

03043
I



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MATEMATICAS Y DE ESPECIALIZACION EN ESTADISTICA APLICADA
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO**

TITULO

**EFICACIA ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS DE *Mentha piperita*,
Thymus vulgaris, *Lippia graveolens* Y DE LA SOLUCION
ANTISEPTICA GERMISOL aplicada *in vitro* A MICROORGANISMOS DE
LA PLACA DENTOBACTERIANA.**

POSGRADO EN ESTADISTICA APLICADA

ALUMNO: HECTOR JAVIER DELGADILLO GUTIERREZ

NUMERO DE EXPEDIENTE: 70765

NUMERO DE CUENTA: 5906702

**TESINA PARA OBTENER LA ESPECIALIZACION EN ESTADISTICA
APLICADA**

AÑO 2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**A mi esposa: Yolanda del Socorro
Por acompañarme en mi camino**

**Para Miguel, María, Mario y Mariana
Con cariño para los 4M, quienes siempre están conmigo**

**Para Javi y Vero
Por saber escucharme**

CONTENIDO	PÁGINA
PORTADA	1
ÍNDICE	2
TÍTULO	4
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN.	
RESISTENCIA Y DE SUSCEPTIBILIDAD	6
PROBLEMAS COMUNES EN LAS INFECCIONES	7
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
CAPÍTULO 1. METODOLOGÍA BACTERIOLÓGICA	
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS	9
PRUEBA DE RESISTENCIA MICROBIANA	9
RESISTENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD	10
CAPÍTULO 2.	
ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA	
DATOS	12
NOMENCLATURA UTILIZADA	12
MEDICIONES DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN	13
GRÁFICA DE CAJAS	15
CAPÍTULO 3	
METODOLOGÍA ESTADÍSTICA	
DISEÑO DE UN CRITERIO DE CLASIFICACIÓN	16
DISEÑO DE BLOQUES	16
DISEÑO FACTORIALES	17
PARCELAS DIVIDIDAS	18
EJEMPLOS DE PARCELAS DIVIDIDAS	19
PRUEBA DE TUKEY PARA COMPARACIONES MÚLTIPLES	19

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

CAPÍTULO 4.	
DISEÑO DEL EXPERIMENTO DE PARCELAS DIVIDIDAS	21
HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN	21
POBLACION	21
MUESTRA	22
TIPO DE ESTUDIO	22
NIVEL DE SIGNIFICANCIA	22
VALOR P	22
VARIABLES Y ESCALA DE MEDICIÓN	23
UNIDAD EXPERIMENTAL DE LA PARCELA GRANDE	24
SUBUNIDAD EXPERIMENTAL DE LA PARCELA PEQUEÑA	25
CAPÍTULO 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EL DISEÑO DEL EXPERIMENTO DE PARCELAS DIVIDIDAS	
MODELO COMPLETO PARA PARCELAS DIVIDIDAS	26
DISEÑO DE PARCELAS DIVIDIDAS UNO PARA LA ESTACIÓN DEL VERANO Y EL OTRO PARA LA ESTACIÓN DEL OTOÑO	29
RESULTADOS	33
CONCLUSIONES	36
BIBLIOGRAFÍA	37

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TÍTULO

EFICACIA ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS DE *Mentha piperita*, *Thymus vulgaris*, *Lippia graveolens* Y DE LA SOLUCIÓN ANTISÉPTICA GERMISOL aplicada *in vitro* A MICROORGANISMOS DE LA PLACA DENTOBACTERIANA.

RESUMEN

Debido al abuso de los antibióticos en patologías que no lo requieren como la ocasionada por la presencia de microorganismos patógenos en la cavidad oral, se busca una nueva alternativa para evitar la aplicación de los antibióticos en forma indiscriminada. Para ello se prueban los siguientes antibacterianos, extractos de: *Thymus vulgaris* (Tomillo), *Lippia graveolens* (Orégano), *Mentha piperita* (Yerbabuena) y el Germisol^{MR} elaborado a base de los extractos vegetales antes mencionados y de yodo fenolado entre otros compuestos. Además se utiliza el antibiótico Estreptomicina como control positivo y agua como control negativo. Este estudio es comparativo, longitudinal, prospectivo y experimental. La población consta de cuatro especies de bacterias patógenas *Staphylococcus aureus*, (*S aureus*), *Streptococcus pyogenes*, (*S pyogenes*), *Streptococcus salivarius* (*S salivarius*) y *Streptococcus sanguis* (*S sanguis*), extraídas de la placa dentobacteriana a pacientes y a personal del Hospital Gabriel Mancera del Instituto Mexicano del Seguro Social de la Ciudad de México y de la Clínica Dental Pirules de la Universidad Autónoma Metropolitana a los que se les añaden 5 antibacterianos Tomillo, Orégano, Yerbabuena, Germisol y Estreptomicina en dos estaciones del año 2000, verano y otoño. La muestra consta de la placa dentobacteriana de la cavidad oral de 30 pacientes. De la muestra de cada paciente se aíslan las bacterias patógenas y se cultivan en un medio de crecimiento de agar.

La unidad experimental para la parcela grande es una caja de Petri donde una cepa patógena es cultivada en agar nutritivo con sensidiscos impregnados de un antibacteriano. La caja de Petri funciona como unidad experimental para las cepas y el sensidisco funciona como subunidad experimental para los antimicrobianos. La variable de respuesta es el halo de inhibición medida en milímetros. Si el promedio del halo de inhibición que produce la bacteria por acción de los antibacterianos es menor o igual a 13.2 mm, se considera resistente y si es mayor o igual a 18.5 mm se considera susceptible, los valores entre 13.2 y 18.5 mm se consideran intermedios. Las variables explicativas son: I) El factor bacteria con las cuatro bacterias patógenas: *S aureus*, *S*

^{MR} GERMISOL. Solución desinfectante. IDEA BIOQUÍMICA, S. A. DE C. V.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

pyogenes, *S salivarius* y *S sanguis*. II) El factor antibacteriano: Extractos de Tomillo, Orégano, Yerbabuena, Germisol y la Estreptomycinina. III) El factor época de la estación del año en que se tomó la muestra: verano y otoño.

Los resultados indican: 1) Que las bacterias fueron resistentes a los extractos vegetales al 10% en una solución hidroalcohólica con etanol al 58%. 2) Al comparar la Estreptomycinina contra el Germisol se encontró que en el verano el *S aureus*, el *S salivarius* y el *S sanguis* fueron más susceptibles a la Estreptomycinina. 3) En el otoño el *S aureus* fue más susceptible al Germisol y en la misma estación del año *S pyogenes*, *S salivarius* y *S sanguis* fueron más susceptibles a la Estreptomycinina.

Se concluye que en otoño el Germisol es mejor bactericida que la Estreptomycinina para atacar al *S aureus*, en verano sucede lo contrario y la Estreptomycinina es mejor bactericida que el Germisol.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCIÓN

CONCEPTO DE RESISTENCIA Y DE SUSCEPTIBILIDAD

La resistencia es la capacidad que tienen las bacterias de crecer y de reproducirse en presencia de antibacterianos y la susceptibilidad es la posibilidad que éstas tienen de disminuir su crecimiento y reproducción en presencia de dichos antibacterianos, siendo el grado de resistencia y de susceptibilidad diferente para cada microorganismo ante los distintos antibacterianos (1), por lo que el bactericida ideal es un fármaco al cual las bacterias no presenten resistencia y sí susceptibilidad.

Los antibióticos fueron descubiertos por Alexander Flemming en 1928 cuando observó que la presencia de un hongo en un medio de cultivo inhibía el crecimiento de bacterias, concluyendo que el hongo producía una sustancia capaz de matarlas, a este compuesto le denominó penicilina, el cual fue el precursor del advenimiento de la era moderna de los antibióticos. Posteriormente y debido a su uso, emergieron cepas bacterianas resistentes y las pruebas de la resistencia y de la susceptibilidad se convirtieron en una necesidad práctica. El optimismo inicial de que el descubrimiento de la penicilina sería el final de las infecciones duró poco ya que las bacterias fueron creando resistencia y debido a ello la industria farmacéutica empezó a producir diferentes tipos de fármacos como antibióticos y antibacterianos.

La resistencia puede ser inducida por la presencia de antibacterianos, un ejemplo es el de la penicilinasasa que destruye a la penicilina y sólo se induce si la bacteria y la penicilina entran en contacto. Cuando surge un nuevo antibiótico, resulta eficaz sólo por un tiempo, debido a que en presencia del antibiótico la cepa desarrolla resistencia.

Hay varios mecanismos de resistencia, muchos se presentan al alterar las estructuras celulares ya sea la membrana o la pared celular. Un mecanismo de resistencia sumamente importante es la producción de plásmidos que son partículas extracromosómicas que afectan a los antibacterianos al producir compuestos que alteran los diversos componentes celulares inactivando a los antibióticos. En algunas bacterias un mecanismo eficaz de resistencia es la eliminación de los antibióticos una vez que penetran a su interior; otro mecanismo es la alteración de las proteínas fijadoras de antibacterianos, de tal manera que los antibióticos se inactivan debido a que no presentan un sitio de fijación. También existen proteínas enzimáticas que modifican a los antibióticos haciéndolos ineficientes. Otro mecanismo es la interacción entre las barreras de difusión de los antibióticos con la producción de enzimas que los degradan (1).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La resistencia a los antibacterianos es un grave problema de salud ya que existen cepas que cada vez van perdiendo susceptibilidad haciéndose más resistentes.

La resistencia a las drogas de los bacilos del tracto digestivo fue encontrada en bacterias aisladas de los alimentos como las verduras y la leche en donde la resistencia de las bacterias alcanzó hasta un 70 y un 90 % respectivamente (2). Cuando a cultivos de cepas de *Klebsiella pneumoniae* en presencia de algunos desinfectantes se les agrega suspensiones de la misma cepa se incrementa la resistencia a compuestos fenólicos, y a algunos derivados yodados hasta disminuir paulatinamente la susceptibilidad cuando se incrementa el número de veces que se va añadiendo la suspensión (3); la resistencia de *Staphylococcus aureus* ha llegado hasta el 60% en los hospitales (4). Hay algunos casos de bacterias que no han creado resistencia a la penicilina como el *Streptococcus pyogenes*, aunque sí se ha visto que tiene una baja resistencia para otros antibióticos (5).

PROBLEMAS COMUNES EN LAS INFECCIONES

Los problemas comunes en las infecciones en los hospitales son los siguientes: a) Las infecciones de las cirugías ocasionadas por estafilococos y estreptococos, b) El incremento de infecciones por bacterias Gram negativas, c) La administración de antibióticos favorece la selección de bacterias Gram negativas al incrementarse la resistencia, d) El abuso de los antibióticos al utilizarlos en la asepsia y la antisepsia, e) La administración sistémica indiscriminada de los antibióticos en infecciones quirúrgicas y f) El abuso de los antibióticos como medidas profilácticas para evitar infecciones de las heridas (6).

DESARROLLO Y PREVENCIÓN DE LA RESISTENCIA.

La resistencia a múltiples agentes antibacterianos es un hecho de la vida contemporánea, se cree que es causada por la interrupción de la terapia o el mal uso de los antibióticos tales como una dosis insuficiente o el antibiótico equivocado; esto juega un papel importante en el desarrollo de la resistencia. Algunos agentes antioxidantes como las catequinas del té verde tienen actividad antimutagénica y pueden suprimir la aparición de la resistencia previniendo la formación de cepas resistentes (7). Por otro lado se encontró que alimentos como el té verde muestran actividad antimicrobiana y el té negro no fermentado del verano exhibe mayor actividad antibacteriana que los preparados en otras estaciones del año (8). También se encontró actividad bactericida de los extractos de propoleo en las cuatro estaciones del año (9). En un estudio reciente del Centro Médico del Instituto Mexicano del Seguro

Social en nuestro país encontraron que el abuso de antibióticos produjo cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes ocasionando una mortalidad del 62% (13 de 21) en niños menores de 2 años (10).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Encontrar si el Germisol es tan efectivo o mejor que la Estreptomicina para eliminar a las siguientes bacterias patógenas de la cavidad oral: *S aureus*, *S pyogenes*, *S salivarius* y *S sanguis*.

El Germisol es un antibacteriano elaborado a partir de extractos vegetales y otros compuestos inocuos iodados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPÍTULO 1

METODOLOGÍA BACTERIOLÓGICA AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS

Para aislar las bacterias de la placa dentobacteriana, se hace un raspado en los dientes de los pacientes donde se observa su presencia (color blanca), utilizando una asa bacteriológica previamente esterilizada y un abatelenguas. Una vez obtenida la muestra se introduce en caldo de enriquecimiento BHI (Infusión de Cerebro-Corazón) o en un medio de caldo tioglicolado y se introducen en una incubadora Napco modelo 5410, durante 24 horas a una temperatura de 36°C. Posteriormente se hace un inóculo con un hisopo en cualquiera de las siguientes placas: agar-sangre, agar-chocolate, agar de Sal y Manitol, agar de MacConkey, agar de Levine con Eosina y Azul de Metileno (EMB) y/o agar Biggy, luego se utiliza una asa para diseminar el material con el propósito de diluir las bacterias en la superficie del agar para obtener colonias aisladas, las placas de agar se incuban de 24 a 48 horas. Las colonias aisladas se resiembran en los medios antes mencionados una y otra vez en forma individual hasta obtener aislamientos puros. Una vez aislada la bacteria se procede a identificarla con una tinción y en caso de que dé positiva para microorganismos Gram-positivos se añade una alícuota en forma de suspensión de bacterias a una tarjeta VITEK[®] para identificación de bacterias Gram positivas (GPI).

PRUEBA DE RESISTENCIA MICROBIANA (elaboración de sensidiscos)
El método de sensidiscos de difusión (prueba de Bauer-Kirby) se utilizó para determinar la resistencia bacteriana. La elaboración de los sensidiscos se hace con papel filtro Whatman No. 1 (6 mm de diámetro) esterilizados. Cada una de las cepas de la placa dentobacteriana (identificadas y purificadas), fueron incubadas en un medio BHI a 36°C durante 24 horas. Posteriormente utilizando un hisopo estéril se humedece en el medio BHI y se realiza una descarga en cualquiera de las siguientes placas de agar: Mueller Hinton, MacConkey, Sal y Manitol o Biggy. El hisopo se hace rodar hacia delante y hacia atrás, a través del agar rotando la placa y pasándolo de nuevo para obtener una inoculación uniforme en toda la superficie.

[®]La tarjeta VITEK está diseñada para usarse conjuntamente con el Sistema VITEK para la identificación automatizada de estreptococos, estafilococos y un grupo seleccionado de bacilos Gram positivos con relevancia clínica, en total 44 especies microbianas.

Cada sensidisco se impregna con 0.025 ml de una de las diluciones de los extractos vegetales, o de Estreptomina (lote número 127193) o Agua destilada estéril, o de la dilución del Germisol (lote número 0198); para lo cual se utiliza una micropipeta con puntas intercambiables estériles. Después de dejar secar los sensidiscos impregnados y utilizando pinzas para evitar una posible contaminación; los sensidiscos secos son colocados en las placas de agar. Las placas son incubadas a 36 °C durante 24 horas.

La medición del diámetro de la zona de inhibición que aparece alrededor del sensidisco incluye el diámetro del papel filtro, la medición se llevó a cabo con un calibrador de 80 mm de escala.

RESISTENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A LAS DROGAS ANTIMICROBIANAS

Para tener un criterio de la resistencia y de la susceptibilidad a los antibacterianos, se tomaron los valores conforme a lo publicado por Koneman y col. (1). Así para determinar si una bacteria es susceptible, resistente o presenta valores intermedios, se calculó el promedio del halo de inhibición y conforme a los datos obtenidos, se decidió que las cepas con un halo de inhibición menor o igual a 13.2 mm son resistentes y las que lo tienen mayor o igual a 18.5 son susceptibles y como intermedio a los que presentan un valor entre 13.3 y 18.4 mm. Tabla I

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA I
ESTÁNDARES PARA INTERPRETACIÓN DE LOS DIÁMETROS DE
LOS HALOS DE INHIBICIÓN **Diámetro del halo en milímetros (mm)**

Agente antibacteriano	Contenido del sensidisco en microgramos	Resistente	Intermedio	Susceptible
Estreptomocina	10	13		≥ 28
Penicilina,	10	≤ 28	28.1-28.9	≥ 29
Meticilina	5	≤ 9	10-13	≥ 14
Nafcilina	1	≤ 10	11-12	≥ 13
Rifampicina	5	≤ 16	17-19	≥ 20
Clindamicina	2	≤ 14	15-20	≥ 21
Sulfonamidas	250 a 300	≤ 12	13-16	≥ 17
Cloranfenicol	30	≤ 12	13-17	≥ 18
Trimetropina	5	≤ 10	11-15	≥ 16
Sulfametaxol	24	≤ 10	11-15	≥ 16
Oxacilina	1	10 ≤	11-12	≥ 13
Nitrofurantoina	300	≤ 14	15-16	≥ 17
PROMEDIO		13.2	13.3-18.4	18.5

Los datos para elaborar esta tabla fueron tomados de Koneman (1)

TESIS CON
 FALLA

CAPÍTULO 2

ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA.

DATOS.

Los datos obtenidos para la variable de respuesta denominada halo de inhibición se presentan en la TABLA II como se indica.

NOMENCLATURA UTILIZADA.

La nomenclatura que se utiliza en este trabajo es la siguiente:

A_i = son los antibacterianos

$i = 1, 2, 3, 4, 5$

1 = Tomillo

2 = Orégano

3 = Yerbabuena

4 = Germisol

5 = Estreptomicina

B_j = bacterias donde:

$j = 1, 2, 3, 4$

1 = *S aureus*

2 = *S pyogenes*

3 = *S salivarius*

4 = *S sanguis*

E_k = épocas o estaciones del año

$k = 1, 2$

1 = verano

2 = otoño

AB_{ij} = antibacteriano i en la bacteria j

C_l = Caja de Petri l va de 1 a 102, 54 para el verano y 48 para el otoño

Cada dato Y_{ijkl} corresponde al halo de inhibición que produce un antibacteriano i por la bacteria j en la estación del año k en la caja de Petri l

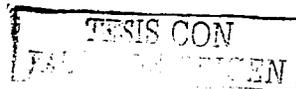


TABLA II

HALO DE INHIBICIÓN MEDIDO EN MILIMETROS, PARA DOS ESTACIONES DEL AÑO, VERANO Y OTOÑO, PARA CUATRO BACTERIAS Y CINCO ANTIBACTERIANOS

ESTACIONES DEL AÑO (E_k): k = 1,2.

VERANO (E1)

OTOÑO (E2)

BACTERIAS EN LAS ESTACIONES DEL AÑO B/E_k

	BACTERIAS EN EL VERANO (B/E1)				BACTERIAS EN EL OTOÑO (B/E2)			
	<i>S aureus</i>	<i>S pyogenes</i>	<i>S sanguinis</i>	<i>S sanguis</i>	<i>S aureus</i>	<i>S pyogenes</i>	<i>S sanguinis</i>	<i>S sanguis</i>
ANTIBAC- TERIANO (A1)	B11	B21	B31	B41	B12	B22	B32	B42
	Y111/, / = cajas de petri de 1 a 15	Y121/, / = cajas de petri de 16 a 24	Y131/, / = cajas de petri de 25 a 39	Y141/, / = cajas de petri de 40 a 54	Y112/, / = cajas de petri de 55 a 67	Y122/, / = cajas de petri de 68 a 79	Y132/, / = cajas de petri de 80 a 92	Y142/, / = cajas de petri 93 a 102
	0,12,14,0, 16,12,10,10, 12,0,10,19, 10,18,8	10,12,4, 13,8, 13,9,9,11,2, 8,9,4,8,7	12,10,1,7,2, 8,12,12,4, 12,10,8,7, 12,12,11,12,1 2,10,4	14,7,10,8, 10,7,10,11, 0,10,5,8,8,0, 10,10, 8,8,7	11,10,7,7, 10,12,8,11, 10,7,0,11,7	11,11,10,10, 10,10,11,9, 10,10,10,10,	0,7,0,0,0,0,9, 0,7,0,0,0,0	11,5,10,12, 10,12,3, 12,10,10, 12,10
Tomillo (A1)	Y211/, 20,11,11,0, 20,16,0,12, 11,0,0,11,0,0, 14	Y221/, 10,8,0,0,10,6,0, 0,0,0,0	Y231/, 10,9,8,10, 9,10,10,9,8, 10,12,10, 12,9,10	Y241/, 7,8,0,0,8,8, 10,0,13,11,0, 8,8,10,0,8,	Y212/, 12,10,7,10, 0,10,9,0,8,7,7,9, 7	Y222/, 11,10,13,11, 11,11,9,10, 10,10,11,10	Y232/, 9,8,10,9,16, 11,9,9,9,8, 10,9,11	Y242/, 10,11,12, 14,10,10,6, 10,11,12,5,10
Orégano (A2)	Y311/, 8,10,17,0,16,0,9, .16,21,8,0,8, 20,16,19	Y321/, 8,6,7,7,13, 11,12,4,9,8, 0,11,1,7,5	Y331/, 18,21,19, 10,1,20, 19,8,20,14, 10,1,18, 10,1,10,1 10,1,13	Y341/, 8,6,10,1,12, 9,1,7,6,12, 9,9,10,3,12, 10,1,9,9, 12,3,12,3,12, 12	Y312/, 8,9,0,8,10,7, 8,10,10,0,8, 7,10	Y322/, 9,8,10,8,8,9, 10,10,9,8,9, 9	Y332/, 0,0,0,0,0,0,0,0, 0,0,0,0	Y342/, 10,12,13,3, 11,5,14,10, 16,11,10,4, 14,4
Yerbabuena (A3)	Y411/, 24,25,24,25, 20,22,24,24, 26,24,25, 24,26,24,25	Y421/, 14,7,14,3, 17,13,6,15, 15,3,16,14, 15	Y431/, 25,27,2,24, 24,26,25, 32,24,24, 25,25,25, 27,29,27	Y441/, 19,2,17,16, 19,18,6,16, 16,16,16,4, 18,16,4,16, 20,17,16,6	Y412/, 28,29,30,1, 28,29,29,25, 29,29,27,3, 30,5,29,30	Y422/, 28,27,27,25, 25,27,27, 27,27,25, 25,30	Y432/, 17,1,16,1,15,18, 17,16,17, 17,1,16,16,6, 18,6,17,9,16	Y442/, 14,16,14,16, 22,1, 14,16, 20,6,17,22
Germisol (A4)	Y511/, 31,36,30, 34,32,36,38, 29,30,34,29, 38,30,32,30	Y521/, 26,30,8,27, 29,6,26,28, 30,26,28	Y531/, 30,22,26, 29,32,26, 28,29,6, 29,5,30,8, 30,33, 24,33,30	Y541/, 26,6,30,1, 33,1,34,28,8, 34,30,29,30, 30,7,29,2, 33,3,30,27, 30	Y512/, 20,3,16,22, 16,15,19,22, 20,20,16,22, 17,20	Y522/, 41,40,36,40, 35,37,33,40, 35,40,40,35	Y532/, 21,8,22,1,24, 24,22, 23,7,23,7,24, 23,5,24,22,24, 37	Y542/, 30,30,1,30, 31,30,31,32, 33, 33,30
Estreptomicina (A5)	15 repeticiones equivalente a 15 cajas de petri	9 repeticiones equivalente a 9 cajas de petri	15 repeticiones equivalente a 15 cajas de petri	15 repeticiones equivalente a 15 cajas de petri	13 repeticiones equivalente a 13 cajas de petri	12 repeticiones equivalente a 12 cajas de petri	13 repeticiones equivalente a 13 cajas de petri	10 repeticiones equivalente a 10 cajas de petri

NOTA: UNA CAJA DE PETRI EQUIVALE A UNA CEPA, UNA CEPA FUE SEMBRADA DE UN PACIENTE

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se procedió a trabajar ordenando los datos en base a las mediciones, se encontraron dos observaciones en las cuales, los antibacterianos de los extractos vegetales daban halos de inhibición con valores de 70 milímetros, esto no era factible, dado que el mayor halo de inhibición que se había registrado era de 48 milímetros. El problema era un error en el punto decimal el cual se corrigió y se anotó 7 mm. Una vez corregidos los datos, se procedió a realizar una gráfica de cajas para el verano y el otoño. Fig. 1. Las cajas indican la mediana por la barra negra horizontal central, así como los valores máximos y mínimos, los asteriscos indican los valores aberrantes o "outliers" y los círculos pequeños indican los valores extremos. Es conveniente hacer el comentario de que en la estadística descriptiva de la gráfica de cajas en la Fig. 1 ya resalta que el Germisol en el otoño es mejor antibacteriano que la Estreptomicina para el *Staphylococcus aureus* y que durante el verano el Germisol y la Estreptomicina tienen un comportamiento semejante para el *Streptococcus salivarius*.

TESIS CON
FALTA

HALO DE INHIBICIÓN EN mm

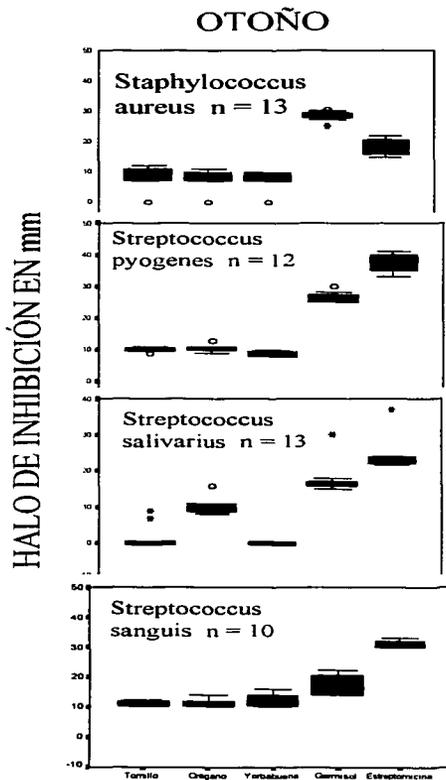
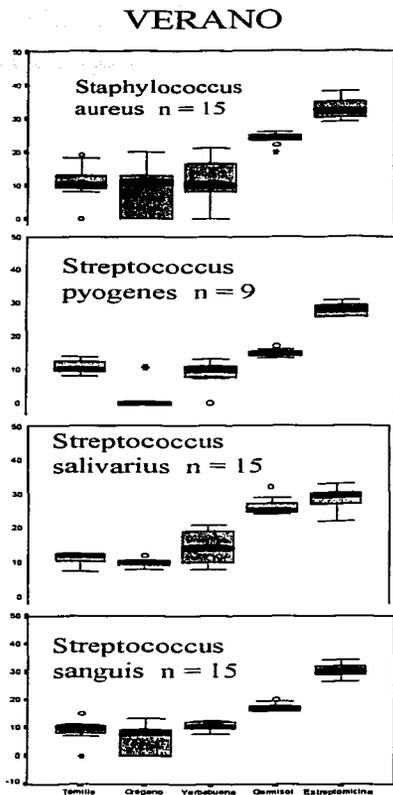


FIGURA I. GRAFICA DE CAJAS EN DONDE SE VEN LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE CADA UNA DE LAS BACTERIAS ANTE LOS DIFERENTES ANTIBACTERIANOS EN DOS ESTACIONES DEL AÑO. LA n = NÚMERO DE CEPAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

DISEÑO DE UN CRITERIO DE CLASIFICACIÓN

En los diseños de experimentos más sencillos se utiliza el diseño totalmente al azar de un criterio de clasificación en donde se comparan una serie de tratamientos. En el supuesto caso que en el trabajo aquí presentado se hubiese requerido conocer únicamente las diferencias entre los promedios de los halos de inhibición de bacterias por los antibacterianos, el factor antibacteriano se hubiese dividido en 5 tratamientos, el modelo hubiese sido:

$$Y_{ij} = \mu + A_i + \epsilon_{ij}$$

Donde Y_{ij} es la medición j del antibacteriano i

μ es un parámetro común para todos los tratamientos denominado la media general.

A_i es el efecto del antibacteriano i .

ϵ_{ij} es el error aleatorio que se refiere a la repetición j del antibacteriano i .

Hipótesis nula:

$$H_0: \mu = 0$$

Enunciado: Todos los tratamientos son iguales, o sea, todas los antibacterianos producen la misma media en el halo de inhibición.

Hipótesis alterna:

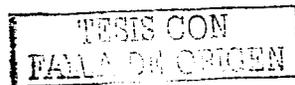
$$H_a: \mu \neq 0$$

Al menos un tratamiento es diferente, o sea, que por lo menos un antibacteriano va a producir un halo de inhibición cuya media es diferente a las otras medias de los otros halos de inhibición.

DISEÑO DE BLOQUES.

Ahora, si se quiere eliminar el error que producen las diferencias entre los distintos tipos de bacterias entonces se lleva a cabo un bloqueo por tipo de bacterias, en donde un bloque se refiere a los estreptococos y el otro a los estafilococos. Según el siguiente modelo:

$$Y_{ijl} = \mu + A_i + B_j + \epsilon_{ijl}$$



Y_{ij} = al dato que corresponde al bloque j del tratamiento i .
Donde μ es la media general

A_i son los tratamientos

B_j son los bloques

ϵ_{ijl} es el error del bloque j del tratamiento i con l repeticiones.

DISEÑOS FACTORIALES.

Cuando se desea ver si existe una interacción entre el antibacteriano con la bacteria, entonces el modelo se denomina modelo factorial, en el caso aquí estudiado se encuentran 5 antibacterianos y 4 especies de bacterias, por lo mismo se lleva a cabo un factorial de 5×4 que corresponde a 20 tratamientos. Este tipo de modelos se utiliza para ver si existe una interacción entre el antibacteriano y el tipo de bacteria, en caso de que la interacción sea significativa, se estudia primeramente la interacción y se deja en un segundo término a los efectos principales que son los factores antibacteriano A y bacteria B. Cada tratamiento que es la combinación de A y B, con l repeticiones.

Según el modelo para un factorial de 2 factores:

$$Y_{ijl} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \epsilon_{ijl}$$

Donde Y_{ijl} es el dato de la repetición l del tratamiento ij

AB_{ij} es la interacción ij del factor A con el factor B

ϵ_{ijl} es el error de la repetición l del tratamiento ij

Ahora en el caso que aquí se está trabajando se agrega un factor más, debido a que se trabajó en dos épocas del año diferente, ese tercer factor se denomina estación del año y se haría como sigue:

Según el modelo para un factorial de 3 factores:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + E_k + AE_{ik} + BE_{jk} + ABE_{ijk} + \epsilon_{ijk}$$

Y_{ijkl} es el dato que corresponde a la repetición l de la época k del tratamiento ij

E_k es la época de la estación k

ABE_{ijk} es la interacción triple de los factores ABE

$AE_{ik} + BE_{jk}$ es la interacción doble del factor E con los factores A y B respectivamente

ϵ_{ijkl} es el error de la repetición l , en la época k , del tratamiento ij

En el caso del experimento aquí planteado este modelo factorial no se puede aplicar debido a que el tratamiento del factor B se hace en una caja de Petri y a dicha caja se le aplica otro tratamiento denominado factor antibacteriano A, en este caso lo conveniente es tratar al experimento como un diseño de Parcelas Divididas ya que al factor B se le aplica el factor A.

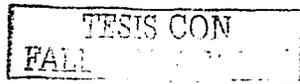
DISEÑO DE PARCELAS DIVIDIDAS

En algunos experimentos a veces un factor requiere más material experimental para su evaluación, como es el caso del factor bacteria que crece en un medio de agar nutritivo en cajas de Petri, debido a que en una caja de Petri se colocan varios antibacterianos para ver la resistencia de una bacteria, la bacteria sembrada en un medio de agar nutritivo en una caja de Petri es la parcela grande y el factor antimicrobiano colocado en un sensidisco en la caja de Petri es la parcela pequeña.

En el diseño de Parcelas Divididas se usa una fórmula de modelo mixto en el que hay un error experimental para la parcela grande y otro para la parcela pequeña, lo que incluye los efectos del error aleatorio por separado para ambas parcelas (13).

En el caso aquí estudiado primeramente se corrió un modelo completo de Parcela Divididas con tres factores, 1) el antibacteriano con 5 niveles, 2) la bacteria con 4 niveles y 3) la época del año con 2 niveles, cada repetición es una caja de Petri donde se siembra una cepa bacteriana y a cada caja de Petri se le colocan los 5 antibacterianos, el total de cajas de Petri fue de 102.

El tratamiento para la parcela grande está dado por una cepa bacteriana, con un factor denominado época del año y se analiza la interacción de la bacteria con la época del año, el error experimental para la parcela completa se toma del cuadrado medio del error de la caja de Petri anidada en la época del año y en la bacteria. En la parcela pequeña se tiene al antibacteriano como



tratamiento, se analizan todas las interacciones con el antibacteriano, dos interacciones dobles, una con la época del año y la otra con la bacteria, una interacción triple entre el antibacteriano, la bacteria y la época del año. El error experimental de la parcela pequeña, se toma del cuadrado medio del error del Análisis de Varianza para el modelo completo.

Dado que en el modelo completo el factor época del año tuvo una significancia de $p < 0.1$ se corrieron por separado dos modelos de Parcelas Divididas uno para el verano y el otro para el otoño.

EJEMPLOS DE PARCELAS DIVIDIDAS (14).

En Agronomía. Esto puede suceder en los experimentos de agronomía donde un factor como los métodos de cultivo puede requerir el uso de algún tipo de tratamiento como el de los fertilizantes, en este tipo de problema se puede aplicar el diseño de Parcelas Divididas. La parcela de los tratamientos de métodos de cultivo es la parcela grande, ésta se divide en subparcelas a las que se les aplican el tratamiento de los fertilizantes.

En Microbiología. En los estudios con bacterias y hongos se utilizan los medios de agar nutritivo en cajas de Petri, una caja para una especie y dentro de dicha caja varios antimicrobianos para ver la resistencia. Aquí el factor microorganismo corresponde a las parcela grande y el factor antimicrobiano a las parcela pequeña.

PRUEBA DE TUKEY PARA COMPARACIONES MÚLTIPLES.

Como se encontró diferencia significativa en las interacciones de los tratamientos AB_{ij} fue conveniente una prueba de comparaciones múltiples y la que se eligió fue la de Tukey, para contrastar en pares todas las medias, en este estudio se quiere comparar las diferencias entre las medias en los diámetros del halo de inhibición entre los diferentes tratamientos i y j . Como son 5 antibacterianos para 4 bacterias, se obtienen 20 tratamientos para cada estación del año, al comparar el promedio de esos halos de inhibición se va a utilizar la prueba de Tukey, página 97 del texto de Montgomery (15). Este procedimiento hace uso del rango estudentizado:

$$q = (\bar{y}_{\max} - \bar{y}_{\min}) / (\sqrt{MS_E}) / n$$

donde $\bar{y}_{\max} - \bar{y}_{\min}$ son los promedios más grandes y más pequeños respectivamente de un grupo de p muestras de promedios. Donde q se compara contra $q_{\alpha}(a, f)$. Tabla VIII del texto de Montgomery (15), el α superior de los puntos porcentuales q donde f es el número de los grados de libertad

asociado con el cuadrado medio del error MS_E , en base a lo anterior se indica que dos tratamientos son diferentes cuando:

$$\bar{Y}_{\text{tratamiento } i} - \bar{Y}_{\text{tratamiento } j} > q_{\alpha}(a, f) \times (\sqrt{MS_E}/n)$$

y expresándolo con palabras se tiene que las diferencias son estadísticamente significativas si el valor de la diferencia entre el promedio de los tratamiento i y j es mayor que el valor de $q_{\alpha}(a, f) \times (\sqrt{MS_E}/n)$.

CAPÍTULO 4 DISEÑO DEL EXPERIMENTO DE PARCELAS DIVIDIDAS

HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

La media del diámetro del halo inhibición del Germisol para cada una de las bacterias es mayor o igual que la media del diámetro del halo de inhibición del Tomillo, del Orégano, de la Yerbabuena y de la Estreptomocina, para cada una de las bacterias, dicha hipótesis se puede enunciar así:

$$\mu_{4j..} \geq \mu_{ij..},$$

donde μ es la media del halo de inhibición medido en milímetros,

μ_{4j} = es del Germisol en la bacteria j

$\mu_{ij..}$ es el halo de inhibición de la bacteria con los antibacterianos

1 = tomillo

2 = orégano

3 = hierbabuena

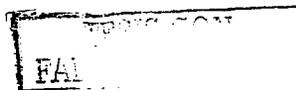
4 = germisol

5 = estreptomocina

los puntos indican la suma de las estaciones del año y de las cajas de Petri lo cual corresponde a cada una de las repeticiones.

POBLACIÓN

La población consta de un conjunto de cultivos de bacterias patógenas de cuatro especies extraídas de la placa dentobacteriana de pacientes y personal del Hospital Gabriel Mancera del Instituto Mexicano del Seguro Social de la Ciudad de México y de la Clínica dental Pirules de la Universidad Autónoma Metropolitana, a los cultivos se les añaden 5 antibacterianos en dos estaciones del año, una en verano y la otra en otoño. Las bacterias patógenas son: *Staphylococcus aureus*, (*S aureus*), *Streptococcus pyogenes*, (*S pyogenes*), *Streptococcus salivarius* (*S salivarius*) y *Streptococcus sanguis* (*S sanguis*). Los cinco antibacterianos son: Tomillo, Orégano, Yerbabuena, Germisol y Estreptomocina.



MUESTRA

La muestra consta de la placa dentobacteriana de 30 pacientes de donde se obtuvieron las cepas de las 4 especies patógenas de las bacterias de la cavidad oral, el muestreo fue por conveniencia dado que el objetivo era probar la efectividad de los antibacterianos; 15 pacientes del verano del año de 2000; y 15 del otoño del mismo año. Los pacientes del verano fueron diferentes a los del otoño. Los antibacterianos fueron: 1) Tomillo, 2) Orégano, 3) Yerbabuena, 4) Germisol y 5) Estreptomicina como control positivo. Se utilizó el agua como control negativo para ver el crecimiento de las cepas. Del Tomillo, Orégano y Yerbabuena se obtuvieron extractos vegetales al 10% en una solución hidroalcohólica con 58% de alcohol etílico, estos extractos fueron usados como tratamientos.

TIPO DE ESTUDIO

El estudio es comparativo, longitudinal, prospectivo y experimental (11). Comparativo porque se contrasta la diferencia de las inhibiciones entre las diferentes poblaciones. Longitudinal, porque hay un tiempo cero que es el momento de la siembra de las bacterias y un tiempo final en donde se lleva a cabo la medición del halo de inhibición, no obstante a que sólo se mide una sola vez la variable de respuesta, que es el halo de inhibición, y además una de las características de todos los experimentos es el ser longitudinales. Prospectivo porque se programa con anticipación y posteriormente se llevan a cabo las mediciones. Experimental porque las cepas bacterianas van a crecer en presencia de antibacterianos diseñados para este estudio.

NIVEL DE SIGNIFICANCIA.

El nivel de significancia α para este trabajo es de 0.1.

VALOR P

El valor p es la probabilidad de obtener un resultado como el que se observa, o aun mayor, bajo el supuesto de que la hipótesis nula es cierta.

De tal manera que:

Si el estadístico observado \geq al estadístico esperado, se rechaza la hipótesis nula. Suponiendo que el estadístico de prueba que observo es de 2.4 y el estadístico de prueba que espero es de 2.1, entonces el valor que observo es mayor que el que espero y a la probabilidad de que mi valor observado sea mayor o igual al esperado le denomino valor p.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VARIABLES Y ESCALA DE MEDICIÓN.

La variable de respuesta, es el halo de inhibición y su escala se mide en milímetros. Las variables explicativas o factores fueron: I) La época o estación en que se tomó la muestra de la placa dentobacteriana: 1 si es de otoño, 2 si es de verano II) Los antibacterianos se clasifican en 5 categorías: 1) extracto de Tomillo, 2) extracto de Orégano, 3) extracto de Yerbabuena, 4) el antibacteriano Germisol y 5) el antibiótico Estreptomicina. III) Las bacterias fueron 4 especies: 1) *Staphylococcus aureus*, 2) *Streptococcus pyogenes*, 3) *Streptococcus salivarius*, 4) *Streptococcus sanguis*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

UNIDAD EXPERIMENTAL DE LA BACTERIA (PARCELA GRANDE).

La parcela grande es una caja de Petri con agar nutritivo, donde se siembra una cepa de una bacteria y se colocan seis sensidiscos, a cinco de ellos se les agrega un antibacteriano y al sexto se le añade agua como control negativo donde las bacterias crecen sin inhibición. Figura 2. El total de unidades experimentales es de 102.

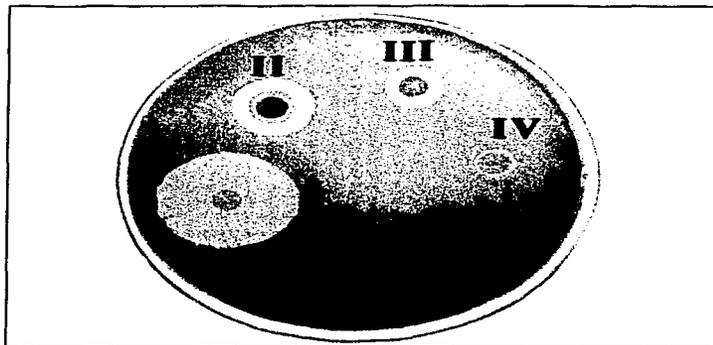


Figura 2. Unidad experimental. *Saphylococcus aureus* sembrado en una caja de Petri con un medio de cultivo de agar Sal y Manitol donde se muestran los halos de inhibición para los distintos antibacterianos. I Estreptomicina como control positivo, II Germisol, III Tomillo, IV Orégano, V Yerbabuena y VI Agua como control negativo. (12).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

SUBUNIDAD EXPERIMENTAL. (PARCELA PEQUEÑA)

La subunidad experimental es un sensidisco impregnado con un antibacteriano en un medio de cultivo de una cepa donde se mide el halo de inhibición, las cajas de Petri fueron 102, y al multiplicarlos por los 5 antibacterianos resulta 510 subunidades experimentales, tabla III.

TABLA III

BACTERIA	UNIDADES EXPERIMENTALES	ANTIBACTERIANOS	SUBUNIDADES EXPERIMENTALES
<i>S aureus</i>	28	5	140
<i>S pyogenes</i>	21	5	105
<i>S salivarius</i>	28	5	140
<i>S sanguis</i>	25	5	125
	102		510

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPÍTULO 5.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EL EXPERIMENTO DE PARCELAS DIVIDIDAS

Se llevó a cabo un análisis del diseño de Parcelas Divididas para un factorial de $2 \times 4 \times 5$ (14). En el modelo completo se unieron la época del verano y la del otoño con el objeto de analizar diferencias entre estas dos épocas. En el modelo completo los efectos principales fueron BACTERIA (B), ÉPOCA (E) y ANTIBACTERIANO (A), las cajas de Petri C que son las repeticiones quedaron anidados en E y B, esto último fue el error experimental de la parcela grande. El diseño para las unidades grandes es un factorial 2×4 completamente al azar. El antibacteriano impregnado en los sensidiscos es el tratamiento para las parcelas pequeñas. El total de cajas de Petri C fue de 102. Se evaluaron todas las posibles interacciones de los efectos principales quedando una interacción triple $A * E * B$ y tres interacciones dobles $B * E$, $A * B$, $A * E$. El modelo completo fue el siguiente:

MODELO COMPLETO PARA PARCELAS DIVIDIDAS:

Y {HALO} VARIABLE DE RESPUESTA

PARCELA GRANDE:

BACTERIA

EPOCA

INTERACCIÓN: BACTERIA * EPOCA

FACTORES ANIDADOS: Caja de Petri[EPOCA, BACTERIA] aleatorio.

(Error experimental para la parcela grande).

PARCELA PEQUEÑA:

ANTIBACTERIANO

ANTIBACTERIANO * BACTERIA

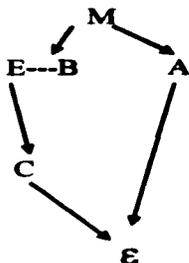
ANTIBACTERIANO * EPOCA

ANTIBACTERIANO * EPOCA * BACTERIA

Nota: El cuadrado medio del error del análisis de varianza para el modelo completo fue el error experimental para la parcela pequeña. (Tabla IV)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El modelo se representa por el siguiente esquema:



M = MEDIA GENERAL

E = ÉPOCA DEL AÑO

B = BACTERIA

A = ANTIBACTERIANO

C = CAJA DE PETRI

ε = ERROR

siendo la anotación del modelo la siguiente:

$$\begin{array}{l}
 \text{PARCELA GRANDE} \\
 Y_{ijkl} = M + B_j + E_k + BE_{jk} + C_l(jk) + A_i + AB_{ij} + AE_{ik} + ABE_{ijk} \\
 + \epsilon_l(ijk)
 \end{array}
 \quad
 \begin{array}{l}
 \text{PARCELA PEQUEÑA} \\
 \text{MODELO 1}
 \end{array}$$

AB_{ij}; Aquí es donde se contrasta la hipótesis:

$$AB_{4j} \geq AB_{5j}$$

El promedio del diámetro de inhibición del Germisol \geq que el promedio del diámetro del halo de inhibición de la Estreptomycin para por lo menos una j

$i = 1, 2, 3, 4, 5$ (antibacterianos)

$j = 1, 2, 3, 4$ (bacterias)

$k = 1, 2$ (épocas o estaciones del año)

$l = 1, 2, 3, \dots, c$ (En total son 102 cajas de Petri, l corresponde al número de repeticiones para cada bacteria j)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA IV

Nota: El paquete estadístico está en el idioma Inglés y es por ello que aparecen palabras en dicho idioma.
(MODELO COMPLETO PARA PARCELAS DIVIDIDAS)

Response HALO Whole Model Summary of Fit

RSquare	0.912341
RSquare Adj	0.905067
Root Mean Square Error	3.055904
Mean of Response	15.4802
Observations (or Sum Wgts)	510

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	133	45681.252	343.468	36.7796
Error	376	3511.294	9.339	Prob > F
C. Total	509	50070.370		< .0001

REML Variance Component Estimates

Random Effect	Var Ratio	Var Component	Std Error	95% Lower	95% Upper
Caja de Petri(EPOCA,BACTERIA)&Random	0.2016649	1.8632576	0.6117153	1.0865809	4.0216846
Residual Total		9.3385488			
		11.221806			

-2 LogLikelihood = 2631.796

Source	Nparm	DF	DFDen	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F	
PARCELA GRANDE:								
EPOCA	1	1	94	28.061	28.061	3.0049	0.0883	
BACTERIA	3	3	94	94.755	31.585	3.3822	0.0214	
EPOCA*BACTERIA	3	3	94	1485.499	495.166	53.0239	< .0001	
Caja de Petri(EPOCA,BACTERIA)&Random (ERROR DE LA PARCELA GRANDE)	102	94	376	685.131	9.42628	1.0063	0.4667	Shrunk
PARCELA PEQUEÑA								
ANTIBACT	4	4	376	34859.587	8714.897	933.2174	<.0001	
ANTIBACTERIANO*BACTERIA	12	12	376	2390.075	199.673	21.0803	<.0001	
ANTIBACTERIANO*EPOCA	4	4	376	932.865	233.21	24.9740	<.0001	
ANTIBACTERIANO*EPOCA*BACTERIA	12	12	376	1911.273	159.273	17.0554	<.0001	
ERROR (ERROR DE LA PARCELA PEQUEÑA)		376		3511.294	9.339			

El factor epoca resulto significativo al 0.1.
El factor bacteria resulto significativo al 0.05
El factor antibacteriano resulto significativo al 0.01
Todas las interacciones resultaron significativas al 0.01

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISEÑO DE PARCELAS DIVIDIDAS UNO PARA LA ESTACIÓN DEL VERANO Y EL OTRO PARA LA ESTACIÓN DEL OTOÑO

Un segundo análisis se llevó a cabo, dado que la interacción de la época con los otros dos factores fue altamente significativa ($p < 0.0001$). Así se corrieron dos análisis de diseños para Parcelas Divididas, uno para el verano y el otro para el otoño. En cada diseño la Caja de Petri, C estaba anidado en el factor Bacteria, B. Los factores fueron: A y B. Siendo para B el tratamiento de la parcela principal y para A el tratamiento de las parcelas pequeñas.

Según el siguiente modelo:

MODELO:

Y {HALO} variable de respuesta

PARCELA GRANDE:

BACTERIA

FACTOR ANIDADO: Caja de Petri[BACTERIA] aleatorio. (Error experimental para la parcela grande)

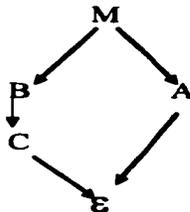
PARCELA PEQUEÑA:

ANTIBACTERIANO

ANTIBACTERIANO*BACTERIA

Nota: El error experimental para la parcela pequeña se obtuvo del análisis de varianza para el modelo de las estaciones del año (Tablas V y VI).

El esquema de la representación del modelo es el siguiente:



M = MEDIA GENERAL

B = BACTERIA

A = ANTIBACTERIANO

C = CAJA DE PETRI

ϵ = ERROR

siendo la anotación del modelo la siguiente:

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

PARCELA GRANDE PARCELA PEQUEÑA

$$Y_{ijl} = M + B_j + Cl(j) + A_i + AB_{ij} + \varepsilon l(ij)$$

MODELO 2

$i = 1, 2, 3, 4, 5$ (antibacterianos)

$j = 1, 2, 3, 4$ (bacterias)

$l = 1, 2, 3, \dots, c$ (En total son 102 cajas de Petri, l corresponde al número de repeticiones para cada bacteria j)

El paquete estadístico utilizado fue el JMP Versión 4. (16).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA V
MODELO DE PARCELAS DIVIDIDAS PARA LA ESTACIÓN DE OTOÑO

Response: HALO, OTOÑO
 Summary of Fit

RSquare	0.969356
RSquare Adj	0.958387
Root Mean Square Error	2.068549
Mean of Response	14.87292
Observations (or Sum Wgts)	240

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Model	63	23634.237	375.147
Error	176	753.085	4.279
C. Total	239	24575.594	

Source	Tests wrt Random Effects		DF Num	F Ratio	Prob>F
	SS	MS Num			
PARCELA GRANDE:					
BACTERIA	2212.81	737.604	3	53.1358	<.0001
Caja de Petri(BACTERIA) (ERROR DE LA PARCELA GRANDE)	610.785	13.8815	44	3.2442	<.0001
PARCELA PEQUEÑA:					
ANTIBACT	17347.6	4336.91	4	1013.559	<.0001
ANTIBACT*BACTERIA ERROR (ERROR DE LA PARCELA PEQUEÑA)	3252.49 753.085	271.041 4.279	12 176	63.3437	<.0001

Todos los factores así como las interacciones resultaron significativas al 0.01

ANTIBACTERIANO*BACTERIA
 Least Squares Means Table

Level	Least Sq Mean	Std Error
1,1	8.53846	0.69056347
1,2	10.16667	0.71876124
1,3	1.76923	0.69056347
1,4	10.98000	0.78736349
2,1	7.30769	0.69056347
2,2	10.58333	0.71876124
2,3	9.91538	0.69056347
2,4	11.11000	0.78736349
3,1	7.30769	0.69056347
3,2	8.91667	0.71876124
3,3	-0.00000	0.69056347
3,4	12.26000	0.78736349
4,1	28.68462 *	0.69056347
4,2	26.66667 *	0.71876124
4,3	17.63846	0.69056347
4,4	17.17000	0.78736349
5,1	18.66923 *	0.69056347
5,2	37.66667 *	0.71876124
5,3	24.29231 *	0.69056347
5,4	31.01000 *	0.78736349

Los asteriscos indican susceptibilidad de las bacterias a los antibacterianos dado que el halo de inhibición es mayor que 18.5 mm (> 18.5 mm)

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

TABLA VI

MODELO DE PARCELAS DIVIDIDAS PARA LA ESTACIÓN DEL VERANO

Response: HALO VERANO
Summary of Fit

RSquare	0.891099
RSquare Adj	0.853528
Root Mean Square Error	3.71363
Mean of Response	16.02
Observations (or Sum Wgts)	270

Analysis of Variance			
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Model	69	21879.831	317.099
Error	200	2758.209	13.791
C. Total	269	25327.992	

Tests wrt Random Effects

Source	SS	MS Num	DF Num	F Ratio	Prob>F
PARCELA GRANDE:					
BACTERIA	895.663	331.888	3	14.4027	<.0001
Caja de Petri(BACTERIA)	1152.17	23.0434	50	1.6709	0.0072
(ERROR DE LA PARCELA GRANDE)					
PARCELA PEQUEÑA: ANTIBACT	18490.8	4622.7	4	335.1956	<.0001
ANTIBACT*BACTERIA	861.883	71.8236	12	5.2080	<.0001
ERROR	2758.209	13.791	200		
(ERROR DE LA PARCELA PEQUEÑA)					

Todos los factores así como sus interacciones resultaron significativas al 0.01

ANTIBACTERIANO*BACTERIA

Least Squares Means Table

Level	Least Sq Mean	Std Error
1,1	10.06667	1.0211599
1,2	10.711111	1.3183118
1,3	10.760000	1.0211599
1,4	8.446667	1.0211599
2,1	8.533333	1.0211599
2,2	2.377778	1.3183118
2,3	9.733333	1.0211599
2,4	6.120000	1.0211599
3,1	11.200000	1.0211599
3,2	9.011111	1.3183118
3,3	14.666667	1.0211599
3,4	10.680000	1.0211599
4,1	24.066667 *	1.0211599
4,2	14.988889	1.3183118
4,3	26.013333 *	1.0211599
4,4	17.080000	1.0211599
5,1	32.733333 *	1.0211599
5,2	27.933333 *	1.3183118
5,3	28.860000 *	1.0211599
5,4	30.366667 *	1.0211599

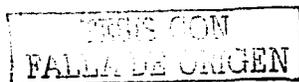
Los asteriscos * indican susceptibilidad de las bacterias a los antibacterianos dado que el halo de inhibición es mayor que 18.5 mm (> 18.5 mm)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS

En el modelo completo para Parcelas Divididas, Tabla IV tanto las interacciones dobles como la interacción triple resultaron altamente significativas, $p < 0.0001$ y además se rechazó la igualdad de medias para las dos épocas $p < 0.1$. En las dos estaciones resultó significativa la interacción AB. Una observación relevante fue encontrar una diferencia en el cuadrado medio del error entre las dos épocas del año, 4.279 y 13.791 respectivamente, lo que indica un comportamiento diferente entre las bacterias con sus antibacterianos en las dos épocas del año o esta diferencia pudo haber sido a otros factores tales como los pacientes o las distintas condiciones desconocidas las cuales no se pudieron controlar en este experimento. El promedio del halo de inhibición que producen las bacterias para cada antibacteriano fue diferente para cada una de las épocas del año; (Figs. 3 y 4) en el verano la Estreptomicina produce un halo de inhibición de alrededor de 30 mm, observándose que en esta época es el antibacteriano más potente tal como se observa en la Fig. 2. $p < 0.05$. En esta época el Germisol produce en las bacterias *S pyogenes* y *S sanguis* un halo de inhibición de 15 y 17 mm respectivamente el cual es un valor intermedio entre la resistencia y la susceptibilidad, las bacterias de *S aureus* y *S salivarius* fueron susceptibles al Germisol dado que sus halos de inhibición fueron de 24 y 26 mm respectivamente. En lo referente a los extractos vegetales, la única bacteria que resultó con un halo de inhibición intermedio entre la resistencia y la susceptibilidad fue *S salivarius* con un halo de inhibición de 14.7 mm para el extracto de Yerbabuena, las otras bacterias fueron resistentes a los extractos vegetales en las condiciones aquí estudiadas.

En el otoño, *S aureus* dio un promedio del halo de inhibición de 28.7 mm para el Germisol el cual fue mayor que el de la Estreptomicina 18.9 mm $p < 0.05$, lo que indica que las cepas del *S aureus* en otoño, son más susceptibles al Germisol, por lo que se puede afirmar que en este periodo el Germisol es mejor bactericida que la Estreptomicina para dicha bacteria (Fig. 4). Las otras tres bacterias *S pyogenes*, *S salivarius* y *S sanguis*, resultaron más susceptibles a la Estreptomicina al compararlas con el Germisol $p < 0.05$. Respecto a los extractos de Tomillo, Orégano y Yerbabuena el promedio del halo de inhibición resultó menor a 10 mm y un hecho relevante fue que para el *S salivarius* no se presentó ningún halo de inhibición para la Yerbabuena, lo que indica una insignificante susceptibilidad de las bacterias para los extractos vegetales en las condiciones aquí presentadas.



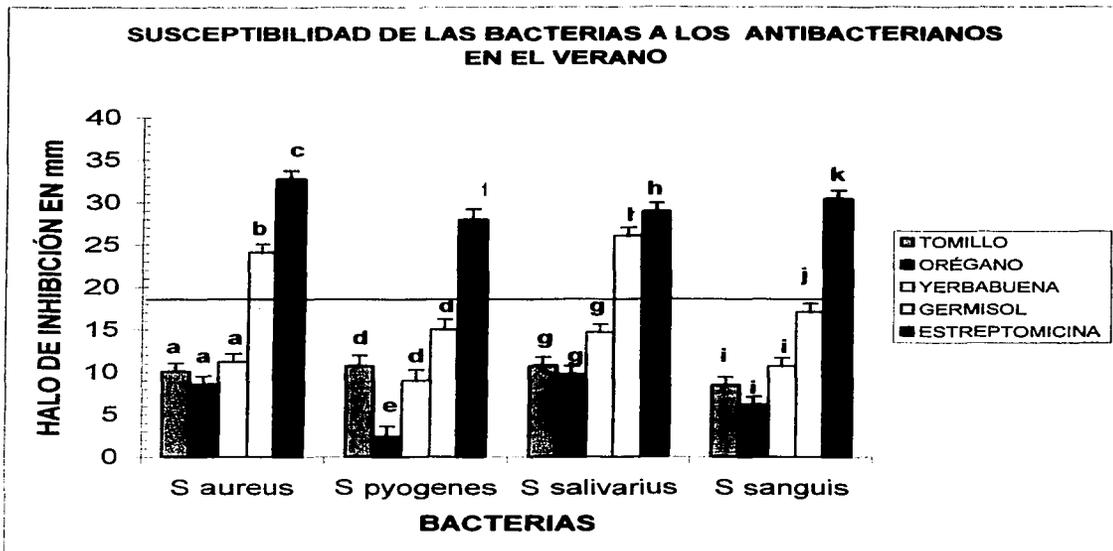


Figura 3. Se encontró interacción entre los antisépticos y las bacterias $p < 0.0001$. Además se llevó a cabo la prueba de Tukey para comparaciones múltiples entre los antisépticos para cada bacteria analizando así el efecto de los antibacterianos para cada bacteria por separado, la misma letra sobre la barra indica igualdad estadística para un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. El promedio del halo de inhibición entre los extractos vegetales con las bacterias fue alrededor de 10 mm, por lo que las bacterias no son susceptibles a dichos extractos. Las líneas verticales sobre las barras indican el error estándar. La línea horizontal en 18.5 mm indica la susceptibilidad de las bacterias al antibacteriano.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

SUSCEPTIBILIDAD DE LAS BACTERIAS A LOS ANTIBACTERIANOS EN EL OTOÑO

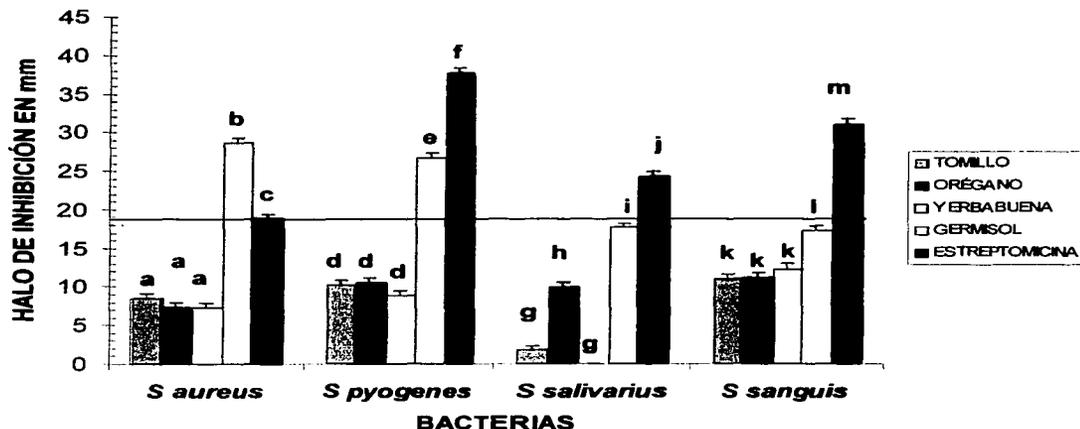


Figura 4. Se encontró interacción entre los antisépticos y las bacterias $p < 0.0001$. Además se llevó a cabo la prueba de Tukey para comparaciones múltiples entre los antisépticos para cada bacteria analizando así el efecto de los antibacterianos para cada bacteria por separado, la misma letra sobre la barra indica igualdad estadística para un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. La bacteria *S aureus* es más susceptible al Germisol que a la Estreptomicina (b vs c, $p < 0.05$). El promedio del halo de inhibición entre los extractos vegetales con las bacterias fue de alrededor de 10 mm, por lo que las bacterias no se consideran susceptibles a dichos extractos. Las líneas verticales sobre las barras indican el error estándar. La línea horizontal en 18.5 mm indica la susceptibilidad de las bacterias al antibacteriano.

Nota: El *S salivarius* con la yerbabuena no produjo un halo de inhibición. No obstante en el análisis estadístico no se eliminó para evitar fallas en su corrida con el paquete estadístico JMP.

TESIS CON
FALLA DE ANEJO

CONCLUSIONES:

1. Los extractos de Tomillo, Orégano y Yerbabuena, producen un halo de inhibición con un promedio menor a 18.5 mm, indicando su escaso poder antibacteriano, por lo mismo estas bacterias no son susceptibles a estos extractos en las condiciones aquí presentadas.
2. El comportamiento estacional fue diferente, las cepas de *S aureus* resultan más susceptibles al Germisol que a la Estreptomicina en el otoño ($p < 0.05$) en el verano sucede lo contrario ya que la Estreptomicina produce un halo de inhibición mayor que el Germisol ($p < 0.05$).
3. En el verano el Germisol es tan efectivo para inhibir el crecimiento de las cepas de *S salivarius* como la Estreptomicina, en esta misma estación las cepas de las otras dos bacterias: *S pyogenes* y el *S sanguis* son más susceptibles a la Estreptomicina por lo que ésta es más efectiva para inhibir su crecimiento. En el otoño la Estreptomicina es mejor bactericida que el Germisol para *S salivarius*, *S pyogenes* y el *S sanguis* ($p < 0.05$).
4. Se concluye finalmente que el Germisol resulta un buen antibacteriano debido a que el promedio de sus halos de inhibición es mayor de 13.2 mm por lo que indica que las bacterias aún no crean resistencia a este compuesto, por lo que se recomienda su uso para evitar el abuso de los antibióticos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BIBLIOGRAFÍA

1. Koneman E. W., Allen S. D., Janda W. M., Schreckenberger P. C., y Winn, W. C. (2001). Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas de Color. Editorial Médica Panamericana Quinta Edición.
2. Diaz JC., Hofer F., 1985. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Gram-negative bacteria resistant to antibiotics in foods. Oct-Dec; 80(4):411-21.
3. Economou-Stamatelopoulou C., Papavassiliou J. 1987. Bactericidal activity of disinfectants against certain bacterial strains. *Klebsiella pneumoniae*. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 80(5):751-5.
4. Shah PM. 2001 *Staphylococcus aureus* in lower respiratory infections: clinical relevance of antimicrobial resistance. *Semin Respir Infect* 16(3),196-202.
5. Orden B., Martinez R., Lopez de los Mozos A., Franco A. 1996. Antibiotic resistance to erythromycin, clindamycin and tetracycline of 573 strains of *Streptococcus pyogenes* (1992-1994). *Enferm Infecc Micorbiol Clin Feb*;14(2):86-9.
6. Popkirov S., Fitschev G. 1980. Current problems in hospital infection. *Zentralbl Chir* 105(2):115-20.
7. Pillai SP, Pillai CA, Shankel DM, Mitscher LA. 2001. The ability of certain antimutagenic agents to prevent development of antibiotic resistance. *Mutat Res* 20;496(1-2)61-73.
8. Chou CC., Lin LL., Chung KT. 1999. Antimicrobial activity of tea as affected by the degree of fermentation and manufacturing season. *Int J Food Microbiol* 1;148(2):125-30.
9. Sforcin JM., Fernandes A Jr., Lopes CA, Bankova V. Funari SR. 2000. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity.. *J Ethnopharmacol* 73;(1-2):243-9.
10. Silva J., Gatica R., Aguilar C., Becerra Z., Garza-Ramos U, Velazquez M., Miranda G., Leanos B., Solorzano F., y Echaniz G. 2001. Outbreak of infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Mexican hospital. *J Clin Microbiol Sep*;39(9):3193-6
11. Méndez Ramírez I., Namihira, D., Moreno L. y Sosa C. 1990. *El protocolo de Investigación: Lineamientos para su elaboración y análisis*. Trillas, México.
12. Solis Widmann A. Eficacia Antibacterial de los extractos de *Mentha piperita*, *Thymus vulgaris* y *Lippia graveolens* en dos etapas de su desarrollo: Antes y después de la floración; y de la solución alopática Germisol[™] aplicada *in vitro* en tres poblaciones del D. F. Informe final de

Servicio Social para obtener el título de BIÓLOGO. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Departamento "El Hombre y su Ambiente". Febrero de 2001.

13. Kuehl R. O. 2001. International Thompson Editores, S. A. de C. V. pp 473-491
14. Méndez I. Diseños con factores anidados y cruzados. Aleatorios y Fijos. Apuntes del Dr. Méndez. Comunicación Personal 2002.
15. Montgomery D. C. 2001 *Design and analysis of experiments*. 5th Edition. John Wiley & Sons, Inc.
16. JMP. The Statistical Discovery Software™. Copyright 2001 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN