La detección de este grupo, se realiza por la fermentación de la lactosa, por la técnica de tubos de fermentación, este grupo es anaerobio facultativo, no formador de espora que producen gas y ácido a 35 °C por 48 horas; dentro de dicho grupo encontramos los coliformes termotolerantes, anteriormente denominados coliformes fecales, debido a su origen fecal y crecimiento a una temperatura a 44.5±0,2°C, pero se detectó que el género de *Klebsiella* por lo que se descubrió que también crecía a esta temperatura y se denominó coliformes termotolerantes. (Association, 2017).

2.6 HIPOCLORITO DE SODIO

Dicha comparación se realizará, debido que el hipoclorito es una sustancia altamente tóxica según la ATSDR – Agencia de sustancias tóxicas y el Registro de enfermedades de España, la exposición a altos niveles de hipoclorito de sodio puede producir irritación de los ojos, la piel y los tractos respiratorios y gastrointestinal y en algunos casos puede ser fatal, sus efectos tóxicos se deben principalmente a sus propiedades corrosivas, los sobrevivientes de intoxicaciones severas pueden quedar con cicatrices y estrechamiento permanentes del esófago, como se han reportados varios casos con intoxicaciones domésticas accidentales en la infancia por productos de uso en casa. (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, 2016). Se debe tener en cuenta que el uso del hipoclorito genera subproductos de la desinfección específicamente trihalometanos y ácidos haloacéticos; la cloramina está asociado a los dos compuestos anteriores sino también a nitritos; el bióxido de cloro genera cloritos y cloratos, mientras que la utilización de ozono genera bromatos, aldehídos, carbono orgánico biodegradable, ácidos cetoaldehídicos, bromoformos, peróxidos y epóxidos. (Rodríguez, 2007).

Durante la búsqueda bibliográfica no se encontró el uso de AE como una alternativa de desinfección en aguas residuales, se espera agregar conocimiento a la comunidad científica con dicho estudio.

CAPÍTULO 3 METODOLOGÍA

Para realizar la aplicación del aceite esencial o mezcla de los mismos a los coliformes termotolerantes, primero se debía recolectar el material vegetal de cada una de las especies, y llevar al laboratorio realizar extracción mediante hidrodestilación, después de obtenerlos, se prepararon los medios de cultivo correspondientes y finalmente se aplicó el tratamiento.

3.1 RECOLECCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

Se obtuvieron 500 g en peso fresco de las especies de *Thymus sp* (tomillo) (ver Figura 4), *Ocimum sp* (albahaca morada de hoja ancha) (ver Figura 5) y *Syzygium aromaticum* (clavo) (ver Figura 6), en la hierbateria del parque “los Libertadores” y en el centro de acopio de la ciudad de Neiva, Colombia. Las especies *Thymus vulgaris* y *Ocimum sanctum* se trabajaron en materia húmeda en contraste con *Syzygium aromaticum* que se dejó secando a temperatura ambiente por 8 días y se trituró en un molino casero dos veces.



Figura 4: Tomillo para extracción de aceite esencial Fuente: Autor (2018).



Figura 5: Albahaca para extracción de aceite esencial Fuente: Autor (2018).



Figura 6: *Syzygium aromaticum* molido dos veces Fuente: Autor (2018).

3.2 EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

La obtención de aceites esenciales se realizó con el método de hidrodestilación, en las instalaciones de laboratorio de la Universidad Corhuila sede Neiva de la siguiente manera:

3.2.1 Alistamiento de materiales:

Plancha de calentamiento, condensador, mangueras, fuente de agua , bomba sumergible de recirculación, balón fondo plano de capacidad de 2000 ml, planta, trampa clewenger , 25 litros de agua destilada, geles de refrigeración.

3.2.2 Pesaje de material vegetal:

Se pesaron 250 gr de *Thymus vulgaris*, y *Ocimum sanctum*, y de *Syzygium aromaticum* por separado. (ver Figura 7)



Figura 7: Pesaje de material vegetal de especies Fuente: Autor (2018).

3.2.3 Montaje:

Se agregó el material vegetal de la especie pesado al balón fondo plano de 2000 mL , se adicionó 1000 mL de agua destilada (*ver Figura 8*), se coloca el balón en la plancha a 107°C, el condensador y la trampa clewenger, se colocaron en el soporte universal con pinzas, y se instalaron las mangueras, al condensador y al balón, el proceso duro aproximadamente 4 horas, y el aceite queda en la trampa de clewenger (*ver Figura 10*). A continuación se presenta en la figura 9 el montaje de la hidrodestilación, con la flecha roja se señala la trampa de clewenger donde queda el aceite esencial.



Figura 8. Balón aforado con material vegetal de especies. Fuente: Autor (2018).



Figura 9. Método de hidrodestilación Fuente: Autor (2018).



Figura 10. Aceite esencial extraído por hidrodestilación Fuente: Autor (2018).

3.3 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Se utilizaron dos medios de cultivo, el laurilsulfato (fase presuntiva) y el EC (fase confirmativa).

La preparación del caldo laurilsulfato se llevó a cabo de la siguiente manera: Se pesaron 35.6 g de caldo Lauril sulfato , se adicionó agua destilada y se llevó a un volumen de 1L y se calentó suavemente hasta disolver. Luego se colocó el medio en tubos de ensayo de 16x150mL con campana de durham invertidos para cubrir al menos la mitad de los tres tercios (10 mL). Seguidamente se cerraron los tubos con tapas de metal o plástico resistentes al calor, se sacaron las burbujas y se autoclavarón a 15 libras de presión a 121°C de 12 a 15 min. Finalmente se dejó enfriar, y se midió el pH de medio, que se encuentre a 6,8 +/- 0,2 después de la esterilización. (se verificó el pH con buffer 4,01 y 6,98). (Stándar methods 9221 E), los primeros 5 tubos se prepararon con doble concentración 71,2 g/L. (ver *Figura 11*)

La preparación del caldo EC se llevó a cabo de la siguiente manera: Se pesaron 37 g de caldo Lauril triptosa, se adicionó agua destilada y se llevó a un volumen de 1L y se calentó suavemente hasta disolver. Luego se colocó el medio en tubos de ensayo de 16x150mL con campana de Durham invertidos para cubrir al menos la mitad de los tres tercios (10 mL). Seguidamente se cerraron los tubos con tapas de metal o plástico resistentes al calor, se sacaron las burbujas y se autoclavaron a 15 libras de presión a 121°C de 12 a 15 min. Finalmente se dejó enfriar, y se midió el pH de medio, que se encuentre a 6,9 +/- 0,2 después de la esterilización. (se verificó el pH con buffer 4,01 y 6,98). (Standard methods 9221 E).

Agua peptona al 1%: Se pesó 1 g de Agua peptona, y se adicionó agua destilada hasta completar un 1L, se dispensó en tubos de ensayo de 16x160 o 20x160 cantidades de 99±2 mL o 9±0,2 mL, se autoclavó a 15 libras de presión a 121°C de 12 a 15 min, se dejó enfriar, y se midió el pH, este debe estar a 7,2 +/- 0,2 después de la esterilización.

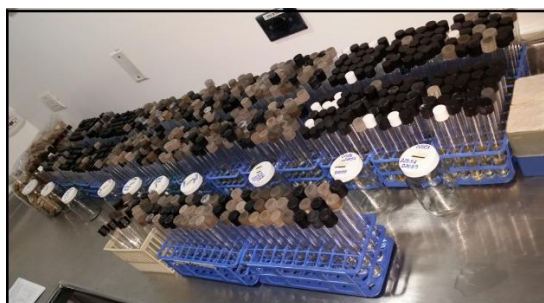


Figura 11. Tubos de caldo laurilsulfato con campana de Durham

3.4 Toma de muestra y análisis de coliformes termotolerantes.

Se tomaron dos muestras (200 mL) de agua residual industrial de tipo hospitalario en la empresa Smart Bussines, ubicada en la zona industrial de la ciudad de Neiva, con la misión de prestar el servicio de lavado a ropa de tipo hospitalario, dicha empresa actualmente posee una planta de tratamiento de aguas residuales.

Las muestras, se tomaron en la lavadora No.1 y No. 4 (marca Girbau), en el primer enjuague, sin detergente ni desinfectante, en la contaminación alta (ropa de cirugía de

doctores) y alta (ropa de pacientes en hospitalización), con el fin de elegir a cual muestra se le realizaban los tratamientos; en la figura No. 12 se presenta la fotografía de una lavadora industrial (izquierda) el área de clasificado (derecho), el recipiente fue estéril y se transportó refrigerada una temperatura de 4°C, y ese mismo día se realizó el análisis de coliformes termotolerantes. Después del análisis se elige cual muestra se le va a aplicar el tratamiento según el resultado, para realizar un nuevo muestreo igual, únicamente cambiando la cantidad es decir, 3000 mL.



Figura 12. Lavadora industrial (izquierda) y área de clasificado (derecha). Fuente: Autor (2018).

3.5 Preparación de los tratamientos

Después de la obtener 1 mL de cada uno de los aceite esenciales aproximadamente (*Thymus vulgaris*, *Ocimum sanctum*, *Syzygium aromaticum*) y en un frasco estéril se agregó 39 mL de aceite mineral ésta se denominó “solución patrón”, para el caso del hipoclorito de sodio estaba concentrado al 2.5%; se realizaron ocho tratamientos, estos se presentan en la tabla 1 a continuación:

Tabla 1: Tratamientos individuales y combinados de aceites esenciales.

Tratamiento	Cantidad de solución patrón (mL)
HIP*	15
TOM*	15
CLA*	15
ALB*	15
TOM+ CLA	7,5 + 7,5
TOM+ ALB	7,5 + 7,5
CLA+ ALB	7,5 + 7,5
TOM+ CLA+ALB	5+5+5

*HIP= hipoclorito ALB=albahaca CLA=clavo TOM= tomillos

3.6 Aplicación de tratamientos y análisis de coliformes termotolerantes

Para la aplicación de los tratamientos se adiciono en un frasco estéril 300 mL de la muestra y 15 mL del tratamiento, y se llevaron a agitación manual por 10 minutos, y se llevó a cabo el análisis de termotolerantes (Standard Methods SM 9221 E) de la siguiente manera:

Fase presuntiva

En 25 tubos que contiene caldo laurilsulfato con campana de durham organizados en filas de 5 tubos, se agregaron volúmenes de la muestra 10 mL, 1 mL y 0,1 y se realizaron tres diluciones seriadas en tubos que contenían 9 mL de agua peptona al 1%, y se incubó a una temperatura de $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, se tomaron como presuntivos positivos todos aquellos que presenten producción de gas y turbidez (figura 13), y se pasa a la etapa confirmativa.

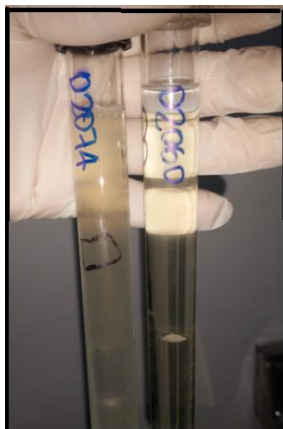


Figura 13. Presencia de turbidez y gas en caldo laurilsulfato (izquierda) sin inocular (derecha). Fuente: Autor (2018)

Fase confirmativa

Con ayuda de asas redondas estériles, se pasó una asada de cada tubo presuntivo a caldo EC, y se incubó en baño María a temperatura de $44,5^{\circ}\text{C}\pm 0,2^{\circ}\text{C}$; se tomó como coliformes termotolerantes todos los tubos que presenten turbidez y gas (figura 13), se reportaron los resultados según la tabla de Numero Más Probable (NMP) en 100 mL de muestra, los valores se encuentran en Anexo 1 teniendo en cuenta 25 tubos con tres diluciones seriadas (Cinco de 10.0 mL, y cinco 1 mL y cinco de 0.1 etc).Se calculó de acuerdo a la siguiente formula:

$$\text{NMP}/100 \text{ mL} = (\text{tabla NMP}/100 \text{ ml}) \times 10/V$$

Donde V= volumen de porción de muestra a la dilución seleccionada más baja:

Cuando más de tres diluciones son usadas en diluciones seriadas, se usó como directriz la Tabla 2 para seleccionar las tres diluciones apropiadas.

Tabla 2: Ejemplos Seleccionados para tres combinaciones de tubos positivos de cinco diluciones (Association, 2017)

Ejemplo	Volumen mL					Combinación de positivos	Índice NMP/100 mL	FORMULA
	10	1	0.1	0.01	0.001			
A	5	5	1	0	0	x-5-1-0-x	330	33X10/1
B	4	5	1	0	0	4-5-1-x-x	48	48X10/10
C	5	2	5	2	1	x-x-5-2-1	7000	70X10
D	4	5	4	5	1	x-x-4-5-1	4800	48X10/
E	5	4	4	0	1	x-4-4-1-x	400	40X10/1
F	4	3	0	1	1	4-3-2-x-x	39	39X10/10
G	4	3	3	2	1	x-x-3-2-1	1700	17X10/0, 1

Los controles analíticos utilizados fueron los siguientes: Agua destilada como blanco, control positivo la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 , y como control negativo a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; a continuación en la figura 14 se presenta los continuación se presenta las cepas ATCC en la presentación kwik- stik de la marca Microbiologics.

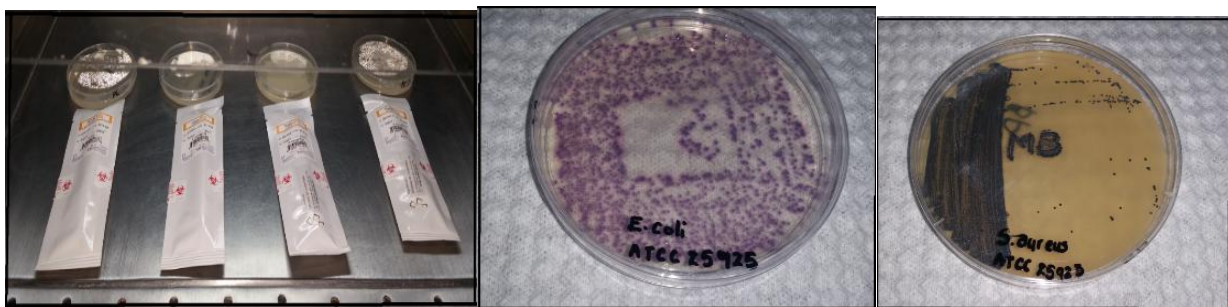


Figura 14. Controles analíticos. Fuente: Autor (2018)

3.7 Tratamientos de los Diseños experimentales.

La presente investigación comparará tres diferentes aceites esenciales vs el hipoclorito de sodio frente a coliformes termotolerantes. Se aplicará un diseño experimental A*B, donde el factor A serán los aceites esenciales y el factor B la concentración de coliformes termotolerantes en unidades NMP/100 mL , se dispuso de ocho tratamientos con tres repeticiones para un total de 24 unidades experimentales, además también se determinó por triplicado la concentración de coliformes termotolerantes de la muestra.

3.8 Análisis estadístico:

Para las 27 unidades experimentales de los 8 tratamientos, se ingresaron en el software Design- Expert, versión 7.0 para su respectivo análisis de varianza (ANOVA) y factorial con modelo 1f1 (factores A Y B con un solo nivel).

CAPÍTULO 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al realizar la comparación entre los resultados del hipoclorito de sodio y los aceites esenciales frente a coliformes termotolerantes es exclusiva.

4.1 Coliformes termotolerantes con contaminación alta y media.

Las muestras de agua residual en la contaminación con clasificado alto fueron 9,3 NMP de coliformes termotolerantes / 100 mL; y en la muestra clasificado medio fueron 170 NMP de coliformes termotolerantes / 100 mL; por lo anterior es justificable debido a que la ropa de cirugía en los doctores tiene un menor tiempo de contacto, y aunque esta puede contener fluidos corporales, se le realiza un proceso de esterilización; en contraste con la ropa de hospitalización de los pacientes que tiene un tiempo de contacto de 24 horas. Con los resultados anteriores se eligió trabajar con la muestra de agua residual clasificado medio dando un resultado de 54000 NMP de coliformes termotolerantes / 100 mL ($\log_{10} = 4.7$).

4.2 Aplicación de tratamientos a coliformes termotolerantes.

A continuación se presentan, en la tabla 3, los resultados de los coliformes termotolerantes después del tratamiento con los aceites esenciales individuales o combinados, los datos obtenidos como NMP/ 100 mL siguen una distribución asimétrica, por lo que es necesaria la normalización previa a fin de realizar el tratamiento estadístico. Para ello se transformaron los datos NMP/100 mL a logaritmo en base 10 (\log_{10} NMP/ 100 mL).

Tabla 3. Resultados de los tratamientos con aceites esenciales Vs. Hipoclorito de sodio frente a coliformes termotolerantes.

Tratamiento	Valor	NMP/ 100 mL	Logaritmo
HIP	1	<1,8	0,255
HIP	2	<1,8	0,255
HIP	3	<1,8	0,255
ALB	1	13,000	4,113
ALB	2	22,000	4,342
ALB	3	22,000	4,342
CLA	1	<1,8	0,255
CLA	2	<1,8	0,255
CLA	3	<1,8	0,255
TOM	1	<1,8	0,255
TOM	2	<1,8	0,255
TOM	3	<1,8	0,255
A+C	1	160,000	5,204
A+C	2	92,000	4,963
A+C	3	24,000	4,380
A+T	1	24,000	4,380
A+T	2	35,000	4,544
A+T	3	35,000	4,544
C+T	1	<1,8	0,255
C+T	2	<1,8	0,255
C+T	3	<1,8	0,255
A+C+T	1	54,000	4,732
A+C+T	2	54,000	4,732
A+C+T	3	54,000	4,732

4.3 Diseño experimental en el software Design-Expert.

A continuación se presenta en la tabla 3 se presenta los resultados de los coliformes termotolerantes después del tratamiento con los aceites esenciales individuales o combinados, los datos obtenidos como NMP/ 100 mL siguen una distribución asimétrica, por lo que es necesaria la normalización previa a fin de realizar el tratamiento estadístico.

Con los resultados obtenidos en logaritmo de coliformes termotolerantes durante la aplicación de los tratamientos, se tomaron 24 unidades experimentales para su respectivo análisis factorial en el modelo 1f1 (un solo factor y un nivel).

4.4 ANOVA para el modelo factorial 1f1, coliformes termotolerantes – tratamientos.

Los resultados para el análisis de varianza ANOVA (Tabla 4), aplicado a la respuesta de número más probable en relación a los tratamientos de aceites esenciales Vs. Hipoclorito de sodio, genero el valor de F de 627.37 lo cual implica que el modelo es significativo con valor $P < 0.0001$.

Tabla 4. ANOVA para el modelo factorial de tratamientos con respuesta de coliformes termotolerantes.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p- value Prob> F	
Model	113.05	7	16.15	627.37	< 0.0001	significant
A-aceite	113.05	7	16.15	627.37	< 0.0001	
Pure Error	0.41	16	0.026			
Cor Total	113.46	23				

Análisis de varianza para el diseño experimental 1f1 interacción aceites esenciales vs. Hipoclorito de sodio con respuesta al log de coliformes termotolerantes. La representación del modelo gráfico (*Figura 15*) Interacción de los factores aceites esenciales, hipoclorito de sodio con respuesta de logaritmo de coliformes termotolerantes, indica que todos los tratamientos tiene un efecto sobre los coliformes termotolerantes, para el hipoclorito de sodio, el clavo, el tomillo y la combinación de clavo con tomillo, evidenciaron un logaritmo de 0,255 de NMP de coliformes termotolerantes / 100 mL, lo cual indica un 100% de efectividad, sin diferencias significativas entre ellas.

En contraste para tratamientos que contenía albahaca, evidenciaron un logaritmo entre 4,113 y 5,204 lo cual indica que no existe ningún tiempo de acción bactericida con respecto a la muestra (4,7), aunque la acción bactericida la albahaca ha sido demostrada por sus compuestos fenolicos como el eugenol metil-eugenol, linalool, metilo chevicol, germacrene A y D, elemicina, β -elmene, (Z) -ocimina (Lal, 2014), es posible que actue dependiendo de la matriz. Al inicio se esperaba que existiera un tipo de asociación entre los tres aceites esenciales, como ocurrió en la investigación de (AbhishekSharma, SasirekaRajendran, Sharma, & BishwajitKundu, 2017) y (Kwiatkowski, Giedrys-Kalemba, Mizielińska, & Bartkowiak, 2016), pero no ocurrió, tal vez por la diferenciación de los componentes de cada uno.

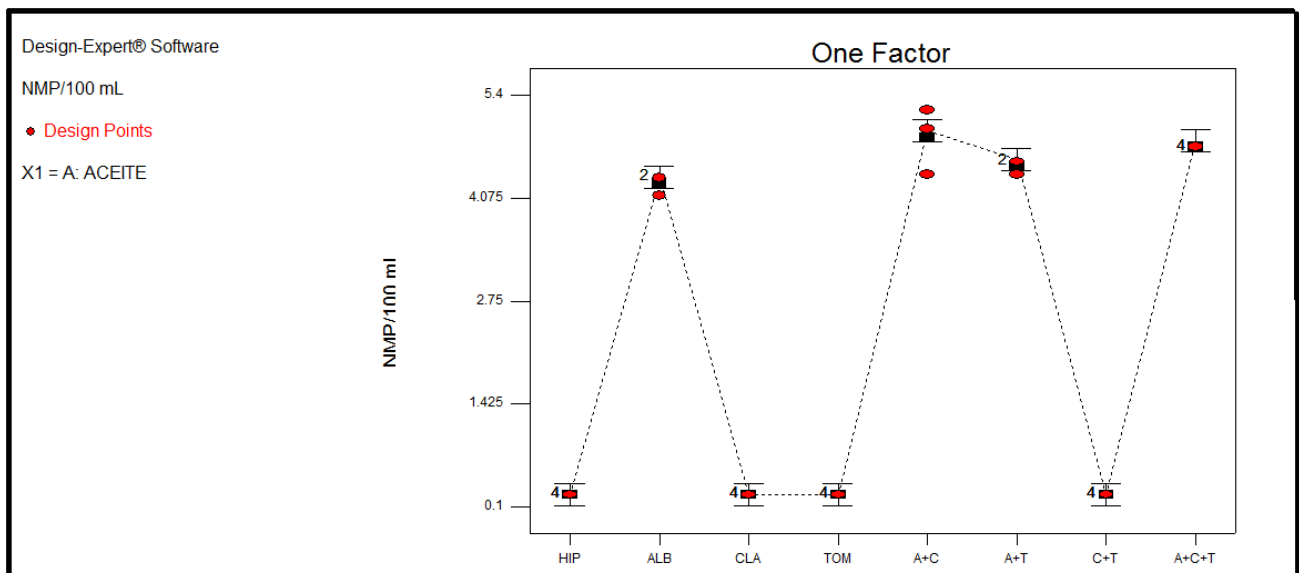


Figura 15. Gráfica modelo Interacción factores aceites esenciales bajo la respuesta logaritmo de coliformes termotolerantes.

Se recomienda realizar una investigación sobre la dosis mínima para inhibir coliformes termotolerantes, con el objetivo de validar cuál es la cantidad mínima de aceite esencial de tomillo y clavo, a diluir en aceite mineral.

CONCLUSIONES

- Los aceites esenciales de tomillo y clavo sí poseen una acción bactericida frente a las bacterias coliformes termotolerantes presentes en agua residual industrial de lavandería hospitalaria.
- Los aceites esenciales más efectivos fueron el tomillo y el clavo, con un crecimiento de coliformes termotolerantes del <1.8 NMP/ 100 mL, para ambos casos.
- Frente al hipoclorito se determinó que el aceite de tomillo y clavo tiene igual acción bactericida, puesto que su comportamiento para los tres casos fue igual.
- Existen diferencias significativas de efectividad del aceite esencial de clavo y tomillo, con respecto a la albahaca puesto que la anterior no presentó acción bactericida frente a los coliformes termotolerantes.

DEFINICIONES

Agua peptona: El agua peptona es un medio de crecimiento mínimo, usado también para realizar diluciones.

Agua residual no domestica: Son aguas procedentes de actividades industriales, comerciales o de servicios distintas a las que constituyen aguas residuales domesticas.

Antimicrobiano: Que impide la formación o el desarrollo de los microbios.

Caldo Ec: Caldo de confirmación para coliformes termotolerantes usado a $44,5\pm 0.2$.

Caldo lauril: Caldo presuntivo para coliformes totales y termotolerantes.

Campana de durham: Tubo de vidrio, insertado en los tubos de ensayo para determinar formación de gas.

Cepa control positivo: Cepa bacteriana que debe crecer en un medio de cultivo determinado.

Cepa control negativo: Cepa bacteriana no que debe crecer en un medio de cultivo determinado.

Colifomes: Grupo de especies bacterianas que tienen ciertas características bioquímicas en común e importancia relevante como indicadores de contaminación del agua y los alimentos.

Coliformes termotolerantes: Subgrupo del grupo de los coliformes que fermenta lactosa y crece a $44,5\pm 0.2$.

Número mas probable: Es una tecnica eficiente para estimar densidades de población que se emplea cuando una evaluación cuantitativa de elementos individuales. Se basa en el principio de que una única célula viva puede desarrollarse y producir un cultivo turbio. El método requiere la realización de una serie de diluciones en serie de la muestra de cultivo, en un medio líquido adecuado para el crecimiento de dicho organismo de un volumen diez veces mayor. Luego, se incuban las muestras de esos tubos y, pasado un tiempo, se examinan los tubos. Aquellos tubos que recibieron una o más células microbianas procedentes de la muestra, se pondrán turbios, mientras que los tubos que no recibieron ninguna célula permanecerán transparentes.

REFERENCIAS

- Van Long, N. N., Joly, C., & Dantigny, P. (2016). Active packaging with antifungal activities. *International Journal of Food Microbiology*, 73-90.
- A.Heredia, J., LucaCeseracciu, Puyol, S. G., C.Paul, U., AlejandroAlfaro-Pulido, & ChiaraGrande. (2018). Antimicrobial, antioxidant, and waterproof RTV silicone-ethyl cellulose composites containing clove essential oil. *Carbohydrate Polymers*, 150-158.
- AbhishekSharma, SasirekaRajendran, Sharma, A. ., & BishwajitKundu. (2017). Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 308-313.
- Acevedo, D., Navarro, M., & Monroy, L. (2013). Composición Química del Aceite Escencial de Hojas de Orégano (*Origanum vulgare*). *SciELO*, 43-48.
- Aguilar A, L. A. (2013). *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*. México: Universidad de las Américas Puebla.
- Asbahani, A. E., Miladi, K., W. B., Sala, M., Addi, E. A., & Casabianca, H. (2015). Essential oils: from extraction to encapsulation. *Elsevier*, 220–243.
- Asensio, C. M. (2013). Utilización de aceites esenciales de variedades de orégano como conservante antimicrobiano, antioxidante y de las propiedades sensoriales de alimentos : quesos cottage, ricotta y aceite de oliva. *Universidad Nacional de Córdoba Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 1-225.
- Association, A. P. (2017). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Waschinton: E.W. Rice, R.B. Baird, A.D. Eaton.

- Behbahani, M. H., Ghasemi, Y., Khoshnoud, M. J., Faridi, P., Moradli, G., & Najafabady, N. M. (2013). Volatile oil composition and antimicrobial activity of two *Thymus* species. *Pharmacognosy Journal*, 75-79.
- Bukvicki, D., Giweli, A., Stojkovic, D., Vujisic, L., Tesevic, V., Nikolic, M., . . . D. Marin*, P. (2018). Short communication: Cheese supplemented with *Thymus algeriensis* oil, a potential natural food preservative. *Journal of Dairy Science*, 3859-3865.
- C., C. (2007). *Hidrodestilación de aceites esenciales: modelado y caracterización*. España: Universidad de Valladolid.
- CALAO, V. Y. (2014). *CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, COMPOSIÇÃO E*. Santarém, Pará : UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ .
- Chuquitarco, M. (2014). Aplicación de aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) en cuatro tipos de hortalizas: col de repollo (*Brassica oleracea* var. *capitata* cv. bronco) , rubra) , col morada (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. lechuga Iceber. *Universidad Técnica de Ambato*, 1- 228.
- Ciarlotti F, G. H. (2015). *Ayurveda y plantas medicinales*. Argentina: Ediciones Lea.
- Costa, A. S., Arrigoni-Blank, M. d., Filho, J. L., Santana, A. D., Santos, D. d., Alves, P. B., & Blank, a. A. (2015). Chemical Diversity in Basil (*Ocimum* sp.) Germplasm. *The Scientific World Journal*, 1-9.
- Costa, A., Arrigoni-Blank, M., Blank, A., Silva, M., Pinto, J., & Santos, D. (2016). Volatile profile of basil cultivars and hybrids. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 315–322.
- Diofanor Acevedo, M. N. (2013). Composición Química del Aceite Escencial de Hojas de Orégano (*Origanum vulgare*). *Scielo*, 43-48 .
- Echanique, E., Eduardo, H., Salazar, O., & Jacqueline, E. (2016). “Efectividad de inhibición

del extracto de tomillo y oregano (AL 10%) frente a *Streptococcus mutans* en 20 muestras. *Universidad central de Ecuador*, 1-71.

El Asbahani, M. K. (2015). Essential oils: from extraction to encapsulation. *Elsevier*, 220–243.

Eze, U. (2016). In vitro Antimicrobial Activity of Essential Oils from the Lamiaceae and Rutaceae Plant Families Against β -Lactamase-Producing Clinical Isolates Of *Moraxella Catarrhalis*. *EC Pharmaceutical Science*, 325-337.

Gaspar, A., Wagner, F., Amaral, V., VA, K., JG, S., BF, C., & L, D. (2017). Development of a biocompatible magnetic nanofluid by incorporating SPIONs in Amazonian oils. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.*, 135-146.

Gonzales, A. E., & Malo, A. L. (2013). Extractos y aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y su potencial aplicación como agentes antimicrobianos en alimentos . *Temas selectos de Ingeniería de alimentos*, 35 - 41.

Jami, S. A., & Araujo, P. D. (2017). Efecto antimicrobiano del extracto, aceite esencial de jengibre (*zingiber officinale*) sobre cepas de *enterococcus faecalis*. *Dialnet*, 89-97.

Jema, M. B., FALLEH, H., SERAIRI, R., NEVES, M. A., SNOUSSI, M., ISODA, H., . . . KSOURI, R. (2017). Short communication: Cheese supplemented with *Thymus algeriensis* oil, a potential natural food preservative. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*.

Jogee, P., Ingle, A., & Rai, M. (2017). Isolation and identification of toxigenic fungi from infected peanuts and efficacy of silver nanoparticles against them. *Food Control*, 143-151.

Khaliqa, T., Waseemb, M. A., Lonec, A. M., & Hassan, Q. P. (2018). *Oscimum sanctum* extract inhibits growth of Gram positive and Gram negative bacterial strains.

Microbial Pathogenesis, 211–213.

- Kwiatkowski, P., Giedrys-Kalemba, S., Mizielińska, M., & Bartkowiak, A. (2016). Modification of pla foil surface by ethylcellulose and essential oils. *Journals Microbiology , Biotechnology And Food Sciences*, 440 - 444.
- Lal, R. (2014). Breeding for new chemotypes with stable high essential oil yield in *Ocimum*. *Industrial Crops and Products*, 41-49.
- LalSaran, P., VandanaTripathy, Saha, A., A.Kalariya, K., Suthar, M. K., & JitendraKumar. (2017). Selection of superior *Ocimum sanctum* L. accessions for industrial application for industrial application. *Industrial Crops and Products*, 700-707.
- María L. Luna Guevara, J. J. (2015). Eficiencia de la desinfección con aceites esenciales y. *Revista Argentina de Microbiología*, 251-255.
- Prakasha, A., Baskaran, R., Paramasivam, N., & Vadivel, V. (2017). Essential oil based nanoemulsions to improve the microbial quality of minimally processed. *Food Research International*, 613 401.
- R, M., L, G., H, R., A, A., & DJ, M. (2016). Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. *Food Chem*, 194-410.
- Rai, M., Ingle, A. P., Birla, S., Yadav, A., & Santos, C. A. (2016). Strategic role of selected noble metal nanoparticles in medicine. *Critical Reviews in Microbiology*, 696-719.
- Richards, A. (2017). *"Haz tus propios aceites de plantas"*. España: Babelcube Inc.
- Sánchez, M. (2016). *Los aceites esenciales - Una perfecta medicina de la naturaleza*. Francia: Balboa Press.
- Santamarina, M., Roselló, J., M, S. G., & Blázquez, .. (2016). Commercial *Laurus nobilis* L.

and *Syzygium aromaticum* L. Merr. & Perry essential oils against post-harvest phytopathogenic fungi on rice. *LWT - Food Science and Technology*, 325-332.

Singh, S., Lal, R., Maurya, R., & Chanotiya, C. (2017). Genetic diversity and chemotype selection in genus *Ocimum*. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic*.

Velásquez, M. A., Álvarez, R. M., Tamayo, P. J., & Carvalho, C. P. (2014). Evaluación in vitro de la actividad fungistática del aceite esencial de mandarina sobre el crecimiento de *Penicillium* sp. *Agroindustria*, 7-14.

Vilcapoma, B., & Oscar, R. (2016). Conservación de la carne de cuy (*cavia porcellus*) línea Perú en ambiente modificado con aceite esencial natural de romero (*rosmarinus officinalis*), y oregano (*origanum vulgare*). *Universidad Nacional del Centro del Perú*, 1- 119.

Virgili, G. (2017). *Guía medicinal y espiritual de plantas tropicales*. Republica dominicana: Angels Fortune.

Zhang, Y., YueWang, Zhu, X., Cao, P., Wei, S., & Lu, Y. (2017). Antibacterial and antibiofilm activities of eugenol from essential oil of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry (clove) leaf against periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Yi Zhang ; YueWang ; Xiaojing Zhu ; Ping Cao ; Shaomin Wei ; Yanhua Lu*, 396-402.

ANEXOS

Anexo 1. Tabla de Número más probable con combinaciones de resultados tubos positivos.

COMBINACIÓN DE POSTIVOS	INDICE NMP/100 mL	LIMITES DE CONFIANZA	
0-0-0	<1.8	-	6.8
0-0-1	1.8	0.090	6,8
0-1-0	1.8	0.090	6,9
0-1-1	3.6	0.70	10
0-2-0	3.7	0.70	10
0-2-1	5.5	1.8	15
0-3-0	5.6	1.8	15
1-0-0	2.0	0.10	10
1-0-1	4.0	0.70	10
1-0-2	6.0	1.8	15
1-1-0	4.0	0.71	12
1-1-1	6.1	1.8	15
1-1-2	8.1	3.4	22
1-2-0	6.1	1.8	15
1-2-1	8.2	3.4	22
1-3-0	8.3	3.4	22
1-3-1	10	3.5	22
1-4-0	10	3.5	22
2-0-0	4.5	0.79	15
2-0-1	6.8	1.8	15
2-0-2	9.1	3.4	22
2-1-0	6.8	1.8	17
2-1-1	9.2	3.4	22
2-1-2	12	4.1	26

2-2-0	9.3	3.4	22
2-2-1	12	4.1	26
2-2-2	14	5.9	36
2-3-0	12	4.1	26
2-3-1	14	5.9	36
2-4-0	15	5.9	36
3-0-0	7.8	2.1	22
3-0-1	11	3.5	23
3-0-2	13	5.6	35
3-1-0	11	3.5	26
3-1-1	14	5.6	36
3-1-2	17	6.0	36
3-2-0	14	5.7	36
3-2-1	17	6.8	40
3-2-2	20	6.8	40
3-3-0	17	6.8	40
3-3-1	21	6.8	40
3-3-2	24	9.8	70
3-4-0	21	6.8	40
3-4-1	24	9.8	70
3-5-0	25	9.8	70
4-0-0	13	4.1	35
4-0-1	17	5.9	36
4-0-2	21	6.8	40
4-0-3	28	9.8	70
4-1-0	17	6.0	40
4-1-1	21	6.8	42
4-1-2	26	9.8	70
4-1-3	31	10	70
4-2-0	22	6.8	50
4-2-1	26	9.8	70

4-2-2	32	10	70
4-2-3	38	14	100
4-3-0	27	9.9	70
4-3-1	33	10	70
4-3-2	39	14	100
4-4-0	34	14	100
4-4-1	40	14	100
4-4-2	47	15	120