

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA E INGENIERÍA DE ALIMENTOS



**FORMULACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
BACTERICIDA DE UN DESINFECTANTE PARA
SUPERFICIES OBTENIDO A PARTIR DE ACEITE
ESENCIAL DE EUCALIPTO (*Eucalyptus globulus labil*)**

PRESENTADO POR:

**MARIO JOSÉ CASTELLANOS FLORES
JENNIFER ALEXANDRA HERNÁNDEZ BATRES
ALEJANDRO JOSÉ SANDOVAL ANDRADE**

PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

INGENIERO QUÍMICO

CUIDAD UNIVERSITARIA, ABRIL DE 2019

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR:

M.Sc. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIA GENERAL:

LIC. CRISTÓBAL HERNÁN RÍOS BENÍTEZ

FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA

DECANO:

ING. FRANCISCO ANTONIO ALARCÓN SANDOVAL

SECRETARIO:

ING. JULIO ALBERTO PORTILLO

ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA E INGENIERÍA DE ALIMENTOS

DIRECTORA:

DRA. TANIA TORRES RIVERA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA E INGENIERÍA DE ALIMENTOS

Trabajo de graduación previo a la opción al Grado de:

INGENIERO QUÍMICO

Título:

**FORMULACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE
UN DESINFECTANTE PARA SUPERFICIES OBTENIDO A PARTIR DE
ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO (*Eucalyptus globulus labil*).**

Presentado
por:

**MARIO JOSÉ CASTELLANOS FLORES
JENNIFER ALEXANDRA HERNÁNDEZ BATRES
ALEJANDRO JOSÉ SANDOVAL ANDRADE**

Trabajo de Graduación Aprobado por:

Docente Asesor:

INGA. ANA BEATRIZ LIMA DE ZALDAÑA

San Salvador, abril 2019

Trabajo de Graduación Aprobado por:

Docente Asesor:

INGA. ANA BEATRIZ LIMA DE ZALDAÑA

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la Virgen María por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi camino, brindarme salud y las fuerzas necesarias en los momentos difíciles, por permitirme superar cada uno de los obstáculos y lograr concluir con éxito una etapa más en mí vida.

A mis Padres Francisco Castellanos y Claudia Margarita Grande, por ser mis modelos a seguir, a quienes agradezco por apoyarme en cada una de mis metas y sueños, por compartir tantos momentos de alegría y pena, y brindarme sus sabios consejos, su confianza, apoyo incondicional, amor, sacrificio, comprensión y las palabras de ánimo para salir adelante en las metas y sueños que me he propuesto. A mis hermanos, que son mi alegría y apoyo día a día, a mi tía Blanca Nohemy y a mis abuelitas Aminta Flores y Ana Gil, por tenerme presente siempre en sus oraciones, por tanto amor, sonrisas y consejos compartidos.

A mis compañeros Jennifer y Alejandro; por su paciencia y compromiso, a pesar de los momentos difíciles no podría haber pedido un mejor grupo y estoy agradecido de poder llamarles amigos.

A mis amigos que me han acompañado a lo largo de mi vida. En especial a ustedes: Delmy, Angie, Vanessa, Angélica, Eduardo y Silvia, gracias por cada una de las aventuras compartidas, risas, sueños, ánimos y su valiosa amistad sin ustedes mi historia dentro de la Universidad y fuera de ella no habría sido la misma.

A la Administración Nacional de Acueductos y Alcantarillados (ANDA), en especial al Lic. Douglas García por sus aportes para el desarrollo y culmen de este trabajo de grado. También a Abigail Anzora por su paciencia y apoyo en el desarrollo del trabajo de graduación.

A mi asesora Inga. Beatriz Lima, gracias por los conocimientos transmitidos y el apoyo en la realización de este Trabajo de Graduación y además a la Ing. Delmy Rico y a Ing. Eugenia Gamero y todos los docentes que formaron parte de mi formación.

Mario José Castellanos Flores.

Agradezco a Dios Todopoderoso por su misericordia al permitirme finalizar mi carrera y sostenerme durante las dificultades, a María Santísima por acompañarme durante esta etapa. A mi madre Mayra Batres por ser siempre una mujer valiente y enseñarme a luchar por mis sueños, por su apoyo cuando decidí estudiar esta carrera y por mantener ese apoyo hasta este momento.

A Jorge Pérez, si bien no es mi padre de sangre, es la persona que me ha criado y que me gusta considerar un amigo, gracias por su paciencia, su apoyo y sus consejos.

A mi Abuela Margarita, mis tíos abuelos Rosario e Ismael, a mis tíos Edward y Christian, a mi madrina Griselda Hernández por apoyarme con recursos cuando lo necesitaba además de su cariño y palabras en toda mi carrera y mi vida en general.

A mi amado novio y compañero de tesis Alejandro Sandoval, sin duda, conocerte fue de lo mejor que me dejó la universidad, agradezco tu incondicional apoyo durante las materias, tus palabras para animarme e impulsarme a seguir luchando por mis sueños.

A mi compañero de tesis Mario Flores por su incansable trabajo para la realización de este trabajo de graduación.

A mi amigo y ahora colega Adalberto Sandoval por sus consejos para la universidad, por tomarte el tiempo de ayudarme cuando lo necesitaba.

A mis compañeros de la universidad: Delmy, Angie, Caren, Samy, Oswaldo, Kevin y Eduardo por todos los momentos que pasamos estudiando y divirtiéndonos, por su compañía, consejos y apoyo durante este trayecto.

A mi hermano Alex Batres y mis amigos Xiomara Molina y Nicolás Anaya, porque a pesar de sus ocupaciones, me apoyaron y me alentaron a seguir adelante.

Finalmente, a todas las personas que se tomaron el tiempo de contribuir a este trabajo de grado: Ing. Beatriz Lima, por su guía durante este proyecto, a mi tío y docente el Ing. Fernando Teodoro Ramírez por sus enseñanzas y su colaboración con el uso del laboratorio durante nuestra investigación, a la Ing. Delmy Rico, Ing. Eugenia Gamero. A nuestra compañera, amiga y ahora colega Abigail Anzora por su ayuda y esfuerzo para la realización de las pruebas microbiológicas y análisis sensorial.

Jennifer Alexandra Hernández Batres.

Le agradezco a Dios por haberme permitido vivir hasta este día, haberme guiado a lo largo de mi vida, por ser mi apoyo, mi luz y mi camino y darme la fortaleza de seguir adelante en momentos de debilidad.

A mi madre María Beatriz Andrade Mena por todo el apoyo y esfuerzo a lo largo de mi vida, por creer en mí y mis sueños y alentarme en momentos difíciles, por darme la oportunidad de superarme a costa de sacrificar lo demás, por la maravillosa educación que me diste a pesar de estar sola y educar a mi hermano a la vez, por siempre ser ejemplo de integridad y los valores que debo poseer, por ayudarme a forjar carácter y comprender que en esta vida hay mucho más que el dinero y cosas materiales. A mi padre Oscar Sandoval quien llegó a mi vida recientemente y que sin el cual este sueño no se habría llevado a cabo. A mi abuela Miriam Elvira Mena por llenarme de cariño y ser un pilar en mi vida. A mi tía Cristina Andrade por su incondicional apoyo, amor y consejos estos últimos años y más aún durante esta investigación. A mi querido hermano Fernando Gabriel Andrade por alentarme y darme motivos para ser un buen ejemplo y hermano mayor para ti, para ser una mejor persona de lo que era.

A mi novia e incondicional compañera de tesis y amiga Jennifer Hernández Batres por compartir más de la mitad de la vida académica, estar ahí para escucharme en momentos difíciles y de frustración, ser mi apoyo, mi confidente y animadora, por ayudarme a superarme y aprender a ver al futuro con esperanza. A mi compañero de Tesis Mario Castellanos por ser un amigo y compartir juntos esta etapa final de nuestras carreras, apoyando y buscando incansablemente formas de conseguir lo necesario para llevar a cabo este trabajo de grado.

A mis amigos: Delmy, Angélica, Samuel, Oswaldo, Caren y Julio compañeros y futuros colegas de carrera por darme tantos momentos felices y de apoyo, A Carlos Duarte mi amigo y compañero de cuarto por estar ahí en esas noches de desvelo, ser un oído ante mis problemas y cuidarnos mutuamente en tiempos de enfermedad, además de darme consejos valiosos de vida. A Heidi, Erika, Karla, Ronald, Elsa, Stanley, Napoleón y Mauricio por ser mis amigos al inicio de mi vida universitaria en Santa Ana y enseñarme que existe la verdadera amistad durante una etapa muy dura en mi vida. A mis maestros durante mi vida académica: Lic. Albeño, Ing. Delmy Rico, Ing. Eugenia Gamero, Ing. Tania e Ing. Teodoro por retarme a superar mis límites y motivarme a ser un profesional de altura, conciencia e integridad. A mi asesora, Ing. Ana Beatriz Lima, por su apoyo y consejos durante esta investigación.

Alejandro José Sandoval Andrade.

RESUMEN

En la presente investigación se realizó la formulación y evaluación bactericida de un desinfectante natural basado en el aceite esencial de eucalipto (*Eucalypto globulus labil*) con el objetivo de proveer una alternativa a los desinfectantes de uso común.

La realización de esta investigación inicia con la construcción del equipo para la extracción del aceite esencial del cual se obtuvo un rendimiento del 2.308% p/p de aceite esencial respecto a la masa de hojas de eucalipto, después de lo cual se determinó la proporción de los demás componentes de la fórmula del desinfectante respecto al aceite esencial de Eucalipto, el cual es el vehículo del compuesto activo (Cineol), para posteriormente aplicar la metodología del diseño experimental, donde se establecen las distintas proporciones del componente activo y pH para formular los desinfectantes, definiendo como variables la concentración de componente activo con un rango de 0.5-5% v/v y el pH con un rango 4-6 generando quince formulaciones diferentes; posteriormente se evalúa la efectividad bactericida de los desinfectantes a través de pruebas de Ausencia-Presencia, Tiempo de contacto mínimo y la Evaluación de actividad antimicrobiana (Official Methods of Analysis AOAC) identificando a partir de los resultados como mejor formulación la de concentración 4 %v/v y pH de 5 con una efectividad contra *E. coli* y *S. aureus* de 99.999% de reducción de microorganismos, lo que lo hace apto para su uso como desinfectante. Para dicha formulación se determinó una homogeneidad y estabilidad de 2 meses, corrosividad de 0.02385 mm/año, capacidad desodorante efectiva, riesgo al contacto nulo, vida útil mínima de 3 meses. También se evaluó la carga contaminante en agua del proceso de manufactura del desinfectante obteniéndose como resultados; Aceites y grasas 14 mg/L, DQO 144 mg/L, DBO 110 mg/L, Solidos Suspendidos Totales <10.80 mg/L y Solidos Sedimentables <0.2 ml/L y el agua residual de su aplicación en un proceso de limpieza obteniéndose como resultados; Aceites y grasas 21 mg/L, DQO 206 mg/L, DBO 42.4 mg/L, Solidos Suspendidos Totales 12.50 mg/L y Solidos Sedimentables <0.2 ml/L. De los cuales ambas aguas cumplieron con la Norma Técnica para Regular Calidad de Aguas Residuales de Tipo Especial Descargadas al Alcantarillado Sanitario, (ANDA, 2004) pero incumplieron la NSO 13.49.01.09 Aguas Residuales Descargadas a un Cuerpo Receptor, (CONACYT, 2009) presentando incumplimiento del parámetro DBO en el agua de manufactura y de parámetros DQO y Aceites y Grasas en el agua de limpieza, por lo que no puede ser descargada directamente a un cuerpo receptor.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

TEMA	Pág.
INTRODUCCIÓN	i
OBJETIVOS	ii
Capítulo 1 Marco Teórico	1
1.1 Generalidades de Los Desinfectantes.....	1
1.1.1 Propiedades de los desinfectantes.....	2
1.1.2 Componentes de un desinfectante	3
1.1.3 Mecanismo de acción de los desinfectantes	4
1.1.4 Factores que influyen en la acción de un desinfectante.....	8
1.2 Generalidades de los Aceites Esenciales	9
1.2.1 Origen de los aceites esenciales.....	10
1.2.2 Métodos de Obtención de los aceites esenciales	11
1.2.3 Usos de los Aceites Esenciales	13
1.2.4 Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales	14
1.3 El Eucalipto (Eucalyptus)	15
1.3.1 Eucalyptus globulus labil.....	15
1.3.2 Aceite esencial Cineol (Eucaliptol)	20
1.4 Microorganismos Indicadores de Contaminación: E. coli y S. aureus	21
1.4.1 Escherichia coli.....	21
1.4.2 Staphylococcus aureus.....	22
Capítulo 2 Metodología de la Investigación	24
2.1 Metodología de la extracción del aceite esencial	24
2.2 Pruebas preliminares para establecer la proporción de cada constituyente en las formulaciones del desinfectante.....	26
2.2.1 Determinación de las proporciones utilizadas en la formulación	26
2.3 Diseño experimental para estudiar el efecto de la concentración de aceite esencial y el pH en la actividad antimicrobiana del desinfectante	29
2.4 Metodología de evaluación bactericida.....	31
2.4.1 Metodología de pruebas de Ausencia-Presencia	31
2.4.2 Metodología de pruebas de tiempo de contacto.....	32
2.4.3 Metodología cuantitativa de actividad bactericida	33
2.5 Metodología para establecer las propiedades físicas del desinfectante basado en aceite esencial de Eucalipto y su vida útil.....	34
2.5.1 Homogeneidad.....	34

TEMA	Pág.
2.5.2 Estabilidad	34
2.5.3 Corrosividad	34
2.5.4 Capacidad desodorante	35
2.5.5 Riesgo al contacto.....	35
2.5.6 Vida útil.....	36
2.6 Metodología para la determinación de los parámetros obligatorios de vertido de las aguas residuales.....	37
Capítulo 3 Fase Experimental	39
3.1 Extracción del aceite esencial	39
3.2 Preparación de las formulaciones del desinfectante obtenidas del diseño experimental.....	41
3.3 Determinación de la actividad bactericida	42
3.3.1 Pruebas de Ausencia-Presencia	42
3.3.2 Prueba de tiempo de contacto	45
3.3.3 Prueba Cuantitativa de la actividad bactericida.....	47
3.4 Determinación de propiedades físicas del desinfectante y su vida útil	47
3.4.1 Determinación de Homogeneidad	48
3.4.2 Determinación de Estabilidad.....	48
3.4.3 Determinación de Corrosividad.....	48
3.4.4 Determinación de capacidad desodorante	49
3.4.5 Determinación de Riesgo al contacto	49
3.4.6 Determinación de la Vida útil.....	50
3.5 Determinación de los parámetros obligatorios de vertido de las aguas residuales	50
Capítulo 4 Análisis y Discusión de Resultados.....	52
4.1 Resultados de la extracción del aceite esencial.....	52
4.2 Resultados de análisis cualitativo y cuantitativo de la actividad bactericida.....	53
4.2.1 Resultados de prueba de ausencia-presencia	53
4.2.2 Resultados de la prueba de tiempo de contacto	56
4.2.3 Resultados de prueba cuantitativa de actividad bactericida.....	57
4.3 Resultados de propiedades físicas del desinfectante y su vida útil.....	58
4.3.1 Homogeneidad.....	59
4.3.2 Estabilidad	59
4.3.3 Corrosividad	59

TEMA	Pág.
4.3.4 Capacidad desodorante	61
4.3.5 Riesgo al Contacto del desinfectante basado en aceite esencial de Eucalipto.....	64
4.3.6 Vida Útil del desinfectante basado en aceite esencial de Eucalipto	65
4.4 Resultados de los parámetros obligatorios de vertido de las aguas	
residuales.	67
Conclusiones.....	70
Recomendaciones.....	72
Bibliografía.....	74
Anexos.....	79
Anexo 1 Equipo de destilación por arrastre de vapor para extracción del aceite	
esencial de Eucalipto.....	80
Anexo 2 Acción de agentes físicos y químicos sobre los microorganismos.....	81
Anexo 3 Escala de turbidez McFarland.....	84
Anexo 4 Técnica de dilución en tubo	86
Anexo 5 Prueba de efecto corrosivo	87
Anexo 6 Procedimiento para la realización de un análisis sensorial hedónico	89
Anexo 7 Formato para la realización de un análisis sensorial hedónico	90
Anexo 8 Certificación de las cepas ATCC	91
Anexo 9 Resultados de análisis microbiológicos: prueba cuantitativa de actividad	
bactericida	97
Anexo 10 Resultados de análisis microbiológicos para estudio de vida útil.....	99
Anexo 11 Resultados de análisis de aguas	101

INDICE DE ILUSTRACIONES

ILUSTRACIÓN	CONTENIDO	Pág.
Ilustración 1.1	Eucalyptus globulus labil	15
Ilustración 1.2	Estructura química del 1,8-Cineol.....	17
Ilustración 2.1	Esquema del equipo de Extracción del aceite esencial de eucalipto (Eucaliptol)	25
Ilustración 2.2	Procedimiento de preparación del desinfectante	28
Ilustración 2.3	Esquematzación de proceso de prueba de ausencia-presencia	32
Ilustración 2.4	Esquematzación de prueba de tiempos de contacto.....	33
Ilustración 2.5	Esquematzación de prueba de Riesgo de Contacto.	36
Ilustración 3.1	Centro Tecnológico de Agricultura y Ganadería.....	39
Ilustración 3.2	Especie de eucalipto encontrada en CETAG.....	39
Ilustración 3.3	Esquema de proceso de recolección y preparación de materia prima...40	
Ilustración 3.4	Separación de aceite esencial de eucalipto del hidrolato.....	41
Ilustración 3.5	Desinfectantes a Evaluar	41
Ilustración 3.6	Flujograma del proceso experimental de la prueba Ausencia- Presencia de microorganismos expuestos al desinfectante basado en aceite esencial de Eucalipto.....	43
Ilustración 3.7	Llenado de los tubos con medio CTS.....	44
Ilustración 3.8	Tubos llenos con CTS	44
Ilustración 3.9	Formulaciones listas para ser dispensadas en los tubos de ensayo	44
Ilustración 3.10	Formulaciones conteniendo a los palillos contaminados con S. aureus y E.coli.....	45
Ilustración 3.11	Flujograma de proceso para prueba de tiempo de contacto de microorganismos contra el desinfectante basado en aceite esencial de Eucalipto	46

ILUSTRACIÓN	CONTENIDO	Pág.
Ilustración 3.12	Exposición de la cepa al desinfectante formulado.....	47
Ilustración 3.13	Piezas de metal sumergidas en desinfectantes.....	49
Ilustración 3.14	Panelista olfateando la superficie después de limpiar	49
Ilustración 3.15	Superficies de la piel expuestas al desinfectante	50
Ilustración 3.16	Limpieza de mesa de laboratorio con desinfectante basado en aceite esencial de Eucalipto	51
Ilustración 3.17	Muestra de agua recolectada del proceso de manufactura del desinfectante basado en aceite esencial de Eucalipto	51
Ilustración 4.1	Gráfico de Valoraciones al minuto 1 después de la operación de limpieza con el desinfectante basado en aceite esencial de Eucalipto ..	62
Ilustración 4.2	Gráfico de Valoraciones a los 10 minutos después de la operación de limpieza con el desinfectante basado en aceite esencial de Eucalipto...	63
Ilustración 4.3	Gráfico de Valoraciones a los 15 minutos después de la operación de limpieza con el desinfectante basado en aceite esencial de Eucalipto ..	63

INDICE DE TABLAS

TABLA	CONTENIDO	Pág.
Tabla 1.1	Principales sectores y ramas industriales donde se usan aceites esenciales y productos derivados	13
Tabla 1.2	Superficie plantada por año de eucalipto del periodo 1970-1995	18
Tabla 1.3	Características aceite esencial de eucalipto globulus labil	20
Tabla 2.1	Valores HLB de emulsionantes naturales utilizados	26
Tabla 2.2	Proporciones de los reactivos a utilizar respecto al compuesto activo	27
Tabla 2.3	Parámetros del diseño experimental	30
Tabla 2.4	Pruebas a realizar obtenidas del diseño experimental	30
Tabla 2.5	Parámetros a evaluar de ambas normas para aguas residuales	38
Tabla 4.1	Resultados de prueba Ausencia-Presencia para Escherichia Coli según escala McFarland.....	53
Tabla 4.2	Resultados de prueba Ausencia-Presencia para Staphylococcus aureus según escala McFarland.....	54
Tabla 4.3	Resultados de tiempo de contacto ante desinfectante basado en aceite esencial de Eucalipto para E. coli	56
Tabla 4.4	Resultados de tiempo de contacto ante desinfectante basado en aceite esencial de Eucalipto para S. aureus.....	56
Tabla 4.5	Porcentaje de reducción de crecimiento microbiano al ser expuestos ante desinfectante basado en aceite esencial de Eucalipto	57
Tabla 4.6	Resultados de análisis microbiológico en muestras de desinfectante de uso doméstico	58
Tabla 4.7	Resumen de Estabilidad de desinfectante formulado vs Tiempo transcurrido.....	59

TABLA	CONTENIDO	Pág.
Tabla 4.8	Seguimiento de masas iniciales y finales de las piezas metálicas para estudio de corrosividad	60
Tabla 4.9	Dimensiones de las piezas metalicas utilizadas para el cálculo de corrosividad	60
Tabla 4.10	Velocidad de Corrosión para las piezas expuestas al desinfectante basado en aceite esencial de Eucalipto	61
Tabla 4.11	Resultados de Análisis sensorial hedónico.....	61
Tabla 4.12	Resultados de Análisis de Varianza Simple (ANOVA)	64
Tabla 4.13	Tabla resumen de resultados de Efectividad Bactericida	65
Tabla 4.14	Resumen de las propiedades físicas y vida útil del desinfectante.....	65
Tabla 4.15	Ficha técnica para Desinfectante basado en aceite esencial de eucalipto.....	66
Tabla 4.16	Resultados de análisis de aguas residuales para agua de proceso de manufactura del desinfectante basado en aceite esencial de Eucalipto	68
Tabla 4.17	Resultados de análisis de aguas residuales para agua de proceso de limpieza utilizando desinfectante formulado final	68

INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha habido un creciente aumento de la contaminación ambiental en el mundo, en especial en la vida acuática a causa de las diferentes actividades realizadas por el hombre como presencia de contaminantes en los cuerpos de agua, tanto físicos (plástico, chatarra, basura, etc.) como químicos (detergentes, aceites, combustibles, etc.) y biológicos (deposiciones, desechos hospitalarios, desechos de animales, etc.) los cuales representan una enorme carga química para ser degradados naturalmente por el cuerpo receptor. Los productos de limpieza impactan fuertemente los ecosistemas marinos afectando las condiciones del cuerpo de agua modificando por ejemplo el pH que impide el crecimiento de algas y plancton que son eslabones esenciales en la cadena alimenticia afectando a todo el ecosistema. Para el año 2016 según el Banco Central de Reserva, El Salvador importó aproximadamente 47 millones de dólares en productos de limpieza de superficies, entre los que se encuentran los desinfectantes, lo que nos da una idea de la enorme cantidad de estos productos a nivel nacional.

Los desinfectantes tienen una gran gama de componentes activos entre los que destacan los alcoholes, cloro y compuestos clorados, aldehídos, yodóforos, amonios cuaternarios, etc.; una gran variedad de estos compuestos utilizados en los desinfectantes son altamente contaminantes y peligrosos para la vida acuática a la que llegan las aguas contaminadas con los residuos de estos productos de limpieza, produciendo dioxinas y furanos cuando el producto tiene compuestos clorados, o causando eutrofización cuando contienen fósforo y nitrógeno o interfiriendo en los tratamientos de aguas residuales, por lo que, en últimas décadas e impulsado por un crecimiento de la preocupación medio ambiental se han incrementado las investigaciones de componentes biocidas de carácter orgánico o biodegradable. Esto nos ha llevado a la identificación del potencial bactericida que poseen algunos aceites esenciales que en su composición contienen principios activos de carácter antibacterial y antisépticos, entre los que se encuentran los aceites esenciales de ruda, mirto, hierbabuena, menta y eucalipto, los cuales pueden ser extraídos por diversos métodos como el arrastre de vapor, extracción por solventes, o el uso de fluidos supercríticos.

OBJETIVOS

Objetivo General:

- Formular un desinfectante natural a partir de aceite esencial de Eucalipto (*Eucalyptus globulus labil*), y evaluar su efectividad ante diferentes microorganismos indicadores de limpieza y desinfección.

Objetivos Específicos:

- Evaluar la disponibilidad de la materia prima utilizada en el territorio salvadoreño.
- Extraer el aceite esencial de Eucalipto a través del método de arrastre de vapor.
- Formular un desinfectante de aplicación a superficies inertes.
- Realizar al menos 3 diluciones del aceite esencial de eucalipto tomando intervalos iguales entre el rango de 0.5-5% v/v, en la formulación del desinfectante para analizar la actividad antimicrobiana para S. Aureus y E. Coli.
- Determinar los tiempos de contacto mínimo entre el desinfectante y los microorganismos en estudio para una desinfección adecuada.
- Determinar las características del desinfectante tales como: estabilidad, homogeneidad, corrosividad, capacidad desodorante y riesgos al contacto para la elaboración de su ficha técnica.
- Evaluar los parámetros obligatorios de vertido de las aguas residuales posterior al proceso de limpieza, de acuerdo a la norma NSO 13.49.01.09. AGUAS RESIDUALES DESCARGADAS A UN CUERPO RECEPTOR.
- Determinar la vida útil del desinfectante.

Capítulo 1

Marco Teórico

En este capítulo se describen las generalidades de los desinfectantes, su mecanismo de acción y las propiedades con que estos cuentan, así como también los factores influyentes para que sean más efectivos. De manera general se especifican los procesos de extracción de los aceites esenciales, usos y actividad microbiológica; se detallan también las generalidades del *Eucalyptus globulus labil* y las de su aceite esencial, además se presentan características de los microorganismos indicadores *E. coli* y *S. aureus*, cuyo control es de vital importancia para laboratorios e industria.

1.1 Generalidades de Los Desinfectantes

Según la Organización Mundial de la Salud (2004) Un desinfectante es un agente químico que destruye o inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos en fase vegetativa o no esporulada. Los desinfectantes no necesariamente matan todos los organismos, pero los reducen a un nivel que no dañan la salud ni la calidad de los bienes perecederos. Los desinfectantes se aplican sobre objetos y materiales inanimados, como instrumentos y superficies, para tratar y prevenir la infección.

No se debe confundir un antiséptico con un desinfectante ya que el primero es un tipo de desinfectante caracterizado por ser aplicado en superficies del cuerpo o tejidos expuestos, como heridas abiertas o quemaduras, destruyen o inhiben los microorganismos sin afectar negativamente al tejido, por lo que todo antiséptico es un desinfectante más no todo desinfectante es antiséptico.

Cabe aclarar que una actividad de desinfección puede ser realizada por otros medios, no solamente por la aplicación de un agente químico, sino también por medios físicos como lo son la ebullición o la exposición prolongada a rayos ultra violeta o por medios químicos con la adición de agentes clorados, basados en amonio u otros

1.1.1 Propiedades de los desinfectantes

Las propiedades que un desinfectante debe poseer para ser efectivo pueden variar en función de su principio activo o su concentración lo que podría afectar la calidad y actividad del producto formulado (Domínguez y Henríquez, 2016).

De acuerdo a Troya (2007) las propiedades ideales de un desinfectante son:

- i. Destruir rápidamente los microorganismos, siendo igual de eficaces con las Bacterias Gram positivas que con las Gram negativas. Deben destruir la mayoría de las esporas fúngicas, siendo también conveniente la destrucción de las esporas bacterianas.
- ii. Ser suficientemente estables en presencia de residuos orgánicos y si fuera necesario, en presencia de aguas duras.
- iii. No ser corrosivos ni dar color a ninguna superficie.
- iv. Ser inodoros o no desprender olores desagradables.
- v. No ser tóxicos, ni irritantes a los ojos o a la piel.
- vi. Fácilmente solubles en agua y grasas, y arrastrables por enjuagado.
- vii. Deben ser estables durante mucho tiempo en forma concentrada (periodo activo de 3-6 meses) y durante menor tiempo en formas diluidas (periodo activo de 1 mes).
- viii. Económicamente competitivos y al emplearlos presentar una buena relación costo / efectividad
- ix. Homogéneo
- x. Compatible con jabón, ceras u otros detergentes

Además de estas hay otras propiedades deseables dependiendo el tipo de desinfectante en función de su concentración ya sea un producto concentrado o en solución (Domínguez y Henríquez, 2016), éstas son:

Características de los desinfectantes como producto concentrado:

- i. Poseer un alto contenido de principio activo.
- ii. Buena capacidad de transporte y estabilidad en el almacenado
- iii. Buena solubilidad, miscibilidad y dosificación en la preparación de las diluciones habituales.

Características de los desinfectantes como producto en solución:

- i. Breve plazo de destrucción de gérmenes con bajas concentraciones, también a bajas temperaturas.
- ii. Facilidad de dispersión.
- iii. Ningún ataque a los materiales tratados.
- iv. Control sencillo, y si es posible automatizado.
- v. Igual acción sobre todas las especies de microorganismos.

1.1.2 Componentes de un desinfectante

Existen diversos tipos de componentes que deben estar presentes en la formulación de un desinfectante, los cuales pueden dividirse en tres categorías (EcuRed, 2015):

- i. Componente activo: encargado de realizar la acción bactericida, antiséptica o inhibitoria del desinfectante, el cual puede ser un compuesto orgánico, como fenoles u aceites esenciales, o inorgánico, como sales de amonio, compuestos clorados, etc.
- ii. Emulsificante: es el encargado de permitir la dispersión del compuesto activo en el disolvente ya que funcionan como tensioactivos teniendo una estructura con una parte con afinidad a los lípidos (lipófila) y otra con afinidad al agua (hidrófila), este solo es necesario en el caso de que el componente activo sea de carácter orgánico y no miscible en agua. En la medida en que el carácter hidrófilo o el lipófilo dominan en un tensioactivo viene dada por el valor de Balance Hidrófilico-Lipófilico (HLB por sus siglas en ingles). Un valor de HLB alto (10 a 18) indica una sustancia más hidrófila, que es adecuada para las emulsiones de aceites en agua (o/w). Las

sustancias con un HLB bajo (3 a 8) son lipófilas y son adecuadas para emulsiones de agua en aceite (w/o) (Shinoda & Saito, 1969).

- iii. Agentes inertes: son aquellos que no intervienen en la acción del desinfectante, pero cumplen otras funciones como servir de vehículo al componente activo, o funciones estéticas como el caso de aromatizantes y colorantes, además de fijadores, preservantes, entre otros.

1.1.3 Mecanismo de acción de los desinfectantes

Es necesario entender que los mecanismos de acción de un desinfectante varían en función de su principio activo pudiendo ir desde la desnaturalización de la membrana celular, la inhibición de enzimas necesarias para su funcionamiento correcto o daño bioquímico al ingresar dentro de la célula.

La muerte de una población microbiana no ocurre inmediatamente al ser expuesta a un agente químico o físico sino que esta va ocurriendo progresivamente de forma exponencial o logarítmica, hasta llegar a un momento en el que la mayoría de la población fue reducida y solo quedan algunos microorganismos resistentes y con el pasar del tiempo el agente va perdiendo su efectividad (Willey, Sherwood, & Woolverton, 2008).

Por lo general muchos agentes químicos poseen un mecanismo de acción en el que el microorganismo se expone al agente y hay una interacción con la superficie de este dando lugar a la alteración de la viabilidad del microorganismo, esto último afectando por diversos métodos su capacidad de subsistir, para dar paso a la infiltración del agente químico dentro de la célula alterando finalmente el metabolismo de ésta y provocando su destrucción.

En otros casos los microorganismos se protegen a través de un mecanismo llamado espora, la cual consiste en la gestación de una célula al interior del microorganismo generado a través de procesos complejos tanto genéticos, metabólicos y estructurales en los que al final del proceso la célula madre o célula vegetativa provoca un proceso de autólisis para liberar así a la espora,

mucho más resistente que su madre, pudiendo ésta permanecer en un estado inactivo por mucho tiempo. Esto conlleva al problema de no poder acabar con una población bacteriana al 100% si no se cuenta con un agente adecuado.

Los microorganismos esporulados se caracterizan por poseer ácido dipicolínico el cual hace a estas formas más resistentes a los desinfectantes que las formas vegetativas. Algunos desinfectantes activos, oxidantes como el peróxido de hidrógeno y el cloro, son capaces de desestabilizar este compuesto en las esporas. Comparativamente, sin embargo, pocos desinfectantes químicos son esporicidas. Muchos bactericidas fuertes, como sucede en el caso de los fenoles o los derivados de amonio cuaternario, poseen sin embargo un escaso efecto sobre la viabilidad de las esporas bacterianas (Troya, 2007). De acuerdo a su mecanismo de acción los desinfectantes se pueden clasificar según Flamenco y Guevara (2011) en:

I. Agentes que lesionan la membrana celular.

La membrana celular separa el protoplasma viviente del medio ambiente no viviente y regula el flujo de solutos hacia y desde la célula. La integridad estructural de la membrana depende de la ordenada disposición de las proteínas y lípidos que la componen. La exposición de los microorganismos a solventes y detergentes orgánicos da como resultado una desorganización estructural de la membrana e interferencia con la función normal de la misma. Entre estos tenemos:

Desinfectantes con actividad superficial. Conocidos también con el nombre de agentes tensioactivos, los cuales son sustancias que alteran las relaciones energéticas a nivel de las interfases, produciendo una reducción de la tensión interfásica de la superficie. Son compuestos que poseen grupos que atraen el agua (hidrófilos) y que la repelen (hidrófobos). La interfase entre la membrana que contiene lípidos de una célula bacteriana y el medio acuoso circundante proporciona un blanco susceptible para los agentes de este tipo. La porción hidrófoba de la molécula es un hidrocarburo de cadena larga liposoluble mientras que la porción hidrófila puede ser un grupo ionizable o una estructura no iónica pero altamente polar, entre los que se incluyen:

- a) **Sustancias catiónicas:** Compuestos de amonio cuaternario. Cuando las bacterias son expuestas a agentes de este tipo, el grupo positivamente cargado se asocia a grupos fosfatos de los fosfolípidos de la membrana, mientras la porción no polar penetra hacia el interior hidrófobo de la membrana produciendo una pérdida de la semipermeabilidad de la membrana y filtración desde la célula, de nitrógeno y compuestos que contienen fósforo. Entonces el propio agente puede ingresar en la célula y desnaturalizar sus proteínas.

- b) **Sustancias no iónicas:** Presentan un efecto solubilizante no específico sobre la membrana citoplasmática que separa selectivamente las proteínas de la pared y membrana celular.

- c) **Sustancias anfóteras:** no ha sido aún determinado el mecanismo de acción de estas sustancias, ya que continúa siendo tema de controversia la efectividad de este grupo de agentes, a pesar de los informes de que es igualmente efectiva que los amonios cuaternarios catatónicos.

- d) **Compuestos fenólicos:** Estos compuestos provocan lesión de la membrana con filtración del contenido celular y lisis. Con bajas concentraciones que son rápidamente bactericidas, las oxidasas y deshidrogenasas unidas a la membrana se inactivan en forma irreversible.

- e) **Alcoholes:** Desorganizan la estructura lipídica penetrando en la región hidrocarbonada. Además de su efecto sobre la membrana celular, los alcoholes y otros solventes orgánicos también desnaturalizan las proteínas celulares.

II. Agentes que desnaturalizan las proteínas.

Las proteínas son las moléculas orgánicas más abundantes en una célula bacteriana, y son fundamentales para todos los aspectos de la estructura y función de la célula. Los agentes que alteran la configuración de una proteína por desnaturalización, provocan un desdoblamiento de la célula polipeptídica de forma tal que las cadenas aparecen

enrolladas al azar y en forma irregular. Entre los agentes químicos que desnaturalizan las proteínas celulares están:

i. Ácidos y álcalis: Estos agentes ejercen su actividad antibacteriana a través de sus iones hidrógenos y oxidrilos libres a través de moléculas no disociadas o alterando el pH del medio ambiente del microorganismo.

ii. Agentes que modifican los grupos funcionales de proteínas y ácidos nucleicos. El sitio catalítico de una enzima contiene grupos funcionales específicos que se unen con el sustrato e inician los eventos catalíticos. Se produce una inhibición de la actividad enzimática si uno o más de estos grupos funcionales son alterados o destruidos. Entre los agentes químicos que modifican los grupos funcionales de las células tenemos:

a) Metales pesados: Las sales solubles de mercurio, arsénico, plata y otros metales pesados, alteran la actividad enzimática formando mercaptanos con grupos sulfidrilos de residuos de cisteína.

b) Agentes oxidantes: los agentes antimicrobianos más útiles en este grupo son los halógenos y el peróxido de hidrogeno. Inactivan las enzimas convirtiendo los grupos -SH funcionales en forma S-S oxidada. Los agentes más fuertes atacan grupos amino, indol y el grupo hidroxifenólico de la tirosina.

c) Tinturas: Presentan una notable afinidad por grupos fosfatos acíclicos de las nucleoproteínas y otros componentes celulares.

d) Agentes alquilantes: Los efectos letales del formaldehído, óxido de etileno y glutaraldehído son resultado de su acción alquilante sobre las proteínas. Las inhibiciones producidas por tales agentes son irreversibles, dando como resultado la modificación e inhibición de la actividad enzimática.

1.1.4 Factores que influyen en la acción de un desinfectante

Es importante considerar la existencia de factores, cuya presencia influya en la efectividad de un desinfectante, los cuales pueden ser directamente relacionados al producto desinfectante y sus características o al entorno de aplicación, dentro de estos se encuentran según Vignoli (2012) y Domínguez y Henríquez (2016):

i. Concentración del componente activo

Si bien este aspecto varía según el desinfectante y el microorganismo, existe una relación inversamente proporcional entre concentración y tiempo de exposición. A mayores concentraciones de desinfectante, menor es el tiempo de exposición para conseguir el mismo efecto. Este factor es tan crítico, que se sabe que concentraciones mínimas de casi cualquier desinfectante no solo no elimina los microorganismos, sino que permiten su desarrollo.

ii. Tiempo de exposición

El tiempo de contacto es una de las variables más importantes en el mecanismo de desinfección, el cual permite llevar a cabo la reacción entre el desinfectante y los microorganismos. Todos los desinfectantes necesitan un tiempo mínimo de contacto para que sean eficaces, siendo generalmente aceptado un mínimo de cinco minutos. El cual varía de acuerdo con el componente activo empleado, la actividad microbiana y la concentración del desinfectante.

iii. pH

Entre otras cosas determina el grado de ionización del agente, siendo en general la forma no disociada la que atraviesa mejor las paredes del microorganismo. Los agentes aniónicos son más efectivos a pH ácido, mientras que los catiónicos a pH alcalino.

iv. Temperatura

El incremento de la temperatura aumenta el poder bactericida del agente, siempre que no lo desnaturalice. Así para temperaturas bajas, por lo general, por cada 10°C de

incremento de esta, la tasa de mortalidad se duplica. Sin embargo, esto no aplica para todos los desinfectantes por lo que siempre es importante seguir las instrucciones del fabricante ya que en algunos casos por un excesivo calentamiento pueden liberarse sustancias nocivas para una persona o no deseadas en ciertas superficies pudiendo provocar corrosión.

v. Presencia de materiales extraños

La presencia de materia orgánica, por ejemplo: mucus, pus, sangre, heces, etc. influyen negativamente en la actividad de muchos desinfectantes, incluso llegando a inactivarlos. Por lo general forman cubiertas que impiden el contacto microorganismo-desinfectante, o se combinan con el agente formando compuestos inertes o menos activos, etc. Por esto es esencial un buen lavado de la superficie, antes de intentar un proceso de desinfección o esterilización; además, el lavado y arrastre también disminuye la población de microorganismos sobre la cual actúa el agente bactericida contribuyendo a una más rápida destrucción.

vi. Resistencia innata de los microorganismos

La eficacia de cada agente depende también de las propiedades características de cada microorganismo contra el cual se lo está aplicando.

Dentro de las formas vegetativas, es el género *Micobacterium* el más resistente. Luego dentro de los Gram positivos (Gram +) se destacan *Staphylococcus* y *Enterococcus*. Dentro de los Gram negativos (Gram -) *Pseudomona*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, y *Serratia* son los más resistentes. Son estos microorganismos (cocos Gram (+) y bacilos Gram (-)), los más frecuentes causantes de epidemias intrahospitalarias debido en primer lugar a no practicar el lavado de manos tantas veces como sea necesario y en segundo lugar a la mala utilización de desinfectantes y antisépticos.

1.2 Generalidades de los Aceites Esenciales

Según Martínez (2003) Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética

(perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes).

Tales aceites están formados por diversas sustancias orgánicas volátiles, las cuales pueden ser compuestos alifáticos de bajo peso molecular como alcoholes, éteres, acetonas, cetonas, aldehídos; y pueden contener fenilpropanos, monoterpenos y sesquiterpenos. Estas sustancias de amplio interés se alojan en diferentes partes de plantas, desde la raíz, hojas, tallos, flores hasta frutos.

Es importante destacar que la composición varía con el lugar de origen. De igual manera varía con el hábitat, entendiéndose como hábitat a las condiciones climáticas, componentes geológicos e hidrológicos de una localización específica, en que se desarrolle la especie vegetal, (generalmente climas cálidos tienen mayor contenido de aceites esenciales), el momento de la recolección, tiempo que transcurra entre recolección y extracción, el método de extracción, etc.

De las principales propiedades terapéuticas debidas a la presencia de aceites esenciales, sobresale la antiséptica (desde antaño estas especies vegetales han sido utilizadas como especias acentuadoras de sabor, pero además de esto como conservantes alimenticios); antiespasmódica, carminativa (que favorece la expulsión de gases) y digestiva.

Se debe hacer mención que algunos aceites esenciales, sobre todo a dosis elevadas, son tóxicos, principalmente a nivel del sistema nervioso central. Otros más, como el de ruda o enebro, se considera que poseen propiedades abortivas. Algunos también pueden causar sensibilidad e irritación tópica. (Arriaza, s.f)

1.2.1 Origen de los aceites esenciales

El origen de las sustancias que conforman los aceites esenciales yace en los metabolitos secundarios de las plantas. Los metabolitos son sustancias que participan en reacciones químicas a nivel celular y que forman parte de un proceso del metabolismo.

Existen metabolitos primarios como proteínas, lípidos, azúcares y demás que en las especies vegetales son críticos para el crecimiento de la planta, su reproducción y supervivencia. Por otra parte, para garantizar la supervivencia de la misma intervienen los metabolitos secundarios que son moléculas de bajo y medio peso molecular, que se generan en la planta por distintas rutas biosintéticas y pertenecen a diversas clases de sustancias químicas tales como ácidos, ésteres, alcoholes, fenoles, terpenos, y muchas otras más. (Stashenko, 2009).

En términos generales los metabolitos secundarios en las plantas cumplen el objetivo de prolongar la vida de las mismas, actúan como defensa química contra microorganismos como bacterias y virus y contra depredadores (expelen aroma que quitan el apetito hacia la planta) o bien como atractores a insectos que pueden resultar beneficiosos, participan en la respiración de la especie y en otras funciones relacionadas con la fisiología.

1.2.2 Métodos de Obtención de los aceites esenciales

Existen diferentes métodos por los cuales se pueden obtener los aceites esenciales, entre los más utilizados se encuentran:

- i. **Destilación por arrastre de vapor:** Las plantas se colocan sobre un fondo perforado o criba ubicado a cierta distancia del fondo de un tanque llamado alambique. La parte más baja de esta contiene agua hasta una altura algo menor que el nivel de la criba. El calentamiento se produce con vapor saturado que se provee de una fuente de calor que compone el equipo, fluye mojado y a presión baja, penetrando a través del material vegetal. Los componentes se volatilizan, y condensan en un refrigerante, siendo recogidos en un vaso florentino, donde se separa el agua del aceite por diferencia de densidad.
- ii. **Expresión del pericarpio:** Una bandeja con pinchos, en cuya parte inferior hay un canal para recoger el aceite esencial. Se emplea para cítricos, sobre todo.
- iii. **Disolución en grasa (*enfleurage*):** Los aceites son solubles en grasas y alcoholes de alta concentración. Sobre una capa de vidrio se coloca una fina película de grasa y sobre ella

los pétalos de flores extendidas. La esencia pasa a la grasa, así hasta saturación de la grasa. Posteriormente con alcohol de 70°, se extrae el aceite esencial. Se emplea para flores con bajo contenido en esencias, pero muy apreciadas (azahar, rosa, violeta, jazmín).

- iv. **Extracción con disolventes orgánicos:** que penetran en la materia vegetal y disuelven las sustancias, que son evaporadas y concentradas a baja temperatura. Después, se elimina el disolvente, obteniendo la fracción deseada.

La selección del disolvente pretende que sea capaz de disolver rápidamente todos los principios y la menor cantidad de materia inerte, que tenga un punto de ebullición bajo y uniforme que permita eliminarlo rápidamente, pero evitando pérdidas por evaporación, químicamente inerte, para no reaccionar con los componentes de los aceites, no inflamable y barato.

Este disolvente ideal no existe, y los más empleados son el éter de petróleo, con punto de ebullición de 30 a 70°C, que se evapora fácilmente y es inflamable, benceno, que disuelve también ceras y pigmentos, y alcohol, que es soluble en agua. Se emplea cuando hay componentes de peso molecular elevado que no son lo suficientemente volátiles.

- v. **Extracción con gases en condiciones supercríticas:** Se emplean gases, principalmente CO₂, a presión y temperatura superiores a su punto crítico. En esas condiciones se obtienen buenos rendimientos y se evitan alteraciones de los componentes de la esencia. La infraestructura necesaria es cara, pero tiene sus ventajas, como la fácil y rápida eliminación del gas extractor por descompresión, la ausencia de residuos de disolventes y que los gases no resultan caros. (Arriaza, s.f, pág. 72)

- vi. **Extracción de Primera Presión en Frío (usado para semillas y algunos frutos):** La presión en frío, es un modo de extracción exclusivamente mecánico que se realiza a baja temperatura, preservando de este modo la proporción de ácidos grasos esenciales, vitamina E, antioxidantes naturales y no necesita ningún aditivo. La primera extracción, denominada como primera presión arroja como resultado un “zumo de frutos “puro y verdaderamente oleaginoso.

Los aceites extraídos por presión en frío son los de más alto valor comercial ya sea extraídos de forma artesanal o industrial para usos cosméticos o comestibles. El procedimiento es el siguiente: la semilla se descascará parcialmente y se limpia mediante ventilación y zarandeo para eliminar impurezas. La semilla limpia se lleva a la prensa: un extrusor a tornillo sin fin. Aquí se vigila especialmente que la temperatura generada por la presión no supere los 45° C para asegurar la estabilidad molecular de los ácidos grasos poliinsaturados.

Durante varios días el aceite bruto decanta en tanques de acero inoxidable. Luego se bombea por un filtro de algodón descartable y se envasa en botellas de vidrio oscuro ámbar o envases de hojalata para evitar la oxidación del aceite por acción de la luz ultra violeta. El refinado se hace innecesario, y el aceite conserva el suave sabor propio de la semilla de la cual proviene (Castellón., s.f).

1.2.3 Usos de los Aceites Esenciales

Los aceites esenciales tienen mucha utilidad en el área industrial tal cual puede observarse en la tabla 1.1.

Tabla 1.1 Principales sectores y ramas industriales donde se usan aceites esenciales y productos derivados.

Sectores	Ramas	Aceites esenciales
Industria Cosmética y de productos de aseo	Higiene Personal Jabones y detergentes Productos de belleza Perfumes y afines Dentífricos	Cítricos Eucalipto y derivados Mentas, lavandas Rosa, patchouli Romero, salvia
Industria de Alimentos	Bebidas Tipo Cola Dulces, confitería Salsas, enlatados Bebidas alcohólicas Tabaco, aromatizantes	Cítricos Anís, Hinojo, Coriandro Oleorresinas, flavours Vainilla, especias Mentas

Continua...

Tabla 1.1 Principales sectores y ramas industriales donde se usan aceites esenciales y productos derivados (Continuación).

Sectores	Ramas	Aceites esenciales
Industria Farmacéutica	Fitocosméticos Cosmecéuticos Homeopatía Aromaterapia Fitofármacos	Cítricos Limonaria, citronela Eucalipto y derivados Lavanda, romero, salvia Geranio, mentas.

Fuente: (Stashenko, 2009, pág. 20).

Es importante mencionar que de unos años a la fecha ha tomado relevancia el uso de aceites esenciales como ingredientes cosméticos de uso personal, como alternativa a tónicos capilares, cremas faciales, corporales e ingredientes en cosmética natural. También se han realizado distintas investigaciones sobre su uso en artículos de limpieza como desinfectantes, además de que algunos aceites tienen potencial antioxidante y se utilizan para conservar productos orgánicos en el área de cosmética.

1.2.4 Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

Diversos estudios realizados han arrojado que la actividad antimicrobiana presentada por los aceites esenciales se debe ampliamente, a la presencia de terpenoides; siguiendo en orden de actividad los terpenoides que contienen grupos alcoholes, luego los que poseen aldehídos y finalmente aquellos que tienen grupos cetónicos. De la misma manera, autores plantean que los aceites con un alto porcentaje de compuestos terpenoides del tipo fenólicos poseen notables propiedades antimicrobianas (Correa, Iglesia, Naranjo, Pino y Sánchez, 2009), estos actúan deteriorando la pared celular de los microorganismos, se adhieren a los lípidos de la membrana citoplasmática como el peptidoglicano y ácidos lipoteicoicos en microorganismos Gram +, a su vez lipopolisacáridos y fosfolípidos en Gram -, e inactivan sistemas enzimáticos de las bacterias. Como prueba de lo expuesto anteriormente existen investigaciones como la realizada por Rodríguez y Salazar (2016) en la que se evalúa la actividad antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* y *Listeria innocua* en aceites esenciales, dando como resultado que los aceites de canela, clavo y tomillo presentan buena inhibición sobre las cepas, además de

un estudio sobre la capacidad antimicrobiana de aceite de eucalipto en ambiente odontológico, arrojando resultados positivos (Chérrez, 2014).

1.3 El Eucalipto (*Eucalyptus*)

El eucalipto es un árbol de gran altura, del cual existen más de 700 especies y algunas sobrepasan los 40 metros de altura. Posee un tronco recto y poco ramificado, usualmente dejando desprender finas capas de la corteza. Hojas aromáticas, simples, alternas, enteras. flores y frutos relativamente pequeños y poco notables.

Pertenecen a la familia botánica *Myrtaceae* la cual es una familia de árboles ricos en aceites esenciales, son originarios de Australia y Tasmania. En América se han realizado muchas introducciones de diferentes especies como lo es el eucalipto globulus labil. Las distintas especies de eucalipto se utilizan indistintamente como medicina popular o para usos como madera (Farmacopea Vegetal Caribeña 2005).

1.3.1 *Eucalyptus globulus labil*

El eucalipto globulus labil pertenece a la familia *Myrtaceae* (ilustración 1.1), este es conocido con otros nombres como eucalipto gigante, ócalo, alcanfor o eucalipto azul. Al igual que todas las especies pertenecientes a esta familia sus árboles son ricos en aceites esenciales; el rendimiento de extracción oscila entre 1.5-3% p/p para esta especie. Esta será la especie utilizada en la investigación ya que es la especie con mayor porcentaje de Cineol en su aceite esencial, además de ser la más estudiada y caracterizada previamente.



Ilustración 1.1 *Eucalyptus globulus labil*.

Origen y distribución

El *Eucalyptus globulus* es originario de la zona este, sureste y pequeñas áreas de la costa oeste de Tasmania, así como de las islas del estrecho de Bass y en el sur de Victoria, Australia (Balmelli, 1995). Según López (2010) esta especie se encuentra, entre las diez especies más plantadas en zonas templadas del mundo, superando los 2,3 millones de hectáreas.

El eucalipto *globulus* está presente en más de 90 países, la mayoría en zonas tropicales y subtropicales, existen plantaciones de gran productividad industrial en zonas templadas como Nueva Zelanda, Chile, Argentina, Brasil, Uruguay, Sudáfrica, la Península Ibérica y Estados Unidos. En Ecuador se cuenta con 32,000 hectáreas plantadas, en Chile con 232,000, mientras que en la Península Ibérica 1,406,000 distribuidos por la zona norte de España y oeste de Portugal.

Descripción botánica

Son árboles perennifolios que con normalidad alcanzan los 30 – 50 m. de altura. La corteza es de color gris, persistente en la base y se desprende en el resto del tronco en largas fajas longitudinales. Presentan hojas de dos tipos: Las hojas juveniles son opuestas, ovales y sésiles. Mientras que las hojas adultas son pecioladas, alternas, falcadas y acuminadas, con el nervio central. Las hojas tienen de 10 a 20 cm de largo. Poseen numerosas glándulas productoras de aceites esenciales.

Las flores son blancas, generalmente solitarias, en las axilas de las ramas superiores, son grandes, tetrámeras, con cáliz y corola fusionados formando el opérculo. Que se cae en la floración, dejando al descubierto un elevado número de estambres de color cremoso claro, muy vistosos, florece durante el otoño y el invierno.

Es cultivado por su madera en las regiones que cuentan con inviernos suaves, sobre todo en las regiones costeras atlánticas y cantábricas.

Composición química

Las principales investigaciones han sido dirigidas al estudio del aceite esencial de sus hojas, las cuales se encuentran compuestas por sitosterol, ácido ursólico, taninos, ácido elágico y gálico, principios amargos, ceras, resinas, contiene aceites esenciales: 1,8-cineol, globulol o cadideno, piperitona, y terpineno, floroglucinas, euglobal, vainillina. Además, se observa la presencia de compuestos polifenólicos, una β -dicetona antioxidante de cadena larga y terpenoides aromáticos: los euglobales.

Junto a ácidos fenólicos sin importancia (ácidos gálicos, gentísico, caféico, ferúlico...), se han descrito varios flavonoides: heterósidos de flavonoles (rutósido, quercitrósido, hiperósido) y ésteres de flavonas metiladas en la cera epicuticular. Los euglobales, sobre todo, se encuentran en los botones florales; estos compuestos benzotetrahidropiránicos o dihidroxanténicos resultan de una cicloadición entre una acetogenina dialdéhídica de tipo floroglucinol y un mono- o sesquiterpeno (felandrenos, sabineno, biciclogermacreno).

De los diversos componentes que contiene la hoja de eucalipto el que se encuentra en mayor proporción es el 1,8-cineol, el cual es un monoterpeno, con un 70% p/p como mínimo, cuya estructura química se presenta en la ilustración 1.2.

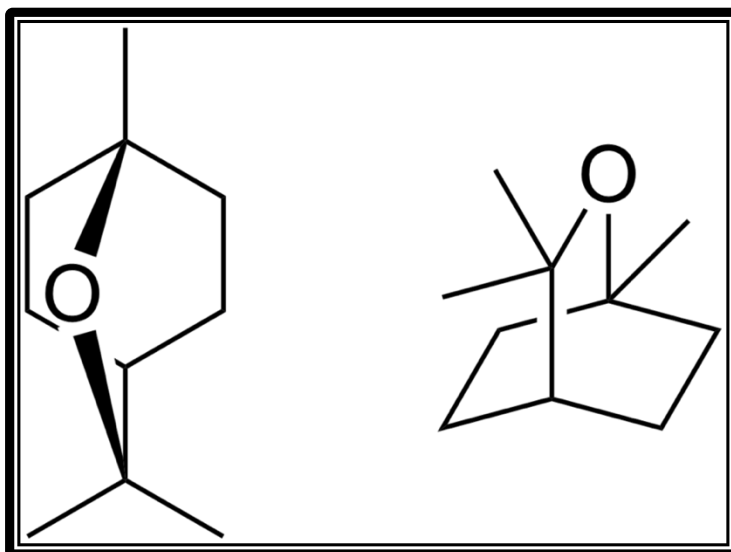


Ilustración 1.2 Estructura química del 1,8-cineol. A la izquierda se encuentra la conformación estructural, a la derecha conformación en silla.

Actividad biológica

La tintura de hojas de *Eucalyptus globulus L.* es activa contra *Candida albicans*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. pyogenes*. La decocción de las hojas no tiene actividad antidermatolítica. Su aceite esencial es repelente de áfidos y mosquitos. La infusión de hojas de *Eucalyptus globulus L.* es hipoglicémica en ratones aloxamizados. Según Rodríguez (2011) el mecanismo de acción bactericida de los aceites esenciales en general no está determinado, estos pueden inactivar enzimas esenciales, reaccionar con la membrana celular o alterar la función del material genético.

Disponibilidad en el territorio salvadoreño

El Salvador está situado a lo largo de la costa del Pacífico, el país cuenta con muchas montañas y volcanes apagados. El clima es tropical húmedo en la costa, pero más templado en el interior. El eucalipto fue inicialmente introducido en 1953 y se plantaron varias especies. El crecimiento es vigoroso sobre terrenos fértiles. Las especies principalmente plantadas son *E. deglupta*, *E. alba*, *E. citriodora*, *E. longifolia*, *E. cinérea* y *E. Globulus*.

En la tabla 1.2 se muestra la superficie plantada por año de eucalipto del periodo 1970-1995 en el territorio salvadoreño (Food and Agriculture Organization (FAO), 2010).

Tabla 1.2 Superficie plantada por año de eucalipto del periodo 1970-1995.

Año	Superficies plantadas de Eucalipto (hectáreas)
1973	1
1974	3
1975	9
1976	57
1978	9
1980	25
1983	16
1984	19

Continua...

Tabla 1.2 Superficie plantada por año de eucalipto del periodo 1970-1995 (Continuación).

Año	Superficies plantadas de Eucalipto (hectáreas)
1986	29
1987	3
1988	21
1989	13
1990	57
1992	41
1993	131
1994	134
1995	59
Total	626

Fuente: (Food and Agriculture Organization (FAO), 2010).

Por otra parte, el Estado Situacional del Medio Ambiente y Recursos Naturales de El Salvador (2007) citando, la EFSA (2006) y a Cruz y Gómez, reportan que para el año 1996 el 38% de la superficie plantada estaba sembrada con teca y pino, el 10% con madrecaao y el 10% con eucalipto. Para el año 2005 había una superficie plantada de 13,765 hectáreas donde las especies exóticas (no nativas) como el eucalipto representan la mayor cantidad.

Según la información solicitada al Centro de Desarrollo Forestal (CEDEFOR), subdivisión del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) el *E. globulus labil* se encuentra plantado a lo largo de todo el territorio salvadoreño en las zonas templadas a manera de ornamentación por lo que no está cuantificado debido a su dispersión, además según la sección de botánica del departamento de biología, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, de la Universidad de El Salvador no existen plantaciones exclusivas de esta especie en el territorio salvadoreño, sin embargo se pueden encontrar grandes números de esta especie en diversas zonas del país, como en el municipio de El Congo y el área cercana al Lago de Coatepeque en el Departamento de Santa Ana, a lo largo de la cuenca del Río Lempa y focalizado cerca del embalse Cerrón Grande en el departamento de Chalatenango, y en la zona de Olocuilta y San Luis Talpa en el departamento de la Paz.

1.3.2 Aceite esencial Cineol (Eucaliptol)

Dado que en las hojas de la planta de eucalipto es donde se encuentra el aceite esencial (Cineol, 70% como mínimo), este se puede obtener por destilación al vapor de las hojas frescas de *Eucalyptus globulus* labil preferiblemente, ya que las hojas secas poseen un rendimiento de extracción mucho menor según López, Moreno y Siche (2010). Las características que presenta el aceite esencial de eucalipto se muestran en la tabla 1.3.

Tabla 1.3 Características aceite esencial de eucalipto globulus labil.

Aspecto	Líquido Transparente
Olor	Penetrante, muy fresco, balsámico y dulce
Densidad a 20 °C	0.912 g/ml
Punto de Inflamación	50°C
Solubilidad	Insoluble en agua, liposoluble, soluble parcialmente en etanol.

Fuente: (Lavado Cumplido, 2018).

i. Usos del aceite esencial Eucaliptol

El aceite esencial, en uso interno o por inhalación, tiene una importante acción antiséptica de las vías respiratorias y es una de las plantas más efectivas para las afecciones bronquiales y pulmonares. Antihelmíntico y astringente, desodorante, balsámico y broncodilatador, expectorante y febrífugo, hipoglucemiante, mucolítico y sudorífico. En uso externo es antiinflamatorio, antiséptico y cicatrizante. Indicado en asma bronquial, bronquitis, cistitis, diabetes ligera, faringitis, gripe, halitosis, resfriado, rinitis, sinusitis y traqueítis. Uso externo en cremas, heridas, irritación cutánea y vulvovaginitis. También es utilizado como antiséptico pulmonar, tos, bronquitis, como expectorante, hipoglicémico, antibacteriano, anticandidiasis, antihelmíntico, en heridas como cicatrizante, amigdalitis, en laringitis.

ii. Toxicidad

El aceite utilizado puro es irritante, produce convulsión, delirio, dificultad respiratoria, gastroenteritis y hematuria. Puede desarrollarse urticaria por manejo de follaje. Está

contraindicado en embarazo o lactancia y alergias respiratorias, es incompatible con sedantes y anestésicos (Flores, Hernández y Valladares, 2004)

1.4 Microorganismos Indicadores de Contaminación: E. coli y S. aureus

Los microorganismos son organismos microscópicos capaces de llevar a cabo todas las funciones vitales, con organización unicelular y capacidad de formar agrupaciones simples de células. Los microorganismos están distribuidos en tres Reinos, uno procariota: Monera (bacterias), y dos eucariotas: Protistas y Hongos. Los virus también se incluyen dentro del objeto de la microbiología.

Hay ciertas especies de microorganismos que por sus características o su procedencia pueden ser utilizados como indicadores de la presencia de otros contaminantes más difíciles de rastrear, tal es el caso de la E. coli la cual se prolifera en el intestino humano y de otros animales por lo cual su presencia puede indicar la contaminación con heces fecales. Entre otros microorganismos que se usan a veces como indicadores se puede mencionar al *Staphylococcus aureus*, para la contaminación procedente de vías orales, nasales, piel y otros orígenes.

Por lo dicho anteriormente se vuelve de vital importancia eliminar estos microorganismos en laboratorios químicos, microbiológicos, de alimentos y en industrias, especialmente de carácter alimenticio; debido a que en los mismos se siguen controles de calidad en los cuales no es permitido que en el entorno de trabajo estén presentes estos microorganismos; por ejemplo, en los laboratorios donde se realizan análisis microbiológicos la presencia de contaminación bacteriológica puede arrojar falsos positivos en las pruebas, en el caso de la industria alimentaria la presencia de microorganismos patógenos compromete la inocuidad, y se corren riesgos de intoxicación en los empleados y consumidores.

1.4.1 *Escherichia coli*

Según la OMS *Escherichia coli* es una bacteria habitual en el intestino del ser humano y de otros animales de sangre caliente. Aunque la mayoría de las cepas son inofensivas, algunas

pueden causar una grave enfermedad de transmisión alimentaria. La infección por *E. coli* se transmite generalmente por consumo de agua o alimentos contaminados, como productos cárnicos poco cocidos y leche cruda.

Los síntomas de la enfermedad incluyen cólicos y diarrea, que puede ser sanguinolenta. También pueden aparecer fiebre y vómitos. La mayoría de los pacientes se recuperan en el término de 10 días, aunque en algunos casos la enfermedad puede causar la muerte (OMS, 2018).

Fue descrita por primera vez en 1885 por Theodore von Escherich, bacteriólogo alemán, quién la denominó *Bacterium coli*. Posteriormente la taxonomía le adjudicó el nombre de *Escherichia coli*, en honor a su descubridor.

Morfología

Es un bacilo que reacciona negativamente a la tinción de Gram (Gram -), es anaeróbico facultativo, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa.

Como todas las bacterias Gram-, la cubierta de *E. coli* consta de tres elementos: la membrana citoplasmática, la membrana externa y, entre ambas, un espacio periplásmico constituido por péptido-glucano. Esta última estructura confiere a la bacteria su forma y rigidez, y le permite resistir presiones osmóticas ambientales relativamente elevadas. *E. coli* es una bacteria mesófila, su óptimo desarrollo se encuentra en el entorno de la temperatura corporal de los animales de sangre caliente (35-45°C). La temperatura límite de crecimiento se sitúa alrededor de 7°C (Canet, 2016)

1.4.2 *Staphylococcus aureus*

Los estafilococos son microorganismos aerobios Gram +. El más patógeno de ellos es el *Staphylococcus aureus*, que típicamente causa infecciones de la piel y a veces neumonía, endocarditis y osteomielitis. En general se lo asocia con la formación de abscesos. Puede causar toxinas que causan gastroenteritis, síndrome de la piel escaldada y síndrome de shock

tóxico (Bush, Schmidt, & Perez, 2018). Su metabolismo es de tipo fermentativo, son aerobios y anaerobios facultativos, catalasa positiva y oxidasa negativa. Son capaces de fermentar la glucosa sin producción de gases y producen acetín-metil-carbinol. Fermentan el manitol con formación de ácidos y puede hacerlo en anaerobiosis.

Se puede diferenciar de otras bacterias halófilas sembrándola en un medio Chapman (manitol-salado). La temperatura óptima de crecimiento va de 35 a 40 °C y el pH óptimo oscila entre 7,0 y 7,5 aunque soportan pH mucho más extremos. Poseen una enzima, la coagulasa, que los diferencia del resto de las especies del género. Poseen igualmente una desoxirribonucleasa (Dnasa) que es una nucleasa exocelular que depolimeriza el ADN. A esta enzima se la denomina termonucleasa por ser termorresistente en las cepas de *Aureus* (Valdez, 2010).

Morfología

El *S. aureus* es un coco inmóvil, de 0.8 a 1 micrómetro de diámetro, que se divide en tres planos para formar grupos de células irregulares semejantes a racimos de uvas.

En extendidos de pus los cocos aparecen solos, en pares, en racimos o en cadenas cortas. Los racimos irregulares son característicos de extendidos tomados de cultivos que se desarrollan en medios sólidos, mientras que en otros cultivos son frecuentes las formas de diplococos y en cadenas cortas. Unas pocas cepas producen una cápsula o capa de baba que incrementa la virulencia del microorganismo. El *S. aureus* es un microorganismo Gram + pero las células viejas se tiñen como Gram -.

Capítulo 2

Metodología de la Investigación

En este capítulo se profundiza en el diseño de las metodologías para llevar a cabo el desinfectante natural, entendiéndose como “desinfectante natural “como aquel producto capaz de destruir o inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y cuyos componentes son de origen natural. La metodología de la investigación inicia con la extracción del componente activo del eucalipto, la formulación del producto, continuando con los métodos para determinar las proporciones idóneas de los componentes del desinfectante y posteriormente las pruebas necesarias para probar su poder bactericida y establecer sus propiedades, además de la medición de su impacto ambiental a través de un análisis de aguas residuales de acuerdo a la norma NSO 13.49.01.09. Aguas residuales descargadas a un cuerpo receptor y la norma técnica para regular calidad de aguas residuales de tipo especial descargadas al alcantarillado sanitario

2.1 Metodología de la extracción del aceite esencial

Para la extracción del aceite esencial de eucalipto, Cineol, se ha encontrado que tradicionalmente se emplea el método de destilación por arrastre de vapor (Cumplido, 2015), la cual es utilizada para sustancias orgánicas inmiscibles en el agua ya que su posterior separación es sencilla.

La destilación con vapor saturado o destilación con agua y vapor es aquella en la que el vegetal no está en contacto con el agua, el vapor de agua se inyecta a través de la masa vegetal dispuesta sobre placas perforadas, rejilla o malla. El material debe tener tamaño uniforme para favorecer el paso del vapor. Por su sencillez, bajo costo y rendimientos, esta técnica es la más usada en la industria de aceites esenciales (Gonzalez Villa, 2004).

Para llevar a cabo la extracción del aceite esencial el equipo utilizado se construyó basándose en el equipo construido en los cursos de formación del Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA), Colombia el cual se presenta esquemáticamente en la ilustración 2.1.

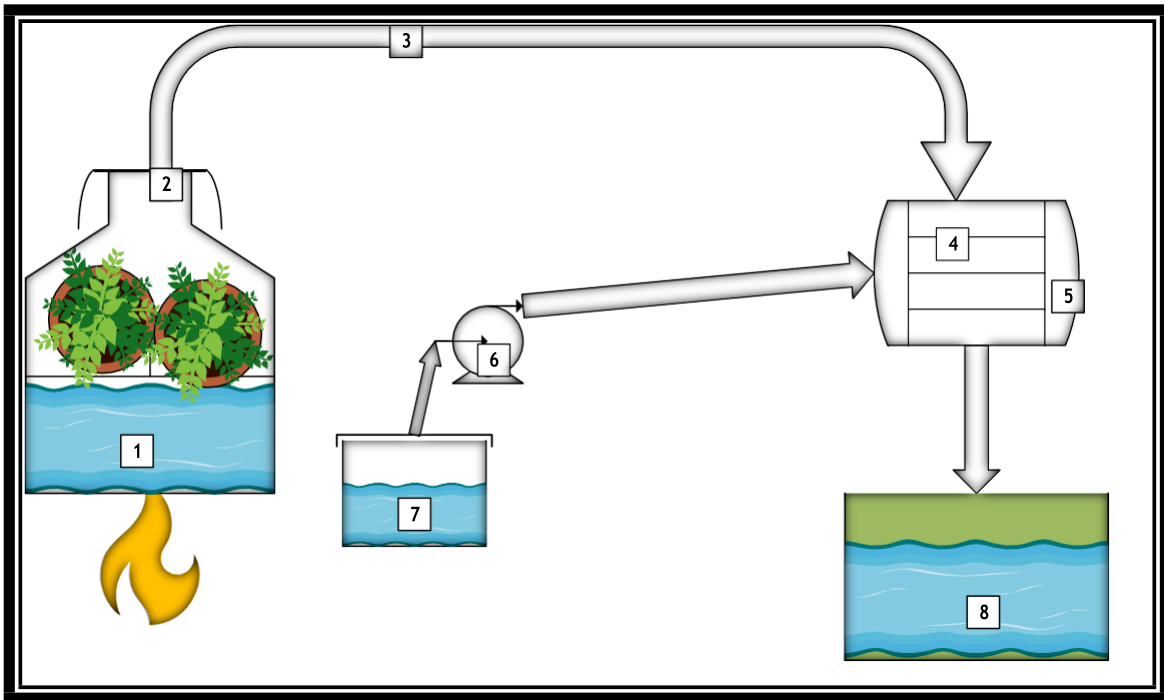


Ilustración 2.1 Esquema del equipo de Extracción del aceite esencial de eucalipto (Eucaliptol).

El equipo consta de:

1. Cámara: es una olla de presión, dentro de la cual esta una rejilla sobre la que descansa el material vegetal. En la parte inferior se coloca agua destilada.
2. Unión: asegura la manguera a la válvula de salida de vapor de la olla.
3. Manguera de silicona termoestable: conecta la cámara con el tubo de cobre para transportar el aceite al alcanzar las condiciones de ebullición dentro de esta.
4. Tubo de cobre en espiral: el cobre es el material que favorece la transferencia de calor, este tubo está en contacto con agua fría para la condensación del aceite.
5. Recipiente alrededor del tubo en espiral: para contener el agua fría, el tubo de cobre va dentro de este, los cuales en conjunto forman el condensador del equipo.
6. Bomba: lleva agua para mantener un flujo constante hacia el recipiente alrededor del tubo de cobre, para maximizar la eficiencia en la transferencia de calor.
7. Contenedor plástico: Contiene el agua de recirculación.
8. Recipiente de captación de hidrolato: Colecta el destilado de aceite esencial.

Se puede observar una fotografía del equipo construido en el Anexo 1, Los parámetros de operación están detallados en la sección 4.1.

2.2 Pruebas preliminares para establecer la proporción de cada constituyente en las formulaciones del desinfectante

Para elaborar el diseño experimental, es necesario tener claro que materias primas conformarían el desinfectante, por lo que se pre-experimentó para encontrar las relaciones apropiadas para la incorporación de todos los elementos que formen parte de la formulación.

2.2.1 Determinación de las proporciones utilizadas en la formulación

Se realizaron pruebas preliminares en donde se estudiaron diversos emulsificantes, de los que se procuró el uso de emulsificantes naturales, entre los que se utilizaron están la **Betaína de Coco, Acido esteárico y Aceite de Ricino hidrogenado** en donde se buscó la formación de una sola fase al momento de realizar la mezcla del aceite esencial, y el agua destilada junto al agente emulsificante. Estos fueron escogidos dado que su valor HLB era idóneo para soluciones aceite en agua como se muestra en la tabla 2.1

Tabla 2.1 valores HLB de emulsionantes naturales utilizados.

Agente emulsificante	HLB
Aceite de Ricino	14
Acido esteárico	15
Betaína de coco	N/A*

Fuente: Valores recopilados de (Vega y Miranda, 2009).

***Nota:** la betaína de coco es un coemulsionante utilizado en compañía de otros tensioactivos por lo que su valor HLB no está determinado.

Se realizaron pruebas de cada uno de los emulsionantes las cuales por separado no formaban una sola fase homogénea, se intentó una combinación de ambos la cual presento mejores resultados, sin embargo adquiriría una consistencia muy cremosa por lo que se recurrió a la ayuda de un coemulsionante, es decir, la betaína de coco la cual logró dar una consistencia

más líquida al desinfectante; por tanto se procedió a realizar pruebas con diferentes proporciones de ellos hasta encontrar la proporción adecuada.

Se utilizó Alcohol etílico como agente clarificante de la emulsión resultante debido a que presentaba aspecto lechoso y alta viscosidad, por lo que el alcohol actuó como diluyente, sin embargo, este fue utilizado en una cantidad muy baja para que no tuviera un efecto bactericida.

Con los resultados obtenidos se establecieron las proporciones (v/v) de cada uno de los constituyentes para la formulación del desinfectante, y estos se presentan en la tabla 2.2

Tabla 2.2 Proporciones de los reactivos a utilizar respecto al aceite esencial de Eucalipto.

Reactivos	Proporciones (v/v)
Aceite esencial de eucalipto (Cineol)	1
Aceite de ricino hidrogenado	2
Acido esteárico	0.5
Betaína de coco	0.8
Alcohol etílico al 90%	0.5

El procedimiento a seguir para preparar el desinfectante se muestra esquemáticamente en la ilustración 2.2.

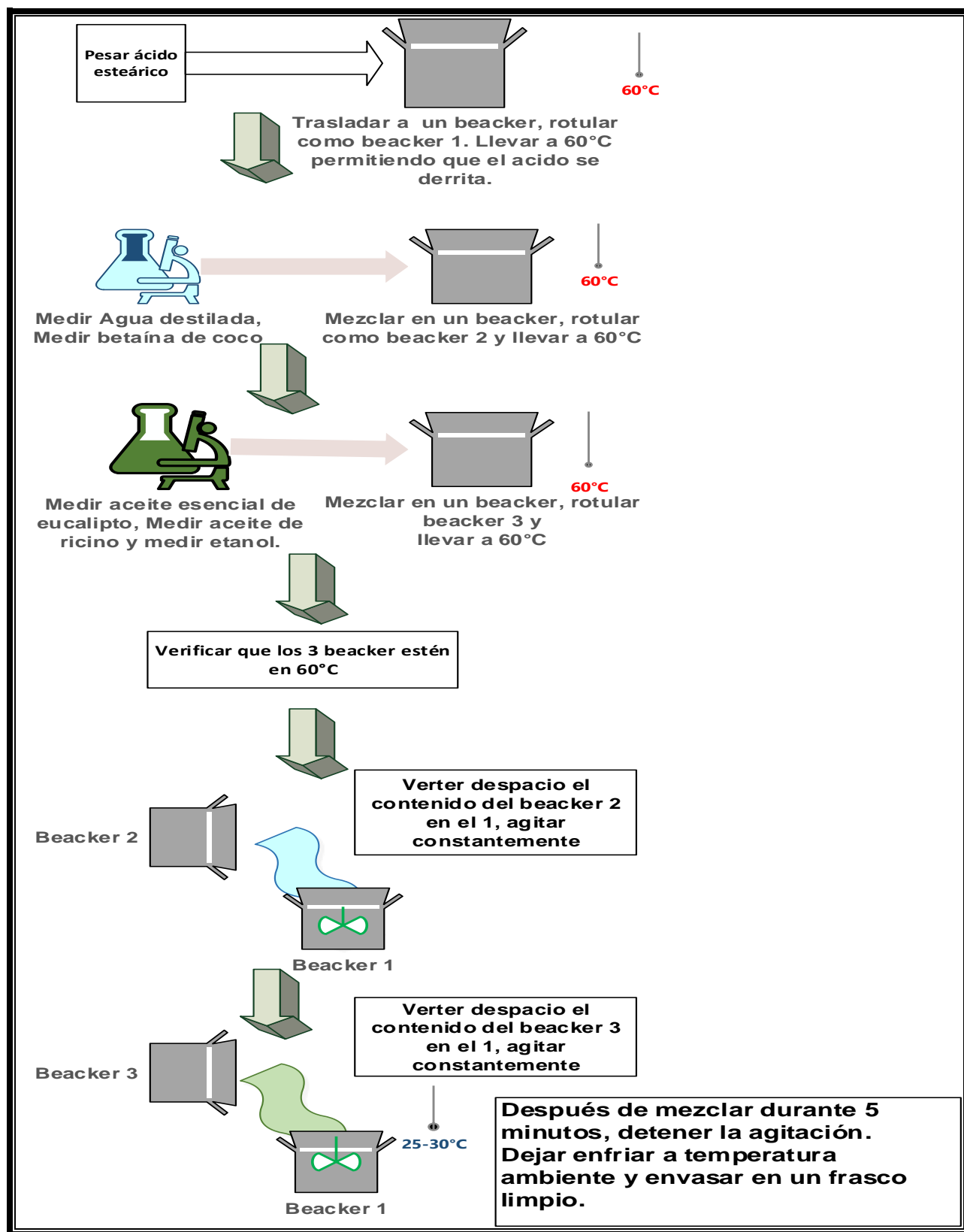


Ilustración 2.2 Procedimiento de preparación del desinfectante basado en aceite esencial de Eucalipto.

2.3 Diseño experimental para estudiar el efecto de la concentración de aceite esencial y el pH en la actividad antimicrobiana del desinfectante.

El diseño experimental es un modelo estadístico, cuyo objetivo es averiguar si unos determinados factores influyen en una variable de interés y, de existir influencia, cuantificarla. Además, estudia como variar los factores de un proceso para conocer los cambios que estos puedan generar en la respuesta y entender mejor el funcionamiento de un proceso o fenómeno estudiado.

Para la presente investigación se utilizó un diseño experimental del tipo factorial multinivel, este diseño es usado para estudiar efectos con “*q*” factores cuantitativos. Se parte especificando un rango de cobertura para cada factor (el cual es variado) y el número de diferentes niveles en los cuales se realiza el estudio (STATGRAPHICS, 2006).

Como se mencionó en la sección 1.1.4 del capítulo 1, la concentración del componente activo es crítica en la actividad antimicrobiana del desinfectante y en el caso del pH este influye en el entorno del microorganismo afectando su funcionamiento y permitiendo la absorción del compuesto activo, por lo que se seleccionaron los factores: concentración de aceite esencial de eucalipto y pH del desinfectante como principales influyentes en la actividad antimicrobiana (variable respuesta).

Para cuantificar el impacto de dichos factores en la variable respuesta se recurrió al seguimiento de la turbidez del medio inoculado y incubado comparándolo con los estándares de turbidez McFarland, los cuales dan un indicativo de la concentración de microorganismos respecto al grado de absorbancia.

El rango de concentración de aceite esencial de eucalipto a experimentar fue considerado tomando como referencia el documento técnico escrito por Solé, Alonso y Aubert (1994) en el que se detallan rangos de concentración para diversos componentes activos de desinfectantes y distintos productos de limpieza, entre los que se encuentran diversos componentes orgánicos que van desde el 0.1 hasta un 8% v/v de concentración; sin embargo,

para productos similares basados en aceites esenciales su concentración recomendable es de un 2% v/v para el aceite de pino y un 5 % v/v para el aceite del árbol de Té (Valdez, 2010) por lo que se seleccionó un rango de concentración de 1 a 5% v/v para esta investigación. El rango de pH a experimentar es de 4 a 6, debido a que este rango se encuentra fuera del pH óptimo de desarrollo de múltiples microorganismos entre los que se encuentran los utilizados como indicadores para esta investigación. Dado lo anterior el diseño experimental consta de 5 niveles para concentración y de 3 niveles para pH como se ilustra en la tabla 2.3.

Tabla 2.3 Parámetros del diseño experimental.

Factores	Limite Bajo	Limite Alto	Niveles	Unidades
Concentración de aceite esencial de Eucalipto.	1.0	5.0	5	% V/V
pH	4	6	3	Unidades de pH

En base al diseño del tipo factorial multinivel y haciendo uso de un software estadístico se obtienen 15 pruebas a efectuar y cada una de ellas se realizará por duplicado para cada uno de los microorganismos (*E. coli* y *S. aureus*). La tabla 2.4 muestra cada una de las pruebas a realizar.

Tabla 2.4 Pruebas a realizar obtenidas del diseño experimental.

Nº de prueba	Concentración de aceite de eucalipto (% v/v)	pH
1	5,0	4,0
2	1,0	6,0
3	4,0	6,0
4	5,0	6,0
5	2,0	6,0
6	3,0	4,0
7	1,0	5,0
8	4,0	5,0
9	3,0	5,0

Continua...

Tabla 2.4 Pruebas a realizar obtenidas del diseño experimental (Continuación).

Nº de prueba	Concentración de aceite de eucalipto (% v/v)	pH
10	4,0	4,0
11	2,0	5,0
12	1,0	4,0
13	3,0	6,0
14	2,0	4,0
15	5,0	5,0

Cada una de las pruebas a realizar según la tabla 2.4 serán sometidas a pruebas de ausencia-presencia, las que presenten resultados positivos (entendiéndose como positivo el no crecimiento de microorganismos) se someterán a la metodología de pruebas de tiempo de contacto y a la metodología cuantitativa de actividad bactericida, a la que presente el mejor resultado se le determinarán las propiedades físicas del desinfectante y se evaluará su impacto ambiental a través de los parámetros obligatorios de vertido de las aguas residuales de acuerdo a la norma NSO 13.49.01.09. Aguas Residuales Descargadas a un Cuerpo Receptor y la Norma Técnica para Regular Calidad de Aguas Residuales de Tipo Especial Descargadas al Alcantarillado Sanitario.

2.4 Metodología de evaluación bactericida

En este apartado se expondrán las metodologías con las cuales se evaluarán los desinfectantes, tanto cualitativa como cuantitativamente con el objetivo de garantizar el poder bactericida del mismo y asegurar su funcionamiento.

2.4.1 Metodología de pruebas de Ausencia-Presencia

La evaluación de ausencia-presencia de microorganismos se realizará por medio de la marcha de laboratorio “Acción de Agentes Físicos y Químicos sobre los Microorganismos” (Pereira de Ruíz, 2016), (ver anexo 2) esta nos indicará cual o cuales formulaciones de desinfectante puestas a prueba poseen acción antimicrobiana. Posteriormente los resultados obtenidos se

compararán con la escala de turbidez McFarland (ver anexo 3) para determinar el número de microorganismos presentes de manera cuantitativa (Organización Mundial de la Salud, 2004) reportando los resultados como unidades formadoras de colonias (UFC). Esto se muestra de manera esquemática en la ilustración 2.3.

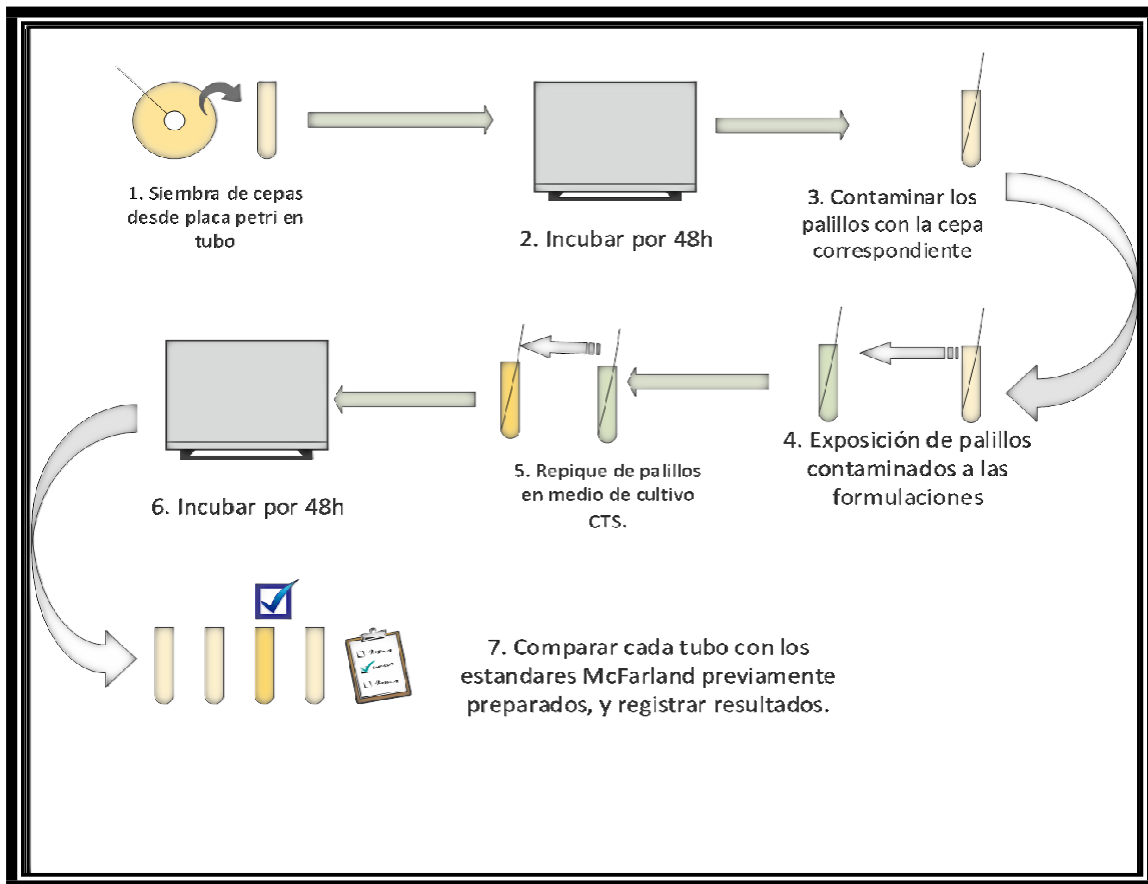


Ilustración 2.3 Esquematización de proceso de prueba de ausencia-presencia.

2.4.2 Metodología de pruebas de tiempo de contacto

La prueba de tiempo de contacto se medirá por la técnica de dilución en tubo (ver anexo 4), esta técnica consiste en colocar volúmenes iguales de las formulaciones puestas a prueba en tubos estériles con el microorganismo a utilizar posteriormente se transfiere una alícuota a tubos que contienen medio de cultivo (Alba & Araujo, 2008). Esta técnica se utilizará con el objetivo de determinar el tiempo en que es efectiva la formulación. Tal como se muestra de manera esquemática en la ilustración 2.4.

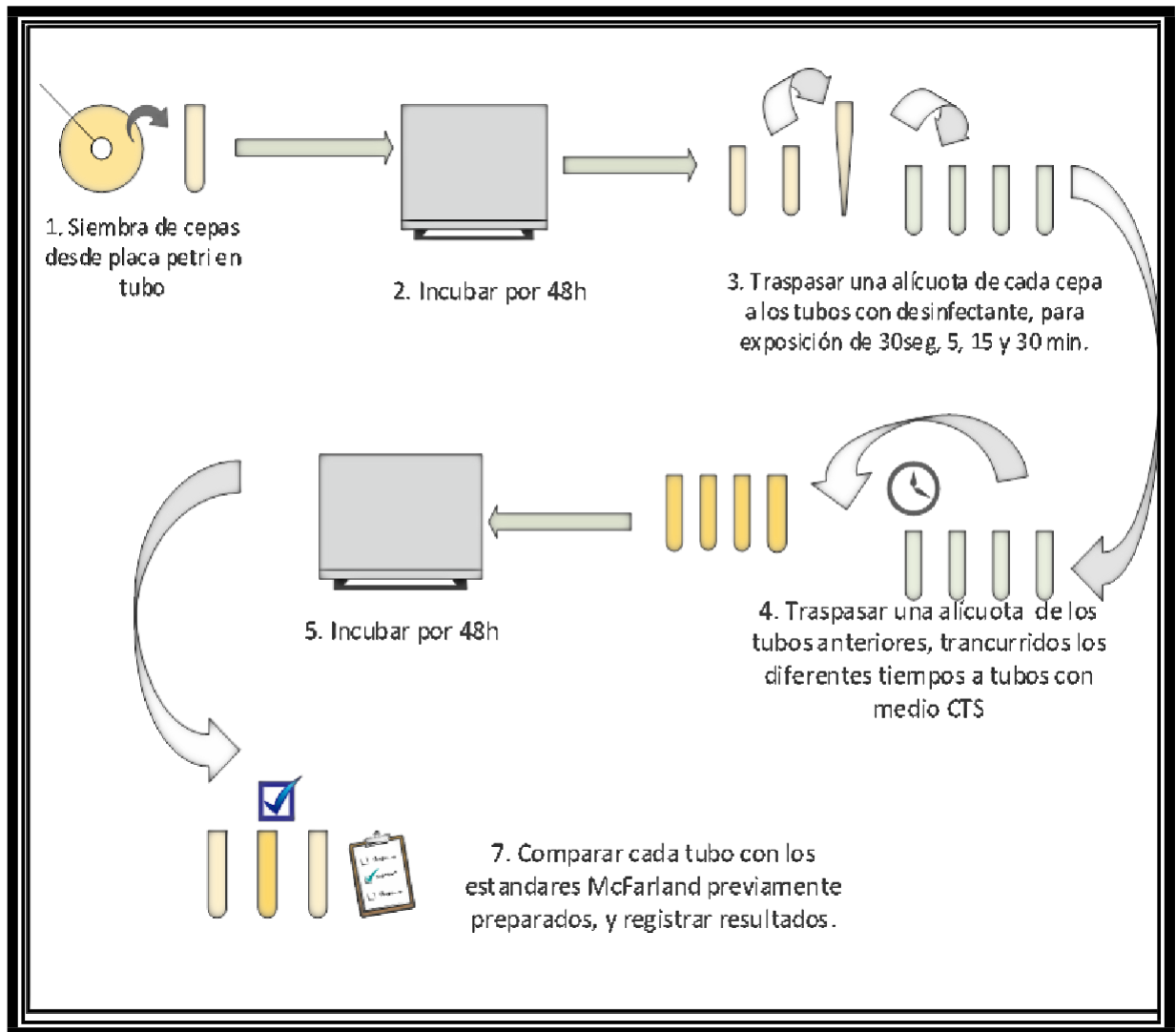


Ilustración 2.4 Esquematización de prueba de tiempos de contacto.

2.4.3 Metodología cuantitativa de actividad bactericida

La prueba cuantitativa de actividad bactericida se hará de acuerdo al método de evaluación de actividad antimicrobiana establecido por el manual “Official Methods of Analysis” AOAC; el cual detalla la metodología para determinar la actividad antimicrobiana y es aplicable a los productos germicidas. Se basa en determinar el porcentaje de reducción de un número determinado de microorganismos, cuando se ponen en contacto con un germicida, bajo condiciones de prueba específicas. Además se compararán los resultados obtenidos contra desinfectantes comerciales de uso doméstico de acuerdo a Claros, Hernández y Turcios (2015)

2.5 Metodología para establecer las propiedades físicas del desinfectante basado en aceite esencial de Eucalipto y su vida útil.

En esta sección se expondrán las metodologías con las cuales se evaluarán los desinfectantes con el objetivo de poder recolectar la información necesaria para la realización de la ficha técnica.

2.5.1 Homogeneidad

El desinfectante se considerará homogéneo al contar de una única fase en la cual no se pueda visualizar a los componentes que lo forman. La homogeneidad se evaluará a través de la observación de la solución formada al instante de su elaboración.

2.5.2 Estabilidad

Para considerar al desinfectante como estable este debe ser capaz de mantener sus propiedades, homogeneidad y efecto de limpieza a través del tiempo. La estabilidad se determinará a través tanto de observación de una sola fase homogénea, como la del análisis de actividad bactericida del desinfectante después del mismo periodo de tiempo que se tomará en cuenta para la vida útil.

2.5.3 Corrosividad

Corrosividad es la capacidad que posee una sustancia para destruir o dañar irreversiblemente una superficie o sustancia con la que entre en contacto, en donde las sustancias corrosivas más comunes suelen ser ácidos y bases fuertes. Según la ficha de seguridad del Cineol (PubChem , 2018) esta es una sustancia no corrosiva lo cual es respaldado por su naturaleza como un monoterpeno, componentes típicos de los aceites esenciales, por lo que un desinfectante formulado a partir de esta no deberá presentar ningún tipo de corrosividad. Sin embargo, al no aplicarse de manera pura, sino más bien en solución junto a otros compuestos, es necesario realizar pruebas de corrosividad para comprobar que el desinfectante formulado no afecte de manera negativa las superficies que pretende limpiar.

En esta investigación se utilizará el método de rastreo del cambio de masa basado en la práctica N°3 “Influencia del pH en la corrosión” (Arévalo, 2015), (ver anexo 5) y haciendo uso de la ecuación presentada en el guión de clase de la Unidad 2 “Importancia del estudio y factores que influyen en la corrosión” (Arévalo, 2015); la cual representa la velocidad de corrosión expresada en cm/h, de la Cátedra Principios de Electroquímica y Corrosión.

2.5.4 Capacidad desodorante

Esta es la capacidad del producto para eliminar malos olores presentes en el área a limpiar, los cuales se pueden deber a la presencia de microorganismos o de elementos en estado leve de descomposición, llevada a cabo a través de la eliminación de estos elementos extraños. Dado que el olor es algo muy subjetivo no puede ser medible de manera cuantitativa fácilmente por lo que se tiende a medir de manera cualitativa con lo que se conoce como análisis sensorial.

El tipo de análisis sensorial utilizado será uno Olfativo en el que a grandes rasgos mide las respuestas de un grupo de personas expuestas a un cierto olor o aroma en particular solicitándoles que describan el aroma según las indicaciones de quienes guían la sesión, el rasgo identificable del olor, intensidad y su permanencia.

En esta investigación se usará una prueba hedónica basada en la investigación “Evaluación Sensorial” (Hernández, 2005). Se busca identificar la presencia de residuos fétidos y la característica discriminatoria será la ausencia o presencia de estos luego de la limpieza con el desinfectante (ver Anexo 6). Preparando un ambiente controlado antes de la exposición de los jueces al producto para evitar errores o discrepancias debidos a estímulos externos, el número de panelistas mínimos según Ibañez y Barcina (2001) está entre 30 y 40 personas por muestra para asegurar fiabilidad estadística.

2.5.5 Riesgo al contacto

El riesgo al contacto se determinará de manera cualitativa al exponer a los investigadores durante un periodo de tiempo de 5 minutos con el desinfectante en contacto directo con el

dorso de la mano, antebrazo y en los dedos, poniéndose cada investigador una porción de 5 ml del desinfectante en una de las anteriores partes; al cabo de este tiempo se limpiará y se dejará transcurrir 10 minutos más para observar las alteraciones en la zona expuesta si las hubiere como se muestra esquemáticamente en la ilustración 2.5.

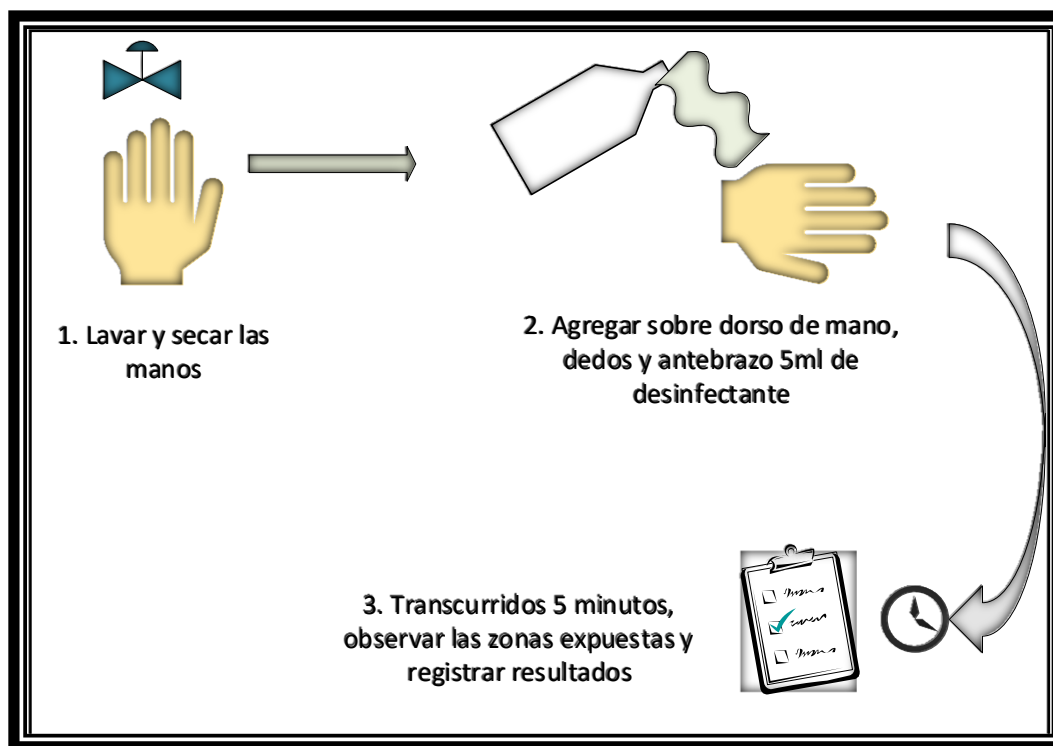


Ilustración 2.5 Esquematización de prueba de Riesgo de Contacto.

2.5.6 Vida útil

Se mantendrán las muestras del desinfectante formulado a las condiciones ambiente del área metropolitana de San Salvador, cuyo promedio en temperatura y humedad según datos del Servicio Nacional de Estudios Territoriales (SNET) son de 30 °C y 50% de humedad, con el fin de estudiar el efecto del paso del tiempo y como afecta éste a las propiedades del desinfectante. Se realizará de esta manera debido a que según el formulario GUÍA DE USUARIO PARA TRAMITE DE NUEVO REGISTRO SANITARIO DE PRODUCTOS COSMÉTICOS E HIGIÉNICOS de la Dirección Nacional de Medicamentos (DNM) no es necesario declarar fecha de vencimiento para un producto higiénico. Sin embargo, siendo este un producto natural es conveniente garantizar sus propiedades durante un periodo mínimo de tiempo. Cabe aclarar que la DNM considera como productos higiénicos:

Productos destinados a ser aplicados en objetos, utensilios, superficies y mobiliario que estén en contacto con las personas en viviendas, edificios e instalaciones públicas y privadas, industrias y otros lugares, usados con el fin de limpiar, desinfectar, desodorizar y aromatizar. (Dirección Nacional de Medicamentos, 2016).

Tomando como referencia a Troya (2007) el periodo mínimo de efectividad esperado para un desinfectante en su forma concentrada es de 3 meses por lo tanto la prueba a realizar tendrá una duración de 90 días, en la misma se evaluará de manera cuantitativa la permanencia del poder bactericida de la formulación exitosa resultante de la prueba cuantitativa expuesta en el apartado 2.4.3 realizando además dicha prueba aproximadamente a los 60 días, dado que es un producto natural sin conservantes es recomendable darle un seguimiento a su efectividad bactericida en un periodo menor al propuesto, cabe aclarar que no se evaluará a los 30 días ya que Troya (2007) establece un periodo mínimo de 30 días para desinfectantes en forma diluida por lo tanto este tiempo no es representativo. Sin embargo, si se observara una disminución en su actividad bactericida por debajo de 99.999% dejaría de ser apto para su uso en laboratorios e industrias, de tal manera que la prueba de vida útil se vería finalizada, reportando la vida útil del desinfectante como el último tiempo en el que se determinó efectividad bactericida del 99.999%.

2.6 Metodología para la determinación de los parámetros obligatorios de vertido de las aguas residuales.

Como parte de los objetivos en la formulación del desinfectante natural, objeto de la presente investigación se realizará un análisis del agua residual del proceso de manufactura del desinfectante y del proceso de limpieza con el desinfectante sobre una superficie cuyos parámetros y metodologías se listan en la tabla 2.5, para ser comparados con la norma NSO 13.49.01.09: Aguas residuales descargadas a un cuerpo receptor (CONACYT, 2009) y con la Norma técnica para regular calidad de aguas residuales de tipo especial descargadas al alcantarillado sanitario (ANDA,2004).

Tabla 2.5 Parámetros a evaluar de ambas normas para aguas residuales.

Parámetro	Metodología a aplicar
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	5220 C Closed Reflux, Titrimetric Method APHA
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO ₅)	5210 B 5-Day BOD Test. Method APHA
Sólidos Sedimentables	2540 F Settleable Solid Method APHA
Sólidos Suspendidos Totales	2540 D Total Suspended Dried at 103 – 105°C Method APHA
Aceites y Grasas	5520 D Soxhlet Extraction. Method APHA

Capítulo 3

Fase Experimental

En el presente capítulo se narra la ejecución de las metodologías experimentales que abarcan desde la extracción del aceite esencial haciendo uso del equipo descrito en la sección 2.1, la elaboración de los desinfectantes a evaluar y las distintas pruebas de actividad bactericida, así como sus propiedades físicas, vida útil y la evaluación del impacto ambiental a través de la comparación con la norma NSO 13.49.01.09. Aguas Residuales Descargadas a un Cuerpo Receptor y la Norma Técnica para Regular Calidad de Aguas Residuales de Tipo Especial Descargadas al Alcantarillado Sanitario.

3.1 Extracción del aceite esencial

Se recolectaron hojas de eucalipto del Centro Tecnológico de Agricultura y Ganadería (CETAG) UES, ubicado en San Luis Talpa, ya que en el CETAG (ilustración 3.1) se cuenta con una amplia población de árboles de eucalipto *globulus labil*. Comparando con las características específicas de la especie (Ilustración 3.2), se colectaron 3 sacos de hojas cuya masa ascendía a 19.2 kilogramos. El proceso completo de recolección y preparación de materia prima se detalla en la ilustración 3.3.



Ilustración 3.1 Centro Tecnológico de Agricultura y Ganadería.



Ilustración 3.2 Especie de eucalipto encontrada en CETAG

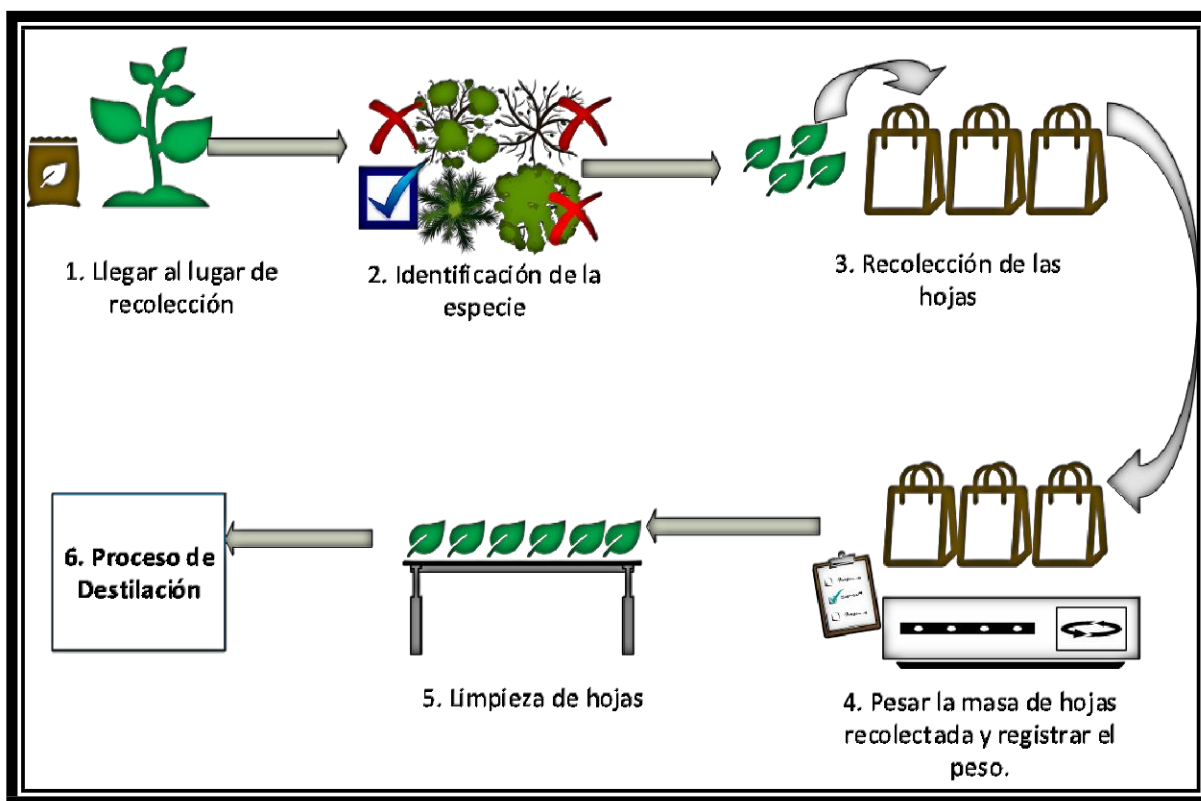


Ilustración 3.3 Esquema de proceso de recolección y preparación de materia prima.

Posteriormente usando el equipo descrito en la sección 2.1 se realizó la extracción del aceite esencial, las hojas fueron limpiadas, lavadas y secadas previo al proceso de destilación, para luego ser colocadas en la cámara separándolas por medio de una rejilla del agua al fondo de ésta. Las destilaciones fueron realizadas en el lapso de 10 días en las que se realizaron 29 corridas de destilación, las cuales tenían una duración promedio de 1 hora con 20 minutos. En esta operación se obtuvo una mezcla de hidrolato de eucalipto junto al aceite esencial debido a las características del equipo de extracción, la cual fue necesario separar a través de diferencia de densidades usando ampollas de separación, como se muestra en la ilustración 3.4.

El aceite esencial obtenido fue almacenado en frascos de vidrio ámbar, para conservar de la mejor manera posible sus propiedades. Los parámetros de operación se detallan en el apartado 4.1.



Ilustración 3.4 Separación de aceite esencial de eucalipto del hidrolato.

3.2 Preparación de las formulaciones del desinfectante obtenidas del diseño experimental.

Se procedió a elaborar las diferentes formulaciones de los desinfectantes de acuerdo a la tabla 2.4 y al proceso descrito en la ilustración 2.2. De cada proporción de aceite esencial se elaboraron 600 ml, de los cuales se tomaron 200 ml para regular las condiciones a cada pH, obteniendo así las 15 formulaciones a evaluar, las cuales se muestran en la ilustración 3.5.

Para regular el pH de cada formulación se usó bicarbonato de sodio (NaHCO_3) para basificar en un rango de 0.03 g – 0.05 g y ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) para acidificar en un rango de 0.05 g – 0.1 g para los desinfectantes ya que el pH original era de 5.4, se homogenizó mediante agitación constante, luego de unos minutos se detuvo la agitación y se realizaron las lecturas con pHmetro digital, hasta alcanzar el pH indicado.



Ilustración 3.5 Desinfectantes a Evaluar.

3.3 Determinación de la actividad bactericida

En esta etapa se realizaron las pruebas cualitativas y cuantitativas para la selección de la formulación o formulaciones más efectivas evaluándolas con los microorganismos indicadores *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, las cuales fueron donadas por el Laboratorio de Calidad de Aguas de la Administración Nacional de Acueductos y Alcantarillados (ANDA) ya que estas poseen la certificación de la American Type Culture Collection (ATCC) (ver anexo 8).

3.3.1 Pruebas de Ausencia-Presencia

En esta prueba se realizó la metodología expuesta en el anexo 2, para lo cual fue necesario el escalamiento de los microorganismos con el objetivo de tener un cultivo de 48 horas en cantidad abundante ya que se necesitó contaminar un gran número de palillos, previamente esterilizados, por las características del procedimiento debido a que se realizaron en total 60 pruebas, 30 para *Staphylococcus aureus* y 30 para *Escherichia coli* de las cuales comprenden las 15 formulaciones a testear y sus respectivos duplicados.

Un resumen del proceso se muestra de manera esquemática en la ilustración 3.6.

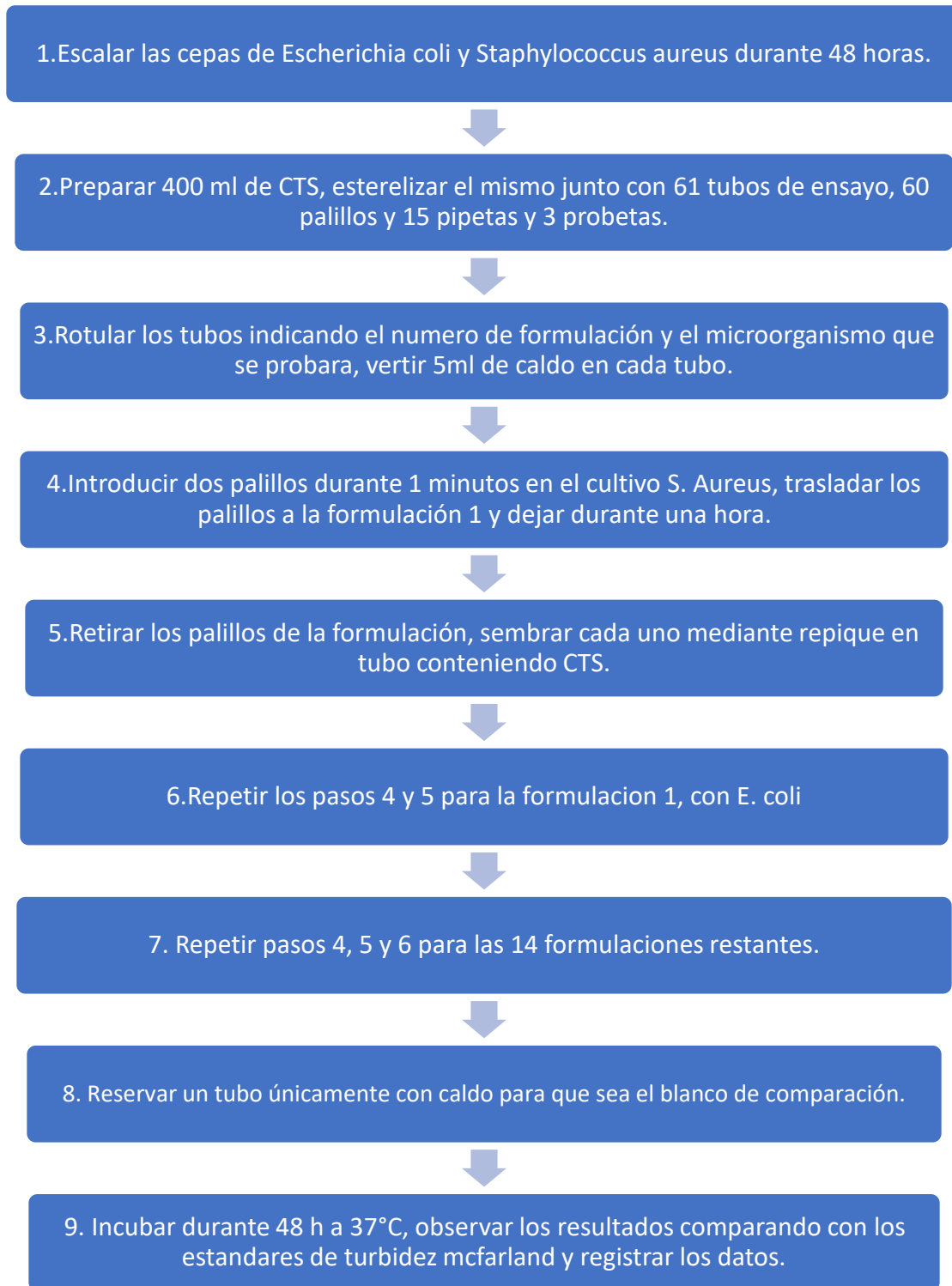


Ilustración 3.6 Flujograma del proceso experimental de la prueba Ausencia-Presencia de microorganismos expuestos al desinfectante basado en aceite esencial de Eucalipto.

Se preparó toda la cristalería a usar, esterilizándose en autoclave; Se preparó 400 ml de medio de cultivo Caldo Tripticasa Soya (CTS) dispensándose 6 ml en cada uno de los 60 tubos para luego ser esterilizados como se muestra en la ilustración 3.7 y 3.8.



Ilustración 3.7 Llenado de los tubos con medio CTS. **Ilustración 3.8** Tubos llenos con CTS.

Se dispensaron 5 ml de desinfectante en 60 tubos esterilizados y debidamente rotulados para cada tipo de microorganismo y formulación para estar listos al momento de pasar el minuto de la contaminación de los palillos como se muestran en la ilustración 3.9.



Ilustración 3.9 Formulaciones listas para ser dispensadas en los tubos de ensayo.

Los palillos fueron contaminados por un periodo de 1 minuto con las cepas ya escaladas, después del cual fueron expuestos a las formulaciones por 1 hora, como se muestra en la

ilustración 3.10, posteriormente se inocularon los tubos conteniendo CTS con los palillos recién salidos de las formulaciones de desinfectante para ser puestos a incubar por 48 horas a una temperatura de 37 °C.

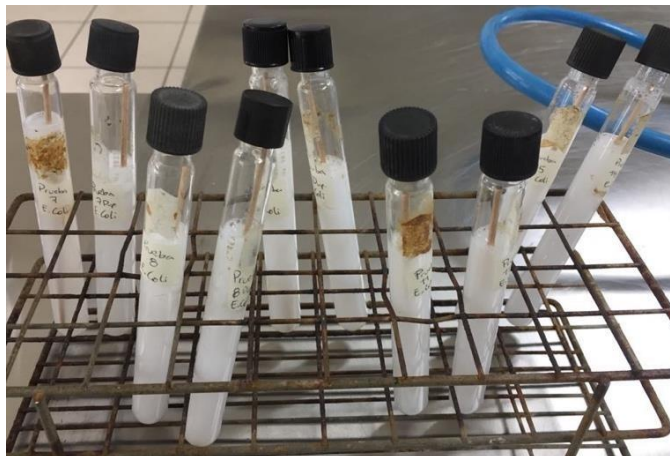


Ilustración 3.10 Formulaciones conteniendo a los palillos contaminados con *S. aureus* y *E. coli*

3.3.2 Prueba de tiempo de contacto

De la prueba anterior se obtuvieron dos formulaciones que presentaron los mejores resultados (Concentración 4% v/v, pH=5 y Concentración 5% v/v, pH=5); por lo que estas se consideraron con la mayor actividad bactericida y por lo tanto se sometieron a la prueba de tiempo de contacto por el método de dilución en tubo metodología expuesta en el anexo 4. Para lo cual fue necesario realizar nuevamente el escalamiento de los microorganismos con el objetivo de tener un cultivo de 48 horas.

Un resumen del proceso se muestra de manera esquemática en la ilustración 3.11

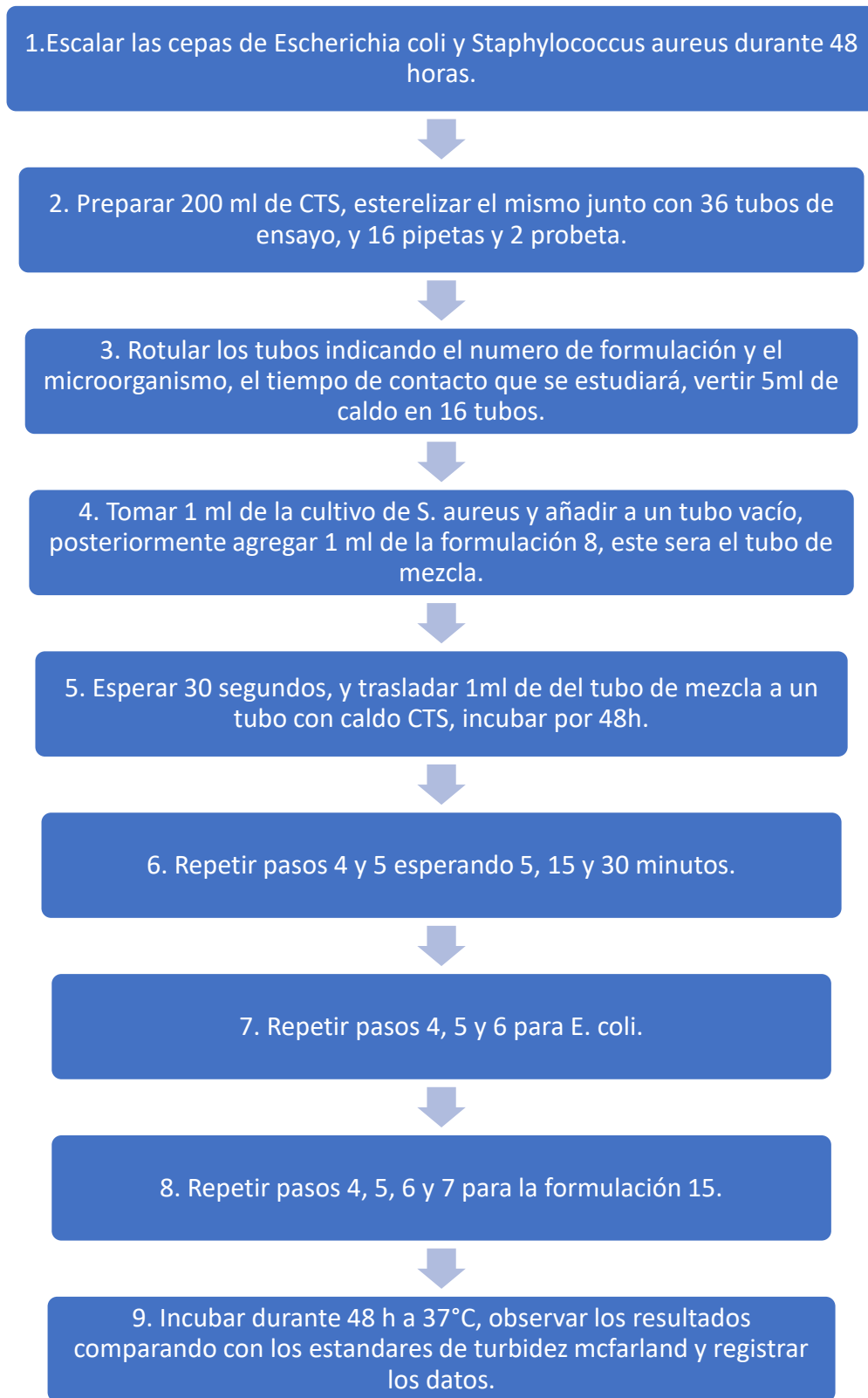


Ilustración 3.11 Flujograma de proceso para prueba de tiempo de contacto de microorganismos contra el desinfectante basado en aceite esencial de Eucalipto.

Se prepararon 200 ml de medio de cultivo CTS para llenar 18 tubos. Se tomó 1 ml de la cepa cultivada y se añadió a un tubo vacío para posteriormente agregar 1 ml de desinfectante ver ilustración 3.12, se agitó y se dejó pasar los tiempos de estudio después de los cuales se tomó una alícuota de 0.5 ml de esta mezcla para inocular los tubos conteniendo CTS debidamente identificados, poniéndose a incubar por 48 horas a 37°C. Lo anterior se realizó para cada uno de los microorganismos.



Ilustración 3.12 Exposición de la cepa al desinfectante formulado.

3.3.3 Prueba Cuantitativa de la actividad bactericida

De la prueba 3.3.1 se obtuvieron dos formulaciones que presentaron los mejores resultados por lo que estas se consideraron con la mayor actividad bactericida y por lo cual estas fueron enviadas al laboratorio del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador (UES) en donde se sometieron a la prueba de Evaluación de Actividad Antimicrobiana basada en el manual “Official Methods of Analysis “AOAC.

3.4 Determinación de propiedades físicas del desinfectante y su vida útil

Como parte de la caracterización de un producto limpiador es necesario establecer sus propiedades físicas, para su uso y manejo en industrias y laboratorios; además se realizó un

estudio de la permanencia de las propiedades bactericidas luego de un periodo de tiempo considerable, con el objetivo de garantizar su efecto limpiador.

Cabe aclarar que estas propiedades fueron evaluadas para una sola formulación de acuerdo a los resultados de la prueba 3.3.3.

3.4.1 Determinación de Homogeneidad

La homogeneidad se determinó de manera cualitativa al momento de la elaboración de las diferentes formulaciones de desinfectantes con la observación de si estas presentaban sinéresis, es decir, la separación de fases u componentes de una disolución.

3.4.2 Determinación de Estabilidad

La estabilidad se determinó a través de la observación de la permanencia de una sola fase homogénea, por un periodo de tiempo acorde con la determinación de la vida útil, en la que se evaluara la efectividad bactericida.

3.4.3 Determinación de Corrosividad

La prueba de corrosividad fue efectuada siguiendo la metodología descrita en el anexo 5, utilizando como materiales de prueba una pieza de hierro y una de acero, las cuales fueron pesadas antes de ser expuestas a la solución puesta a prueba, la pieza metálica fue colocada en un recipiente de vidrio en donde se agregó el desinfectante hasta cubrirlo por completo, como se muestra en la ilustración 3.13, dejándose por un periodo de una semana; después del cual las piezas fueron limpiadas, secadas con papel toalla y colocadas en la estufa a una temperatura de 105°C por 30 minutos para eliminar todo rastro de humedad.



Ilustración 3.13. Piezas de metal sumergidas en desinfectante.

3.4.4 Determinación de capacidad desodorante

La capacidad desodorante de la formulación de desinfectante fue determinada a través de un análisis sensorial del tipo hedónico detallado en el anexo 6, usando el instrumento de prueba presentado en el anexo 7. En dicha prueba se contaminó una superficie con una sustancia con olor fétido (atún) y cada uno de los evaluadores reconoció dicho olor como se muestra en la ilustración 3.14;



Ilustración 3.14 Panelista olfateando la superficie después de limpia.

3.4.5 Determinación de Riesgo al contacto

Esta prueba se realizó de manera cualitativa exponiendo a los investigadores por un periodo de 5 minutos a 5 ml del desinfectante en diferentes zonas de la piel como lo son el dorso de

la mano, dedos y el antebrazo como se muestra en la ilustración 3.15; luego se lavó la zona expuesta y se dejaron pasar 10 minutos en espera de alguna reacción o irritación.



Ilustración 3.15 Superficies de la piel expuestas al desinfectante.

3.4.6 Determinación de la Vida útil

Las pruebas de efectividad bactericida para determinar la vida útil se realizaron después de transcurridos 60 y 90 días desde la elaboración de dicha formulación de la cual se reservó una cantidad de 150 ml para la realización de cada prueba bajo la misma metodología del apartado 3.3.3. en el laboratorio CENSALUD UES.

3.5 Determinación de los parámetros obligatorios de vertido de las aguas residuales

Para evaluar parámetros obligatorios de vertido de las aguas residuales de acuerdo a la Norma NSO 13.49.01.09 y la Norma Técnica para regular la calidad de aguas residuales de tipo especial vertidas al alcantarillado sanitario de la prueba 3.3.3 se seleccionó una formulación con la mayor actividad bactericida y menor concentración de componente activo. Se colectó el agua residual de la limpieza de utensilios, cristalería y equipo utilizado durante el proceso de manufactura del desinfectante con el objetivo de conocer el impacto de su elaboración a

escala de laboratorio, además se realizó un proceso de limpieza sobre la mesa de laboratorio de la planta piloto de la Universidad de El Salvador en donde se colectó el agua residual de esta operación tal como se muestra en la ilustración 3.16, con el objetivo de conocer la contribución que éste aportaría a la carga contaminante existente durante su utilización, la cual fue enviada al Laboratorio de Control de Calidad de la Administración Nacional de Acueductos y Alcantarillados (ANDA) (Ilustración 3.17) en donde se sometió al análisis de DBO5, DQO, Aceites y Grasas, Sólidos Sedimentables y Sólidos Suspendedos.

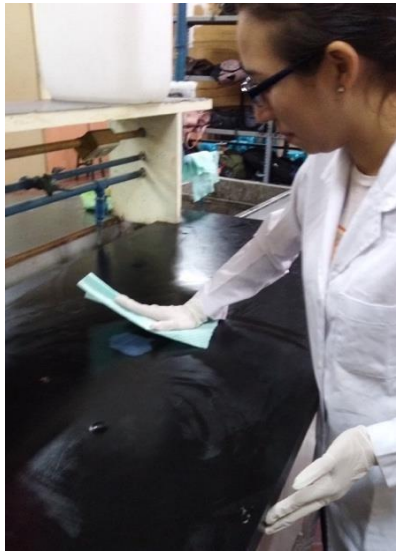


Ilustración 3.16 Limpieza de mesa de laboratorio con desinfectante basado en aceite esencial de Eucalipto.

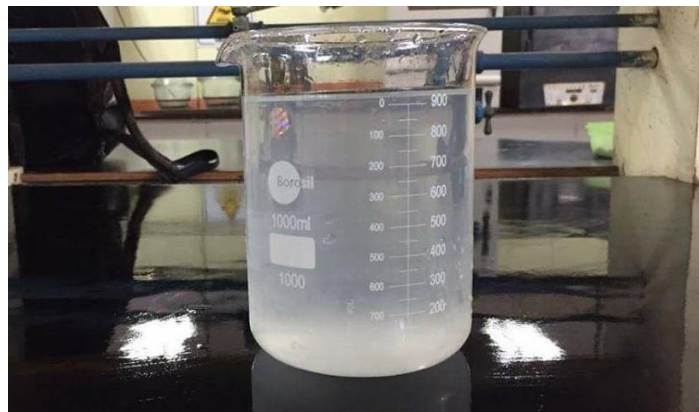


Ilustración 3.17 Muestra de agua recolectada del proceso de manufactura del desinfectante basado en aceite esencial de Eucalipto.

Capítulo 4

Análisis y Discusión de Resultados

En el presente capítulo se narra los resultados obtenidos que abarcan desde la extracción del aceite esencial, las distintas pruebas de actividad bactericida, así como sus propiedades físicas, vida útil y la evaluación del impacto ambiental a través de la comparación con la norma NSO 13.49.01.09. Aguas Residuales Descargadas A Un Cuerpo Receptor y la Norma Técnica Para Regular Calidad De Aguas Residuales De Tipo Especial Descargadas Al Alcantarillado Sanitario.

4.1 Resultados de la extracción del aceite esencial

En esta etapa se realizaron 29 corridas de destilación, las cuales tenían una duración aproximada de 1 hora con 45 minutos considerando operaciones de limpieza del equipo, preparación de las hojas, etc., en un lapso de 10 días; al final de las que se obtuvieron en total 486 ml de Aceite esencial de Eucalipto.

Como parte de la investigación se determinó el rendimiento obtenido de la operación de destilación, el cual está basado en un balance de masa de la cantidad de aceite esencial obtenida entre la masa de hojas entrantes al proceso, como se detalla a continuación:

$$V_{\text{Aceite esencial obtenido}} = 486 \text{ ml}$$

$$\rho_{\text{Aceite esencial}} = 0.912 \text{ g/ml dato tomado de la Tabla 1.3}$$

$$M_{\text{Hojas entrantes}} = 19.2 \text{ kg}$$

$$M_{\text{Aceite esencial}} = V_{\text{Aceite esencial obtenido}} * \rho_{\text{Aceite esencial}}$$

$$M_{\text{Aceite esencial}} = (486 \text{ ml}) * (0.912 \text{ g/ml}) = 443.23 \text{ g.}$$

$$\% \text{ Rendimiento} = (M_{\text{Aceite esencial}} / M_{\text{Hojas entrantes}}) * 100 = (443.23 \text{ g.} / 19200 \text{ g.}) * 100$$

$$\% \text{ Rendimiento} = 2.308 \% \text{ ó}$$

$$\text{Rendimiento} = 0.023 \text{ g de aceite esencial / g hojas de eucalipto utilizadas}$$

Retomando el argumento de la sección 1.3.1 en la que teóricamente se establece un rango de rendimiento de extracción para la especie *Eucalyptus globulus* labil que va desde 1.5 hasta el 3% p/p, por lo que el rendimiento obtenido de 2.308% p/p coincide con el rango teórico demostrando a su vez el buen funcionamiento del equipo utilizado. Es importante aclarar la existencia de pérdidas de aceite esencial en la operación de separación.

4.2 Resultados de análisis cualitativo y cuantitativo de la actividad bactericida

4.2.1 Resultados de prueba de ausencia-presencia

En la tabla 4.1 se presentan los resultados obtenidos de la comparación de cada tubo inoculado según la tabla 2.4 con la escala de turbidez McFarland asignando a cada tubo de prueba el número de la escala de turbidez más semejante recopilándose para *E. coli* y en la tabla 4.2 para *S. aureus*.

Tabla 4.1 Resultados de prueba Ausencia-Presencia para *Escherichia Coli* según escala McFarland

Nº de prueba	Concentración de aceite esencial (% v/v)	pH	Nº Turbidez Estándar	Nº aproximado de microorganismos (UFC)
1a	5	4	3	9x10 ⁸
1b	5	4	3	9x10 ⁸
2a	1	6	2	6x10 ⁸
2b	1	6	3	9x10 ⁸
3a	4	6	2	6x10 ⁸
3b	4	6	2	6x10 ⁸
4a	5	6	2	6x10 ⁸
4b	5	6	2	6x10 ⁸
5a	2	6	2	6x10 ⁸
5b	2	6	2	6x10 ⁸
6a	3	4	2	6x10 ⁸
6b	3	4	2	6x10 ⁸
7a	1	5	3	9x10 ⁸
7b	1	5	3	9x10 ⁸
8a	4	5	2	6x10 ⁸
8b	4	5	2	6x10 ⁸

Continua...

Tabla 4.1 Resultados de prueba Ausencia-Presencia para Escherichia Coli según escala (Continuación).

Nº de prueba	Concentración de aceite esencial (% v/v)	pH	Nº Turbidez Estándar	Nº aproximado de microorganismos (UFC)
9a	3	5	3	9x10 ⁸
9b	3	5	3	9x10 ⁸
10a	4	4	3	9x10 ⁸
10b	4	4	3	9x10 ⁸
11a	2	5	3	9x10 ⁸
11b	2	5	2	6x10 ⁸
12a	1	4	2	6x10 ⁸
12b	1	4	2	6x10 ⁸
13a	3	6	3	9x10 ⁸
13b	3	6	3	9x10 ⁸
14a	2	4	2	6x10 ⁸
14b	2	4	2	6x10 ⁸
15a	5	5	1	3x10⁸
15b	5	5	1	3x10⁸

Tabla 4.2 Resultados de prueba Ausencia-Presencia para Staphylococcus aureus según escala McFarland

Nº de prueba	Concentración de aceite esencial (% v/v)	pH	Nº Turbidez Estándar	Nº aproximado de microorganismos (UFC)
1a	5	4	2	6x10 ⁸
1b	5	4	1	3x10 ⁸
2a	1	6	2	6x10 ⁸
2b	1	6	2	6x10 ⁸
3a	4	6	2	6x10 ⁸
3b	4	6	1	3x10 ⁸
4a	5	6	1	3x10 ⁸
4b	5	6	1	3x10 ⁸
5a	2	6	1	3x10⁸
5b	2	6	1	3x10⁸

Continua...

Tabla 4.2 Resultados de prueba Ausencia-Presencia para *Staphylococcus aureus* según escala (Continuación).

Nº de prueba	Concentración de aceite esencial (% v/v)	pH	Nº Turbidez Estándar	Nº aproximado de microorganismos (UFC)
6a	3	4	0.5	1x10 ⁸
6b	3	4	0.5	1x10 ⁸
7a	1	5	2	6x10 ⁸
7b	1	5	2	6x10 ⁸
8a	4	5	0.5	1x10 ⁸
8b	4	5	0.5	1x10 ⁸
9a	3	5	1	3x10 ⁸
9b	3	5	1	3x10 ⁸
10a	4	4	1	3x10 ⁸
10b	4	4	1	3x10 ⁸
11a	2	5	1	3x10 ⁸
11b	2	5	1	3x10 ⁸
12a	1	4	1	3x10 ⁸
12b	1	4	0.5	1x10 ⁸
13a	3	6	1	3x10 ⁸
13b	3	6	1	3x10 ⁸
14a	2	4	1	3x10 ⁸
14b	2	4	1	3x10 ⁸
15a	5	5	1	3x10 ⁸
15b	5	5	1	3x10 ⁸

Las pruebas señaladas en amarillo tanto para *E. coli* como para *S. aureus* presentaron resultados favorables, pero se descartaron debido a que la formulación presentó luego de 1 semana desde su fabricación la separación marcada de fases evidenciando su inestabilidad; por otro lado, las pruebas 8 y 15 presentaron además de resultados positivos para ambos microorganismos, homogeneidad, por tanto, fueron las escogidas para pasar a la siguiente metodología de prueba. Al analizar ambas tablas se puede observar una mayor actividad bactericida para *S. aureus* en la mayoría de las formulaciones.

4.2.2 Resultados de la prueba de tiempo de contacto

Aplicando el mismo método de comparación de tubos con la escala de turbidez McFarland se obtuvieron los siguientes resultados para las formulaciones 8 y 15 como puede observarse en las tablas 4.3 para E. coli y 4.4 para S. aureus.

Tabla 4.3 Resultados de tiempo de contacto ante desinfectante basado en aceite esencial de Eucalipto para E. coli.

Nº de prueba	Concentración de aceite esencial (%v/v)	pH	Tiempo de contacto	Nº de Turbidez Estándar	Nº aproximado de microorganismos (UFC)
8	4	5	30 seg	3	9x10 ⁸
8	4	5	5 min	3	9x10 ⁸
8	4	5	15 min	3	9x10 ⁸
8	4	5	30 min	2	6x10 ⁸
15	5	5	30 seg	3	9x10 ⁸
15	5	5	5 min	3	9x10 ⁸
15	5	5	15 min	3	9x10 ⁸
15	5	5	30 min	2	6x10 ⁸

Tabla 4.4 Resultados de tiempo de contacto ante desinfectante basado en aceite esencial de Eucalipto para S. aureus.

Nº de prueba	Concentración de aceite esencial (%v/v)	pH	Tiempo de contacto	Nº de Turbidez Estándar	Nº aproximado de microorganismos (UFC)
8	4	5	30 seg	3	9x10 ⁸
8	4	5	5 min	3	9x10 ⁸
8	4	5	15 min	2	6x10⁸
8	4	5	30 min	2	6x10⁸
15	5	5	30 seg	3	9x10 ⁸
15	5	5	5 min	3	9x10 ⁸
15	5	5	15 min	3	9x10 ⁸
15	5	5	30 min	2	6x10 ⁸

Se inocularon los tubos para esta prueba con un número aproximado (de ambos microorganismos) de 15×10^8 UFC, que corresponde al estándar 5 en la escala de turbidez McFarland.

De acuerdo a los resultados obtenidos y comparando con la cantidad de microorganismos inoculados, se observa una reducción en la cantidad tanto de *E. coli* como de *S. aureus* a partir de los 30 segundos. Cabe destacar que en el caso del *S. aureus* la prueba 8, cuya concentración es de 4% v/v y pH 5, presentó un mayor poder bactericida, ya que reporta un menor crecimiento desde los 15 minutos de contacto (6×10^8 UFC).

4.2.3 Resultados de prueba cuantitativa de actividad bactericida

Ya que tanto *E. coli* como *S. aureus* presentaron resultados similares al final del tiempo total de contacto, ambos fueron sometidos a la evaluación de actividad antimicrobiana según el método de la AOAC, el cual no solo incluye los microorganismos de estudio en esta investigación sino además *Salmonella spp* y *Pseudomas aeruginosa* (ver Anexo 9). Un resumen de los resultados se presenta en la tabla 4.5, los cuales fueron realizados en el CENSALUD de la Universidad de el Salvador (UES).

Tabla 4.5 Porcentaje de reducción de crecimiento microbiano al ser expuestos ante desinfectante basado en aceite esencial de Eucalipto.

Nº de prueba	Concentración de aceite esencial (%v/v)	pH	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>P. aeruginosa</i>
8	4.0	5.0	99.999%	99.999%	99.999%	99.999%
15	5.0	5.0	99.999%	99.999%	99.999%	99.999%

A pesar de que ambas formulaciones son efectivas se selecciona la prueba 8 con una concentración de 4% v/v y pH= 5 para las etapas experimentales siguientes, debido a que

presenta una mayor eficiencia en la prueba de tiempo de contacto y a que contiene una menor cantidad de aceite esencial de eucalipto, buscando la optimización del recurso.

Se comprueba que los desinfectantes formulados poseen una efectividad antimicrobiana competitiva con otros desinfectantes comerciales cuyo compuesto activo son el glutaraldehído y amonio cuaternario, e incluso superior a desinfectantes basados en Cloruro de benzalconio cuya efectividad es nula según Claros, Herández y Turcios (2015) de acuerdo a la tabla 4.6.

Tabla 4.6 Resultado de análisis microbiológico en muestras de desinfectante de uso doméstico

Variables	Muestra A Glutaraldehído, 0.04 - 0.06% v/v	Muestra B Glutaraldehído, 0.13% v/v	Muestra C Cloruro de Benzalconio	Muestra D Amonio Cuaternario 0.2% v/v
	Eficiencia	Eficiencia	Eficiencia	Eficiencia
Staphylococcus aureus ATCC 6538	100%	100%	0%	99.99%
Salmonella typhimurium ATCC 14028	99.99%	100%	0%	99.99%
Escherichia coli ATCC 25922	100%	100%	0%	99.99%

Fuente: (Claros, Henández, y Turcios, 2015, pág. 61)

4.3 Resultados de propiedades físicas del desinfectante y su vida útil

Como parte de la caracterización del desinfectante es necesario presentar los resultados obtenidos de las diferentes propiedades físicas evaluadas, vida útil y análisis del impacto ambiental en el agua, para su uso y manejo en industrias y laboratorios.

4.3.1 Homogeneidad

El desinfectante con 4% v/v de concentración y pH 5 desde el momento de su elaboración presentó la incorporación de sus componentes en una sola fase. Luego de 60 días se aprecia la permanencia de una sola fase.

4.3.2 Estabilidad

Para considerar al desinfectante como estable, este debe cumplir las características de homogeneidad y poseer una efectividad antimicrobiana igual o superior a 99.999%; los resultados obtenidos según informe de laboratorio (Anexo 9 y Anexo10) se resumen en la tabla 4.7

Tabla 4.7 Resumen de Estabilidad del desinfectante formulado vs Tiempo transcurrido.

Periodo transcurrido	Homogeneidad	Efectividad antimicrobiana	Estabilidad
12 días	No presenta sinéresis	99.999%	SI
60 días	No presenta sinéresis	100%	SI
90 días	Sinéresis	100%	NO

Pudo observarse en el transcurso del tiempo que alrededor de los 70 días el desinfectante comenzó a separarse en dos fases, quedando las fases totalmente diferenciables alrededor de los 80 días, por lo que se esperaba que ya no mantuviera sus propiedades bactericidas, sin embargo, conservó su efectividad hasta finalizar el periodo de análisis. Cabe destacar que para realizar el análisis antimicrobiano a los 3 meses el desinfectante fue agitado para incorporar sus fases.

4.3.3 Corrosividad

De acuerdo a la prueba del efecto corrosivo (anexo 5) y luego de un periodo de estudio de una semana se pudo evidenciar la oxidación de ciertas áreas de las piezas ensayadas, las masas registradas se muestran en la tabla 4.8.

Tabla 4.8 Seguimiento de masas iniciales y finales de las piezas metálicas para estudio de corrosividad.

Pieza	Masa inicial (g)	Masa final (g)
Hierro	2.4973	2.4950
Acero	2.3288	2.3285

Con estos registros y haciendo uso de la ecuación retomada del guión de clase de la cátedra de Principios de Electroquímica y Corrosión (Arévalo, 2015) se procede a calcular la velocidad de corrosión expresada en mm/año.

$$C = \frac{m}{A * \rho * t}$$

Donde:

C = velocidad de Corrosión en cm/h

m = Masa perdida = Masa inicial – Masa final

A= área de la pieza expuesta al agente químico en cm²

ρ = densidad del material en g /cm³

t= tiempo de la duración de la prueba en horas

Las dimensiones de las piezas evaluadas se detallan en la tabla 4.9, las cuales son necesarias para el calculo de corrosividad

Tabla 4.9 Dimensiones de las piezas metálicas utilizadas para el cálculo de corrosividad

Pieza	Longitud (cm)	Diámetro (cm)	Área (cm²) = $\pi * D * h$	Densidad (g/cm³)
Hierro	5.08	0.4	6.384	7,874
Acero	5.08	0.4	6.384	7.852

A continuación, se detalla el cálculo de velocidad de corrosión para la pieza de hierro, para la pieza de acero se realizó de igual forma.

$$C = \frac{2.4973g - 2.4950g}{(6.384cm^2) * (7.874g/cm^3) * (168h)}$$

$$C = 2.7235 \times 10^{-7} \text{ cm/h} * \frac{10 \text{ mm}}{1 \text{ cm}} * \frac{24 \text{ h}}{1 \text{ día}} * \frac{365 \text{ días}}{1 \text{ año}}$$

$$C = 0.02385 \text{ mm/año}$$

Los resultados de estos cálculos se resumen en la tabla 4.10.

Tabla 4.10 Velocidad de Corrosión para las piezas expuestas al desinfectante basado en aceite esencial de Eucalipto.

Pieza	Velocidad de corrosión (mm / año)
Hierro	0.02385
Acero	0.00312

Análizando los resultados podemos considerar al desinfectante como una sustancia no corrosiva teniendo por velocidad de corrosión las piezas expuestas al mismo una relación casi despreciable. Además, que en una operación de limpieza común el agente estará en contacto con las superficies por un tiempo de 5 minutos, tiempo insuficiente para corroer el material.

4.3.4 Capacidad desodorante

De acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 3.4.4 se obtuvieron los resultados descritos en la tabla 4.11, la cual muestra el número de panelistas que escogieron cada una de las puntuaciones al tiempo correspondiente.

Tabla 4.11 Resultados de análisis sensorial hedónico.

Valoraciones Tiempo	Me desagrada mucho	Me desagrada	No me agrada ni me desagrada	Me agrada levemente	Me agrada mucho
1 minuto	0 %	8.11%	32.43%	35.13%	24.32%
10 minutos	0 %	2.94%	44.12%	41.18%	11.76%
15 minutos	0 %	2.70%	51.35%	32.43%	13.51%

Estos resultados a su vez se presentan esquemáticamente como porcentajes en las ilustraciones 4.1 para un minuto, 4.2 para los 10 minutos y 4.3 para los 15 minutos.

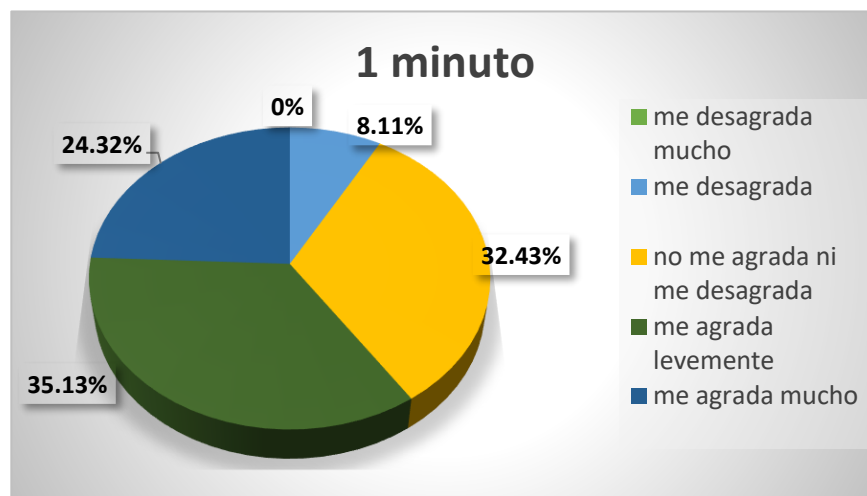


Ilustración 4.1 Gráfico de Valoraciones al minuto 1 después de la operación de limpieza con el desinfectante basado en aceite esencial de Eucalipto.

Como se aprecia en la ilustración 4.1, después de transcurrido un minuto solo un 8.11% de los panelistas pudo percibir la presencia de un olor fétido, mientras que el 32.43% de los panelistas no percibieron ninguno de ambos olores y los restantes solo pudieron percibir el olor del desinfectante.

Después de transcurridos 10 minutos el 9.94% de los panelistas pudo percibir un olor fétido, sin embargo, un 44.12% no sintió ni la presencia de olores fétidos ni del desinfectante y el 52.94% restante percibió solamente el olor al desinfectante. Cabe aclarar que en diversas observaciones los panelistas percibían el aroma a eucalipto muy fuerte contestando que les desagradaba levemente, explicando así un incremento en la porción de panelistas indicando “me desagrada levemente” a pesar de la explicación previa a la realización de la prueba, por tanto, los resultados de 3 panelistas se extrajeron quedando la distribución como se muestra en la ilustración 4.2.

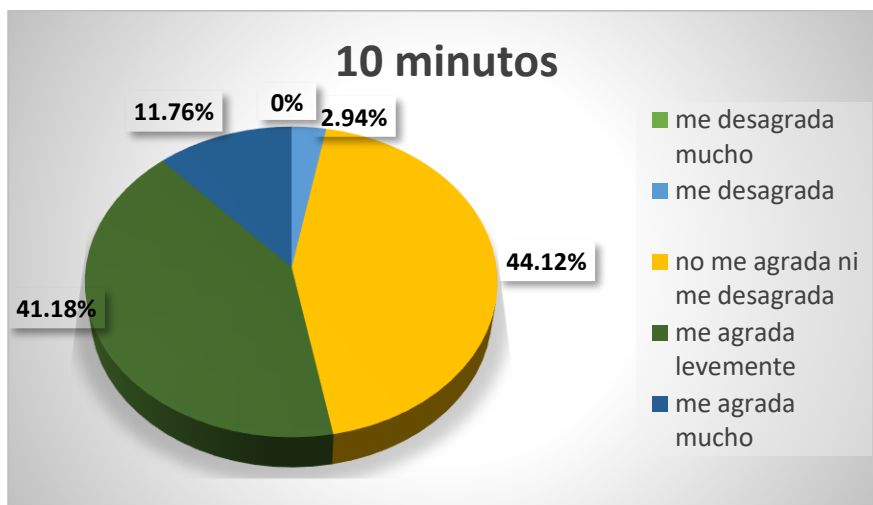


Ilustración 4.2 Gráfico de Valoraciones a los 10 minutos después de la operación de limpieza con el desinfectante basado en aceite esencial de Eucalipto.



Ilustración 4.3 Gráfico de Valoraciones a los 15 minutos después de la operación de limpieza con el desinfectante basado en aceite esencial de Eucalipto.

Según la ilustración 4.3 luego de transcurridos 15 minutos el 2.70% de los panelistas pudo percibir un olor fétido, sin embargo, un 51.35% no sintió ni la presencia de olores fétidos ni del desinfectante y el 45.94% restante percibió solamente el olor al desinfectante. Por lo que se puede atribuir una buena capacidad desodorante para la formulación de desinfectante puesta a prueba de concentración del 4% v/v y pH 5.0.

Realizando un tratamiento estadístico a los datos recolectados de las encuestas a través de un Análisis de Varianza Simple de un Factor (ANOVA), el cual establece como Hipótesis

nula o h_0 que los grupos a comparar (1 minuto, 10 minutos y 15 minutos) son estadísticamente iguales, y compara el parámetro F calculado con el grado de significancia seleccionado, si éste es mayor al grado de significancia se rechaza h_0 quedando como válida la hipótesis alterna (h_a) la cual establece una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de control de acuerdo a lo que se está evaluando, obteniendo como resultado la tabla 4.12

Tabla 4.12 Resultados de Análisis de varianza simple (ANOVA).

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1.423423423	2	0.711711712	0.996496146	0.372539118	3.080386863
Dentro de los grupos	77.13513514	108	0.714214214			
Total	78.55855856	110				

El grado de significancia seleccionado fue del 5% ya que es el mínimo aceptable para que los datos tengan validez estadística, del análisis se obtuvo un parámetro F de 0.9965 el cual es mayor a 0.05 de significancia, por lo que se rechaza h_0 , estableciendo una diferencia estadísticamente significativa entre los 3 grupos de control. Al comparar los resultados entre el grupo 1 minuto y grupo 10 minutos podemos observar una disminución en la percepción del olor fétido, mientras con el grupo 10 minutos y 15 minutos se mantiene estable la percepción del olor fétido, de tal manera se confirma que a medida que pasa el tiempo la presencia del olor fétido es menos perceptible; concluyendo que el producto formulado posee capacidad desodorante aceptable.

4.3.5 Riesgo al Contacto del Desinfectante basado en aceite esencial de Eucalipto

Según el procedimiento de determinación del riesgo al contacto del apartado 3.4.5 y después de los 5 minutos de exposición a la formulación en zonas consideradas de alta probabilidad de exposición a productos de limpieza y transcurridos los 10 minutos tras retirar el desinfectante no se presentó irritación, alteraciones o reacciones alérgicas al producto en ninguno de los 3 sujetos de prueba. Por lo cual se puede considerar que el desinfectante no presenta ningún riesgo al contacto en el periodo estudiado.

4.3.6 Vida Útil del desinfectante basado en aceite esencial de Eucalipto

Como parte del proceso de selección de la mejor formulación del apartado 4.2.3. Para el desinfectante de concentración 4% v/v y pH de 5 se obtuvo una efectividad bactericida del 99.999% a los 12 días de elaboración. Después de esto pasados 60 días aproximadamente se realizó una nueva evaluación de efectividad bactericida de la cual se obtuvo un resultado de 100% de efectividad contra *S. aureus* y *E. coli* además de *P. aeruginosa* y *Salmonella*. Transcurridos 90 días se repitió el procedimiento de evaluación bactericida manteniendo una efectividad de 100% contra *S. aureus*, *E. coli* y *Salmonella*, además presentando una reducción a una efectividad de 99.999% contra *P. aeruginosa* (ver Anexo 10). Los resultados se muestran en la tabla resumen 4.13.

Tabla 4.13 Tabla resumen de resultados de Efectividad Bactericida.

Días transcurridos	Efectividad
12 días	99.999%
60 días	100.00%
90 días	100.00 %

Por tanto, se puede garantizar una vida útil mínima de 90 días o 3 meses como lo establecido por Troya (2007).

Tabla 4.14 Resumen de las propiedades físicas y vida útil del desinfectante.

Propiedad	Resultado
Homogeneidad	Si
Estabilidad	2 meses
Corrosividad	0.02385 mm/año
Capacidad desodorante	Positiva
Riesgo al contacto	No presenta riesgo
Vida útil mínima	3 meses

Además de la determinación de las propiedades físicas y la vida útil, se evaluó para el desinfectante de concentración 4% v/v y pH = 5, la densidad y viscosidad, con ayuda de un picnómetro y un viscosímetro BYK Gardner, con la finalidad de crear su ficha técnica, la cual se muestra en la tabla 4.15.

Tabla 4.15 Ficha técnica para Desinfectante basado en aceite esencial de eucalipto

Ficha técnica	
Desinfectante basado en aceite esencial de eucalipto	
Descripción	El desinfectante de eucalipto es un producto natural de limpieza destinado a la desinfección de todo tipo de superficies sólidas resistentes al agua, con aroma característico a Eucalipto, dejando las superficies desinfectadas y desodorizadas.
Aplicaciones	<ul style="list-style-type: none"> • Desinfección de superficies destinadas a estar en contacto con alimentos. • Limpieza en industrias. • Desinfección en mesas de laboratorios químicos. • Uso doméstico.
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> • Desinfecta y Desodoriza al mismo tiempo. • No presenta riesgo al contacto con la piel del usuario*. • Alternativa natural.
Modo de empleo	Agitar antes de usar. Aplicar de forma concentrada en cantidad suficiente para humedecer completamente la superficie a desinfectar, recomendable la aplicación del producto con atomizador; posteriormente utilizar una toalla o esponja para limpiar la superficie, utilizar una esponja abrasiva para eliminar suciedades difíciles.
Ingredientes	<ul style="list-style-type: none"> • Ácido esteárico 2% v/v • Etanol 2% v/v • Betaína de coco 3.2% v/v • Aceite esencial de eucalipto 4% v/v • Aceite de ricino 8% v/v • Agua 80.8% v/v (Vehículo)

Continua...

Tabla 4.15 Ficha técnica para desinfectante basado en aceite esencial de eucalipto (Continuación).

Información técnica	Aspecto:	Líquido fluido.
	Olor:	Característico a eucalipto.
	Color:	Blanco Traslúcido.
	pH:	5.
	Densidad:	1.004 Kg/m ³
	Viscosidad:	42KU ó 51 cp
	Corrosividad:	0.02385 mm/año.
	Estabilidad:	2 meses.
	Vida útil mínima:	3 meses.
Información de almacenamiento	Almacenar en envases opacos cerrados, lejos de temperaturas extremas y luz solar. Mantener fuera del alcance de los niños.	
Información de manipulación	No se recomienda su uso diluido. Evitar el contacto con los ojos, en caso de contacto lavar con abundante agua y acudir al servicio de salud más cercano. No ingerir, en caso de ingesta acudir al servicio de salud inmediatamente.	
Información medio ambiental	No verter el agua resultante de la limpieza directamente a un cuerpo receptor, disponer de la misma en el alcantarillado sanitario.	
*No se recomienda manipulación directa por personas con hipersensibilidad a los componentes constituyentes, ni en personas con la piel irritada o herida.		

4.4 Resultados de los parámetros obligatorios de vertido de las aguas residuales

De las muestras enviadas a analizar y de acuerdo a los informes del laboratorio de Control de Calidad de ANDA (anexo 11) se muestra un resumen y comparación de los parámetros evaluados con las normas en la tabla 4.16 para el agua de proceso de manufactura y en la tabla 4.17 para el agua de proceso de limpieza.

Tabla 4.16 Resultados de análisis de aguas residuales para agua de proceso de manufactura del desinfectante basado en aceite esencial de Eucalipto.

Parámetro	Unidades	Resultados manufactura	Norma técnica	Norma NSO.13.49.01.09
Aceites y grasas	mg/L	14	150	20
DQO	mg/L	144	1000	150
DBO	mg/L	110	400	60
Sólidos suspendidos totales	mg/L	<10.80	450	60
Sólidos sedimentables	mL/L	<0.2	20	1

El agua residual del proceso de manufactura de acuerdo a la norma NSO.13.49.01.09 no es apta para vertido directo a cuerpo receptor de agua, ya que no cumple el parámetro de DBO, no obstante, al ser comparados los resultados con la norma técnica para regular calidad de aguas residuales de tipo especial descargadas al alcantarillado sanitario, el agua residual es apta para su vertido en alcantarillado sin previo tratamiento.

Tabla 4.17 Resultados de análisis de aguas residuales para agua de proceso de limpieza utilizando desinfectante formulado final.

Parámetro	Unidades	Resultados proceso de limpieza	Norma técnica	Norma NSO.13.49.01.09
Aceites y grasas	mg/L	21	150	20
DQO	mg/L	206.4	1000	150
DBO	mg/L	42.40	400	60
Sólidos suspendidos totales	mg/L	12.5	450	60
Sólidos sedimentables	mL/L	<0.2	20	1

El agua residual del proceso de limpieza de una superficie no es apta para su vertido directo a cuerpo receptor de agua, ya que no cumple los parámetros de DQO y Aceites y Grasas, pero, al ser comparados los resultados con la norma técnica para regular calidad de aguas residuales de tipo especial descargadas al alcantarillado sanitario, el agua residual es apta para su evacuación en alcantarillado sin previo tratamiento.

Cabe aclarar que estos resultados dan una aproximación a la carga contaminante tanto en el proceso de manufactura como de aplicación del desinfectante, por lo que no representa la contaminación total emitida por una empresa o entidad en sus procesos.

Conclusiones

- 1- El Eucalipto de la variedad *E. globulus labil* se encuentra plantado por todo el territorio salvadoreño, sin embargo no existen plantaciones exclusivas de esta especie ni una cuantificación de las hectáreas plantadas con esta variedad específica, por otro lado se encuentran aglomeraciones de esta especie de forma silvestre en las zonas de el Lago de Coatepeque, Santa Ana, a lo largo de la cuenca del río Lempa y focalizado cerca del embalse Cerrón Grande en el Departamento de Chalatenango, en la zona de Olocuilta y San Luis Talpa en el departamento de la Paz.
- 2- Haciendo uso del equipo construido basado en el principio de la extracción por arrastre de vapor, el proceso de destilación de aceite esencial de eucalipto fue efectivo obteniendo un rendimiento de 0.02308 g de aceite esencial / g de hojas de eucalipto utilizadas (2.308% p/p), el cual se encuentra en el rango teórico para esta especie.
- 3- Se determinaron los componentes naturales y sus proporciones para la elaboración del desinfectante, las cuales son: aceite esencial de eucalipto 1 parte, aceite de ricino hidrogenado 2 partes, betaína de coco 0.8 partes, etanol 0.5 partes y ácido esteárico 0.5 partes; que permiten la integración de la fase oleosa con la fase acuosa dando como resultado una formulación homogénea y fluida.
- 4- Se evaluaron 15 formulaciones con diferentes concentraciones de aceite esencial y pH, de las cuales 2 resultaron efectivas, las cuales son concentración 5% v/v, pH=5 y concentración 4% v/v y pH=5, presentando un porcentaje de reducción de 99.999% para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, eligiendo la formulación de concentración 4% v/v y pH=5 para establecer sus propiedades físicas, vida útil y determinación de carga contaminante en agua, debido a que consume menor cantidad de componente activo.
- 5- El desinfectante de concentración 4% v/v y pH=5 se equipara a desinfectantes comerciales basados en glutaraldehído y amonio cuaternario cuyos porcentajes de reducción de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* varían entre 99.99% y 100%

e incluso supera a los desinfectantes basados en cloruro de benzalconio cuyo porcentaje de reducción es 0% para los mismos microorganismos, por lo que este desinfectante es competitivo en términos de poder bactericida con otras alternativas presentes en el mercado.

- 6- El tiempo de contacto mínimo de la formulación de concentración 4% v/v y pH=5 es de 30 segundos, logrando una desinfección efectiva con un porcentaje de reducción de 99.999% para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.
- 7- Se determinaron las propiedades físicas del desinfectante con concentración 4% v/v y pH=5, el cual demostró ser homogéneo, estable hasta 2 meses luego de su elaboración, posee un poder corrosivo de 0.02385 mm/año para el Hierro y de 0.00312 para el Acero, presenta capacidad desodorante y no representa un riesgo al contacto para el usuario.
- 8- La vida útil mínima del desinfectante es de 3 meses, a pesar de mantenerse estable solo durante 2 meses perdiendo la homogeneidad, pero conservando la efectividad bactericida, de acuerdo a los resultados obtenidos en el apartado 4.3.6.
- 9- Según los resultados de análisis de aguas residuales, si se diseñase una planta en la que se fabrique este desinfectante con la formulación presentada, el vertido de las aguas del proceso de manufactura, así como también las del proceso de limpieza no se puede realizar directamente a un cuerpo receptor ya que, presenta incumplimiento del parámetro DBO (110 mg/L) y de parámetros DQO (206.4 mg/L) y Aceites y Grasas (21 mg/L) respectivamente, esto puede atribuirse a la presencia de diversos componentes orgánicos y ácidos grasos; sin embargo, si se podrían descargar al sistema público de alcantarillado sanitario.

Recomendaciones

1. Estudiar otras especies de eucalipto presente en el país para caracterizar las propiedades de sus aceites, como el eucalipto citriodora el cual además de aportar un potencial bactericida puede funcionar como repelente para insectos, u otros valores agregados al desinfectante; además establecer rendimientos de extracción con el objetivo de elegir la mejor especie para cultivo en una plantación dedicada al propósito de fabricar este desinfectante.
2. Realizar un estudio de mercado para la comercialización del desinfectante y su aceptabilidad, estableciendo así una demanda aproximada necesaria para el diseño de una planta y evaluar su factibilidad económica.
3. Ampliar el estudio de vida útil del desinfectante (pH=5, concentración=4% v/v) tanto a condiciones aceleradas como a condiciones normales para establecer una correlación de envejecimiento acelerado la cual pueda ser aplicada a productos similares basados en el aceite esencial de eucalipto con el objetivo de ser tomado en cuenta en el análisis económico, ya que esto afecta directamente al proceso de logística, producción, almacenamiento y distribución.
4. Debido a su estabilidad de dos meses es recomendable el estudio de una reformulación en la que se prueben otros emulsionantes ya sean de origen sintético o natural, que contribuyan a la permanencia de la homogeneidad por un periodo mayor de tiempo. Además de la adición de preservantes de ser necesario.
5. Evaluar el desinfectante formulado (pH=5, concentración=4% v/v) haciendo las modificaciones necesarias para que cumpla diversas normas ambientales, para ser utilizado en edificios, empresas u organismos que buscan certificaciones ambientales como la certificación Leadership in Energy & Environmental Design (L.E.E.D) en la cual es necesario el poseer sistemas de eficiencia energética integrados, sistemas de gestión y ahorro de agua, uso de materiales y equipos de oficina reciclados, pintura

que emita bajos o ningún compuesto orgánico volátil, químicos de limpieza menos contaminantes, entre otros.

6. Realizar un estudio para la aplicación del desinfectante (pH=5, concentración=4% v/v) en el ámbito hospitalario para la desinfección de salas de operación, mesas, cuartos de hospital, Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), como también otro tipo de instalaciones como laboratorios clínicos y farmacéuticos.

Bibliografía

- Alba, T. N., y Araujo, E. F. (2008). *Evaluación de los Desinfectantes Utilizados en el Proceso de Limpieza y Desinfección del Área de Fitoterapéuticos en Laboratorios Pronabell LTDA*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- Administración Nacional de Acueductos y Alcantarillados, (2004). *Norma Técnica para Regular la Calidad de Aguas Residuales de Tipo Especial Descargadas al Alcantarillado Sanitario*. Obtenido de <http://www.anda.gob.sv/wpcontent/uploads/2015/04/aguas-residuales.pdf>, San Salvador, El Salvador
- Ambiental, G. d. (S.F de S.F de S.F). *GIBA*. Obtenido de www.eula.cl/giba/wp-content/.../09/tecnica-analitica-para-determinacion-de-dbo.doc
- APHA, AWWA, WEF. (1998). *Standar methods for the examination of the water and waste water* (20 ed.).
- Arévalo, M. F. (2015). *Cuaderno de cátedra, Importancia del estudio y factores que influyen en la corrosión, Principios de Electroquímica y Corrosión*. San Salvador, El Salvador: Universidad de El Salvador.
- Arévalo, M. F. (2015). *Cuaderno de la cátedra: Influencia del pH en la corrosión, Principios de Electroquímica y Corrosión*. San Salvador, El Salvador: Universidad de El Salvador.
- Arévalo, V., Azucena, G., y Lainez, S. (2018). *Formulación y caracterización de una biopelícula comestible elaborada a partir de almidón de Sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) y Yuca (*Manihot esculenta*) Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero de Alimentos*. San Salvador, El Salvador: Universidad de El Salvador.
- Arriaza, B. C. (s.f). *Uso industrial de Plantas Aromáticas y Medicinales*. (U. P. Madrid, Ed.) Obtenido de Open Course Ware de la Universidad Politecnica de Madrid, España: <http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/contenidos/material-de-clase/tema7.pdf>
- Balmelli, G. (1995). *Ensayos de orígenes de Eucalyptus globulus.* " Serie Técnica N° 68. Programa. Forestal, INIA Tacuarembó.
- Bush, L. M., Schmidt, C. E., & Perez, M. T. (2018). *Manual MSD*. Obtenido de Infecciones por estafilococos: <https://www.msmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/cocos-grampositivos/infecciones-por-estafilococos>
- Canet, J. J. (19 de Enero de 2016). *Seguridad e Higiene Alimentaria*. Obtenido de Escherichia Coli: características, patogenicidad y prevención: <http://www.betelgeux.es/blog/2016/01/19/escherichia-coli-caracteristicas-patogenicidad-y-prevencion-i/>

- Castellón., A. (s.f). *Aceites: Extracción por prensado en frío*. Obtenido de Sitio Web Prensado en Frío: http://www.prensandoenfrio.com/71041_es/prensado-en-frio-la-elaboracion-mas-natural-del-aceite-de-semillas/
- Chérrez, S. P. (2014). *Estudio In vitro del efecto antimicrobiano del aceite esencial de Eucalyptus globulus L. (Eucalipto) en comparación al Hipoclorito de Sodio al 2,5% y Gluconato de Clorhexidina al 2%, sobre cepas de Enterococcus faecalis*. Quito, Ecuador: Universidad Central del Ecuador.
- Claros, E. V., Henríquez, E. A., y Turcios, A. V. (2015) *Propuesta de elaboración de reglamento técnico y pruebas de efectividad microbiana para desinfectante de uso doméstico en El Salvador*. Trabajo de grado para optar al título de: Ingeniero Químico. San Salvador, El Salvador.
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología , (2009). *NSO 13.49.01:09 Aguas Residuales Descargadas a un Cuerpo Receptor*. Obtenido de <https://www.transparencia.gob.sv/institutions/anda/documents/115912/download>, San Salvador, El Salvador
- Cumplido, B. L. (Abril de 2015). Aceite esencial de eucailpto bio. *La Redoma Creativa*, 2.
- Di Marco, E. (7 de Abril de 2018). *Foresto Industria*. Obtenido de Foresto Industria: <http://forestoindustria.magyp.gob.ar/archivos/procedimiento-requerido-en-plantaciones/eucalyptus-globulus-sp-globulus-labill-familia-myrtace.pdf>
- Dirección Nacional de Medicamentos. (2016). *Guía de usuario para tramite de nuevo registro sanitario de productos cosméticos e higiénicos*. San Salvador , El Salvador.
- Domínguez, J. R., y Henríquez, K. I. (2016). *Formulación, pruebas de funcionamiento y de aceptabilidad de desinfectantes en gel clorados y yodados Trabajo de grado para optar por el título de Ingeniero Químico*. San Salvador, El Salvador: Universidad de El Salvador.
- EcuRed . (2015). *Desinfectantes*. Obtenido de EcuRed conocimiento con todos y para todos : <https://www.ecured.cu/Desinfectante#Caracter.C3.ADsticas>
- Environmental Protection Agency (EPA). (1993). *Method 410.4 Determination of chemical oxygen demand by semi-automated colorimetry*. Cincinnati, Ohio, United States of America.
- FAO. (20 de Marzo de 2018). *articulos*. Obtenido de sitio web de la fao: <http://www.fao.org/3/a-ac459s.pdf>
- Flamenco, J.W. y Guevara, G. I. (2011). *Formulación de tres productos desinfectantes y evaluación de su actividad antimicrobiana*, Trabajo de grado para optar al título de:

Licenciatura en Química y Farmacia . San Salvador, El Salvador: Universidad de El Salvador.

Flores, S. A., Hernández, E. A., y Valladares, R. M. (2004). *Determinación de la actividad antifúngica de Aceites Esenciales Extraídos de Lippia graveolens (Oregano), Rosmarinus officinalis (Romero) y Eucalyptus globulus (Eucalipto) en Microsporium canis Trichophyton rubrum y Epidermophyton floccosum*, Trabajo de grado para optar al título de: Licenciatura en Química y Farmacia . San Salvador, El Salvador: Universidad de El Salvador.

Food and Agriculture Organization (FAO). (2010). *Evaluación de los recursos forestales mundiales 2010, Informe nacional 2010 El Salvador*. Roma: FAO.

Fuentes Guerrero, M. N. (2007). *Adulteración y/o falsificación en cinco productos a base de plantas medicinales comercializados en el mercado central del Municipio de San Salvador Trabajo de grado para optar al título de ingeniero químico*. San Salvador, El Salvador: Universidad de EL Salvador.

Gonzalez Villa, A. A. (2004). *Obtención de aceites esenciales y extractos etanolicos de plantas del amazonas*. Manizales, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.

Hernández, E. (2005). *Evaluación Sensorial*. Bogotá, Colombia.

Ibañez, F., y Barcina, Y. (2001). *Análisis Sensorial de Alimentos, Métodos y Aplicaciones*. Barcelona, Cataluña, España : Springer.

Lavado Cumplido, B. (9 de Abril de 2018). *La Redoma Creativa*. Obtenido de La Redoma Creativa:
<http://quimicsdalmauonline.com/pdfs/FICHA%20TECNICA%20AE%20EUCALIP TO%20BIO%20.pdf>

López, G. A. (2010). “*Domesticación y cultivo del Eucalipto*” (Vols. Boletín del CIDEU 8-9: 89-95 (2010)). Centro de Investigación Forestal.

Martinez, A. (2003). *Aceites esenciales*. Medellín, Colombia: Facultad de Química Farmaceutica, Universidad de Antioquía. Obtenido de http://www.med-informatica.com/OBSERVAMED/Descripciones/AceitesEsencialesUdeA_esencias2001b.pdf

OMS. (Jueves 12 de Abril de 2018). *Organización Mundial de la Salud* . Obtenido de http://www.who.int/topics/escherichia_coli_infections/es/

Organización Mundial de la Salud . (2004). *Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo*. Atlanta, Georgia, Estados Unidos.

- Pereira de Ruíz, A. I. (2016). *Manual de Laboratorio de microbiología*. San Salvador, El Salvador: Universidad de El Salvador.
- PubChem . (24 de Abril de 2018). *Compound Summary for CID 2758, Eucalyptol* .
Obtenido de PubChem, Open Chemistry Database :
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Eucalyptol#section=Top>
- Rodríguez Zaragoza, S., y Salazar Rueda, I. J. (2016). *Efecto antimicrobiano de aceites esenciales en Staphylococcus aureus y Listeria innocua*. Tlalnepantla de Baz, Estado de México, México: Colegio Indoamericano, S. C.
- Sánchez, Y., Pino, O., Correa, T. M., Naranjo, E., & Iglesia, A. (2009). *Estudio químico y microbiológico del aceite esencial de Piper auritum Kunth (Caisimón de anís)*. La Habana, Cuba: Instituto de Medicina Deportiva.
- SENA. (s.f.). *Sistema de Bibliotecas SENA*. Obtenido de Introducción a la Industria de los Acietes Esenciales de Plantas Medicinales y Aromaticas:
https://repositorio.sena.edu.co/sitios/introduccion_industria_aceites_esenciales_plantas_medicinales_aromaticas/
- Shinoda, K., y Saito, H. (1969). The Stability of O/W type emulsions as functions of temperature and the HLB of emulsifiers: The emulsification by PIT-method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 30, 258-263.
- Silva, J. M. (2014). *Evaluación de la acción bactericida de aldehído cinámico y aceite esencial de eucalipto (Eucalyptus spp.) en emulsión*. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.
- Solé, C. M., Alonso, R. M., y Aubert, A. C. (1994). *Desinfectantes: características y usos más corrientes*. Barcelona, Cataluña, España : Instituto Nacional de Higiene y Seguridad en el Trabajo.
- Stashenko, E. E. (2009). *Aceites esenciales*. Santander, España: Univesidad Industrial de Santander.
- STATGRAPHICS. (2006). *STATGRAPHICS.net* . Obtenido de statgraphics support :
<http://www.statgraphics.net/wp-content/uploads/2011/12/tutoriales/DDE%20-%20Disenos%20Factoriales%20Multinivel.pdf>
- Troya, J. A. (2007). *Evaluación de la efectividad de los desinfectantes DIVOSAN FORTE y MH en la desinfección de equipos y áreas de trabajo en una empresa procesadora de helados*. Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.
- Valdez, M. d. (2010). *Formulación de desinfectante a partir de aceite esencial de árbol de Té (Melaleuca alternifolia) y evaluación de su actividad antimicrobiana ante Staphylococcus aureus y Escherichia coli*. Ciudad de Guatemala, Guatemala: Universidad Rafael Landívar.

Vega, A., y Miranda, J. (2009). *Emulsiones Farmacéuticas*. Mexico D.F, Estados Unidos Mexicanos: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. Obtenido de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Emulsiones_5452.pdf

Vignoli, R. (2012). Esterilización y Desinfección. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11.

Willey, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2008). *Prescott, Harley, and Klein's Microbiology*. New York, United States of America: McGraw-Hill.

Anexos

Anexo 1

Equipo de destilación por arrastre de vapor para extracción del aceite esencial de eucalipto

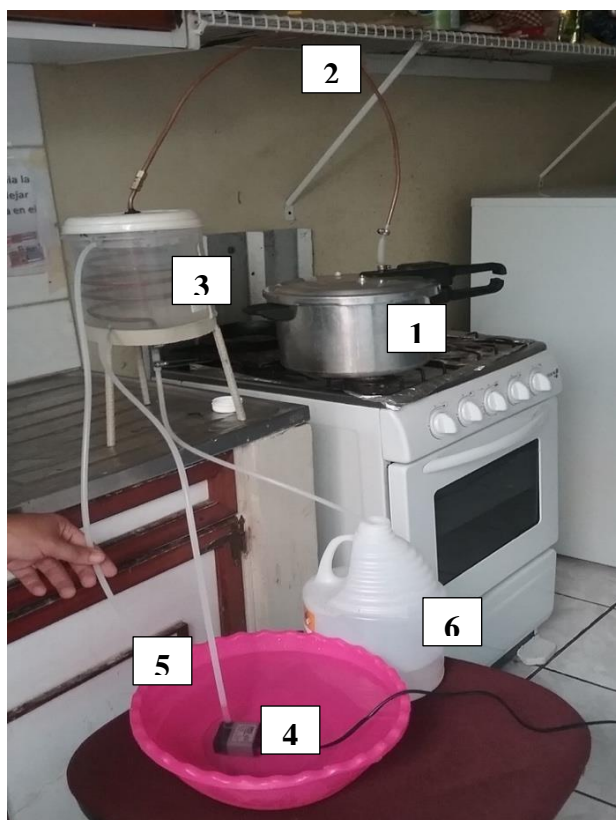


Figura 1 vista del equipo de extracción con todos sus elementos; 1: cámara de destilación, 2: manguera de silicona, 3: condensador, 4: bomba de recirculación, 5: recipiente para recirculación de agua, 6: Recipiente de captación de hidrolato.



Figura 2 vista de la cámara de extracción y el condensador.

Anexo 2

Acción de Agentes Físicos y Químicos sobre los Microorganismos

Universidad de El Salvador
Facultad de Ingeniería y Arquitectura
Escuela de Ingeniería Química e Ingeniería de Alimentos
Curso de Microbiología para Ingeniería Química



PRACTICA N° 3

OBJETIVOS:

- Observar el efecto del calor sobre las bacterias esporuladas y no esporuladas.
- Observar el efecto de varios agentes químicos sobre los microorganismos.

EFFECTO DE AGENTES FÍSICOS Y QUÍMICOS SOBRE LOS MICROORGANISMOS

Los microorganismos son seres vivos cuya vitalidad puede ser afectada por agentes físicos y químicos. Este fenómeno es ampliamente utilizado en los diversos procedimientos de esterilización y desinfección para lograr su eliminación o control en las áreas en que puedan ser nocivos para el humano. Los agentes bactericidas no son siempre consecuentes en su acción, ya que además de su efecto desinfectante, se encuentran involucrados, concentración y tiempo de exposición.

PRIMERA SESIÓN

MATERIAL

- 4 Placas de TSA.
- 6 Tubos con CTS.
- 5 Palillos de madera estériles.
- 5 Tubos de ensayo con tapón de rosca 16 x 125 mm conteniendo 15 ml de:
 - a. Alcohol etílico al 70%.
 - b. Fenol al 5 %.
 - c. Merthiolato 1:1000.
 - d. Hipoclorito de sodio al 20%.
 - e. Agua destilada estéril.



CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO

- Escherichia coli (3 Tubos).
- Bacillus subtilis (2 Tubos), cultivo de 5 días.

A. ACCIÓN DE AGENTES FÍSICOS

EFECTO DE LA TEMPERATURA.

1. Con un lápiz grueso o un plumón divida el fondo de las placas de Petri que contienen TSA en 5 partes y rotúlelas así: 0, 5, 15, 30 y 60 minutos.

En la tapa escriba el nombre de la bacteria, las iniciales de su nombre, la temperatura de trabajo y la fecha.

2. Coloque un cultivo de E. coli y otro de B. subtilis en un baño de agua a 60°C. Los otros dos tubos de cultivo, uno de E. coli y otro de B. subtilis colóquelos en agua hirviendo (100°C).

3. Inocule la placa de agar en el sitio previamente rotulado al finalizar los intervalos de 0, 5, 15, 30 y 60 minutos respectivamente. El tiempo es acumulativo en el tratamiento con calor, ejemplo: Después del tratamiento térmico de 5 minutos solo se calienta 10 minutos más para completar los 15 minutos, de esta misma forma para los demás tiempos.

4. Incube las placas a 37°C por 24—48 horas en posición invertida.

Nota: Tiempo 0 es sin tratamiento térmico del cultivo bacteriano

B. ACCIÓN DE AGENTES QUÍMICOS

1. Introduzca cada una de las varillas de madera en el cultivo de E. coli déjelo permanecer un minuto aproximadamente. Trabaje cerca del mechero y use solo un tubo de cultivo.

2. Saque las varillas del caldo y deposite en los tubos conteniendo:

- Alcohol etílico al 70 %.
- Fenol al 5 %.
- Solución de merthiolato 1:1000.
- Hipoclorito de Sodio al 20 % (puede utilizarse lejía que se comercializa en el comercio).
- Agua destilada estéril.



3. Déjelos dentro de los tubos con las sustancias químicas durante 1 hora.
4. Al finalizar este tiempo sáquelas e introdúzcalas en tubos de CTS convenientemente rotulados, agite suavemente, retire la varilla, flamee la boca del tubo y tápelo.
5. Descarte las varillas en una solución desinfectante.
6. Incube los tubos a 37°C por 24-48 horas.

SEGUNDA SESIÓN

1. Compare y anote la efectividad de los diferentes desinfectantes. Si el caldo permanece transparente no hay crecimiento bacteriano, en cambio la presencia de turbidez indica crecimiento bacteriano.
2. Observe y explique los resultados obtenidos en el experimento sobre los efectos de la temperatura.
3. Tabule sus resultados así:

Tabla 1. Resultados – Acción de Agentes Químicos

Acción de agente químico		
Sustancia empleada	Permitió el crecimiento bacteriano	Inhibió el crecimiento bacteriano
Alcohol etílico al 70%		
Bicloruro de Mercurio 1:1000		
Fenol al 5%		
Merthiolato 1:1000		
Hipoclorito de Sodio		
Agua destilada estéril		

Anexo 3

Escala de Turbidez de McFarland

El objetivo de este procedimiento es determinar el número de bacterias por ml de fluido. Una suspensión bacteriana equivalente en turbidez a la turbidez estándar de 0,5 de McFarland contiene aproximadamente 10^8 bacterias por ml.

La tabla 1 describe las cantidades utilizadas de las soluciones para formar cada punto en la escala McFarland. (Organización Mundial de la Salud, 2004).

Tabla 1 composición para la turbidez de la escala McFarland.

Nº turbidez estándar	Solución de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ al 1.175% p/v	Solución de H_2SO_4 al 1% v/v	Densidad de bacterias aproximada
0.5	0.05 mL	9.95 mL	1×10^8
1	0.1 mL	9.9 mL	3×10^8
2	0.2 mL	9.8 mL	6×10^8
3	0.3 mL	9.7 mL	9×10^8
4	0.4 mL	9.6 mL	12×10^8
5	0.5 mL	9.5 mL	15×10^8
6	0.6 mL	9.4 mL	18×10^8
7	0.7 mL	9.3 mL	21×10^8
8	0.8 mL	9.2 mL	24×10^8
9	0.9 mL	9.1 mL	27×10^8
10	1.0 mL	9.0 mL	30×10^8

Fuente: (Organización Mundial de la Salud, 2004).

Procedimiento para la preparación de tubos estándar:

- Preparar solución de Cloruro de Bario dihidratado ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) al 1.175% p/v.
- Preparar solución de Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) al 1% v/v.
- Mezclar volúmenes específicos de las soluciones de acuerdo a la tabla 1 para cada punto en la escala McFarland.

- Rotular los tubos de ensayo.
-

La figura 1 muestra los estándares ya preparados.

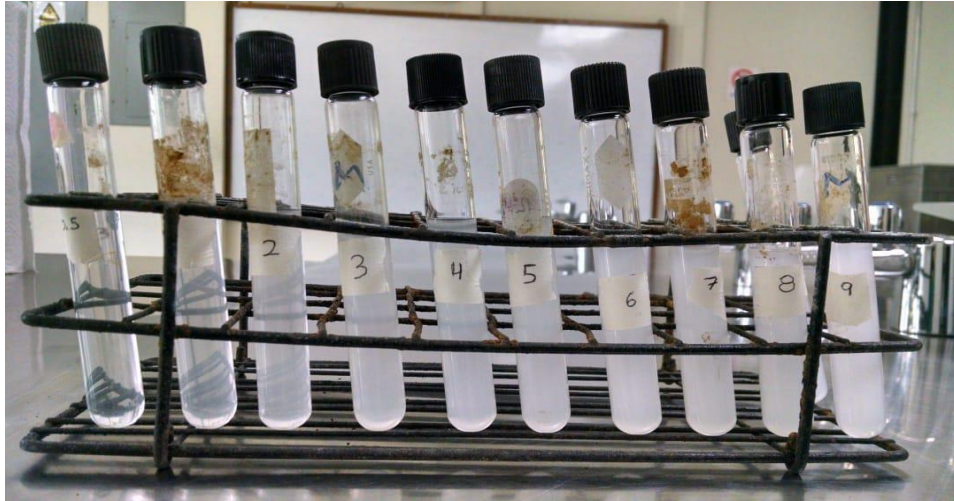


Figura 1. Escala de turbidez McFarland.

Los tubos que se obtienen de aplicar la práctica “Acción de agentes físicos y químicos sobre los microorganismos” y la prueba de tiempo de contacto, se comparan con cada tubo de la escala McFarland vistos a contraluz o con la ayuda de una página señalada como se muestra en la figura 2, reportando como resultado el número de microorganismos correspondiente de acuerdo a la similitud con alguno de los tubos de la escala.



Figura 2. Ejemplo de comparación del estándar McFarland con tubo contaminado.

Anexo 4

Técnica de la dilución en tubo

La técnica de dilución en tubo se realizará basado en el procedimiento dado en “Evaluación de los Desinfectantes Utilizados en el Proceso de Limpieza y Desinfección del Área de Fitoterapéuticos en Laboratorios Pronabell LTDA” (Alba & Araujo, 2008):

Procedimiento:

- Se probarán las formulaciones efectivas de la prueba de ausencia presencia
- Se dispensa 1 mililitro de formulación en 8 tubos estériles, 4 por cada microorganismo.
- Se inoculan todos los tubos de la serie añadiendo 1 mililitro del microorganismo utilizado como prueba.
- A los 30 segundos, 5, 15 y 30 minutos se transfiere una alícuota de cada tubo a otro tubo que contenga medio de cultivo estéril.
- Incubar por 48 horas a 37°C.
- Luego de la incubación se observa en cuales de los tubos hubo crecimiento mediante la aparición de turbidez en el tubo (crecimiento positivo) o ausencia de turbidez (crecimiento negativo).

Nota: Aquellos tubos que presenten crecimiento negativo indican que dicha formulación del agente químico mata al microorganismo utilizado como prueba cuando este es expuesto durante ese periodo de tiempo.

Anexo 5

Prueba del efecto corrosivo

Universidad de El Salvador
Facultad de Ingeniería y Arquitectura
Escuela de Ingeniería Química e Ingeniería de Alimentos
Principios de Electroquímica y Corrosión



Laboratorio No. 3 “Influencia del pH en la corrosión”

La corrosión, de los metales puede ocurrir en agua destilada, agua lluvia, agua de mar, soluciones salinas, soluciones ácidas, soluciones alcalinas, presencia de gases, etc. Otro factor importante para el fenómeno de corrosión lo constituye el tipo de iones presentes (aniones o cationes) que entran en contacto con el metal.

Las reacciones químicas que tiendan a convertir los metales en fase sólida en especies ionizadas constituyen procesos de corrosión.

❖ MATERIAL Y EQUIPO

- Probeta de 50 ml.
- 4 beakers de 250 ml
- 20 botes pequeños de vidrio con tapadera tipo Gerber.
- Lija.

❖ REACTIVOS

- Solución A: Solución de Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) 0.01 N.
- Solución B: Solución de Acetato de Sodio ($\text{CH}_3\text{COO-Na}^+$) 0.01 N.
- Solución C: Solución de Hidróxido de Potasio (KOH) 0.01 N.
- Solución D: Solución de Cloruro de Amonio (NH_4^+Cl^-) 0.01 N.

❖ METALES A UTILIZAR

- Magnesio
- Cobre
- Hierro
- Zinc
- Aluminio



❖ PROCEDIMIENTO

PARTE I: CORROSIÓN EN MEDIO ÁCIDO.

1. Colocar en cinco botes de gerber 30 ml de solución de ácido sulfúrico 0.01 N (A), y en otros cinco colocar 30 ml de solución de acetato de sodio 0.01 N (B). Rotular cada frasco con el nombre de la solución.
2. Cortar dos pedazos de cada uno de los metales mencionados anteriormente.
3. Colocar un pedazo de cada metal en solución A y un pedazo de cada metal en solución B. Rotular los frascos con el nombre del metal.
4. Observar los cambios ocurridos durante la primera hora.
5. Dejar reposar durante tres días y anotar lo ocurrido.

PARTE II: CORROSIÓN EN MEDIO ALCALINO.

1. Colocar en cinco botes de gerber 30 ml de solución de hidróxido de potasio 0.01 N (C), y en otros cinco colocar 30 ml de solución de cloruro de amonio 0.01 N (D). Rotular cada frasco con el nombre de la solución.
2. Seguir los mismos pasos de la Parte I desde el numeral 2.

❖ CUESTIONARIO

1. Explique ¿cómo puede afectar la presencia de aniones y cationes en la corrosión?
2. Plantee las reacciones de equilibrio de las soluciones utilizadas antes y después de adicionar los metales.
3. ¿Qué metales fueron más rápidos para corroerse?
4. ¿Qué puede explicarse mediante las reacciones de óxido-reducción del fenómeno de corrosión ocurrido en esta práctica?
5. ¿Cómo podría cuantificarse el desgaste del metal en un proceso de corrosión en el laboratorio?

Anexo 6

Procedimiento para la realización de un análisis sensorial hedónico

Procedimiento basado en “Evaluación Sensorial”, Hernández Elizabeth, 2005

- Seleccionar una superficie separada de la zona de respuestas de los panelistas.
- Contaminar la superficie con sustancias fétidas características de fácil reconocimiento, huevos, pescado, etc.
- Limpiar la de las superficies con el desinfectante basado en aceite de eucalipto.
- Pasar a los jueces a olfatear la superficie luego de transcurrido 1, 10 y 15 minutos. después de haber limpiado con el desinfectante.
- Los jueces harán sus juicios respondiendo el instrumento de la prueba.

Anexo 7

Formato para la realización de un análisis sensorial hedónico

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DESODORANTE DEL DESINFECTANTE
BASADO EN ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO.

EVALUACIÓN SENSORIAL

PRUEBA HEDONICA

FECHA _____

Frente a usted tiene una superficie que ha sido limpiada previamente con un desinfectante, por favor indique en la casilla de valoración la escala de aceptación según los rastros de olor fétido que pueda percibir en los tiempos indicados, describa su opinión sobre el producto que acaba de probar.

Escala de aceptación

1	2	3	4	5
Me Desagrada mucho	Me Desagrada	No me Agrade, ni me Desagrada	Me Agrade levemente	Me Agrade mucho

TIEMPO	VALORACIÓN
1 minuto	
10 minutos	
15 minutos	



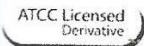

COMENTARIOS

¡MUCHAS GRACIAS!

Anexo 8

Certificación de las cepas ATCC

8.1 Certificación para cepa *S. aureus*

	
Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release	
Specifications Microorganism Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus Catalog Number: 0360 Lot Number: 360-332** Reference Number: ATCC® 25923™* Purity: Pure Passage from Reference: 3 Mean Assay Value (MAV): 5.3E+03 CFU per pellet	Expiration Date: 2019/3/31 Release Information: Quality Control Technologist: Caitlyn J Laudenbach Release Date: 2017/4/20
Performance	
Macroscopic Features: Medium to large, convex, entire edge, both white and pale white colonies, smooth, opaque, beta hemolytic Microscopic Features: Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters	Medium: SBAP Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive (1) Coagulase (rabbit plasma - tube): positive (1) Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 27 - 35 mm (1) Penicillin (10 units - Disk Susceptibility): 26 - 37 mm (1) Oxacillin (1 mcg - Disk Susceptibility): 18 - 24 mm <div style="text-align: center;">  Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE </div>
<p>**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</p> <p>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</p> <p>▲ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</p> <p>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</p> <div style="display: flex; align-items: flex-start;"> <div style="margin-right: 20px;">  </div> <div> <p>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC®</p> </div> </div> <div style="margin-top: 10px;"> <p>(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</p> </div> <div style="margin-top: 10px;">  TESTING CERT #2655.01 </div>	

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 - 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 - 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 - 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)


Category	Interpretation
(A)	High consistency: The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	Low consistency: The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which the genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	No consistency: The requirements for high or low consistency are not met.

Sample Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus
 Sample Description: 0360
 Sample ID: 360-332
 Sample Creation Date/Time: 2017-04-18T15:53:01.740 CL
 Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library 1.0, Listeria

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
B3 (+++)(A)	360-332	Staphylococcus aureus	2.29

Comments:

N/A

 **Microbiologics®**
Statistical Analysis Certificate

Microorganism Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus

Reference #: ATCC® 25923™*

Catalog #: 0360

Lot #: 360-332**

Expiration Date: 2019/3/31

Mean Assay Value (MAV): 5.3E+03 CFU per pellet

Standard Deviation: 1.0E+03

Coefficient of Variation: 19%

99% Confidence Interval of 4.5E+03 to 6.1E+03 CFU

95% Confidence Interval of 4.8E+03 to 5.9E+03 CFU

Method used to determine Mean Assay Value: Spiral Biotech Test Method

Medium Employed: TSA

Incubation Time and Temp: 24 hrs at 34-38 degrees C




Amanda Kuperus
Quality Control Manager
AUTHORIZED SIGNATURE

The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number. The information included in this Statistical Analysis Certificate is strictly based on the product's lot number. A product lot number may be assigned to multiple packaging configurations. As a result, this certificate only lists the lot number and does not include a product description.

8.2 Certificación ATCC para cepa E. coli



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Escherichia coli Catalog Number: 0335 Lot Number: 335-267 Reference Number: ATCC® 25922™ Purity: Pure Passage from Reference: 3 Mean Assay Value: 4.2E+03 CFU per pellet	Expiration Date: 2018/12/31 Release Information: Quality Control Technologist: Megan C Wipper Release Date: 2017/8/3
Performance	
Macroscopic Features: 2 colony types, both are gray & beta hemolytic; one is circular to irregular, convex, slightly erose edge & smooth; other is larger, irregular, low convex, erose edge & rough Microscopic Features: Gram negative straight rod	Medium: SBAP Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Oxidase (Kovacs): negative Beta-glucuronidase (E. coli Broth w/MUG): positive (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 16 - 22 mm (1) Gentamicin (10 mcg - Disk Susceptibility): 19 - 26 mm (1) SXT (1.25/23.75 mcg - Disk Susceptibility): 23 - 29 mm  Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE
<p><small>Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are thereby a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</small></p> <p><small>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</small></p> <p><small>Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</small></p> <p><small>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</small></p> <p><small>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</small></p> <p><small>(†) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</small></p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div data-bbox="288 1346 435 1395"> </div> <div data-bbox="288 1442 496 1570"> </div> <div data-bbox="1157 1525 1332 1579"> <p><i>Rec: Wipper</i> 04-09-17/AE</p> </div> </div>	

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 - 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 - 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 - 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	High consistency: The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	Low consistency: The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which the genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	No consistency: The requirements for high or low consistency are not met.

Sample Name: Escherichia coli
 Sample Description: 0335
 Sample ID: 335-267
 Sample Creation Date/Time: 2017-08-01T11:47:40.950 MW
 Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library 1.0, Listeria

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
F11 (+++)(A)	335-267	Escherichia coli	2.51

Comments:

closely related to Shigella and not definitely distinguishable at the moment



Statistical Analysis Certificate

Microorganism Name: Escherichia coli
Reference #: ATCC® 25922™*
Catalog #: 0335
Lot #: 335-267
Expiration Date: 2018/12/31
Mean Assay Value: 4.2E+03 CFU per pellet
Standard Deviation: 1.4E+03
Coefficient of Variation: 33%
99% Confidence Interval of 3.1E+03 to 5.2E+03 CFU
95% Confidence Interval of 3.4E+03 to 4.9E+03 CFU

Method used to determine Mean Assay Value: Spiral Biotech Test Method
Medium Employed: TSA
Incubation Time and Temp: 24 hrs at 34-38 degrees C

Amanda Kuperus
Quality Control Manager
AUTHORIZED SIGNATURE

The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number. This information included in this Statistical Analysis Certificate is strictly based on the product's lot number. A product lot number may be assigned to multiple packaging configurations. As a result, this certificate only lists the lot number and does not include a product description.

Anexo 9

Resultados de Análisis Microbiológicos: prueba cuantitativa de actividad bactericida.

9.a Actividad bactericida del desinfectante concentración 4% v/v, pH = 5



CENSALUD
Centro de Investigación y Desarrollo en Salud
Universidad de El Salvador

LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLÓGICO

Ciudad Universitaria, Final 25 Avenida Norte, San Salvador, El Salvador. Teléfono No. (503) 2511-2028

INFORME DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Nombre de la muestra: Desinfectante EUCALIPTO 4% Código: 20180912-02

Forma Farmacéutica: Solución Desinfectante

Solicitante: Mario José Flores. Fecha de emisión 24-09-2018

Lote No. ----- Fabricación: ----- Vencimiento: -----

Método: Evaluación de actividad antimicrobiana -- Official Methods of Analysis. AOAC.

Contenido rotulado: Eucalipto 4%

Descripción: Solución de color blanco, con olor característico.

DETERMINACIÓN	RESULTADOS		ESPECIFICACIONES
Efectividad antimicrobiana frente a:	Porcentaje de reducción a		El porcentaje de reducción deber ser de igual o mayor a 99.999% en el tiempo de contacto señalado.
	30 seg	5 min	
<i>Escherichia coli</i>	99.999 %	99.999 %	
<i>Salmonella spp</i>	99.999 %	99.999 %	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99.999 %	99.999 %	
<i>Staphylococcus aureus</i>	99.999 %	99.999 %	
OBSERVACIONES:			
- El informe corresponde a la muestra remitida y ensayada el 12/09/2018.			
- La muestra fue ensayada en su concentración original, según indicaciones del solicitante.			

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez
Química Farmacéutica



Fecha de análisis: 12-09-2018

9.b Actividad bactericida del desinfectante concentración 5% v/v, pH = 5



CENSALUD

Centro de Investigación y Desarrollo en Salud
Universidad de El Salvador

LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLÓGICO

Ciudad Universitaria, Final 25 Avenida Norte, San Salvador, El Salvador. Teléfono No. (503) 2511-2028

INFORME DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Nombre de la muestra: Desinfectante EUCALIPTO 5% Código: 20180912-01

Forma Farmacéutica: Solución Desinfectante

Solicitante: Mario José Flores. Fecha de emisión 24-09-2018

Lote No. ----- Fabricación: ----- Vencimiento: -----

Método: Evaluación de actividad antimicrobiana -- Official Methods of Analysis. AOAC.

Contenido rotulado: Eucalipto 5%

Descripción: Solución de color blanco, con olor característico.

DETERMINACIÓN	RESULTADOS		ESPECIFICACIONES
Efectividad antimicrobiana frente a:	Porcentaje de reducción a		El porcentaje de reducción deber ser de igual o mayor a 99.999% en el tiempo de contacto señalado
	30 seg	5 min	
<i>Escherichia coli</i>	99.999 %	99.999 %	
<i>Salmonella spp</i>	99.999 %	99.999 %	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99.999 %	99.999 %	
<i>Staphylococcus aureus</i>	99.999 %	99.999 %	
OBSERVACIONES:			
- El informe corresponde a la muestra remitida y ensayada el 12/09/2018.			
- La muestra fue ensayada en su concentración original, según indicaciones del solicitante.			

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez
Química Farmacéutica



Fecha de análisis: 12-09-2018

Anexo 10

Resultados de Análisis Microbiológicos para Estudio de Vida Útil

10.1 Análisis de efectividad antimicrobiana a los 2 meses



CENSALUD
Centro de Investigación y Desarrollo en Salud
Universidad de El Salvador

LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLÓGICO

Ciudad Universitaria, Final 25 Avenida Norte, San Salvador, El Salvador. Teléfono No. (503) 2511-2028

INFORME DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Nombre de la muestra: Desinfectante EUCALIPTO 4% Código: 20181105-01
Forma Farmacéutica: Solución Desinfectante
Solicitante: Mario José Flores. Fecha de emisión 07-12-2018
Lote No. ----- Fabricación: ----- Vencimiento: -----
Método: Evaluación de actividad antimicrobiana -- Official Methods of Analysis. AOAC.
Contenido rotulado: Eucalipto 4%
Solución de color blanco, con olor característico.
Descripción: Información etiqueta: Prueba 8, pH 5.

DETERMINACIÓN	RESULTADOS		ESPECIFICACIONES
Efectividad antimicrobiana frente a:	Porcentaje de reducción a		El porcentaje de reducción deber ser de igual o mayor a 99.999% en el tiempo de contacto señalado
	30 seg	5 min	
<i>Escherichia coli</i>	100.0 %	100.0 %	
<i>Salmonella spp</i>	100.0 %	100.0 %	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100.0 %	100.0 %	
<i>Staphylococcus aureus</i>	100.0 %	100.0 %	
OBSERVACIONES:			
- El informe corresponde a la muestra remitida y ensayada el 07/11/2018.			
- La muestra fue ensayada en su concentración original, según indicaciones del solicitante.			

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez
Química Farmacéutica



Fecha de análisis: 07-11-2018

10.2 Análisis de efectividad antimicrobiana a los 3 meses



CENSALUD
Centro de Investigación y Desarrollo en Salud
Universidad de El Salvador

LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLÓGICO

Ciudad Universitaria, Final 25 Avenida Norte, San Salvador, El Salvador. Teléfono No. (503) 2511-2028

INFORME DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Nombre de la muestra: Desinfectante EUCALIPTO 4% Código: 20181203-01

Forma Farmacéutica: Solución Desinfectante

Solicitante: Mario José Flores. Fecha de emisión 07-12-2018

Lote No. ----- Fabricación: ----- Vencimiento: -----

Método: Evaluación de actividad antimicrobiana -- Official Methods of Analysis. AOAC.

Contenido rotulado: Eucalipto 4%

Solución de color blanco, con olor característico.

Descripción: Información etiqueta: pH 5.

DETERMINACIÓN	RESULTADOS		ESPECIFICACIONES
Efectividad antimicrobiana frente a:	Porcentaje de reducción a		El porcentaje de reducción deber ser de igual o mayor a 99.999% en el tiempo de contacto señalado
	30 seg	5 min	
<i>Escherichia coli</i>	100.0 %	100.0 %	
<i>Salmonella spp</i>	100.0 %	100.0 %	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99.999 %	99.999 %	
<i>Staphylococcus aureus</i>	100.0 %	100.0 %	
OBSERVACIONES:			
<ul style="list-style-type: none"> - El informe corresponde a la muestra remitida y ensayada el 03/12/2018. - La muestra fue ensayada en su concentración original, según indicaciones del solicitante. 			

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez
Química Farmacéutica



Fecha de análisis: 03-12-2018

Anexo 11

Resultados de Análisis de Aguas

11.1 Resultado de análisis para Agua Residual de Proceso de Manufactura

	LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD	CODIGO: P G - 2 8 F 2
	REGISTRO	N° L186508
	NOMBRE: INFORME DE ENSAYO DE AGUA RESIDUALES	PAGINA: 1 de 1

Código de Muestra: 0	Identificación de Muestra: L186508
Cliente: LABORATORIO REQUERIMIENTO ESPECIAL	Fecha de Recepcion: 21-11-2018 Hora: 09:27
Dirección: -	Fecha de Análisis: 21-11-2018 Hora: 11:00
Muestreador: MARIO JOSE CASTELLANOS	Tipo de Muestra Analizada:
Punto de Muestreo: PLANTA PILOTO	Parametros de acuerdo a NSO 13.07.01.04
Plan de Muestreo: Puntual	ORDINARIO
Fecha de Muestreo: 21-11-2018 Hora: 07:50	

Párametros de Campo	Resultados	Unidad	Límite Máximo Permissible	Método
Temperatura de Muestra	22.0	°C.	20 - 35 °C La temperatura del agua descargada al cuerpo receptor no podrá alterar ± 5°C con respecto al cuerpo hidrico receptor	2550 Laboratory and Field. Method APHA
Cloro Residual	-	mg/L	-----	4500 - Cl G DPD Colorimetric. Method APHA

RESULTADOS ANALITICOS

Párametros de Laboratorio	Resultados	Unidad	Límite Máximo Permissible	Método
DQO Total *	144.00	mg/L	150	5220 C Closed Reflux, Titrimeric. Method APHA
DBO Total *	110.00	mg/L	60	5210 B 5-Day BOD Test. Method APHA
Sólidos Sedimentables *	<0.2	mL/L	1	2540 F Settleable Solid. Method APHA
Sólidos Suspendidos Totales *	<10.80	mg/L	60	2540 D Total Suspended Solid Dried at 103 - 105°C. Method APHA
Aceites y Grasas	14.00	mg/L	20	5520 D Soxhlet Extraction. Method APHA
pH *	6.91	—	5.5 - 9.0 Vertidos en aguas limnicas; 6.0 - 9.5 Vertidos en aguas costero marinas	4500 - H ⁺ B Electrometric. Method APHA
Turbidez	-	NTU	No se incrementara en 5 unidades la turbidez del cuerpo receptor.	2130 B Nefelometric. Method APHA
Color	-	Pt - Co	Efluente liquido no deberá incrementar color visible al cuerpo receptor	120 Method HACH
Cloruros	-	mg/L	—	4500 - Chloride B Argentometric. Method APHA
Oxigeno Disuelto *	-	mg/L	—	4500 - O C Azide Modification. Method APHA

* Métodos Acreditados** Fuera de Rango*** Interferencia de MatrizND No Detectable

Revisado por: _____

Observaciones: _____


Autorizado por: _____

LIC. DOUGLAS ERNESTO GARCIA
JEFE DEL LABORATORIO

Boulevard del Hipodromo, No. 609, Colo. San Benito, San Salvador
Los resultados reportados corresponden a la muestra ensayada

laboratorio@anda.gob.s.v

11.2 Resultados de análisis para Agua Residual de Proceso de Limpieza

	LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD	CODIGO: P G - 28 F 2
	REGISTRO	N° L186509
	NOMBRE: INFORME DE ENSAYO DE AGUA RESIDUALES	PAGINA: 1 de 1

Código de Muestra: 0	Identificación de Muestra: L186509
Cliente: LABORATORIO REQUERIMIENTO ESPECIAL	Fecha de Recepción: 21-11-2018 Hora: 09:27
Dirección: -	Fecha de Análisis: 21-11-2018 Hora: 11:04
Muestreador: MARIO JOSE CASTELLANOS	Tipo de Muestra Analizada:
Punto de Muestreo: PLANTA PILOTO	Parametros de acuerdo a NSO 13.07.01.04
Plan de Muestreo: Puntual	ORDINARIO
Fecha de Muestreo: 21-11-2018 Hora: 08:02	

Parámetros de Campo	Resultados	Unidad	Límite Máximo Permissible	Método
Temperatura de Muestra	22.0	°C.	20 - 35 °C La temperatura del agua descargada al cuerpo receptor no podrá alterar ± 5°C con respecto al cuerpo hidrico receptor	2550 Laboratory and Field. Method APHA
Cloro Residual	-	mg/L	-----	4500- Cl G DPD Colorimetric. Method APHA

RESULTADOS ANALITICOS

Parámetros de Laboratorio	Resultados	Unidad	Límite Máximo Permissible	Método
DQO Total *	206.40	mg/L	150	5220 C Closed Reflux, Tritrimetric. Method APHA
DBO Total *	42.40	mg/L	60	5210 B 5-Day BOD Test. Method APHA
Sólidos Sedimentables *	<0.2	mL/L	1	2540 F Settleable Solid. Method APHA
Sólidos Suspendidos Totales *	12.50	mg/L	60	2540 D Total Suspended Solid Dried at 103 - 105°C. Method APHA
Aceites y Grasas	21.00	mg/L	20	5520 D Soxhlet Extraction. Method APHA
pH *	7.01	—	5.5 - 9.0 Vertidos en aguas limnicas; 6.0 - 9.5 Vertidos en aguas costero marinas	4500 - H ⁺ B Electrometric. Method APHA
Turbidez	-	NTU	No se incrementara en 5 unidades la turbidez del cuerpo receptor.	2130 B Nefelometric. Method APHA
Color	-	Pt - Co	Efluente liquido no deberá incrementar color visible al cuerpo receptor	120 Method HACH
Cloruros *	-	mg/L	—	4500 - Chloride B Argentometric. Method APHA
Oxigeno Disuelto *	-	mg/L	—	4500 - O C Azide Modification. Method APHA

* Métodos Acreditados** Fuera de Rango*** Interferencia de Matriz N.D No Detectable

Revisado por: _____

Observaciones: _____

Autorizado por: _____

LIC. DOUGLAS ERNESTO GARCIA
JEFE DEL LABORATORIO

Boulevard del Hipodromo, No. 609, Colo. San Benito, San Salvador
Los resultados reportados corresponden a la muestra ensayada

laboratorio@anda.gob.s.v