



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA DIVISIÓN DE  
CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

**Procesos de oxidación avanzada con ozono y peróxido  
de hidrógeno para inactivar huevos de helminto  
*Toxocara canis* y quistes del protozooario *Giardia lamblia***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS E  
INGENIERÍA AMBIENTALES

PRESENTA

**Q.B.P. VERÓNICA CASTILLO CAMPOS**

Ciudad de México, junio de 2016

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS E  
INGENIERÍA AMBIENTALES POR LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
METROPOLITANA

PRESENTA

**Q.B.P. VERÓNICA CASTILLO CAMPOS**

Procesos de oxidación avanzada con ozono y peróxido de  
hidrógeno para inactivar huevos de helminto *Toxocara canis*  
y quistes del protozoario *Giardia lamblia*

Comité de evaluación:

Dra. Clementina Rita Ramírez Cortina  
Dr. Benjamín Noguera Torres  
M. en C. María del Rocío Cruz Colín  
Dra. María Teresa Castañeda Briones

Universidad Autónoma Metropolitana -Azcapotzalco  
Instituto Politécnico Nacional -ENCB  
Universidad Autónoma Metropolitana -Azcapotzalco  
Universidad Autónoma Metropolitana -Azcapotzalco

Ciudad de México, junio de 2016

A mis hijas  
María Fernanda y Daniela

## DEDICATORIAS

**A mi hermano Emilio:** Por motivarme a seguir con este sueño y por su apoyo.

**A mi madre y mi hermano Mario:** Porque con su cariño, paciencia, consejos y apoyo me ha permitido seguir siempre adelante, y porque sé que a pesar de la distancia siempre estaremos juntos avanzando.

**A mi esposo:** Por su paciencia y apoyo para seguir adelante con este sueño.

**Al Dr. Benjamín Nogueta Torres:** Por sus excelentes consejos y sobre todo por su apoyo incondicional en todo momento, por su tiempo, paciencia y confianza. Mi agradecimiento infinito.

## AGRADECIMIENTOS

### A mi comité:

Dr. Benjamín Nogueta Torres  
M. en C. María del Rocío Cruz Colín  
Dra. María Teresa Castañeda Briones

Les agradezco su amable disposición y valiosas sugerencias para la realización de este trabajo.

A la Dra. Clementina Rita Ramírez Cortina, por darme este trabajo de investigación maravilloso.

A la Dra. Violeta Mugica Álvarez, por confiar en mí. Por su apoyo, por sus consejos y por darme la oportunidad de ingresar a la Maestría.

A mis compañeros de maestría: Liz, Estephanie, José, Anbu, Sarahí, Gerardo, Israel, Raúl, Julio y Miriam.

Gracias también a todas aquellas personas que me apoyaron de diversas maneras a lo largo de este trabajo.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Procesos Físico-Químicos del departamento de Energía de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Azcapotzalco bajo la dirección de la Dra. Clementina R. Ramírez Cortina y en el laboratorio de Helminología del departamento de Parasitología en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. Benjamín Noguera Torres.

Este trabajo contó con el apoyo financiero del CONACYT No 564056 titulado "Procesos de oxidación avanzada con ozono y peróxido de hidrógeno para inactivar huevos de helminto *Toxocara canis* y quistes del protozoario *Giardia lamblia*".

Para realizar la Maestría en Ciencias e Ingeniería Ambientales, el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología me otorgó una beca con el No. de registro 326850 durante el periodo 2014-2016.

Una parte de los resultados de este trabajo, fueron presentados en el VIII Congreso Latinoamericano de Ciencias Ambientales realizado en Pucón, Chile, del 5 al 9 de Octubre del 2015.

Este trabajo contó con el apoyo financiero del COMECYT No 16BTIM0201.

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>viii</b>
<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS</b>	<b>xii</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xiv</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. ESTADO DEL ARTE</b>	<b>5</b>
Infecciones parasitarias por protozoarios	5
2.1. <i>Giardia lamblia</i> y Giardiosis	6
2.1.1. Clasificación taxonómica	6
2.1.2. Epidemiología	6
2.1.2.1. Giardiosis en México	7
2.1.3. Morfología de <i>G. lamblia</i>	8
2.1.3.1. Fase de trofozoíto	9
2.1.3.2. Fase de quiste	9
<b>2.1.3.2.1 Desenquistamiento</b>	<b>11</b>
2.1.4. Viabilidad de <i>G. lamblia</i>	11
2.1.5. Ciclo de vida	12
2.2. <i>Toxocara canis</i> y toxocariosis	13
2.2.1. Clasificación taxonómica	15
2.2.2. Epidemiología	15
2.2.3. Morfología de <i>Toxocara canis</i>	16
2.2.4. Ciclo biológico	17
2.2.5. Morfología del huevo de <i>Toxocara canis</i>	20
2.2.6. Huevos de helmintos en aguas residuales	22
2.3. Procesos de oxidación avanzada	23
Ventajas de estas nuevas tecnologías sobre los métodos convencionales	25
2.3.1. Peróxido de hidrógeno	26
2.3.1.1. Reacciones en la disociación del peróxido de hidrógeno	27
2.3.2. El peróxido de hidrógeno como un desinfectante	28
2.3.3. Ozono	29
2.3.3.1. Producción de ozono	29
2.3.3.2. Mecanismo de reacción del ozono	30
2.3.4. El ozono como un desinfectante	32
2.3.4.1. Los mecanismos de desinfección asociados con el uso del ozono	34
2.3.5. Peroxono	35
2.3.5.1. Proceso del peroxono	35
2.3.6. Peroxono como un desinfectante	37
2.3.7. Los procesos de oxidación avanzada como una alternativa para la desinfección	38
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>48</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>48</b>

<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>49</b>
<b>6. METODOLOGÍA</b>	<b>50</b>
6.1. Obtención de los quistes de <i>G. lamblia</i>	50
6.2. Obtención de los huevos de <i>T. canis</i>	50
6.3. Preparación y valoración de peróxido de hidrógeno al 10% y 30%	51
6.4. Determinación de la producción de radicales hidroxilo	51
6.5. Análisis estadístico	52
6.6. Inactivación de quistes de <i>Giardia lamblia</i>	52
6.6.1. Tratamiento con peróxido de hidrógeno al 10% (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) a diferentes pH y tiempos de contacto	52
6.6.2. Tratamiento con ozono (O <sub>3</sub> ) a diferentes pH y 120 minutos de contacto	54
6.6.3. Tratamiento con ozono/peróxido de hidrógeno al 10% a diferentes pH y 120 minutos de contacto	56
6.6.4. Tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) a diferentes pH y tiempos de contacto	58
6.6.5. Tratamiento con ozono (O <sub>3</sub> ) a diferentes pH y tiempos de contacto	59
6.6.7. Tratamiento con ozono y peróxido de hidrógeno al 30% (O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) a diferentes pH y tiempos de contacto	61
6.7. Pruebas de viabilidad	63
6.7.1. Determinación de la viabilidad de los quistes de <i>G. lamblia</i> por el método de exclusión del colorante azul de metileno amortiguado de Bingham y Meyer, 1979.	63
6.7.2. Determinación de la viabilidad de <i>G. lamblia</i> por el método de desenquistamiento in vitro de Rice y Shaefer III, 1981.	63
6.8. Inactivación de <i>Toxocara canis</i>	64
6.8.1. Tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) a diferentes pH y tiempos de contacto	64
6.8.2. Tratamiento con ozono (O <sub>3</sub> ) a diferentes pH y tiempos de contacto	65
6.8.3. Tratamiento con ozono y peróxido de hidrógeno al 30% (O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) a diferentes pH y tiempos de contacto	67
6.9. Microscopía óptica	70
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>71</b>
7.1. Inactivación de quistes de <i>Giardia lamblia</i>	71
7.1.1. Tratamiento con peróxido de hidrógeno al 10% (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) a diferentes pH y tiempos de contacto	71
7.1.2. Tratamiento con ozono (O <sub>3</sub> ) a diferentes pH y 120 minutos de contacto	73
7.1.3. Tratamiento con ozono/peróxido de hidrógeno al 10% a diferentes pH y 120 minutos de contacto	75
7.1.4. Tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) a diferentes pH y tiempos de contacto	77
7.1.4.1. Quistes observados en el testigo y después del tratamiento con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30%	79
7.1.5. Tratamiento con ozono (O <sub>3</sub> ) a diferentes pH y tiempos de contacto	80
7.1.5.1. Quistes tratados con ozono (O <sub>3</sub> )	83
7.1.6. Tratamiento con ozono y peróxido de hidrógeno al 30% (O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) a diferentes pH y tiempos de contacto	84
7.1.6.1. Quistes tratados con ozono y peróxido de hidrógeno al 30% (O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	86



7.1.7. Determinación de la viabilidad de <i>G. lamblia</i> por el método de exclusión del colorante azul de metileno amortiguado de Bingham et al., 1979.	88
7.1.8. Determinación de la viabilidad de <i>G. lamblia</i> por el método de desenquistamiento in vitro de Rice y Shaefer III, 1981.	88
7.2. Huevos de <i>Toxocara canis</i> en el testigo	89
7.2.1. Huevos observados en el testigo después de 28 días de incubación	90
7.2.2. Tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) a diferentes pH y tiempos de contacto	91
7.2.2.1. Huevos tratados con peróxido de hidrógeno al 30% (observaciones a 10x)	93
7.2.3. Tratamiento con ozono (O <sub>3</sub> ) a diferentes pH y tiempos de contacto	94
7.2.3.1. Huevos tratados con ozono (observaciones a 10x)	97
7.2.4. Tratamiento con ozono y peróxido de hidrógeno al 30% (O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) a diferentes pH y tiempos de contacto	97
7.2.4.1. Huevos tratados con O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30% (observaciones a 40x)	99
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>105</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>108</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>119</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Procesos de oxidación avanzada

**Tabla 2.** Potencial de óxido-reducción de algunos agentes oxidantes.

**Tabla 3.** Capacidad desinfectante de los distintos agentes químicos.

**Tabla 4.** Comparación de la formación de subproductos con distintos desinfectantes.

**Tabla 5.** Parámetros microbiológicos de detección obligatoria en varios países para el agua potable en México, Colombia, Estados Unidos y la comunidad Europea.

**Tabla 6.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 10% a pH 5 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

**Tabla 7.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 10% a pH 7 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

**Tabla 8.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 10% a pH 10 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

**Tabla 9.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono pH 5 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

**Tabla 10.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono pH 7 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

**Tabla 11.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono pH 10 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

**Tabla 12.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono/peróxido de hidrógeno al 10% a pH 5 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

**Tabla 13.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono/peróxido de hidrógeno al 10% a pH 7 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

**Tabla 14.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono/peróxido de hidrógeno al 10% a pH 10 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

**Tabla 15.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% a pH 5 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

**Tabla 16.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% a pH 7 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

**Tabla 17.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% a pH 10 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

**Tabla 18.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono pH 5 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

**Tabla 19.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono pH 7 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

**Tabla 20.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono pH 10 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

**Tabla 21.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono/peróxido de hidrógeno al 30% a pH 5 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

**Tabla 22.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono/peróxido de hidrógeno al 30% a pH 7 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

**Tabla 23.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono/peróxido de hidrógeno al 30% a pH 10 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

**Tabla 24.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% a pH 5 para inactivar huevos de *T. canis*.

**Tabla 25.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% a pH 7 para inactivar huevos de *T. canis*.

**Tabla 26.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% a pH 10 para inactivar huevos de *T. canis*.

**Tabla 27.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono a pH 5 para inactivar huevos de *T. canis*.

**Tabla 28.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono a pH 7 para inactivar huevos de *T. canis*.

**Tabla 29.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono a pH 10 para inactivar huevos de *T. canis*.

**Tabla 30.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono/peróxido de hidrógeno al 30% a pH 5 para inactivar huevos de *T. canis*.

**Tabla 31.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono/peróxido de hidrógeno al 30% a pH 7 para inactivar huevos de *T. canis*.

**Tabla 32.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono/peróxido de hidrógeno al 30% a pH 10 para inactivar huevos de *T. canis*.

**Tabla 33.** Porcentaje de inactivación de quistes de *G. lamblia* a los 120 minutos de exposición con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10% a diferentes concentraciones a pH 5, 7 y 10.

**Tabla 34.** Porcentaje de inactivación de quistes de *G. lamblia* con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10% a diferentes tiempos de contacto a pH 5, 7 y 10.

**Tabla 35.** Porcentaje de inactivación de quistes de *G. lamblia* tratados con agua saturada con ozono a diferentes concentraciones y pH diferentes con un tiempo de contacto de 120 minutos.

**Tabla 36.** Porcentaje de inactivación de quistes tratados a los 120 min con ozono a diferentes pH.

**Tabla 37.** Porcentaje de inactivación de quistes de *G. lamblia* a los 120 minutos de contacto con una solución de agua saturada con ozono y peróxido de hidrógeno al 10% a diferentes concentraciones y pH.

**Tabla 38.** Porcentaje de inactivación de quistes tratados a los 120 min con ozono y peróxido de hidrógeno a diferentes pH.

**Tabla 39.** Porcentaje de inactivación de quistes de *G. lamblia* después del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% a diferentes pH y tiempos de contacto.

**Tabla 40.** Comparación de los porcentajes de inactivación de quistes de *G. lamblia* después de ser tratados con ozono a diferentes pH con un tiempo de contacto de 7 y 10 minutos.

**Tabla 41.** Comparación de los porcentajes de inactivación de quistes de *G. lamblia* después de ser tratados con ozono/peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes pH con un tiempo de contacto de 7 y 10 minutos.

**Tabla 42.** Porcentajes de inactivación de HH *T. canis* después de ser tratados con peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes pH y tiempos de contacto.

**Tabla 43.** Comparación de los porcentajes de inactivación de HH *T. canis* después de ser tratados con ozono a diferentes pH con un tiempo de contacto de 60 y 120 minutos.

**Tabla 44.** Comparación de los porcentajes de inactivación de HH *T. canis* después de ser tratados con ozono/peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes pH con un tiempo de contacto de 60 y 120 minutos.

**Tabla 45.** Comparación de los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos aplicados para inactivar quistes de *G. lamblia* y HH *T. canis*

**Tabla 46.** Comparación de los resultados obtenidos en este proyecto con resultados reportados en la literatura, utilizando POAs.

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Incidencia del mes de noviembre de la giardiosis en México 2015.
- Figura 2.** Morfología del trofozoito de *G. lamblia*, etapa replicativa en el intestino.
- Figura 3.** Morfología del quiste de *G. lamblia* (fase infectante).
- Figura 4.** Ciclo biológico de *G. lamblia*.
- Figura 5.** Morfología de *T. canis*.
- Figura 6.** Ciclo biológico de *T. canis*.
- Figura 7.** Huevo de *T. canis* donde se observan las fosetas.
- Figura 8.** Huevos de *T. canis*.
- Figura 9.** Capas que componen al huevo de *T. canis*.
- Figura 10.** Estructura química de la pared externa de un nematodo.
- Figura 11.** Esquema representativo de un generador de ozono.
- Figura 12.** Aparato generador de ozono.
- Figura 13.** Porcentaje de inactivación de quistes de *G. lamblia* a los 120 minutos de exposición con  $H_2O_2$  al 10% a diferentes concentraciones y pH.
- Figura 14.** Inactivación de quistes de *G. lamblia* tratados con  $H_2O_2$  al 10% a diferentes tiempos de contacto y pH.
- Figura 15.** Porcentaje de inactivación de quistes de *G. lamblia* a 120 minutos de contacto a diferentes concentraciones de  $O_3$  en agua y pH.
- Figura 16.** Inactivación de quistes de *G. lamblia* tratados con agua saturada con ozono a pH diferentes con un tiempo de contacto de 120 minutos.
- Figura 17.** Porcentaje de inactivación de quistes de *G. lamblia* a los 120 minutos de contacto con una solución de agua saturada con ozono y peróxido de hidrógeno 10% a diferentes concentraciones y pH.

**Figura 18.** Inactivación de quistes de *G. lamblia* tratados con agua saturada de ozono/ peróxido de hidrógeno al 10% a pH diferentes con un tiempo de contacto de 120 minutos.

**Figura 19.** Porcentaje de inactivación de quistes de *G. lamblia* después del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% a diferentes pH y tiempos de contacto.

**Figura 20.** Inactivación de quistes de *G. lamblia* tratados con peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes tiempos de contacto y pH.

**Figura 21.** Quiste viable y no viable en el testigo.

**Figura 22.** Quiste viable.

**Figura 23.** Quiste deformado por efecto del peróxido a pH 7.

**Figura 24.** Quiste deformado por la oxidación del peróxido a pH 10.

**Figura 25.** Comparación de los porcentajes obtenidos de inactivación de quistes de *G. lamblia* después de ser tratados con ozono a diferentes tiempos de contacto a pH 5, 7 y 10.

**Figura 26.** Porcentaje de inactivación de quistes de *G. lamblia* tratados con ozono a diferentes tiempos de contacto y pH.

**Figura 27.** Quiste con la membrana deformada por la oxidación a pH 5.

**Figura 28.** Quiste tratado con O<sub>3</sub>.

**Figura 29.** Comparación de los porcentajes obtenidos de inactivación de quistes de *G. lamblia* después de ser tratados con ozono/peróxido de hidrógeno al 30% a pH 5, 7 y 10 con un tiempo de contacto de 7 minutos (CT=11.2 mg/L\*min) y 10 minutos (CT=16 mg/L\*min).

**Figura 30.** Quistes de *G. lamblia* tratados con O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a diferentes pH y tiempos de contacto

**Figura 31.** Quistes dañados de la membrana por la oxidación con ozono/peróxido de hidrógeno a pH 10.

**Figura 32.** Comparación de los diferentes tratamientos para inactivar quistes de *G. lamblia* a pH diferentes.

**Figura 33.** Quistes de *G. lamblia* teñidos con azul de metileno amortiguado (AMA).

**Figura 34.** Trofozoítos.

**Figura 35.** Porcentaje de trofozoítos obtenido después del método de desenquistamiento *in vitro*.

**Figura 36.** Huevo de *T. canis* con dos blastómeros.

**Figura 37.** Larva de *T. canis* saliendo del huevo (proceso de eclosión).

**Figura 38.** Huevo larvado entero.

**Figura 39.** Huevo de *T. canis* en organogénesis.

**Figura 40.** Huevo entero con larva definitiva.

**Figura 41.** Huevo en fase de mórula.

**Figura 42.** Huevos de *T. canis* en diferentes fases de embrionación hasta la formación de la larva, después de 28 días de incubación.

**Figura 43.** Porcentaje de inactivación de HH *Toxocara canis* después del tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes pH y tiempos de contacto.

**Figura 44.** Tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes pH y tiempos de contacto.

**Figura 45.** Huevo tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a pH 10.

**Figura 46.** Huevo tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a pH 5.

**Figura 47.** Huevo tratado tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a pH 7.

**Figura 48.** Huevo tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a pH 10.

**Figura 49.** Comparación de los porcentajes de inactivación de HH *T. canis* obtenidos en el tratamiento con ozono a diferentes pH y tiempos de contacto

**Figura 50.** Tratamiento con ozono a diferentes pH y tiempos de contacto.



**Figura 51.** Huevos tratados con ozono a pH 10.

**Figura 52.** Huevos que presentan daño a pH 5

**Figura 53.** Huevo que presenta oxidación en la capa externa debido a la ozonólisis a pH 5.

**Figura 54.** Huevo oxidado por la acción del ozono a pH 10.

**Figura 55.** Porcentaje de inactivación de HH *T. canis* después del tratamiento con ozono/peróxido de hidrógeno a diferentes pH y tiempos de contacto.

**Figura 56.** Tratamiento con ozono/peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes pH y tiempos de contacto .

**Figura 57.** Huevo tratado con  $O_3/H_2O_2$  a pH 10.

**Figura 58.** Huevo tratado con  $O_3/H_2O_2$  a pH 5.

**Figura 59.** Huevo oxidado con  $O_3/H_2O_2$  a pH 7.

**Figura 60.** Huevo que presenta oxidación en la pared externa debido al  $O_3/H_2O_2$  a pH 5.

**Figura 61.** Huevo tratado con  $O_3/H_2O_2$  a pH 5.

**Figura 62.** Huevo tratado con  $O_3/H_2O_2$  a pH 10.

**Figura 63.** Comparación de los diferentes tratamientos para inactivar HH, a pH diferentes.

**Figura 64.** Test de azul de metileno.

**Figura 65.** Fotografías de pruebas cualitativas de radicales  $\bullet OH$  en  $H_2O_2$  al 10% y 30% a pH 5, 7, 10.

**Figura 66.** Fotografías de pruebas cualitativas de radicales  $\bullet OH$  en  $O_3/H_2O_2$  al 30% a pH 5, 7, 10.

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>μL</b>	Microlitros
<b>μm</b>	Micras
<b>CT</b>	Factor de concentración por tiempo de contacto
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>HH</b>	Huevos de helminto
<b>IPI</b>	Infecciones parasitarias intestinales
<b>J2</b>	Fase juvenil 2
<b>L</b>	Litros
<b>LMO</b>	Larva migrans ocular
<b>LVM</b>	Larva migrans visceral
<b>M</b>	Concentración molar
<b>min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mm</b>	Milímetros
<b>O<sub>3</sub></b>	Ozono
<b>OH<sup>·</sup></b>	Radical hidroxilo
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>POA<sub>s</sub></b>	Procesos de oxidación avanzada
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>TiO<sub>2</sub></b>	Dióxido de titanio
<b>UV</b>	Luz ultravioleta
<b>V</b>	Volts
<b>VIH</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana

## RESUMEN

Las enfermedades causadas por parásitos reciben el nombre de parasitosis y constituyen un problema de salud pública que a pesar de los adelantos en la tecnología, continúan afectando la calidad de vida de los individuos y los animales que los adquieren. El ozono ( $O_3$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), así como la combinación de ambos ( $O_3/H_2O_2$ ) son poderosos oxidantes que se aplican exitosamente desde hace mucho tiempo como desinfectantes de agua de tipo residual y potable, por lo que es de interés evaluar su actividad parasiticida a diferentes tiempos de contacto, pH y concentraciones. Se utilizaron quistes de *Giardia lamblia* y huevos de *Toxocara canis*, ambos agentes zoonóticos, cosmopolitas, que comúnmente contaminan aguas residuales y suelo.

El contacto hasta por 120 min de soluciones de  $H_2O_2$  a diferentes concentraciones y pH inactiva el 52.2% de los huevos de *T. canis* y disminuye el 71.9% de viabilidad de los quistes de *G. lamblia*. El tratamiento con  $O_3$  inactivó al 98% de los quistes a pH 10, con los huevos alcanzó el 83.9% a pH 5.

La oxidación con agua saturada con ozono de manera individual o combinada con peróxido de hidrógeno a diferentes valores de pH no eliminó el riesgo de transmisión de la giardiosis ya que solo alcanzó valores máximos de 35.5% de actividad giardicida, Sin embargo la actividad del ozono aplicado en el reactor semi-bach fue 2.6 veces más eficiente en la inactivación de quistes de *G. lamblia*.

La oxidación por el ozono en combinación con peróxido de hidrógeno y la acción de los radicales hidroxilo formados en el ambiente alcalino presentaron mayor inactivación de quistes de *G. lamblia* (99.4%) y huevos de helminto (89.4%) en comparación con la inactivación en reacciones a pH neutro y ácido.

El sinergismo que se tiene con la combinación oxidante de  $O_3/H_2O_2$  y la presencia de radicales hidroxilo formados en el pH alcalino permitió obtener mayores porcentajes de inactivación lo que disminuye de manera importante el riesgo de transmisión de ambas parasitosis, por lo que se demostró que los procesos de oxidación a avanzada son una alternativa para inactivar quistes del protozooario *G. lamblia* así como huevos de helminto *T. canis*.

## ABSTRACT

Parasitic diseases are a public health problem that despite the advances in technology continues to affect the quality of life of individuals and animals. Ozone and hydrogen peroxide as well as the combination of both ( $O_3/H_2O_2$ ) are powerful oxidants successfully that have been applied for a long time as disinfectants of waste water and potable type, so it is interesting to evaluate its parasitical activity at different contact times, pH and concentrations of  $O_3$  and  $H_2O_2$ . *Giardia lamblia* cysts and *Toxocara canis* eggs were used, both zoonotic cosmopolitan agents, commonly contaminate wastewater and soil.

Contact up to 120 min of  $H_2O_2$  solutions at different concentrations and pH inactivates the 52.2% of the *T. canis* eggs and only decreases 71.9% viability of *G. lamblia* cysts. The treatment with  $O_3$  inactivated the 98% of the cysts with a pH 10, with the eggs only reached 83.9 % at a pH of 5.

The oxidation with water saturated with ozone individually or in combination with hydrogen peroxide in different values of pH didn't eliminate the risk of transmission of the Giardiasis as it only reached higher values of 35.54% of giardicidal activity. Even though the activity of the ozone applied in the reactor was 2.6 times more efficient in the inactivation of *G. lamblia*.

Oxidation by ozone in combination with hydrogen peroxide and the action of the hydroxyl radicals formed by the alkaline environment presented a higher inactivation of the *G. lamblia* cysts (99.4%) and the helminth eggs (89.4%) compared to the inactivation of the reactions of a neutral and an acid pH.

The synergism that is obtain with the oxidant combination of  $O_3/H_2O_2$  and the presence of hydroxyl radicals formed in the alkaline pH allowed higher percentages of inactivation which significantly reduces the risk of the transmission of both parasitosis, it was shown that the advanced oxidation processes are an alternative to inactivate cysts of the protozoan *G. lamblia* as well as the eggs of the helminth *T. canis*.

# 1. INTRODUCCIÓN

Las parasitosis tienen un gran impacto en la salud humana y animal, aún en estas fechas en donde se tienen avances muy importantes en tecnología como son la nanotecnología y proteómica que se están aplicando para mejorar las técnicas de diagnóstico (Sánchez-Ovejero *et al.*, 2016).

A medida que los humanos fueron desplazándose en diferentes direcciones, tuvieron que adaptarse a las condiciones ambientales de una zona particular y alimentarse de sus fuentes naturales. Hoy se sabe que una amplia gama de microorganismos con diferentes orígenes forman parte de la biosfera, conforme la gente se extendía hacia nuevas regiones, entraba en contacto no sólo con la flora y fauna de esas zonas, sino también con los organismos presentes en los vegetales, animales, tierra o agua; de igual modo algunos animales infectados se convertían en fuente de contaminación para las personas cuando se interactuaba con ellos.

Los parásitos constituyen un problema de salud pública, pero también repercuten en la economía para el control de las enfermedades infecciosas, de hecho y aunque no siempre, las infecciones parasitarias afectan desproporcionadamente a las poblaciones con más desventajas económicas en el mundo. Muchos parásitos que se encuentran raramente en el mundo desarrollado, son muy comunes en países en vías de desarrollo (Gersovitz y Hammer, 2001). Cuando las personas padecían algún problema de salud por un microorganismo por la aparición de un síntoma, la gente trataba de conocer las causas de la enfermedad, el origen de sus síntomas y la forma de curarse, las primeras observaciones de enfermedades parasitarias proceden de alguien que advirtió que la materia fecal contenía helmintos y protozoarios entre otros, entonces ya fue posible identificar las causas de los signos y síntomas de la afección como diarrea mucosa y sanguinolenta, fiebre o vómitos (Becerril, 2004).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) advierte que el incremento en la hacinación favorecerá la transmisión de enfermedades, los niños en edad escolar son los más vulnerables y pueden presentar afecciones físicas e intelectuales debido a las infecciones por helmintos y protozoarios. El parasitismo intestinal es

uno de los problemas que se presenta tanto en los estratos rurales como en los urbanos donde los hábitos de higiene y juego hacen que los niños en edad escolar sean los más afectados por las infecciones transmitidas por protozoarios y helmintos (Smyth *et al.*, 1969).

La mayoría de los parásitos ya sean unicelulares como los protozoarios o multicelulares como los helmintos han desarrollado extraordinarios mecanismos de adaptación que les permiten sobrevivir en condiciones ambientales que de otro modo los destruirían (Luján, 2006).

Los quistes de protozoarios como *Giardia lamblia* pueden existir y concentrarse en el agua, tanto residual como potable, ya que existen factores de riesgo que incluyen a la contaminación accidental de hortalizas, frutas, esto se debe por el uso de riego de agua contaminada, así como también a un inadecuado saneamiento de la red de distribución de agua, el tiempo de resistencia de los microorganismos patógenos en el ambiente, prácticas deficientes de desinfección, la ingestión de agua contaminada, de hecho aún después de haber sido esta agua tratada con algún procedimiento de desinfección ya sea físico o químico (Smyth *et al.*, 1969; Barbosa *et al.*, 2013).

El hecho de ingerir este tipo de protozoos puede provocar diferentes grados de enfermedad, ya que puede ir desde una aguda hasta una crónica que pueden ser agresivas, complicarse y ser mortales, sobre todo en aquellas personas que inmunológicamente se encuentran comprometidas y/o inmunodeprimidos; por lo que si se da un tratamiento adecuado de prevención del agua se evitaría el hecho de que se den brotes epidémicos en la población (Barbosa *et al.*, 2013).

Los helmintos son un grupo de organismos muy abundantes en la naturaleza, se caracterizan por ser metazoarios, macroparásitos y por su aspecto vermiforme. La palabra helminto, deriva del griego *elmis* o *helmis* “gusano”, la helmintología es una rama de la parasitología animal que estudia a estos parásitos del hombre y de otros animales (Botero y Restrepo, 2003).

El helminto *Toxocara canis* es el agente etiológico de la toxocariosis, la cual entre las enfermedades parasitarias es de las más importantes de la población a nivel mundial (Anderson, 2000).

En muchos países, las infecciones causadas por parásitos son frecuentes, especialmente la helmintosis, los huevos de los helmintos son muy resistentes a los desinfectantes químicos, manteniéndose viables por mucho tiempo. Los huevos de helminto se pueden llegar a concentrar en el agua residual o potable por un inadecuado saneamiento de la red de distribución. Por otro lado, malos hábitos higiénicos, uso de agua de riego contaminada, una desinfección inadecuada, contaminación de frutas y hortalizas pueden provocar este tipo de infecciones. Los huevos de helmintos son descargados al medio ambiente en las heces y la ruta oral-fecal es la principal vía de transmisión de la enfermedad. Por desgracia, hay una falta de conocimiento sobre el control sanitario de los helmintos (Luján, 2006).

Históricamente la contaminación antropogénica de las aguas se ha tratado con métodos convencionales con procesos fisicoquímicos como son la floculación, precipitación, cloración o adsorción en carbón activo, por mencionar algunas tecnologías de uso común. Sin embargo, en ciertas ocasiones este tipo de tecnologías no son eficaces ya sea por la alta toxicidad del efluente a tratar o porque con las tecnologías disponibles no es posible alcanzar los requerimientos de vertido requeridos, por lo que surge la necesidad de procesos más eficaces en la destrucción de contaminantes. En las últimas décadas las tecnologías de oxidación avanzada se han consolidado como una alternativa eficiente para la destrucción de contaminantes, incluyendo los orgánicos, inorgánicos, metales y patógenos como los virus, protozoarios, bacterias y parásitos (Sanz *et al.*, 2012). Sin embargo, dichas tecnologías (POA) aún hoy son poco aplicadas, y peor aún menos difundidas en los países de economías emergentes como los de América Latina (Doménech *et al.*, 2002).

Los procesos de oxidación avanzada se definen como aquellos procesos que implican la generación de radicales hidroxilo que son unos fuertes oxidantes, que en una cantidad suficiente hacen posible la purificación del agua (Gottschak *et al.*, 2002). Los POA son tecnologías que se están consolidando como la opción más eficaz en el tratamiento de efluentes contaminados, principalmente por aspectos como su alta versatilidad, la amplia variedad de las tecnologías disponibles y la posibilidad que ofrecen de combinarse con las tecnologías más convencionales (Sanz *et al.*, 2012).

En el presente trabajo, se planteó el uso de tecnologías de oxidación avanzada con ozono ( $O_3$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y la combinación ( $O_3/H_2O_2$ ) para demostrar su actividad como desinfectantes sobre huevos de helminto (HH) de *T. canis* y quistes de *G. lamblia*, como una alternativa para el control de la transmisión de estos parásitos.



## 2. ESTADO DEL ARTE

### **Infecciones parasitarias por protozoarios**

Los protozoos de *proto* = primero y *zoo* = animal, son seres eucariontes, es decir que tienen un DNA organizado, membrana nuclear y organoides diferenciados. Son unicelulares, presentan diferentes formas dependiendo de la clase a la que pertenecen, las formas de resistencia que por lo general tienen importancia epidemiológica son los quistes y ooquistes. El desplazamiento de los protozoarios se realiza por medio de flagelos, cilios y pseudópodos. La reproducción puede ser asexual y sexual (Werner, 2013).

Una característica de los organismos parásitos es la gran capacidad que tienen de adaptarse a cambios del medio ambiente que les rodea, ya sean unicelulares como los protozoarios o multicelulares como los helmintos pueden ocupar diferentes nichos durante su trayecto por diversos vectores y hospedadores (Deitsch *et al.*, 1997). Las Infecciones Parasitarias Intestinales (IPI) son endémicas y constituyen la principal causa de enfermedad en todo el mundo, son el resultado de un saneamiento inadecuado, falta de acceso a agua potable y malas condiciones de vida, al igual que por contaminación de aguas residuales (Obala *et al.*, 2013). Las enfermedades parasitarias son muy importantes en México debido a su impacto económico y efectos adversos sobre la población (Sánchez-Vega *et al.*, 2006). Para determinar con qué frecuencia se presentan parasitosis por protozoarios en México se han realizado diversos estudios en poblaciones, indicando como principales agentes a *G. lamblia* (Flores, 2002). Otros factores como la carencia o deficiencia de los servicios públicos sanitarios así como la ausencia de sistemas de abastamientos y falta de potabilización de agua en las poblaciones rurales y urbanas favorecen la transmisión de estos patógenos (Sánchez-Pérez *et al.*, 2000).

## 2.1. *Giardia lamblia* y giardiosis

*G. lamblia* también conocido como: *Giardia intestinalis*, *Giardia duodenalis* es un protozoo flagelado zoonótico patógeno descrito por Antonie Van Leeuwenhoek de sus propias heces en 1681 (Citado en Adam, 2001), que parasita el tracto digestivo de humanos y otros mamíferos. En 1859, Vilem Laml (Citado en Adam, 2001) realizó un estudio con más detalle de la morfología y movilidad de este parásito haciendo mención de la forma, presencia de disco ventral y tamaño, y lo denominó *Cercomonas intestinalis*. En 1902 Charles Wardell Stiles (Citado en Adam, 2001) lo nombró *Giardia duodenalis* en honor al profesor A. Girad de Paris (Adam, 2001).

### 2.1.1. Clasificación taxonómica

De acuerdo a Schmidt y Roberts (2013), Adam (2001) y Luján y Svärd (2011), la clasificación taxonómica de *G. lamblia* es la siguiente:

Reino: Protista  
Phylum: Sarcomastigophora  
Subphylum: Mastigophora  
Clase: Zoomastigophorea  
Orden: Diplomonadina  
Suborden: Diplomonadina  
Familia: Hexamitidae  
Género: *Giardia*  
Especie: *lamblia* (*duodenalis* o *intestinalis*)

### 2.1.2. Epidemiología

La infección por *G. lamblia* produce una patología denominada giardiasis o giardiosis la cual se encuentra entre las primeras diez parasitosis que afectan al hombre (Upcroft y Upcroft, 2001; Vázquez y Campos, 2009), y es una de las causas más comunes de diarrea en todo el mundo pero puede cursar de manera asintomática a la enfermedad aguda o crónica.

El hombre es el principal reservorio de *G. lamblia* pero se conocen diferentes reservorios animales que se infectan con esta especie y a su vez funcionan como transmisores (Adam, 2001; Rivera *et al.*, 2002; Wolfe, 1992).

### 2.1.2.1. Giardiosis en México

La giardiosis presenta una distribución mundial y la incidencia guarda relación estrecha con las condiciones sanitarias así como la higiene personal y nivel educativo; se calcula que en México hay casi 9 millones de personas parasitadas por *G. lamblia* (Vázquez y Campos, 2009), siendo los grupos más afectados los niños menores de 5 años. La prevalencia en México de la giardiosis oscila entre un 20-50 % y ocupa el tercer lugar de las parasitosis (SSA), pero el primer lugar como el parásito protozoario intestinal en humanos más común (Thompson, 2008). En el 2015 en el mes de noviembre, la Secretaria de Salud reporto 10,449 casos de giardiosis (Figura 1), y tan solo en el Distrito Federal se presentaron 662 casos, la mayor incidencia se presentó en los estados con climas cálidos y templados como Puebla, Estado de México, Oaxaca, Chiapas, San Luis Potosí, Veracruz, Tamaulipas, Sinaloa, Yucatán, Jalisco, Guerrero (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica 2015). Incidentalmente también es el parásito más común en animales domésticos como perros y gatos, que se infectan con los quistes de esta especie y que pueden funcionar como transmisores siendo por lo tanto un microorganismo cosmopolita (Adam, 2001; Thompson, 2008; Wolfe, 1992).

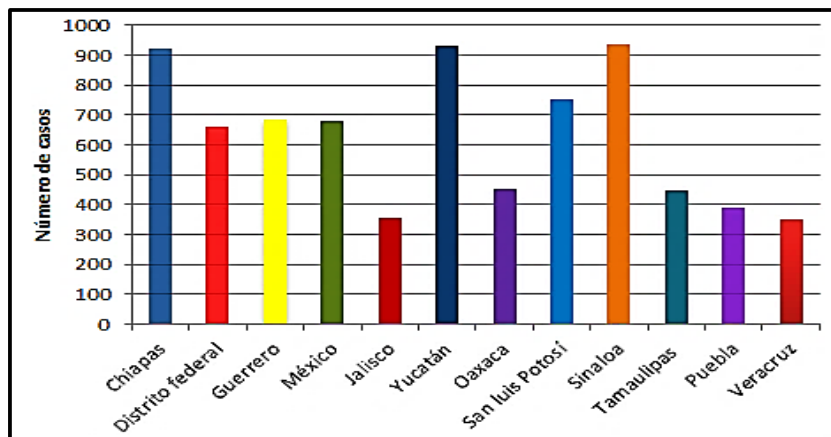


Figura 1. Incidencia del mes de Noviembre de 2015 de la giardiosis en México

Actualmente la Organización Mundial de la Salud reconoce a la giardiosis como una zoonosis aun cuando el tema sigue resultando controversial (Arévalo *et al.*, 2005, Fonte y Ali, 2010). El agua potable que proviene de ríos y lagos se puede encontrar expuesta a la defecación tanto de animales como de humanos, la filtración y la ebullición son los medios que normalmente se utilizan para la desinfección, así como la cloración que no es suficiente para inactivar quistes del protozooario *G. lamblia*, por lo que se está probando la ozonación como una alternativa (US EPA 1999a; Arévalo *et al.*, 2005).

En el agua para consumo humano *G. lamblia* se encuentra con mayor frecuencia, pero esto puede variar según la localidad, por lo que se debe dar un seguimiento si se presentan brotes hídricos, así como también importa qué tipo de animales o reservorios pueden estar transmitiendo la enfermedad (Smith *et al.*, 2006).

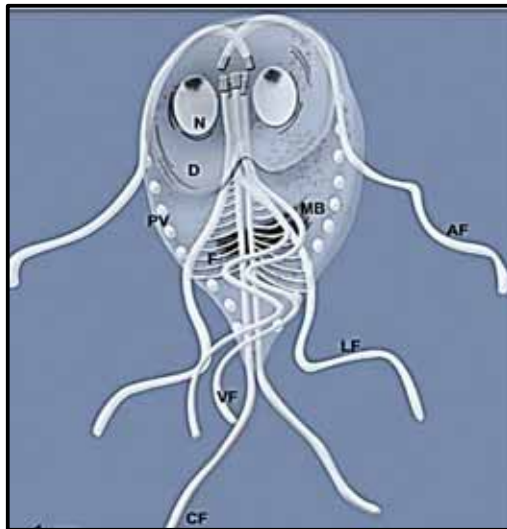
En un estudio de campo que realizaron en el valle de Juárez (México) Di Giovanni *et al.* en el 2006, observaron que las actividades de agricultura pueden ser un riesgo debido a que las ovejas que consumían el forraje que era regado con aguas residuales ya tratadas, transmitían la enfermedad a los humanos, por lo que el agua residual recuperada no es una garantía de que esté libre de quistes de *G. lamblia*.

### **2.1.3. Morfología de *G. lamblia***

Durante el ciclo de vida de *G. lamblia* se presentan dos fases: la de trofozoíto y la de quiste, las cuales sufren significativos cambios bioquímicos y morfológicos que les permiten sobrevivir en ambientes y condiciones como los mecanismos de defensa que el hospedador genera, que de otro modo los destruirían. Para sobrevivir fuera del intestino del hospedador los trofozoítos pasan a la fase de quiste, que se caracteriza por poseer una rígida pared glicoproteica externa que le permite sobrevivir incluso a los desinfectantes comunes, y condiciones ambientales hostiles como cambios de pH, humedad y de temperatura. Los trofozoítos son sensibles a los cambios de temperatura, humedad y a la presencia de agentes químicos (Luján, 2006).

### 2.1.3.1. Fase de trofozoíto

El trofozoíto es la fase patogénica, tiene forma de pera cortada, de gota o lagrimea con simetría bilateral cuya superficie dorsal es convexa y la superficie ventral es cóncava y miden de 10 a 15  $\mu\text{m}$  de largo y de 7 a 9  $\mu\text{m}$  de ancho (Vázquez y Campos, 2009), presenta un par de núcleos de forma esférica ovoides colocados en ambos lados de la línea superior del mismo tamaño con sus cariosomas. El citoesqueleto incluye un centro parabasal del cual salen los 4 pares de flagelos y uno o dos cuerpos medios (Figura 2) que se relacionan con la información genética que codifica para que se forme el disco ventral el cual es característico de *G. lamblia* al desenquistarse (Adam, 2001).



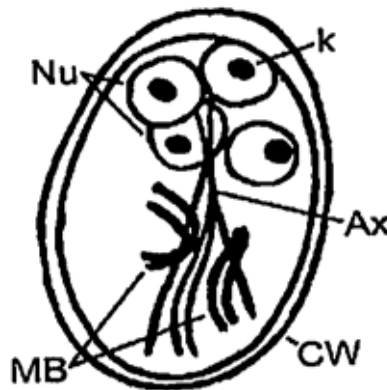
**Figura 2. Morfología del trofozoíto de *Giardia lamblia*, etapa replicativa en el intestino. (D)** disco ventral, **(N)** 2 núcleos, **(AF)** flagelos anteriores, **(LF)** flagelos posteriores, **(CF)** flagelos caudales, **(VF)** flagelos ventrales, **(MB)** cuerpos medios, que se ven transversalmente a los axonemas centrales, **(F)** microtúbulos que se conectan a los axonemas, **(PV)** vesículas periféricas (Luján y Svård, 2011).

### 2.1.3.2. Fase de quiste

Los metaquistes o quistes con cuatro núcleos corresponden a la etapa infectiva, son de forma redonda o elíptica, miden de 5 a 8  $\mu\text{m}$  de largo por 10  $\mu\text{m}$  de diámetro y presenta de dos a cuatro núcleos dependiendo de su fase de madurez (Figura 3) y son liberados al exterior con las heces, estos pueden permanecer viables por varios meses en lugares frescos y húmedos a una temperatura de 4 a

8 °C (Luján, 2006). La infección se propaga a un nuevo hospedero por la ingestión de alimentos o agua contaminados con los quistes, en agua fría pueden sobrevivir más de dos meses, se ha demostrado que los quistes son resistentes a las concentraciones de cloro que normalmente utilizan para desinfectar el agua (US EPA 1999a).

Se requiere la ingesta de más de 100 quistes para asegurar la infección en el humano (Luján, 2006). La enquistación se produce después de que los organismos han sido sometidos a la replicación del núcleo, pero antes de la citocinesis, por lo tanto los quistes presentan de dos a cuatro núcleos dependiendo de su madurez, están cubiertos por una pared que es de 0.3 a 0.5  $\mu\text{m}$  de espesor, la parte exterior de la pared del quiste está cubierta con una red de filamentos y una capa membranosa interior con dos membranas. En relación con la composición de carbohidratos se ha considerado como principal componente de la pared quística la N-acetilgalactosamina y N-acetilglucosamina, la quitina aunque en menor proporción también se encuentra presente (Adam, 2001; Bazán-Tejeda *et al.*, 2008).



**Figura 3. Morfología del quiste de *Giardia lamblia* (fase infectante).** Nu- 4 núcleos, Ax- axonema, K- Cariosoma, MB- 2 cuerpos medios, CW- Pared del quiste separada de la membrana celular.

### **2.1.3.2.1 Desenquistamiento**

*G. lamblia* presenta un ciclo de vida simple, el desenquistamiento *in vivo* fue descrito y reproducido en 1979 por Bingham y Meyer, bajo condiciones *in vitro*, el desenquistamiento se ha utilizado para determinar la viabilidad de los metaquistes así como para cuestiones epidemiológicas (Adam, 2001). El desenquistamiento necesita ser regulado para evitar la apertura del quiste en el estómago donde *Giardia* puede morir por el pH de los jugos gástricos, sin embargo *in vitro* es necesario utilizar un pH de 1.3 a 2.7 (Bingham y Meyer, 1979) o a 4 (Boucher y Gillin, 1990; Shayne *et al.*, 1990) para que el desenquistamiento sea un éxito.

El mecanismo molecular por el cual las señales son percibidas a través de la pared del quiste es aún desconocido. El proceso es rápido ya dura aproximadamente 2 horas. La técnica de desenquistamiento *in vitro* varía de un laboratorio a otro, ya que esto depende de la calidad del quiste y de su madurez (Lujan y Svärd, 2011; Ankarklev *et al.*, 2010).

Después de haber sido tratados los quistes bajo condiciones adecuadas para desenquistar, los trofozoítos salen a través de la ruptura de la pared del quiste, la división celular comienza alrededor de 30 minutos si las condiciones son las adecuadas, lo que resulta en dos trofozoítos binucleados (Luján y Svärd, 2011).

### **2.1.4. Viabilidad de *G. lamblia***

La viabilidad de los quistes de *G. lamblia* puede determinarse utilizando diferentes métodos; en 1979 Bingham *et al.* demostraron que la exclusión del colorante o su incorporación, así como el desenquistamiento *in vitro* son métodos que se pueden emplear para comprobar la viabilidad de estos quistes. Un factor que afecta la viabilidad es la temperatura ya que cuando se almacenan a 8 °C son viables hasta por 3 meses en agua, pero si estos se almacenan a 37 °C no llegan a sobrevivir más de 4 días.

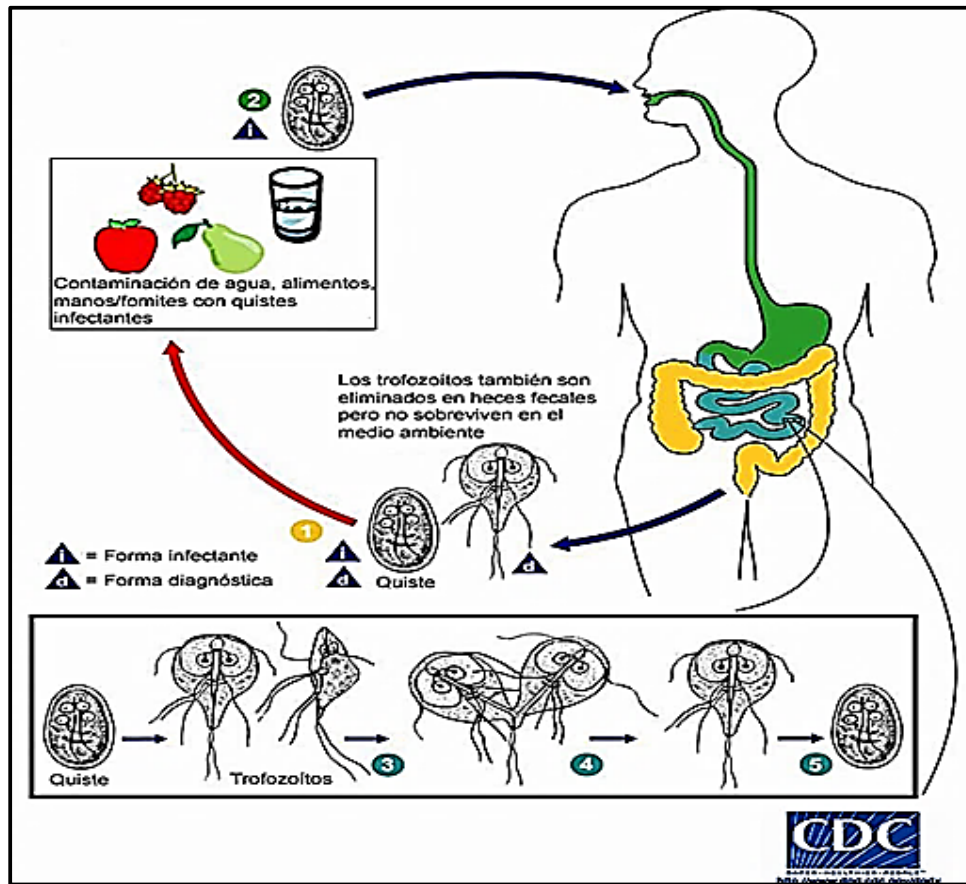
La infectividad de *Giardia* se ha probado utilizando modelos animales, y como modelo a *Giardia muris* después de la ozonización y se ha observado que se tiene una sensibilidad alta para detectar inactivaciones de quistes del 99.9% (Labatiuk *et al.*, 1992).

### **2.1.5. Ciclo de vida**

La infección por *G. lamblia* comienza con la ingestión de alimentos y agua contaminados con materia fecal que contiene los quistes. En el estómago tras el paso por el ambiente ácido (jugos gástricos con un pH de 1.3 a 2.7) y por la exposición a los contenidos del intestino delgado, se presentan el desenquistamiento y la liberación del trofozoíto, en respuesta a las señales del huésped en la parte inferior del intestino delgado, una vez libre el trofozoíto parasita el duodeno y el yeyuno tanto en el humano como en otros hospederos, en este sitio el pH es ligeramente alcalino (pH 7 y 8) y las secreciones pancreáticas y biliares son favorables para su establecimiento y división por fisión binaria; los trofozoítos se unen firmemente a la superficie de las células epiteliales mediante el disco ventral adhesivo y colonizan el intestino delgado o se pueden mover libremente en el lumen.

Algunos son arrastrados cuando se va el bolo alimenticio hacia el colon en donde comienzan a enquistarse como respuesta a la deshidratación del medio, detectando a su vez que hay una disminución del colesterol y sales biliares, durante la fase del enquistamiento los flagelos se retraen primero, después el citoplasma se condensa y los componentes de la pared del quiste se secretan, los quistes binucleados recién formados son excretados al medio a través en las heces como quistes infecciosos, tras una maduración se vuelven infectivos (tetranucleados o metaquistes) para otros hospederos, repitiéndose el ciclo de vida (Figura 4) (Adam, 2001).





**Figura 4. Ciclo de vida de *G. lamblia*.** (1) Los quistes son responsables de la transmisión de la giardiasis y pueden sobrevivir varios meses en el ambiente. La infección se inicia con la ingestión de quistes presentes en el agua contaminada, los alimentos, o por contaminación de manos o fómites. (2) En el intestino delgado, se presenta el desenquistamiento y se liberan los trofozoítos (cada quiste produce dos trofozoítos). (3) Los trofozoítos se multiplican por fisión longitudinal binaria en el lumen del intestino delgado donde pueden estar libres o adheridos a la mucosa por el disco ventral. (4) El enquistamiento durante el tránsito de los parásitos hacia el colon. (5) Los quistes son excretados en las heces y son infecciosos, por lo que la transmisión de persona a persona es posible (Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention 2004).

## 2.2. *Toxocara canis* y toxocariosis

Los helmintos son gusanos planos o redondos, pluricelulares, invertebrados, tamaño variable (mm-m), sin apéndices articulados pero sí presentan órganos de fijación, presentan pared corporal, carecen de aparato respiratorio y circulatorio, pueden ser hermafroditas o ser dimórficos.

Se dividen en dos phylum: el filo Nematoda y el filo Platyhelminthes. Los nemátodos son gusanos cilíndricos que abarcan un gran número de parásitos humanos; como órganos de fijación pueden presentar dientes o placas cortantes, tubo digestivo completo, dimorfismo sexual. Los huevos de helmintos tienen una longitud que varía entre 18 a 150  $\mu\text{m}$ , y un diámetro que varía de 12 a 14  $\mu\text{m}$  en los más pequeños, y hasta 90  $\mu\text{m}$  en los más grandes. La forma de los huevos puede ser esférica o alargada (Calderón, 2004).

Las geohelmintosis son el conjunto de parasitosis helmínticas en las que los huevos de helmintos parásitos son expulsados con las heces, estos huevos no se encuentran embrionados y para que se puedan desarrollar y ser infectivos necesitan permanecer en el suelo húmedo aproximadamente de 7 a 14 días, aunque esto puede variar (Gallegos-Berenguer, 1997).

*Toxocara canis* es un nemátodo parásito de vertebrados que pertenece al orden Ascaridia, es el agente causal de la toxocariosis que es una zoonosis, la cual entre las enfermedades parasitarias es una de las importantes dentro de la población a nivel mundial. Es una geohelmintiasis de animales de importancia en la salud pública (Anderson, 2000).

La toxocariosis es una enfermedad común en los perros, la fase adulta de este parásito, afecta principalmente a los cachorros de pocas semanas a tres meses, los cuales son los más susceptibles, y se alojan principalmente en su intestino en donde las hembras adultas de estos parásitos son muy fecundas, ya que producen miles de huevos 200,000 al día. Esta puede ser una razón por la que su prevalencia es alta. Además de los perros, *T. canis* es capaz de infectar a una gran variedad de hospederos paraténicos como roedores (ratas, cobayos, ratones), rumiantes, conejos, aves de crianza (palomas y pollos), animales silvestres como coyotes, zorras, lobos; insectos como las cucarachas, lombrices, cerdos y el hombre (Quiroz, 1997; Archelli y Kozubsky, 2008). La enfermedad en el hombre se manifiesta en dos formas denominadas larva migrans visceral (LMV) y la larva migrans ocular (LMO). Su alta incidencia se da especialmente en los lugares donde no se tiene un control adecuado de los parasitosis de la población canina, principalmente la población callejera (Martínez-Barbosa *et al.*, 1998; Botero y Restrepo, 2003).

### 2.2.1. Clasificación taxonómica

De la Fe-Rodríguez *et al.*, (2006) reportan la siguiente clasificación taxonómica de *T. canis*:

Reino: Animalia  
Phylum: Nematelminthes  
Clase: Cecermentea  
Subclase: Rhabditia  
Orden: Ascaridida  
Superfamilia: Ascaridoidea  
Familia: Toxocaridae  
Género: Toxocara  
Especie: Canis

### 2.2.2. Epidemiología

La diseminación y sobrevivencia de huevos de helminto en el ambiente no solamente incluye la ruta fecal, sino que también hay que entender el papel importante que juegan las aguas residuales (Botero y Restrepo, 2003).

La infección en humanos está ampliamente documentada en todo el mundo con niveles variados de prevalencia desde 2.6% en Inglaterra hasta 81.5% en Nepal. La infección afecta la calidad de vida del humano y causa problemas respiratorios, hepáticos o neurológicos crónicos y si se adquiere durante la infancia las alteraciones continuarán por el resto de la vida (Macpherson, 2013).

En el hombre la toxocariosis se adquiere por vía oral, una de ellas puede ser la vía directa o geofagia que es el hábito de ingerir tierra por carencia de hierro, y es frecuente en niños, mujeres embarazadas, mientras que la vía oral indirecta implica consumir frutas y verduras contaminadas, o por la ingesta de huevos infectivos (Archelli y Kozubsky, 2008). Los huevos no solo se dispersan a través de las heces de los cachorros en el suelo, también se ha demostrado que el 95% de los cachorros pueden albergar huevos en el pelo en cantidades considerables a las encontradas en el suelo (Roddie *et al.*, 2008).

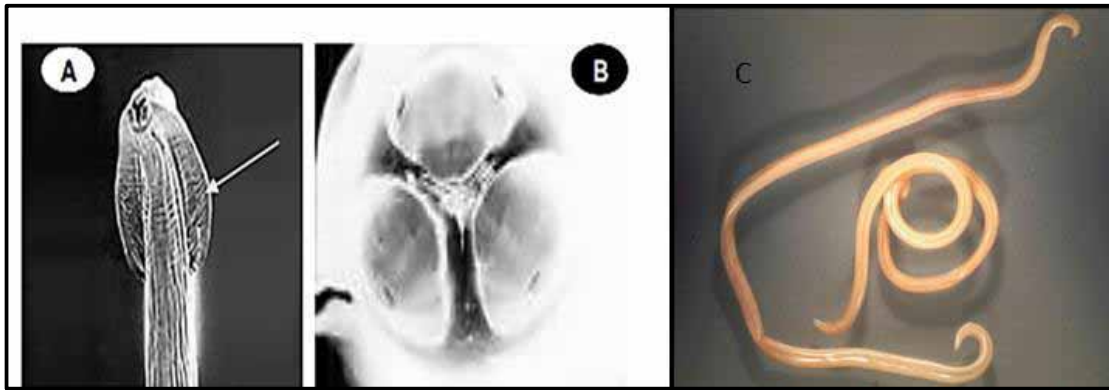
La toxocariosis se presenta casi exclusivamente en niños menores de 10 años, aunque también puede presentarse en adultos, la mayoría de los casos se da por la deficiencia de saneamiento en las viviendas y mala higiene personal, la prevalencia de este síndrome es difícil de establecer por la dificultad de un diagnóstico seguro. La parasitosis es cosmopolita en los perros y presenta frecuencias muy variables de acuerdo a las regiones y a la metodología utilizada (Botero y Restrepo, 2003).

En la ciudad de México se realizó un estudio en donde se encontró que entre los nemátodos encontrados, *T. canis* tuvo un prevalencia de 13.3% en perros callejeros principalmente jóvenes, contribuyendo en la contaminación ambiental al no estar desparasitados (Eguia *et al.*, 2005).

La toxocariosis intestinal está ampliamente difundida y existen muchos estudios nacionales e internacionales en donde se observan variaciones muy importantes de prevalencia que van de 2.9% en Holanda a 79.9% en Japón, en tanto que en México los valores oscilan desde 5% en Monterrey a 100% en el CDMX (Macpherson, 2013).

### **2.2.3. Morfología de *Toxocara canis***

*T. canis* es un gusano dioico en el cual se observan tres regiones una anterior donde se encuentra la boca y el anillo nervioso, una media donde se encuentra el intestino y una posterior donde se localizan las gónadas y la cloaca, en la parte anterior se encuentran las aletas cefálicas (Toxon, arco) que es lo característico del género para fines diagnósticos, en la boca se observa la presencia de tres labios bien desarrollados (Figura 5), el extremo posterior de la hembra termina en punta, en el macho termina curvado hacia la parte ventral observándose también la papila caudal. Las hembras miden 18 cm y los machos 10 cm, para fines diagnósticos de género se observan la ornamentación de la cutícula y las espículas desiguales (Lamothe-Argumedo y García-Prieto, 1988).



**Figura 5. Morfología de *Toxocara canis*.** En la (A) se observa la parte anterior del nemátodo adulto con las aletas cefálicas (flecha), mientras que en la (B) se observan los tres labios, (C) adultos machos y hembras. (Collage of Veterinary Medicine, University of Georgia, 2007).

#### 2.2.4. Ciclo biológico

La toxocariosis comprende cuatro mecanismos de transmisión: ingestión de huevos, transplacentaria, transmamaria y por ingestión de hospederos paraténicos los cuales alojan larvas enquistadas en sus tejidos.

**Ingestión de huevos:** Los cachorros menores a tres meses de edad son los hospederos definitivos en donde los adultos de *T. canis* se alojan en el intestino. Cuando los cachorros ingieren huevos embrionados con la fase J2 estos eclosionan en el intestino, atraviesan la pared intestinal llegan al hígado y por medio del sistema portal llegan al corazón. Por medio de la circulación menor llegan a los pulmones y migran hacia la tráquea, es en esta región donde mudan a J3 y son deglutidas. En el estómago mudan al estadio J4 y en el intestino delgado se alojan hasta desarrollar su fase adulta, cuando son sexualmente maduros, las hembras liberan grandes cantidades de huevos inmaduros (200,000 huevos/día/hembra) los cuales son liberados al ambiente a través de las heces. El potencial biótico no solo repercute en la salud de estos animales, sino que también se convierte en un grave problema de salud pública, especialmente en los lugares donde no se tiene un control adecuado de las parasitosis en la población canina, principalmente la callejera.

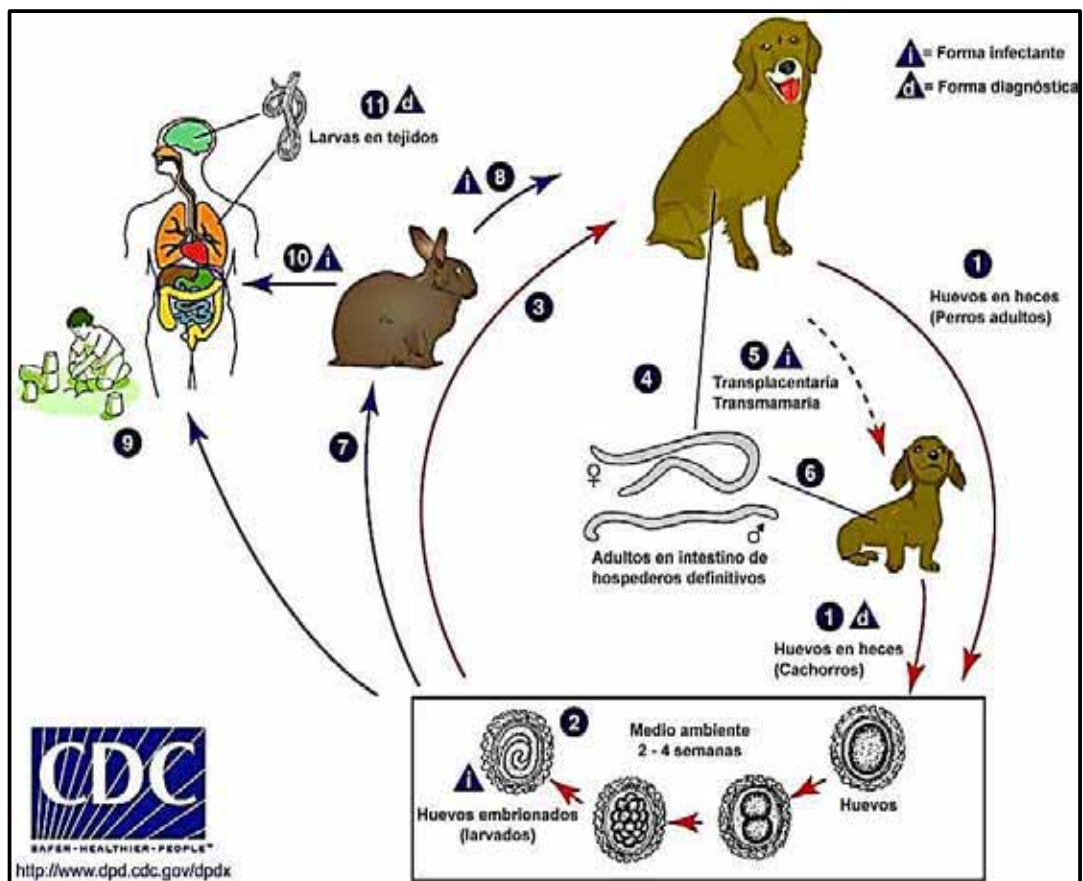
Los huevos inmaduros requieren de un período de 28 días para formar la fase infectiva J2, la presencia de los adultos en el intestino de los cachorros causa, además de lesiones en vísceras, irritación y obstrucción intestinal y, en infestaciones masivas puede ocasionar la muerte de estos animales (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

**Trasmisión por hospederos paraténicos:** Otro modo adicional de infestación es el que se realiza debido a los hábitos depredadores del hospedero canino. Los huevos infectantes ingeridos por roedores, producen larvas de segundo estadio, que se alojan en diferentes tejidos y órganos de estos hospederos paraténicos. Tales larvas prosiguen su desarrollo cuando el roedor es ingerido por un carnívoro, y el parásito alcanza, sin migración, el estado adulto en el intestino. En perros adultos la migración es diferente, las larvas se pueden desarrollar en huéspedes paraténicos, en los que se incluye al hombre, cuando las larvas llegan a los pulmones no pasan a la tráquea para ser deglutidas sino que pasan a riñones, útero, cerebro, músculo esquelético permaneciendo en estado inactivo en la fase J2 (Roberts *et al.*, 2005).

En el hombre la infección ocurre cuando ingiere alimentos contaminados con huevos embrionados, eclosionando estos en el intestino, liberándose larvas del segundo estadio J2, y no pueden completar su ciclo de desarrollo, pero mantienen un metabolismo activo, mostrando un comportamiento migratorio regularmente hacia músculo esquelético y tejido nervioso. Sin embargo, la respuesta inmunológica que se genera impide que se complete su migración hacia otras partes del cuerpo y estas larvas son encapsuladas, formándose un granuloma eosinofílico en cualquiera de los órganos donde se encuentre principalmente ojos, hígado, pulmones, cerebro.

Su recorrido por el cuerpo en esta fase conduce al estado clínico conocido como *larva migrans visceral* y *larva migrans ocular* (Lamothe-Argumedo y García-Prieto, 1988).

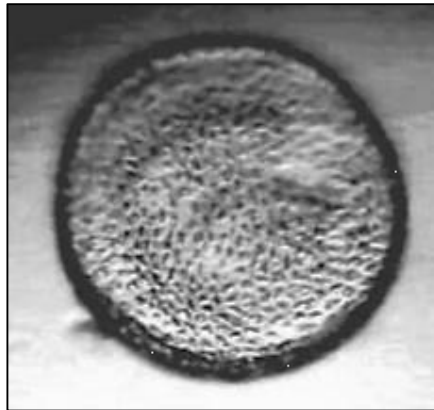
**Transplacentaria y trasmamaria:** Las perras cuando se encuentran preñadas presentan una infección prenatal, estas abandonan los tejidos selectivamente a los 42 o 43 días de la gestación probablemente bajo influencia hormonal, como la prolactina, hidrocortisona y oxitocina, se alojan larvas de segundo estadio J2 permaneciendo en tejidos y se dirigen hacia la placenta por el cordón umbilical penetrando al feto o migran hacia las glándulas mamarias, después se desarrollan por completo en los cachorros, presentado estos al sexto día de nacidos larvas J4 en el intestino (Figura 6).



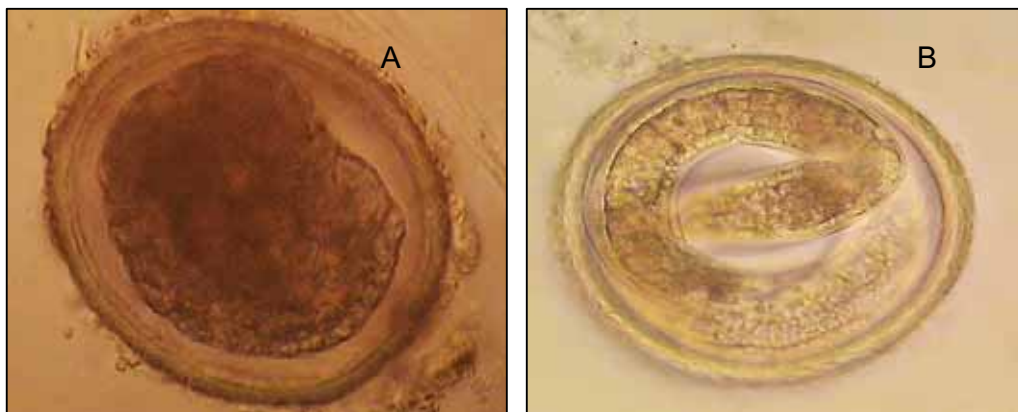
**Figura 6. Ciclo biológico de *T. canis*.** (Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention, 2004).

### 2.2.5. Morfología del huevo de *Toxocara canis*

Los huevos de *T. canis* tienen una cubierta gruesa la cual le da la resistencia ante las condiciones ambientales de tipo químico, mecánico y térmico, son subsféricos, con hoyuelos llamados fosetas en su superficie que los asemeja a una pelota de golf, miden de 80 a 85  $\mu\text{m}$  por 75  $\mu\text{m}$  (Figuras 7 y 8).



**Figura 7. Huevo de *T. canis* donde se observan las fosetas,** observación a 40x en microscopio óptico (Fuente: elaboración propia).

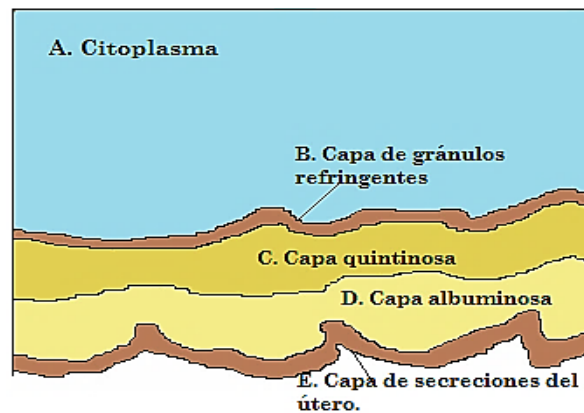


**Figura 8. Huevos de *T. canis*.** (A) Huevo no embrionado eliminado en heces de perro. (B) Huevo embrionado larvado. Observación a 40x en microscopio óptico (Fuente: elaboración propia).



El huevo está formado por cuatro capas, tres de las cuales forman al huevo y una cuarta formada por las secreciones que adquiere al salir del útero, dándole esta última resistencia al huevo. El material secretado de la pared del útero se adhiere a la superficie externa del huevo, mientras el huevo permanezca en el útero, se mantiene un aspecto albuminoso e incoloro, pero cuando entra en contacto con la bilis en el flujo del contenido intestinal del hospedero, esta capa se endurece y adquiere una coloración pardo-amarillenta (Chester *et al.*, 1986).

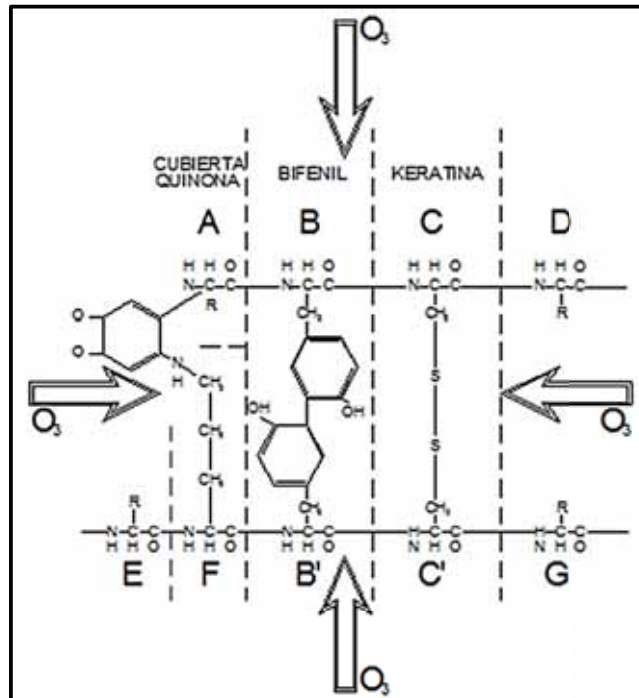
El orden sucesivo de las capas que conforman a los huevos de *T. canis* de afuera hacia adentro es el siguiente: la primera capa está formada secreciones del útero por arriba de esta se encuentra una segunda capa formada de albumina, la tercer capa está formada de quitina (mecánicamente rígida) por arriba de esta se encuentra una cuarta capa formada de lípidos que se observan como gránulos refringentes que salen del citoplasma, la cual es resistente a la desecación, a la penetración de sustancias polares y responsables de la extrema impermeabilidad (Figura 9).



**Figura 9.** Capas que componen al huevo de *Toxocara canis* (Chester *et al.*, 1986).

Por cromatografía de capa fina se han identificado los siguientes aminoácidos componentes de la estructura química general de la cubierta externa de los nematodos como *T. canis*: lisina, arginina, ácido glutámico, serina, glicina, cistina, ácido aspártico, treonina, alanina, valina, tirosina, leucina, isoleucina, triptofano, fenilalanina y prolina. A, B, C y D representan una proteína, E, F, B', C' y G otra.

El aminoácido N-terminal de la proteína A, está ligado a una o-quinona, la cual también está ligada a un residuo lisil de la proteína F (Smyth y Mc Manus, 1989).



**Figura 10.** Estructura química de la pared externa de un nemátodo (Smyth y Mc Manus, 1989).

Cuando están protegidos de la luz solar directa y la desecación, los huevos se desarrollan hasta alcanzar el estadio infeccioso en unas tres semanas a temperaturas estivales y persisten en el suelo muchos meses. Debido a la acción de las lluvias, es posible que los huevos se transporten a lugares bastante distantes alcanzando grandes concentraciones en algunos puntos (Chester *et al.*, 1986).

### 2.2.6. Huevos de helmintos en aguas residuales

La diseminación y sobrevivencia de HH en el ambiente no solamente incluyen la ruta fecal, sino que también hay que entender el papel importante que juegan las aguas residuales.

Existe una gran diversidad de HH que tienen importancia sanitaria, recuperados de aguas residuales y lodos que afectan a los humanos y animales, entre los helmintos importantes encontrados está *T. canis*, los cuales pueden eliminarse del agua pero el problema se transfiere a los lodos, lo que implica una problemática en particular. Los HH presentan mayor resistencia a ser eliminados, lo que ha propiciado que se busquen nuevos métodos de inactivación y así tener alternativas diferentes de los métodos tradicionales (Jiménez, 2007; Bouhoum *et al.*, 2000; Makni, 2001).

### **2.3. Procesos de oxidación avanzada**

Las actividades de desinfección son consideradas como los mecanismos principales en la desactivación o destrucción de los organismos patógenos para prevenir la dispersión de enfermedades transmitidas a través del agua tanto a los usuarios como al ambiente. Es muy importante que las aguas residuales sean tratadas adecuadamente antes de realizarse los procesos de desinfección para que la acción de cualquier desinfectante sea eficaz (US EPA, 1999a).

Los procesos biológicos convencionales en el tratamiento de aguas en algunos casos no producen buenos resultados para la eliminación de contaminantes o no se logra alcanzar el grado requerido bajo norma (García *et al.*, 2011).

En la práctica para la aplicación de los métodos de tratamiento se debe tener en cuenta fundamentalmente la naturaleza y las propiedades fisicoquímicas de las aguas o efluentes a tratar, las aguas contaminadas por la actividad humana pueden en general ser procesadas eficientemente por plantas de tratamientos químicos convencionales como la ozonización; sin embargo en estos casos y cada vez más se está recurriendo al uso de las llamadas tecnologías o procesos de oxidación avanzada, muy poco aplicados y peor aún menos difundidos (Doménech *et al.*, 2002).

Es por esta razón que la aplicación de un proceso de oxidación avanzada (POA) como un pretratamiento o post-tratamiento puede ser una alternativa. Los POA estos son reconocidos por presentar una alta eficiencia en su aplicación ya que se logra degradar una gran variedad de contaminantes, cualquier proceso de

oxidación en el cual las especies dominantes sean los radicales hidroxilo es definido como un proceso de oxidación avanzada (Müller y Jekel, 2001; Tang, 2004), los cuales presentan un potencial de oxidación de 2.8 V, son de vida corta, y son agentes oxidantes extremadamente potentes (Acero y Von, 2001; García *et al.*, 2011).

En los métodos convencionales de tratamiento de aguas residuales se acentúa la reducción o la eliminación de la demanda bioquímica de oxígeno y de los sólidos en suspensión, en tanto que en el tratamiento orientado para el aprovechamiento del agua se exige la eliminación de agentes patógenos, operación para la cual no son muy eficaces los métodos convencionales. En la potabilización de agua, la problemática es similar ya que éstos patógenos resisten a otros desinfectantes como el cloro (Mara y Cairncross, 1989; Camel y Berman, 1998). En el caso de los protozoarios se han aplicado dosis de cloro de hasta 80 mg/L por 120 minutos, resultando costoso para tratar sus quistes (US EPA, 1999a), por lo que es importante la aplicación de estas nuevas tecnologías en la desinfección para garantizar una calidad óptima del agua. La mayoría de los procesos de oxidación avanzada pueden aplicarse a la desinfección inactivando virus, bacterias, helmintos y protozoarios, detoxificación y remediación de aguas especiales generalmente a pequeña y mediana escala (Mara y Cairncross, 1989).

El uso de procesos de oxidación avanzada (POA) para eliminar los contaminantes en diversas aplicaciones de tratamiento de agua ha sido objeto de estudio durante unos 30 años, las mezclas más comunes de oxidación avanzada incluyen el reactivo de Fenton, ozono/peróxido de hidrógeno ( $O_3/H_2O_2$ ), ozono/luz ultravioleta ( $O_3/UV$ ),  $O_3$ /catalizador sólido, peróxido de hidrógeno/magnesio ( $H_2O_2/Mg^{2+}$ ), peróxido de hidrógeno/luz ultravioleta ( $H_2O_2/UV$ ), foto asistida con Fenton,  $H_2O_2$ /catalizador sólido, peróxido de hidrógeno/hipoclorito de sodio ( $H_2O_2/NaClO$ ), Óxido de titanio/luz ultravioleta ( $TiO_2/UV$ ), se han investigado para saber el efecto que tienen sobre los contaminantes y conocer así su actividad (Suty *et al.*, 2004; Tang 2004). Los procesos de oxidación avanzada se enlistan en la tabla 1.

**Tabla 1.** Procesos de oxidación avanzada.

<ul style="list-style-type: none"><li>• Ozonificación en medio alcalino (O<sub>3</sub>/OH)</li><li>• Ozonificación con peróxido de hidrógeno</li><li>• Procesos Fenton (Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)</li><li>• Oxidación electroquímica</li><li>• Radiólisis y tratamiento con haces de electrones</li><li>• Plasma no térmico</li><li>• Descarga electrohidráulica-ultrasonido</li><li>• Oxidación en agua a condiciones sub/ y supercrítica de presión y temperatura.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Procesos fotoquímicos<ul style="list-style-type: none"><li>-Fotólisis del agua en el ultravioleta de vacío (UVV)</li><li>-UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></li><li>-UV/O<sub>3</sub></li><li>.Foto Fenton</li><li>-Fotocatálisis heterogénea</li></ul></li></ul>
--	---

Fuente: Doménech *et al.*, 2002.

### **Ventajas de estas nuevas tecnologías sobre los métodos convencionales**

- Generan lodos que a su vez requieren de un proceso de tratamiento y/o disposición.
- Se consigue la mineralización completa o destrucción del contaminante. En cambio, las tecnologías convencionales, que no emplean especies oxidantes, no alcanzan a oxidar completamente la materia orgánica.
- No se forman subproductos de reacción o se forman en baja concentración.
- Son ideales para disminuir la concentración de compuestos formados por pretratamientos alternativos, como la desinfección en donde se usa cloro.
- En muchos casos, consumen mucho menos energía que otros métodos por ejemplo, la incineración.
- Eliminan efectos sobre la salud de desinfectantes y oxidantes residuales como el cloro.
- Los POA se usan principalmente como pretratamientos antes de un tratamiento biológico para contaminantes resistentes a la biodegradación o como proceso de post-tratamiento para efectuar un pulido de las aguas antes de la descarga a los cuerpos receptores.

Estas técnicas, deben su eficiencia a los procesos involucrados que poseen una mayor factibilidad termodinámica y una velocidad de oxidación muy incrementada por la participación de radicales, principalmente el radical hidroxilo (OH•), esta especie posee propiedades que lo hace capaz de atacar virtualmente a todos los compuestos orgánicos y reaccionar de  $10^6$  a  $10^{12}$  veces más rápido que oxidantes alternativos como el  $O_3$ . En la tabla 2, se presentan los potenciales de oxidación de distintas especies y se muestra que después del flúor el radical hidroxilo es el oxidante más energético (Doménech *et al.*, 2002).

**Tabla 2.** Potencial de óxido-reducción de algunos agentes oxidantes.

Especie	Potencial en volts (E°) A 25 °C
Flúor	3.03
Radical hidroxilo	2.80
Oxígeno atómico	2.42
Ozono	2.07
Peróxido de hidrógeno	1.78
Radical perhidroxilo	1.70
Permanganato	1.68
Dióxido de cloro	1.57
Ácido hipocloroso	1.49
Cloro	1.36
Bromo	1.09
Yodo	0.54

Fuente: Doménech *et al.*, 2002.

### 2.3.1. Peróxido de hidrógeno

Thenard (citado en Tang, 2004), identificó el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) como un compuesto químico en 1818 y ha estado disponible de manera comercial en soluciones acuosas desde mediados del siglo XIX. Este compuesto tiene un enlace covalente oxígeno-oxígeno y dos enlaces covalentes hidrógeno-oxígeno, sus propiedades oxidativas se originan a partir de estos enlaces. Es a temperatura y presión ambiental un líquido altamente polar, fuertemente enlazado con el hidrógeno (como el caso del agua). En estado puro, es un líquido denso y claro y tiene un sabor amargo, su punto de congelación es de  $-0.43$  °C y su punto de ebullición es de  $15.2$  °C a 1 atm de presión. Su uso comercial es en solución acuosa por lo tanto la constante de velocidad de reacción es más importante que la del compuesto puro, en general el  $H_2O_2$  como reactivo es fácil de manejar y

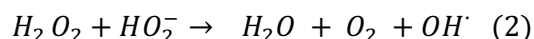
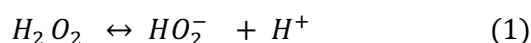
seguro, es común que ya se use en el tratamiento de contaminantes en aguas potables municipales, aguas residuales y efluentes gaseosos (Tang, 2004).

El peróxido de hidrógeno es un fuerte oxidante con un potencial de oxidación estándar que va desde 1.8 a 0.87 V, oxida un gran número de compuestos orgánicos e inorgánicos, los mecanismos de reacción de estas oxidaciones varían según el compuesto, los tipos de catalizadores usados y otros condicionantes de la reacción. Ha sido aplicado para oxidar sulfuros, nitritos, cianuros, hipocloritos y cloro en aguas residuales (Tang, 2004).

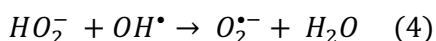
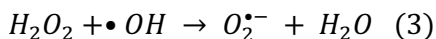
### 2.3.1.1. Reacciones en la disociación del peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno produce radicales según las condiciones en que se encuentre en las reacciones.

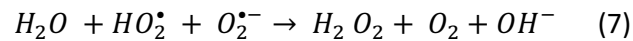
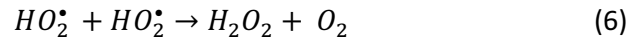
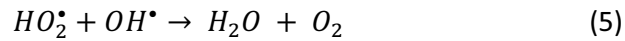
A continuación se presenta la reacción reversible de la disociación del peróxido de hidrógeno, la cual genera el anión perhidroxilo (1), el cual reacciona nuevamente con una molécula de peróxido de hidrógeno, dando como productos agua, oxígeno y un radical hidroxilo (2).



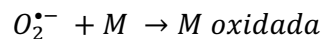
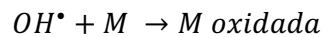
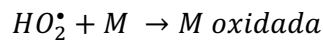
Con la generación del primer radical hidroxilo, debido a su alta reactividad se da lugar a una serie de reacciones en las que se generan mayor número de radicales, en los cuales además del radical hidroxilo ( $OH^\bullet$ ) se encuentran el radical perhidroxilo ( $HO_2^\bullet$ ) y el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ).



Las siguientes reacciones involucran la recombinación de radicales, dando lugar a compuestos más estables como  $H_2O$ ,  $O_2$  y el compuesto inicial  $H_2O_2$ .



Los radicales libres, pueden seguir el camino descrito anteriormente pero en presencia de otros compuestos como materia orgánica, también reaccionan con está dando lugar a procesos oxidativos como se muestra en las siguientes reacciones:



### 2.3.2. El peróxido de hidrógeno como un desinfectante

El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) es un oxidante eficaz, capaz de inactivar virus, bacterias y protozoarios. Tiene un fuerte poder desinfectante porque forma radicales hidroxilos que son el segundo oxidante más fuerte después del flúor. A concentraciones superiores al 20% es corrosivo y comburente. Puede destruir esporas, su efectividad permanece inalterable ante la presencia de materia orgánica y en bajas temperaturas. Cuando se aplica en aguas residuales desactiva coliformes fecales con una reducción de 2 unidades log durante 20 minutos (en efluentes de tratamiento biológico); pero el peróxido de hidrógeno se ve afectado por el pH en medios con valores de 7 y 8 por lo que sus características de desinfectante decrecen (Lazarova *et al.*, 1998). Es excelente fuente de oxígeno, radicales superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ) y radicales hidroxilo los cuales son altamente reactivos y muy tóxicos para los microorganismos (Labas *et al.*, 2008).



### 2.3.3. Ozono

El ozono (O<sub>3</sub>) es una forma alotrópica del oxígeno, se encuentra en estado gaseoso a temperatura ambiente, es incoloro y con olor acre penetrante, es tóxico, altamente corrosivo, fuerte oxidante, su potencial de oxidación es de 2.07 V. se estima que 50 ppm por 30 minutos puede ser letal (Gottschalk, 2000).

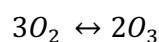
#### 2.3.3.1. Producción de ozono

El ozono se produce cuando las moléculas de oxígeno (O<sub>2</sub>) son disociadas por medio de una fuente de energía produciendo átomos de oxígeno que posteriormente chocan con una molécula de oxígeno para formar una molécula inestable, el ozono (O<sub>3</sub>). El método de descarga eléctrica es la fuente de energía más comúnmente utilizada para la producción de ozono.

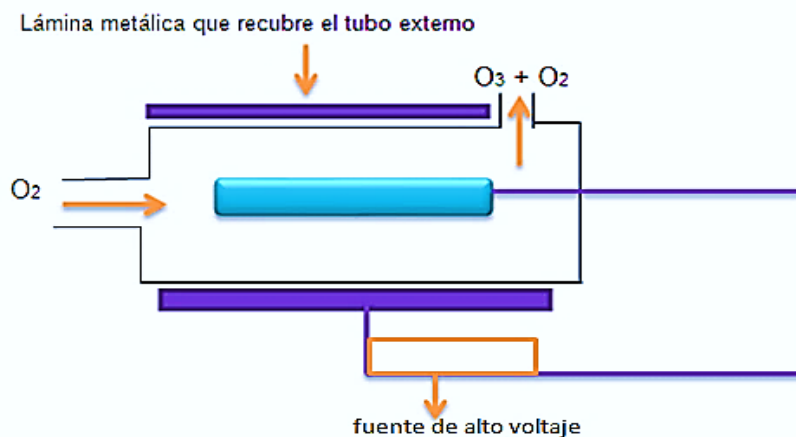
El aire o el oxígeno puro se utilizan como gas de alimentación, el cual es transmitido al generador de ozono a un flujo estable. La corriente de gas generada con el aire contiene cerca del 0.5 a 3% de ozono en peso, mientras que, con el oxígeno puro genera aproximadamente de 2 a 4 veces esa concentración (US EPA, 1999a).

El uso más generalizado del ozono se da en la desinfección del agua potable, sin embargo, en los últimos años han aumentado las investigaciones sobre la aplicación de ozono para la desinfección de aguas residuales (US EPA, 1999a).

Dado que el ozono es una molécula inestable, debe ser generado en el momento que se va a aplicar para su uso en el tratamiento de agua, está formado generalmente por la combinación de un átomo de oxígeno con una molécula de oxígeno:



El ozono puede ser producido utilizando oxígeno puro o aire, puede estar en forma gaseosa o directamente en forma de solución por procesos electroquímicos. La descarga de corona, también conocido como descarga eléctrica silenciosa, consiste en hacer pasar un gas que contiene oxígeno a través de dos electrodos separados por un dieléctrico y un espacio de descarga. El voltaje se aplica a los electrodos, causando un flujo de electrones a través del espacio de descarga. Estos electrones proporcionan la energía para disociar las moléculas de oxígeno, dando lugar a la formación de ozono (Figura 10).



**Figura 11. Esquema representativo de un generador de ozono.** El oxígeno o aire pasa a través de dos placas dieléctricas provocando que se disocien las moléculas de oxígeno para que posteriormente se forme el ozono (Modificado de US EPA, 1999b).

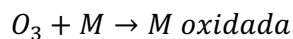
Los radicales hidroxilo son los principales oxidantes formados en la descomposición del ozono en el agua, esto se puede demostrar midiendo las velocidades relativas a las que se consumen los diferentes sustratos y se pueden comparar con las constantes de velocidad de la reacción conocidas, por lo que la velocidad de descomposición del ozono es una función compleja en la que influye la temperatura y el pH (Hoigné y Bader, 1979).

### 2.3.3.2. Mecanismo de reacción del ozono

El ozono reacciona con las sustancias en dos diferentes maneras, de forma directa y de forma indirecta. Estas dos formas generan diferentes productos de la

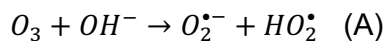
reacción y son controlados por diferentes tipos de cinéticas (Gottschalk *et al.*, 2000).

La reacción directa implica que el ozono reacciona directamente con el material a oxidar:

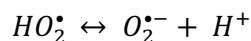


La reacción indirecta, implica la formación de radicales libres. El primer paso del decaimiento del ozono, acelerado por iniciadores de la reacción como los iones  $OH^-$  para formar oxidante secundarios como los radicales  $OH^\bullet$ .

La reacción entre el  $OH^-$  y el ozono producen la formación de un anión radical superóxido  $O_2^{\bullet-}$  y un radical perhidroxilo  $HO_2^\bullet$

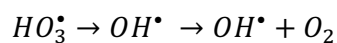
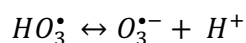
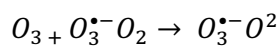


El radical perhidroxilo se encuentra en equilibrio ácido – base.

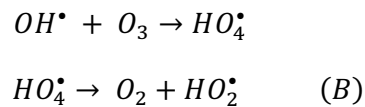


### **Cadena de radicales.**

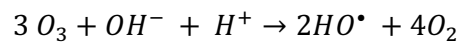
El anión radical ozono ( $O_3^\bullet$ ) formado en la reacción entre el ozono y el anión radical superóxido descompuesto inmediatamente en un radical hidroxilo.



Este radical  $\text{OH}^\bullet$  puede reaccionar con ozono, según se ve a continuación:



La combinación de las ecuaciones A y B demuestran que tres moléculas de ozono producen dos  $\text{OH}^\bullet$



#### 2.3.4. El ozono como un desinfectante

En la década de los 70s el descubrimiento de los trihalometanos (THM) en el agua debido a procesos de cloración hizo que se desarrollaran distintas líneas de investigación para evitar la formación de estos productos. Estas investigaciones llevaron a la utilización del ozono como agente oxidante para la desinfección de aguas potables.

La aplicación de la ozonización es un método de desinfección de aguas potables que se está aplicando ya en la actualidad, pero no es un método solamente aplicable a aguas potables sino que también se puede aplicar como desinfección de aguas residuales (Osorio *et al.*, 2010).

Existen varias ventajas de utilizar el ozono, es más efectivo que el cloro para eliminar las bacterias y virus en un menor tiempo de contacto, además es efectivo contra los parásitos resistentes al cloro como el protozoario *G. lamblia*.

Para comparar la efectividad de diferentes desinfectantes se suele usar el factor CT que es la concentración del desinfectante multiplicada por tiempo ( $\text{mg/L} \cdot \text{min}$ ) para alcanzar un determinado nivel de inactivación del microorganismo que ha sido expuesto bajo condiciones definidas, valores bajos de CT indican mayor eficacia del desinfectante (Rodríguez, 2007). En la tabla 3 se muestra la capacidad de algunos desinfectantes:

**Tabla 3.** Capacidad desinfectante de los distintos agentes químicos.

Compuesto	General	Bacterias	Virus	Quistes
Ozono	++++	++++	+++	++
Cloro/hipoclorito	+++	++++	++	+
Dióxido de cloro	+++	++++	++	+
Permanganato	++	+++	++	-

++++ Muy buena    +++ Buena    ++ Regular    + Escaso    - Nulo Fuente: Doménech, 2004

Además la eficiencia de la desinfección por ozono no es afectada por el pH. El ozono tiene una vida corta y se descompone en moléculas menos reactivas y efectivas, además se consume rápidamente por lo que no queda ozono residual que nos garantice que habrá una desinfección y no puede prevenirse una reproducción microbiana (US EPA 1999a). Los compuestos del cloro reaccionan con un sin fin de compuestos presentes en el agua (Tabla 4) como los aminoácidos, amoníaco, materia orgánica, hierro, manganeso y otros, el ozono no produce sólidos disueltos como ocurre cuando se lleva a cabo la cloración (Hoigné, 1998; Doménech, 2004).

**Tabla 4.** Comparación de la formación de subproductos con distintos desinfectantes.

Compuesto	Formación de THM*	Formación de otros subproductos
Ozono	Nula	Media
Cloro	Alta	Media- Alta
Dióxido de Cloro	Nula	Media-Alta

\*Trihalometanos

Fuente: Modificado de Doménech, 2004.

Los únicos subproductos regulados de la ozonización son los iones bromato, los cuales se forman cuando las aguas de abasto tienen determinada concentración de iones bromuro, y su formación puede ser controlada. Actualmente se analizan nuevos requerimientos de CT, para diseñar sistemas de ozonación de aguas considerando la inactivación de protozoarios, teniendo como objetivo también la reducción de costos y un mayor control de iones bromato (Bataller *et al.*, 2010).

### 2.3.4.1. Los mecanismos de desinfección asociados con el uso del ozono

Los mecanismos de desinfección son:

- La oxidación o destrucción directa de la pared de la célula con la salida de componentes celulares fuera de la misma.
- El daño directo hacia las bases nitrogenadas (purinas y pirimidinas) de los ácidos nucleicos.
- Las reacciones con los subproductos radicales de la descomposición del ozono.
- La ruptura de las uniones de carbono-nitrógeno que conduce a la despolimerización.

Cuando el ozono se descompone en agua, los radicales libres del peróxido de hidrógeno ( $\text{HO}_2^*$ ) y del hidróxido ( $\text{OH}$ ) que se forman tienen una gran capacidad de oxidación y desempeñan un papel activo en el proceso de desinfección, en general se cree que los microorganismos son destruidos debido a la oxidación protoplasmática dando como resultado la desintegración de la pared celular o la fisura de la célula.

La eficacia de la desinfección depende de la susceptibilidad de los organismos a ser tratados, del tiempo de contacto y de la concentración del ozono en el agua. Los componentes de un sistema de desinfección utilizando ozono incluyen la preparación del gas de alimentación, la generación del ozono, el contacto con el ozono y la destrucción del ozono (US EPA 1999a).

Los parámetros principales de control del proceso son la dosis, la mezcla y el tiempo de contacto, los sistemas de desinfección por medio de ozono tienen como objetivo el maximizar la solubilidad del ozono en el agua residual ya que la desinfección depende de la transferencia del ozono al agua residual, la cantidad de ozono que se disuelve en el agua residual a una temperatura constante es una función de la presión parcial del ozono gaseoso sobre el agua o en la corriente del gas de alimentación.

Es necesario que los sistemas de desinfección que utilizan ozono sean evaluados a escala piloto y calibrados antes de la instalación para asegurar que se cumplan con los requisitos del permiso de descarga en los sitios específicos de uso (US EPA 1999a).

### 2.3.5. Peroxono

Se han utilizado muchos procesos para poder incrementar la descomposición del ozono y que con esto, la capacidad oxidativa que tiene el proceso de la ozonización permita producir altas concentraciones de radicales hidroxilo ( $OH^*$ ), existen diferentes mezclas como lo son la de  $O_3/H_2O_2$ ,  $UV/H_2O_2$ ,  $O_3/UV$ ,  $O_3/pH$  alcalino,  $O_3/UV/H_2O_2$ , cada uno de estos procesos incluye la adición de peróxido de hidrógeno al agua ozonada y a este proceso se le conoce como peroxono (Brunet *et al.*, 1984; Glaze *et al.*, 1987; Beltrán *et al.*, 1997), esta combinación es una de las tecnologías de oxidación avanzada más usadas, permite aprovechar los efectos sinérgicos entre ellos, lo que produce una destrucción adicional de la carga orgánica (Doménech *et al.*, 2002).

En estos procesos hay producción de radicales hidroxilo que son de corta vida con una energía alta, debido a la descomposición del ozono por el peróxido de hidrógeno, el rompimiento de las moléculas de ozono puede ser catalizado hacia la producción de radicales hidroxilo cuando se le adicionan soluciones de pH alcalino (Glaze *et al.*, 1987). Dependiendo de la dosis del ozono el proceso puede ser efectivo, así como también depende de la concentración de la mezcla  $O_3/H_2O_2$ , tiempo de contacto, y la composición de la muestra (Aieta *et al.*, 1988).

#### 2.3.5.1. Proceso del peroxono

La reacción de  $O_3$  con  $H_2O_2$  es lenta, pero la de su anión  $HO_2^-$  es rápida, así la tasa de la reacción sigue la siguiente relación:

$$K_{obs} = K (HO_2^- + O_3) \times 10^{(pH-pK_a)}$$

$K_{\text{obs}}$  = Constante de velocidad observada

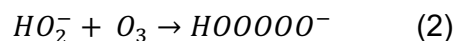
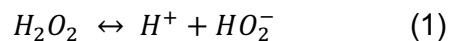
$K$  = Constante de velocidad de reacción

$pK_a$  = Constante de disociación ácida

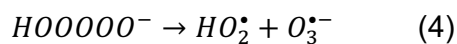
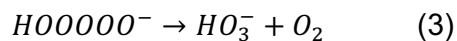
$pH$  = Concentración de iones hidrógeno

Siempre y cuando se trabaje a valores de  $pH$  razonablemente por debajo de la  $pK_a$  de  $H_2O_2$ .

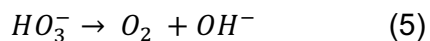
El mecanismo ha sido modificado por varios autores en algunos aspectos de acuerdo con esto, la velocidad de reacción de  $O_3$  a  $HO_2^-$  sería de la siguiente manera



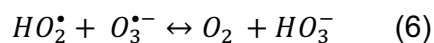
Este producto puede perder  $O_2$  o descomponerse en  $HO_2^\bullet$  y  $O_3^{\bullet-}$



La vida corta del intermediario  $HO_3^-$  es muy corta y decae rápidamente en  $O_2$  más  $OH^-$

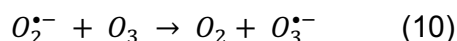
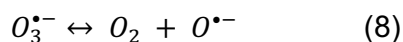
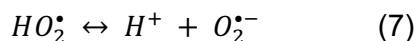


Los dos radicales formados en la reacción (4) se juntan por un período corto de tiempo para reaccionar de acuerdo al siguiente ejemplo:





Similar a la reacción (3), esto reduce el rendimiento de los radicales libres. Aquellos compuestos intermediarios que se han escapado en las reacciones pueden reaccionar después (7) y (10).



Como consecuencia de las reacciones 3 y 6, el rendimiento de  $\cdot OH$  es menor a lo que se creía, solo alrededor del 50% se consume con respecto al  $O_3$ , a pesar de esto el proceso peroxono es todavía una alternativa a otros procesos de oxidación avanzados (Von, 2008).

Los radicales hidroxilo atacan los componentes orgánicos indiscriminadamente, la adición de peróxido de hidrógeno da una producción de radicales hidroxilo de 1.0 mol por mol de ozono (Aieta *et al.*, 1988).

### 2.3.6. Peroxono como un desinfectante

El peroxono al igual que otros procesos de oxidación avanzados ha demostrado ser un desinfectante eficaz para inactivar patógenos, pero se tiene que cuidar o controlar el factor CT, ya que el peroxono no se puede medir a menos que se mida el ozono residual. Las concentraciones de ozono que se usan para el factor CT se pueden basar en el ozono residual, pero el ozono se descompone rápidamente en presencia del peróxido de hidrógeno, por lo que se puede requerir de concentraciones más altas de ozono para tener una mayor eficiencia, además se debe tener en cuenta otras especies oxidantes que se estén generando y que tal vez actúen como desinfectante; se debe considerar también la fuente y la calidad del agua y el tipo de microorganismo a prueba (US EPA 1999a; Wolfe *et al.*, 1989).

El peroxono ( $O_3/H_2O_2$ ) tiene un efecto microbicida en virus como el bacteriófago MS2 (de cadena sencilla de RNA), phiX174 (cadena sencilla de ADN) y PRD-1 (recubiertos de ADN de doble cadena). Bacterias como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* resultan ser resistentes debido a sus esporas, por lo que se les compara con los protozoarios como *Giardia* para realizar estudios de resistencia a los desinfectantes clásicos tomándolos como indicadores de aguas residuales (Sommer *et al.*, 2004).

### **2.3.7. Los procesos de oxidación avanzada como una alternativa para la desinfección**

La ozonización de agua potable y aguas residuales se ha convertido en un método atractivo debido al poder oxidante, bactericida y contra protozoarios que tiene el ozono, por lo que su combinación con otros procesos aumenta la eliminación de la carga orgánica, inorgánica y microbiológica de las aguas residuales (Van Leeuwen *et al.*, 2003; Véliz *et al.*, 2010; Lazarova *et al.*, 1999).

Muchos estudios que se han realizado sobre la desinfección con ozono se han enfocado a la acción que tiene sobre diferentes microorganismos, así como los factores que afectan su inactivación entre los cuales se encuentran la temperatura, el pH, el tiempo de contacto, y la dosis de ozono (Masten y Hoigné, 1992)

La giardiosis es actualmente uno de los problemas de salud pública relacionado con las redes de abastecimiento de agua de los países en desarrollo y es considerada una enfermedad emergente, la incidencia futura es difícil de prever, en México los casos descritos y declarados no llegan a ser datos reales de la situación, ya que el desconocimiento de los cuerpos sanitarios con respecto a estos agentes patógenos y su patología hace que los casos de infección queden enmascarados por otras infecciones gastrointestinales causadas por virus entéricos, bacterias coliformes o microorganismos inespecíficos (Doménech, 2003).

Si se lograran abatir los costos, el ozono sería la técnica más viable, ya que es el desinfectante que ha demostrado ser capaz de destruir formas infectantes resistentes como los huevos de helminto *T. canis* y los quistes del protozooario *G. lamblia*. Los indicadores de contaminación como los coliformes, aun cuando pase los límites permisibles no indican la presencia de otros agentes infecciosos más peligrosos. También es muy importante que la desinfección vaya de la mano con una buena campaña de saneamiento (Rojas y Orta, 2002; Solarte *et al.*, 2006; García-Gómez *et al.*, 2011).

En México y en otros países de América Latina la revisión microbiológica del agua incluye la identificación de organismos coliformes, pero no se consideran a otras bacterias contaminantes, a ciertos virus entéricos y a parásitos (Tabla 5), estos últimos ya se incluyen en los Estados Unidos y en países de la comunidad Europea, como parámetros de calidad y seguridad para la población, en la perspectiva del cambio climático, la abundancia de microorganismos así como de nuevos agentes infecciosos, dejaría a la identificación de coliformes como una opción limitada (Santos *et al.*, 2009).

**Tabla 5.** Parámetros microbiológicos de detección obligatoria en varios países para el agua potable en México, Colombia, Estados Unidos y la comunidad Europea. (Santos *et al.*, 2009)

Parámetro	México	Colombia	Estados Unidos	Comunidad Europea
Coliformes fecales	0	0	0	0
Coliformes totales	0	0	0	0
<i>Cryptosporidium</i>			0	0
<i>Giardia lamblia</i>			0	
Cuenta Herotrófica en placa			0	
<i>Legionella sp.</i>			0	
Virus entéricos			0	0
<i>Clostridium perfringes</i>				0
<i>Streptococcus faecalis</i>				0

Debido a que no existe un parámetro único ni existe la técnica eficaz que asegure la calidad del agua, el reto es analizar las características de las fuentes, que permitan implementar técnicas que mejoren y aseguren la calidad de la potabilización del agua, que es esencial para la vida.

Se ha tratado de identificar el mejor sistema o método de tratamiento de desinfección que sea eficiente y efectivo para disminuir el incremento de enfermedades gastrointestinales ocasionadas por agentes infecciosos que son potencialmente transmitidos como los protozoarios y HH en aguas residuales, pero sólo se ha logrado eliminar su presencia en el agua y transferir el problema a los lodos que resultan de las etapas de tratamiento de agua, para ello se han realizado diferentes sistemas de desinfección y se han logrado avances para poder eliminar o disminuir la acción patógena de los agentes infecciosos altamente persistentes y dañinos para el hombre, así como la dosis que se debe aplicar y tiempos de contacto que normalmente se pueden emplear, por lo anterior se pueden aplicar métodos físicos como: filtración, ebullición, radiación solar y radiación ultravioleta y los métodos químicos como: ozonación y cloración, los cuales han resultado ser los mejores sistemas de desinfección y que van a la vanguardia por su amplio rango de desinfección como es la ozonación (Rojas-Valencia y Orta, 2002). Sin embargo la luz UV resulta ser un método no viable de desinfección en dosis bajas de radiación  $16 \text{ WS/cm}^2$ , debido a que los quistes de *G. lamblia* son resistentes a ella (Rice y Hoff, 1981).

En 1954 Giese y Christensen, se cuestionaban como era que el ozono tenía efecto sobre diversos microorganismos, desde entonces ya se estudiaban los efectos letales que tenía el  $\text{O}_3$ , pero aún no se hacía una revisión sistemática de estas investigaciones, ni nadie había tratado de determinar el mecanismo de acción del ozono en las células, por lo que se realizaron experimentos con diferentes microorganismos para ver el efecto del ozono, encontrándose que en algunos protozoarios se presentaba lisis celular, pero otros presentaban resistencia como *Fabrea salina*, *Condylostoma magnum*, *Paramecium caudatum*. En las levaduras se presentaba una disminución en cuanto al número de colonias; en general la membrana celular no reacciona completamente con el ozono por lo que la célula se podía recuperar, pero si el ozono es capaz de penetrar, la célula termina con todas sus funciones.

Mercado-Burgos *et al.* en 1975 reportaron un daño significativo en cercarias de *Schistosoma mansoni*, con una dosis de ozono de 40 mg/L, los miracidios eran incapaces ya de infectar a los caracoles que fueron utilizados para el bioensayo.

En 1984, Wickramayake *et al.* estudiaron el efecto que tenía el ozono a una concentración de 0.53 mg/L\*min y a pH 7 sobre quistes de *Giardia muris* y *G. lamblia*, en donde lograron inactivar al 99% de los quistes de *G. lamblia*. También observaron que *G. muris* fue 3.5 veces más resistente bajo estas condiciones. En 1985 realizaron otro estudio donde comparaban la viabilidad de estos dos protozoarios, observando que era similar en un rango de temperatura entre 6-37 °C durante 25 días de almacenaje, y la temperatura óptima para su supervivencia era de 5 °C. Nuevamente demostraron que el ozono resulta efectivo para tratar quistes de ambas especies de *Giardia*, pero *G. muris* es más resistente, esta diferencia en cuanto a resistencia al ozono los hizo proponer el empleo de los quistes de *G. muris* como modelo para *G. lamblia* en estudios de desinfección con ozono.

Ishizaki *et al.* en 1987, demostraron que el ozono en *E. coli* HB101 que alberga el plásmido de ADN dañaba al ADN del plásmido Pbr322 al penetrar el ozono en la membrana celular y reaccionar con las sustancias citoplasmáticas, por lo que el ADN cromosómico es uno de los objetivos de degradación del ozono, ocasionando la muerte de la célula.

En 1989 Wolfe *et al.*, trabajaron con *G. muris* que provenía de aguas superficiales no tratadas, manejaron un pH de 8 y una temperatura de 14 °C con un tiempo de 22 minutos; los quistes fueron tratados con ozono a concentraciones de 3.4 a 5.4 mg/L\*min, siendo valores mayores a los reportados por la US EPA (1.3 mg/L\*min a 15 °C); también trabajaron con peroxono con las mismas concentraciones y temperatura pero con un tiempo de 1.8 minutos. Concluyeron que las concentraciones del ozono propuesto para inactivar los quistes de *G. muris* son un poco mayor a los emitidos por la US EPA pero esto se debía posiblemente al origen del agua. El porcentaje obtenido de inactivación con el ozono y peroxono fue del 99%.

Se han realizado estudios sobre el efecto que tiene el ozono como desinfectante en agua potable contaminada con ooquistes de *Cryptosporidium parvum* (Korich *et al.*, 1990; Rennecker *et al.*, 1999; Rennecker *et al.*, 2000; US EPA, 2001; Betancourt y Rose, 2004; Díaz *et al.*, 2003; Driedger *et al.*, 2000). Buckhari *et al.*, en el 2000 analizaron la viabilidad e infectividad después de tratar a los quistes de *C. parvum* con ozono reportando un 40% de viabilidad, y un 30% de infectividad en ratones neonatales CD-1.

Existen diversos factores que pueden afectar la inactivación de quistes de *G. muris* utilizando ozono. En 1992 Labatiuk *et al.* establecieron la importancia que tiene la temperatura, el pH, la dosis de ozono y el tiempo de contacto para inactivar quistes de *G. muris* tomado como modelo a ratones.

En un estudio realizado por Finch *et al.* en 1993 se demostró que no hay diferencia de susceptibilidad al ozono entre *G. muris* y *G. lamblia* a 22 °C con una dosis de 2.52 mg/L de ozono y un tiempo de contacto de 2 y 5 minutos a un pH de 7, obteniendo un 99% de inactivación de los quistes.

Se han realizado estudios con huevos de *T. canis*, en el año 1997 por Hong-Kean *et al.*, en Taiwán, quienes encontraron que aún después de darles tratamiento a los huevos de *T. canis* con un proceso de oxidación avanzada usando ozono residual a una concentración de 6.76 mg/L y 5.91 mg/L y manejando un tiempo de contacto de 40 y 20 minutos, éstos no se inactivaron, sin embargo, en este trabajo no se determinaron datos de porcentajes de inactivación, sino que los huevos tratados se inocularon en ratones para determinar si seguían siendo infectivos. Como los ratones resultaron estar infectados concluyeron que el ozono no produjo ningún efecto sobre la viabilidad de los huevos. Algo importante fue que en sus observaciones en microscopio electrónico de barrido los huevos oxidados con ozono presentaban deformación en su capa externa cuando se trataron con 40 minutos, pero no mencionan a que pH se trabajó la muestra.

En el 2000 Rojas y Orta, trabajaron con huevos fértiles del helminto *Ascaris suum*, aplicando una concentración de 19 mg O<sub>3</sub>/L en 500 mL en fase de gas durante 30 minutos. Observaron que el ozono como desinfectante con ese tiempo y dosis no ocasionaba daño, ya que se encontraron huevos con la fase de larva, los huevos que no eran viables si presentaron daño en las capas y fueron destruidos.

Posteriormente en el 2004 Orta *et al.*, realizaron un trabajo con el mismo helminto, cuyos huevos se sometieron a tratamiento con ozono a una concentración de 3.5 a 4.7 mg/L y a pH de 5 y 9 obteniendo el porcentaje más alto de inactivación del 99% con un tiempo de contacto de 120 min en medio ácido.

En el año 1999d la US EPAc publicó un nuevo manual que denominó *Alternative Disinfectants and Oxidants*, donde hacen referencia a generalidades de oxidantes como el ozono y de la combinación del ozono con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, entre otros, se documentaron datos que hacían referencia al factor CT (concentración del desinfectante por tiempo de contacto) y a la inactivación de quistes del protozooario *G. muris*, los valores de CT a los cuales se lograba una inactivación del 99% de quistes, fue en donde se utilizó una concentración de 3.4 y si se combinaba al ozono con el peróxido de hidrógeno se tenía un CT de 2.6 mg/L min. También se publicó que el ozono daña la membrana celular de los protozoarios, y esto puede deberse a que la pared se vuelve más permeable, por lo tanto el ozono al encontrarse en una fase acuosa penetra el quiste, y esto trae como consecuencia que se dañen las membranas citoplasmáticas, afectando también otros componentes como estructurales (US EPA, 1999c).

Facile *et al.* en 2000 realizó un trabajo en donde se utilizaron dos cepas bacterianas esporuladas aerobias, trabajaron con un reactor y encontraron que con una dosis de ozono 0.5 - 2.5 mg/L a pH de 6.3 y 8.2, se tenían mejores resultados, pero para la cepa de *B. subtilis* que tomaron como referencia se necesitaba un tiempo de contacto mayor observando que se desarrollaba cierta resistencia a la ozonación, por lo que tomaron como modelo a esta cepa de *B. subtilis* para compararla con los protozoarios *G. lamblia* y *C. parvum* y poder entender por qué estos protozoarios presentan resistencia, así *B. subtilis* se puede tomar como un indicador de contaminación antes de utilizar una desinfección con ozono.

Khadre *et al.* (2001) y Fernández-Torres *et al.* (2010), realizaron un trabajo en donde demostraron que el alto potencial de oxidación del ozono oxida los materiales de membranas de las células provocando una peroxidación lipídica, lo cual permite que el ozono ingrese al organismo dañando las enzimas RNAasa y ADNasa por lo que las células ya no se pueden reproducir, los productos que se

generan durante la reacción presentan actividad antimicrobiana debido al poder oxidante.

En un trabajo realizado por Rojas en el 2001, el objetivo fue establecer qué tan factible era inactivar parásitos con un tratamiento anaerobio termofílico (a 55 °C) de lodos, y otro en condiciones mesofílicas (a 35 °C); en ambas etapas experimentales, el digestor termofílico resultó ser más eficiente para remover patógenos y parásitos que los digestores mesofílicos. La digestión termofílica se encontró muy cerca de cumplir con los parámetros establecido por la US EPA 1996 (citado por Rojas, 2001) para HH en biosólidos del tipo "A" los cuales pueden ser utilizados para fines agrícolas sin ninguna restricción, el número de HH que se pueden encontrar en los biosólidos es de 0.25 HH larvados/g ST) y para los indicadores de patógenos, coliformes fecales (<1000 NMP g/ST), entonces los resultados demostraron que la digestión anaerobia termofílica es más eficiente y puede ser una alternativa buena para eliminar helmintos de lodos provenientes de aguas residuales y así poder utilizar esos lodos con fines agrícolas sin restricciones.

En el 2002 en Taiwán Chuen-Tyan *et al.*, examinaron el efecto que tenía el ozono sobre la inhibición de ooquistes de *Eimeria colchici in vitro*, encontraron que la esporulación de los ooquistes baja cuando se le trata con ozono a una concentración de 3.82 mg/L durante 60 min

Orta *et al.* en el 2002 trabajaron con un reactor de 1 L con el propósito de destruir HH, utilizando concentraciones de 36.8 mgO<sub>3</sub>/L de ozono en gas que se aplicó en el fondo del reactor, con flujos de 0.25 y 0.5 L/min para lograr tasas de 9.2 y 18.4 mgO<sub>3</sub>/min respectivamente, observando que a una concentración de 18.4 mgO<sub>3</sub>/min a un pH menor a 5 se obtenía un 94% de inactivación, pero los resultados mejoraron cuando se aplicó un pH de 3 con la misma concentración pero con un tiempo de contacto de 1 h, en donde se obtenía un 96.7% de huevos dañados en su cubierta exterior; se trabajó con otras especies que se encuentran comúnmente en aguas residuales tales como *T. canis* y observaron que después de 3 h de contacto con ozono se obtienen mejores resultados, es decir hay una mayor destrucción de huevos debido a que el ozono hidroliza los aminoácidos que caracterizan a las proteínas que cubren el HH, por lo que los procesos de



oxidación avanzada con ozono son una buena alternativa y una base para considerar otros tratamientos en la Legislación Mexicana y así poder asegurar la eliminación de las especies que son altamente resistentes a las desinfecciones comunes.

En años recientes se ha tomado interés por el ozono debido a su habilidad para oxidar diversas bacterias del grupo de coliformes como *B. subtilis* además de *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Streptococcus*, *Salmonella* y virus como Norwalk, poliovirus 1 y el bacteriófago MS2 (Shin y Sobsey, 2003; Sommer *et al.*, 2004; Chun-Chieh y Chih-Shan, 2006; Abdullah *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2002; Bancroft *et al.*, 1984; Cho *et al.*, 2003). Por otro lado la combinación de ozono con peróxido ha demostrado tener una mayor capacidad de oxidación ya que hay mayor producción de radicales hidroxilo, sobre bacterias como *C. perfringens* que es un indicador de contaminación fecal (Lanao *et al.*, 2008).

En un trabajo realizado en 2011 por Rojas-Valencia, se demostró que debido a las propiedades oxidantes que tiene el ozono es capaz de desactivar microorganismos rápidamente, rompiendo la membrana celular o protoplasma, lo que hace imposible activar bacterias, virus y células de protozoarios eliminándose hasta un 99% de bacterias y virus a una concentración de 10 mg/L en 10 minutos. El ozono actúa sobre ácidos grasos insaturados, en lípidos, glicoproteínas, los aminoácidos y grupos sulfhidrilo de ciertas enzimas. También se ha comprobado que el ADN no es resistente al ozono, por lo que puede destruir microorganismos patógenos y no patógenos tales como: huevos de helmintos, protozoarios, bacterias y virus.

Yamasaki *et al.* en el 2004 reportaron que la inactivación de *Chlamydia trachomatis* y *Chlamydia pneumoniae* se daba inmediatamente en un tiempo de 5 segundos cuando utilizaban una concentración de ozono de 4 ppm.

Rojas-Valencia *et al.* 2004 realizaron un trabajo en donde aplicaron ozono a una concentración de 18.4 mgO<sub>3</sub>/min a un pH de 3 por diferentes periodos de tiempo en bacterias como *Vibrio cholerae*, *Salmonella tify* y coliformes fecales se observando que en 8 minutos la población microbiana se redujo hasta quedar dentro de los LMP (1000 NMP/100ml) para aguas de riego que indican las normas. El efecto del ozono fue causar una lisis celular liberando las endotoxinas

que son biodegradables. Con el helminto *Ascaris suum* fue diferente debido a que requiere de una hora por lo menos de contacto con el ozono, la envoltura de los huevos de este helminto está constituida por aminoácidos, en donde el ozono conduce a la formación de aldehídos, formaldehídos y acetaldehídos a bajas concentraciones, estos niveles no representan un daño para la salud de los humanos, por lo que el ozono se puede utilizar de forma segura para reducir concentraciones de sustancias biológicas que son resistentes a los tratamientos con altas concentraciones de cloro.

Bracho *et al.* (2007) demostraron que no siempre está relacionada la presencia de quistes de *G. lamblia* con la presencia de bacterias indicadoras de contaminación fecal ya que demostraron la presencia de quistes en las muestras analizadas de agua potable proveniente de fuentes subterráneas y del sistema municipal de suministro. Esta investigación se realizó en la Ciudad de Maracaibo, Venezuela, por lo que las bacterias indicadoras de contaminación no garantizan que no haya parásitos en el agua potable.

Ran y Li en 2013 demostraron que la capacidad de inactivación del ozono mejora en condiciones ácidas y no en condiciones alcalinas cuando la dosis de ozono está por encima de 3 mg/L y el tiempo de exposición es de 7 minutos se puede llegar a un 99,9% de inactivación, pero cuando se aumenta la temperatura por arriba de los 35 °C la inactivación disminuye.

En el año 2013, Ibáñez *et al.*, evaluaron la actividad parasiticida sobre los huevos de *Hymenolepis nana* usando un proceso de oxidación avanzada con ozono y peróxido, utilizando valores diferentes de pH, y una concentración de ozono de 1.1 mg/L durante 60 minutos a una temperatura de 25 °C, con el peróxido se trabajó en las mismas condiciones que la ozonización y por medio de la microscopia electrónica de barrido y de transmisión se observó que las estructuras de los huevecillos cuando se combinaba ozono-peróxido, y se utilizaba un pH de 5 a 7, eran modificadas. La importancia de esta investigación está en que se comprobó el proceso de oxidación con ozono y peróxido bajo condiciones ligeramente ácidas no tiene actividad desinfectante sobre los huevos de *H. nana*, sin embargo a pH alcalino se obtienen mejores resultados y hay una mejor destrucción de la capa superficial de los huevos del céstodo.

En un trabajo realizado por Marques *et al.* (2014) se encontró que los quistes y trofozoítos de *Giardia spp.* presentaban resistencia al cloro, el agente desinfectante más empleado en el tratamiento de aguas residuales; por esta razón comprobaron que las nuevas técnicas para desinfección de aguas que contiene este parásito son necesarias, evaluaron la eficacia del ozono a diferentes concentraciones 11 mg/L, 21 mg/L, 65 mg/L y el ultrasonido, combinándolos e individualmente, obteniendo un 100% de remoción de quistes de *Giardia spp.* en aguas residuales a los 5 minutos de tratamiento con ozono, utilizando un CT de 325 mg/L\*min.

Asimismo el peróxido de hidrógeno por si solo produce radicales libres  $\bullet\text{H}$  y  $\bullet\text{OH}$ , por lo que oxida y reduce los grupos funcionales de las enzimas, carece de poder desinfectante residual, se ha visto que es efectivo para eliminar bacterias, virus y algunos protozoarios, inactiva esporas a bajas temperaturas y además, su efectividad permanece inalterable ante la presencia de algún material orgánico. Tiene alta actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, su actividad microbicida se ve muy afectada por el pH en medios con pH de 7 a 8, ya que sus características de desinfectante decrecen se puede decir que hasta el momento no se ha visto nada con respecto a su acción sobre HH (Steindl *et al.*, 2014; Blanchard *et al.*, 1998).

### 3. JUSTIFICACIÓN

*G. lamblia* y *T. canis* son parásitos zoonóticos que se transmiten a través de la ingesta de las formas parasitarias presentes en el suelo, agua y alimentos contaminados con heces que contienen estadios infectantes. Ambas parasitosis son de amplia distribución mundial y alta frecuencia en países con alto y bajo desarrollo económico. Los desinfectantes que más frecuentemente se comercializan, como el cloro, no logran eliminar el riesgo de infección por huevos de helminto y formas viables de *G. lamblia*, siendo necesaria una desinfección confiable de agua para consumo humano y poco agresiva para el ambiente, así como de aguas residuales que se usan para riego.

Las tecnologías de oxidación avanzada con ozono y peróxido de hidrógeno han demostrado tener actividad desinfectante sobre diferentes microorganismos patógenos. Por lo anterior, es de interés evaluar el efecto desinfectante del ozono y del peróxido de hidrógeno sobre huevos de helminto *T. canis* y quistes de *G. lamblia*, como una alternativa para el control de la transmisión de estos parásitos.

### 4. HIPÓTESIS

Los procesos de oxidación avanzada con ozono y peróxido de hidrógeno poseen potente efecto sobre microorganismos patógenos por lo que se puede aplicar eficazmente en la desinfección de agua. Entonces las técnicas de oxidación basadas en estas especies químicas y su combinación, lograrán la inactivación de huevos de helminto *T. canis* y de las formas viables del protozooario *G. lamblia*.

## 5. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar la inactivación que originan los procesos de oxidación avanzada con ozono, peróxido de hidrógeno y la combinación ozono/peróxido de hidrógeno, sobre los huevos de helminto *T. canis* y los quistes del protozooario *G. lamblia*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la eficiencia de desinfección del ozono a diferentes condiciones de pH y tiempos de contacto para inactivar huevos de helminto *T. canis* y quistes del protozooario *G. lamblia*.
2. Determinar la eficiencia del tratamiento con peróxido de hidrógeno para inactivar huevos de *T. canis* y quistes de *G. lamblia*, variando las concentraciones de peróxido y tiempos de contacto.
3. Determinar la eficiencia que tiene la combinación ozono/peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones y tiempos de contacto para inactivar huevos de *T. canis* y quistes de *G. lamblia* variando las concentraciones y tiempos de contacto.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. Obtención de los quistes de *G. lamblia*

Se seleccionaron muestras de materia fecal de pacientes diagnosticados con giardiosis aguda por el laboratorio clínico recolectadas en un período no mayor de 24 h. Las cuales se procesaron de la siguiente manera: se tamizó la muestra con una malla fina, se hicieron 5 lavados con agua corriente, se centrifugó en cada lavado a 1500 rpm/8 minutos; al final se obtuvo un sedimento donde se encontraban los quistes de *G. lamblia*.

El sedimento donde se encontraban los quistes se contó utilizando una cámara de Neubauer para obtener el número total de quistes/mL, se ajustó con agua potable comercial para obtener una concentración final de quistes (260,400/mL±4775), el concentrado se guardó en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

### 6.2. Obtención de los huevos de *T. canis*

Los ejemplares adultos de *T. canis* se recolectaron de un cachorro de entre 4 y 5 meses de edad. Los perros fueron desparasitados con Albendazol por vía oral (400 mg). Las hembras adultas del parásito se separaron y se colocaron en una caja de Petri con agua destilada para hacer lavados, posteriormente se hizo una disección del útero cerca de la parte media del cuerpo del nemátodo para obtener los HH. Los huevos inmaduros o no embrionados se resuspendieron en una solución de formaldehído al 2%.

Se tomaron 5 µL de la suspensión de huevos, los cuales se colocaron entre porta y cubreobjetos de 18x18, se contaron todos los campos para obtener el número de HH/mL, se obtuvo una concentración final de 4976 HH/mL±108. Para realizar el conteo se utilizó un microscopio óptico de la marca Carl Zeiss, y las observaciones se hicieron a 40x.

### 6.3. Preparación y valoración de peróxido de hidrógeno al 10% y 30%

Se realizó la valoración del peróxido de hidrógeno aplicando la volumetría por oxido-reducción (permanganimetría) para la determinación de la concentración de peróxido de hidrógeno en la muestra comercial que se estaba trabajando al 30% y la que se preparó al 10%.

Se colocó la muestra de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10% (20 mL) y 30% (33.33 mL) en un matraz aforado de 100 mL, se aforó la muestra a 100 mL exactamente y se homogeneizó con agitación cuidadosa, se midieron alícuotas de 20 mL en matraces Erlenmeyer de 250 mL y se añadió agua hasta un volumen aproximado de 50 mL. Se agregaron 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1:1 y se tituló con KMnO<sub>4</sub>. Se tituló en frío con el KMnO<sub>4</sub> 0.045 N hasta la aparición de un ligero color rosa que persistió durante 30 segundos como mínimo. Se calculó el porcentaje de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la muestra (Tomado de: prácticas de Laboratorio de Química Analítica, 2014).

Cálculos:

$$\% \text{H}_2\text{O}_2 = \frac{(\text{mL de KMnO}_4 \text{ gastados})(N \text{ de KMnO}_4)(\text{Factor de dilución})}{g \text{ de peróxido de la muestra}}$$

### 6.4. Determinación de la producción de radicales hidroxilo

Para confirmar la presencia de radicales hidroxilo se determinó la producción de radicales •OH por medio de la prueba colorimétrica de azul de metileno que es un indicador cualitativo que indica la presencia de radicales hidroxilo de manera inmediata (ver anexo D). Sólo se realizó esta prueba para el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10% y 30%, así como para la combinación de O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% (Sotoh *et al.*, 2007).

## 6.5. Análisis estadístico

Las medias fueron analizadas por un análisis de varianza (ANOVA) mediante la prueba de Turkey ( $P=0.05$ ) para distinguir las diferencias entre los tratamientos a diferentes pH y tiempos de contacto. Para ello se utilizó el programa de GraphPad Prism 5.0 para Windows.

También se realizó un análisis estadístico en Excel para comparar los tratamientos a tiempos y pH diferentes.

## 6.6. Inactivación de quistes de *Giardia lamblia*

En esta etapa se propuso probar el efecto del  $H_2O_2$  con diferentes dosis,  $O_3$  y la combinación de  $O_3/H_2O_2$  en los quistes, considerando los efectos a distintos valores de pH de 5, 7 y 10; y diferentes tiempos de contacto 30, 60 y 120 min para las tres pruebas.

### 6.6.1. Tratamiento con peróxido de hidrógeno al 10% ( $H_2O_2$ ) a diferentes pH y tiempos de contacto

**Tabla 6.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 10% a pH 5 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

Composición de la mezcla	Tubos Eppendorf						Testigo
	1	2	3	4	5	6	
$H_2O_2$ al 10% ( $\mu L$ )	6	30	60	90	150	300	x
Agua a pH 5 (mL)	1	1	1	1	1	1	1
Volumen del concentrado de quistes ( $\mu L$ )	200	200	200	200	200	200	200
Tiempo 30, 60 y 120 (min)	si	si	si	si	si	si	si
Temperatura ( $^{\circ}C$ )	25	25	25	25	25	25	25
Concentración mol/L de $H_2O_2$ al 10%	0.15	0.73	1.42	2.09	3.33	6	x

Se realizó una prueba y dos repeticiones.



**Tabla 7.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 10% a pH 7 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

Composición de la mezcla	Tubos Eppendorf						Testigo
	1	2	3	4	5	6	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 10% (μL)	6	30	60	90	150	300	x
Agua a pH 7 (mL)	1	1	1	1	1	1	1
Volumen del concentrado de quistes (μL)	200	200	200	200	200	200	200
Tiempo 30, 60 y 120 (min)	si	si	si	si	si	si	si
Temperatura (°C)	25	25	25	25	25	25	25
Concentración mol/L de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 10%	0.15	0.73	1.42	2.09	3.33	6	x

Se realizó una prueba y dos repeticiones.

**Tabla 8.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 10% a pH 10 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

Composición de la mezcla	Tubos Eppendorf						Testigo
	1	2	3	4	5	6	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 10% (μL)	6	30	60	90	150	300	x
Agua a pH 10 (mL)	1	1	1	1	1	1	1
Volumen del concentrado de quistes (μL)	200	200	200	200	200	200	200
Tiempo 30, 60 y 120 (min)	si	si	si	si	si	si	si
Temperatura (°C)	25	25	25	25	25	25	25
Concentración mol/L de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 10%	0.15	0.73	1.42	2.09	3.33	6	x

Se realizó una prueba y dos repeticiones.

En el caso del testigo solo se puso en contacto con aire. Transcurrido el tiempo para cada uno de los tratamientos con peróxido de hidrógeno a diferentes pH 5, 7 y 10, se realizaron 10 lavados, se centrifugó a 10,000 rpm/3 minutos en una microcentrifuga clínica con solución a pH neutro, para eliminar el peróxido de hidrógeno a los diferentes pH.

Después de los lavados, los quistes se resuspendieron en 1 mL de agua a pH neutro, se realizó el conteo de los quistes en 5 μL entre porta y cubreobjetos de 18x18 mm para determinar la viabilidad y la inactivación con el colorante azul de metileno amortiguado usando un microscopio óptico para su análisis, el conteo se hizo a 40x.

En un principio se trabajó con una concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% pero debido a que se generaba mucho gas, no fue posible al momento de centrifugar obtener una pastilla en el fondo del tubo Eppendorf, se resuspendió la muestra al momento de sacar el tubo de la microcentrifuga, por lo que se bajó la concentración al 10%, hubo menos generación de gas, y constantemente se agitó en un vórtex y se destapó para que el gas fuera liberado, y de esta manera ya no se dificultó centrifugar.

Se determinó el porcentaje de viabilidad y de inactivación de los quistes tratados, por el método de exclusión del azul de metileno amortiguado (Bingham *et al.*, 1979).

### 6.6.2. Tratamiento con ozono (O<sub>3</sub>) a diferentes pH y 120 minutos de contacto

Durante 15 minutos se ozonaron 10 mL de agua potable comercial que se colocó en un reactor semi-bach con capacidad de 50 mL.

En esta etapa se trabajó con un ozonador de la marca Ozone se le suministró oxígeno industrial como gas de alimentación con un gasto de 0.519 L/min que se puede controlar con una válvula check adaptada a un rotámetro o flujómetro, de esta manera se puede tener una tasa fija de ozono disuelto en la muestra, que se determinó por el método colorimétrico de índigo, obteniéndose 1.7 mgO<sub>3</sub>/L. Factor CT para el ozono: 204 mgO<sub>3</sub>/L.\*min (para los 120 minutos de contacto).

**Tabla 9.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono pH 5 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

Composición de la mezcla	Tubos Eppendorf						Testigo
	1	2	3	4	5	6	
Agua saturada con O <sub>3</sub> (μL)	6	30	60	90	150	300	x
Agua a pH 5 (mL)	1	1	1	1	1	1	1
Volumen del concentrado de quistes (μL)	200	200	200	200	200	200	200
Tiempo 120 (min)	si	si	si	si	si	si	si
Temperatura (°C)	27	27	27	27	27	27	27
Concentración mol/L de O <sub>3</sub> en el agua saturada	1.75x10 <sup>-7</sup>	8.43x10 <sup>-7</sup>	1.60x10 <sup>-6</sup>	2.30x10 <sup>-8</sup>	3.54x10 <sup>-6</sup>	5.90x10 <sup>-6</sup>	x

Se realizó una prueba y dos repeticiones.

**Tabla 10.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono pH 7 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

Composición de la mezcla	Tubos Eppendorf						Testigo
	1	2	3	4	5	6	
Agua saturada con O <sub>3</sub> (μL)	6	30	60	90	150	300	x
Agua a pH 7 (mL)	1	1	1	1	1	1	1
Volumen del concentrado de quistes (μL)	200	200	200	200	200	200	200
Tiempo 120 (min)	si	si	si	si	si	si	si
Temperatura (°C)	27	27	27	27	27	27	27
Concentración mol/L de O <sub>3</sub> en el agua saturada	1.75x10 <sup>-7</sup>	8.43x10 <sup>-7</sup>	1.60x10 <sup>-6</sup>	2.30x10 <sup>-8</sup>	3.54x10 <sup>-6</sup>	5.90x10 <sup>-6</sup>	x

Se realizó una prueba y dos repeticiones.

**Tabla 11.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono pH 10 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

Composición de la mezcla	Tubos Eppendorf						Testigo
	1	2	3	4	5	6	
Agua saturada con O <sub>3</sub> (μL)	6	30	60	90	150	300	x
Agua a pH 10 (mL)	1	1	1	1	1	1	1
Volumen del concentrado de quistes (μL)	200	200	200	200	200	200	200
Tiempo 120 (min)	si	si	si	si	si	si	si
Temperatura (°C)	27	27	27	27	27	27	27
Concentración mol/L de O <sub>3</sub> en el agua saturada	1.75x10 <sup>-7</sup>	8.43x10 <sup>-7</sup>	1.60x10 <sup>-6</sup>	2.30x10 <sup>-8</sup>	3.54x10 <sup>-6</sup>	5.90x10 <sup>-6</sup>	x

Se realizó una prueba y dos repeticiones.

En el caso del testigo solo se puso en contacto con aire. Transcurrido el tiempo para cada uno de los tratamientos con ozono a diferentes pH 5, 7 y 10, se realizaron 10 lavados, se centrifugó a 10,000 rpm/3 minutos en una microcentrifuga clínica con solución a pH neutro, para eliminar el agua saturada con ozono a los diferentes pH.

Después de los lavados, los quistes se resuspendieron en 1 mL de agua a pH neutro, se tomaron 5 μL y se colocaron entre porta y cubreobjetos de 18X18 mm y se realizó la lectura en todos los campos para determinar el porcentaje de viabilidad y el porcentaje de inactivación con el colorante azul de metileno amortiguado usando un microscopio óptico para su análisis (las observaciones se realizaron a 40x).

### 6.6.3. Tratamiento con ozono/peróxido de hidrógeno al 10% a diferentes pH y 120 minutos de contacto

Para cada una de las condiciones de pH para el tratamiento con ozono/peróxido de hidrógeno al 10%, durante 15 minutos se ozonó agua potable comercial en un reactor semi-bach con capacidad de 50 mL.

**Tabla 12.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono/peróxido de hidrógeno al 10% a pH 5 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

Composición de la mezcla	Tubos Eppendorf						Testigo
	1	2	3	4	5	6	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 10% (μL)	6	30	60	90	150	300	x
Agua saturada con O <sub>3</sub> (μL)	6	30	60	90	150	300	x
Agua a pH 5 (mL)	1	1	1	1	1	1	1
Volumen del concentrado de quistes (μL)	200	200	200	200	200	200	200
Tiempo 120 (min)	si	si	si	si	si	si	si
Temperatura (°C)	27	27	27	27	27	27	27
Concentración mol/L de O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en el agua saturada	0.014	0.07	0.14	0.2	0.3	0.5	x

Se realizó una prueba y dos repeticiones.

**Tabla 13.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono/peróxido de hidrógeno al 10% a pH 7 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

Composición de la mezcla	Tubos Eppendorf						Testigo
	1	2	3	4	5	6	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 10% (μL)	6	30	60	90	150	300	x
Agua saturada con O <sub>3</sub> (μL)	6	30	60	90	150	300	x
Agua a pH 7 (mL)	1	1	1	1	1	1	1
Volumen del concentrado de quistes (μL)	200	200	200	200	200	200	200
Tiempo 120 (min)	si	si	si	si	si	si	si
Temperatura (°C)	27	27	27	27	27	27	27
Concentración mol/L de O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en el agua saturada	0.014	0.07	0.14	0.2	0.3	0.5	x

Se realizó una prueba y dos repeticiones.

**Tabla 14.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono/peróxido de hidrógeno al 10% a pH 10 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

Composición de la mezcla	Tubos Eppendorf						Testigo
	1	2	3	4	5	6	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 10% (μL)	6	30	60	90	150	300	x
Agua saturada con O <sub>3</sub> (μL)	6	30	60	90	150	300	x
Agua a pH 10 (mL)	1	1	1	1	1	1	1
Volumen del concentrado de quistes (μL)	200	200	200	200	200	200	200
Tiempo 120 (min)	si	si	si	si	si	si	si
Temperatura (°C)	27	27	27	27	27	27	27
Concentración mol/L de O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en el agua saturada	0.014	0.07	0.14	0.2	0.3	0.5	x

Se realizó una prueba y dos repeticiones.

En el caso del testigo solo se puso en contacto con aire. Transcurrido el tiempo para cada uno de los tratamientos se realizaron 10 lavados, se centrifugó a 10,000 rpm /3 minutos en una microcentrífuga clínica con solución a pH neutro, para eliminar el agua saturada con ozono y peróxido de hidrógeno a los diferentes pH.

Después de los lavados, los quistes se resuspendieron en 1 mL de agua a pH neutro, se realizó el conteo de los quistes en 5 μL entre porta y cubreobjetos de 18 x 18 mm, se realizaron las lecturas en todos los campos para determinar el porcentaje de viabilidad y de inactivación con el colorante azul de metileno amortiguado usando un microscopio óptico para su análisis.

El tratamiento se realizó de la siguiente manera: se colocaron 10 mL de agua potable comercial, se encendió el generador de ozono y se dejó por 15 minutos para saturar el agua, se apagó y el agua ozonada se colectó en un tubo para centrífuga de 50 mL y se colocó en hielo para evitar que se perdiera el ozono.

La cantidad de ozono generada se debe mantener constante, por lo que es necesario determinar que flujo llega a la muestra, la cantidad de ozono generada y la cantidad de ozono disuelto. El flujo se obtuvo de tablas de la Cole-parmer ya que de esta marca es el flujómetro que se tiene en el laboratorio.

Se trabajó con un reactor vertical delgado y alargado cuya capacidad volumétrica fue de 50 mL, con una entrada de oxígeno con ozono en la parte inferior, el cual

se distribuyó en la columna de agua a través de un vidrio poroso, lo que facilitó el burbujeo fino y una distribución homogénea del gas en el líquido.

#### 6.6.4. Tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a diferentes pH y tiempos de contacto

En esta etapa se trabajó con peróxido de hidrógeno al 30% de acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas preliminares, se decidió aumentar esta concentración para ver si resultaba más significativa la inactivación a este porcentaje ya que en la primera etapa se obtuvo un porcentaje máximo de inactivación de 60.58% a pH 10. También se decidió manejar cantidades mayores de agua potable comercial a diferentes pH 5, 7 y 10, y solamente dos tiempos de contacto 60 y 120 minutos.

**Tabla 15.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% a pH 5 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

Composición de la mezcla	Tubos Eppendorf						Testigo
	1	2	3	4	5	6	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30% (mL)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	x
Agua a pH 5 (mL)	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7
Volumen del concentrado de quistes (mL)	1	1	1	1	1	1	1
Tiempo 60 y 120 (min)	si	si	si	si	si	si	si
Temperatura (°C)	27	27	27	27	27	27	27
Concentración mol/L de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30%	9.7	9.7	9.7	9.7	9.7	9.7	x

Se realizó una prueba y dos repeticiones.

**Tabla 16.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% a pH 7 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

Composición de la mezcla	Tubos Eppendorf						Testigo
	1	2	3	4	5	6	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30% (mL)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	x
Agua a pH 7 (mL)	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7
Volumen del concentrado de quistes (mL)	1	1	1	1	1	1	
Tiempo 60 y 120 (min)	si	si	si	si	si	si	si
Temperatura (°C)	27	27	27	27	27	27	27
Concentración mol/L de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30%	9.7	9.7	9.7	9.7	9.7	9.7	x

Se realizó una prueba y dos repeticiones.

**Tabla 17.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% a pH 10 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

Composición de la mezcla	Tubos Eppendorf						Testigo
	1	2	3	4	5	6	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30% (mL)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	x
Agua a pH 10 (mL)	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7
Volumen del concentrado de quistes (mL)	1	1	1	1	1	1	1
Tiempo 60 y 120 (min)	si	si	si	si	si	si	si
Temperatura (°C)	27	27	27	27	27	27	27
Concentración mol/L de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30%	9.7	9.7	9.7	9.7	9.7	9.7	x

Se realizó una prueba y dos repeticiones.

En el caso del testigo solamente se puso en contacto con aire. Transcurrido este tiempo, para cada uno de los tratamientos se centrifugó a 1500 rpm/8 min, se retiró y se resuspendió el sedimento en agua a pH neutro y se realizaron 10 lavados, esto se hizo con la finalidad de eliminar el peróxido de hidrógeno a los diferentes pH 5, 7 y 10.

Después de los lavados, los quistes se resuspendieron en 1 mL de agua a pH neutro, se procedió a realizar el conteo de los quistes recuperados en 5 µL. Para observar la viabilidad y la inactivación se usó el colorante azul de metileno amortiguado, se realizó el análisis en un microscopio óptico a 40x.

#### 6.6.5. Tratamiento con ozono (O<sub>3</sub>) a diferentes pH y tiempos de contacto

En esta etapa se trabajó con un ozonador de la marca Ozone Ecological Equipments de menor capacidad, se le suministró oxígeno industrial como gas de alimentación con un gasto de 0.624 L/min que se pudo controlar con una válvula check adaptada a un rotámetro o flujómetro, de esta manera se pudo tener una tasa fija de ozono disuelto en la muestra, que se determinó por el método colorimétrico de índigo, obteniéndose 1.6 mgO<sub>3</sub>/L.

Para cada una de las condiciones de pH para el tratamiento con ozono, se colocaron en un reactor 9 mL de agua potable comercial a diferentes pH 5, 7 y 10, 1 mL del concentrado de quistes y se llevó a cabo el tratamiento durante 3, 5, 7 y 10 minutos a una temperatura de 27 °C

**Tabla 18.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono pH 5 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

Composición de la mezcla	Tubos Eppendorf						Testigo
	1	2	3	4	5	6	
Agua a pH 5 (mL)	9	9	9	9	9	9	9
Volumen del concentrado de quistes (mL)	1	1	1	1	1	1	1
Tiempo 3, 5 7 y 10 (min)	si	si	si	si	si	si	si
Temperatura (°C)	27	27	27	27	27	27	27
Concentración mol/L de O <sub>3</sub>	0.033	0.033	0.033	0.033	0.033	0.033	x

Se realizó una prueba y dos repeticiones.

**Tabla 19.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono pH 7 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

Composición de la mezcla	Tubos Eppendorf						Testigo
	1	2	3	4	5	6	
Agua a pH 7 (mL)	9	9	9	9	9	9	9
Volumen del concentrado de quistes (mL)	1	1	1	1	1	1	1
Tiempo 3, 5 7 y 10 (min)	si	si	si	si	si	si	si
Temperatura (°C)	27	27	27	27	27	27	27
Concentración mol/L de O <sub>3</sub>	0.033	0.033	0.033	0.033	0.033	0.033	x

Se realizó una prueba y dos repeticiones.

**Tabla 20.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono pH 10 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

Composición de la mezcla	Tubos Eppendorf						Testigo
	1	2	3	4	5	6	
Agua a pH 10 (mL)	9	9	9	9	9	9	9
Volumen del concentrado de quistes (mL)	1	1	1	1	1	1	1
Tiempo 3, 5 7 y 10 (min)	si	si	si	si	si	si	si
Temperatura (°C)	27	27	27	27	27	27	27
Concentración mol/L de O <sub>3</sub>	0.033	0.033	0.033	0.033	0.033	0.033	x

Se realizó una prueba y dos repeticiones.

En el caso del testigo solo se puso en contacto con aire. Se encendió el generador de ozono y se mantuvo el tratamiento durante los 3, 5, 7 y 10 minutos, se apagaba el generador de ozono, se recuperaba la muestra, para ello se realizaron 5 lavados al reactor para recuperar la mayor cantidad de quistes.



Transcurrido el tiempo cada uno de los tratamientos se centrifugó a 1500 rpm/8 minutos, realizándose 10 lavados con agua a pH neutro para eliminar las soluciones a los diferentes pH, después de los lavados los quistes se resuspendieron en 1 mL de agua a pH neutro, se realizó el conteo en 5  $\mu$ L, para determinar la viabilidad y la inactivación utilizando el colorante azul de metileno amortiguado, se realizó el recuento con el uso de un microscopio óptico a 40x.

Para las pruebas confirmativas sólo se trabajó con los tiempos 7 y 10 minutos en donde se obtuvieron los mejores porcentajes de inactivación.

### 6.6.7. Tratamiento con ozono y peróxido de hidrógeno al 30% ( $O_3/H_2O_2$ ) a diferentes pH y tiempos de contacto

Con lo que respecta a la concentración utilizada en esta combinación  $O_3/H_2O_2$ , en esta etapa se tomó la decisión de aumentar la concentración del peróxido de hidrógeno a 30% porque en la primera etapa solo se obtuvo un porcentaje de inactivación a pH 10 del 34.1% que fue poco relevante.

Para cada una de las condiciones de pH para el tratamiento con ozono/peróxido de hidrógeno se colocó en un reactor 1 mL del concentrado de quistes, 0.3 mL de peróxido de hidrógeno al 30% y 8.7 mL de agua potable comercial a diferentes pH, se llevó a cabo el tratamiento por 3, 5, 7 y 10 minutos, a una temperatura de 27 °C.

**Tabla 21.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono/peróxido de hidrógeno al 30% a pH 5 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

Composición de la mezcla	Tubos Eppendorf						Testigo
	1	2	3	4	5	6	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30% (mL)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	x
Agua a pH 5 (mL)	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7
Volumen del concentrado de quistes (mL)	1	1	1	1	1	1	1
Tiempo 3, 5, 7 y 10 (min)	si	si	si	si	si	si	si
Temperatura (°C)	27	27	27	27	27	27	27
Concentración mol/L de $O_3/H_2O_2$	0-0034	0-0034	0-0034	0-0034	0-0034	0-0034	x

Se realizó una prueba y dos repeticiones.

**Tabla 22.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono/peróxido de hidrógeno al 30% a pH 7 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

Composición de la mezcla	Tubos Eppendorf						Testigo
	1	2	3	4	5	6	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30% (mL)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	x
Agua a pH 7 (mL)	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7
Volumen del concentrado de quistes (mL)	1	1	1	1	1	1	1
Tiempo 3, 5, 7 y 10 (min)	si	si	si	si	si	si	si
Temperatura (°C)	27	27	27	27	27	27	27
Concentración mol/L de O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0-0034	0-0034	0-0034	0-0034	0-0034	0-0034	x

Se realizó una prueba y dos repeticiones.

**Tabla 23.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono/peróxido de hidrógeno al 30% a pH 10 para inactivar quistes de *G. lamblia*.

Composición de la mezcla	Tubos Eppendorf						Testigo
	1	2	3	4	5	6	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30% (mL)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	x
Agua a pH 10 (mL)	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7
Volumen del concentrado de quistes (mL)	1	1	1	1	1	1	1
Tiempo 3, 5, 7 y 10 (min)	si	si	si	si	si	si	si
Temperatura (°C)	27	27	27	27	27	27	27
Concentración mol/L de O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0-0034	0-0034	0-0034	0-0034	0-0034	0-0034	x

Se realizó una prueba y dos repeticiones.

En el caso del testigo solo se puso en contacto con aire. Se encendió el generador de ozono y se dejó el tratamiento durante los 3, 5, 7 y 10 minutos, se apagó el generador de ozono, se recuperó la muestra, para ello se realizaron 5 lavados al reactor para recuperar la mayor cantidad de quistes.

Para las pruebas confirmativas solo se trabajó con los tiempos 7 min (Factor CT para el ozono: 11.2 mg/L\*min) y 10 min (Factor CT para el ozono: 16 mg/L\*min),

Transcurrido el tiempo cada uno de los tratamientos se centrifugó a 1500 rpm/8 minutos, realizándose 5 lavados con agua a pH neutro para eliminar las soluciones a los diferentes pH, después de los lavados los quistes se resuspendieron en 1 mL de agua a pH neutro, se realizó el conteo en 5 µL, para determinar la viabilidad y la inactivación utilizando el colorante azul de metileno amortiguado, se realizó el análisis en un microscopio óptico a 40x.

## **6.7. Pruebas de viabilidad**

Se usó un control sin tratamiento al cual se le ajustó el pH a 5, 7 y 10, después se determinó la viabilidad de los quistes de *G. lamblia* una vez que fueron tratados.

Se determinó la viabilidad de los quistes por el método de exclusión del colorante de Bingham y Meyer (1979) y por el método de desenquistamiento *in vitro* de Rice y Shaefer III (1981).

### **6.7.1. Determinación de la viabilidad de los quistes de *G. lamblia* por el método de exclusión del colorante azul de metileno amortiguado de Bingham y Meyer, 1979.**

Se tomaron 5  $\mu$ L de una muestra de quistes de *G. lamblia* que fueron tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10% y 30%, O<sub>3</sub>, O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se les adicionó azul de metileno amortiguado al 1%, dejándose a temperatura ambiente por 3 minutos. Se determinó con ayuda de un microscopio óptico, si se incorporaba o no el colorante en el quiste, los quistes teñidos son no viables y los quistes incoloros son viables, las observaciones se realizaron a 40x.

Durante todo el trabajo se evaluó así su inactivación, ya que al realizar la microscopía óptica es fácil visualmente establecer qué quistes incorporan o no el colorante en su citoplasma y que quistes lo excluyen, de esta manera también se eliminan errores de interpretación al momento de hacer las lecturas.

### **6.7.2. Determinación de la viabilidad de *G. lamblia* por el método de desenquistamiento *in vitro* de Rice y Shaefer III, 1981.**

Se tomaron 200  $\mu$ L de quistes de *G. lamblia* que fueron tratados con O<sub>3</sub>, O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% a pH 10, y se les adicionaron 2 mL de solución de Hanks, se homogeneizó en un vórtex y se puso en una incubadora a 37 °C durante 30 minutos, se centrifugó a 10,000 rpm/3 minutos, se resuspendió en 0.5 mL de solución Tyrode precalentado a 37 °C, se inoculó en medio TYI-S-33, posteriormente se realizaron las observaciones de los trofozoítos de *G. lamblia* en un microscopio invertido y

en un microscopio óptico a 40x. Se usó un testigo el cual no fue sometido a ningún tratamiento.

## 6.8. Inactivación de *Toxocara canis*

### 6.8.1. Tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a diferentes pH y tiempos de contacto

Para cada una de las condiciones de pH para el tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% se colocó en un tubo de plástico para centrifuga de 50 mL se colocó 1 mL del concentrado de huevos, 0.3 mL de peróxido de hidrógeno al 30% y 8.7 mL de agua potable comercial a diferentes pH, el tratamiento se llevó a cabo por 60 y 120 minutos a 26 °C.

**Tabla 24.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% a pH 5 para inactivar huevos de *T. canis*.

Composición de la mezcla	Tubos Eppendorf						Testigo
	1	2	3	4	5	6	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30% (mL)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	x
Agua a pH 5 (mL)	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7
Volumen del concentrado de huevos (mL)	1	1	1	1	1	1	1
Tiempo 60 y 120 (min)	si	si	si	si	si	si	si
Temperatura (°C)	26	26	26	26	26	26	26
Concentración mol/L de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30%	9.7	9.7	9.7	9.7	9.7	9.7	x

Se realizó una prueba y una repetición.

**Tabla 25.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% a pH 7 para inactivar huevos de *T. canis*.

Composición de la mezcla	Tubos Eppendorf						Testigo
	1	2	3	4	5	6	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30% (mL)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	x
Agua a pH 7 (mL)	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7
Volumen del concentrado de huevos (mL)	1	1	1	1	1	1	1
Tiempo 60 y 120 (min)	si	si	si	si	si	si	si
Temperatura (°C)	26	26	26	26	26	26	26
Concentración mol/L de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30%	9.7	9.7	9.7	9.7	9.7	9.7	x

Se realizó una prueba y una repetición.

**Tabla 26.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% a pH 10 para inactivar huevos de *T. canis*.

Composición de la mezcla	Tubos Eppendorf						Testigo
	1	2	3	4	5	6	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30% (mL)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	x
Agua a pH 10 (mL)	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7
Volumen del concentrado de huevos (mL)	1	1	1	1	1	1	1
Tiempo 60 y 120 (min)	si	si	si	si	si	si	si
Temperatura (°C)	26	26	26	26	26	26	26
Concentración mol/L de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30%	9.7	9.7	9.7	9.7	9.7	9.7	x

Se realizó una prueba y una repetición.

Transcurrido este tiempo, para cada uno de los tratamientos se centrifugó a 2000 rpm /5 min, se retiró y se resuspendió el sedimento en agua a pH neutro y se realizaron 5 lavados, esto se hizo con la finalidad de eliminar el peróxido de hidrógeno a los diferentes pH. Se resuspendió el sedimento en donde se encontraban los huevos con 5 mL de una solución de formaldehído al 2%, se incubaron los huevos por un período de cuatro semanas a 28 °C con agitación constante en condiciones de obscuridad, realizándose observaciones cada tres días para verificar la embrionación de los huevos.

Después de los 28 días de incubación se realizó el conteo de los huevos en 5 µL entre porta y cubreobjetos de 18x18 mm para observar la viabilidad y la inactivación. El conteo se realizó con el uso de un microscopio óptico a 40x.

Para el caso del testigo o control se justó el pH a 5, 7 y 10, se realizó un conteo antes (estos datos corresponden a la concentración inicial de HH) y después de cada tratamiento y solo se puso en contacto con aire.

### 6.8.2. Tratamiento con ozono (O<sub>3</sub>) a diferentes pH y tiempos de contacto

En esta etapa se trabajó con un ozonador de la marca Ozone Ecological Equipments de menor capacidad, se le suministró oxígeno industrial como gas de alimentación con un gasto de 0.624 L/min que se puede controlar con una válvula check adaptada a un rotámetro o flujómetro, de esta manera se pudo

tener una tasa fija de ozono disuelto en la muestra, que se determinó por el método colorimétrico de índigo, obteniéndose 1.6 mgO<sub>3</sub>/L. En el caso del testigo solo fue tratado con aire.

**Tabla 27.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono a pH 5 para inactivar huevos de *T. canis*.

Composición de la mezcla	Tubos Eppendorf						Testigo
	1	2	3	4	5	6	
Agua a pH 5 (mL)	9	9	9	9	9	9	9
Volumen del concentrado de huevos (mL)	1	1	1	1	1	1	1
Tiempo 60 y 120 (min)	si	si	si	si	si	si	si
Temperatura (°C)	27	27	27	27	27	27	27
Concentración mol/L de O <sub>3</sub>	0.033	0.033	0.033	0.033	0.033	0.033	x

Se realizó una prueba y una repetición.

**Tabla 28.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono a pH 7 para inactivar huevos de *T. canis*.

Composición de la mezcla	Tubos Eppendorf						Testigo
	1	2	3	4	5	6	
Agua a pH 7 (mL)	9	9	9	9	9	9	9
Volumen del concentrado de huevos(mL)	1	1	1	1	1	1	1
Tiempo 60 y 120 (min)	si	si	si	si	si	si	si
Temperatura (°C)	27	27	27	27	27	27	27
Concentración mol/L de O <sub>3</sub>	0.033	0.033	0.033	0.033	0.033	0.033	x

Se realizó una prueba y una repetición.

**Tabla 29.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono a pH 10 para inactivar huevos de *T. canis*.

Composición de la mezcla	Tubos Eppendorf						Testigo
	1	2	3	4	5	6	
Agua a pH 10 (mL)	9	9	9	9	9	9	9
Volumen del concentrado de huevos(mL)	1	1	1	1	1	1	1
Tiempo 60 y 120 (min)	si	si	si	si	si	si	si
Temperatura (°C)	27	27	27	27	27	27	27
Concentración mol/L de O <sub>3</sub>	0.033	0.033	0.033	0.033	0.033	0.033	x

Se realizó una prueba y una repetición.

Para cada una de las condiciones de pH para el tratamiento con ozono, se colocaron en un reactor 9 mL de agua potable comercial a diferentes pH 5, 7 y 10, 1 mL del concentrado de huevos, se llevó a cabo el tratamiento durante 60 y 120 minutos a 22 °C. Se inició la generación de ozono y se dejó el tratamiento durante los 60 y 120 minutos. Al finalizar la generación de ozono, se recuperó la muestra, para ello se realizaron 10 lavados al reactor para recuperar la mayor cantidad de huevos, ya que debido a sus componentes estos pueden llegar a ser pegajosos y quedarse en las paredes del reactor.

Para cada uno de los tratamientos se centrifugó a 2000 rpm/5 minutos, realizándose 5 lavados con agua a pH neutro para eliminar las soluciones a los diferentes pH; después de los lavados los huevos se resuspendieron en 5 mL de una solución de formaldehído al 2%, se incubaron a 28 °C por un período de cuatro semanas, en condiciones de obscuridad y agitación constante, realizándose observaciones cada tercer día para verificar la embrionación de los huevos, después de la incubación se realizó el conteo en 5  $\mu$ L, entre porta y cubreobjetos de 18x18 mm para determinar la viabilidad y la inactivación, con el uso de un microscopio óptico a 40x.

### **6.8.3. Tratamiento con ozono y peróxido de hidrógeno al 30% ( $O_3/H_2O_2$ ) a diferentes pH y tiempos de contacto**

Para cada una de las condiciones de pH para el tratamiento con ozono/peróxido de hidrógeno se colocaron en un reactor 1 mL del concentrado de huevos, 0.3 mL de peróxido de hidrógeno al 30% y 8.7 mL de agua a diferentes pH, se llevó a cabo el tratamiento por 60 y 120 minutos a 22 °C. Se encendió el generador de ozono y se dejó el tratamiento durante los 60 y 120 minutos, se apagó el generador de ozono, se recuperó la muestra; para ello se realizaron 10 lavados al reactor para recuperar la mayor cantidad de huevos.

**Tabla 30.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono/peróxido al 30% de hidrógeno a pH 5 para inactivar huevos de *T. canis*.

Composición de la mezcla	Tubos Eppendorf						Testigo
	1	2	3	4	5	6	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30% (mL)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	x
Agua a pH 5 (mL)	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7
Volumen del concentrado de huevos (mL)	1	1	1	1	1	1	1
Tiempo 60 y 120 (min)	si	si	si	si	si	si	si
Temperatura (°C)	22	22	22	22	22	22	22
Concentración mol/L de O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0-0034	0-0034	0-0034	0-0034	0-0034	0-0034	x

Se realizó una prueba y una repetición.

**Tabla 31.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono/peróxido de hidrógeno al 30% a pH 7 para inactivar huevos de *T. canis*.

Composición de la mezcla	Tubos Eppendorf						Testigo
	1	2	3	4	5	6	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30% (mL)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	x
Agua a pH 7 (mL)	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7
Volumen del concentrado de huevos (mL)	1	1	1	1	1	1	1
Tiempo 60 y 120 (min)	si	si	si	si	si	si	si
Temperatura (°C)	22	22	22	22	22	22	22
Concentración mol/L de O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0-0034	0-0034	0-0034	0-0034	0-0034	0-0034	x

Se realizó una prueba y una repetición.

**Tabla 32.** Composición de la mezcla y condiciones de tratamiento con ozono/peróxido de hidrógeno al 30% a pH 10 para inactivar huevos de *T. canis*.

Composición de la mezcla	Tubos Eppendorf						Testigo
	1	2	3	4	5	6	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30% (mL)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	x
Agua a pH 10 (mL)	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7
Volumen del concentrado de huevos (mL)	1	1	1	1	1	1	1
Tiempo 60 y 120 (min)	si	si	si	si	si	si	si
Temperatura (°C)	22	22	22	22	22	22	22
Concentración mol/L de O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0-0034	0-0034	0-0034	0-0034	0-0034	0-0034	x

Se realizó una prueba y una repetición.

En el caso del control o testigo se ajustó el pH a 5, 7, 10, y solo se puso en contacto con aire.

Después cada uno de los tratamientos se centrifugó a 2000 rpm /5 minutos, realizándose 5 lavados con agua a pH neutro para eliminar las soluciones a los

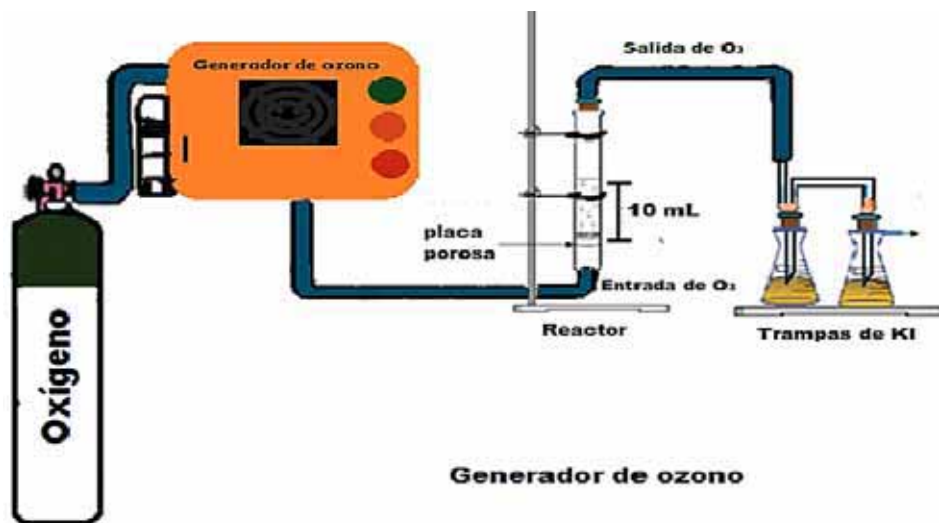


diferentes pH, después de los lavados los huevos se resuspendieron en 5 mL de una solución de formaldehído al 2%, se incubaron los huevos por un período de cuatro semanas a 28 °C con agitación constante en condiciones de obscuridad, realizándose observaciones cada tres días para verificar la embrionación de los huevos.

Después de los 28 días de incubación se realizó el conteo de los huevos en 5  $\mu$ L entre porta y cubreobjetos de 18x18 mm, para observar la viabilidad y la inactivación. El recuento se realizó con el uso de un microscopio óptico a 40x.

La razón por la que se eligió un reactor de capacidad de 50 mL semi-bach fue porque se trabajó con muestras pequeñas y el riesgo de infección que se tiene al manejar este tipo de parásitos es alto. El tamaño de la muestra que se trabajó fue de 10 mL en donde estaban suspendidos los quistes de *G. lamblia* y los huevos del helminto *T. canis*.

El tratamiento se realizó de la siguiente manera: se colocaron 10 mL de agua a diferentes pH se encendía el generador de ozono y se dejó a diferentes tiempos, se apagó y el agua ozonada con los quistes y los huevos se colectó en un tubo para centrífuga de 50 mL (Figura 11).



**Figura 12. Aparato de ozonación.** El ozono se generó utilizando oxígeno a través de la corona de descarga interna del generador de ozono, este pasa directa y continuamente hacia el reactor en donde se encuentra la muestra, el ozono sale y se dirige hacia el sistema de destrucción que son las trampas de yoduro de potasio (Modificado de Ibáñez *et al.*, 2013).

## 6.9. Microscopía óptica

Se tomaron fotografías con cámara digital, las cuales muestran los daños que se observaron al microscopio óptico a 40x. Después de realizar los tratamientos, de esta manera se puede ver el daño que sufren los quistes (las dos membranas quísticas), así como también el daño que presentan los HH durante los tres diferentes tratamientos de oxidación al que se pusieron en contacto  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_3$  y  $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ .

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Inactivación de quistes de *Giardia lamblia*

#### 7.1.1. Tratamiento con peróxido de hidrógeno al 10% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a diferentes pH y tiempos de contacto

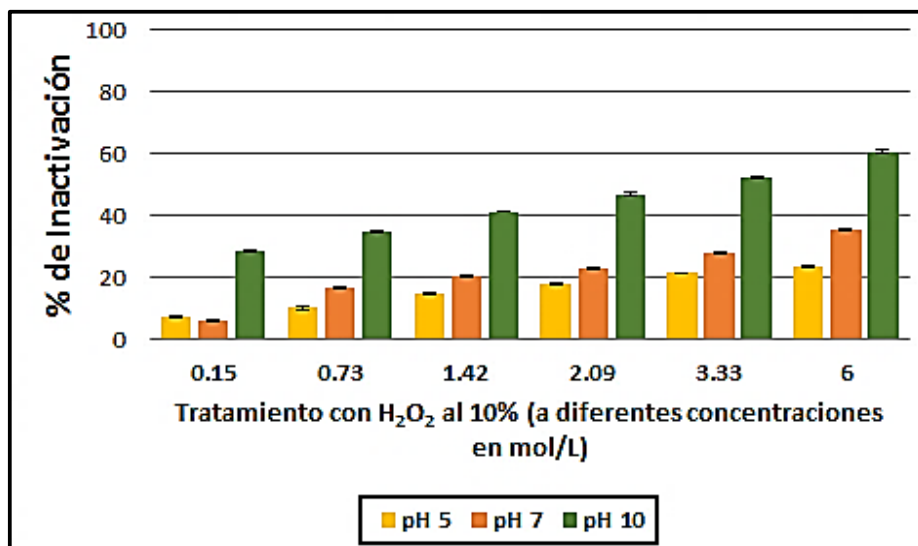
En la figura 13 se muestran los resultados de la inactivación de los quistes de *G. lamblia* después de haber sido tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10% a diferentes concentraciones en mol/ L a los 120 minutos de contacto, la finalidad de haber trabajado con diferentes concentraciones fue para encontrar una mínima concentración que diera porcentajes de inactivación altos, encontrando que a 6 mol/L se obtuvo un 60.58% de inactivación.

**Tabla 33.** Porcentaje de inactivación de quistes de *G. lamblia* a los 120 minutos de exposición con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10% a diferentes concentraciones a pH 5, 7 y 10.

Concentración mol/L de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 10%	% de inactivación	*Desv. Std.	% de inactivación	Desv. Std.	% de inactivación	Desv. Std.
0.15	7.44	0.28	6.28	0.26	28.48	0.38
0.73	10.2	0.46	16.45	0.26	34.94	0.24
1.42	14.76	0.42	20.58	0.32	41.34	0.24
2.09	17.87	0.38	23.08	0.39	46.74	0.63
3.33	21.44	0.21	27.97	0.32	52.21	0.49
6	23.57	0.28	35.35	0.26	60.58	0.57
	pH 5		pH 7		pH 10	

\*Desviación estándar

Sólo se graficaron los resultados obtenidos a los 120 minutos de tratamiento con peróxido de hidrógeno al 10% ya que a este tiempo se obtuvo el mayor porcentaje de inactivación a diferentes pH: 5, 7 y 10 (Figura 13).



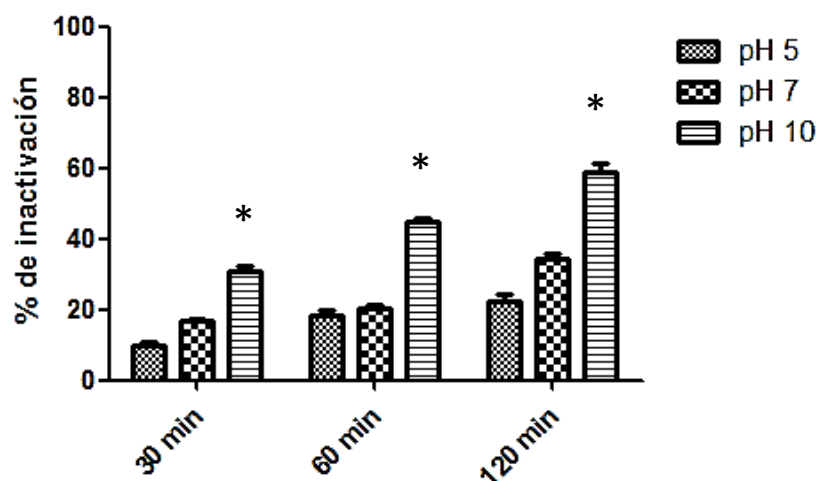
**Figura 13.** Porcentaje de inactivación de quistes de *G. lamblia* a los 120 minutos de exposición con  $H_2O_2$  al 10% a diferentes concentraciones y pH.

La baja eficiencia de inactivación del peróxido de hidrógeno que hace necesario tiempos prolongados de contacto para alcanzar valores por arriba del 50% ha sido reportada también por otros autores (Abdullah *et al.*, 2007; De Dios, 2005). El peróxido de hidrógeno no tiene una alta actividad para inactivar protozoarios, a pesar de ser una excelente fuente de radicales  $\bullet OH$  y  $O_2^{\bullet -}$  los cuales resultan ser tóxicos para otros microorganismos (Tang, 2004; Labas *et al.*, 2008).

En la figura 14 se muestran los resultados de inactivación de los quistes de *G. lamblia* después de haber sido tratados con  $H_2O_2$  al 10%, donde se observa que hay una diferencia estadísticamente significativa entre el pH 5 y pH 10 en cuanto a inactivación sobre los quistes. Se presentó mayor inactivación de acuerdo al incremento del tiempo de contacto; en cuanto al pH se observó que a pH alcalino siempre se lograron porcentajes superiores de inactivación a los otros valores de pH utilizados. En todos los casos la inactivación no logró eliminar el riesgo de transmisión.

**Tabla 34.** Porcentaje de inactivación de quistes de *G. lamblia* con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10% a diferentes tiempos de contacto a pH 5, 7 y 10.

pH	t= 30 min	t= 60 min	t= 120 min
5	10.33 %	19.52 %	23.57 %
7	17.26 %	21.08 %	35.35 %
10	32.05 %	45.53 %	60.58 %



**Tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10% (3 mol/L) a diferentes tiempos y pH**

**Figura 14.** Porcentaje de inactivación de quistes de *G. lamblia* tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10% a diferentes tiempos de contacto y pH. Existe una diferencia estadísticamente significativa (P=<0.0366) entre el pH 5 y pH 10. Se utilizó un estudio estadístico de ANOVA con una prueba de Turkey.

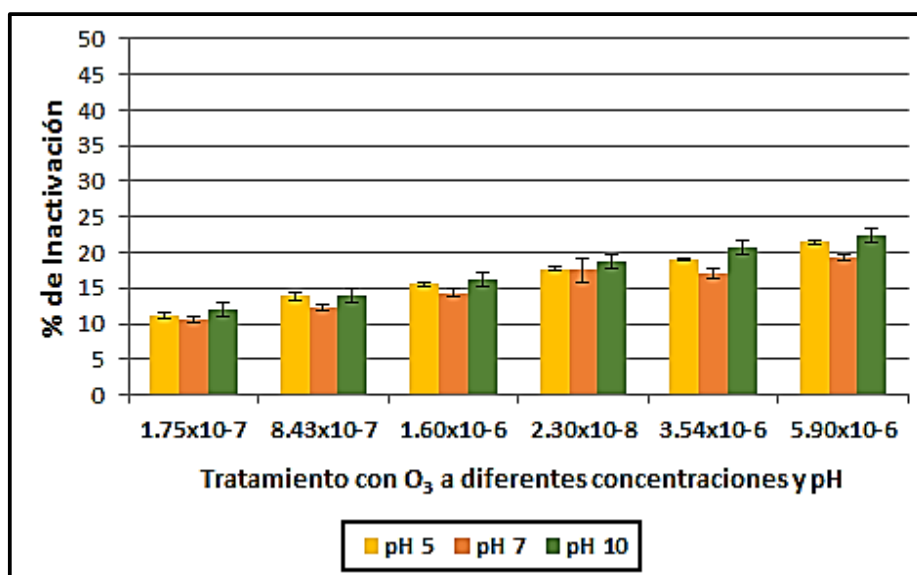
### 7.1.2. Tratamiento con ozono (O<sub>3</sub>) a diferentes pH y 120 minutos de contacto

La inactivación de quistes originada por agua saturada con ozono a diferentes tiempos de contacto y pH se muestra en la figura 15. En general, al incrementar la presencia de ozono se aumentó la actividad parasiticida, así como el pH alcalino presentó mejor inactivación. Se obtuvo un porcentaje de inactivación a pH 10 de 22.31% que fue el más alto, seguido de un 21.49% a pH 5, y un 19.37% a un pH de 7. Estos resultados muestran la baja eficiencia del agua saturada con ozono, por lo que no es una buena opción este tratamiento para inactivar quistes del protozoo *G. lamblia*.

**Tabla 35.** Porcentaje de inactivación de quistes de *G. lamblia* tratados con agua saturada con ozono a diferentes concentraciones y pH diferentes con un tiempo de contacto de 120 minutos.

Concentración mol/L de O <sub>3</sub>	% de inactivación	*Desv. Std.	% de inactivación	Desv. Std.	% de inactivación	Desv. Std.
1.75x10 <sup>-7</sup>	11.06	0.42	10.6	0.36	12.05	0.29
8.43x10 <sup>-7</sup>	13.86	0.52	12.37	0.42	14.04	0.42
1.60x10 <sup>-6</sup>	15.53	0.22	14.32	0.53	16.22	0.54
2.30x10 <sup>-8</sup>	17.64	0.26	17.48	1.63	18.85	0.42
3.54x10 <sup>-6</sup>	19.01	0.26	17.03	0.59	20.58	0.27
5.90x10 <sup>-6</sup>	21.49	0.26	19.37	0.48	22.31	0.37
	pH 5		pH 7		pH 10	

\*Desviación estándar.



**Figura 15.** Porcentaje de inactivación de quistes de *G. lamblia* a 120 minutos de contacto a diferentes concentraciones de O<sub>3</sub> en agua y pH. Factor CT para el ozono: 204 mgO<sub>3</sub>/L\*min.

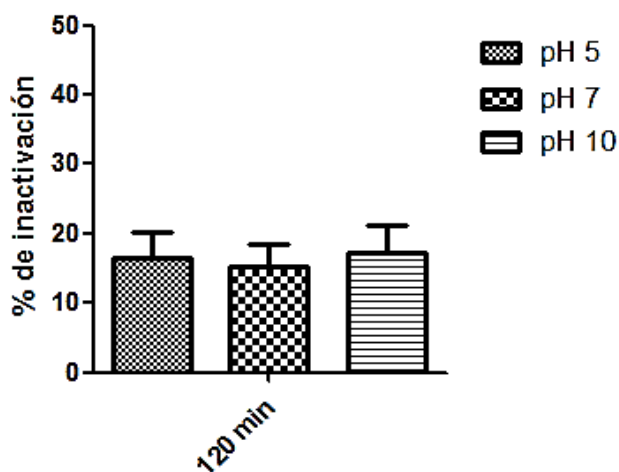
El ozono puede reaccionar con las sustancias de forma directa e indirecta, en este caso reaccionó de forma indirecta ya que a un pH de 10 hay mayor producción de radicales hidroxilo, favoreciendo que el ozono reaccione sobre los quistes (Gottschalk *et al.*, 2000).

En la figura 16 se muestran los resultados de inactivación de quistes de *G. lamblia* después de haber sido tratados con ozono con un tiempo de contacto de 120 minutos y pH 5, 7 y 10, no hay una diferencia estadísticamente significativa entre

los diferentes pH, por lo que el agua saturada con ozono no logró eliminar el riesgo de transmisión.

**Tabla 36.** Porcentaje de inactivación de quistes tratados a los 120 min con ozono a diferentes pH.

pH	t= 120 min
5	21.49%
7	19.37%
10	22.31%



**Tratamiento con H<sub>2</sub>O saturada con O<sub>3</sub> a diferentes pH y 120 min.**

**Figura 16.** Inactivación de quistes de *G. lamblia* tratados con agua saturada con ozono a pH diferentes con un tiempo de contacto de 120 minutos. No existe una diferencia estadísticamente significativa ( $P=0.9385$ ) con respecto a los diferentes pH.

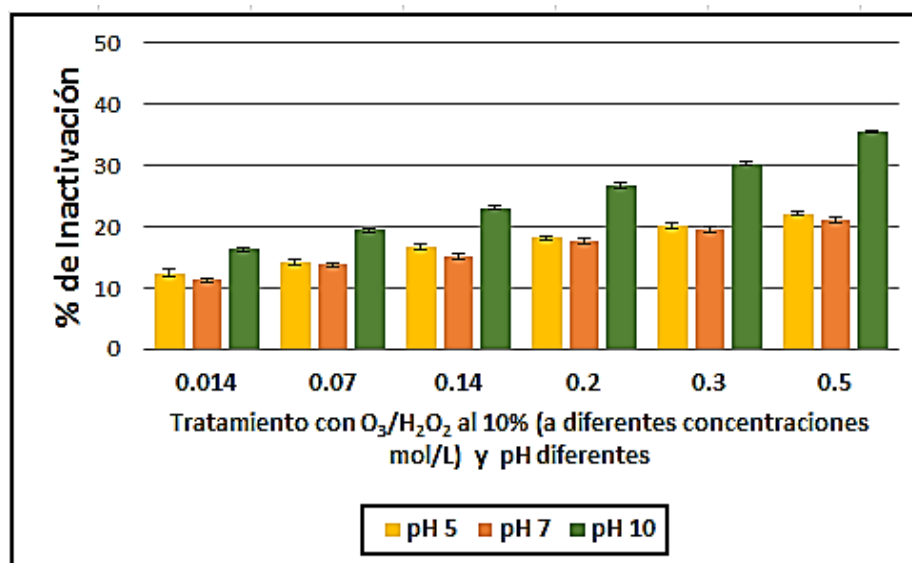
### 7.1.3. Tratamiento con ozono/peróxido de hidrógeno al 10% a diferentes pH y 120 minutos de contacto

En la figura 17 se muestran los resultados de inactivación después de haber sido tratados con la combinación de O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10%, en donde el porcentaje más alto de inactivación que se obtuvo fue de 35.53% a un pH de 10 con un tiempo de contacto de 120 min y una concentración de 0.5 mol/L, seguido de un 22.14% a un pH de 5; finalmente a un pH de 7 se obtuvo un 21.09%. En general, con la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10% se obtuvo baja eficiencia, por lo que no es una buena opción para inactivar quistes de *G. lamblia*.

**Tabla 37.** Porcentaje de inactivación de quistes de *G. lamblia* a los 120 minutos de contacto con una solución de agua saturada con ozono y peróxido de hidrógeno al 10% a diferentes concentraciones y pH.

Concentración mol/L de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 10% y O <sub>3</sub>	% de inactivación	*Desv. Std.	% de inactivación	Desv. Std.	% de inactivación	Desv. Std.
0.014	12.42	0.56	11.27	0.25	16.31	0.25
0.07	14.07	0.48	13.76	0.35	19.38	0.43
0.14	16.7	0.41	15.15	0.37	23.09	0.26
0.2	18.17	0.35	17.64	0.4	26.81	0.5
0.3	20.12	0.4	19.52	0.41	30.31	0.37
0.5	22.14	0.35	21.09	0.41	35.54	0.25
	pH 5		pH 7		pH 10	

\*Desviación estándar.



**Figura 17.** Porcentaje de inactivación de quistes de *G. lamblia* a los 120 minutos de contacto con una solución de agua saturada con ozono y peróxido de hidrógeno al 10% a diferentes concentraciones y pH. Factor CT para el ozono: 204 mgO<sub>3</sub>/L\*min.

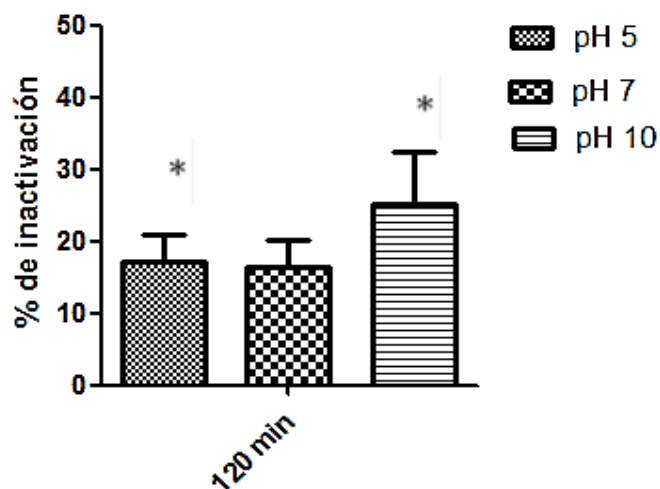
Se encontró que hubo una diferencia estadísticamente significativa entre el pH 5 y pH 7, así como entre el pH 7 y pH 10 con el tratamiento con O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> los 120 minutos de contacto (Figura 18), posiblemente el porcentaje de inactivación de 35.53% no se deba realmente al ozono sino más bien al peróxido de hidrógeno que está actuando (Figura 13), ya que resulta ser un fuerte oxidante, el hecho de



haber solamente saturado agua con ozono, no permite obtener buenos resultados de inactivación. Por lo que resulta ser un tratamiento no efectivo para inactivar quistes del protozario *G. lamblia*.

**Tabla 38.** Porcentaje de inactivación de quistes tratados a los 120 min con ozono y peróxido de hidrógeno a diferentes pH.

pH	t= 120 min
5	22.14%
7	21.09%
10	35.54%



**Tratamiento con  $O_3/H_2O_2$  a los 120 minutos de contacto**

**Figura 18.** Inactivación de quistes de *G. lamblia* tratados con agua saturada con ozono/peróxido de hidrógeno al 10% a pH diferentes con un tiempo de contacto de 120 minutos. Existe una diferencia estadísticamente significativa ( $P=0.0161$ ) con respecto a pH 5 y pH 10 así como a pH 7 y pH 10.

#### 7.1.4. Tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% ( $H_2O_2$ ) a diferentes pH y tiempos de contacto

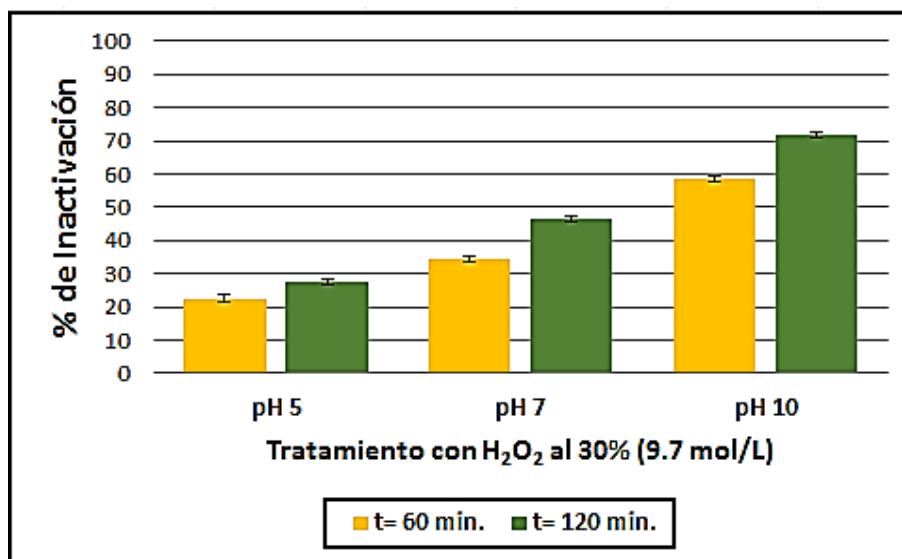
Para esta segunda etapa se consideró trabajar con una concentración del 30 % de peróxido de hidrógeno debido a que en la primera parte los porcentajes obtenidos eran no significativos, el peróxido por sí solo no resulta ser un potente

parasiticida, debido a que necesita de concentraciones altas y tiempos de contacto largos (necesita de más tiempo para reaccionar y alcanzar a tener una mayor efectividad ), que es lo que se observa en estos resultados, es por ello también que ya no se trabajó con un tiempo de contacto de 30 minutos.

En la figura 19 se muestran los porcentajes de inactivación con peróxido de hidrógeno al 30% se presentó mayor inactivación cuando se incrementó el tiempo de contacto; en cuanto al pH se observó que a pH alcalino se logró un porcentaje de inactivación de 71.86%, a un pH ácido se obtuvo un 27.25% y a pH neutro sólo se logró un 46.57%.

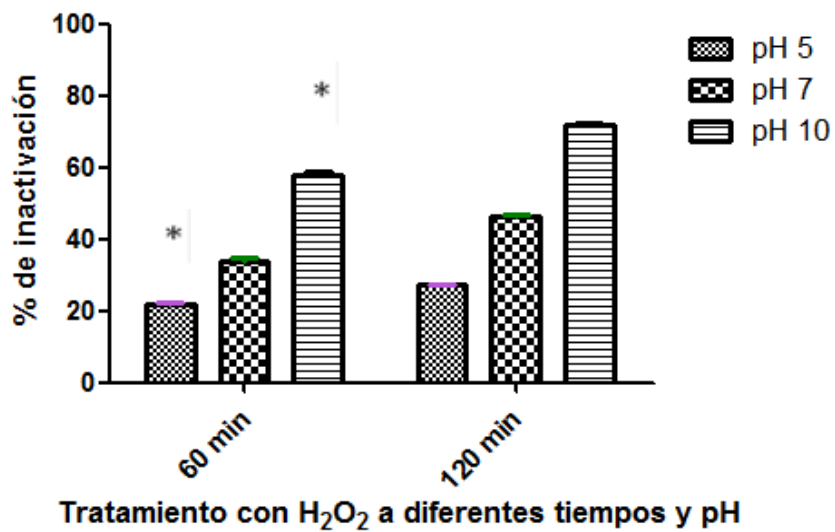
**Tabla 39.** Porcentaje de inactivación de quistes de *G. lamblia* después del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% a diferentes pH y tiempos de contacto.

Tratamiento	t= 60 min	t= 120 min
pH 5	22.53%	27.25%
pH 7	34.37%	46.57%
pH 10	58.59%	71.86%



**Figura 19.** Porcentaje de inactivación de quistes de *G. lamblia* después del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% a diferentes pH y tiempos de contacto.

En la figura 20 se muestra la inactivación de quistes de *G. lamblia* después de haber sido tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%, encontrándose que hay una diferencia estadísticamente significativa, en cuanto al pH se observa que a un pH alcalino se logran los porcentajes más altos de inactivación, sin embargo con los otros pH no se logra eliminar el riesgo de transmisión.



**Figura 20** Inactivación de quistes de *G. lamblia* tratados con peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes tiempos de contacto y pH. Existe una diferencia estadísticamente significativa (P=0.0331) entre el pH 5 y pH 10.

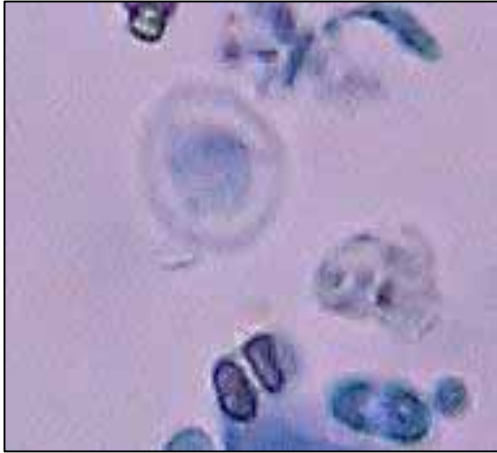
#### 7.1.4.1. Quistes observados en el testigo y después del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%



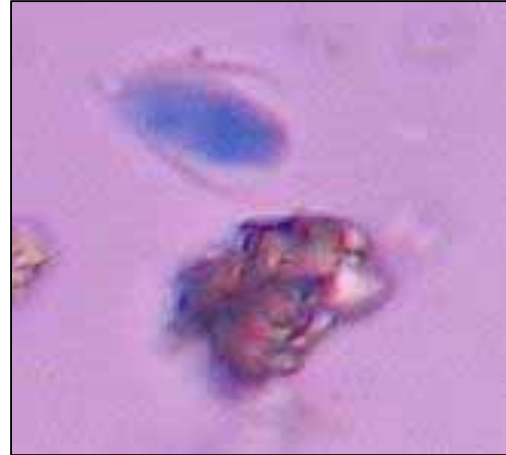
**Figura 21.** Quiste viable y no viable en el testigo (40x).



**Figura 22.** Quiste viable. Se observan incoloros (40x).



**Figura 23.** Quiste deformado por efecto del peróxido a pH 7 (40x).



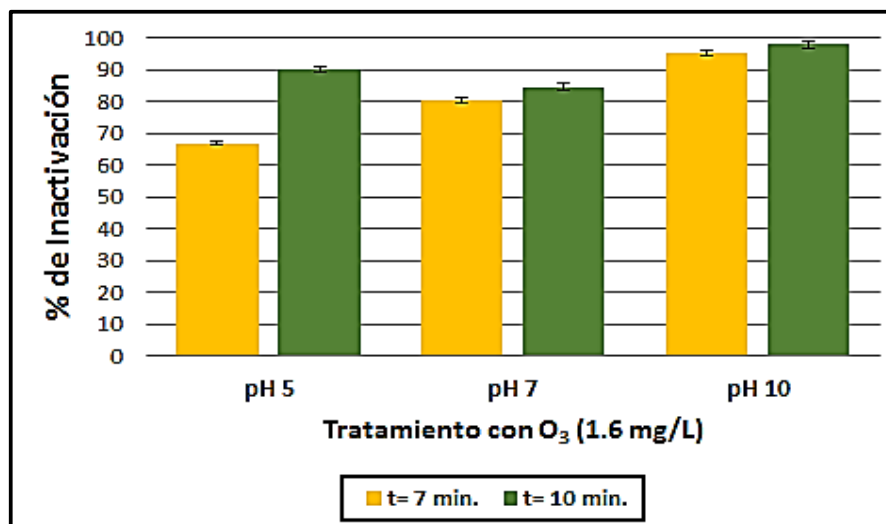
**Figura 24.** Quiste deformado por la oxidación del peróxido a pH10 (40x).

### 7.1.5. Tratamiento con ozono (O<sub>3</sub>) a diferentes pH y tiempos de contacto

En la figura 25 se muestran los porcentajes de inactivación obtenidos después de haber sido tratados los quistes a los 7 y 10 minutos de contacto con ozono a condiciones diferentes de pH, se logró un 97.99% a un pH de 10, seguido de un 90.1% a pH 5 y finalmente un 84.62% a pH 7.

**Tabla 40.** Comparación de los porcentajes de inactivación de quistes de *G. lamblia* después de ser tratados con ozono a diferentes pH con un tiempo de contacto de 7 y 10 minutos.

Tratamiento	t= 7 min	t= 10 min
pH 5	86.84	90.1
pH 7	80.47	84.62
pH 10	95.25	97.99
CT para el ozono	11.2 mg/L*min	16 mg/L*min



**Figura 25.** Comparación de los porcentajes obtenidos de inactivación de quistes de *G. lamblia* después de ser tratados con ozono a pH 5, 7 y 10 con un tiempo de contacto de 7 minutos (CT= 11.2 mg/L\*min) y 10 minutos (CT= 16 mg/L\*min).

El ozono es un fuerte oxidante que puede reaccionar de dos maneras diferentes con las sustancias, una es de forma indirecta que se ve favorecida por pH alcalinos, los radicales hidroxilo formados tienen un potencial de oxidación mayor que el ozono, por lo que se obtuvo un mayor porcentaje de inactivación a pH 10, a pesar de que el tiempo fue de 10 minutos y de que el concentrado de quistes tenía mucha materia orgánica los radicales hidroxilo que se formaron reaccionaron con los quistes junto con el ozono de manera rápida.

Según Labatiuk *et al.* (1992), se deben de utilizar tiempos de contacto mayores de 5 minutos para inactivar quistes de *Giardia* y esto coincide con el tiempo utilizado para las pruebas realizadas.

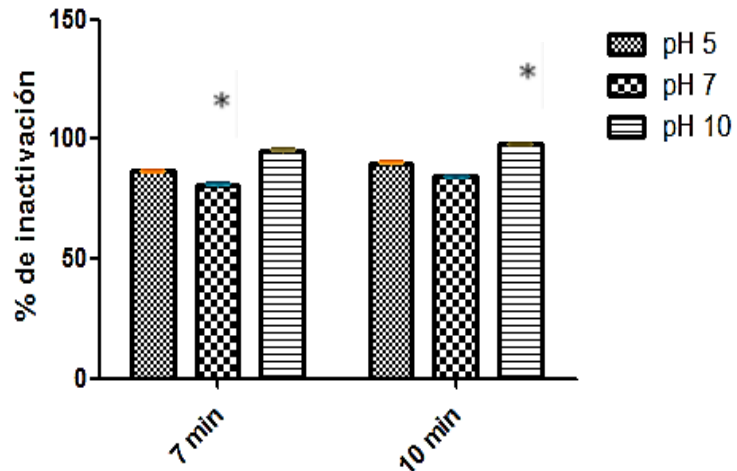
En el caso del pH 7, existen factores que pueden afectar la inactivación de quistes de *G. lamblia*, como el tiempo, la temperatura y el pH, en este caso el porcentaje de desactivación no fue alto a este pH, a pesar de que el ozono reacciona bien a un pH entre 5.5-9.5 US EPA (1999a).

La otra forma de reaccionar del ozono es la directa de forma selectiva y lenta que se favorece a un pH ácido, el ozono reaccionó de una manera directa con los quistes o el material a oxidar, los resultados obtenidos a pH 5 fueron buenos porcentajes ya que se logró el 90%, estos resultados coinciden con los de Ran y Li (2013) en donde ellos concluyen que la capacidad del ozono para inactivar quistes de *Giardia* puede mejorar en condiciones ácidas.

Se trabajó con diferentes CT (concentración del desinfectante por el tiempo) el utilizado para estas pruebas a los 10 minutos donde se obtuvo el mayor porcentaje fue de 16 mg/L\*min a pesar de que la US EPA (1999b) recomienda un CT de 3.4 mg/L\*min, para estas pruebas se utilizó un CT 4.5 veces más que lo establecido.

Autores como Marques *et al.* (2014) lograron un 100% de inactivación con 325 mg de ozono/L\*min a los 5 minutos. Wickramanayake *et al.* 1984 utilizaron una dosis de ozono de 0.53 mg/L\*min para obtener una inactivación del 99% de quistes de *Giardia*, Finch *et al.* (1993) requirieron de 0.65 mg/L\*min para obtener el mismo porcentaje, sin embargo los resultados obtenidos en este trabajo no coinciden ya que se utilizó una concentración de 1.6 mg/L de ozono y se obtuvo un porcentaje del 97.99% a los 10 minutos de contacto. El concentrado de quistes, así como las diferentes formas de ozonar y el origen del agua son factores que definitivamente influyen para que estos resultados sean tan diferentes.

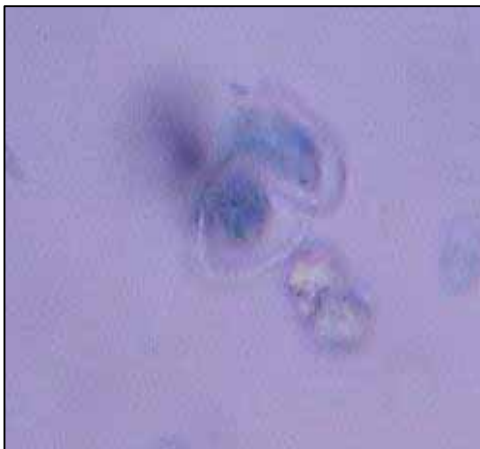
Se encontró que existe una diferencia estadísticamente significativa entre pH 7 y pH 10 (Figura 26) a los 7 y 10 minutos de contacto con ozono, por lo que este tratamiento resulta ser una buena alternativa para inactivar quistes de *G. lamblia*.



**Tratamiento con O<sub>3</sub> a diferentes tiempos de contacto y pH**

**Figura 26.** Porcentaje de inactivación de quistes de *G. lamblia* tratados con ozono a diferentes tiempos de contacto y pH. Existe una diferencia estadísticamente significativa (P=0.0193) entre el pH 10 y pH 7.

#### 7.1.5.1. Quistes tratados con ozono ( O<sub>3</sub> )



**Figura 27.** Quistes con la membrana deformada por la oxidación a pH 5 (40x).



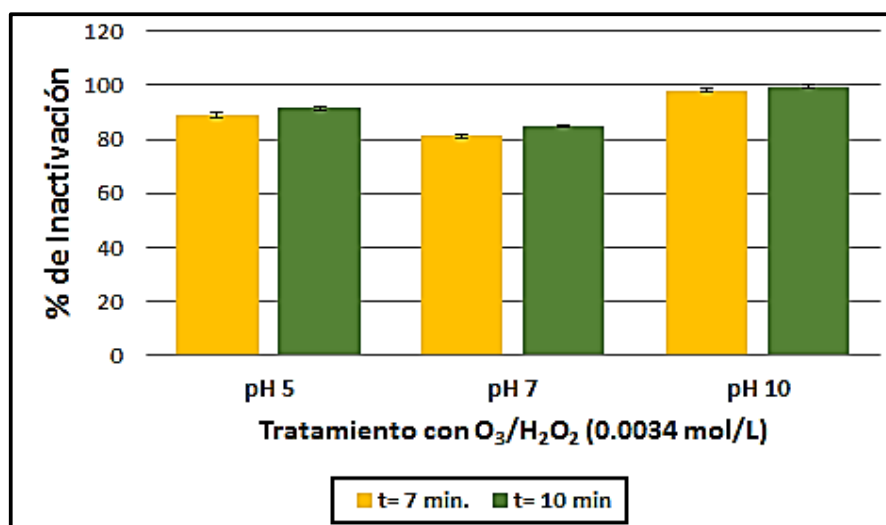
**Figura 28.** Quiste tratado con O<sub>3</sub>. La membrana se observa con daño por la oxidación, a pH 10 (40x).

### 7.1.6. Tratamiento con ozono y peróxido de hidrógeno al 30% (O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a diferentes pH y tiempos de contacto

En la figura 29 se muestra el porcentaje de inactivación obtenido de quistes de *G. lamblia* a los 7 y 10 minutos de exposición con la combinación O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> siendo a un pH alcalino el más alto con un 99.4%, a pH ácido un 91.40% y finalmente a pH neutro solo se logró un 84.80%. La influencia del pH es importante, ya que al formarse los iones hidroxilo, que tienen como función la descomposición del ozono, se favorece su disociación, y de esta manera se acelera la reacción con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para que se generen más radicales hidroxilo, los pH por arriba de 8 favorecen que se incremente los radicales hidroxilo, es por eso que en este caso la mejor inactivación se obtuvo a un pH de 10, a pesar de que el agua utilizada es agua para beber de una marca comercial, y los carbonatos por muy bajos que sean pueden competir con los radicales OH<sup>\*</sup> para oxidar materia orgánica.

**Tabla 41.** Comparación de los porcentajes de inactivación de quistes de *G. lamblia* después de ser tratados con ozono/peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes pH con un tiempo de contacto de 7 y 10 minutos.

Tratamiento	t= 7 min	t= 10 min
pH 5	86.99%	91.46%
pH 7	81.15%	84.8%
pH 10	98.19%	99.4%
CT para el ozono	11.2 mg/L*min	16 mg/L*min

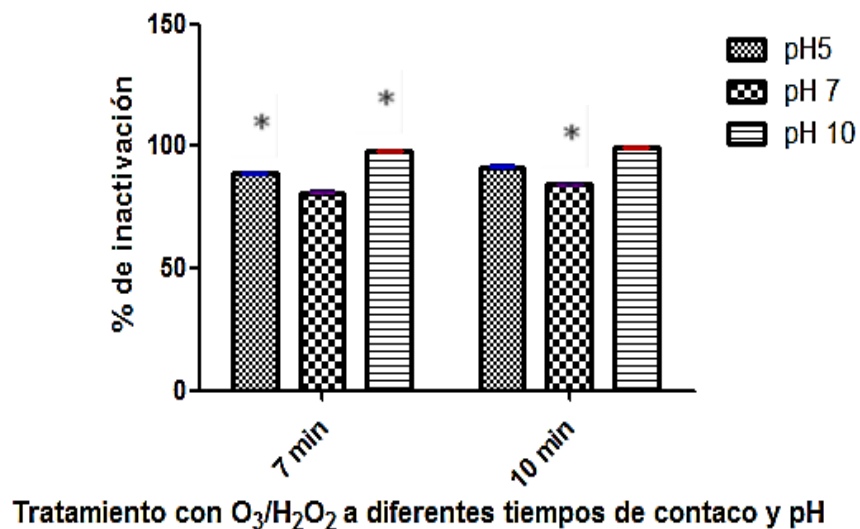


**Figura 29.** Comparación de los porcentajes de inactivación de quistes de *G. lamblia* obtenidos después de ser tratados con ozono/peróxido de hidrógeno al 30% a pH 5, 7 y 10 con un tiempo de contacto de 7 minutos (CT=11.2 mg/L\*min) y 10 minutos (CT=16 mg/L\*min).



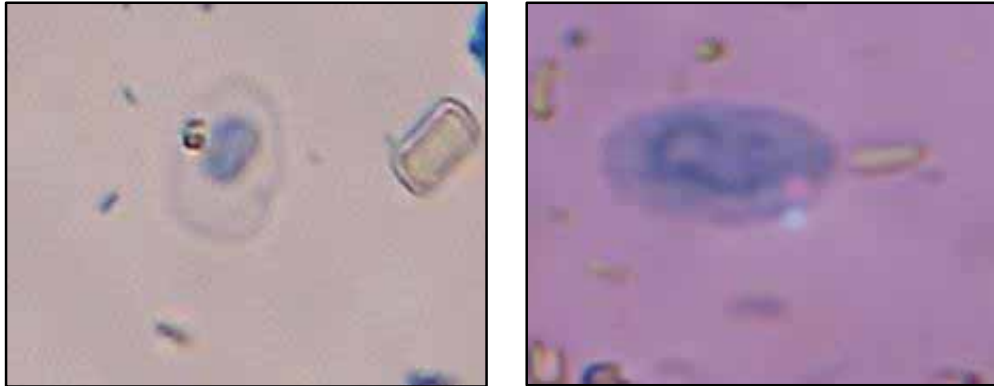
La concentración utilizada fue de 16 mg/L\*min; la US EPA (1999b) recomienda 2.6 mg/L\*min, cuando se combina ozono con peróxido de hidrógeno, estando alta esta concentración para las pruebas utilizadas, también se aplicó una concentración más alta de peróxido del 30% debido a que en la primera parte los resultados de inactivación no fueron tan buenos. Wolfe *et al.* (1989) obtuvieron una inactivación del 99% de quistes de *G. muris* con peroxono a una concentración de 3.4-5.4 mg/L\*min por arriba también de lo establecido y a una temperatura de 22 °C.

Se encontró que hay una diferencia estadísticamente significativa (Figura 30) entre el pH 5 y pH 10, con el tratamiento con O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% con un tiempo de contacto de 7 y 10 minutos. También hubo una diferencia significativa entre el pH 7 y pH 10, por lo que este tratamiento es recomendable para inactivar quistes del protozooario *G. lamblia*.



**Figura 30.** Quistes de *G. lamblia* tratados con O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a diferentes pH y tiempos de contacto. Existe una diferencia estadísticamente significativa (P= 0.0079) a pH 5 y pH 10 así como a pH 7 y pH 10.

### 7.1.6.1. Quistes tratados con ozono y peróxido de hidrógeno al 30% (O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)



**Figura 31.** Quistes dañados de la membrana por la oxidación con ozono/peróxido de hidrógeno a pH 10.

El ozono es capaz de destruir la membrana celular de los protozoarios como *G. lamblia*, esto se debe a que la pared es afectada haciéndola más permeable, de esta manera el ozono penetra al quiste y daña la membrana citoplasmática, afectando también el núcleo, los ribosomas y otros componentes estructurales del quiste.

Para aumentar el proceso de oxidación del ozono, se realizó el tratamiento con la mezcla de ozono-peróxido de hidrógeno al 30%, hay una diferencia significativa a pH 10, debido a la formación de radicales hidroxilo que se forman a partir del ozono y del peróxido de hidrógeno, lo que genera una mayor cantidad de producción de radicales hidroxilo que reaccionan con las membranas del quiste.

En la figura 32 se comparan los porcentajes de inactivación que se obtienen con los diferentes tratamientos; en general los altos porcentajes se tienen a pH alcalino en todos los tratamientos, en el caso del peróxido de hidrógeno a pH ácido se inhibe su actividad, pero se ve favorecida a un pH de 7 y 10 a tiempos de contacto largos y concentraciones altas, el hecho de haber puesto los quistes en un reactor y en contacto directo con el ozono mejora considerablemente la inactivación, siempre y cuando se controle el flujo de oxígeno con ozono, así como también se debe de controlar el número de quistes que se van a tratar, para no tener pérdidas considerables que afecten el porcentaje de inactivación.

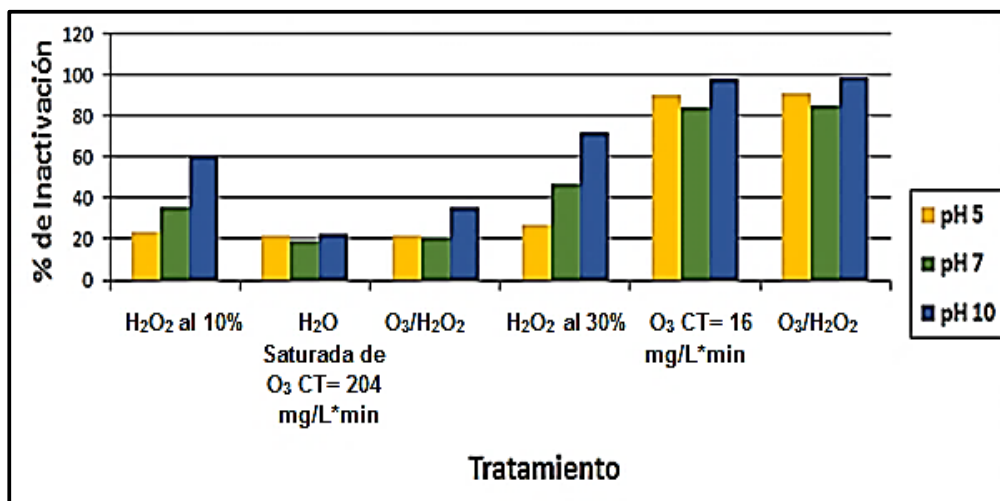


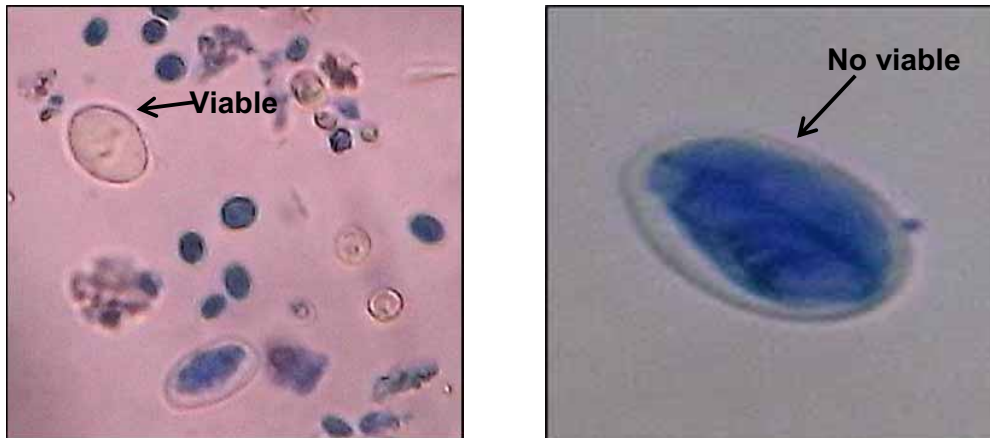
Figura 32. Comparación de los diferentes tratamientos para inactivar quistes de *G. lamblia* a pH diferentes.

En el tratamiento con peroxono los resultados obtenidos son considerables debido a que se alcanzó un 99.4% de inactivación, pero siempre se debe de considerar la fuente, la calidad del agua y el tipo de parásito.

Los microorganismos patógenos que resultan ser más difíciles de eliminar son los protozoarios, en México existe una legislación que regula los sistemas públicos operadores del agua para beber, cuya norma incluye en muestras de 100 mL de agua la determinación de bacterias coliformes totales y *E. coli* o coliformes fecales (NOM-127-SSA-1994, NOM-179-SSAI-1998) en donde cualquiera de ellos debe de estar ausente, sin embargo todavía no existe una norma que indique el número máximo permisible de quistes en agua potable o de tipo residual para organismos como *G. lamblia*.

Es por ello que la necesidad de tener agua tratada hace que sea apremiante contar con métodos que permitan la eliminación de quistes del protozoario *G. lamblia*, aún más debe existir una norma que garantice que desinfectantes son capaces de eliminar este tipo de microorganismos de frutas, verduras que son regadas con aguas negras y lo mismo debería de aplicarse al agua potable.

**7.1.7. Determinación de la viabilidad de *G. lamblia* por el método de exclusión del colorante azul de metileno amortiguado de Bingham et al., 1979.**



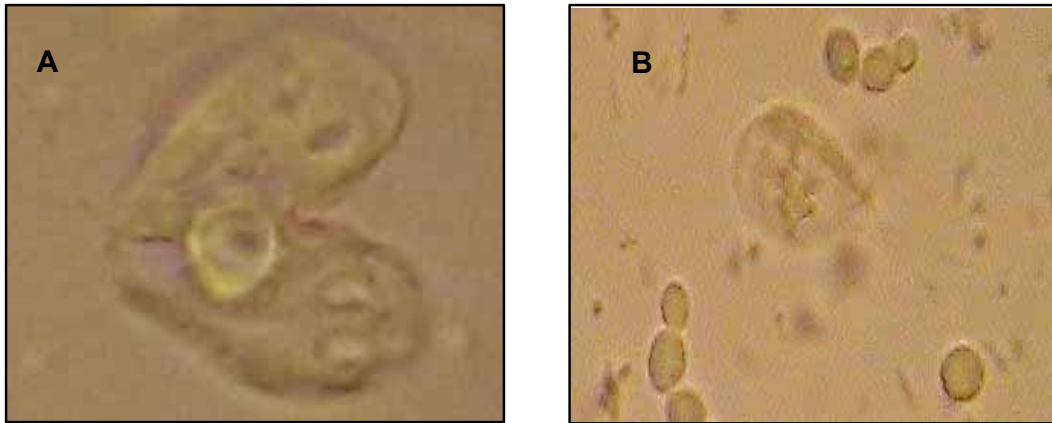
**Figura 33.** Quistes de *G. lamblia* teñidos con azul de metileno amortiguado (AMA). Los quistes incoloros son viables, los teñidos de azul son no viables. Las imágenes que se muestran se tomaron del microscopio óptico en objetivo a 40x. Fuente: propia.

**7.1.8. Determinación de la viabilidad de *G. lamblia* por el método de desenquistamiento in vitro de Rice y Shaefer III, 1981.**

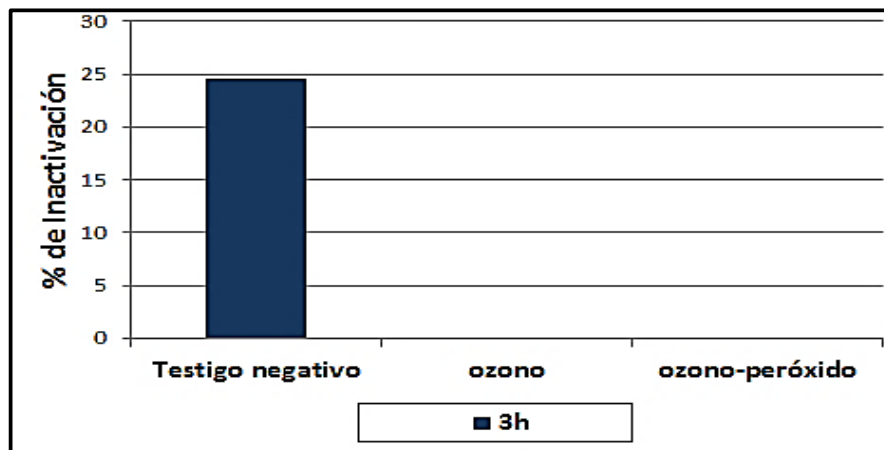
Para determinar la viabilidad de los quistes de *G. lamblia* se realizó el desenquistamiento, simulando el paso del quiste por el organismo del hospedero, dando de esta manera un ambiente parecido al del estómago en donde hay un pH ácido, hasta llegar al intestino delgado donde hay una neutralización por las secreciones biliares. A pesar de darle a *G. lamblia* todas las condiciones adecuadas para desenquistar, es difícil esta etapa y los porcentajes de desenquistamiento son bajos.

En la figura 35 se muestra el porcentaje obtenido de trofozoítos en el testigo, el cual fue del 24.56% a las tres horas, con lo que respecta a las muestras tratadas con  $O_3$  y  $O_3/H_2O_2$  no desenquistaron, con lo que se demuestra que estos tratamientos impiden que se lleve a cabo el desenquistamiento.

Para la determinación del porcentaje de viabilidad se contó el número de trofozoítos recuperados después del desenquistamiento, tomando en cuenta que dos trofozoítos equivalen a un quiste (Figura 34).



**Figura 34.** Trofozoítos. **(A)** Trofozoíto de *G. lamblia* desenquistando, después de haber aplicado el método del desenquistamiento *in vitro*. **(B)** Trofozoíto de *G.lamblia* obtenido a partir del desenquistamiento *in vitro*, se observan los núcleos, los flagelos, el cuerpo medio. Estas imágenes fueron observadas al microscopio óptico a 40x (Fuente: propia).



**Figura 35.** Porcentaje de trofozoítos obtenidos después del método de desenquistamiento *in vitro*.

## 7.2. Huevos de *Toxocara canis* en el testigo

Los huevos que son potencialmente infectivos son aquellos que se encuentran en una fase de embrionación, ya que pueden culminar en la fase de larva J3 (fase infectiva), por lo que solamente se contaron aquellos huevos que se encontraban en alguna fase de embrionación y larvados para obtener el porcentaje de inactivación.

### 7.2.1. Huevos observados en el testigo después de 28 días de incubación



**Figura 36.** Huevo de *T. canis*, se observan dos blastomeros. Observación a 40x.



**Figura 37.** Larva de *T. canis* saliendo del huevo (proceso de eclosión).



**Figura 38.** Huevo larvado entero.



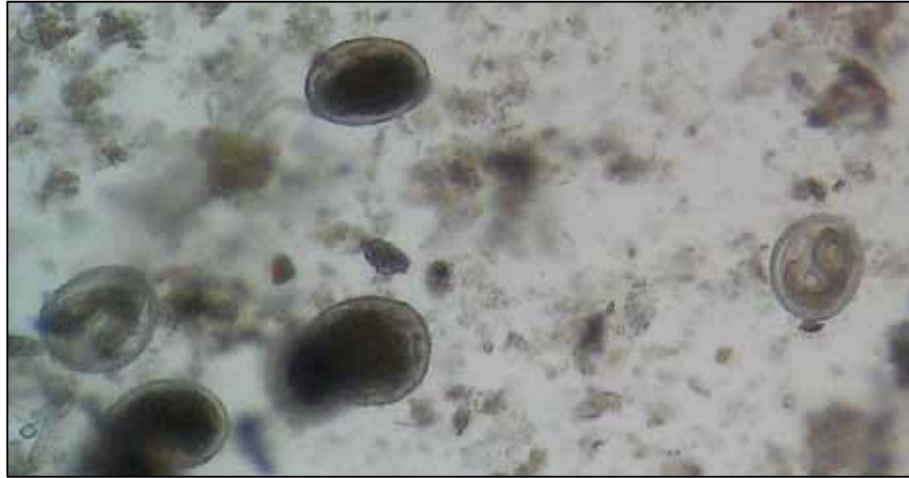
**Figura 39.** Huevo de *T. canis* en organogénesis. Observación a 40x.



**Figura 40.** Huevo entero con larva definitiva. Observación a 40x.



**Figura 41.** Huevo en fase de mórula. Observación a 40x.



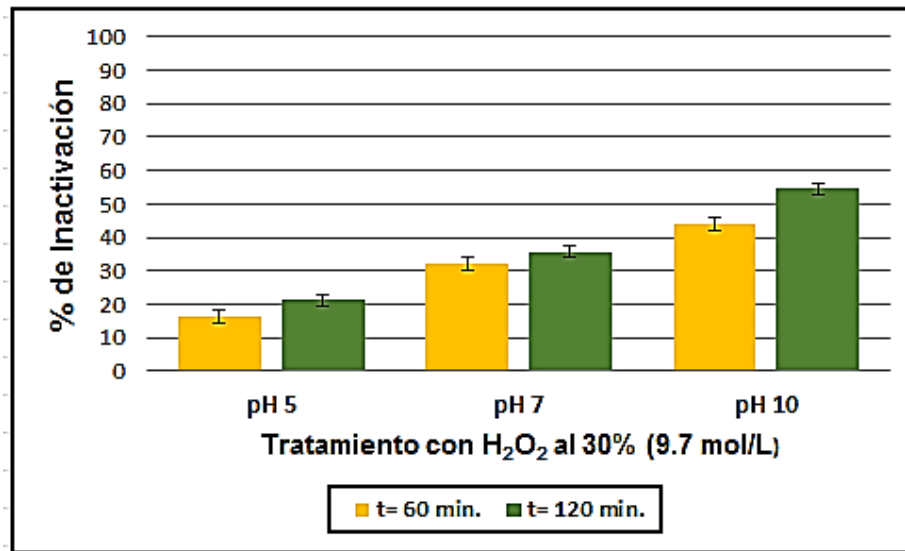
**Figura 42.** Huevos de *T. canis* en diferentes fases de embrionación hasta la formación de la larva, después de 28 días de incubación. Observación a 10x.

### 7.2.2. Tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% ( $H_2O_2$ ) a diferentes pH y tiempos de contacto

En la figura 43 se muestran los porcentajes obtenidos de inactivación de huevos de *T. canis* a pH diferentes y tiempos de contacto, el porcentaje de inactivación más alto se obtuvo con un pH de 10 con 54.44%, seguido de un pH 7 con 35.79% y por último a pH 5 con 21.33%, se trabajó con una concentración alta de peróxido de hidrógeno que fue del 30%, a pesar de tener una actividad biocida, es necesario utilizar concentraciones altas de peróxido y tiempos de contacto largos para la reacción y tener una actividad mayor como desinfectante, se decidió utilizar solamente dos tiempos de 60 y 120 minutos.

**Tabla 42.** Porcentajes de inactivación de HH *T. canis* después de ser tratados con peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes pH y tiempos de contacto.

Tratamiento	t= 60 min	t= 120 min
pH 5	16.475	21.33%
pH 7	31.88%	35.79%
pH 10	44%	54.44%

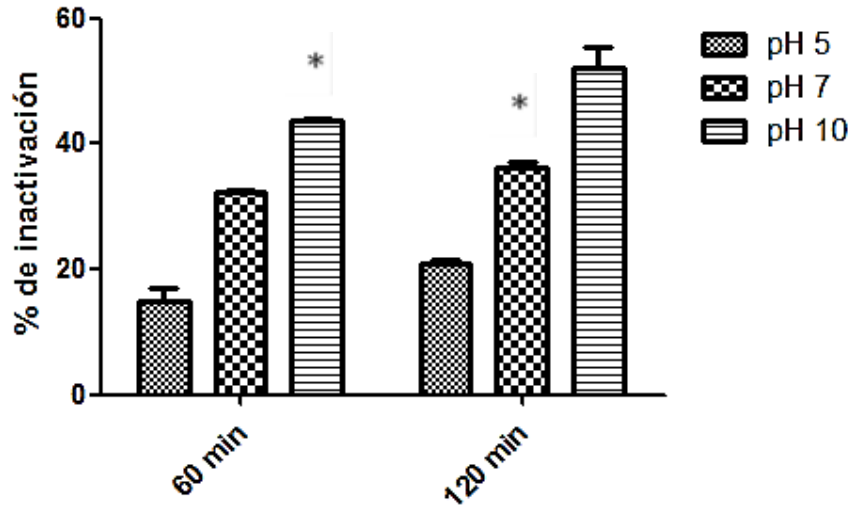


**Figura 43.** Porcentaje de inactivación de HH *Toxocara canis* después del tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes pH y tiempos de contacto.

En este caso el peróxido tiene mayor actividad como oxidante cuando se encuentra a un pH alcalino, al variar el pH a ácido o a neutro la actividad disminuye, a los 120 minutos se obtuvo el mayor porcentaje, debido a que el peróxido tiene una velocidad de reacción lenta para poder alcanzar una mayor efectividad como biocida. El poder oxidante se debe a la formación de radicales hidroxilo que son los más fuertes después del flúor Doménech *at al.* (2002).

Se encontró que existe una diferencia estadísticamente significativa entre el pH 5 y pH 10 a diferentes tiempos de exposición con el peróxido de hidrógeno (Figura 44), sin embargo no es un tratamiento recomendable debido a que solo se obtuvo un porcentaje por arriba del 50%, por lo que resulta no ser un parasiticida para inactivar HH de *T. canis*.





**Tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a diferentes tiempos y pH**

**Figura 44.** Tratamiento con peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes pH y tiempos de contacto. Se encontró que existe una diferencia estadísticamente significativa (P=0.0164) entre el pH 5 y pH 10.

**7.2.2.1. Huevos tratados con peróxido de hidrógeno al 30% (observaciones a 10x)**



**Figura 45.** Huevo tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a pH 10, la pared externa se observa oxidada. Observación a 40x.



**Figura 46.** Huevo tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a pH 5, se observa daño en la pared externa. Observación a 40x.



**Figura 47.** Huevo tratado con  $H_2O_2$  a pH 7 se observa oxidación de la pared externa. Observación a 40x.



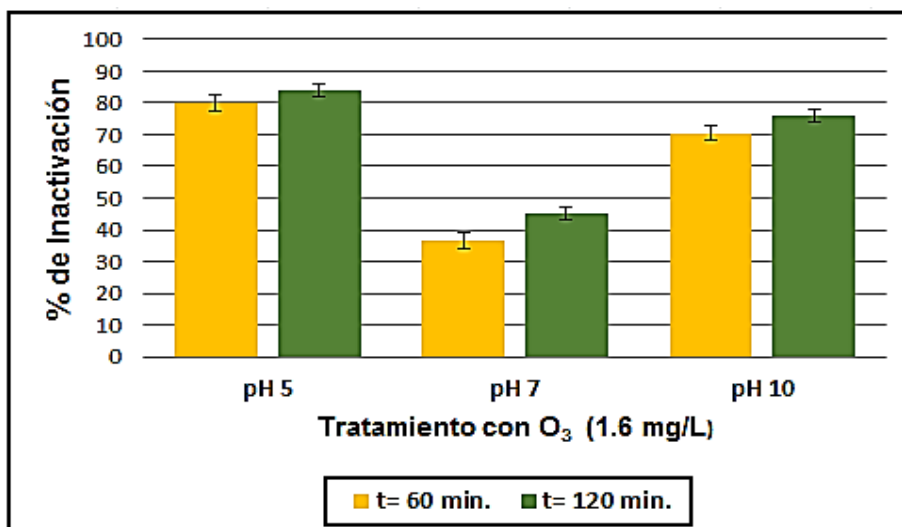
**Figura 48.** Huevo tratado con  $H_2O_2$  a pH 10, se observa daño en la pared ex debido a la oxidación. Observación a 40x.

### 7.2.3. Tratamiento con ozono ( $O_3$ ) a diferentes pH y tiempos de contacto

En la figura 49 se muestra el porcentaje de inactivación obtenido a pH 5 de 83.85% a los 120 minutos de contacto, seguido de un pH 10 de 75.88% y finalmente un 45.24% a pH 7. Para desactivar HH se necesitan dosis altas de ozono, en este caso se utilizó una concentración de 1.6 mg/L, pero no se logró un mayor porcentaje de inactivación.

**Tabla 43.** Comparación de los porcentajes de inactivación de HH *T. canis* después de ser tratados con ozono a diferentes pH con un tiempo de contacto de 60 y 120 minutos.

Tratamiento	t= 60 min	t= 120 min
pH 5	80%	83.85%
pH 7	36.47%	45.24%
pH 10	70.48%	75.88%
CT para el ozono	96 mg/L*min	192 mg/L*min



**Figura 49.** Comparación de los porcentajes de inactivación de HH *T. canis* obtenidos en el tratamiento con ozono a pH diferentes y tiempos de contacto. Factor CT a los 60 min. para el ozono: 96 mg/L\*min para este tiempo y a los 120 min. se tiene un factor CT para el ozono de 192 mg/L\*min.

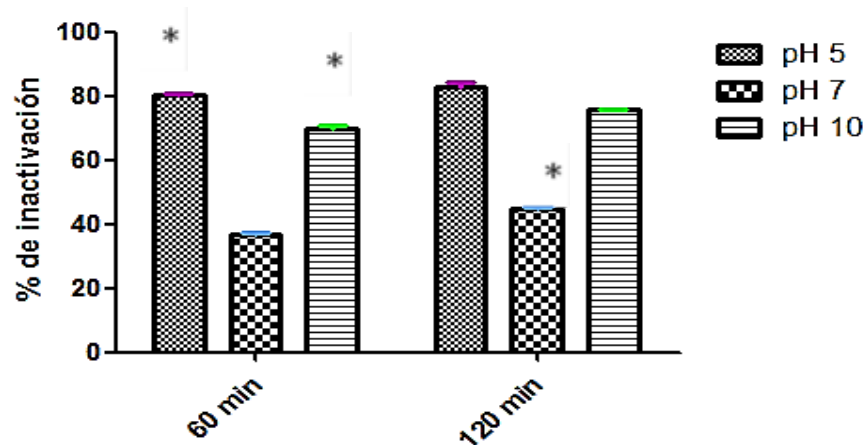
El ozono puede reaccionar de dos maneras diferentes con las sustancias, una es la indirecta que se favorece con pH alcalinos, y otra es la reacción directa del ozono (ozonólisis) que se ve favorecida con el pH ácido, el mayor porcentaje de inactivación se obtuvo a pH ácido, en donde el ozono reaccionó de una forma rápida con los HH, no dando lugar a que se formaran radicales hidroxilo o que se formaran en porcentajes bajos según Gottschalk *et al.* (2000).

Cuando el ozono se descompone en agua, los radicales libres del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y del hidróxido (OH) que se forman, tienen gran capacidad de oxidación y desempeñan un papel activo en el proceso de desinfección.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Rojas *et al.* (2004) en donde ellos trabajaron con el helminto *Ascaris suum* a un pH 5 obteniendo un porcentaje de inactivación del 94% en 1 h de contacto, también trabajaron con *T. canis* obteniendo un 96.7% de inactivación a las 3 horas utilizando un pH ácido; la diferencia con este trabajo consiste en que se utilizó un tiempo de contacto menor que fue de 120 minutos y se logró un 83.85% a pH 5.

La resistencia de los huevos de *T. canis* a diferentes compuestos químicos, se atribuye a su membrana que es altamente impermeable, entre los compuestos que le dan esta característica se encuentran los esteroides y los lípidos. También se ha considerado el palmitol que es el componente mayoritario de la cera de abeja Rojas *et al.* (2004).

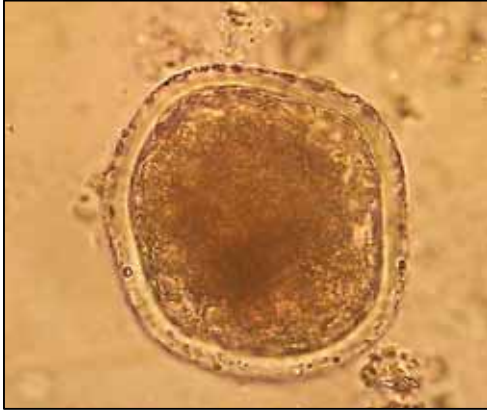
Se encontró que existe una diferencia estadísticamente significativa entre en pH 5 y pH 7 (Figura 50) a diferentes tiempos de exposición con el ozono. También hubo una diferencia significativa entre el pH 7 y pH 10, por lo que este método es recomendable para inactivar HH de *T. canis*.



**Tratamiento con O<sub>3</sub> a diferentes tiempos de contacto y pH**

**Figura 50.** Tratamiento con ozono a pH diferentes y tiempos de contacto. Se encontró que existe una diferencia estadísticamente significativa ( $P=0.0044$ ) entre el pH 5 y pH 7 así como entre el pH 7 y pH 10.

### 7.2.3.1. Huevos tratados con ozono (observaciones a 10x)



**Figura 51.** Huevos tratados con ozono a pH 5, el daño en la pared externa es evidente debido a la oxidación por ozonólisis.



**Figura 52.** Huevos que presentan daño a pH 10 en la pared externa debido a la oxidación por la ozonólisis.



**Figura 53.** Huevo que presenta oxidación en la pared externa debido a la ozonólisis a pH 5.



**Figura 54.** Huevo oxidado por la acción del ozono a pH 10, la pared externa presenta deformación.

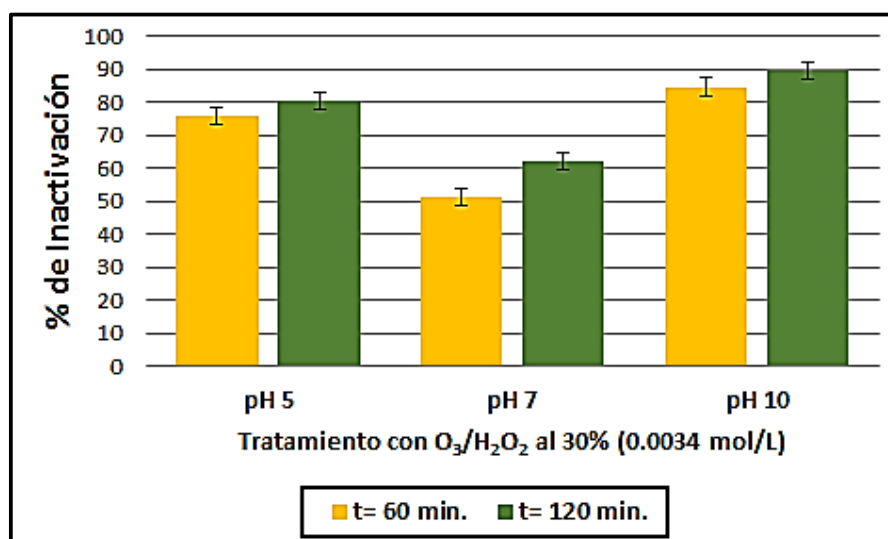
### 7.2.4. Tratamiento con ozono y peróxido de hidrógeno al 30% ( $O_3/H_2O_2$ ) a diferentes pH y tiempos de contacto

En la figura 55 se muestran los porcentajes obtenidos con el tratamiento ozono/peróxido de hidrógeno, el porcentaje más alto se obtuvo a los 120 minutos de contacto a un pH alcalino y fue de 89.44%, seguido de un 80.63% a pH ácido, finalmente un 62% a pH neutro.

Al combinar el ozono con el peróxido la energía oxidante da lugar a la oxidación rápida de los huevos, debido a que se favorece la formación de radicales hidroxilo, en este caso el ozono se ve favorecido con un pH alcalino (vía indirecta) acelerándose la reacción con el peróxido de hidrógeno. El CT utilizado a los 120 minutos fue de 192 mg/L\*min.

**Tabla 44.** Comparación de los porcentajes de inactivación de HH *T. canis* después de ser tratados con ozono/peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes pH con un tiempo de contacto de 60 y 120 minutos.

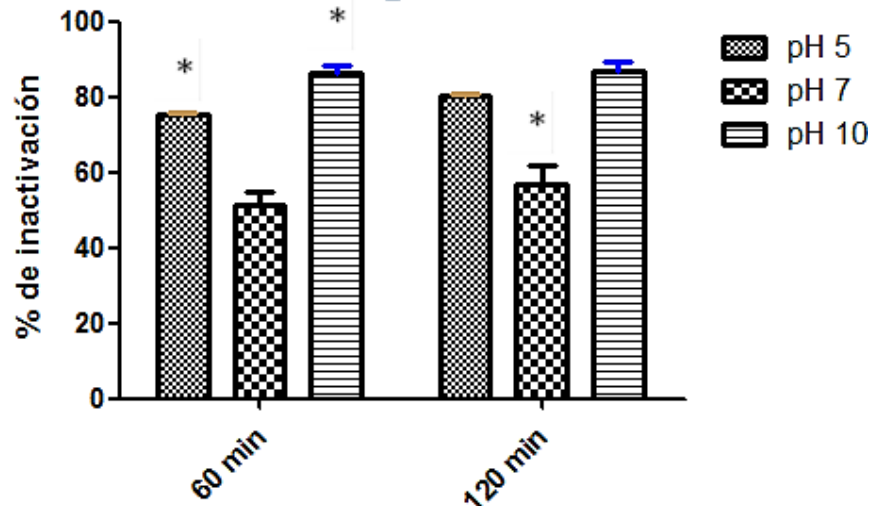
Tratamiento	t= 60 min	t= 120 min
pH 5	75.79%	80.63%
pH 7	51.18%	62%
pH 10	84.67%	89.44%
CT para el ozono	96 mg/L*min	192 mg/L*min



**Figura 55.** Porcentaje de inactivación de HH *T. canis* después del tratamiento con ozono/peróxido de hidrógeno a diferentes pH y tiempos de contacto.

Los resultados obtenidos coinciden con los obtenidos por Ibáñez *et al.* (2013) ellos obtuvieron mayor inactivación de HH de *Hymenolepis nana* a un pH 10 utilizando un proceso de oxidación avanzada combinando ozono/peróxido de hidrógeno con un tiempo de 60 minutos y una concentración de ozono 1.1 mg/L. no se especifica el porcentaje. En este trabajo se utilizó 1.6 mg/L de ozono y un tiempo mayor de 120 minutos a pH alcalino.

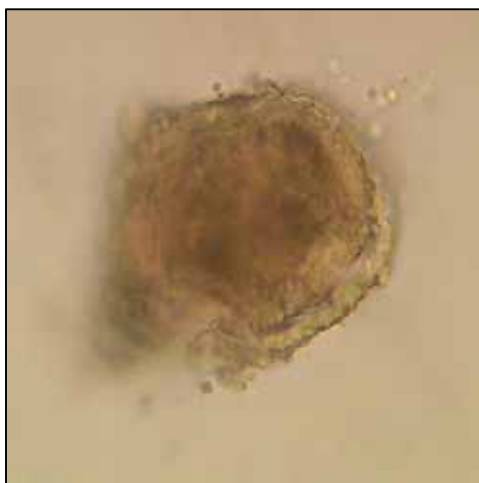
Existe una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos con pH 5, pH 7 y pH 10 a diferentes tiempos de contacto (Figura 56), por lo que este método para inactivar HH de *T. canis* es recomendable.



#### Tratamiento con $O_3/H_2O_2$ a diferentes tiempos de contacto y pH

**Figura 56.** Tratamiento con ozono/peróxido de hidrógeno al 30% a pH diferentes y tiempos de contacto. Se encontró que existe una diferencia estadísticamente significativa ( $P=0.0032$ ), entre el pH 7 y pH 10, así como entre el pH 5 y pH 7.

#### 7.2.4.1. Huevos tratados con $O_3/H_2O_2$ al 30% (observaciones a 40x)



**Figura 57.** Huevo tratado con  $O_3/H_2O_2$  a pH 10, se presenta deformación en la pared externa debido a la oxidación así como ruptura.



**Figura 58.** Huevo tratado con  $O_3/H_2O_2$  a pH 5, se observa la pared externa deformada por la oxidación.



**Figura 59.** Huevo oxidado con  $O_3/H_2O_2$  a pH 7.



**Figura 60.** Huevo que presenta oxidación en la pared externa debido al  $O_3/H_2O_2$  a pH 5.



**Figura 61.** Huevo tratado con  $O_3/H_2O_2$  a pH 5, la pared se observa deformada formada debido a la oxidación.



**Figura 62.** Huevo tratado con  $O_3/H_2O_2$  a pH 10, se observa una ruptura lo cual permite que el citoplasma salga del huevo.

El peróxido de hidrógeno al no ser una molécula larga o muy compleja, es capaz de difundirse a través de la membrana celular y una vez dentro, producir radicales hidroxilo ( $\bullet OH$ ) por medio de algún mecanismo como es la combinación con el ozono, y de esta manera oxidar la membrana.



La resistencia de los huevos de helmintos al daño, físico, químico, así como mecánico, desecación y la penetración de otras sustancias polares se debe a la composición de sus capas, se ha supuesto que la capa intermedia y la externa protegen los embriones contra el daño mecánico mientras que la interna es una barrera a los compuestos químicos, es por ello que el peróxido a pesar de ser considerado como una tecnología de oxidación avanzada debido a sus propiedades oxidantes no logro producir un daño considerable en los HH.

En la figura 63 se muestran los diferentes tratamientos utilizados para inactivar HH de *T. canis*, el mayor porcentaje de inactivación se obtuvo con el proceso de oxidación avanzada combinando el ozono/peróxido de hidrógeno a los 120 minutos de contacto a pH alcalino, con estos resultados se demuestra que los POAs son una buena alternativa para inactivar HH. Lo que se recomienda es aumentar el tiempo de contacto, y usar otras combinaciones como ozono/luz ultravioleta, ozono/ultrasonido variando las condiciones de la temperatura.

Con el tratamiento con ozono se obtuvo también un alto porcentaje de inactivación de HH a pH ácido actuando el ozono molecular en una reacción directa, lo cual conlleva a tener una mayor cantidad de oxidante disponible para inactivar HH, en cambio en las pruebas realizadas a pH alcalino después de 120 minutos se mostró menor inactivación de huevos, posiblemente porque a estas condiciones básicas el ozono se descompone en agua y forma radicales oxidantes secundarios OH, actuando de esta manera el ozono en una forma indirecta, lo cual en este caso retrasa la inactivación de los HH.

Con el peróxido de hidrógeno no se obtiene una inactivación relevante ya que solo se alcanzó un 54.44% por lo que no es una buena opción como desinfectante para inactivar HH.

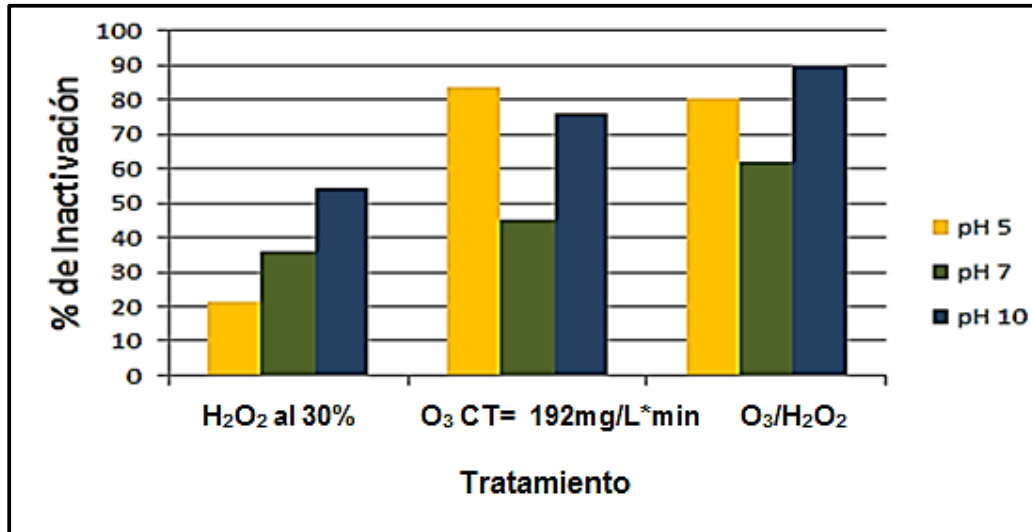
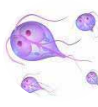



Figura 63. Comparación de los diferentes tratamientos para inactivar HH, a pH diferentes.

El presente trabajo evaluó la capacidad que tienen los procesos de oxidación avanzada para inactivar quistes del protozooario *G. lamblia* y HH de *T. canis*.

Tabla 45. Comparación de los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos aplicados para inactivar quistes de *G. lamblia* y huevos de *T. canis*

		Primera parte			Segunda parte		
<i>Giardia lamblia</i> 	pH	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 10%	H <sub>2</sub> O saturada de O <sub>3</sub> CT= 204 mg/L*min.	O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 10%	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30%	O <sub>3</sub> CT=16 mg/L*min.	O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30% CT=16 mg/L*min.
	5	23.57 %	21.49%	22.14%	27.25%	90.1%	91.46%
	7	35.35 %	19.37%	21.09%	46.57%	84.62%	84.8%
	10	60.58 %	22.31%	35.54%	71.86%	97.99%	99.4%
<i>Toxocara canis</i> 	pH	No se realizó el tratamiento a los huevos de helminto con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 10%, ni con agua saturada con ozono.			H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30%	O <sub>3</sub> CT=192 mg O <sub>3</sub> /L*min.	O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30% CT= 192 mgO <sub>3</sub> /L*min
	5				21.33%	83.85%	80.63%
	7				35.79%	45.24%	62%
	10				54.44%	75.88%	88.44%

En la tabla 41 se muestran los resultados obtenidos con los diferentes tratamiento solamente a los 120 minutos, debido a que estos porcentajes de inactivación fueron los más altos y los más representativos.

**Tabla 46.** Comparación de los resultados obtenidos en este proyecto con resultados reportados en la literatura, utilizando POAs.

Parásito	Criterios para demostrar inactivación	Tratamiento POAs	Parámetros del tratamiento	% de Inactivación	Referencia
Quistes de <i>G. lamblia</i> y <i>G. muris</i> .	Prueba de viabilidad por el método de desenquistamiento de Raice y Shaefer, 1981.	Ozono	CT=0.53 mgO <sub>3</sub> /L*min, pH 7, T=37 °C, t= 1.5-3.5 min.	99% de quistes inactivados, siendo más resistentes los de <i>G. muris</i>	Wickramayake <i>et al.</i> , 1984 y 1985.
Quiste de <i>G. muris</i>	Prueba de viabilidad por el método de desenquistamiento de Raice y Shaefer, 1981.	Ozono y peroxono	CT= 3.4 a 5.4 mgO <sub>3</sub> /L*min, 22 minutos con ozono y 1.8 min con peroxono.pH 8, T= 14 °C	99% de quistes de <i>G. muris</i> inactivados.	Wolfe <i>et al.</i> , 1989.
Quistes de <i>G. muris</i> y <i>G. lamblia</i>	Utilizaron como modelo a ratones para ver la viabilidad de los quistes de ambas especies de <i>Giardia</i> .	Ozono	T= 22 °C, pH= 7, t= 2 y 5 min, dosis de ozono 2.52 mg/L	99% de inactivación de quistes de ambos parásitos.	Finch <i>et al.</i> , 1993.
Quiste de <i>G. lamblia</i>	Utilizaron la fluorescencia para ver el daño del quiste.	Ozono	T= 27 °C, pH=8, t=7 min, dosis de ozono 3 mg/L	99% de inactivación de quistes.	Ran y Li, 2013.
Quiste de <i>Giardia sp.</i>	No mencionan ningún método debido a que llegaron al 100%	Ozono	No mencionan temperatura ni pH, CT= 325 mgO <sub>3</sub> /L*min,t= 15 min.	100% de inactivación de quistes.	Marques <i>et al.</i> , 2014.
Huevos de <i>T. canis</i>	Utilizaron a ratones como modelo para ver si embrionaban los huevos	Ozono	6.76 y 5.91 mgO <sub>3</sub> /L, t= 40 y 20 min	No se menciona el porcentaje de inactivación	Hong-Kean <i>et al.</i> , 1997.
Huevos de <i>Ascaris suum</i>	No mencionan el metodo para verificar si hay o no embrionación de huevos después del tratamiento.	Ozono	Dosis de ozono 3.5 mg/L, t= 120 min, pH 5, dosis de ozono 4.7 mg/L	99% de inactivación	Orta, 2004

Continuación de la tabla 46.

Parásito	Criterios para demostrar inactivación	Tratamiento POAs	Parámetros del tratamiento	% de Inactivación	Referencia
Huevos de <i>A. suum</i> , <i>T. canis</i>	Solo realizaron observaciones al microscopio después de cada tratamiento para determinar viabilidad.	Ozono	36.8 mgO <sub>3</sub> /L, pH=3, t= 1 h, no se menciona la temperatura	96.7% de inactivación de huevos, en el caso de huevos de <i>T. canis</i> después de 3h aún se observaban huevos viables.	Orta et al., 2002.
Huevos de <i>Hymenolepis nana</i>	Realizaron una prueba de infectividad en ratones, para posteriormente buscar adultos de <i>H. nana</i> en intestino delgado	Ozono y Ozono/peróxido de hidrógeno	Dosis de ozono 1.1 mg/L, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 33%, pH= 10, T= 25 °C	Ninguno de los dos procesos de oxidación avanzada tuvieron actividad desinfectante sobre los huevos de <i>H. nana</i>	Ibañez et al., 2013.
Quistes de <i>G. lamblia</i>	Método de desenquistamiento de Rice y Shaefer y por el método de exclusión del colorante de Bigman y Meyer	Peróxido de hidrógeno al 10%, ozono, ozono/peróxido de hidrógeno al 10%	Dosis de ozono 1.7 mg/L, peróxido de hidrógeno al 10%, t=120 min, T=27 °C	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> = 60.58%, O <sub>3</sub> = 22.31%, O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> = 35.54%	En este trabajo
Quistes de <i>G. lamblia</i>	Método de desenquistamiento de Rice y Shaefer y por el método de exclusión del colorante de Bigman y Meyer	Peróxido de hidrógeno al 30%, ozono, ozono/peróxido de hidrógeno al 30%	Dosis de Ozono 1.6 mg/L, peróxido de hidrógeno al 30%, t=120 min, T=27 °C	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> = 71.86%, O <sub>3</sub> =97.99%, O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> =99.4%	En este trabajo
Huevos de <i>T. canis</i>	Sólo se realizaron observaciones al microscopio optico a 40X para determinar la inactivación	Peróxido de hidrógeno al 30%, ozono, ozono/peróxido de hidrógeno al 30%	Dosis de Ozono 1.6 mg/L, peróxido de hidrógeno al 30%, t=120 min, T=22-26 °C	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> = 71.86%, O <sub>3</sub> =97.99%, O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> =99.4%	En este trabajo

## 8. CONCLUSIONES

La oxidación por el peróxido de hidrógeno al 10 y 30% evaluados en diferentes tiempos de contacto no elimina el riesgo de transmisión de formas infectantes de quistes de *G. lamblia*.

Se obtuvo una inactivación del 60.58% con peróxido de hidrógeno al 10% a los 120 minutos de contacto a un pH 10, que fue el porcentaje más alto, debido a que el peróxido de hidrógeno necesita de estar presente a concentraciones más altas y tener tiempos de contacto mas largos.

El peróxido de hidrógeno tuvo mayor actividad oxidativa sobre los quistes de *G. lamblia* a un pH 10, y a un tiempo de contacto de 120 minutos con una concentración del 30%, obtuyéndose una inactivación del 71.86 %.

En cuanto a los huevos de *T. canis* sólo se alcanzó una inactivación del 54.44% con peróxido de hidrógeno al 30% a los 120 minutos de contacto a un pH 10, este porcentaje bajo se debe a que el peróxido de hidrógeno no oxida totalmente al huevo debido a su composición, por lo que se necesitarían tiempos de contacto mas prolongados para eliminar el riesgo de transmisión de formas infectantes de HH *T. canis*.

La aplicación del peróxido de hidrógeno se incrementó hasta 1.6 veces a pH 10, en donde se favoreció la producción de radicales hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ), en comparación con el pH neutro y el pH ácido.

La aplicación de agua saturada con ozono de manera individual o combinada con peróxido de hidrógeno a diferentes valores de pH no eliminó el riesgo de transmisión de la giardiosis, ya que se alcanzaron valores máximos de solo el 35.54% de actividad giardicida.

La oxidación de los quistes de *G. lamblia* cuando se ozonaron directamente en el reactor se incrementó hasta 2.6 veces que en el tratamiento con agua saturada con ozono, por lo que la inactivación resultó ser más eficiente.

Durante la oxidación con ozono a pH 7 no se eliminó el riesgo de transmisión de la giardiosis, ya que se obtuvo una eficiencia de solo el 84.62%, y en el caso de la toxocariosis la eficiencia fue de solo 45.24%, mientras que a pH alcalino se favorece la formación y acción de los radicales hidroxilo, incrementándose la inactivación 1.1 veces de ambos parásitos.

La oxidación por ozono a pH 10 favorece la inactivación de los quistes de *G. lamblia* y en ambiente ácido la inactivación de huevos de *T. canis*. Estas diferencias se deben a las condiciones de composición de la pared celular de ambas formas parasitarias, ya que mientras *G. lamblia* posee una sola pared de N-acetilgalactosamina y N-acetilglucosamina, *T. canis* posee cuatro paredes, estando presente solo en una de ellas la N-acetilglucosamina.

En *G. lamblia* el ozono oxida a las proteínas que constituyen la pared del quiste actuando sobre el enlace peptídico (grupo carboxilo y amino) a pH 10, y cuando se combina ozono con peróxido de hidrógeno, la oxidación aumenta.

El ozono reacciona con los aminoácidos que se encuentran presentes en la capa externa de los huevos de *T. canis*, especialmente cuando el pH es ácido, ya que actúa sobre el átomo de nitrógeno o sobre el grupo R alquil sulfurado o insaturado, pero también puede actuar sobre ambos al mismo tiempo.

La oxidación con ozono en combinación con el peróxido de hidrógeno y la acción de los radicales hidroxilo formados en el ambiente alcalino presentaron mayor inactivación de los quistes *G. lamblia*, del 99.4%; para el caso de *T. canis* fue del 89.4%, en comparación con la inactivación alcanzada en reacciones a pH neutro y ácido. A pesar de haber obtenido los mencionados porcentajes de inactivación, el riesgo de transmisión de formas infectantes de ambos parásitos no se eliminó, ya que se necesitaría aumentar el tiempo de contacto para ambas formas infectantes, sugiriéndose hasta de 15 minutos, en el caso de *G. lamblia* y de 3 horas para *T. canis*.

La oxidación por ozono originó la pérdida de la capacidad de exclusión del colorante azul de metileno, lo que indica que las membranas, que están debajo de la pared del quiste de *G. lamblia*, han perdido su permeabilidad selectiva. Además, originó alteraciones morfológicas observadas por microscopía óptica, lo que explica en parte, la pérdida de su capacidad de exquistamiento y por lo tanto de su infectividad.

Por todo lo anterior, se propone el empleo del peróxido de hidrógeno, ozono así como su combinación ozono/peróxido de hidrógeno, como una alternativa menos agresiva para el ambiente que el tratamiento con cloro en el control de la transmisión de ambas parasitosis.

La aplicación en campo de los tratamientos estudiados en esta tesis sería posible si se cuenta con los recursos necesarios para implementar una planta de tratamiento pequeña, donde se aplicaría un pre y pos tratamiento con ozono para que de esta manera se asegure que el agua tratada esté libre de estos parásitos, que presentan un problema de salud muy serio actualmente a nivel mundial.

## REFERENCIAS

- Abdullah Y., Ahmad N., Hummaira L., Aamir A. A. K. 2007. Pathogen Re-Growth in UASB effluent disinfected by UV, O<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and advanced oxidation processes. *Ozone: Sci. & Eng.* 29(6): 485-492
- Acero L. J y Von G.U. 2001. Characterization of oxidation processes: ozonation and the AOP O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Journal AWWA.* 93(10): 90-100.
- Adam D.R. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.* 14(3): 447-475.
- Aieta E., Reagan J., Lang L., McCreynolds J. 1988. Advanced oxidation processes for treating groundwater Contaminated with TCE and PCE: pilot-scale evaluations. *J. Am. Water Works Assoc.* 80(5): 64-72.
- Anderson R. C. 2000. Nematode parasites of vertebrates. Their development and transmission. 2<sup>nd</sup> edition. CABI Publishing, Oxon. pp 303-305.
- Ankarklev J., Jerlström H. J., Ringquist E., Troell K., Suärd G. S. 2010. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nature Rev. Microbiol.* 8: 413-422.
- APHA, AWWA, WPCF. 1992. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Edit. Díaz Santos. Madrid, España. pp 4-187.
- Archelli S y Kozubsky L. 2008. *Toxocara* y Toxocariosis. *Acta Bioquim. Clin. Latinoam.* 42(3): 379-84.
- Arévalo A., Duque S., Nicholls R. S. 2005. Experimental infection of the Gerbil (*Meriones unguiculatus*) by Colombia isolates of *Giardia duodenalis*. *Biomédica.* 25(3): 305-14.
- Bancroft K., Chrostowski R., Wright L., Suffet H. 1984. Ozonation and oxidation competition values. *Water Res.* 18(4): 473-478.
- Barbosa J., Espinar M. J., Goncalves R., Pina-Vaz C. 2013. *Cryptosporidium spp.*, *Giardia lamblia* y *Encephalitozoon intestinalis* emergent opportunists. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental.* LIII(2): 117-124.
- Bataller O. M., Fernández A. L., Véliz E. 2010. Eficiencia y sostenibilidad del empleo del ozono en la gestión de los recursos hídricos. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 26(1): 85-95.
- Bazán-Tejeda M. L., Argüello-García R., Ortega-Pierres G. 2008. La biogénesis del quiste de *Giardia duodenalis* como modelo de diferenciación unicelular. *Mensaje Bioquímico XXXII.*



- Becerril F. M.A. 2004. Parasitología médica. Mac Graw-Hill/Interamericana Editores S.A de C.V. pp 1-138.
- Beltrán J. F, Encinar J. M., González J. F. 1997. Industrial wastewater advanced oxidation. Part 2. Ozone combined with hydrogen peroxide or UV radiation. *Wat. Res.* 31(10): 2415-2428.
- Betancourt W y Rose B.J. 2004. Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia*. *Vet. Parasitol.* 126: 219-234.
- Bingham K. A y Meyer A. E. 1979. *Giardia* excystation can be induced in vitro in acidic solutions. *Department of Microbiology.* 227: 301-302.
- Bingham, K. A., Jarrol L. E., Meyer A. E. 1979. *Giardia* sp.: Physical Factors of Excystation *in Vitro*, and Excystation vs Eosin Excystation as Determinants of Viability. *Exp. Parasitol.* 47: 284-291
- Blanchard P. A., Bird R. M., Wright L. J. 1998. Peroxigen disinfection of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm on stainless steel discs. *Biofouling.* 33(3): 233-253.
- Botero D., Restrepo M. 2003. Parasitosis humanas. Corporación para investigaciones biológicas. Medellín Colombia pp. 154-158.
- Boucher M y Gillin F.D. 1990. Excystation of in vitro-derived *Giardia lamblia* cysts. *Infect. Immun.* 58(11): 3516-3522.
- Bouhoum K., Amahmid O., Asmama S. 2000. Occurrence and removal of protozoan cysts and helminth eggs in waste stabilization ponds in Marrakech. *Water Sci. Technol.* 42(10-11): 159-164.
- Bracho M., Sarcos M., Reyes P., Botero L. 2007. Presencia de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* en agua potable. Maracaibo, Venezuela. *Ciencia.* 15(2). pp 164-171
- Brunet R., Bourbigot M., Dore M. 1984. Oxidation of organic compounds through the combination ozone-hydrogen peroxide. *Ozone: Sci. Eng.* 6: 163-184.
- Bukhari Z., Marshall M., Korich D., Flicker C., Smith H. 2000. Comparision of *Cryptosporidium parvum* viability and infectivity assays following ozone treatment of oocyst. *App. Environ. Microbiol.* 66(7): 2972-2980.
- Calderón Arguedas O. 2004. Parasitología general: Elementos y actividades. San José, Costa Rica. Editorial de la Universidad de Costa Rica. pp 27-29.
- Camel V y Bermand A. 1998. The use of ozone and associated oxidation processes in drinking water treatment. *Wat. Res.* 32(11): 3208-3222.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Division of Parasitic Diseases. National Center for Infectious Diseases. Consultado en la página web <http://www.cdc.gov/parasites/toxocariasis/biology.html> con última revisión de noviembre de 2004.

Chester P.B., Clifton J.R., Wayne C.E. 1986. Parasitología Clínica 2ª edición. Editorial Salvat. Barcelona, España. pp 246-248, 332-356.

Cho M., Chung H., Yoon J. 2002. Effect of pH and importance of ozone initiated radical reactions in inactivating *Bacillus subtilis* spore. *Ozone Sci. Eng.* 24(2): 145-150.

Cho M., Chung H., Yoon J. 2003. Disinfection of water containing natural organic matter by using ozone-initiated radical reactions. *Appl. Environ. Microbiology.* 69(4): 2284-2291.

Chuen-Tyan L., Jiunn-Shiow W., Hong-Kean O. 2002. Effect of ozone treatment on *Eimeria colchici* oocysts. *J. Parasitol.* 88(1): 159-162.

Chun-Chieh T y Chih-Sham L. 2006. Ozone for inactivation of aerosolized bacteriophages. *Aerosol Sci. and Tec.* 40(9): 683-689.

Collage of Veterinary Medicine, University of Georgia. 2007. [www.vet.uga.edu.info@stenco.es](http://www.vet.uga.edu.info@stenco.es)

Cordero del campillo H., Rojo V. F. A., Martínez F. A. R., Sánchez A. M. C., Hernández R. S., Navarrete L. C. I., Díez BP., Quiroz R. H., Carvalho M. 1999. Parasitología veterinaria. Mc. Graw Hill. Madrid. pp 636-639.

De Dios G. 2005. Biocidas para el control de aguas de refrigeración. División de circuitos industriales. STENCO. España.

De la Fe-Rodríguez P., Duménigo-Ripol B.E., Brito-Alberto E., Aguilar-Sotelo J. 2006. *Toxocara canis* y síndrome de la larva *migrans visceralis*. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET.* 7(4): 42.

Deitsch W. K., Moxon R. E., Wellems E. T. 1997. Shared themes of antigenic variation and virulence in bacterial, protozoal and fungal infections. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61(3): 281-293.

Di Giovanni G.D., Betancourt W. Q., Hernández J., Assadian N. W., Flores Marquez J. P., López E. J. 2006. Investigation of potential zoonotic transmission of Cryptosporidiosis and Giardiasis through agricultural use of reclaimed wastewater. *Int. J. Environ Health.* 16(6): 405-18.

Díaz C. M. E., Leyva M. E. E., Mata H. V., González R. H. 2003. Incidencia y viabilidad de *Cryptosporidium parvum* en el agua potable de Ciudad Obregón Sonora, México. *Rev. Contam. Ambient.* 19 (2): 67-72.

Doménech J. 2003. *Cryptosporidium* y *Giardia*, problemas emergentes en el agua de consume humano. *Sanidad ambiental.* 22(11): 112-116.

Doménech J. 2004. Ozono frente a cloro. *Sanidad ambiental.* 23(5): 120-126.

Doménech J., Wilson F., Jardim W. F., Litter M. I. 2002. Capítulo I. Procesos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes. Este trabajo es parte del proyecto CNEA-CAC-UAQ #95-Q-03-05. M.I.L. CONICET. Argentina. pp 3-24.

Doménech J., Wilson F., Jardim W. F., Litter M. I. 2002. Capítulo I. Procesos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes. Este trabajo es parte del proyecto CNEA-CAC-UAQ #95-Q-03-05. M.I.L. CONICET. Argentina. pp 3-24.

Driedger, M. A., Rennecker, L.J. y Mariñas, J. B. 2000. Sequential Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with Ozone and free Chlorine. *Wat. Res.* 34 (14,): 3591-3597.

Eguía-Aguilar P., Cruz-Reyes A., Martínez-Maya J.J. 2005. Ecological analysis and description of the intestinal helminths present in dogs in México city. *Vet. Parasitol.* 127: 139-146.

Facile N., Benoit B., Prevóst M., Koudjonou B. 2000. Evaluating bacterial aerobic spores as a surrogate for *Giardia* and *Cryptosporidium* inactivation by ozone. *Wat Res.* 34 (12): 3238-3246.

Fernández-Torres I., Bataller-Venta M., Hernández-Castro C., Sánchez-Urrutia E., Morales-Chacón Y. 2010. Actividad antimicrobiana de los subproductos generados por la reacción del ozono con los microorganismos. *CENIC. Ciencias biológicas.* 41(2): 121-125.

Finch G., Black E., Labatiuk L., Gyürék L, Belosevic M. 1993. Comparison of *Giardia lamblia* and *Giardia muris* cyst in activation by ozone. *App. Environ. Microbiol.* 59(11): 3674-3680.

Flores J. L. 2002. Modelo de evaluación de riesgos sanitarios derivados del consumo de agua y alimentos. *Food, Nutrition and agricultura, FAO.* 31: 42-51.

Fonte G. L., Ali A. S. 2010. Giardiosis ¿Una zoonosis? *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología.* 48(2): 108-113.

Gallegos-Berenguer J. 1997. *Parasitología. Atlas Temático.* Ed. Emegé. Barcelona, España. pp 90.

García-Gómez C., Gortáres-Moroyoqui P., Drogui P. 2011. Tratamientos biológicos y de oxidación avanzada combinados para una solución a la biotecnología ambiental. *Ide@s CONCYTEG*. 6(71): 585-605.

Gersovitz M., Hammer J. 2001. The economical control of infectious diseases. [gerso@worldnet.att.net](mailto:gerso@worldnet.att.net) & [jhammer@worldbank.org](mailto:jhammer@worldbank.org).

Giese C. A., Christensen E. 1954. Effects of ozone on organisms. *Physiological zoology*. 27(2): 101-115.

Glaze W., Kang W., Chapin D. 1987. The chemistry of water treatment processes involving ozone, hydrogen peroxide and ultraviolet radiation. *Ozone Sci. Eng.* 9: 335-352.

Gottschalk C. Libra J. A., Saupe A. 2002. Ozonation of water and waste water. Edit. WILEY\_VCH. Weinheim, Germany. pp 15-19.

Hoigné J. 1998. Chemistry of aqueous ozone and transformation of pollutants by ozonation and advanced oxidation processes. The handbook of environmental chemistry. Quality and treatment of drinking water II, part C. Springer, Berlín. pp 85-141.

Hoigné J., Bader H. 1979. Ozonation of water: Role of Hydroxyl radicals as oxidizing intermediates. *Ameri. Assoc. Advancem. Sci.* 190(4216): 782-784.

Hong-Kean O., Ching-Lung L., Jiunn-Shiow W. 1997. Effect of ozone treatment on *Toxocara canis* eggs. *J. Vet Sci.* 66(2): 169-173.

Ibáñez C. G., Ramírez C. R. C., Marquéz N. A., Alonso G. M. S., León A. G., León G. G., Noguera T. B. 2013. Effect of ozone and peroxone on helminth *Hymenolepis nana* eggs. *Ozone: Sci & Eng.* 35(3): 67-62.

Ishizaki K., Sawadaishi K., Miura K., Shinriki N. 1987. Effect of ozone on plasmid DNA *Escherichia coli in situ*. *Water Research*. 21(7): 823-827.

Jiménez B. 2007. Helminths (worms) eggs federal control in wastewater and sludge. International symposium on new directions in urban water management. 12-14 september, unesco. París. pp 1-8.

Khadre A. M., Yousef E. A y Kim G. J. 2001. Microbiological aspects of ozone, applications in food: a review. *Journal of food science*. (9): 1242-1252.

Korich D., Mead J., Madore M., Sinclair N., Sterling C. 1990. Effect of ozone, chlorine dioxide, chlorine and monochlorine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *App. Environ. Microbiol.* 56(5): 1423-1428

- Labas M., Zalazar C., Brandi R., Cassano A. 2008. Reaction Kinetics of bacteria employing hydrogen peroxide. *Biochem. Eng. J.* 38(1): 78-87.
- Labatiuk W. CH., Belosevic M., Finch R. G. 1992. Factors influencing the infectivity of *Giardia muris* cysts following ozone inactivation in laboratory and natural waters. *Wat. Res.* 26(6): 733-743.
- Lamothe- Argumedo R., García-Prieto L. 1988. Helmintiasis del hombre en México. Ed. AGT. México, D.F. pp 1-128,140.
- Lanao M., Ormad M. P., Ibarz C., Miguel N., Ovelleiro L. J. 2008. Bactericidal effectiveness of O<sub>3</sub>, O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub> on *Clostridium perfringens*. *Ozone: Sci and Eng.* 30(6): 431-438.
- Lazarova V., Janex M.L., Fiksdal L., Oberg C., Barcina I., Pommeypuy, M. 1998. Advanced Wastewater Disinfection Technologies: Short and Long Term Efficiency. *Wat. Sci. Tech.* 38(12):109-117.
- Lazarova V., Savoye P., Janex L. M., Blatchley III R. E., Pommeypuy M. 1999. Advanced Wastewater Disinfection Technologies: state of the art and perspectives. *Wat. Sci. Tech.* 40(4-5): 203-213.
- Lujan H. D y Svärd S. 2011. *Giardia* a model organism. SpringerWien New York. Pp 3, 71, 93, 139.
- Luján H. D. 2006. *Giardia* y giardiasis. Medicina (Buenos Aires). 66(1): 70-74.
- Macpherson C. N. L. 2013. The epidemiology and public health importance of toxocariasis: A zoonosis of global importance. *Int. J Parasitol.* 43(12-13): 999-1008.
- Makni. H. 2001. Disinfection of secondary effluents by infiltration percolation. Soukra Túnez. *Water Sci. Technol.* (43)12: 175-178.
- Mara D. y Cairncross S. 1989. Guidelines for the Safe Use of Wastewater and Excreta in Agriculture and Aquaculture. WHO Geneva. pp 1-112.
- Marques P.T., Moreira S.E.L., Marmo M.L., Amaro Z.R., Da Silva S.R., Barrinha F.F., De Lima J., Barrinha F.A. 2014. Comparative analysis of ozone and ultrasound Effect on the elimination of *Giardia* spp. From wastewater. Sao Paulo, Brazil. *Ozone: Sci. Eng.* 36(2):138-143.
- Martínez-Barbosa I., Fernández-Presas A.M., Vazquez-Tsuji O., Ruíz-Hernández A. 1998. Frecuencia de *Toxocara canis* en perros y áreas verdes del sur de la Ciudad de México, Distrito Federal. *Vet. Méx.* 29(3): 239-243.

Masten S. y Hoigné J. 1992. Comparison of ozone and hydroxyl radical- induced oxidation of chlorinated in water. *Ozono Sci. Eng.* 14(3): 197-214.

Mercado-Burgos N., Hoehn R., Holliman R. 1975. Effect of halogen and ozone on *Schistosoma mansoni*. *J. Water Pollut.* 47(10): 2411-2419.

Müller J. P. y Jekel M. 2001. Comparison of advanced oxidation processes in flow-through pilot plants (part I). *Water Sci, Technol.* 44 (5): 303-309.

Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994. Salud ambiental, agua para consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.

Norma Oficial Mexicana, NOM-179-SSA1-1998. Vigilancia y evaluación del control de calidad del agua para uso y consumo humano distribuida por sistemas de abastecimiento público.

Obala A.A., Simiyu C. J., Odhiambo D. O., Nanyu V., Chege P., Downing R., Mwaliko E., Menya D., Chelagat D., Nyamogoba H. D. N., Ayuo P. O., Twagirumuka M., Vandebroek D., Otsyula B. B. O., Maeseneer J. 2013. Webuye Health and Demographic Surveillance Systems Baseline Survey of soil-transmitted helminths and intestinal protozoa among children up to five years. *J Trop Med.* Vol. 2013. pp 1-7

Orta-Velazquez M.T., Martinez L.J., Monje-Ramírez I., Rojas-Valencia M.N. 2004. Destruction of Helminth (*Ascaris suum*) eggs by ozone. *Ozone: Sci. Eng.* 26(4): 359-366.

Orta-Velázquez M.T., Rojas-Valencia M.N., Vaca-Mier M. 2002. Destruction of helminth (*Ascaris suum*) eggs by ozone: second stage. *Ozone: Sci. Eng.* 2(3): 227-233.

Osorio R. F., Torres R. J. C., Sánchez B. M. 2010. Tratamiento de aguas para la eliminación de microorganismos y agentes contaminantes. Ediciones Díaz de Santos. pp 20-25.

Prácticas de laboratorio de Química analítica. 2014. Químico farmacéutico industrial. Elaborado por la academia de profesores del departamento de química inorgánica. pp 121-123.

Quiróz R. H. 1997. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Limusa. México, D.F. pp 395, 404-405.

Ran Z.L., Li S.F. 2013. Inactivation of *Cryptosporidium* and *Giardia* in drinking water by ozone. *Appl. Mech. Mater.* 361-363, 623-627.

- Rennecker L.J., Driedger M.A., Rubin A.S., Mariñas J.B. 2000. Synergy in sequential inactivation of *Cryptosporidium parvum* with ozone free chlorine and ozone monochloramine. Urbana USA. *Wat Res.* 34(17): 4121-4130.
- Rennecker L.J., Mariñas, J.B., Owens, H.J., Rice W.E. 1999. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* Oocysts with Ozone. *Wat. Res.* 33(11): 2481- 2488.
- Rice W. E., Hoff C. J. 1981. Inactivation of *Giardia lamblia* cyst by ultraviolet irradiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 42(3): 546-547.
- Rice W. E., Schaeffer III W. F. 1981. Improved *in vitro* excystation procedure for *Giardia lamblia* cysts. *Journal Clin. Microbiol.* 14(6): 709-710.
- Rivera M., De la Parte M., Hurtado P., Magaldi L., Collazo M. 2002. Giardiasis intestinal. Mini-Revisión. *Invest. Clin.* 43(2): 119-128.
- Roberts L. S., Janovy J. J., Schmidt P. 2005. Foundations of Parasitology. Seventh edition. Mac Graw Hill. Boston. pp 354-356.
- Roddie G., Stafford P., Holland C., Wolfe A. 2008. Contamination of dog hair with eggs of *Toxocara canis*. *Vet. Parasitol.* 152(1-2):85-93.
- Rodríguez F. J. 2007. Procesos de potabilización del agua e influencia del tratamiento de ozonización. Editorial. Díaz de Santos. pp 30-37
- Rojas O.M. 2001. Remoción de indicadores patógenos y parásitos (coliformes fecales y huevos de helminto) en lodos municipales de tipo fisicoquímico por digestión anaeróbica termofílica. XXVII Congreso interamericano de Engenharia sanitaria e Ambiental.
- Rojas V. N., Orta, L. T. 2000. Resistencia de los Huevos de helmintos a la desinfección con ozono y luz ultra violeta. *Rev. Tláloc-AMH*, abril-junio, (18): 23-24.
- Rojas-Valencia M. N. 2011. Research on ozone application as disinfectant and action mechanisms on wastewater microorganisms. Science against pathogens: communicating current research and technological advances. Ed. A. Méndez-Vilas. pp 263-271.
- Rojas-Valencia M.N., Orta-Velásquez M.T., Vaca-Mier M., Franco V. 2004. Ozonation by-products issued from the destruction of microorganisms present in wastewaters treated for reuse. *Water Sci. Technol.* 50(2): 187:93.
- Rojas-Valencia N.,Orta de Velásquez T. 2002. Avances en la desinfección de aguas residuales para eliminar huevos de helminto y otros microorganismos. Ingeniería sanitaria y ambiental. AIDIS, Argentina. No. 60. pp 67.

- Sánchez-Ovejero C., Benito-López F., Díez P., Casulli A., Siles-Lucas M., Fuentes M., Manzano-Román R. 2016. Sensing parasites: Proteomic and advanced bio-detection alternatives. *J Proteomics*: S1874-3919(16)30005-7.
- Sánchez-Pérez H. J., Vargas-Morales M. G., Méndez-Sánchez J. D. 2000. Calidad bacteriológica del agua para consumo humano en zonas de alta marginación de Chiapas. *Salud Pública de México*. 42(5): 397-406.
- Sánchez-Vega J.T., Tay-Zavala J., Aguilar-Chiu A., Ruíz-Sánchez D., Malagón F., Rodríguez-Covarrubias JA., Ordoñez-Martínez J., Calderón-Romero L. 2006. Cryptosporidiosis and other intestinal protozoan infections in children less than one year of age in Mexico City. *AM. J. Trop. Med. Hyg.* 75(6): 1095-1098.
- Santos-Guzmán J., Guerrero-Medrano L., Reyna-Caamaño R., Mejía-Velásquez G. 2009. Marco legislativo del suministro de agua en México. *Rev. Panam. Salud Públ.* 26(6): 549-52.
- Sanz J., Lombraña J. I., De Luis A. 2012. Estado del arte en la oxidación avanzada a efluentes industriales: nuevos desarrollos y futuras tendencias. *Afinidad. Revista de Química teórica y aplicada*. 70(561): 26-33.
- Schmidt G. R y Roberts' L. S. 2013. *Foundations of Parasitology*. Ninth edition. Mac Graw Hill. New York. pp 88-89.
- Shayne E., Baucher M., Gillin D. F. 1990. Excystation of *in vitro*- derived *Giardia lamblia* cyst. *Infect. Immun.* 58(11): 3516-3522.
- Shin A.G y Sobsey D.M. 2003. Reduction of Norwalk virus Poliovirus 1, and Bacteriophage MS2 by Ozone disinfection of water. *APPL. Environ. Microbiol.* 69(7): 3975-3978.
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 2015. Boletín Epidemiología. Secretaría de salud. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/infoepi/index.htm>
- Smith H., Cacció S., Tait A., MacLauchlin J., Thompson A. 2006. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. *Trends Parasitol.* 22(4): 160-167.
- Smyth J. D. y Mc Manus D. P. 1989. *The Physiology and Biochemistry of Cestodes* New York: Cambridge University Press, Chap. 7: The Biology of the Egg, pp.156-194.
- Smyth J., Larry S., Gerald R. 1969. *The Physiology of Cestodes*. Mc-Graw Hill Higher Education. pp 354-355.



Solarte Y., Peña M., Madera C. 2006. Transmisión de protozoarios patógenos a través del agua para consumo humano. *Colomb. Med.* 73(1): 74-82.

Sommer R., Pribil W., Pflegers H., Werderitsch M., Gehringer P. 2004. Microbicidal efficacy process using ozone/hydrogen peroxide in water treatment. *Water Sci. Technol.* 50(1): 159-64.

Sotoh Y. A., Trosko E.J., Masten J.S. 2007. Methylene blue dye test for rapid qualitative detection of hydroxyl radicals formed in a Fenton's reaction aqueous solution. *Environ Sci. Technol.* 41(8): 2881-2887.

Steindl G., Fiedler A., Huhulescu S., Wewalka G., Allerberger F. 2014. Effect of airborne hydrogen peroxide on spores of *Clostridium difficile*. *Wien Klin Wochenschr.* DOI 10.1007/s00508-014-0682-6.

Suty H, De Traversay C., Cost M. 2004. Applications of advanced oxidation processes: presents and future. *Water Sci. Technol.* 49(2): 227-233.

Tang W. 2004. Physicochemical treatment of hazardous wastes. Lewis Publisher. pp 85-113.

Thompson RCA. 2008. Giardiasis: Modern concepts in control and management. *Ann Nestlé.* 66: 22-39.

Upcroft P., Upcroft J. 2001. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clin. Microbiol. Rev.* 14(1): 150-164.

US EPA. 1999b. Folleto informativo de tecnología de aguas residuales, desinfección con ozono. Washington, D.C. Office of water. pp 1-  
(<http://www.epa.gov/owm/mtb/cs-99-063.pdf>).

US EPA. 1999c. Guidance manual: Alternative disinfectants and oxidants. Capítulo 3 y 7: Ozone generation, peroxone (ozone/hydrogen peroxide). Washington, D.C. pp 95, 1-21

US EPA. 1999d. Guidance Manual: Alternative Disinfectants and Oxidants. Washington, D.C: Office of Water, Chap. 3: Ozone. pp. 7-19.

US EPAa (United States Environmental Protection Agency). 2001. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by Filtration/MS/FA. Edición EPA-821-R-025. US EPA office of water. pp 58

Van-Leeuwen J., Pipe-Martín C., Lehmann R. 2003. Water reclamation at south cabooture, Queensland, Australia. *Ozone: Sci. Eng.* 25(2): 107-120.

Vázquez T. O y Campos R. T. 2009 Giardiasis: La parasitosis más frecuente a nivel mundial. *Rev. Del Centro de Inv. (Méx).* 8(31): 75-90.

Véliz L.E., Llanes O.J.G., Fernández G.L.A., Bataller VM. 2010. Evaluación de la eficiencia de los procesos de coagulación-floculación y ozonización a escala de laboratorio en el tratamiento de aguas residuales municipales. *CENIC ciencias químicas*. 41(1): 49-56.

Von S.C. 2008. Advanced oxidation processes: mechanistic aspects. *Wat. Sci. Tec.* 58(5): 1015-1021.

Werner APT. 2013. Parasitología humana. Primera edición. Mac Graw Hill Interamericana Editores S.A de C.V. México. pp 13-17, 452-453.

Wickramanayake B. G., Rubin J. A., Sproul J. O. 1984. Inactivation of *Giardia lamblia* cysts with ozone. *Appl. Environ. Microbiol.* 48(3): 671-672.

Wickramanayake G. B., Rubin J.A., Sproul O. J. 1985. Effects of ozone and storage temperature on *Giardia* cysts. *Journal (American water works association)*. 77(8): 74-77.

Wolfe L. R., Stewart H. M., Liang S., McGuire J. M. 1989. Inactivation of *Giardia muris* and indicator organisms seeded in surface water peroxono and ozone. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(9): 2230-2241.

Wolfe S. M. 1992. Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 5(1):93-100.

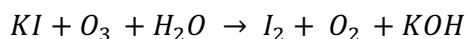
Yamasaki T., Inoue M., Ogawa M., Shiga S., Kishimoto T., Hawiwara T., Matsumoto T. 2004. Inactivation of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae* by ozone. *Letters in applied Microbiology*. 38:406-409.

## ANEXOS

### ANEXO A. Determinación de la cantidad de ozono en fase gaseosa por el método yodométrico

Este método (APHA-AWWA, WPCF, 1992) es cuantitativo, sujeto a pocas interferencias y con buena precisión, con este método se puede determinar la concentración de ozono en aire o agua, se utiliza el método semi-bach cuando a la muestra se le adiciona continuamente ozono en gas. En este caso se hizo en fase líquida, la solución de KI funciona como un medio reaccionante del ozono producido en exceso.

El ozono oxida al yodo ( $I^-$  a  $I_2$ ) proveniente de la solución de yoduro de potasio, al titular la solución con tiosulfato de sodio, utilizando solución de almidón para observar el vire de color amarillo a incoloro, conociendo el gasto podemos encontrar la concentración de ozono generado en un minuto. Se expresa en mg/min y nos permite conocer cuántos miligramos de ozono está produciendo nuestro generador.



De esta manera se libera  $O_2$  a la atmósfera y no ozono.

Para determinar la cantidad de ozono que se genera por este método, se utiliza la siguiente ecuación, y así podemos calcular cuántos miligramos de ozono se está generando por minuto.

$$mgO_3 / min = \frac{mL \text{ de } Na_2S_2O_3 \text{ gastados} \times \text{Normalidad de } Na_2S_2O_3 \times 2400}{VT}$$

El KI se prepara al 2%, se pesan 20 g de KI y se agregan a un matraz aforado de 1000 mL, diluir con agua destilada hasta el aforo para tener una solución 1 N, se conserva en un recipiente de plástico bien cerrado.

## **ANEXO B. Determinación de ozono disuelto por**

El método colorimétrico de índigo (APHA-AWWA, WPCF, 1992) nos permite conocer la cantidad de ozono disuelto que se encuentra en el agua, es un método cuantitativo.

**Principio:** En solución ácida el ozono decolora rápidamente el índigo. La disminución de la absorbancia es proporcional al aumento de la concentración y la proporcionalidad constante a 600 nm es  $0.42 + 0.01/\text{cm}/\text{mg}/\text{L}$ .

### **Reactivos:**

Solución madre índigo: añadir 500 mL de agua destilada y 1 mL de ácido fosfórico concentrado a un matraz de 1 L. Añádanse con agitación 770 mg de trisulfonato potásico de índigo,  $\text{C}_{16}\text{H}_7\text{N}_2\text{O}_{11} \text{S}_3\text{K}_3$ . Aforar hasta 1 L con agua destilada. Estable hasta 4 meses.

Reactivos de índigo I: añadir a un matraz aforado de 1L 20 mL de solución madre de índigo, 10 g de fosfato diácido de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) y 7 mL de ácido fosfórico concentrado, diluir hasta el aforo, es normalmente estable durante una semana.

Se usa para rangos de concentración de ozono de 0.01 a 0.1 mg de  $\text{O}_3/\text{L}$

Reactivo de índigo II: procédase como en el reactivo índigo I, añadiendo 100 mL de solución madre de índigo en lugar de 20 mL. Estable 1 semana.

- 1) Rangos de concentración de ozono de 0.01 a 0.1 mg de O<sub>3</sub>/L: añadir 10 mL de reactivo de índigo 1 a dos matraces aforados de 100 mL, llénese uno de ellos hasta el aforo con agua destilada (blanco) y otro hasta el aforo con la muestra totalmente decoloradas se eliminen rápidamente con agitación pero sin producir la pérdida de gas ozono. Medir la absorbancia de las dos soluciones a 600 nm ± 5 nm lo antes posible y siempre en las 4 h siguientes. Calcúlese de la siguiente manera:

$$mg \text{ de } O_3 = \frac{100 * \Delta A}{(f * b * V)}$$

Donde  $\Delta A$ = diferencia de absorbancia entre muestra y blanco

b= recorrido de la luz en la cubeta en cm.

V= volumen de la muestra en mL.

f= 0.42

Nota: se recomienda usar cubetas de 10 cm.

- 2) Rangos de 0.05 a 0.5 mg de O<sub>3</sub>/L: proceder como antes utilizando el reactivo índigo II en lugar del reactivo I. Preferentemente mídase la absorbancia la absorbancia en cubetas de 4 o 5 cm. (se aplica la formula anterior)
- 3) Concentraciones mayores a 0.5 mg de O<sub>3</sub>/L: procédase utilizando el reactivo de índigo II, pero en estas concentraciones superiores, se utilizará un menor volumen de muestra. Dilúyase la mezcla resultante a 100 mL con agua destilada. Úsese una pipeta de vidrio para dosificar la muestra, que se dejara fluir a través de un matraz Erlenmeyer durante un minuto por lo menos, sin producir burbujas. Lávese la pipeta con muestra y añádase al matraz la cantidad medida, manteniendo la punta de la pipeta por debajo de la superficie (se aplica la formula anterior).

Nota: En las primeras dos partes de experimentación, se aplicó el método para intervalos de concentración mayores de 0.5 mg/L

### **ANEXO C. Tinción de azul de metileno amortiguado para preparaciones húmedas**

Esta técnica de tinción se utiliza cuando se sospecha la presencia de trofozoítos en las preparaciones con solución salina, los cuales han perdido su movilidad y tienden a redondearse haciendo difícil su identificación, así como también se utiliza para observar la presencia de quistes. La ventaja de esta técnica es que se emplean reactivos fáciles de conseguir y preparar.

- **Solución A** (solución de ácido acético)

Ac. Acético glacial	1.2 mL
Agua destilada	98.8 mL

- **Solución B** (solución de acetato de sodio)

Acetato de sodio (CH <sub>3</sub> COONa) anhidro	1.6 g
Acetato de sodio trihidratado	2.6 g
Agua destilada	100 mL

**Preparación:** Disolver el acetato de sodio en 100 mL de agua destilada, mezclar y almacenar en un frasco con tapa (esta solución es estable por seis meses).

#### **Solución de trabajo para tinción**

Sol A	46.3 mL
Sol. B	3.7 mL
Colorante azul de metileno	0.5 g
Agua destilada	50 mL

**Preparación:** Mezclar las soluciones A y B con los 50 mL de agua y por último añadir el azul de metileno, agitar hasta su total disolución. Almacenar en frasco ámbar. Esta solución es estable indefinidamente, si se sedimenta el colorante se recomienda filtrar la solución.

### **Tinción**

- Tomar 5  $\mu$ L de quistes que ya fueron tratados
- Adicionar una gota de azul de metileno amortiguado, homogenizar
- Cubrir la preparación con un cubreobjetos de 18x18
- Incubar a temperatura ambiente por 3 minutos.
- Observar al microscopio con objetivos de 10x y 40x

### **Interpretación**

Con esta tinción los quistes se observan de color azul (quistes inactivados o no viables) y los quistes incoloros son aquellos que están viables.

## **ANEXO D. Prueba cualitativa de radical hidroxilo formado en los tratamientos con peróxido de hidrógeno y ozono/peróxido de hidrógeno (detección cualitativa de radicales hidroxilo)**

### **Fundamento:**

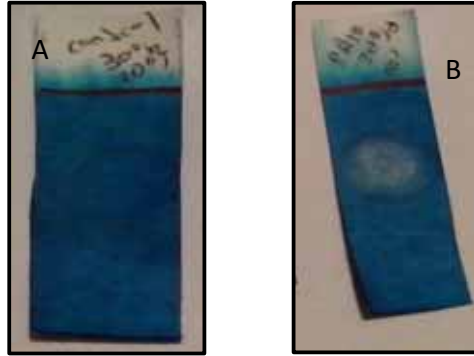
La prueba colorimétrica de azul de metileno es un indicador cualitativo que indica la presencia de radicales hidroxilo de manera inmediata. Esta prueba se caracteriza por ser sencilla, no requiere material caro y es rápida. La detección se lleva a cabo mediante el blanqueamiento de un indicador de papel filtro, previamente tratado con azul de metileno, después de aplicar una muestra acuosa la cual contiene radicales hidroxilo. En esta prueba, los radicales hidroxilo reaccionan con el catión del azul de metileno para producir un ion hidróxido y un catión radical de azul de metileno. El color del catión es azul oscuro y el catión radical es incoloro, la aplicación de una muestra conteniendo radicales hidroxilo al azul de metileno resultará en el cambio de color azul oscuro a incoloro.

Para la desinfección es necesario realizar pruebas que confirmen la presencia de radicales hidroxilo.

**Procedimiento:**

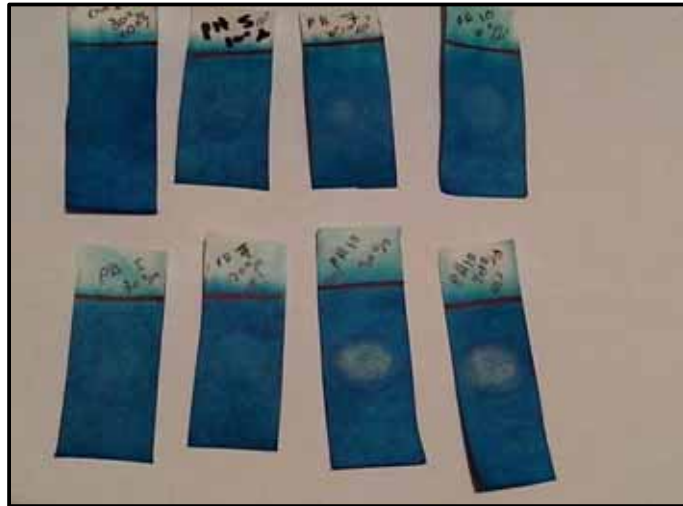
1. Preparar una solución 0.01 M de metanol.
2. Con la solución anterior preparar una solución 0.001 M de azul de metileno.
3. Recortar el papel filtro (grado 1, 70 mm diámetro, porosidad media) en rectángulos de 2 x 6 cm aproximadamente.
4. Marcar una línea horizontal a una distancia de 1.5 cm de la parte superior con un marcador permanente como se muestra en la Figura AB. Esta línea servirá como una barrera hidrofóbica para prevenir que el azul de metileno sobrepase la línea durante el proceso de inmersión.
5. Sumergir 10 veces la parte inferior de la tira dentro de la solución de azul de metileno hasta el nivel marcado.
6. Dejar secar las tiras en un lugar oscuro durante al menos 24 horas. Las tiras pueden ser guardadas en una bolsa de plástico negra hasta por 30 días sin que esto afecte los resultados de la prueba.
7. Tomar una muestra de líquido producto de la reacción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 10% y 30%, así como la combinación de  $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% y dejar caer una gota en el centro de la sección del papel, previamente tratado con azul de metileno. Debe realizarse una comparación con agua destilada. La ausencia de blanqueamiento del azul de metileno indica que no hay presencia de radicales hidroxilo. Por otro lado el blanqueamiento del azul de metileno debido a la presencia de radicales hidroxilo ocurre de forma inmediata pasando de un color azul oscuro a un color casi blanco, concentrado en el punto de aplicación y con un color azul oscuro alrededor, como se observa en la Figura 63.



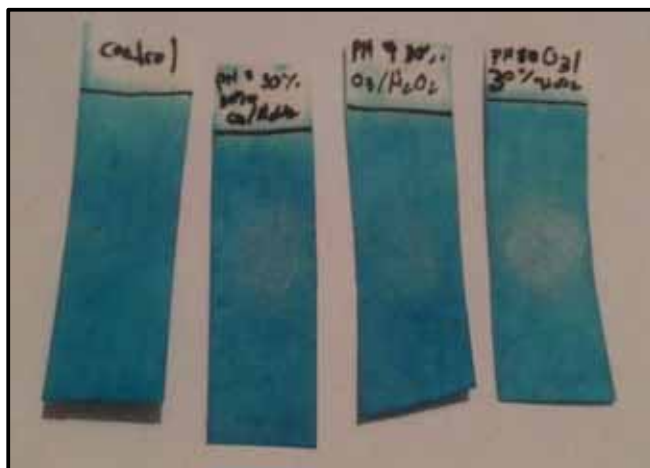


**Figura 64.** Test de azul de metileno. Control negativo (A) y control positivo (B).

**ANEXO E. Fotografías de la prueba cualitativa de radical hidroxilo formado en los tratamientos con peróxido de hidrógeno y ozono/peróxido de hidrógeno**



**Figura 65.** Fotografías de pruebas cualitativas de radicales  $\cdot\text{OH}$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 10% y 30% a pH 5, 7, 10.



**Figura 66.** Fotografías de pruebas cualitativas de radicales  $\bullet\text{OH}$  en  $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% a pH 5, 7, 10.