



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**Identificación de la actividad antimicrobiana de fuentes/recursos naturales frente a
Streptococcus en relación a antibióticos comerciales.**

Ruilova Rodríguez, Tania Lilibeth

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

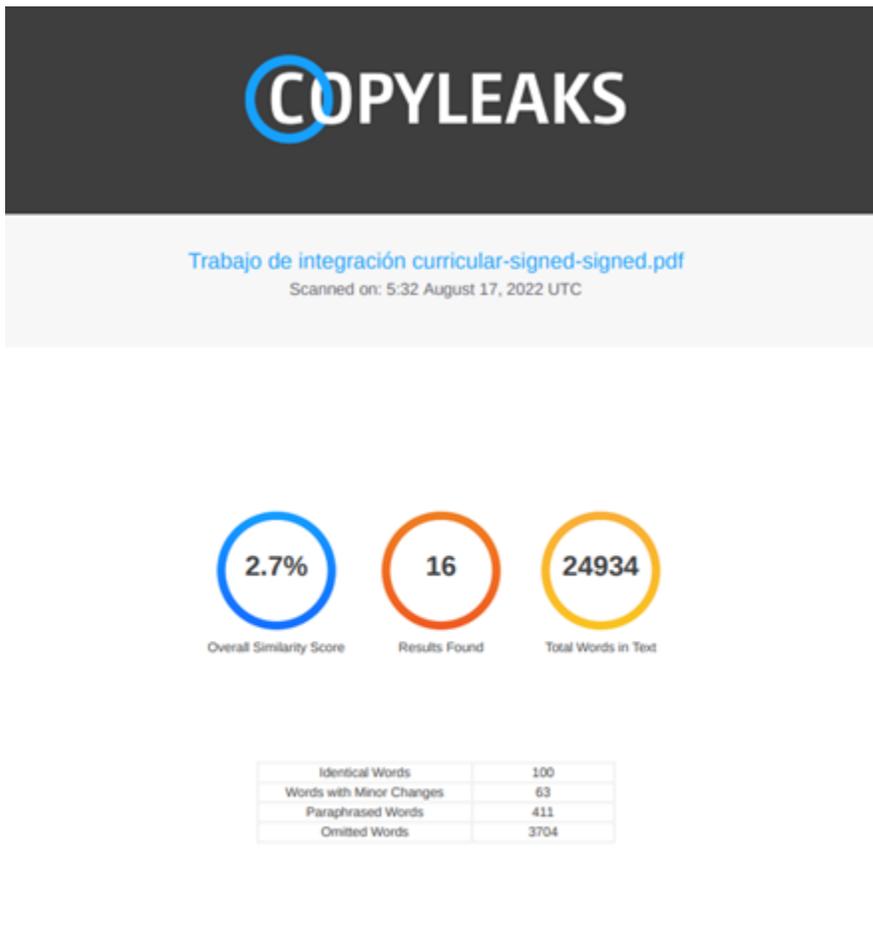
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología

Bqf. Urbina Salazar, Anabell del Rocío Ph. D.

17 de agosto del 2022

Reporte de verificación de contenido



Firma:

.....

Bqf. Urbina Salazar, Anabell del Rocío Ph. D.

Director



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: “**Identificación de la actividad antimicrobiana de fuentes/recursos naturales frente a *Streptococcus* en relación a antibióticos comerciales**” fue realizado por la señorita **Ruilova Rodríguez, Tania Lilibeth**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Santo Domingo, 17 de agosto del 2022

Firma:

.....
Bqf. Urbina Salazar, Anabell del Rocío Ph. D.

C. C 1804154217



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Ruilova Rodríguez, Tania Lilibeth**, con cédula de ciudadanía n° 0605404037, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **“Identificación de la actividad antimicrobiana de fuentes/recursos naturales frente a *Streptococcus* en relación a antibióticos comerciales”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo, 17 de agosto del 2022

Firma

Ruilova Rodríguez, Tania Lilibeth

C.C.: 0605404037



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, **Ruilova Rodríguez, Tania Lilibeth**, con cédula de ciudadanía n° 0605404037, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **“Identificación de la actividad antimicrobiana de fuentes/recursos naturales frente a *Streptococcus* en relación a antibióticos comerciales”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Santo Domingo, 17 de agosto del 2022

Firma

Ruilova Rodríguez, Tania Lilibeth

C.C.: 0605404037

Dedicatoria

Por mi dedicación a este proyecto de investigación lo dedico de manera especial a mis padres, José Luis Ruilova y Adela Rodríguez, de igual manera a mis hermanos Jomaira R. y Robinson R. y a mis abuelitos, por ser fieles acompañantes durante mi proceso académico y apoyo incondicional de todas mis decisiones, fundamentalmente al sentir su calor ante mi decisión de irme lejos de casa por perseguir mis sueños y proceso universitario, siempre dándome las mejores enseñanzas y educación para ser una persona entregada a lo que hace.

Este proyecto de estudio también se lo dedico a cada persona que me ha acompañado y escuchado durante todo este proceso brindándome siempre las mejores palabras para demostrarme que no estoy sola en cada paso que doy.

De manera especialmente única a cada mascota que ha formado parte de mi vida por ser fieles acompañantes emocionales.

Tania Ruilova

Agradecimiento

Al finalizar esta etapa universitaria quiero agradecer de manera infinita a toda mi familia, padres y hermanos, por brindarme amor y apoyo incondicional sin importar los obstáculos por los que hemos pasado y sacar la mejor versión de cada uno durante todas las etapas vividas.

Agradezco a mis compañeros, amigos y confidentes universitarios Dyllan R., Wendy G., Boris T., Paulina Z., Adriana A., Sonia D., Kevin C., Jairo C., Angie G., Joel C., Wendy V., Evelyn G., Kevin O. y a todas las personas que han estado en mi vida durante esta etapa.

A mis maestros que han ayudado que toda esta etapa se desarrolle de la mejor manera Paola P., Juan N., Vinicio U., Mario M., Anabell U., Gisella M., Pedro P., Milton A. y a todos los académicos universitarios con profesionalismo.

De manera particular agradezco al Centro de Investigación Microbiológica CIMIC y a cada una de las personas que lo conforman, por ayudarme con las instalaciones y equipos para la ejecución del presente proyecto.

Finalmente a todas y cada una de las personas que me han permitido conocerlas y que han llegado a influir en mi crecimiento personal y académico.

Tania Ruilova

Índice de contenido

Carátula	1
Reporte de verificación de contenido	2
Certificación	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimiento	7
Resumen	22
Abstract.....	23
Capítulo I	24
Introducción.....	24
Objetivos	26
<i>Objetivo general</i>	26
<i>Objetivo específico</i>	26
Hipótesis	26
<i>Hipótesis Factor A (Streptococcus)</i>	26
<i>Hipótesis Factor B (Antimicrobiano)</i>	26
<i>Hipótesis Factor C (Concentración)</i>	26
<i>Hipótesis para el Factor A (Grupo) x Factor B (Antimicrobiano) x Factor C (Concentración)</i>	27
Capítulo II	28

Revisión de literatura	28
<i>Streptococcus</i>	28
Generalidades	28
Clasificación.....	28
Identificación.....	29
Resistencia a antibióticos.....	30
Efectos en la salud.....	31
Aceites esenciales.....	32
Generalidades	32
Métodos de extracción.....	33
Efecto antimicrobiano	35
Aceite esencial de Eucalipto (<i>Eucalyptus sp.</i>).....	36
Aceite esencial de Limón (<i>Citrus limon</i>)	36
Miel (<i>Apis mellifera</i>).....	37
Generalidades	37
Efecto antimicrobiano	37
Métodos de sensibilidad antimicrobiana	38
Generalidades	38
Método de difusión en agar por discos (<i>Kirby-Bauer</i>).....	38
Método de difusión en agar por pozos modificados	38
Medios de cultivo.....	39

	10
<i>Agar Sangre</i>	39
<i>Caldo LB (Luria Bertani)</i>	39
Métodos de estudio de sensibilidad.....	39
<i>Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)</i>	39
<i>Concentración Mínima Bactericida (CMB)</i>	40
Capítulo III	41
Metodología	41
Ubicación del Área de investigación	41
<i>Ubicación política</i>	41
<i>Ubicación Ecológica</i>	41
<i>Ubicación Geográfica</i>	41
Materiales.....	42
<i>Recolección de muestras biológicas</i>	42
<i>Cultivo de muestras biológicas</i>	42
<i>Verificación de la presencia de Streptococcus</i>	43
<i>Elaboración de antibiogramas</i>	43
<i>Lectura de antibiogramas</i>	44
<i>Extracción de aceites esenciales</i>	44
<i>Siembra de Streptococcus</i>	45
<i>Elaboración de discos</i>	45
<i>Elaboración de antibiogramas para el método de discos</i>	46

<i>Elaboración de antibiogramas para el método de pozos</i>	46
<i>Concentración mínima inhibitoria</i>	47
<i>Concentración mínima bactericida</i>	48
Métodos	48
<i>Elección del kit de serología para Streptococcus</i>	48
<i>Ensayos de prueba de calidad del kit de serología para Streptococcus</i>	49
<i>Obtención de muestras biológicas</i>	49
<i>Cultivo de exudados faríngeos y secreción vaginal</i>	49
<i>Evaluación de la presencia de Streptococcus en las muestras clínicas</i>	50
<i>Prueba de Camp</i>	50
<i>Tinción Gram</i>	50
<i>Antibiogramas</i>	51
<i>Lectura de los halos presentes en los antibiogramas</i>	51
<i>Extracción del aceite esencial de eucalipto y limón</i>	51
<i>Antibiogramas con los aceites esenciales y miel</i>	51
<i>Preparación del inóculo</i>	53
<i>CMI (concentración mínima inhibitoria)</i>	53
<i>CMB (concentración mínima bactericida)</i>	53
Diseño Experimental	53
<i>Factores del experimento</i>	53
<i>Tratamientos para comparar</i>	54

	12
Análisis Estadístico.....	56
<i>Análisis funcional</i>	57
Variables evaluadas	57
<i>Extracción del aceite esencial de eucalipto</i>	57
<i>Extracción del aceite esencial de limón</i>	57
<i>Determinación de la densidad del aceite esencial de eucalipto</i>	57
<i>Determinación de la densidad del aceite esencial de limón</i>	58
<i>Determinación del rendimiento del aceite esencial de Eucalipto</i>	58
<i>Determinación del rendimiento del aceite esencial de Eucalipto</i>	58
<i>Determinación de halos de inhibición con el método de discos</i>	59
<i>Determinación de halos de inhibición con el método de pozos</i>	59
<i>CMI</i>	59
<i>CMB</i>	59
Capítulo IV	60
Resultados.....	60
Identificación serológica de las muestras clínicas.....	60
Identificación microbiológica de los <i>Streptococcus</i> encontrados.....	61
Identificación bioquímica de los <i>Streptococcus</i> encontrados	62
Antibiogramas con discos de antibióticos	63
Destilación del aceite esencial de eucalipto	65
Destilación del aceite esencial de limón.....	67

Antibiogramas por el método de difusión en agar por discos (Kirby-Bauer)	70
Antibiogramas por el método de difusión en agar por pozos	72
CMI	74
CMB	77
Análisis de varianza.....	80
<i>Análisis de varianza para la inhibición por el método Kirby-Bauer</i>	80
<i>Análisis de varianza para la inhibición de pozos</i>	81
Prueba de Tukey para la evaluación de los factores.....	82
<i>Resultados de la evaluación de los diferentes Streptococcus (Factor A) por el método de Kirby-Bauer</i>	82
<i>Resultados de la evaluación de los antimicrobianos (Factor B) por el método de Kirby-Bauer</i>	84
<i>Resultados de la evaluación de distintas concentraciones (Factor C) por el método de Kirby-Bauer</i>	85
<i>Resultados de la evaluación de los diferentes Streptococcus (Factor A) por el método de inhibición por pozos</i>	87
<i>Resultados de la evaluación de los antimicrobianos (Factor B) por el método de inhibición por pozos</i>	88
<i>Resultados de la evaluación de distintas concentraciones (Factor C) por el método de inhibición por pozos</i>	89
Pruebas de Tukey para evaluar las interacciones significativas en la actividad antimicrobiana	90

<i>Análisis Tukey aplicado en la interacción A*B (Streptococcus + Antimicrobianos) por el método de Kirby-Bauer</i>	91
<i>Análisis Tukey aplicado en la interacción A*C (Streptococcus + Concentración) por el método de Kirby-Bauer</i>	93
<i>Análisis Tukey aplicado en la interacción B*C (Antimicrobiano + Concentración) por el método de Kirby-Bauer</i>	95
<i>Análisis Tukey aplicado en la interacción A*B*C (Streptococcus + Antimicrobiano + Concentración) por el método de Kirby-Bauer</i>	97
<i>Análisis Tukey aplicado en la interacción A*B (Streptococcus + Antimicrobianos) por el método de inhibición por pozos</i>	99
<i>Análisis Tukey aplicado en la interacción A*C (Streptococcus + Concentración) por el método de inhibición por pozos</i>	101
<i>Análisis Tukey aplicado en la interacción B*C (Antimicrobiano + Concentración) por el método de inhibición por pozos</i>	103
<i>Análisis Tukey aplicado en la interacción A*B*C (Streptococcus + Antimicrobiano + Concentración) por el método de inhibición por pozos</i>	105
Análisis de CMI	107
Análisis de CMB	115
Capítulo V	124
Discusión	124
Streptococcus (Factor A)	124
Antimicrobiano (Factor B)	125
Concentración (Factor C)	126

Interacción Factor A, Factor B y Factor C	126
Capítulo VI	128
Conclusiones	128
Recomendaciones	129
Capitulo VII	130
Bibliografía	130

Índice de tablas

Tabla 1 <i>Clasificación general de los Estreptococos que tienen probabilidad de causar enfermedades en el ser humano.....</i>	29
Tabla 2 <i>Recursos utilizados para la recolección de muestras biológicas a estudiar.....</i>	42
Tabla 3 <i>Recursos utilizados para el cultivo microbiano de las muestras de exudados faríngeos.</i>	42
Tabla 4 <i>Recursos utilizados para la verificación de la presencia de Streptococcus en los cultivos.....</i>	43
Tabla 5 <i>Recursos usados para la elaboración de antibiogramas.....</i>	43
Tabla 6 <i>Recursos utilizados para leer los halos de inhibición formados en los antibiogramas ..</i>	44
Tabla 7 <i>Recursos usados para la extracción de los aceites esenciales.....</i>	44
Tabla 8 <i>Recursos utilizados para la siembra bacteriana de los Streptococcus.....</i>	45
Tabla 9 <i>Recursos usados en la elaboración de discos impregnados.....</i>	45
Tabla 10 <i>Recursos usados en la elaboración de antibiogramas con el método de discos.....</i>	46
Tabla 11 <i>Recursos usados en la elaboración de antibiogramas con el método de pozos.....</i>	46
Tabla 12 <i>Recursos usados para comprobar la concentración mínima inhibitoria.....</i>	47
Tabla 13 <i>Recursos usados para comprobar la concentración mínima bactericida.....</i>	48
Tabla 14 <i>Soluciones expresadas en concentración.....</i>	51
Tabla 15 <i>Factores y niveles a evaluar en el potencial inhibitorio de fuentes y recursos naturales</i>	53
Tabla 16 <i>Tratamientos a comprobar en el potencial inhibitorio de fuentes o recursos en distintas concentraciones aplicados a Streptococcus.....</i>	54
Tabla 17 <i>Esquema de análisis de varianza para el potencial inhibitorio de fuentes y recursos frente a Streptococcus encontrados.....</i>	56
Tabla 18 <i>Resultados del análisis serológico del crecimiento bacteriano de las muestras clínicas</i>	60

Tabla 19 <i>Identificación de la hemólisis obtenida en el crecimiento bacteriano de las muestras de Streptococcus identificadas.....</i>	61
Tabla 20 <i>Resultados de las pruebas bioquímicas de los Streptococcus obtenidos.....</i>	62
Tabla 21 <i>Diferenciación de Streptococcus agalactiae.....</i>	62
Tabla 22 <i>Discos de antibióticos usados en los antibiogramas</i>	63
Tabla 23 <i>Diámetro de los halos de inhibición que presentaron los antibióticos en S. viridans...63</i>	63
Tabla 24 <i>Diámetro de los halos de inhibición que presentaron los antibióticos en S. agalactiae</i>	64
Tabla 25 <i>Diámetro de los halos de inhibición que presentaron los antibióticos en el Grupo C..64</i>	64
Tabla 26 <i>Diámetro de los halos de inhibición que presentaron los antibióticos en el Grupo G..65</i>	65
Tabla 27 <i>Destilación del aceite esencial de eucalipto con respecto al tiempo.....</i>	65
Tabla 28 <i>Parámetros medidos en la extracción de AE de eucalipto.....</i>	66
Tabla 29 <i>Datos para determinar la densidad del AE de eucalipto.....</i>	67
Tabla 30 <i>Destilación del aceite esencial de limón con respecto al tiempo</i>	67
Tabla 31 <i>Parámetros medidos en la extracción de AE de limón</i>	68
Tabla 32 <i>Datos para determinar la densidad del AE de limón.....</i>	69
Tabla 33 <i>Diámetro de los halos de inhibición que presentó el aceite esencial de eucalipto en el método de Kirby-Bauer</i>	70
Tabla 34 <i>Halos de inhibición que presentó el aceite esencial de limón en el método de difusión en agar por discos Kirby-Bauer.....</i>	71
Tabla 35 <i>Diámetro de los halos de inhibición que presentó la miel en el método Kirby-Bauer..71</i>	71
Tabla 36 <i>Diámetro de los halos de inhibición que presentó el aceite esencial de eucalipto en el método de difusión en agar por pozos</i>	72
Tabla 37 <i>Diámetro de los halos de inhibición que presentó el aceite esencial de limón en el método de difusión en agar por pozos</i>	73

Tabla 38 <i>Diámetro de los halos de inhibición que presentó la miel en el método de difusión en agar por pozos</i>	74
Tabla 39 <i>Actividad inhibitoria del AE de eucalipto</i>	75
Tabla 40 <i>Actividad inhibitoria del AE de limón</i>	75
Tabla 41 <i>Actividad inhibitoria de la miel</i>	76
Tabla 42 <i>Actividad bactericida del AE de eucalipto</i>	77
Tabla 43 <i>Actividad bactericida del AE de limón</i>	78
Tabla 44 <i>Actividad bactericida de la miel</i>	79
Tabla 45 <i>ANOVA de los datos obtenidos en el método Kirby-Bauer</i>	80
Tabla 46 <i>ANOVA de los datos obtenidos en el método de inhibición por pozos</i>	81
Tabla 47 <i>Prueba de Tukey de la evaluación del Factor A en el método de Kirby-Bauer</i>	83
Tabla 48 <i>Prueba de Tukey de la evaluación del Factor B en el método de Kirby-Bauer</i>	84
Tabla 49 <i>Prueba de Tukey de la evaluación del Factor C en el método de Kirby-Bauer</i>	85
Tabla 50 <i>Prueba de Tukey de la evaluación del Factor A en el método de inhibición por pozos</i>	87
Tabla 51 <i>Prueba de Tukey de la evaluación del Factor B en el método de inhibición por pozos</i>	88
Tabla 52 <i>Prueba de Tukey de la evaluación del Factor C en el método de inhibición por pozos</i>	89
Tabla 53 <i>Prueba de Tukey de la evaluación de la interacción del Factor A x Factor B en el método de Kirby-Bauer</i>	91
Tabla 54 <i>Prueba de Tukey de la evaluación de la interacción del Factor A x Factor C en el método de Kirby-Bauer</i>	93
Tabla 55 <i>Prueba de Tukey de la evaluación de la interacción del Factor B x Factor C en el método de Kirby-Bauer</i>	95

Tabla 56 Prueba de Tukey de la evaluación de la interacción del Factor A x Factor B x Factor C en el método de Kirby-Bauer.....	97
Tabla 57 Prueba de Tukey de la evaluación de la interacción del Factor A x Factor B en el método de inhibición por pozos.....	99
Tabla 58 Prueba de Tukey de la evaluación de la interacción del Factor A x Factor C en el método de inhibición por pozos.....	101
Tabla 59 Prueba de Tukey de la evaluación de la interacción del Factor B x Factor C en el método de inhibición por pozos.....	103
Tabla 60 Prueba de Tukey de la evaluación de la interacción del Factor A x Factor B x Factor C en el método de inhibición por pozos.....	105
Tabla 61 Tabla cruzada con los resultados de la CMI para <i>S. viridans</i>	107
Tabla 62 Tabla cruzada con los resultados de la CMI para <i>S. agalactiae</i>	109
Tabla 63 Tabla cruzada con los resultados de la CMI para el Grupo C.....	111
Tabla 64 Tabla cruzada con los resultados de la CMI para el Grupo G.....	113
Tabla 65 Tabla cruzada con los resultados de la CMB para <i>S. viridans</i>	116
Tabla 66 Tabla cruzada con los resultados de la CMB para <i>S. agalactiae</i>	118
Tabla 67 Tabla cruzada con los resultados de la CMB para el Grupos C.....	120
Tabla 68 Tabla cruzada con los resultados de la CMB para el Grupo G.....	122

Índice de figuras

Figura 1 <i>Gráfico de los diámetros de inhibición obtenido con el Factor A en el método de Kirby-Bauer</i>	84
Figura 2 <i>Gráfico de los diámetros de inhibición obtenido con el Factor B en el método de Kirby-Bauer</i>	85
Figura 3 <i>Gráfico de los diámetros de inhibición obtenido con el Factor C en el método de Kirby-Bauer</i>	86
Figura 4 <i>Gráfico de los diámetros de inhibición obtenido con el Factor A en el método de pozos</i>	88
Figura 5 <i>Gráfico de los diámetros de inhibición obtenido con el Factor B en el método de pozos</i>	89
Figura 6 <i>Gráfico de los diámetros de inhibición obtenido con el Factor C en el método de pozos</i>	90
Figura 7 <i>Gráfico de los diámetros de inhibición obtenido con en la interacción del Factor A x Factor B en el método de Kirby-Bauer</i>	92
Figura 8 <i>Gráfico de los diámetros de inhibición obtenido con en la interacción del Factor A x Factor C en el método de Kirby-Bauer</i>	94
Figura 9 <i>Gráfico de los diámetros de inhibición obtenido con en la interacción del Factor B x Factor C en el método de Kirby-Bauer</i>	96
Figura 10 <i>Gráfico de los diámetros de inhibición obtenido con en la interacción del Factor A x Factor B en el método de pozos</i>	100
Figura 11 <i>Gráfico de los diámetros de inhibición obtenido con en la interacción del Factor A x Factor C en el método de pozos</i>	102
Figura 12 <i>Gráfico de los diámetros de inhibición obtenido con en la interacción del Factor B x Factor C en el método de pozos</i>	104

Figura 13 <i>Gráfico de Pareto de los antimicrobianos a distintas concentraciones que inhibieron el crecimiento bacteriano en el caso de S. viridans</i>	109
Figura 14 <i>Gráfico de Pareto de los antimicrobianos a distintas concentraciones que inhibieron el crecimiento bacteriano en el caso de S. agalactiae</i>	111
Figura 15 <i>Gráfico de Pareto de los antimicrobianos a distintas concentraciones que inhibieron el crecimiento bacteriano en el caso del Grupo C</i>	113
Figura 16 <i>Gráfico de Pareto de los antimicrobianos a distintas concentraciones que inhibieron el crecimiento bacteriano en el caso del Grupo G</i>	115
Figura 17 <i>Gráfico de Pareto de los antimicrobianos a distintas concentraciones que actuaron como bactericidas en el caso de S. viridans</i>	117
Figura 18 <i>Gráfico de Pareto de los antimicrobianos a distintas concentraciones que actuaron como bactericidas en el caso de S. agalactiae</i>	119
Figura 19 <i>Gráfico de Pareto de los antimicrobianos a distintas concentraciones que actuaron como bactericidas en el caso del Grupo C</i>	121
Figura 20 <i>Gráfico de Pareto de los antimicrobianos a distintas concentraciones que actuaron como bactericidas en el caso del Grupo G</i>	123

Resumen

Los metabolitos presentes en los agentes antimicrobianos tiene efecto inhibitorio dependiendo de las concentraciones a los que estos se encuentren, su estudio y análisis es de mucha importancia porque aportan información, avances y hallazgos de manera directa a la industria farmacéutica para la búsqueda y elaboración de nuevos medicamentos que ayuden a combatir la actual tasa elevada de resistencia a antibióticos que existe a nivel mundial, por lo cual el presente estudio pretende establecer la existencia de actividad antimicrobiana de tres agentes antibacterianos siendo así el aceite esencial de eucalipto, el aceite esencial de limón y la miel, a distintas concentraciones, se probó al 60%, 80% y 100% frente a microorganismos encontrados en muestras clínicas de exudados faríngeos y secreciones vaginales, el análisis se desarrolló mediante dos pruebas de sensibilidad (Kirby Bauer y pozos modificados en agar), posterior a ellos se comprobó la concentración mínima inhibitoria (CMI) a la que estos agentes sean eficaces, por último se realizó el análisis de la concentración mínima bactericida (CMB). Los resultados fueron examinados mediante un diseño experimental estadístico tri factorial y con Tukey como prueba de significancia a un 95% de nivel de confianza, obteniendo así que el aceite esencial de eucalipto actuó como el agente antibacteriano con mayor actividad antibacteriana frente a los estreptococos analizados.

Palabras clave: Agentes antimicrobianos, *Streptococcus*, CMI, CMB.

Abstract

The metabolites present in antimicrobial agents have inhibitory effect depending on the concentrations at which they are found, their study and analysis is of great importance because they provide information, advances and findings directly to the pharmaceutical industry for the search and development of new drugs to help combat the current high rate of antibiotic resistance that exists worldwide, so the present study aims to establish the existence of antimicrobial activity of three antibacterial agents such as eucalyptus essential oil, the essential oil of lemon and honey, at different concentrations, were tested at 60%, 80% and 100% against microorganisms found in clinical samples of pharyngeal exudates and vaginal secretions, the analysis was developed through two sensitivity tests (Kirby Bauer and modified agar wells), after which the minimum inhibitory concentration (MIC) at which these agents are effective was checked, and finally the analysis of the minimum bactericidal concentration (MBC) was performed. The results were examined by means of a tri factorial statistical experimental design and with Tukey as a significance test at a 95% confidence level, thus obtaining that eucalyptus essential oil acted as the antibacterial agent with the greatest antibacterial activity against the streptococci analyzed.

Key words: Antimicrobial agents, *Streptococci*, CMI, CMB.

Capítulo I

Introducción

Los antibióticos son fármacos utilizados para tratar infecciones bacterianas, la resistencia a los antibióticos ocurre cuando las bacterias mutan como consecuencia del uso de estos medicamentos. La resistencia a los antimicrobianos es una de las mayores amenazas para la salud, la seguridad alimentaria y el desarrollo del mundo actual. Puede afectar la cantidad de infecciones que se vuelven más difíciles de tratar debido a la pérdida de eficacia de los antibióticos, independientemente de la edad o el país de residencia. Por esta razón, tiene mucho sentido invertir en investigaciones y el desarrollo de nuevos antibióticos, vacunas, productos de diagnóstico y otras herramientas (WHO, 2020).

Sin antibióticos, las bacterias crecerán y no hay antagonistas para prevenirlo. Cuando un agente antibacteriano se activa, inhibe el crecimiento de la bacteria, y llega el momento en que la inhibición desaparece. La actividad antibacteriana es la capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento de una población bacteriana y puede expresarse cuantitativamente mediante pruebas in vitro. Se determina mediante su crecimiento mínimo inhibitorio o crecimiento mínimo bactericida y se pueden comparar varios compuestos. Una baja actividad no significa resistencia, tampoco significa eficacia, fracaso del tratamiento o efectos secundarios. La eficacia clínica se evidencia por la mejoría o muerte del paciente (Fica, 2005).

El incremento de la resistencia bacteriana a los agentes antibacterianos de uso común hace que sea más difícil para los médicos seleccionar empíricamente el agente antibacteriano apropiado. Por lo tanto, las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana in vitro de patógenos bacterianos relacionados deben realizarse utilizando métodos validados y muestras recolectadas adecuadamente. Hay varios métodos, pero el objetivo de las pruebas de sensibilidad in vitro es proporcionar un indicador confiable de cómo un organismo puede responder a la terapia antibacteriana en un huésped infectado, o si se está desarrollando resistencia. Este tipo de información ayuda a los médicos a elegir un tratamiento adecuado

utilizando el antibiótico correcto, a desarrollar pautas de uso de antimicrobianos y proporciona datos para el seguimiento epidemiológico. Los datos de dicha vigilancia epidemiológica proporcionan una selección adecuada del tratamiento de primera línea y un punto de partida para detectar la aparición y/o propagación de cepas resistentes y determinantes de resistencia en diversas especies bacterianas (OIE, 2019). Los estreptococos forman un diverso grupo de bacterias Gram positivas, incluyendo patógenos humanos, integran la microbiota humana, y también presentan numerosas infecciones entre ellas las respiratorias (Fernández Rivero & del Pozo, 2018).

La elevada demanda de alternativas que reemplacen los antibióticos junto con el apareamiento de enfermedades, da paso a la investigación del potencial que tienen los extractos vegetales como agentes antimicrobianos, por un lado los aceites esenciales son aromas derivados de plantas y especias que los humanos han utilizado para curar y prevenir enfermedades y conservar alimentos durante mucho tiempo. La presencia de propiedades beneficiosas de los aceites esenciales está determinada por su composición química. Muchos compuestos volátiles están involucrados, y la proporción de cada uno de estos, depende de la variedad y órganos de la planta, madurez, condiciones de cultivo y extracción, y el almacenamiento del aceite. Su principal mecanismo de acción se centra en su capacidad para penetrar las membranas bacterianas, destruir las estructuras bacterianas y provocar la fuga de iones (Huerta, 2011).

Por otro lado el uso de la miel de abeja en el tratamiento de heridas, úlceras, quemaduras e infecciones se remonta a la antigüedad debido a sus propiedades antibacterianas así como a sus importantes efectos antiinflamatorios y varios estudios han demostrado un efecto supresor de la miel en alrededor de 60 tipos de bacterias, incluidas las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Lusby et al., 2005). Al igual Zamora & Arias (2011) señalan que los efectos antibacterianos y antiinflamatorios subrayan su inmenso potencial en el campo dermatológico y clínico en general.

Objetivos

Objetivo general

Identificar la actividad antimicrobiana de fuentes/recursos naturales frente a *Streptococcus* en relación a antibióticos comerciales.

Objetivo específico

Comprobar la presencia de *Streptococcus* en las muestras de exudado faríngeo y secreción vaginal, analizadas mediante un Kit de serología para *Streptococcus*.

Analizar las muestras mediante pruebas bioquímicas y microbiológicas.

Realizar antibiogramas de las muestras.

Comprobar la inhibición bacteriana de fuentes/recursos naturales.

Hipótesis

Hipótesis Factor A (Streptococcus)

Ho: El estreptococo estudiado durante el análisis influye en el potencial inhibitorio.

Ha: El estreptococo estudiado durante el análisis no influye en el potencial inhibitorio.

Hipótesis Factor B (Antimicrobiano)

Ho: Los tipos de antimicrobianos utilizados influyen en la inhibición bacteriana del microorganismo estudiado.

Ha: Los tipos de antimicrobianos utilizados no influyen en la inhibición bacteriana del microorganismo estudiado.

Hipótesis Factor C (Concentración)

Ho: Las diferentes concentraciones de los antimicrobianos utilizados influyen en la inhibición bacteriana del estreptococo estudiado.

Ha: Las diferentes concentraciones de los antimicrobianos utilizados no influyen en la inhibición bacteriana del estreptococo estudiado.

**Hipótesis para el Factor A (Grupo) x Factor B (Antimicrobiano) x Factor C
(Concentración)**

Ho: El efecto de las interacciones entre los factores *Streptococcus* * Antimicrobiano * Concentración influye en la actividad antimicrobiana.

Ha: El efecto de las interacciones entre los factores *Streptococcus* * Antimicrobiano * La concentración influye en la actividad antimicrobiana.

Capítulo II

Revisión de literatura

Streptococcus

Generalidades

Los *Streptococcus* pertenecen a la familia *Streptococcaceae*, son bacterias Gram positivas, aerobios facultativos, con forma de coco o esférica, catalasa negativa, algunas especies tienen capsula y por lo general se agrupan en forma de cadenas de dos (diplococcus) o más bacterias (INSST, 2022). Varios miembros del género *Streptococcus* son patógenos tanto para animales como para seres humanos y se sospecha y demuestra que algunas de estas especies pueden ser zoonóticas (CFSPH, 2005).

Clasificación

Los *Streptococcus* se agrupan por anticuerpos que reconocen antígenos de superficie. Los principales grupos de estreptococos son A, B y D. Dentro del grupo de los estreptococos, las enfermedades infecciosas (especialmente la faringitis) son causadas por el grupo A. *Streptococcus pneumoniae* (la principal causa de la neumonía humana), *Streptococcus mutans* y otros *Streptococcus* llamados *S. viridans* (entre las causas de la caries dental) no pertenecen al grupo antigénico (Fox, s.f.).

Se observan en el crecimiento bacteriano tres tipos de reacciones hemolíticas (alfa, beta, gamma) después del crecimiento de estreptococos en agar sangre de cordero. La hemólisis alfa se refiere a la lisis parcial de los glóbulos rojos, lo que hace que la colonia se vuelva verde (debido a la liberación de un producto de degradación de la hemoglobina llamado biliverdina). La hemólisis beta se refiere a un halo completamente claro de hemólisis y la hemólisis gamma se refiere a la ausencia de hemólisis. Los estreptococos del grupo A y B son beta hemolíticos, mientras que el D suele ser estreptococo alfa o gamma. *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus viridans* son alfa hemolíticos. La clasificación general se presenta en la Tabla 1. La reacción hemolítica es importante para la clasificación de los estreptococos.

Las reacciones hemolíticas, junto con otras características fisiológicas, son suficientes para la identificación clínica putativa (Fox, s.f.). Los estreptococos se clasifican en grupos basados en su apariencia en los cultivos de laboratorio y sus distintos componentes químicos. Cada grupo produce infecciones específicas (Bush, 2021).

La clasificación serológica de Lancefield se fundamenta en la identificación antigénica presente en la pared y cápsulas bacterianas. Esta identificación reconoce 20 serotipos etiquetados con las letras de la A a la V, con excepción de I y J (INSST, 2022). Hay algunas especies de estreptococos que no tienen el antígeno del grupo de Lancefield y algunas otras especies que recientemente han descrito el antígeno. El grupo de Lancefield no corresponde necesariamente a las especies de estreptococos. Los miembros de una sola especie pueden pertenecer a múltiples grupos de Lancefield, y los miembros de un solo grupo de Lancefield pueden pertenecer a varias especies diferentes (CFSPH, 2005).

Tabla 1

Clasificación general de los Estreptococos que tienen probabilidad de causar enfermedades en el ser humano.

Hemólisis	Especie
Beta	Grupo A, B, C, F y G
Alfa	<i>Streptococcus viridans</i> y <i>Streptococcus viridans</i> .
Gamma	Grupo D (enterococos)

Identificación

La identificación clínica de los estreptococos se basa en parte en la respuesta hemolítica al agar sangre y los grupos de Lancefield. La hemólisis no es completamente confiable en la identificación de especies. El tipo y edad de los glóbulos rojos, otras

características del medio y las condiciones de cultivo también afectan la hemólisis. Hay algunas especies de estreptococos que no tienen el antígeno del grupo de Lancefield y algunas otras especies que recientemente han descrito el antígeno. El grupo de Lancefield no corresponde necesariamente a las especies de estreptococos. Los miembros de una sola especie pueden pertenecer a múltiples grupos de Lancefield, y los miembros de un solo grupo de Lancefield pueden pertenecer a varias especies diferentes (CFSPH, 2005).

Un Test de identificación es un sistema de prueba de látex rápido para la detección cualitativa de estreptococos del grupo Lancefield. Esta prueba rápida de coagulación con látex proporciona una solución integral para la separación e identificación de los grupos A, B, C, F y G de Lancefield. Los resultados son claros ya que se presenta un aglomerado de látex blanco sobre fondo negro donde se obtiene el antígeno específico del grupo. El estreptococo se extrae en un simple paso de incubación y las partículas de látex de poliestireno recubiertas de anticuerpos específicos de grupo se utilizan luego para identificar el antígeno. Estas partículas de látex se agregan fuertemente en presencia de antígenos homólogos y permanecen como una suspensión uniforme en ausencia de antígenos homólogos (Fisher Scientific, 2022).

Resistencia a antibióticos

Los antibióticos son una herramienta esencial para la prevención y el tratamiento de infecciones causadas por ciertas bacterias en humanos, animales y cultivos. En el cuidado de la salud, los antibióticos son uno de los medicamentos más efectivos para combatir las infecciones bacterianas que amenazan la vida. La resistencia a los antibióticos ocurre cuando los microorganismos dejan de responder a los antibióticos diseñados para matarlos. Es decir, los microorganismos no mueren y continúan creciendo. Esto no significa que el cuerpo sea resistente a los antibióticos. Las infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos son difíciles y, a veces, incluso intratables. Las infecciones resistentes a los antibióticos a menudo requieren hospitalizaciones más prolongadas, consultas médicas adicionales y alternativas costosas y tóxicas. La resistencia a los antibióticos amenaza los

avances de la medicina moderna de la que dependemos actualmente, incluidos el reemplazo de articulaciones, el trasplante de órganos y el tratamiento del cáncer. Estos procedimientos conllevan un riesgo significativo de infección y los pacientes no pueden recibirlos sin antibióticos efectivos (CDC, 2020).

La sensibilidad es significativamente mayor en niños menores de 5 años y adultos mayores de 65 años. La inmadurez del sistema inmunitario relacionada con la edad es una causa importante del trastorno inmunitario anterior, pero la causa subyacente de la susceptibilidad en los ancianos es compleja. Los estreptococos aumentan la resistencia a los antibióticos utilizados tradicionalmente en todo el mundo. Los factores que sustentan la resistencia a penicilina y cefotaxima son: la toma de antibióticos el mes pasado, usar antibióticos indiscriminadamente especialmente sin prescripción (De la Osa Busto et al., 2017).

Efectos en la salud

Los estreptococos pueden ser patógenos oportunistas. Las infecciones por estreptococos del grupo A están muy extendidas en humanos y tienen una prevalencia claramente alta en climas templados. El estreptococo *S. agalactiae* del grupo B causa una variedad de infecciones, incluidas infecciones del tracto urinario, bacteriemia, ganglios, infecciones posparto, neumonía, endocarditis, enfisema y meningitis. Estreptococo del grupo D (*S. bovis*) generalmente causa endocarditis, bacteriemia, infecciones del tracto urinario, osteomielitis y trastornos gastrointestinales. Los grupos C, G, F, H y otros grupos de estreptococos no agrupados, raramente presentan diversas manifestaciones clínicas como caries y abscesos, meningitis, fiebre puerperal, infecciones de heridas, endocarditis, etc. (INSST, 2022).

El género *Streptococcus* contiene varias especies importantes de patógenos humanos y animales que se adaptan más específicamente para sobrevivir dentro de una sola especie huésped. Como patógeno adaptado al huésped, las especies de estreptococos han desarrollado un repertorio característico de toxinas proteináceas y no proteináceas que

desempeñan funciones importantes en la colonización, la etiología y la diseminación. Las bacterias pertenecientes al género *Streptococcus* producen una variedad de toxinas como hemolisina, proteasas y superantígenos, que favorecen la colonización, supervivencia, reproducción y etiología de la bacteria en el huésped. La hemolisina, como la estreptolisina S (SLS), es secretada por 99 estreptococos del grupo A y estreptococos C y G y participa principalmente en la lisis celular. Además, puede interactuar sinérgicamente con otros factores de virulencia para inducir necrosis tisular y promover el desarrollo de fascitis necrosante. Los superantígenos (SAGs) son toxinas potentes secretadas por los estreptococos de los grupos A, C y G y generalmente causan shock estreptocócico tóxico, escarlatina y fiebre reumática aguda (Barnett et al., 2015).

Aceites esenciales

Generalidades

Los aceites volátiles, aceites esenciales o simplemente esencias, son sustancias aromáticas naturales provocadas por el aroma de las flores y otros órganos botánicos. Forman la base de la aromaterapia debido a sus múltiples efectos farmacológicos, pero también se utilizan ampliamente en las industrias de perfumería y cosmética, farmacéutica, alimentaria, de bebidas espirituosas y de confitería. Actualmente, esta definición solo se utiliza si se obtiene por inyección de vapor o, en el caso de los cítricos, por exprimido de la piel. Los aceites esenciales generalmente constituyen 0.1-1% del peso seco de las plantas. Son líquidos que tienen baja solubilidad en agua y se disuelven en alcoholes y solventes orgánicos. Cuando está fresco, se oxida y se endurece a un color amarillo intenso, haciéndolo incoloro a temperatura ambiente (esto se evita llenándolo y sellándolo completamente en un frasco de vidrio color topacio). La mayoría de los aceites son menos densos que el agua (excepto los aceites esenciales de canela, sazafrán y clavo) y tienen un índice de refracción más alto (López Luegon, 2004).

Algunos aceites son casi monomoleculares y están compuestos casi en su totalidad por un solo componente, mientras que otros son ricos en 2-3 moléculas. Sin embargo, la mayoría son multimoléculas, con sólo trazas de 3 o 4 moléculas principales, muchas moléculas secundarias y, en algunos casos, cientos de moléculas diferentes. Su composición química a excepción de las esencias derivadas de los heterósidos (como las almendras amargas y las mostazas), suelen ser una mezcla compleja de componentes muy diferentes, casi exclusivamente en el grupo de los terpenos, en menor medida (incluyendo cinamaldehído, eugenol, anetol, anisaldehído y safrol). Los compuestos terpénicos están formados por monoterpenos (10 carbonos) y sesquiterpenos (15 carbonos) en unidades de isopreno (5 carbonos). Estos monoterpenos y sesquiterpenos pueden ser acíclicos, monocíclicos y bicíclicos, así como oxigenados y desoxigenados (López Luegon, 2004).

Métodos de extracción

Los aceites esenciales están disponibles en una variedad de formas. La más común es la extracción (destilación) con corriente de vapor. Otros métodos aplicables en determinados casos son el prensado en frío de las pieles de los cítricos, la denominada floración con grasa a temperatura ambiente para extraer algunos delicados aromas florales (jazmín, azahar, rosa), ya temperatura ambiente Extracción con disolvente orgánico (López Luegon, 2004).

Destilación por vapor. El material vegetal, llamado lote, se coloca en un alambique y luego se pasa por vapor caliente. El calor cargará y destruirá la cámara de almacenamiento de aceite esencial, liberando el aceite en vapor (recuerde que es volátil). El vapor/aceite sube al condensador en el alambique. Un condensador es un tubo empapado en agua fría que condensa el vapor en agua. Al final de la condensación, el agua y los aceites esenciales se recogen en un recipiente llamado "alambique". Este recipiente especialmente diseñado tiene dos salidas que no se mezclan con agua y aceite, por lo que la solución se separa en aceites esenciales e hidrolatos. Los aceites esenciales son generalmente menos densos que el agua y flotan en el agua. Una vez recolectado el hidrosol se descarga en la salida inferior del

destilador. Dado que se produce más de un hidrosol, el proceso debe realizarse durante la destilación para evitar que el recipiente se desborde. Antes de la invención de este tipo de destilación, se utilizaban prensas para extraer los aceites esenciales de las plantas (IFA, s.f.).

Prensado. Este método se utiliza para extraer la esencia de las frutas cítricas. Se empuja la cáscara de la fruta con la mano hasta que las glándulas sebáceas se rompan y el aceite se pueda recoger con una esponja. Cuando se satura, la esponja se drena en el recipiente. Hoy en día, este método de extracción está mecanizado y ya no se utilizan las manos (IFA, s.f.).

Rozamiento. Otro método utilizado históricamente fue extraer aceite de las flores frotando o usando licor de hiedra. Las flores se colocan en una placa de vidrio llamada "marco" cubierta con grasa refinada. La grasa absorbe los aceites esenciales de las flores y, cuando termina, se quita las flores y se reemplazan por otras nuevas. Este proceso se repite tantas veces como fuera necesario hasta saturar la grasa con los aceites esenciales. Este proceso da como resultado lo que se denomina unguento. Luego se disuelve en alcohol. La grasa no se disuelve en alcohol, pero los aceites esenciales sí. El líquido resultante se calienta suavemente y el aceite esencial permanece en el recipiente en su estado puro cuando el alcohol se evapora por primera vez (IFA, s.f.).

Macerado. Este proceso de obtención es parecido al Efreulage, es un método que permite la extracción de aceites esenciales en casa, ya diluidos. Para esto se trituran las flores y hojas para romper las células y glándulas sebáceas y se colocan en aceite vegetal tibio. Los aceites vegetales absorben los aceites esenciales y el resto se escurre. El nuevo material se añade al soporte ya calentado. Este proceso se repite hasta que la grasa o aceite vegetal se concentre por completo (IFA, s.f.).

Extracción por solvente. Es uno de los métodos de extracción más modernos y que se utiliza principalmente para aceites florales caros y delicados como el jazmín, la rosa y el nardo. Técnicamente, el producto utilizado para la extracción con solvente no es un aceite esencial,

pero más exactamente se llama "absoluto". Desafortunadamente, la extracción con solvente usa químicos agresivos que pueden dejar residuos en absoluto aromáticos, lo que puede irritar la piel. Por esta razón, los absolutos no se consideran adecuados para el masaje (IFA, s.f.).

Extracción de Dióxido de Carbono. La obtención con dióxido de carbono es un desarrollo que comenzó en las últimas décadas y, por lo tanto, es relativamente nuevo. El resultado es un aceite puro y de calidad única que es muy diferente del aceite destilado al vapor. Dado que el dióxido de carbono es un gas inerte, no reacciona químicamente con el aceite extraído, no es tóxico, es incoloro e inodoro y tiene la ventaja de poder evitar daños en las piezas manteniendo una temperatura baja. Temperatura, no hay sonidos altos ni bajos. Se conservan el olor y el olor naturales característicos. La extracción tiene lugar en una cámara cerrada, lo que permite la recuperación de todos los aceites, incluidos los componentes más frágiles y volátiles. Sin embargo, este tipo de proceso tiene sus inconvenientes. Los residuos de pesticidas presentes en las plantas dejan niveles más altos en comparación con los métodos de extracción tradicionales. Por otro lado, también es un hecho que todo el material vegetal se recupera por extracción con dióxido de carbono (IFA, s.f.).

Efecto antimicrobiano

Desde un punto de vista farmacológico, las propiedades de los aceites esenciales varían mucho debido a la heterogeneidad de sus constituyentes. Algunas de las moléculas que se encuentran en los aceites esenciales de ciertas plantas son de gran interés terapéutico que han dado lugar a la aromaterapia. Algunos de estos efectos también se han aplicado a los cosméticos debido a sus efectos sobre la piel (López Luegon, 2004).

Los remedios antiguos, incluidos los aceites esenciales y sus ingredientes, se han buscado hasta cierto punto como fuente de nuevos agentes antibacterianos. Se sabe que muchos tienen una actividad antibacteriana significativa contra una amplia gama de microorganismos. Esclarecer el mecanismo de acción de estos compuestos puede conducir a la identificación de nuevas dianas antibióticas. Una vez identificados, dichos objetivos pueden

representar rutas biosintéticas o reguladoras que no están inhibidas por los fármacos actualmente disponibles (Boire et al., 2013).

Los aceites esenciales son conocidos desde hace mucho tiempo por sus propiedades contra bacterias, hongos, virus, insectos y antioxidantes. Son ampliamente usados para estos fines en las industrias médica y alimentaria. El creciente interés en productos naturales alternativos ha llevado a la comunidad de investigación a encontrar nuevos usos y aplicaciones para estos componentes. Los aceites esenciales y sus ingredientes muestran una actividad prometedora contra muchos patógenos derivados de los alimentos y microorganismos de interés (Bassolé & Juliani, 2012).

Aceite esencial de Eucalipto (Eucalyptus sp.)

El eucalipto tiene glándulas que secretan aceites esenciales en las hojas y tiene un aroma único. Se ha demostrado que el aceite esencial de eucalipto en forma de vapor es tóxico para las bacterias, los hongos, los patógenos (del suelo y poscosecha) y los insectos. Conduce a un uso potencial como fumigante en laboratorios, hospitales, almacenes de granos, etc. Su actividad antibacteriana se debe, entre otras cosas, a la presencia de sus constituyentes 1,8-cineol, β -cimeno, D-limoneno, α -pineno y α -terpineol. Los principales componentes son monoterpenos oxigenados (eucalipto), hidrocarburos monoterpénicos (α -pineno) e hidrocarburos sesquiterpénicos (aromadendreno) (Nolazco Cama et al., 2020).

Aceite esencial de Limón (Citrus limon)

Anualmente se producen unas 3.600 toneladas de aceite esencial de limón. A nivel mundial el aceite esencial de limón se posee en el segundo lugar después de la naranja dulce. La producción de este producto se considera segura, está destinada, según la demanda, a Europa Occidental, Estados Unidos y Japón. La cáscara de limón contiene aproximadamente el 0,4% de aceite, este se encuentra en sacos ovalados en la parte de color de la cascara o en la piel externa, y actúa como una barrera tóxica natural contra los microorganismos y otros insectos. El aceite de limón contiene alrededor de 2% sustancias no

volátiles, un aproximado de 23 hidrocarburos, 18 alcoholes, 16 aldehídos, 11 ésteres, 4 ácidos y 3 cetonas. Los principales componentes del aceite esencial obtenido por prensado de la cáscara son: limoneno, beta-pineno, gamma-terpineno (Cerutti & Neumayer, 2004).

Miel (*Apis mellifera*)

Generalidades

La miel es un alimento saludable, natural y altamente nutricional producido por las abejas. Sus beneficiosas propiedades van más allá de su uso como edulcorante, rico en sales minerales, enzimas, vitaminas y proteínas, lo que le otorga propiedades nutritivas y sensoriales únicas. La miel puede ser mono floral si predomina cierta proporción de néctar y polen de una determinada planta, y multi floral si contiene una mezcla inespecífica de distintos néctares y polen. Dependiendo del entorno, la geografía y las condiciones climáticas, la miel puede tener diferente contenido de polen y humedad relativa. La miel se produce en los cinco continentes, y su consumo varía de un país a otro dependiendo de la cultura y la dieta (FAO, 2020).

Efecto antimicrobiano

La miel se utiliza no solo como edulcorante natural, sino también como antiinflamatorio, antioxidante y antibiótico. Las personas a menudo usan miel por vía oral para tratar la tos y localmente para tratar quemaduras y promover la cicatrización de heridas (Middlesex Health, 2020). La miel tiene propiedades especiales y se ha sugerido que varias sustancias contribuyen principalmente a sus propiedades antibacterianas. Se ha demostrado que la miel es eficaz contra diversas bacterias patógenas. Incluso aquellos que ya son resistentes a los antibióticos. Por otro lado, también se ha demostrado que la miel en combinación con antibióticos puede reducir su dosis y potencialmente revertir la resistencia previamente adquirida a ellos (Combarros Fuertes, 2021).

Métodos de sensibilidad antimicrobiana

Generalidades

Los antibiogramas o pruebas de sensibilidad, determinan la susceptibilidad de un microorganismo a un agente antimicrobiano basándose en la exposición de la bacteria a una concentración estandarizada del agente antimicrobiano. Las pruebas de sensibilidad se pueden realizar contra bacterias, hongos o virus. Para algunos microorganismos, los resultados obtenidos con un fármaco predicen los resultados obtenidos con fármacos similares. Por lo tanto, no es necesario probar todos los medicamentos potencialmente útiles. Estas pruebas se realizan *in vitro* y procesan sin tener en cuenta muchos factores que afectan al fármaco *in vivo*. Por lo tanto, las pruebas de sensibilidad no siempre pueden predecir el resultado del tratamiento (Vazquez Pertejo, 2020).

Método de difusión en agar por discos (Kirby-Bauer)

El método de difusión por disco más utilizado (conocido también como prueba de Kirby-Bauer) es óptimo para microorganismos de crecimiento rápido. Es un método cualitativo que consiste en colocar placas impregnadas de antibiótico sobre placas de agar que han sido inoculadas con el organismo ensayado. Después de la incubación (típicamente de 16 a 18 h), se midió el diámetro de la zona de inhibición alrededor de cada placa. Cada combinación del microorganismo con el antibiótico tiene un diámetro diferente, es decir, es S (sensible), I (intermedio) o R (resistente). Para determinar la sensibilidad se pueden ejecutar pruebas de sensibilidad las cuales pueden ser con métodos en base a ácidos nucleicos, semi cuantitativas o cualitativas (Vazquez Pertejo, 2020).

Método de difusión en agar por pozos modificados

El método consiste en crear una serie de pocillos o hendiduras de 5 mm de espesor en agar nutritivo contenido en una placa petri plateada que contiene microorganismos utilizando un punzón estéril de 4 mm de diámetro. El número de agujeros depende de la

región de inhibición esperada. A continuación, se añaden a cada pocillo cantidades estándar de la formulación del inhibidor que se va a analizar (Alzate Tamayo et al., 2011).

Medios de cultivo

Agar Sangre

El agar sangre es un medio de cultivo sólido rico, pero no selectivo. Se utiliza para aislar y cultivar una amplia variedad de microorganismos a partir de muestras clínicas o para subcultivos. Este cultivo se compone principalmente de agar stock enriquecido y 5% de sangre. La base de gelatina puede cambiar según sea necesario, pero principalmente incluirá peptonas, aminoácidos, vitaminas, extractos de carne, cloruro de sodio, agar y más. El agar sangre es un medio enriquecido ya que contiene un 5-10% de sangre hecha de agar como aditivo principal. Ambos compuestos son ricos en nutrientes y esta propiedad permite que crezcan la mayoría de las bacterias cultivadas. Este aumento es ilimitado; por lo tanto, no es selectivo. Sin embargo, si a este medio se le añaden compuestos para suprimir el crecimiento de algunos microorganismos y facilitar el crecimiento de otros, se vuelve selectivo. Esto sucede cuando se agregan ciertos antibióticos o agentes antifúngicos. Asimismo, el agar sangre es un medio discriminante porque distingue tres tipos de bacterias: beta hemolítica, alfa hemolítica y gamma hemolítica (Gil, 2019).

Caldo LB (Luria Bertani)

Es un medio, un medio no selectivo e indiferenciado que contiene triptona, extracto de levadura y cloruro de sodio. Contiene nutrientes esenciales para el crecimiento óptimo de la mayoría de los microorganismos. El LB de Miller tiene una relación diferente al LB típico (Arumí Rovira, 2019).

Métodos de estudio de sensibilidad

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La concentración mínima inhibitoria (CMI), es la concentración más baja ($\mu\text{g/ml}$) de un antibiótico que inhibe el crecimiento de una cepa bacteriana dada. La mayoría de los

antibióticos contienen valores de CMI para determinar el antibiótico más adecuado para garantizar la eficacia terapéutica. Esta información puede conducir a la elección correcta del tratamiento, lo que aumenta las posibilidades de éxito para eliminar las infecciones y ayudar a combatir la resistencia a los antibióticos (IDEXX, 2022).

Concentración Mínima Bactericida (CMB)

El propósito de la concentración mínima bactericida o CMB es determinar la concentración más baja de un agente antimicrobiano capaz de matar una cepa de bacterias para compararla con la concentración alcanzada en un sitio particular. Se basa en los mismos métodos utilizados para obtener el valor de MIC al diluir el caldo y ajustarlo para bacterias seleccionadas. CMB se consideró la concentración más baja de agente antibacteriano, matando el 99,9% del inóculo original (CoEsAnt-SEIMC, 2001).

Capítulo III

Metodología

Ubicación del Área de investigación

Ubicación política

País:	Ecuador
Provincia:	Chimborazo
Cantón:	Riobamba
Parroquia:	Veloz
Sector:	Morona 21-42 y 10 de Agosto

Ubicación Ecológica

Zona de vida:	Urbana
Altitud:	2754 msnm
Temperatura media:	13 °C
Precipitación:	1619 mm/año
Humedad relativa:	86%
Heliófila	158 horas luz/año

Ubicación Geográfica

El procesamiento del proyecto de investigación se desarrolló en la provincia de Chimborazo, específicamente en las instalaciones del Centro de Investigación Microbiológica CIMIC, en el laboratorio de microbiología ubicado en la ciudad de Riobamba, Morona 21-42 y 10 de Agosto.

Latitud: 1°40'38"

Longitud: 78°38'44"

Altitud: 2754 msnm

Materiales

Recolección de muestras biológicas

Tabla 2

Recursos utilizados para la recolección de muestras biológicas a estudiar.

Equipo	Materiales/Insumos	Muestra
Hielera de muestras biológicas	Medio de transporte Stuart	Células de la garganta
	Paleta baja lengua	
	Guantes desechables	
	Mandil desechable	
	Cofia	
	Cubre zapatos	
	Mascarilla cubreboca	

Cultivo de muestras biológicas

Tabla 3

Recursos utilizados para el cultivo microbiano de las muestras de exudados faríngeos.

Equipo	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestra
Cámara de flujo laminar	Mechero	Agar sangre	Células de la garganta
Autoclave	Cajas Petri	Agua destilada	Secreción vaginal
Incubadora de CO ₂	Vasos de precipitación		
Plancha térmica	Varilla de agitación		
Balanza	Asa bacteriológica		

Verificación de la presencia de *Streptococcus*

Tabla 4

Recursos utilizados para la verificación de la presencia de *Streptococcus* en los cultivos.

Equipo	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestra
Microscopio	Placas	Kit serológico	Crecimiento bacteriano
		para <i>Streptococcus</i>	
	Cajas Petri	Tiras reactivas de Catalasa	
		Rejilla	Solución salina fisiológica
	Palillos estériles	Agua destilada Cristal violeta Lugol Alcohol cetona Safranina	

Elaboración de antibiogramas

Tabla 5

Recursos usados para la elaboración de antibiogramas.

Equipo	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestra
Incubadora de CO ₂	Cajas Petri	Agar sangre	Crecimiento bacteriano
Cámara de flujo laminar	Mechero	Solución salina fisiológica	

Autoclave	Hisopos estériles	Agua destilada
	Tubos de ensayo estériles	
	Vasos de precipitación	
	Varilla de agitación	
	Pinzas	
	Discos de antibióticos	

Lectura de antibiogramas

Tabla 6

Recursos utilizados para leer los halos de inhibición formados en los antibiogramas.

Materiales/Insumos	Muestra
Regla	Antibiogramas
Lámpara	
M100: Performance	
Standards for Antimicrobial	
Susceptibility Testing CLSI	

Extracción de aceites esenciales

Tabla 7

Recursos usados para la extracción de los aceites esenciales.

Equipo	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestra
Destilador por arrastre de vapor	Goteros estériles	Agua destilada	Hojas de eucalipto
			Cáscaras de limón

Siembra de Streptococcus

Tabla 8

Recursos utilizados para la siembra bacteriana de los Streptococcus.

Equipo	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestra
Autoclave	Cajas Petri	Agar sangre	<i>Streptococcus</i>
Plancha térmica	Mechero	Agua destilada	
Balanza	Medios Stuart con muestra		
Cámara de flujo laminar	Vasos de precipitación		
Incubadora de CO ₂	Varilla de agitación		

Elaboración de discos

Tabla 9

Recursos usados en la elaboración de discos impregnados.

Equipo	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestra
Cámara de flujo laminar	Discos en blanco	Agua destilada	Aceite esencial de Eucalipto
Micropipetas	Tubos eppendorf		Aceite esencial de Limón
Plancha térmica	Puntas		Miel
	Pinzas		
	Mechero		
	Cajas tripetri estériles		
	Aceite de oliva		

Elaboración de antibiogramas para el método de discos

Tabla 10

Recursos usados en la elaboración de antibiogramas con el método de discos.

Equipo	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestra
Cámara de flujo laminar	Cajas Petri	Agar sangre	<i>Streptococcus</i>
Autoclave	Mechero	Solución salina fisiológica	
Incubadora de CO ₂	Hisopos estériles	Agua destilada	
Plancha térmica	Tubos de ensayo estériles		
Balanza	Pinzas		
	Vasos de precipitación		
	Varilla de agitación		
	Discos impregnados		

Elaboración de antibiogramas para el método de pozos

Tabla 11

Recursos usados en la elaboración de antibiogramas con el método de pozos.

Equipo	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestra
Cámara de flujo laminar	Cajas Petri	Agar sangre	<i>Streptococcus</i>
Autoclave	Mechero	Solución salina fisiológica	

Incubadora de CO ₂	Hisopos estériles	Agua destilada
Plancha térmica	Tubos de ensayo estériles	
Balanza	Pinzas	
Micropipetas	Puntas	
	Vasos de precipitación	
	Varilla de agitación	
	Sacabocados	
	Tubos eppendorf	
	Aceite de Eucalipto	
	Aceite de Limón	
	Miel	
	Aceite de oliva	

Concentración mínima inhibitoria

Tabla 12

Recursos usados para comprobar la concentración mínima inhibitoria.

Equipo	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestra
Incubadora de CO ₂	Tubos estériles	Caldo LB	<i>Streptococcus</i>
Micropipetas	Disco de Penicilina		
	Gradilla		
	Puntas		
	Tapones		
	Tubos eppendorf		
	Aceite de Eucalipto		

Aceite de Limón

Miel

Aceite de oliva

Concentración mínima bactericida

Tabla 13

Recursos usados para comprobar la concentración mínima bactericida.

Equipo	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestra
Cámara de flujo laminar	Cajas Petri	Agar sangre	CMI
Autoclave	Mechero	Solución salina fisiológica	
Incubadora de CO ₂	Hisopos estériles	Agua destilada	
Plancha térmica	Vasos de precipitación		
Balanza	Varilla de agitación		
	Asa bacteriológica		

Métodos

Elección del kit de serología para Streptococcus

El kit de serología para verificar la presencia de *Streptococcus* que se seleccionó fue Streptex Rapid, prueba de extracción rápida para el grupo estreptococos. Mediante esta prueba serológica de aglutinación nos permitió la identificación del grupo (A, B, C, F y G) al cual pertenecen las colonias que han crecido en el cultivo del exudado faríngeo y secreción vaginal.

Ensayos de prueba de calidad del kit de serología para Streptococcus

Para comprobar la calidad y validez de la prueba serológica de aglutinación elegida se procedió a probar según indica el protocolo en la tarjeta de procedimiento para el kit de prueba Streptex Rapid y el kit de extracción ácida Streptex, se inició con 3 gotas de los reactivos 1 y 2 de extracción en el tubo desechable, en lugar de la muestra se usa el control positivo de aglutinación que viene en el kit, se mezcló con un bastoncillo, se añadió una gota de los reactivos de látex A, B, C, F y G en 5 círculos diferentes en la tarjeta de reacción, mediante un dispensador de muestra se añadió 1 gota del extracto del tubo desechable en cada uno de los 5 círculos que contienen los reactivos látex de los grupos, con un bastoncillo se mezcló y extendió cada muestra hasta cubrir toda la zona del círculo, por último se agitó la tarjeta suavemente durante 1 minuto y se observó el resultado de aglutinación.

Obtención de muestras biológicas

Bajo un acuerdo de confidencialidad y un consentimiento informado firmado por el representante legal, se procedió a tomar las muestras de una población de 40 niños, los exudados faríngeos se obtuvieron de niños de entre 3 a 5 años de edad, se utilizó el respectivo equipo de bioseguridad. Una vez abierta de manera adecuada la boca con ayuda de paletas baja lenguas se recogió con el hisopo estéril la muestra de la parte profunda de la boca, correspondiente a la garganta, en el área de las amígdalas y se guardó el hisopo con la muestra en el medio de transporte Stuart. Las muestras de secreción vaginal se recibieron por parte de médicos ginecólogos.

Cultivo de exudados faríngeos y secreción vaginal

Se realizó medios de cultivo agar sangre de cordero en cajas monopetri, en las cuales se procedió a sembrar las muestras de exudado faríngeo y secreción vaginal y se incubaron en CO₂ por 24 horas a 35°C.

Evaluación de la presencia de Streptococcus en las muestras clínicas

Con el crecimiento bacteriano obtenido de los exudados faríngeos después de las 24 horas de incubación en CO₂, se evaluó la presencia de *Streptococcus*, con ayuda del kit de prueba Streptex Rapid y el kit de extracción ácida Streptex, en primer lugar puso 3 gotas del reactivo 1 en un tubo desechable, en el mismo tubo se añadió 3 gotas del reactivo 2, con la parte no puntiaguda de un bastoncillo se recogió 5 colonias grandes, se las mezcló con los reactivos 1 y 2 en el tubo desechable, se adicionó 3 gotas del reactivo de extracción 3 y se mezcló con el mismo bastoncillo, por otro lado se agregó 1 gota de los reactivos de látex A, B, C, F y G en 5 círculos diferentes en una tarjeta de reacción, con un dispensador de muestra (pipeta) se añadió gota del extracto del tubo desechable en cada uno de los 5 círculos que contienen los reactivos de látex A, B, C, F y G. Con un nuevo bastoncillo para cada círculo se mezcló y extendió hasta cubrir toda la zona del círculo, finalmente se agitó suavemente la tarjeta durante 1 minuto y se observó los resultados.

Prueba de Camp

La prueba de Camp se realizó como control de verificación para comprobar la existencia del *Streptococcus agalactiae* del grupo B, para esto se utilizó agar sangre de cordero, se sembró una estría de la cepa *Staphylococcus aureus* y de manera perpendicular y lo más cerca posible sin llegar a tocar la estría se procedió a sembrar la cepa de *Streptococcus* que se analizará. Se la dejó incubar por 24 horas en CO₂ a 35°C, se sembraron todos los *Streptococcus* encontrados para que formen parte de los controles.

Tinción Gram

Se fijó la muestra en una placa y se añadió sobre esta el colorante cristal violeta, transcurrido 30 segundos se procedió a lavarlo con agua destilada, se adicionó el mordiente lugol y se esperó 30 segundos para lavarlo, seguido de esto se colocó el decolorante alcohol cetona y se lo lavó de inmediato, por último, se añadió el colorante de contraste safranina y después de 20 segundos se lavó, se dejó secar la placa y se observó en el microscopio.

Antibiogramas

Con ayuda de hisopos estériles se tomó colonias y se las mezcló en tubos estériles que contenían solución salina hasta ajustar la turbidez a 0.5 de la escala estándar de McFarland, en cajas Petri con agar sangre de cordero se procedió a platear y se puso los discos de antibióticos de Penicilina 10U, Vancomicina 30µg, Cefotaxima 30µg, Clindamicina 2µg, Eritromicina 15µg y Levofloxacin 5µg, para realizar una prueba de susceptibilidad para diferenciar grupos se usó el disco de Bacitracina 0.04U y Optoquina 5µg. Se dejó incubar en CO₂ por 24 horas a 35°C.

Lectura de los halos presentes en los antibiogramas

A contraluz se reflejó las cajas Petri con los cultivos para poder visualizar los halos de inhibición, con una regla se procedió a medir los diámetros.

Extracción del aceite esencial de eucalipto y limón

Se recolectó hojas secas de eucalipto y cáscaras de limón, se montó el equipo de destilación por arrastre de vapor, y se procedió a la extracción de los aceites por separado.

Antibiogramas con los aceites esenciales y miel

Para los métodos de sensibilidad que se usaron se realizó agar sangre de cordero en cajas monopetri. Las soluciones que se prepararon se detallan en la tabla 14. La elección del diluyente se realizó un control de inhibición impregnando el disco con aceite de oliva y agua, se dejó por 10 minutos los discos que absorban el control, por mientras se plateó el agar sangre de cordero con los *Streptococcus* a analizar, después con ayuda de pinzas se tomó los discos y se ubicaron tal cual como se realizó con los discos de antibióticos, finalmente se incubó en CO₂ por 24 horas a 35°C.

Tabla 14

Soluciones expresadas en concentración.

Fuente/recurso (antimicrobiano)	Diluyente	Concentración
--	------------------	----------------------

		60%
Aceite esencial de eucalipto	Aceite de oliva	80%
		100%
		60%
Aceite esencial de limón	Aceite de oliva	80%
		100%
		60%
Miel	Agua destilada	80%
		100%

Difusión en agar por discos (Kirby-Bauer). Para este método se realizó agar sangre de cordero en cajas monopetri. La elección del diluyente se realizó un control de inhibición impregnando el disco con aceite de oliva y agua, se dejó por 10 minutos los discos que absorban el control, por mientras se plateó el agar sangre de cordero con los *Streptococcus* a analizar, después con ayuda de pinzas se tomó los discos y se ubicaron tal cual como se realizó con los discos de antibióticos, finalmente se incubó en CO₂ por 24 horas a 35°C. Para el método Kirby-Bauer los discos en blanco se impregnaron con 20µl de solución, los discos reposaron 10 minutos antes de usarlos para garantizar la absorción de la solución. Se plateó los medios agar sangre de cordero con los *Streptococcus* que se estudiará, posterior a esto se posicionaron los discos impregnados de solución de aceite esencial de eucalipto, aceite esencial de limón y miel a distintas concentraciones. Se esperó 5 minutos para que los discos se adhieran correctamente y se llevó los cultivos a incubar en CO₂ por 24 horas a 35°C.

Difusión en agar por pozos modificados. En el agar sangre de cordero plateado por los *Streptococcus* estudiados se realizó pozos de 5mm de diámetro con ayuda de un sacabocados estéril, en los cuales se depositó 20µl de la solución (antimicrobiano). Se esperó

10 minutos para que las soluciones se adhieran y concentren correctamente y se llevó los cultivos a incubar en CO₂ por 24 horas a 35°C.

Preparación del inóculo

Se recogieron colonias del cultivo bacteriano con hisopos estériles, se mezclaron las colonias en un tubo estéril que contenía Caldo LB hasta ajustar la turbidez a 0.5 de la escala estándar de McFarland, este proceso se realizó para cada *Streptococcus* estudiado.

CMI (concentración mínima inhibitoria)

Se colocaron tubos estériles en una gradilla, y se añadió 500µl en cada tubo el inóculo de *Streptococcus* correspondiente, junto con 500µl del antimicrobiano a la concentración respectiva, por otro lado en lugar de la fuente o recurso se puso un disco de Penicilina para tener el control de inhibición, ya que el control de crecimiento fue el tubo estándar de turbidez ajustado a 0.5 de la escala estándar de McFarland, se aseguraron los tubos con tapones, se homogenizó y se incubaron en CO₂ por 24 horas a 35°C.

CMB (concentración mínima bactericida)

Los tubos incubados en CO₂ por 24 horas a 35°C para la concentración mínima inhibitoria CMI, se sembraron en agar sangre de cordero, primero se mezcló el contenido de cada tubo tratando de homogeneizar el inóculo con la solución y con un asa bacteriológica estéril se tomó una muestra de cada tubo y se procedió a sembrar, esto se llevó a incubar en CO₂ por 24 horas a 35°C.

Diseño Experimental

Factores del experimento

Tabla 15

Factores y niveles a evaluar en el potencial inhibitorio de fuentes y recursos naturales.

Factores	Simbología	Niveles
<i>Streptococcus</i>	a ₁	Microorganismo 1

	a ₂	Microorganismo 2
	a ₃	Microorganismo 3
	a ₄	Microorganismo 4
	b ₁	Aceite esencial de eucalipto
Antimicrobiano	b ₂	Aceite esencial de limón
	b ₃	Miel
	c ₁	60%
Concentración	c ₂	80%
	c ₃	100%

Tratamientos para comparar

Tabla 16

Tratamientos a comprobar en el potencial inhibitorio de fuentes o recursos en distintas concentraciones aplicados a Streptococcus.

N°	Tratamientos	Combinación
T1	a1b1c1	Microorganismo 1 + Aceite esencial de eucalipto + 60%
T2	a1b1c2	Microorganismo 1 + Aceite esencial de eucalipto + 80%
T3	a1b1c3	Microorganismo 1 + Aceite esencial de eucalipto + 100%
T4	a1b2c1	Microorganismo 1 + Aceite esencial de limón + 60%
T5	a1b2c2	Microorganismo 1 + Aceite esencial de limón + 80%
T6	a1b2c3	Microorganismo 1 + Aceite esencial de limón + 100%
T7	a1b3c1	Microorganismo 1 + Miel + 60%
T8	a1b3c2	Microorganismo 1 + Miel + 80%
T9	a1b3c3	Microorganismo 1 + Miel + 100%
T10	a2b1c1	Microorganismo 2 + Aceite esencial de eucalipto + 60%

T11	a2b1c2	Microorganismo 2 + Aceite esencial de eucalipto + 80%
T12	a2b1c3	Microorganismo 2 + Aceite esencial de eucalipto + 100%
T13	a2b2c1	Microorganismo 2 + Aceite esencial de limón + 60%
T14	a2b2c2	Microorganismo 2 + Aceite esencial de limón + 80%
T15	a2b2c3	Microorganismo 2 + Aceite esencial de limón + 100%
T16	a2b3c1	Microorganismo 2 + Miel + 60%
T17	a2b3c2	Microorganismo 2 + Miel + 80%
T18	a2b3c3	Microorganismo 2 + Miel + 100%
T19	a3b1c1	Microorganismo 3 + Aceite esencial de eucalipto + 60%
T20	a3b1c2	Microorganismo 3 + Aceite esencial de eucalipto + 80%
T21	a3b1c3	Microorganismo 3 + Aceite esencial de eucalipto + 100%
T22	a3b2c1	Microorganismo 3 + Aceite esencial de limón + 60%
T23	a3b2c2	Microorganismo 3 + Aceite esencial de limón + 80%
T24	a3b2c3	Microorganismo 3 + Aceite esencial de limón + 100%
T25	a3b3c1	Microorganismo 3 + Miel + 60%
T26	a3b3c2	Microorganismo 3 + Miel + 80%
T27	a3b3c3	Microorganismo 3 + Miel + 100%
T28	a4b1c1	Microorganismo 4 + Aceite esencial de eucalipto + 60%
T29	a4b1c2	Microorganismo 4 + Aceite esencial de eucalipto + 80%
T30	a4b1c3	Microorganismo 4 + Aceite esencial de eucalipto + 100%
T31	a4b2c1	Microorganismo 4 + Aceite esencial de limón + 60%
T32	a4b2c2	Microorganismo 4 + Aceite esencial de limón + 80%
T33	a4b2c3	Microorganismo 4 + Aceite esencial de limón + 100%
T34	a4b3c1	Microorganismo 4 + Miel + 60%
T35	a4b3c2	Microorganismo 4 + Miel + 80%

T36

a4b3c3

Microorganismo 4 + Miel + 100%

Tipo de diseño. Se aplicó ANOVA con arreglo factorial AxBxC (4x3x3), en donde A representa a los Streptococcus que se encontraron en los análisis de las muestras clínicas, B corresponde a antimicrobianos inhibidores utilizados y C a las distintas concentraciones de los antimicrobianos.

Repeticiones. El diseño experimental contó con la ejecución de 3 repeticiones por tratamiento, teniendo un total de 108 unidades experimentales por método de sensibilidad.

Análisis Estadístico

Tabla 17

Esquema de análisis de varianza para el potencial inhibitorio de fuentes y recursos frente a Streptococcus encontrados.

Fuente		Grados de libertad
Streptococcus	a-1	3
Antimicrobiano	b-1	2
Concentración	c-1	2
Streptococcus + Antimicrobiano	(a-1) (b-1)	6
Streptococcus + Concentración	(a-1) (c-1)	6
Antimicrobiano + Concentración	(b-1) (c-1)	4
Streptococcus + Antimicrobiano + Concentración	(a-1) (b-1) (c-1)	12
Replicas	r-1	2
Error		70
Total		107

Análisis funcional

Como análisis funcional se aplicó la prueba de significancia de Tukey al 5% ($p < 0,05$) a cada una de las variables que en el análisis de varianza presentaron diferencias significativas.

VARIABLES EVALUADAS

Extracción del aceite esencial de eucalipto

Se procedió a medir los mililitros de aceite que se extrae conforme pasa el tiempo, hasta aproximadamente 90 minutos, se realizaron tres mediciones de índice de refracción (n_d) a una temperatura de 18°C, el pH a temperatura de 19°C, la densidad de la muestra extraída y la densidad referencial teórica.

Extracción del aceite esencial de limón

Al igual que en el caso de la extracción del aceite esencial de eucalipto, se procedió a medir los mililitros de aceite que se extrae conforme para el tiempo por aproximadamente 90 minutos. Se realizó tres mediciones para completar datos del índice de refracción (n_d) a una temperatura de 18°C, el pH a una temperatura de 19°C, la densidad de la muestra extraída y la densidad referencial teórica.

Determinación de la densidad del aceite esencial de eucalipto

La medición de la densidad se la hizo con un picnómetro tomando el peso de picnómetro vacío y luego más el peso del aceite de eucalipto, y se realizó el respectivo cálculo.

Se calculó la densidad empleando la siguiente ecuación:

$$\delta = \frac{m_2 - m_1}{v}$$

Siendo:

δ = densidad (g/ml)

m_2 = peso del picnómetro + aceite de eucalipto

m_1 = peso del picnómetro vacío

v = volumen total (10ml)

Determinación de la densidad del aceite esencial de limón

La medición de la densidad se la hizo con un picnómetro tomando el peso de picnómetro vacío y luego más el peso del aceite de limón, y se realizó el respectivo cálculo.

Se calculó la densidad empleando la siguiente ecuación:

$$\delta = \frac{m2 - m1}{v}$$

Siendo:

δ = densidad (g/ml)

m2= peso del picnómetro + aceite de limón

m1= peso del picnómetro vacío

v= volumen total (10ml)

Determinación del rendimiento del aceite esencial de Eucalipto

El rendimiento se calculó tomando en cuenta los datos determinados anteriormente, tomando como referencia el peso en masa del eucalipto en gramos que se procesó para destilar y el volumen extraído.

Se calculó el rendimiento empleando la siguiente ecuación:

$$m = \delta * v$$

Siendo

m= masa del eucalipto (g)

δ = densidad (g/ml)

v= volumen extraído

Determinación del rendimiento del aceite esencial de Eucalipto

El rendimiento se calculó tomando en cuenta los datos calculados anteriormente, tomando como referencia el peso en masa de la cáscara de limón en gramos que se procesó para destilar y el volumen extraído.

Se calculó el rendimiento empleando la siguiente ecuación:

$$m = \delta * v$$

Siendo

m= masa del eucalipto (g)

δ = densidad (g/ml)

v= volumen extraído

Determinación de halos de inhibición con el método de discos

La medición se realizó una vez pasaron 24 horas de la incubación de los antibiogramas con los discos impregnados. Los halos de inhibición se midieron en contraluz desde el centro del disco impregnado de la solución que sustituyeron a los discos de antibióticos, hasta donde inicie el crecimiento o exista al menos una colonia formada. La medición se realizó con una regla y con cuidado de no tocar el crecimiento bacteriano.

Determinación de halos de inhibición con el método de pozos

La medición se realizó una vez pasaron 24 horas de la incubación de los antibiogramas con los pocillos llenos de solución. Al igual que en la medición de los halos de inhibición con el método de discos, se realizó el análisis de inhibición midiendo los halos desde el centro del pocillo en donde se encontraba la solución, esto se realizó con una regla, poniendo la caja Petri a contraluz teniendo cuidado de no tocar el crecimiento bacteriano y de que no se esparza la solución.

CMI

Se analizó el crecimiento o inhibición bacteriana luego de las 24 horas de incubación que tuvieron los tubos. Comprobando su turbidez con el tubo estándar ajustado a 0.5 de la escala estándar de McFarland como control de crecimiento y el tubo que contenía como antimicrobiano a un disco de Penicilina 10U como control de no crecimiento.

CMB

Las muestras de los tubos que fueron sembradas en agar sangre corazón se analizaron luego de 24 horas de incubación en donde se reportó si existía crecimiento o no.

Capítulo IV

Resultados

Identificación serológica de las muestras clínicas

El análisis serológico se realizó para todos los exudados faríngeos obtenidos de la población de 40 niños, de igual manera con las muestras de secreción vaginal, el análisis arrojó la identificación de los siguientes resultados:

Tabla 18

Resultados del análisis serológico del crecimiento bacteriano de las muestras clínicas.

Grupo	Características	Identificación
Alfa Hemolítico		-
Grupo B		
Grupo C	Gram positivo Catalasa negativa	
Grupo G		

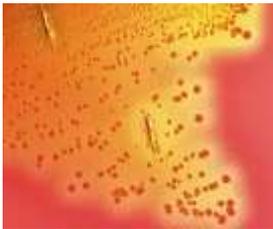
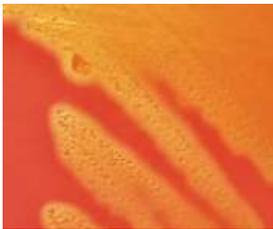
Nota. Esta tabla muestra los resultados positivos en la identificación de los grupos beta hemolíticos mediante el kit de serología, con respecto al alfa hemolítico no hay campo de verificación por medio de la prueba serológica.

Identificación microbiológica de los *Streptococcus* encontrados

En la identificación microbiológica se identificó el tipo de hemólisis desarrollada en el crecimiento bacteriano de las muestras que se identificó la presencia de *Streptococcus*.

Tabla 19

Identificación de la hemólisis obtenida en el crecimiento bacteriano de las muestras de Streptococcus identificadas.

Microorganismo	Hemólisis	Morfología
<i>S. viridans</i>	Alfa	
Grupo B	Beta	
Grupo C	Beta	
Grupo G	Beta	

Nota. En la tabla se indica los resultados de la identificación de los grupos según su hemólisis, con respecto al alfa hemolítico se determinó la presencia de *S. viridans*.

Identificación bioquímica de los *Streptococcus* encontrados

Se realizaron pruebas bioquímicas para poder obtener una tabla de criterios fenotípicos de los microorganismos que se identificaron. Dentro de las pruebas se determinó la sensibilidad que obtuvieron los discos de Bacitracina 0.04U, STX 25µg, Optoquina 5µg y Penicilina 10U, la prueba de camp para identificar la presencia de *Streptococcus agalactiae* en el grupo B que se encontró en la prueba serológica, y la prueba de bilis.

Tabla 20

Resultados de las pruebas bioquímicas de los Streptococcus obtenidos.

Grupo	Hemolisis	Bacitracina	SXT	Prueba de	Optoquina	Penicilina	Bilis
		0.04U	25µg	CAMP	5µg	10U	
Alfa	A	R (V)	S	-	R	S	-
B	B	R	R	+	R	S	-
C	B	R (V)	S	-	R	S	-
G	B	R (V)	S	-	R	S	-

Nota. La sensibilidad de la Bacitracina es variable en el caso de los alfa hemolíticos, del grupo C y G de los beta hemolíticos.

Tabla 21

Diferenciación de Streptococcus agalactiae.

Microorganismo	Agar	Identificación
<i>S. agalactiae</i>	CHROMagar StrepB	

Para la diferenciación del *Streptococcus agalactiae* se utilizó CHROMagar StrepB, el cual tuvo un aspecto de color malva lo que resulta positivo para *Streptococcus agalactiae*.

Antibiogramas con discos de antibióticos

En la elaboración de los antibiogramas se usaron los descritos en la tabla 22, teniendo en cuenta los *Streptococcus* identificados.

Tabla 22

Discos de antibióticos usados en los antibiogramas.

Microorganismos	Antibióticos
	Penicilina 10u
<i>Streptococcus viridans</i>	Vancomicina 30ug
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Cefotaxima 30ug
Grupo C	Clindamicina 2ug
Grupo G	Eritromicina 15ug
	Levofloxacinina 5ug

Nota. Se usaron para los cuatro microorganismos los mismos seis discos de antibióticos.

En la medición de los halos se obtuvieron midiendo los diámetros de inhibición y su sensibilidad se determinó el M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing CLSI 2021 los resultados se encuentran en las tablas descritas a continuación:

Tabla 23

Diámetro de los halos de inhibición que presentaron los antibióticos en S. viridans.

Microorganismo	Antibiótico	Halo (mm)	Sensibilidad
	Penicilina 10u	25	S
	Vancomicina 30ug	22	S
<i>S. viridans</i>	Cefotaxima 30ug	30	S
	Clindamicina 2ug	26	S
	Eritromicina 15ug	13	R
	Levofloxacinina 5ug	24	S

Tabla 24

Diámetro de los halos de inhibición que presentaron los antibióticos en S. agalactiae.

Microorganismo	Antibiótico	Halo (mm)	Sensibilidad
<i>S. agalactiae</i>	Penicilina 10u	35	S
	Vancomicina 30ug	19	S
	Cefotaxima 30ug	34	S
	Clindamicina 2ug	6	R
	Eritromicina 15ug	21	S
	Levofloxacin 5ug	24	S

Tabla 25

Diámetro de los halos de inhibición que presentaron los antibióticos en el Grupo C.

Microorganismo	Antibiótico	Halo (mm)	Sensibilidad	Observación
Grupo C	Penicilina 10u	33	S	
	Vancomicina 30ug	21	S	
	Cefotaxima 30ug	34	S	
	Clindamicina 2ug	20	R	
	Eritromicina 15ug	6	R	
	Levofloxacin 5ug	22	S	

En el caso del antibiograma del Grupo C se presencia un mecanismo de resistencia denominado metilasa inducible ya que existe la característica D entre la Clindamicina (CTX 30) y la Eritromicina (E 15) como se observa en la imagen de la tabla correspondiente. Este mecanismo a pesar del halo sensible determina resistencia en ambos.

Tabla 26

Diámetro de los halos de inhibición que presentaron los antibióticos en el Grupo G.

Microorganismo	Antibiótico	Halo (mm)	Sensibilidad
Grupo G	Penicilina 10u	33	S
	Vancomicina 30ug	21	S
	Cefotaxima 30ug	30	S
	Clindamicina 2ug	32	S
	Eritromicina 15ug	21	S
	Levofloxacin 5ug	24	S

Destilación del aceite esencial de eucalipto

Se tomó en cuenta la cantidad de aceite esencial (AE) de eucalipto expresado en ml, con respecto al tiempo, y la destilación se reflejó de la siguiente manera:

Tabla 27

Destilación del aceite esencial de eucalipto con respecto al tiempo.

Tiempo (minutos)	AE de eucalipto (ml)
0	0
5	0
10	0
15	1
20	3.25
25	12
30	18
35	23.4
40	28

45	31
50	32
55	32.5
60	34
65	35
70	36
75	38
80	39
85	39
90	39

Las variables tomadas en cuenta durante y al finalizar la extracción del AE de eucalipto se encuentran plasmados en las siguientes tablas y cálculos:

Tabla 28

Parámetros medidos en la extracción de AE de eucalipto.

Medición	Índice de refracción (η_d)	PH Temperatura (19 °C)	Densidad (g/ml)	Densidad (g/ml) teórico
	Temperatura (18 °C)		Muestra extraída	
1	1,459			
2	1,461			
3	1,458	5,032	0,74987	0,921
Promedio	1,4597			

Tabla 29

Datos para determinar la densidad del AE de eucalipto.

Masas	Peso picnómetro	M (g)
M1	Vacío	13.2473
M2	Aceite + recipiente	20,9628

Con los datos de la tabla 29 se procedió a calcular la densidad de la siguiente manera:

$$\delta = \frac{m_2 - m_1}{v}$$

$$\delta = \frac{20,9628 - 13.2473}{10}$$

$$\delta = 0.7463 \text{ g/ml}$$

Para obtener el rendimiento se realizó el cálculo conociendo el dato de la masa de eucalipto (5000g) y el volumen extraído fue de 39ml:

$$m = \delta * v$$

$$m = 0,7463 \text{ g/ml} * 39\text{ml}$$

$$m = 29,11 \text{ g}$$

Destilación del aceite esencial de limón

En la destilación del aceite esencial de limón de igual manera se tomó en cuenta los ml de AE que se obtuvo con respecto al tiempo, lo que reflejó de la siguiente manera:

Tabla 30

Destilación del aceite esencial de limón con respecto al tiempo.

Tiempo (minutos)	AE de eucalipto (ml)
0	0
5	0
10	0

15	1
20	4
25	8
30	15
35	20
40	24
45	28
50	30
55	32
60	35
65	37
70	38
75	39
80	40
85	40
90	40

Las variables tomadas en cuenta durante y al finalizar la se encuentran en las siguientes tablas y cálculos:

Tabla 31

Parámetros medidos en la extracción de AE de limón.

Medición	Índice de refracción (η_d)	PH Temperatura	Densidad (g/ml)	Densidad (g/ml)
	Temperatura (18 °C)	(19 °C)	Muestra extraída	teórico

1	1,458			
2	1,46			
3	1,46	3,54	0,9154	0,95
Promedio	1,459			

Tabla 32

Datos para determinar la densidad del AE de limón.

Masas	Peso picnómetro	M (g)
M1	Vacío	13.189
M2	Aceite + recipiente	19,9828

Con los datos de la tabla 32 se procedió a calcular la densidad aplicando la fórmula de la siguiente manera:

$$\delta = \frac{m2 - m1}{v}$$

$$\delta = \frac{19,9828 - 13.189}{10}$$

$$\delta = 0.6794 \text{ g/ml}$$

Para obtener el rendimiento se realizó el cálculo conociendo que se procedió a destilar 6000g de cascara de limón y el volumen extraído fue de 40ml, se obtuvo la masa del aceite de la siguiente manera:

$$m = \delta * v$$

$$m = 0,6794 \text{ g/ml} * 40\text{ml}$$

$$m = 27,176 \text{ g}$$

Antibiogramas por el método de difusión en agar por discos (Kirby-Bauer)

Los antibiogramas por el método de Kirby-Bauer con los discos impregnados con los diferentes antimicrobianos (AE de eucalipto, AE de limón y miel) a sus distintas concentraciones expresadas en porcentajes (60%, 80% y 100%) y el control positivo correspondiente al disco de Penicilina 10U dieron los siguientes resultados de diámetro (mm) en los halos de inhibición:

Tabla 33

Diámetro de los halos de inhibición que presentó el aceite esencial de eucalipto en el método de Kirby-Bauer.

Aceite esencial de eucalipto					
Microrganismo	%	R1	R2	R3	Control + (P)
<i>S. viridans</i>	60	6	6	6	
	80	6	6	6	30
	100	10	11	10	
<i>S. agalactiae</i>	60	13	14	14	
	80	22	23	23	42
	100	46	46	45	
Grupo C	60	10	10	10	
	80	12	12	11	25
	100	20	20	20	
Grupo G	60	6	6	6	
	80	10	10	11	42
	100	12	12	13	

Tabla 34

Halos de inhibición que presentó el aceite esencial de limón en el método de difusión en agar por discos Kirby-Bauer.

Aceite esencial de limón					
Microrganismo	%	R1	R2	R3	Control + (P)
	60	6	6	6	
<i>S. viridans</i>	80	6	6	6	30
	100	12	12	11	
	60	9	9	9	
<i>S. agalactiae</i>	80	10	12	12	42
	100	20	20	19	
	60	8	8	8	
Grupo C	80	10	10	10	25
	100	12	13	12	
	60	6	6	6	
Grupo G	80	10	10	10	42
	100	13	13	13	

Tabla 35

Diámetro de los halos de inhibición que presentó la miel en el método Kirby-Bauer.

Miel					
Microrganismo	%	R1	R2	R3	Control + (P)
	60	6	6	6	
<i>S. viridans</i>	80	6	6	6	30
	100	8	9	9	

	60	8	8	8	
<i>S. agalactiae</i>	80	9	10	9	42
	100	12	11	12	
	60	6	6	6	
Grupo C	80	6	6	6	25
	100	6	7	7	
	60	6	6	6	
Grupo G	80	6	6	6	42
	100	8	8	8	

Antibiogramas por el método de difusión en agar por pozos

Los antibiogramas por el método de difusión en agar por pozos llenos de los antimicrobianos y el control positivo para el cual se puso un disco de Penicilina 10U dieron los siguientes resultados de halos de inhibición:

Tabla 36

Diámetro de los halos de inhibición que presentó el aceite esencial de eucalipto en el método de difusión en agar por pozos.

Aceite esencial de eucalipto					
Microrganismo	%	R1	R2	R3	Control + (P)
	60	6	6	6	
<i>S. viridans</i>	80	9	9	10	34
	100	17	18	17	
	60	26	25	26	
<i>S. agalactiae</i>	80	39	40	40	46
	100	48	48	48	

	60	14	14	13	
Grupo C	80	17	16	16	37
	100	33	32	32	
	60	9	9	10	
Grupo G	80	15	15	14	35
	100	21	22	22	

Tabla 37

Diámetro de los halos de inhibición que presentó el aceite esencial de limón en el método de difusión en agar por pozos.

Aceite esencial de limón					
Microrganismo	%	R1	R2	R3	Control + (P)
	60	6	6	6	
<i>S. viridans</i>	80	6	6	6	34
	100	14	15	14	
	60	16	15	16	
<i>S. agalactiae</i>	80	30	29	30	46
	100	39	40	40	
	60	13	12	12	
Grupo C	80	14	13	13	37
	100	18	19	18	
	60	6	6	6	
Grupo G	80	14	13	14	35
	100	16	17	17	

Tabla 38

Diámetro de los halos de inhibición que presentó la miel en el método de difusión en agar por pozos.

Miel					
Microorganismo	%	R1	R2	R3	Control + (P)
	60	6	6	6	
<i>S. viridans</i>	80	10	10	11	34
	100	17	17	16	
	60	14	14	15	
<i>S. agalactiae</i>	80	18	19	18	46
	100	21	20	21	
	60	6	6	6	
Grupo C	80	6	6	6	37
	100	10	10	11	
	60	6	6	6	
Grupo G	80	6	6	6	35
	100	11	11	10	

CMI

La turbidez de los tubos reflejó si existe o no actividad inhibitoria según su turbidez por medio de una comparación visual de los tubos que contienen la bacteria más antimicrobianos a distintas concentraciones (%) con el control negativo de inhibición que fue el tubo de turbidez a 0.5 de la escala estándar de McFarland y con el control de positivo que corresponde al tubo con antibiótico en lugar de antimicrobiano, los resultados se reflejan de la siguiente manera:

Tabla 39

Actividad inhibitoria del AE de eucalipto.

Aceite esencial de eucalipto				
Microorganismo	%	CMI	C+	C-
	60	+	+	-
<i>S. viridans</i>	80	+	+	-
	100	+	+	-
	60	+	+	-
<i>S. agalactiae</i>	80	+	+	-
	100	+	+	-
	60	+	+	-
Grupo C	80	+	+	-
	100	+	+	-
	60	+	+	-
Grupo G	80	+	+	-
	100	+	+	-

Nota. Inhibe (+), no inhibe (-).

Se considera que desde una concentración al 60% del aceite esencial de eucalipto tiene un potencial inhibitorio en cuanto a la comparación de turbidez en los cuatro microorganismos analizados, la concentración mínima inhibitoria es del 60% siendo esa la menor concentración que se analizó.

Tabla 40

Actividad inhibitoria del AE de limón.

Aceite esencial de limón				
Microorganismo	%	CMI	C+	C-

	60	+	+	-
<i>S. viridans</i>	80	+	+	-
	100	+	+	-
	60	-	+	-
<i>S. agalactiae</i>	80	+	+	-
	100	+	+	-
	60	+	+	-
Grupo C	80	+	+	-
	100	+	+	-
	60	+	+	-
Grupo G	80	+	+	-
	100	+	+	-

Nota. Inhibe (+), no inhibe (-).

Se considera que desde una concentración al 60% del aceite esencial de eucalipto tiene un potencial inhibitorio en tres de los cuatro microorganismos probados por lo que en *S. viridans*, Grupo C y Grupo G, la CMI es del 60% siendo esa la menor concentración que se probó. En cuanto al *S. agalactiae* la concentración mínima inhibitoria es del 80% por la presencia de turbidez en la concentración más baja.

Tabla 41

Actividad inhibitoria de la miel.

Miel				
Microorganismo	%	CMI	C+	C-
	60	-	+	-
<i>S. viridans</i>	80	-	+	-
	100	+	+	-

	60	-	+	-
<i>S. agalactiae</i>	80	-	+	-
	100	+	+	-
	60	-	+	-
Grupo C	80	-	+	-
	100	+	+	-
	60	-	+	-
Grupo G	80	-	+	-
	100	+	+	-

Nota. Inhibe (+), no inhibe (-).

Se considera que desde una concentración del 100% de la miel tiene un potencial inhibitorio en los cuatro microorganismos probados, la CMI es del 100% siendo esa la mayor y la concentración pura que se analizó.

CMB

El crecimiento bacteriano de la siembra de los tubos resultantes de la prueba que determinó la concentración mínima inhibitoria junto con el control positivo que es la siembra de la bacteria y el control negativo de crecimiento que es la bacteria con el antibiótico dieron los siguientes resultados:

Tabla 42

Actividad bactericida del AE de eucalipto.

Aceite esencial de eucalipto				
Microorganismo	%	CMB	C+	C-
	60	+	+	-
<i>S. viridans</i>	80	+	+	-
	100	+	+	-

	60	+	+	-
<i>S. agalactiae</i>	80	+	+	-
	100	+	+	-
	60	+	+	-
Grupo C	80	+	+	-
	100	+	+	-
	60	+	+	-
Grupo G	80	+	+	-
	100	+	+	-

Nota. No existe crecimiento (+), existe crecimiento (-).

Se considera que desde una concentración del 60% del aceite esencial de eucalipto tiene un potencial bactericida en los cuatro microorganismos analizados.

Tabla 43

Actividad bactericida del AE de limón.

Aceite esencial de limón				
Microorganismo	%	CMB	C+	C-
	60	+	+	-
<i>S. viridans</i>	80	+	+	-
	100	+	+	-
	60	+	+	-
<i>S. agalactiae</i>	80	+	+	-
	100	+	+	-
	60	+	+	-
Grupo C	80	+	+	-
	100	+	+	-

	60	+	+	-
Grupo G	80	+	+	-
	100	+	+	-

Nota. No existe crecimiento (+), existe crecimiento (-).

Se considera que desde una concentración del 60% del aceite esencial de limón se tiene un potencial bactericida en los cuatro microorganismos analizados, ya que no presentan crecimiento, la CMB es del 60% siendo esa la menor concentración que se sembró.

Tabla 44

Actividad bactericida de la miel.

Miel				
Microorganismo	%	CMB	C+	C-
	60	-	+	-
<i>S. viridans</i>	80	+	+	-
	100	+	+	-
	60	-	+	-
<i>S. agalactiae</i>	80	+	+	-
	100	+	+	-
	60	+	+	-
Grupo C	80	+	+	-
	100	+	+	-
	60	+	+	-
Grupo G	80	+	+	-
	100	+	+	-

Nota. No existe crecimiento (+), existe crecimiento (-).

Se considera que desde una concentración del 60% de la miel se tiene un potencial bactericida en el Grupo C y Grupo G, ya que no presenta crecimiento, la CMB es del 60% siendo esa la menor concentración que se sembró. En el caso de *S. viridans* y *S. agalactiae* la CMB es del 80% ya que la menor concentración sembrada presentó crecimiento.

Análisis de varianza

Análisis de varianza para la inhibición por el método Kirby-Bauer

Tabla 45

ANOVA de los datos obtenidos en el método Kirby-Bauer.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
<i>A:Streptococcus</i>	1416,33	3	472,111	2974,30	0,0000
<i>B:Antimicrobiano</i>	943,722	2	471,861	2972,73	0,0000
<i>C:Concetración</i>	1064,22	2	532,111	3352,30	0,0000
<i>D:Replica</i>	0,888889	2	0,444444	2,80	0,0676
INTERACCIONES					
<i>AB</i>	942,056	6	157,009	989,16	0,0000
<i>AC</i>	429,778	6	71,6296	451,27	0,0000
<i>BC</i>	377,722	4	94,4306	594,91	0,0000
<i>ABC</i>	433,833	12	36,1528	227,76	0,0000
<i>RESIDUOS</i>	11,1111	70	0,15873		
<i>TOTAL</i>					
<i>(CORREGIDO)</i>	5619,67	107			

El ANOVA del método de Kirby-Bauer descompone la variabilidad del diámetro medido en el halo de inhibición en contribuciones debidas a varios factores. Los valores-P prueban la significancia, debido a que 7 valores de este apartado son menores que 0,05, estos factores tienen efecto estadísticamente significativo sobre el halo de inhibición con un 95% de nivel de confianza. Por lo que resulta que se encuentra diferencia altamente significativa entre los *Streptococcus* (Factor A), los antimicrobianos (Factor B) y las concentraciones (Factor C). Así mismo en el efecto que ocasione el *Streptococcus* en el tipo de antimicrobiano (interacción AB), en las concentraciones (interacción AC), y el antimicrobiano con el porcentaje de concentración (interacción BC), por último el *Streptococcus* con el tipo de antimicrobiano y la concentración (interacción ABC). En cuanto a las réplicas no se encontró diferencia significativa lo que refleja normalidad en los datos y replicas.

Análisis de varianza para la inhibición de pozos

Tabla 46

ANOVA de los datos obtenidos en el método de inhibición por pozos.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: <i>Streptococcus</i>	5359,36	3	1786,45	7237,72	0,0000
B:Antimicrobiano	1881,06	2	940,528	3810,50	0,0000
C:Concetración	2468,72	2	1234,36	5000,95	0,0000
D:Replica	0,0555556	2	0,0277778	0,11	0,8937
INTERACCIONES					
AB	1018,5	6	169,75	687,73	0,0000
AC	319,056	6	53,1759	215,44	0,0000
BC	290,389	4	72,5972	294,12	0,0000

ABC	300,5	12	25,0417	101,45	0,0000
RESIDUOS	17,2778	70	0,246825		
TOTAL (CORREGIDO)	11654,9	107			

El ANOVA para el método de inhibición por pozos descompone la variabilidad del diámetro medido en el halo de inhibición en contribuciones debidas a varios factores. Los valores-P prueban la significancia, ya que 7 valores de este apartado son menores que 0,05, por lo que estos factores tienen efecto estadísticamente significativo sobre el halo de inhibición con un 95% de nivel de confianza. Por lo que resulta que se encuentra diferencia altamente significativa entre los *Streptococcus* (Factor A), los antimicrobianos (Factor B) y las concentraciones (Factor C). Así mismo en el efecto que ocasione el *Streptococcus* en el tipo de antimicrobiano (interacción AB), en las concentraciones (interacción AC), y el antimicrobiano con el porcentaje de concentración (interacción BC), por último el *Streptococcus* con el tipo de antimicrobiano y la concentración (interacción ABC). En cuanto a las réplicas no se encontró diferencia significativa lo que refleja normalidad en los datos y replicas.

Prueba de Tukey para la evaluación de los factores

Resultados de la evaluación de los diferentes Streptococcus (Factor A) por el método de Kirby-Bauer

Para todas las pruebas de significancia en la evaluación de los factores de manera individual se utilizó el programa STATISTICA por el cual se obtuvieron los siguientes resultados, tanto tablas como gráficos en los análisis de las pruebas de Tukey con un 95% de nivel de confianza.

Tabla 47

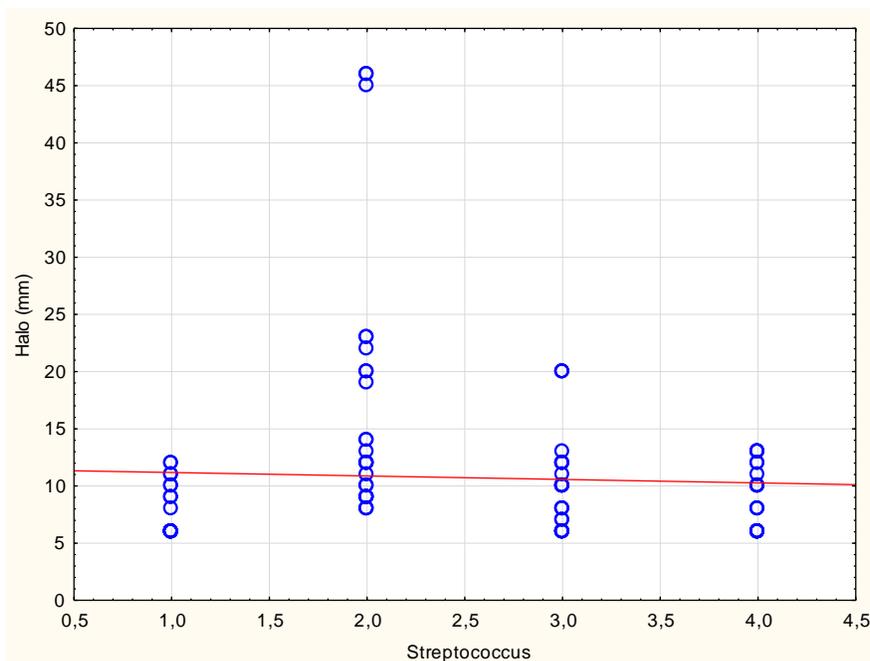
Prueba de Tukey de la evaluación del Factor A en el método de Kirby-Bauer.

Streptococcus	Halo (mm) Media	Grupos Homogéneos
1	7,40741	X
4	8,62963	X
3	10,0741	X
2	16,7778	X

Se establece la formación de 4 grupos homogéneos, determinando que el *Streptococcus* número 1 (*S. viridans*) es el que obtuvo los diámetros de inhibición más pequeños con una media de 7,407 mm, por otro lado, el *Streptococcus* número 2 (*S. agalactiae*) obtuvo los diámetros de inhibición más grandes con una media de 16,778 mm, siendo así el *S. agalactiae* el microorganismo donde se desarrolló más actividad antimicrobiana.

Figura 1

Gráfico de los diámetros de inhibición obtenido con el Factor A en el método de Kirby-Bauer.



En la Figura 1 se muestra que el *Streptococcus* número 2 que corresponde al *Streptococcus agalactiae* presentó los diámetros más grandes en los halos de inhibición.

Resultados de la evaluación de los antimicrobianos (Factor B) por el método de Kirby-Bauer

Tabla 48

Prueba de Tukey de la evaluación del Factor B en el método de Kirby-Bauer.

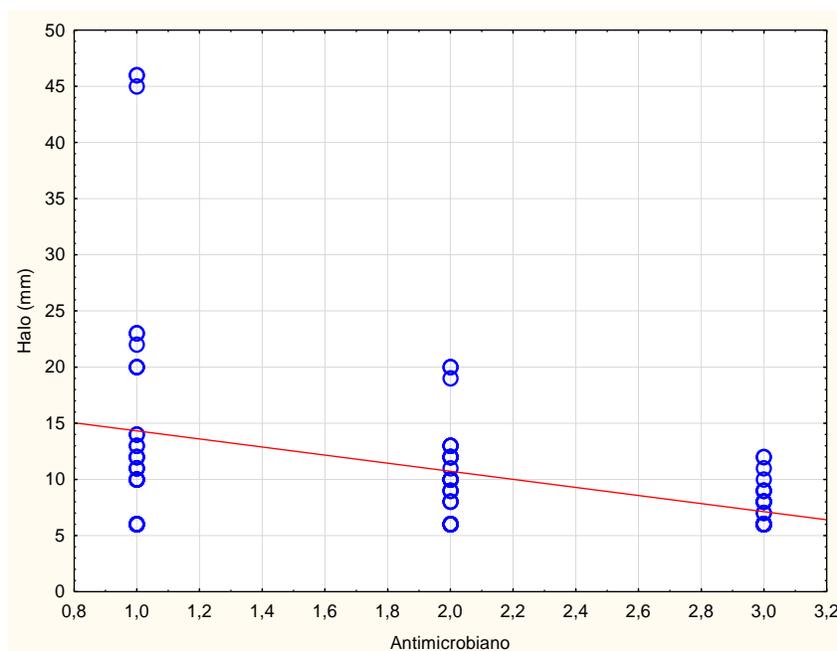
Antimicrobiano	Halo (mm) Media	Grupos Homogéneos
3	7,36111	X
2	10,25	X
1	14,5556	X

Se establece la formación de 3 grupos homogéneos, determinando que el antimicrobiano número 3 (miel) es el que obtuvo los diámetros de inhibición más pequeños con

una media de 7,361 mm, por otro lado, el antimicrobiano número 1 (aceite esencial de eucalipto) obtuvo los diámetros de inhibición más grandes con una media de 14,556 mm, siendo así el aceite esencial de eucalipto el antimicrobiano donde se desarrolló más actividad inhibitoria.

Figura 2

Gráfico de los diámetros de inhibición obtenido con el Factor B en el método de Kirby-Bauer.



En la Figura 2 se muestra que el antimicrobiano número 1 correspondiente al aceite esencial de eucalipto presentó los diámetros más grandes en los halos de inhibición.

Resultados de la evaluación de distintas concentraciones (Factor C) por el método de Kirby-Bauer

Tabla 49

Prueba de Tukey de la evaluación del Factor C en el método de Kirby-Bauer.

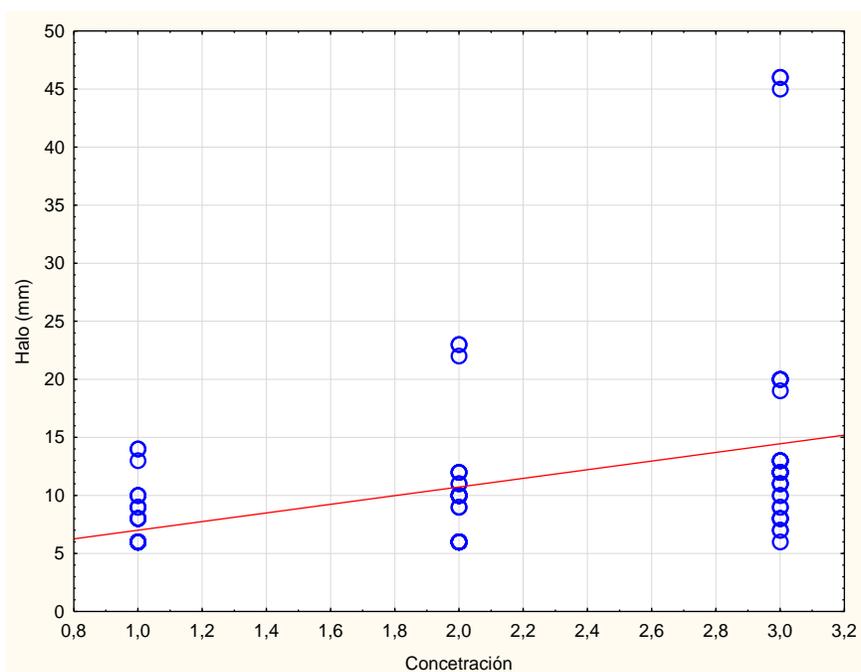
Concentración	Halo (mm) Media	Grupos Homogéneos
1	7,55556	X
2	9,61111	X

3	15,0	X
---	------	---

Se establece la formación de 3 grupos homogéneos, determinando que la concentración número 1 (60%) es la que obtuvo los diámetros de inhibición más pequeños con una media de 7,556 mm, por otro lado, la concentración número 3 (100%) obtuvo los diámetros de inhibición más grandes con una media de 15,000 mm, siendo así 100% la concentración donde se desarrolló más actividad inhibitoria.

Figura 3

Gráfico de los diámetros de inhibición obtenido con el Factor C en el método de Kirby-Bauer.



En la Figura 3 se muestra que la concentración número 3 correspondiente al 100% es la que presentó los diámetros más grandes en los halos de inhibición.

Resultados de la evaluación de los diferentes *Streptococcus* (Factor A) por el método de inhibición por pozos

Al igual que con el método anterior, se utilizó el mismo programa estadístico para realizar la prueba de significancia para el método de inhibición por pozos en los análisis de las pruebas de Tukey con un 95% de nivel de confianza.

Tabla 50

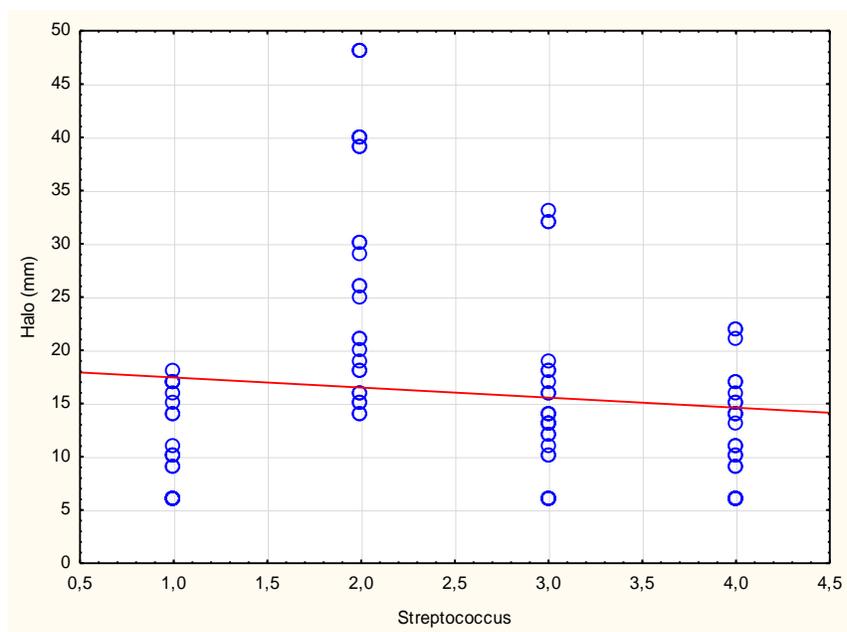
Prueba de Tukey de la evaluación del Factor A en el método de inhibición por pozos.

<i>Streptococcus</i>	Halo (mm) Media	Grupos Homogéneos
1	10,22222	X
4	11,62963	X
3	14,29630	X
2	27,96296	X

Se establece la formación de 4 grupos homogéneos, determinando que el *Streptococcus* número 1 (*S. viridans*) es la que obtuvo los diámetros de inhibición más pequeños con una media de 10,222 mm, por otro lado, el *Streptococcus* número 2 (*S. agalactiae*) obtuvo los diámetros de inhibición más grandes con una media de 15,000 mm, siendo así el *S. agalactiae* el microorganismo donde se desarrolló más actividad antimicrobiana.

Figura 4

Gráfico de los diámetros de inhibición obtenido con el Factor A en el método de pozos.



En la Figura 4 se muestra que en efecto el *Streptococcus* número 2 correspondiente al *S. agalactiae* presentó los diámetros más grandes en los halos de inhibición.

Resultados de la evaluación de los antimicrobianos (Factor B) por el método de inhibición por pozos

Tabla 51

Prueba de Tukey de la evaluación del Factor B en el método de inhibición por pozos.

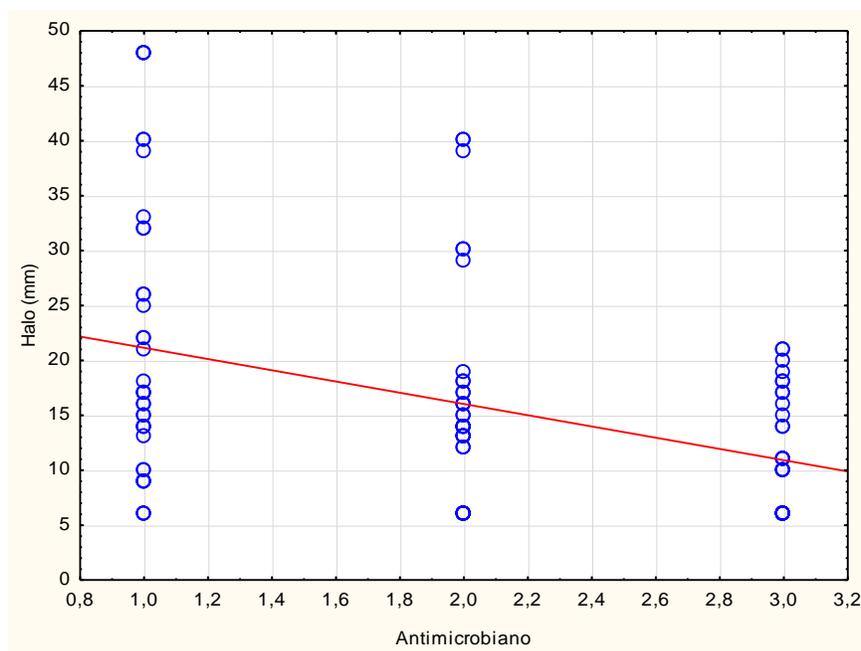
Antimicrobiano	Halo (mm) Media	Grupos Homogéneos
3	10,94444	X
2	15,97222	X
1	21,16667	X

Se establece la formación de 3 grupos homogéneos, determinando que el antimicrobiano número 3 (miel) es el que obtuvo los diámetros de inhibición más pequeños con una media de 10,944 mm, por otro lado, el antimicrobiano número 1 (aceite esencial de

eucalipto) obtuvo los diámetros de inhibición más grandes con una media de 21,167 mm, siendo así el aceite esencial de eucalipto el antimicrobiano donde se desarrolló más actividad inhibitoria.

Figura 5

Gráfico de los diámetros de inhibición obtenido con el Factor B en el método de pozos.



En la Figura 5 se muestra que el antimicrobiano número 1 correspondiente al aceite esencial de eucalipto presentó los diámetros más grandes en los halos de inhibición.

Resultados de la evaluación de distintas concentraciones (Factor C) por el método de inhibición por pozos

Tabla 52

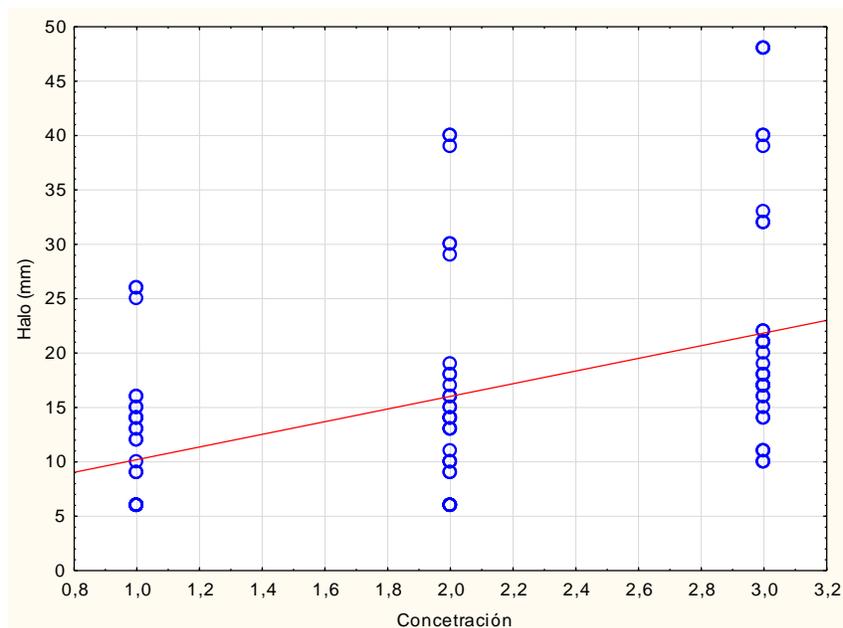
Prueba de Tukey de la evaluación del Factor C en el método de inhibición por pozos.

Concentración	Halo (mm) Media	Grupos Homogéneos
1	10,58333	X
2	15,27778	X
3	22,22222	X

Se establece la formación de 3 grupos homogéneos, determinando que la concentración número 1 (60%) es la que obtuvo los diámetros de inhibición más pequeños con una media de 10,583 mm, por otro lado, la concentración número 3 (100%) obtuvo los diámetros de inhibición más grandes con una media de 22,222 mm, siendo así 100% la concentración donde se desarrolló más actividad inhibitoria.

Figura 6

Gráfico de los diámetros de inhibición obtenido con el Factor C en el método de pozos.



En la Figura 6 se muestra que la concentración número 3 correspondiente al 100% es la que presentó los diámetros más grandes en los halos de inhibición.

Pruebas de Tukey para evaluar las interacciones significativas en la actividad antimicrobiana

Se utilizó el mismo programa estadístico (STATISTICA) para realizar las pruebas de significancia para las interacciones dobles y triples entre los factores estudiados en los análisis de las pruebas de Tukey con un 95% de nivel de confianza.

Análisis Tukey aplicado en la interacción A*B (*Streptococcus* + Antimicrobianos)

por el método de Kirby-Bauer

Tabla 53

Prueba de Tukey de la evaluación de la interacción del Factor A x Factor B en el método de Kirby-Bauer.

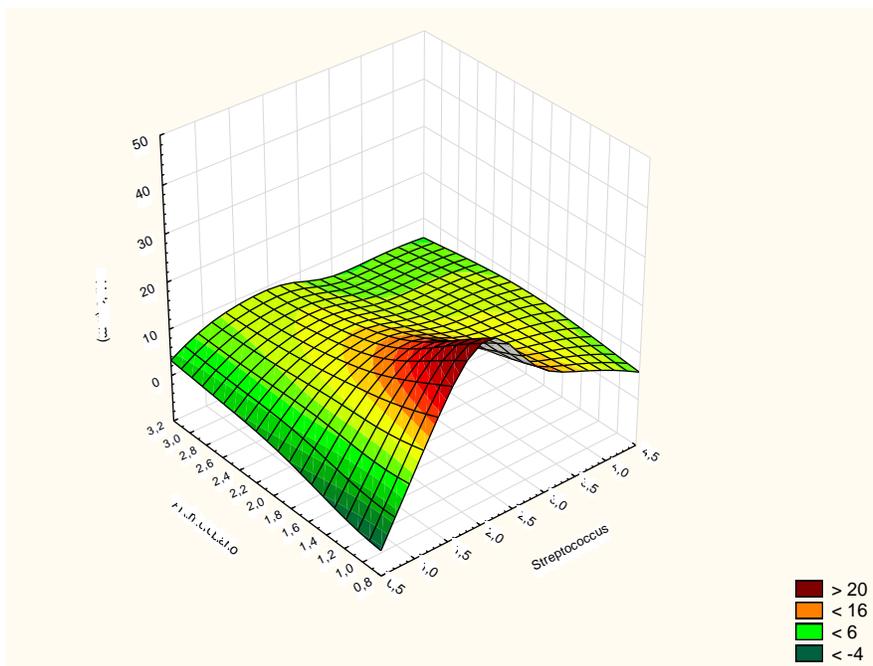
<i>Streptococcus</i>	Antimicrobiano	Halo (mm)	Grupos Homogéneos		
3	3	6,22222	X		
4	3	6,66667	X	X	
1	3	6,88889	X	X	
1	1	7,44444		X	X
1	2	7,88889			X
4	1	9,55556			X
4	2	9,66667			X
2	3	9,66667			X
3	2	10,11111			X
2	2	13,33333			X
3	1	13,88889			X
2	1	27,33333			X

Se establece la formación de 7 grupos homogéneos, determinando que la que la combinación del *Streptococcus* número 3 (Grupo C) junto con el antimicrobiano número 3 (miel) forman los halos de inhibición más pequeños obteniendo una media de 6,222 mm, mientras que la combinación del *Streptococcus* número 2 (*S. agalactiae*) con el antimicrobiano número 1 (AE de eucalipto) forman los halos de inhibición más grandes obteniendo una media de 27,333

mm. Por lo que la mejor combinación de estos dos factores es la obtenida por el microorganismo *S. agalactiae* con el antimicrobiano aceite esencial de eucalipto.

Figura 7

Gráfico de los diámetros de inhibición obtenido con en la interacción del Factor A x Factor B en el método de Kirby-Bauer.



En la figura 7 correspondiente a un gráfico de superficie se puede observar los resultados de la interacción entre el Factor A (*Streptococcus*) y el Factor B (Antimicrobiano), donde se detalla por colores los resultados de los diámetros de inhibición de la interacción desde los halos más pequeños teniendo tonalidad verde oscuro hasta los halos más grandes con tonalidad roja, teniendo un rango desde < -4 hasta > 20. Reafirmando por su tonalidad fuerte en color rojo que la interacción con halos de inhibición más grandes es la del microorganismo *Streptococcus agalactiae* con el antimicrobiano correspondiente al aceite esencial de eucalipto.

Análisis Tukey aplicado en la interacción A*C (*Streptococcus* + Concentración)

por el método de Kirby-Bauer

Tabla 54

Prueba de Tukey de la evaluación de la interacción del Factor A x Factor C en el método de Kirby-Bauer.

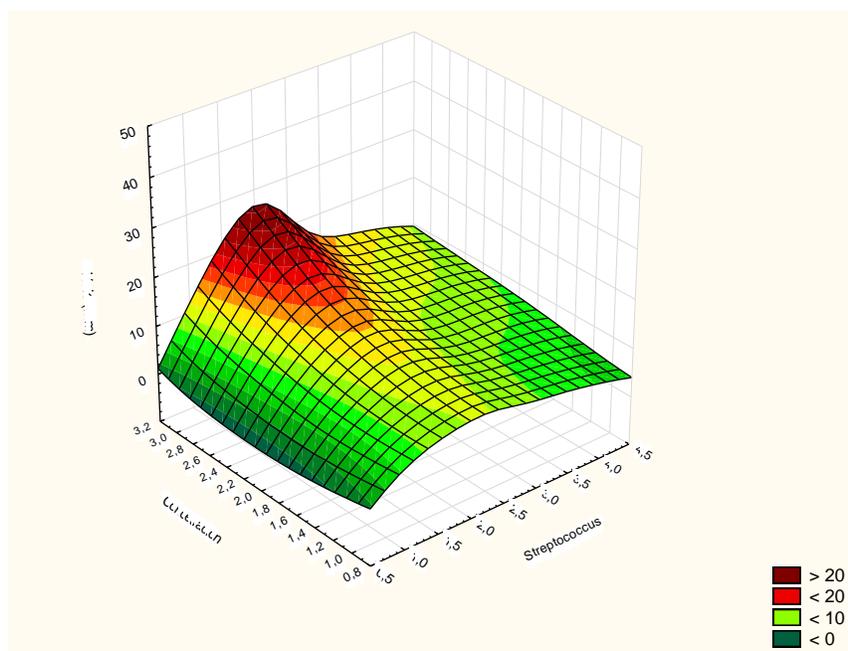
<i>Streptococcus</i>	Concentración	Halo (mm) Media	Grupos Homogéneos
1	2	6,00000	X
4	1	6,00000	X
1	1	6,00000	X
3	1	8,00000	X
4	2	8,77778	X
3	2	9,22222	X
2	1	10,22222	X
1	3	10,22222	X
4	3	11,11111	X
3	3	13,00000	X
2	2	14,44444	X
2	3	25,66667	X

Se establece la formación de 8 grupos homogéneos, determinando que la que la combinación del *Streptococcus* número 1 (*S. viridans*) junto con la concentración numero 2 (80%), del *Streptococcus* número 4 (Grupo G) con la concentración número 1 (60%) y el *Streptococcus* número 1 (*S. viridans*) con la concentración número 1 (60%), forman los halos de inhibición más pequeños obteniendo una media de 6,000 mm en los tres casos, mientras que la combinación del *Streptococcus* número 2 (*S. agalactiae*) con la concentración número 3

(100%) forman los halos de inhibición más grandes obteniendo una media de 25,667 mm. Por lo que la mejor combinación de estos dos factores es la obtenida por el microorganismo *S. agalactiae* con la concentración de 100%.

Figura 8

Gráfico de los diámetros de inhibición obtenido con en la interacción del Factor A x Factor C en el método de Kirby-Bauer.



En la figura 8 correspondiente a un gráfico de superficie se puede observar los resultados de la interacción entre el Factor A (*Streptococcus*) y el Factor C (Concentración), donde se detalla por colores los resultados de los diámetros de inhibición desde los más pequeños teniendo tonalidad verde oscuro hasta el más alto con tonalidad roja, teniendo un rango desde < 0 hasta > 20. Reafirmando por su tonalidad fuerte en color rojo que la interacción con halos más grandes es la del microorganismo *S. agalactiae* la concentración de 100%.

Análisis Tukey aplicado en la interacción B*C (Antimicrobiano + Concentración)

por el método de Kirby-Bauer

Tabla 55

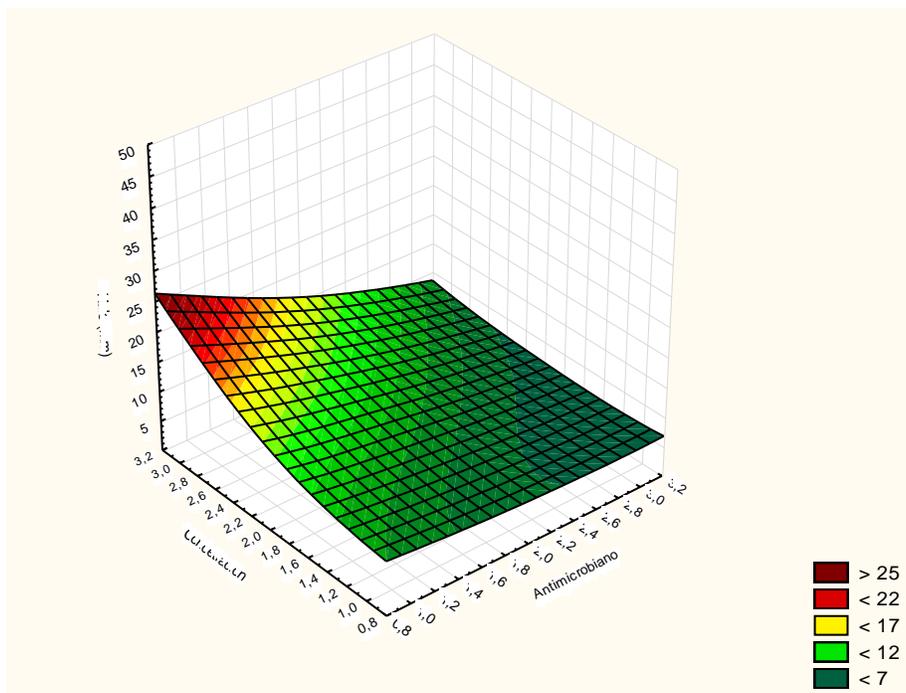
Prueba de Tukey de la evaluación de la interacción del Factor B x Factor C en el método de Kirby-Bauer.

Antimicrobiano	Concentración	Halo (mm)	Media	Grupos homogéneos
3	1	6,50000		X
3	2	6,83333		X X
2	1	7,25000		X
3	3	8,75000		X
1	1	8,91667		X X
2	2	9,33333		X
1	2	12,66667		X
2	3	14,16667		X
1	3	22,08333		X

Se establece la formación de 7 grupos homogéneos, determinando que la combinación del antimicrobiano número 3 (miel) junto con el número 1 (60%) forman los halos de inhibición más pequeños obteniendo una media de 6.5 mm, mientras que la combinación del antimicrobiano número 1 (AE de eucalipto) con la concentración número 3 (100%) forman los halos de inhibición más grandes obteniendo una media de 22.08 mm. Por lo que la mejor combinación de estos dos factores es la obtenida por el aceite esencial de eucalipto a una concentración del 100%.

Figura 9

Gráfico de los diámetros de inhibición obtenido con en la interacción del Factor B x Factor C en el método de Kirby-Bauer.



En la figura 9 correspondiente a un gráfico de superficie se puede observar los resultados de la interacción entre el Factor B (Antimicrobiano) y el Factor C (Concentración), donde se detalla por colores los resultados de los diámetros de inhibición desde los más pequeños teniendo tonalidad verde oscuro hasta el más alto con tonalidad roja, teniendo un rango desde < 7 hasta > 25. Reafirmando por su tonalidad fuerte en color rojo que la interacción con halos más grandes es la del aceite esencial de eucalipto a una concentración de 100%.

Análisis Tukey aplicado en la interacción A*B*C (Streptococcus + Antimicrobiano + Concentración) por el método de Kirby-Bauer

Tabla 56

Prueba de Tukey de la evaluación de la interacción del Factor A x Factor B x Factor C en el método de Kirby-Bauer.

A	B	C	Hallo (mm)	Media	Grupos homogéneos
1	1	1	6,00000	X	
1	1	2	6,00000	X	
4	3	2	6,00000	X	
1	2	1	6,00000	X	
1	2	2	6,00000	X	
4	3	1	6,00000	X	
1	3	1	6,00000	X	
1	3	2	6,00000	X	
4	2	1	6,00000	X	
4	1	1	6,00000	X	
3	3	2	6,00000	X	
3	3	1	6,00000	X	
3	3	3	6,66667	X	
3	2	1	8,00000	X	
4	3	3	8,00000	X	
2	3	1	8,00000	X	
1	3	3	8,66667	X	X
2	2	1	9,00000	X	X X
2	3	2	9,33333	X	X X X

3	1	1	10,00000	X	X		
4	2	2	10,00000	X	X		
3	2	2	10,00000	X	X		
4	1	2	10,33333		X	X	
1	1	3	10,33333		X	X	
2	2	2	11,33333			X	X
3	1	2	11,66667			X	
2	3	3	11,66667			X	
1	2	3	11,66667			X	
3	2	3	12,33333			X	X
4	1	3	12,33333			X	X
4	2	3	13,00000			X	X
2	1	1	13,66667			X	
2	2	3	19,66667				X
3	1	3	20,00000				X
2	1	2	22,66667				X
2	1	3	45,66667				X

Se establece la formación de 12 grupos homogéneos, determinando que las primeras 13 combinaciones correspondientes al primer grupo homogéneo de la interacción de los tres factores (*Streptococcus* x Antimicrobiano x Concentración) forman los halos de inhibición más pequeños obteniendo una media que va desde 6.00 mm hasta 6.66 mm, por otro lado la combinación *Streptococcus* número 2 (*S. agalactiae*) con el antimicrobiano número 1 (aceite esencial de eucalipto) junto con la concentración número 3 (100%) forman los halos de inhibición más grandes obteniendo una media de 45.66 mm. Por lo que la mejor combinación

de estos tres factores es la obtenida por el microorganismo *Streptococcus agalactiae*, el aceite esencial de eucalipto y una concentración del 100%.

Análisis Tukey aplicado en la interacción A*B (*Streptococcus* + Antimicrobianos)
por el método de inhibición por pozos

Tabla 57

Prueba de Tukey de la evaluación de la interacción del Factor A x Factor B en el método de inhibición por pozos.

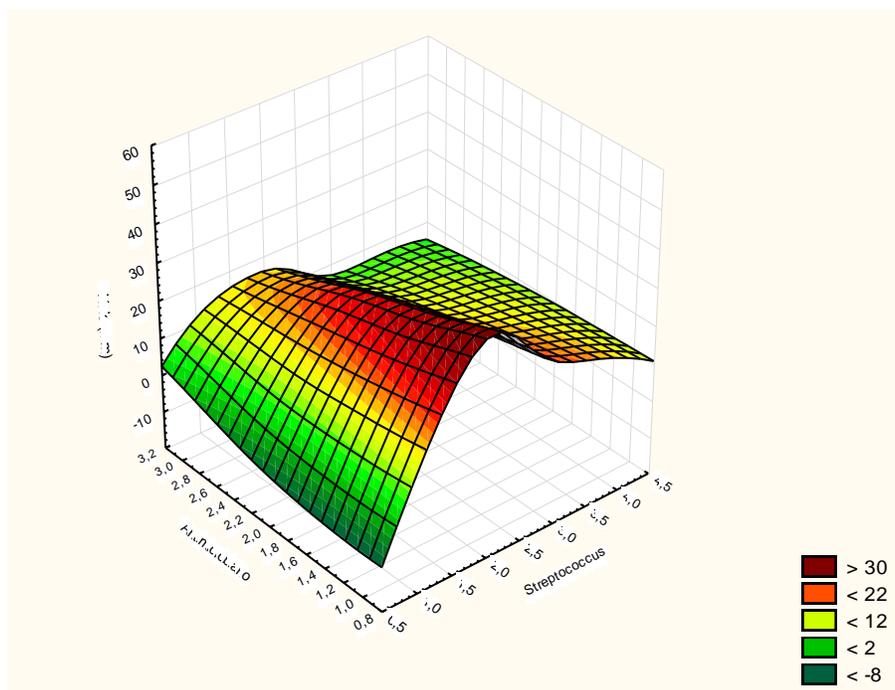
<i>Streptococcus</i>	Antimicrobiano	Halo (mm)	Media	Grupos Homogéneos
3	3	7,44444	X	
4	3	7,55556	X	
1	2	8,77778	X	
1	1	10,88889	X	
1	3	11,00000	X	
4	2	12,11111	X	
3	2	14,66667	X	
4	1	15,22222	X	
2	3	17,77778	X	
3	1	20,77778	X	
2	2	28,33333	X	
2	1	37,77778	X	

Se establece la formación de 9 grupos homogéneos, determinando que la combinación del *Streptococcus* número 3 (Grupo C) junto con el antimicrobiano número 3 (miel) y *Streptococcus* número 4 (Grupo G) junto con el antimicrobiano número 3 (miel) forman los halos de inhibición más pequeños obteniendo una media 7.44 mm y 7.55 mm respectivamente,

mientras que la combinación del *Streptococcus* número 2 (*S. agalactiae*) con el antimicrobiano número 1 (AE de eucalipto) forman los halos de inhibición más grandes obteniendo una media de 37.77 mm. Por lo que la mejor combinación de estos dos factores es la obtenida por el microorganismo *S. agalactiae* con el antimicrobiano AE de eucalipto.

Figura 10

Gráfico de los diámetros de inhibición obtenido con en la interacción del Factor A x Factor B en el método de pozos.



En la figura 10 correspondiente a un gráfico de superficie se puede observar los resultados de la interacción entre el Factor A (*Streptococcus*) y el Factor B (Antimicrobiano), donde se detalla por colores los resultados de los diámetros de inhibición desde los más pequeños teniendo tonalidad verde oscuro hasta el más alto con tonalidad roja, teniendo un rango desde <-4 hasta > 20. Reafirmando por su tonalidad fuerte en color rojo que la interacción con halos más grandes es la del microorganismo *S. agalactiae* con el antimicrobiano AE de eucalipto.

**Análisis Tukey aplicado en la interacción A*C (*Streptococcus* + Concentración)
por el método de inhibición por pozos**

Tabla 58

Prueba de Tukey de la evaluación de la interacción del Factor A x Factor C en el método de inhibición por pozos.

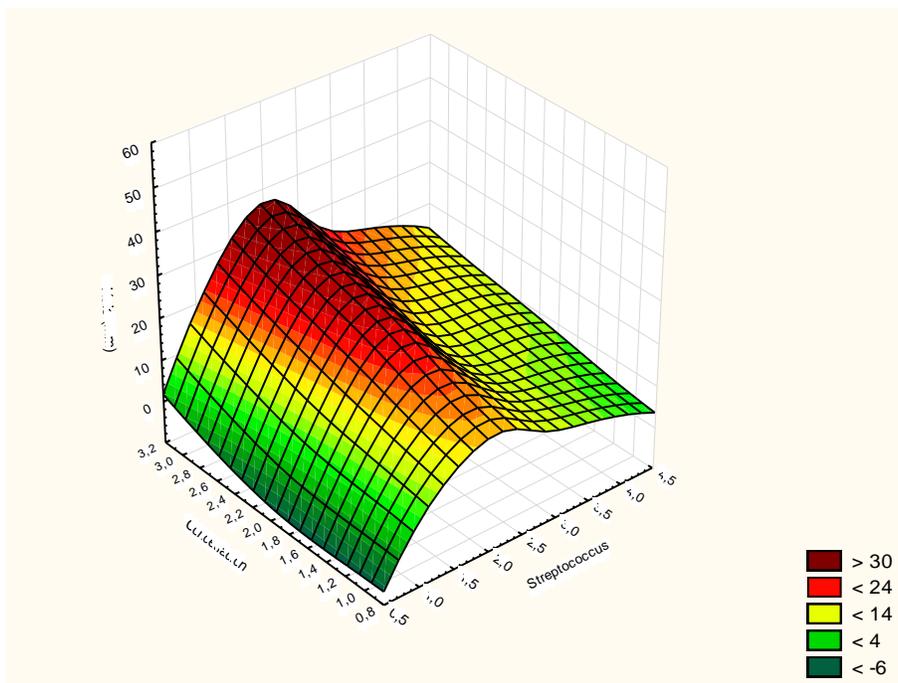
<i>Streptococcus</i>	Concentración	Hale (mm) Media	Grupos Homogéneos
1	1	6,00000	X
4	1	7,11111	X
1	2	8,55556	X
3	1	10,66667	X
4	2	11,44444	X X
3	2	11,88889	X
1	3	16,11111	X
4	3	16,33333	X
2	1	18,55556	X
3	3	20,33333	X
2	2	29,22222	X
2	3	36,11111	X

Se establece la formación de 10 grupos homogéneos, determinando que la combinación del *Streptococcus* número 1 (*S. viridans*) junto con la concentración número 1 (80) forman los halos de inhibición más pequeños obteniendo una media de 6.00 mm, mientras que la combinación del *Streptococcus* número 2 (*S. agalactiae*) con la concentración número 3 (100%) forman los halos de inhibición más grandes obteniendo una media de 35.11 mm. Por lo que la

mejor combinación de estos dos factores es la obtenida por el microorganismo *S. agalactiae* con la concentración de 100%.

Figura 11

Gráfico de los diámetros de inhibición obtenido con en la interacción del Factor A x Factor C en el método de pozos.



En la figura 11 correspondiente a un gráfico de superficie se puede observar los resultados de la interacción entre el Factor A (*Streptococcus*) y el Factor C (Concentración), donde se detalla por colores los resultados de los diámetros de inhibición desde los más pequeños teniendo tonalidad verde oscuro hasta el más alto con tonalidad roja, teniendo un rango desde < -8 hasta > 30. Reafirmando por su tonalidad fuerte en color rojo que la interacción con halos más grandes es la del microorganismo *S. agalactiae* la concentración de 100%.

Análisis Tukey aplicado en la interacción B*C (Antimicrobiano + Concentración)

por el método de inhibición por pozos

Tabla 59

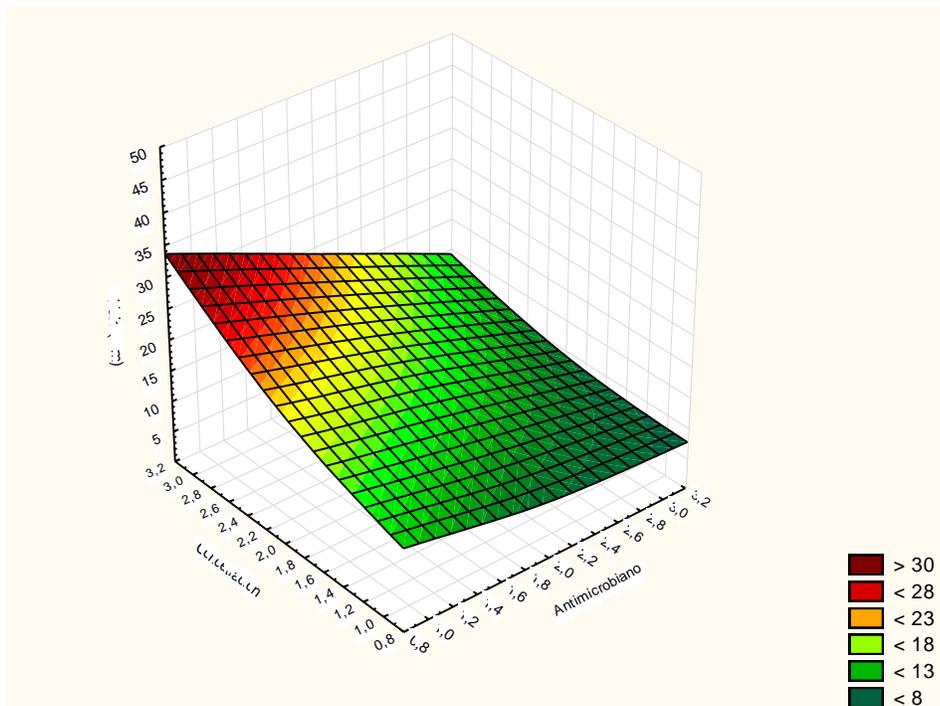
Prueba de Tukey de la evaluación de la interacción del Factor B x Factor C en el método de inhibición por pozos.

Antimicrobiano	Concentración	Halo (mm) Media	Grupos Homogéneos
3	1	8,08333	X
2	1	10,00000	X
3	2	10,16667	X
1	1	13,66667	X
3	3	14,58333	X
2	2	15,66667	X
1	2	20,00000	X
2	3	22,25000	X
1	3	29,83333	X

Se establece la formación de 8 grupos homogéneos, determinando que la combinación del antimicrobiano número 3 (miel) junto con la concentración número 1 (60%) forman los halos de inhibición más pequeños obteniendo una media de 8.08 mm, mientras que la combinación del antimicrobiano número 1 (AE de eucalipto) con la concentración número 3 (100%) forman los halos de inhibición más grandes obteniendo una media de 29.83 mm. Por lo que la mejor combinación de estos dos factores es la obtenida por el aceite esencial de eucalipto a una concentración del 100%.

Figura 12

Gráfico de los diámetros de inhibición obtenido con en la interacción del Factor B x Factor C en el método de pozos.



En la figura 12 correspondiente a un gráfico de superficie se puede observar los resultados de la interacción entre el Factor B (Antimicrobiano) y el Factor C (Concentración), donde se detalla por colores los resultados de los diámetros de inhibición desde los más pequeños teniendo tonalidad verde oscuro hasta el más alto con tonalidad roja, teniendo un rango desde < 8 hasta > 30. Reafirmando por su tonalidad fuerte en color rojo que la interacción con halos más grandes es la del aceite esencial de eucalipto a una concentración de 100%.

Análisis Tukey aplicado en la interacción A*B*C (Streptococcus + Antimicrobiano + Concentración) por el método de inhibición por pozos

Tabla 60

Prueba de Tukey de la evaluación de la interacción del Factor A x Factor B x Factor C en el método de inhibición por pozos.

A	B	C	Halo (mm)	Media	Grupos Homogéneos
1	1	1	6,00000	X	
3	3	2	6,00000	X	
4	3	2	6,00000	X	
1	2	1	6,00000	X	
1	2	2	6,00000	X	
4	3	1	6,00000	X	
1	3	1	6,00000	X	
4	2	1	6,00000	X	
3	3	1	6,00000	X	
1	1	2	9,33333	X	
4	1	1	9,33333	X	
3	3	3	10,33333	X	
1	3	2	10,33333	X	
4	3	3	10,66667	X	
3	2	1	12,33333	X	
3	2	2	13,33333	X	X
4	2	2	13,66667	X	X
3	1	1	13,66667	X	X
1	2	3	14,33333	X	X

2	3	1	14,33333	X	X		
4	1	2	14,66667	X	X		
2	2	1	15,66667		X	X	
3	1	2	16,33333		X	X	
1	3	3	16,66667		X	X	
4	2	3	16,66667		X	X	
1	1	3	17,33333			X	X
2	3	2	18,33333			X	
3	2	3	18,33333			X	
2	3	3	20,66667				X
4	1	3	21,66667				X
2	1	1	25,66667			X	
2	2	2	29,66667				X
3	1	3	32,33333				X
2	2	3	39,66667				X
2	1	2	39,66667				X
2	1	3	48,00000				X

Se establece la formación de 14 grupos homogéneos, determinando que la que las primeras 9 combinaciones correspondientes al primer grupo homogéneo de la interacción de los tres factores (*Streptococcus* x Antimicrobiano x Concentración) forman los halos de inhibición más pequeños obteniendo una media de 6.00 mm, por otro lado la combinación *Streptococcus* número 2 (*S. agalactiae*) con el antimicrobiano número 1 (aceite esencial de eucalipto) junto con la concentración número 3 (100%) forman los halos de inhibición más grandes obteniendo una media de 48.00 mm. Por lo que la mejor combinación de estos tres

factores es la obtenida por el microorganismo *Streptococcus agalactiae*, el aceite esencial de eucalipto y una concentración del 100%.

Análisis de CMI

Para la representación estadística de los resultados obtenidos en la Concentración Mínima Inhibitoria se usó tablas cruzadas y gráfico de Pareto, de esa manera los resultados se reflejan a continuación.

Tabla 61

Tabla cruzada con los resultados de la CMI para S. viridans.

		Tabla cruzada de la CMI para <i>S. viridans</i>			
		Inhibe			
		NO	SI	Total	
Antimicrobiano	E1	Recuento	0	1	1
		% dentro de Recurso	0,0%	100,0%	100,0%
	E2	Recuento	0	1	1
		% dentro de Recurso	0,0%	100,0%	100,0%
	E3	Recuento	0	1	1
		% dentro de Recurso	0,0%	100,0%	100,0%
	L1	Recuento	0	1	1
		% dentro de Recurso	0,0%	100,0%	100,0%
	L2	Recuento	0	1	1
		% dentro de Recurso	0,0%	100,0%	100,0%
	L3	Recuento	0	1	1
		% dentro de Recurso	0,0%	100,0%	100,0%
M1	Recuento	1	0	1	
	% dentro de Recurso	100,0%	0,0%	100,0%	

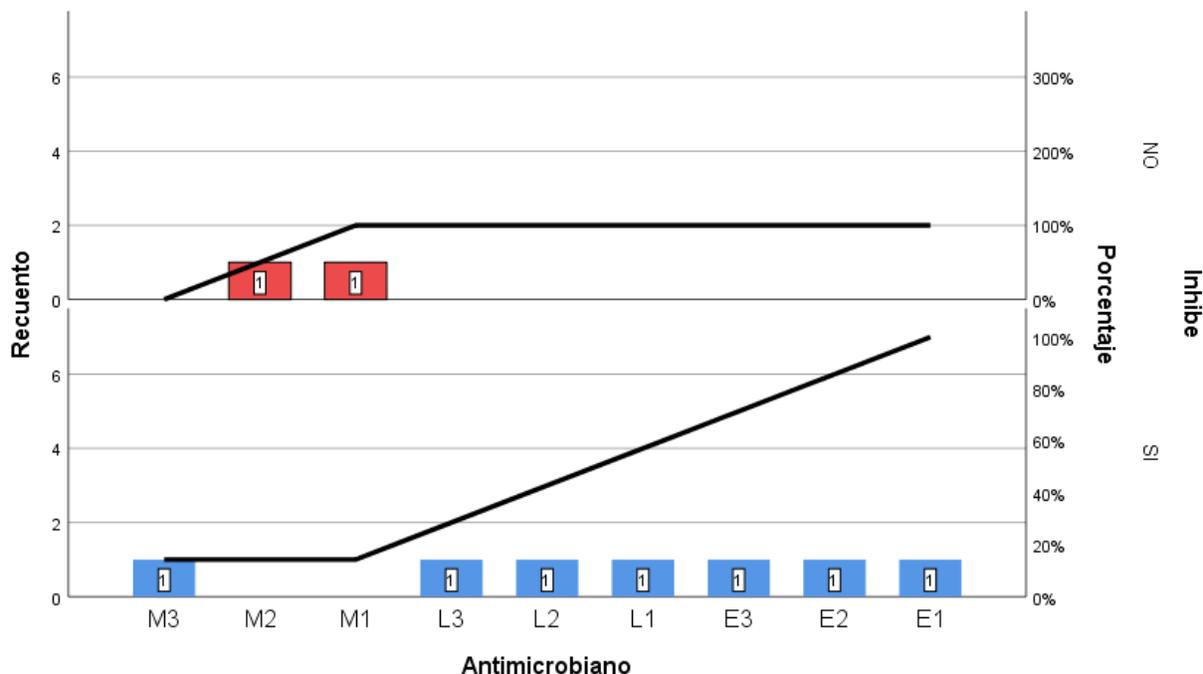
		Recuento	1	0	1
	M2	% dentro de Recurso	100,0%	0,0%	100,0%
		Recuento	0	1	1
	M3	% dentro de Recurso	0,0%	100,0%	100,0%
		Recuento	2	7	9
	Total	% dentro de Recurso	22,2%	77,8%	100,0%

Nota. E1: AE de eucalipto al 60%, E2: AE de eucalipto al 80%, E3: AE de eucalipto al 100%, L1: AE de limón al 60%, L2: AE de limón al 80%, L3: AE de limón al 100%, M1: Miel al 60%, M2: Miel al 80%, M3: Miel al 100%.

En los resultados de la CMI del *S. viridans* se obtuvo dos tubos con turbidez igual al control de crecimiento, representando un 22.2% del total, los dos negativos fueron en la miel a concentraciones de 60% y de 80%, considerando así que en el caso de este microorganismo y la miel como antimicrobiano la CMI fue del 100%. En el caso de los otros antimicrobianos y sus distintas concentraciones actuaron como inhibidores desde la mínima concentración probada que fue del 60%.

Figura 13

Gráfico de Pareto de los antimicrobianos a distintas concentraciones que inhibieron el crecimiento bacteriano en el caso de *S. viridans*.



En la figura 13 que corresponde a un gráfico de Pareto se reflejan los resultados, teniendo un total de 7 casos que inhibieron y 2 casos que no, considerando los antimicrobianos y sus concentraciones como los casos evaluados.

Tabla 62

Tabla cruzada con los resultados de la CMI para *S. agalactiae*.

		Tabla cruzada de la CMI para <i>S. agalactiae</i>		
		Inhibe		Total
Antimicrobiano		NO	SI	
		E1	Recuento	0
% dentro de Antimicrobiano	0,0%		100,0%	100,0%
E2	Recuento	0	1	1

	% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
E3	Recuento	0	1	1
	% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
L1	Recuento	1	0	1
	% dentro de Antimicrobiano	100,0%	0,0%	100,0%
L2	Recuento	0	1	1
	% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
L3	Recuento	0	1	1
	% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
M1	Recuento	1	0	1
	% dentro de Antimicrobiano	100,0%	0,0%	100,0%
M2	Recuento	1	0	1
	% dentro de Antimicrobiano	100,0%	0,0%	100,0%
M3	Recuento	0	1	1
	% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
Total		3	6	9
	% dentro de Antimicrobiano	33,3%	66,7%	100,0%

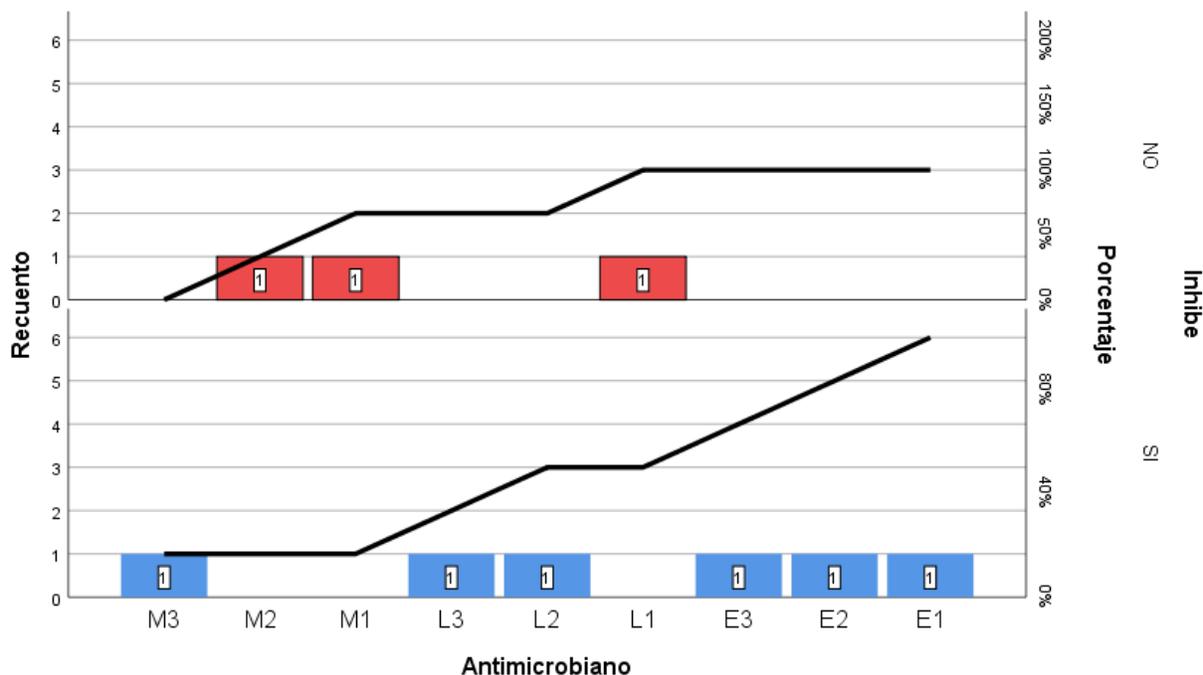
Nota. E1: AE de eucalipto al 60%, E2: AE de eucalipto al 80%, E3: AE de eucalipto al 100%, L1: AE de limón al 60%, L2: AE de limón al 80%, L3: AE de limón al 100%, M1: Miel al 60%, M2: Miel al 80%, M3: Miel al 100%.

En los resultados de la CMI del *S. agalactiae* se obtuvo tres tubos con turbidez igual al control de crecimiento, representando un 33.3% del total, uno de los negativos correspondía al AE de limón en una concentración del 60% y dos de los tres negativos fueron en la miel a concentraciones de 60% y de 80%, considerando así que en el caso de este microorganismo y el aceite esencial de limón la CMI fue del 80% y con la miel como antimicrobiano la CMI fue del

100%. En el caso de los otros antimicrobianos y sus distintas concentraciones actuaron como inhibidores desde la mínima concentración probada que fue del 60%.

Figura 14

Gráfico de Pareto de los antimicrobianos a distintas concentraciones que inhibieron el crecimiento bacteriano en el caso de S. agalactiae.



En la figura 14 que corresponde a un gráfico de Pareto se reflejan los resultados, teniendo un total de 6 casos que inhibieron y 3 casos que no, considerando los antimicrobianos y sus concentraciones como los casos evaluados.

Tabla 63

Tabla cruzada con los resultados de la CMI para el Grupo C.

		Tabla cruzada de la CMI para el Grupo C		
		Inhibe		Total
		NO	SI	
Antimicrobiano	E1	Recuento	0	1

	% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
E2	Recuento	0	1	1
	% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
E3	Recuento	0	1	1
	% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
L1	Recuento	0	1	1
	% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
L2	Recuento	0	1	1
	% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
L3	Recuento	0	1	1
	% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
M1	Recuento	1	0	1
	% dentro de Antimicrobiano	100,0%	0,0%	100,0%
M2	Recuento	1	0	1
	% dentro de Antimicrobiano	100,0%	0,0%	100,0%
M3	Recuento	0	1	1
	% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
	Recuento	2	7	9
Total	% dentro de Antimicrobiano	22,2%	77,8%	100,0%

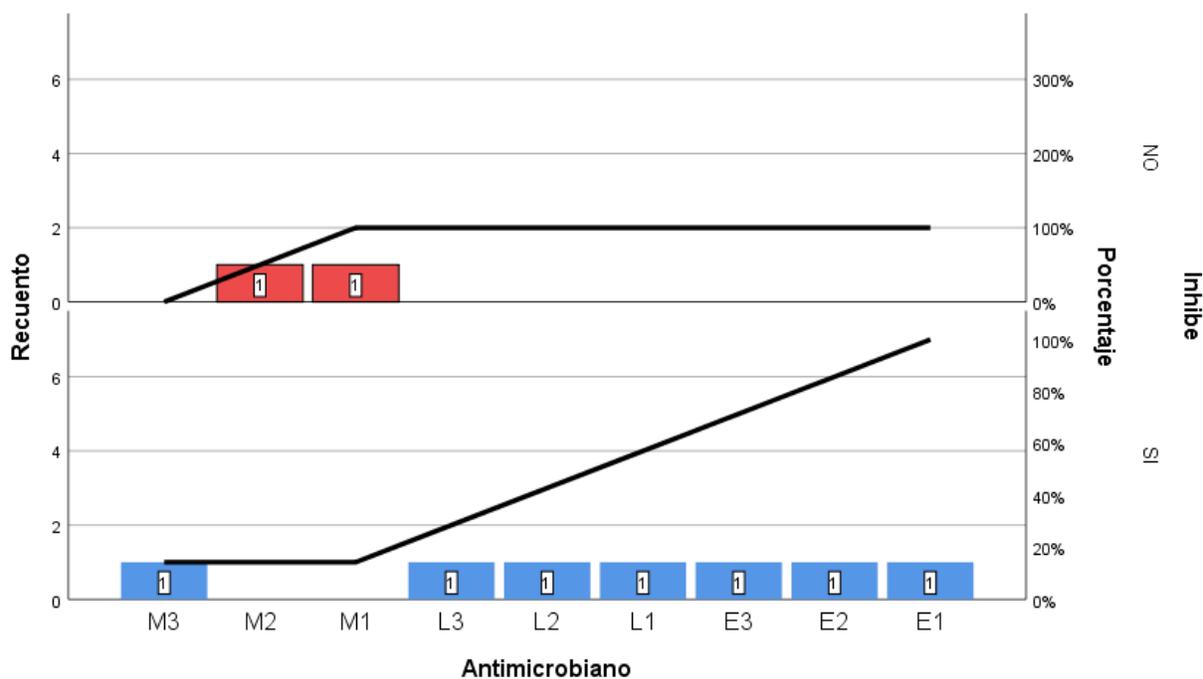
Nota. E1: AE de eucalipto al 60%, E2: AE de eucalipto al 80%, E3: AE de eucalipto al 100%, L1: AE de limón al 60%, L2: AE de limón al 80%, L3: AE de limón al 100%, M1: Miel al 60%, M2: Miel al 80%, M3: Miel al 100%.

En los resultados de la CMI del Grupo C se obtuvo dos tubos con turbidez igual al control de crecimiento, representando un 22.2% del total, los dos negativos fueron en la miel a concentraciones de 60% y de 80%, considerando así que en el caso de este microorganismo y la miel como antimicrobiano la CMI fue del 100%. En el caso de los otros antimicrobianos y sus

distintas concentraciones actuaron como inhibidores desde la mínima concentración probada que fue del 60%.

Figura 15

Gráfico de Pareto de los antimicrobianos a distintas concentraciones que inhibieron el crecimiento bacteriano en el caso del Grupo C.



En la figura 15 que corresponde a un gráfico de Pareto se reflejan los resultados, teniendo un total de 7 casos que inhibieron y 2 casos que no, considerando los antimicrobianos y sus concentraciones como los casos evaluados.

Tabla 64

Tabla cruzada con los resultados de la CMI para el Grupo G.

		Tabla cruzada para el Grupo G		
		Inhibe		
		NO	SI	Total
Antimicrobiano	E1	0	1	1

	% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
E2	Recuento	0	1	1
	% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
E3	Recuento	0	1	1
	% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
L1	Recuento	0	1	1
	% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
L2	Recuento	0	1	1
	% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
L3	Recuento	0	1	1
	% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
M1	Recuento	1	0	1
	% dentro de Antimicrobiano	100,0%	0,0%	100,0%
M2	Recuento	1	0	1
	% dentro de Antimicrobiano	100,0%	0,0%	100,0%
M3	Recuento	0	1	1
	% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
	Recuento	2	7	9
Total	% dentro de Antimicrobiano	22,2%	77,8%	100,0%

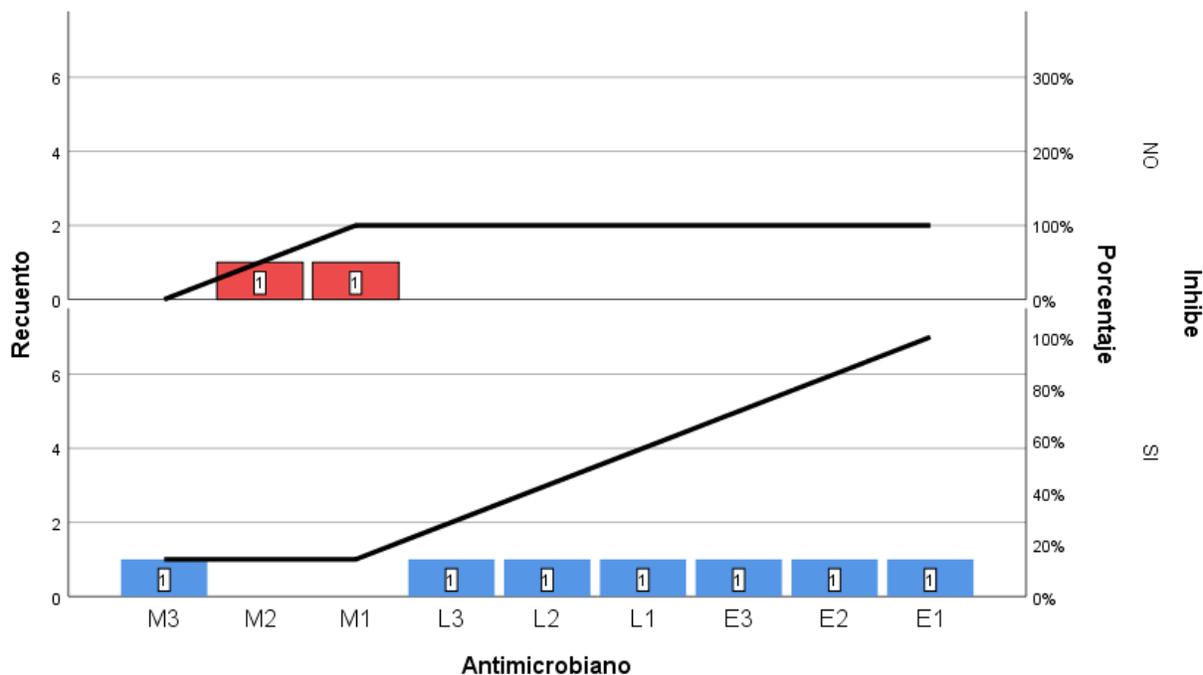
Nota. E1: AE de eucalipto al 60%, E2: AE de eucalipto al 80%, E3: AE de eucalipto al 100%, L1: AE de limón al 60%, L2: AE de limón al 80%, L3: AE de limón al 100%, M1: Miel al 60%, M2: Miel al 80%, M3: Miel al 100%.

En los resultados de la CMI del Grupo G se obtuvo dos tubos con turbidez igual al control de crecimiento, representando un 22.2% del total, los dos negativos fueron en la miel a concentraciones de 60% y de 80%, considerando así que en el caso de este microorganismo y la miel como antimicrobiana la CMI fue del 100%. En el caso de los otros antimicrobianos y sus

distintas concentraciones actuaron como inhibidores desde la mínima concentración probada que fue del 60%.

Figura 16

Gráfico de Pareto de los antimicrobianos a distintas concentraciones que inhibieron el crecimiento bacteriano en el caso del Grupo G.



En la figura 16 que corresponde a un gráfico de Pareto se reflejan los resultados obtenidos en el Grupo G, teniendo un total de 7 casos que inhibieron y 2 casos que no, considerando los antimicrobianos y sus concentraciones como los casos evaluados.

Análisis de CMB

Para la representación estadística de los resultados obtenidos en la Concentración Mínima Bactericida se usó tablas cruzadas y gráfico de Pareto, de esa manera los resultados se reflejan a continuación.

Tabla 65

Tabla cruzada con los resultados de la CMB para S. viridans.

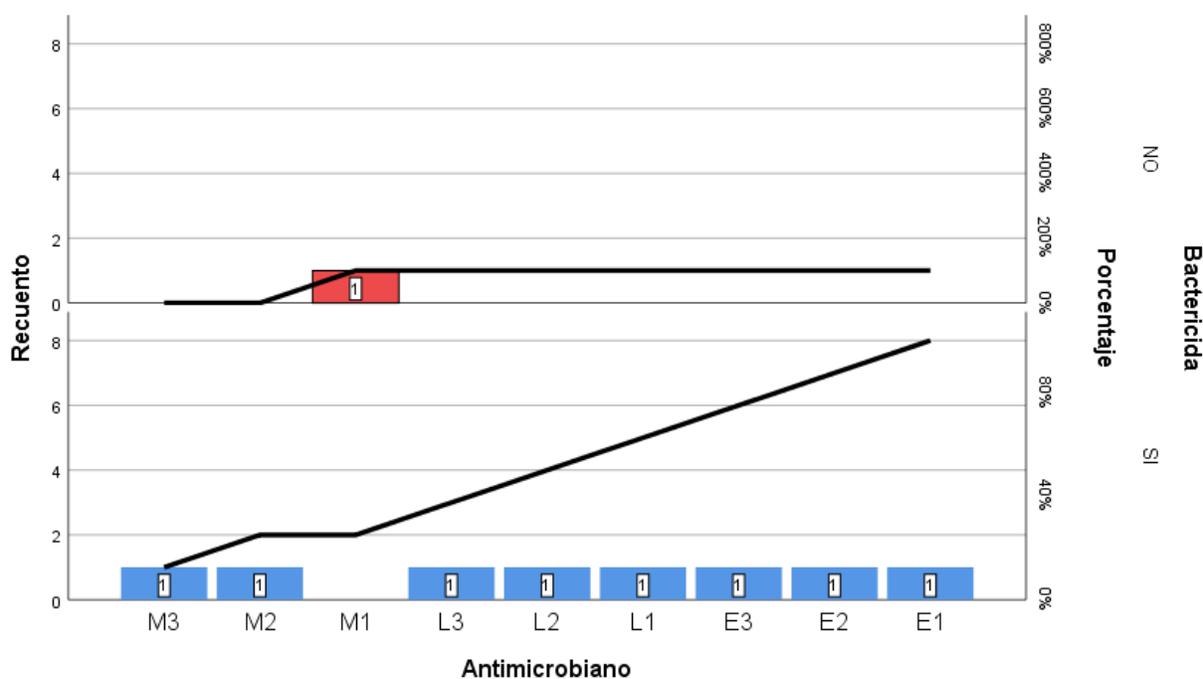
		Tabla cruzada de la CMB para <i>S. viridans</i>			
		Inhibe			
		NO	SI	Total	
Antimicrobiano	E1	Recuento	0	1	1
		% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
	E2	Recuento	0	1	1
		% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
	E3	Recuento	0	1	1
		% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
	L1	Recuento	0	1	1
		% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
	L2	Recuento	0	1	1
		% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
	L3	Recuento	0	1	1
		% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
	M1	Recuento	1	0	1
		% dentro de Antimicrobiano	100,0%	0,0%	100,0%
	M2	Recuento	0	1	1
		% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
	M3	Recuento	0	1	1
		% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
Total		Recuento	1	8	9
		% dentro de Antimicrobiano	11,1%	88,9%	100,0%

Nota. E1: AE de eucalipto al 60%, E2: AE de eucalipto al 80%, E3: AE de eucalipto al 100%, L1: AE de limón al 60%, L2: AE de limón al 80%, L3: AE de limón al 100%, M1: Miel al 60%, M2: Miel al 80%, M3: Miel al 100%.

En los resultados de la CMB del *S. viridans* se obtuvo una caja con crecimiento, representando un 11.1% del total, el negativo fue en la miel a la concentración de 60%, considerando así que en el caso de este microorganismo y la miel como bactericida la CMB fue del 80%. En el caso de los otros antimicrobianos y sus distintas concentraciones actuaron como bactericidas desde la mínima concentración probada que fue del 60%.

Figura 17

Gráfico de Pareto de los antimicrobianos a distintas concentraciones que actuaron como bactericidas en el caso de S. viridans.



En la figura 17 que corresponde a un gráfico de Pareto se reflejan los resultados obtenidos del *S. viridans*, teniendo un total de 8 casos que no tuvieron crecimiento bacteriano y 1 caso que sí, considerando los antimicrobianos y sus concentraciones como los casos evaluados.

Tabla 66

Tabla cruzada con los resultados de la CMB para *S. agalactiae*.

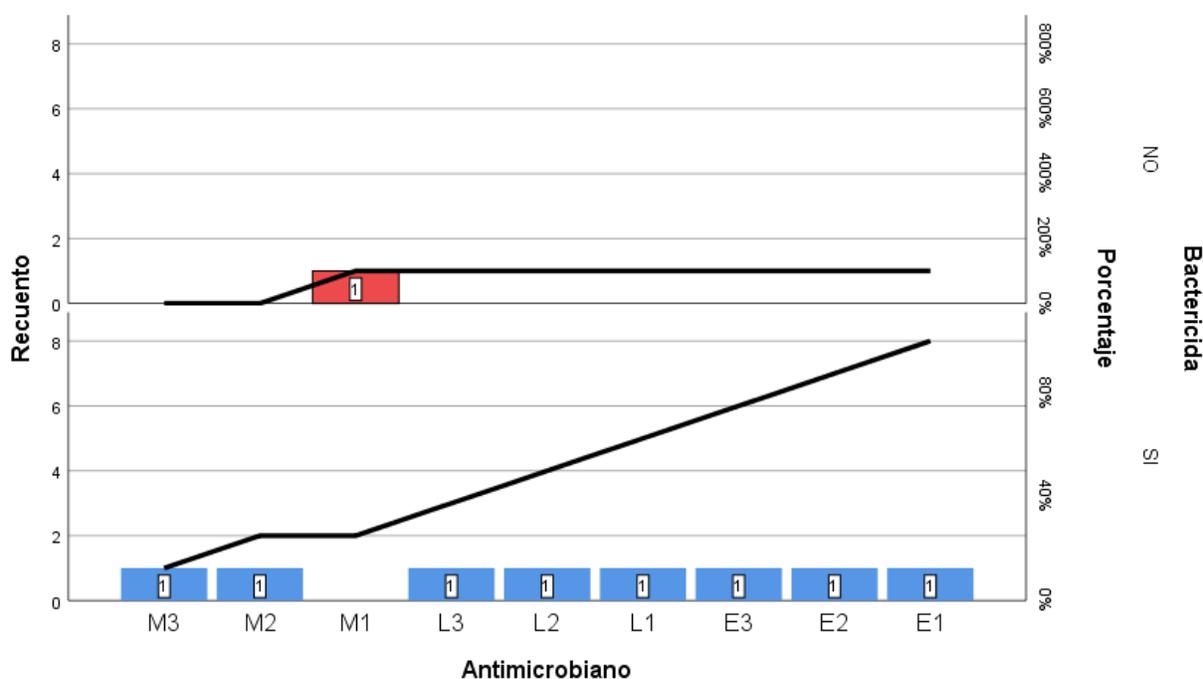
		Tabla cruzada de la CMB para <i>S. agalactiae</i>			
		Bactericida			
		NO	SI	Total	
Antimicrobiano	E1	Recuento	0	1	1
		% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
	E2	Recuento	0	1	1
		% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
	E3	Recuento	0	1	1
		% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
	L1	Recuento	0	1	1
		% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
	L2	Recuento	0	1	1
		% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
	L3	Recuento	0	1	1
		% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
	M1	Recuento	1	0	1
		% dentro de Antimicrobiano	100,0%	0,0%	100,0%
	M2	Recuento	0	1	1
		% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
	M3	Recuento	0	1	1
		% dentro de Antimicrobiano	0,0%	100,0%	100,0%
Total	Recuento	1	8	9	
	% dentro de Antimicrobiano	11,1%	88,9%	100,0%	

Nota. E1: AE de eucalipto al 60%, E2: AE de eucalipto al 80%, E3: AE de eucalipto al 100%, L1: AE de limón al 60%, L2: AE de limón al 80%, L3: AE de limón al 100%, M1: Miel al 60%, M2: Miel al 80%, M3: Miel al 100%.

En los resultados de la CMB del *S. agalactiae* se obtuvo una caja con crecimiento, representando un 11.1% del total, el crecimiento fue en el caso de la miel a una concentración de 60%, considerando así que en el caso de este microorganismo y la miel como bactericida la CMB fue del 80%. En el caso de los otros antimicrobianos y sus distintas concentraciones actuaron como bactericidas desde la mínima concentración probada que fue del 60%.

Figura 18

Gráfico de Pareto de los antimicrobianos a distintas concentraciones que actuaron como bactericidas en el caso de *S. agalactiae*.



En la figura 18 que corresponde a un gráfico de Pareto se reflejan los resultados obtenidos del *S. agalactiae*, teniendo un total de 8 casos que no tuvieron crecimiento y 1 caso que sí, considerando los antimicrobianos y sus concentraciones como los casos evaluados.

Tabla 67*Tabla cruzada con los resultados de la CMB para el Grupos C.*

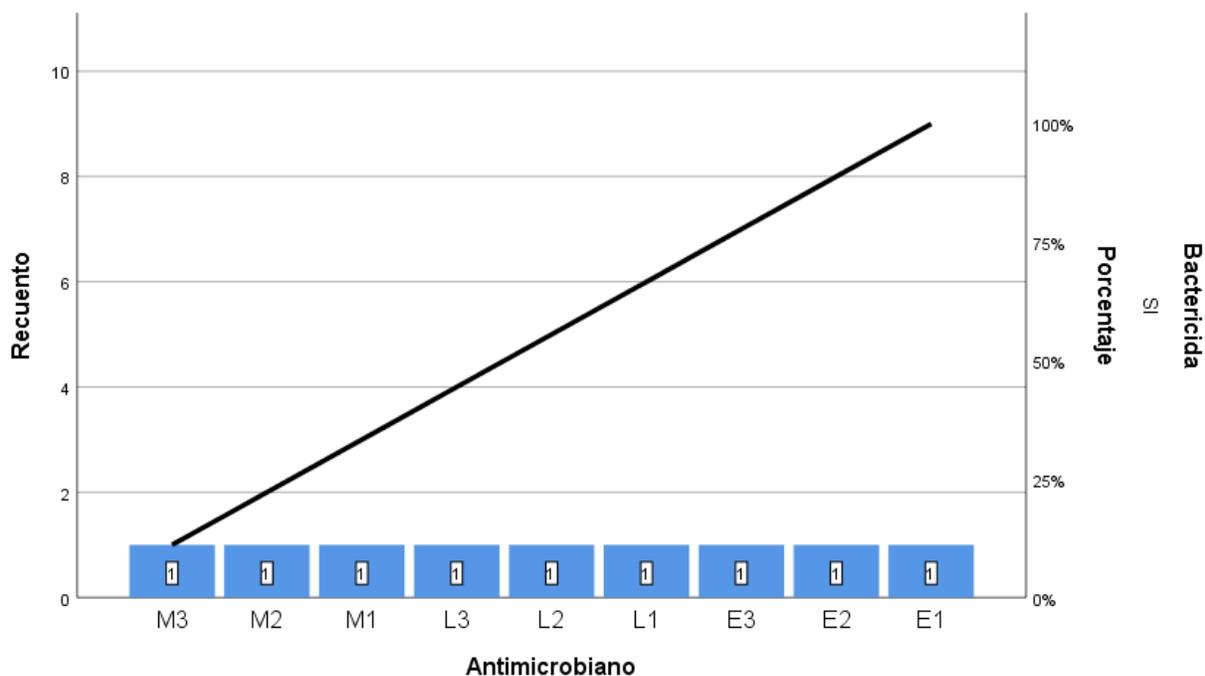
		Bactericida		
		SI	Total	
Antimicrobiano	E1	Recuento	1	1
		% dentro de Antimicrobiano	100,0%	100,0%
	E2	Recuento	1	1
		% dentro de Antimicrobiano	100,0%	100,0%
	E3	Recuento	1	1
		% dentro de Antimicrobiano	100,0%	100,0%
	L1	Recuento	1	1
		% dentro de Antimicrobiano	100,0%	100,0%
	L2	Recuento	1	1
		% dentro de Antimicrobiano	100,0%	100,0%
	L3	Recuento	1	1
		% dentro de Antimicrobiano	100,0%	100,0%
	M1	Recuento	1	1
		% dentro de Antimicrobiano	100,0%	100,0%
	M2	Recuento	1	1
		% dentro de Antimicrobiano	100,0%	100,0%
	M3	Recuento	1	1
		% dentro de Antimicrobiano	100,0%	100,0%
Total		Recuento	9	9
		% dentro de Antimicrobiano	100,0%	100,0%

Nota. E1: AE de eucalipto al 60%, E2: AE de eucalipto al 80%, E3: AE de eucalipto al 100%, L1: AE de limón al 60%, L2: AE de limón al 80%, L3: AE de limón al 100%, M1: Miel al 60%, M2: Miel al 80%, M3: Miel al 100%.

En los resultados de la CMB del Grupo C se obtuvo un total del 100% de cajas que no presentaron crecimiento, considerando, así como CMB desde la mínima concentración probada que fue del 60%, en el caso de los tres antimicrobianos usados.

Figura 19

Gráfico de Pareto de los antimicrobianos a distintas concentraciones que actuaron como bactericidas en el caso del Grupo C.



En la figura 19 que corresponde a un gráfico de Pareto se reflejan los resultados obtenidos del Grupo C, teniendo un total de 9 casos (100%) que no tuvieron crecimiento, es decir en los cuales los antimicrobianos a sus diferentes concentraciones actuaron como bactericidas.

Tabla 68

Tabla cruzada con los resultados de la CMB para el Grupo G.

Tabla cruzada de la CMB para el Grupo G			
		Bactericida	
		SI	Total
Antimicrobiano	E1	Recuento	1
		% dentro de Antimicrobiano	100,0%
	E2	Recuento	1
		% dentro de Antimicrobiano	100,0%
	E3	Recuento	1
		% dentro de Antimicrobiano	100,0%
	L1	Recuento	1
		% dentro de Antimicrobiano	100,0%
	L2	Recuento	1
		% dentro de Antimicrobiano	100,0%
	L3	Recuento	1
		% dentro de Antimicrobiano	100,0%
	M1	Recuento	1
		% dentro de Antimicrobiano	100,0%
	M2	Recuento	1
		% dentro de Antimicrobiano	100,0%
	M3	Recuento	1
		% dentro de Antimicrobiano	100,0%
Total	Recuento	9	9
	% dentro de Antimicrobiano	100,0%	100,0%

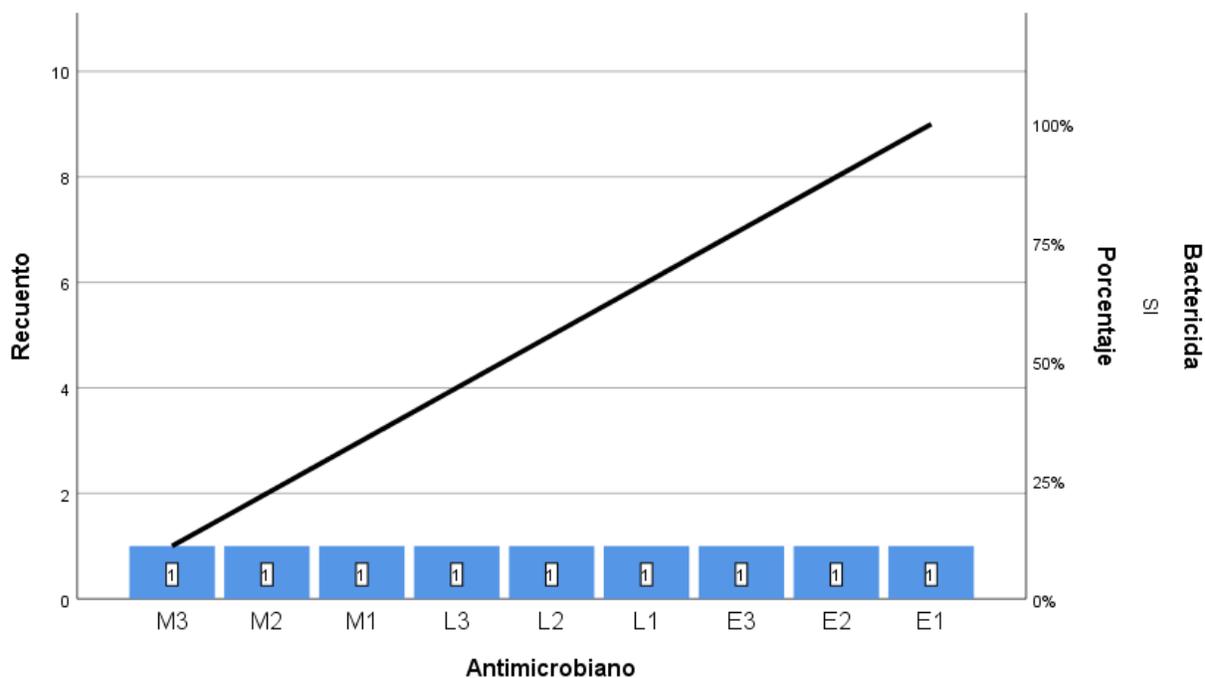
Nota. E1: AE de eucalipto al 60%, E2: AE de eucalipto al 80%, E3: AE de eucalipto al 100%,

L1: AE de limón al 60%, L2: AE de limón al 80%, L3: AE de limón al 100%, M1: Miel al 60%, M2: Miel al 80%, M3: Miel al 100%.

En los resultados de la CMB del Grupo G se obtuvo un total del 100% de cajas que no presentaron crecimiento, considerando, así como CMB desde la mínima concentración probada que fue del 60% en todos los casos de antimicrobianos probados.

Figura 20

Gráfico de Pareto de los antimicrobianos a distintas concentraciones que actuaron como bactericidas en el caso del Grupo G.



En la figura 20 que corresponde a un gráfico de Pareto se reflejan los resultados obtenidos en la CMB del Grupo G, teniendo un total de 9 casos (100%) que no tuvieron crecimiento, en los cuales los antimicrobianos a sus diferentes concentraciones actuaron como bactericidas.

Capítulo V

Discusión

Streptococcus (Factor A)

Los resultados obtenidos en las pruebas de sensibilidad con antibióticos en el caso del estreptococo del grupo viridans (SGV) reflejaron sensibilidad en el caso de la Penicilina de 10U, Kim y Lee (2020) mencionan que puede existir mecanismos de resistencia relevantes que alteran las proteínas de unión a la Penicilina en el caso de los SGV que son estreptococos principalmente de muestras orales, se sabe que comúnmente causan endocarditis infecciosa y que la placa dental es su fuente principal en donde se encuentran con frecuencia, a pesar que en exudados faríngeos se consideran flora saprofita son tratables en caso de causar sintomatología. Los SGV no reaccionan con el suero usado para tipificar de Lancefield por ser alfa hemolítico, es por eso que no se obtuvo aglutinación en la prueba de identificación rápida.

En el caso de los estreptococos del grupo B denominados SGB reaccionan con el suero usado para tipificar el grupo B de Lancefield, por lo cual tuvo aglutinación en la prueba de identificación por ser beta hemolítico, se comprueban los resultados con Hayes y colaboradores (2020) detallan que este grupo de microorganismos es reconocido de manera universal por su susceptibilidad a los antibióticos betalactámicos, sin embargo existen reportes en algunos países de una susceptibilidad reducida donde se incluye a la Penicilina, los resultados obtenidos en el antibiograma reflejaron una resistencia en la Clindamicina, la resistencia a estos antibióticos de segunda línea es alta en los SGB y sigue en aumento (Jaramillo et al., 2018). Como es el caso de muchos microorganismos Gram positivos y en especial *Streptococcus agalactiae* (SAG) han mostrado cambios en su comportamiento y respuesta a distintos tratamientos antimicrobianos que se someten tanto bovinos como humanos.

Los estreptococos del grupo C (SGC) y del grupo G (SGG) reaccionaron con el suero que tipifica el grupo C o G de Lancefield respectivamente al ser beta hemolíticos, se consideran flora natural en las vías respiratorias humanas y suelen colonizar de manera asintomática la

piel, el tracto gastrointestinal y el genital femenino (Wessels, 2020), los antimicrobianos más activos para estos dos estreptococos son las Penicilinas, los Carnapenémicos, las Cefalosporinas y la vancomicina, la mayor parte de pacientes reciben Penicilina o cefalosporina debido a su sensibilidad (Tan & File, 2013).

Antimicrobiano (Factor B)

Luis y colaboradores (2014) señalan que el aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus sp*) tiene actividad antimicrobiana en bacterias Gram positivas incluso en aislados clínicos, estas bacterias son más susceptibles ante el accionar del extracto de manera que presentan grandes halos de inhibición. La acumulación de metabolitos secundarios del eucalipto es inducido por medio de un ataque de patógenos, a estos ciertos metabolitos se los denomina fitoalexinas, algunas de estas tienen actividades de amplio espectro en contra de un gama amplia de patógenos y por otro lado otras fitoalexinas se dirigen hacia patógenos específicos, siendo así que si existe una mayor acumulación de fitoalexinas fenólicas en la planta promueve la defensa contra patógenos (Luis et al., 2014).

El aceite esencial de limón (*Citrus limon*) tuvo efecto tanto inhibidor como bactericida tal cual se reafirma con lo mencionado por Lui y colaboradores (2020) quienes alegan que el aceite de limón cítrico que es extraído de la cascara es una mezcla de hesperidina, limoneno, delta gluconolactona y otros compuestos considerados seguros, además menciona que el limoneno es el principal ingrediente del aceite esencial con un aproximado de 48.48 %, tanto el aceite como el limoneno en particular demuestran potenciales efectos inhibidores contra bacterias con virulencia bucal, todo esto confirma la efectividad de los resultados ya que las muestras pertenecen a exudados faríngeos.

La *Apis mellifera* (miel de abeja) ha demostrado en estudios (Combarros Fuertes et al., 2018) ser eficiente frente a distintos patógenos incluso a algunas bacterias resistentes a antibióticos demostrando que a pesar de la procedencia y la clase de miel de abeja probadas todas han mostrado actividad antibacteriana frente a cepas clínicas.

Concentración (Factor C)

La actividad de algún agente antimicrobiano se encuentra condicionado por las concentraciones que alcancen un lugar de acción que depende del comportamiento de la sensibilidad del microorganismo al agente, esto se conoce como la concentración mínima inhibitoria, por lo que la actividad antibacteriana podría depender de las concentraciones, ya que al aumentar la concentración del antimicrobiano se produce una mayor eliminación del microorganismo (Canut Blasco et al., 2015), por ello los antimicrobianos con una concentración mayor fueron los que tuvieron mayor actividad inhibitoria ante los *Streptococcus* que se analizaron.

Interacción Factor A, Factor B y Factor C

Al referirse a los aceites esenciales, la presencia de metabolitos actúan de manera directa sobre los patógenos, en este caso el aceite esencial de eucalipto mostró la mayor actividad inhibitoria, Ramírez y Huamanchumo (2021) destacan que las propiedades que posee este aceite son generadas por medio de diversos mecanismos y concentraciones, el mecanismo más reconocido es de toxicidad en la pared celular que el aceite al ser por naturaleza lipofílica se une a la membrana lo que aumenta su permeabilidad y se da apoptosis celular, el aceite esencial de eucalipto es más eficaz contra Gram positivos.

En el caso del accionar del aceite esencial de limón Klimek Szczykutowicz y colaboradores (2020) señalan que dentro de las actividades terapéuticas probadas del aceite incluyen actividades antimicrobianas frente a varias bacterias y en este estudio se pudo comprobar que tiene actividad inhibitoria y bactericida en el caso de estreptococos.

Por último, la efectividad inhibitoria y bactericida de la miel de abeja a pesar que todas muestran actividad contra patógenos depende de la calidad y concentraciones, las abejas son las encargadas de fabricar una proteína denominada defensina-1 la cual es agregada a la miel, es decir, esta proteína forma parte del sistema inmunológico de las abejas y es añadida a la

miel, la mayor parte de las propiedades antibacterianas que presenta la miel se debe a esta proteína (ArgenBio, 2022).

Los antimicrobianos presentaron actividad inhibitoria formando halos dependiendo su concentración, Jaramillo y otro (2018) explica que estos agentes actúan dentro de la célula ligándose a un punto de acción que depende de la molécula puede ser un sitio específico de la célula o una enzima, este punto de acción o blanco es fundamental en el efecto bacteriostático o bactericida de los agentes antimicrobianos, cualquier cambio que exista en el blanco limita la afinidad del agente lo que produce una disminución en su acción, la eficacia de los agentes se centra en su capacidad de ingresar en la célula a concentraciones necesarias para poder actuar sobre el punto de acción.

Capítulo VI

Conclusiones

El aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus sp.*), aceite esencial de limón (*Citrus limon*) y la miel (*Apis mellifera*) tuvieron efecto antimicrobiano en las tres concentraciones evaluadas (60%, 80% y 100%) tanto en los dos métodos de sensibilidad probados así como en el análisis de la CMI y CMB, por lo que el modelo experimental plasmado en este trabajo supone que los tres agentes antimicrobianos evaluados poseen actividad antimicrobiana sobre los distintos microorganismos encontrados en diferentes muestras clínicas..

Los microorganismos fueron susceptibles a los agentes que se probaron, por ello se acepta la hipótesis nula ya que el *Streptococcus* que se analiza si influye en la inhibición, es decir depende del microorganismo para que la actividad antimicrobiana sea mayor, en este caso el *Streptococcus* del Grupo G fue el más resistente ya que a todas las concentraciones presentó halos pequeños, por otro lado el *Streptococcus* más sensible fue el *S. agalactiae* porque presentó los halos de inhibición más grande ante todos los agentes. En el caso de las pruebas de CMI y CMB se podría considerar que los cuatro microorganismos actuaron de manera similar ya que las diferencias en turbidez y crecimiento no son significativas.

Los tres agentes antimicrobianos pertenecientes al factor A tuvieron efecto, por lo que se acepta la hipótesis nula de este factor, el antimicrobiano que obtuvo mejor actividad fue el aceite esencial de eucalipto obteniendo los halos de inhibición más grandes en los cuatro microorganismos, en cambio la miel dio los halos más pequeños tomando en cuenta las tres concentraciones, por lo que se concluye que el aceite de eucalipto fue el mejor antimicrobiano contra los *Streptococcus* probados,

En cuanto a las concentraciones si tuvieron influencia por lo que se acepta la hipótesis nula, certificando que la concentración más alta (100%) tuvo mayor efecto contra el crecimiento bacteriano a comparación de la concentración mínima experimentada.

Por último, se concluye que el mejor efecto antimicrobiano se obtuvo mediante el establecimiento de la interacción de los tres factores por lo que se establece que el aceite esencial de eucalipto con una concentración del 100% inhibiendo el crecimiento bacteriano de *S. agalactiae* logró la mejor actividad antibacteriana.

Recomendaciones

Los agentes antimicrobianos mostraron actividad inhibitoria en la mayoría de las pruebas y concentraciones, por lo que se recomienda realizar análisis en donde se ponga a prueba concentraciones más bajas de las probadas en este estudio, para obtener un rango referencial mayor que ayude a encontrar una concentración a la cual sus principios activos o metabolitos actúan ante los microorganismos.

En cuanto a los microorganismos y partiendo del potencial antibacteriano de los agentes probados (aceite esencial de eucalipto, aceite esencial de limón y miel) se podría poner a prueba a estos agentes en mayor variedad de bacterias patógenas para los humanos o animales.

Para una mejor percepción de resultados se sugiere realizar las pruebas de CMI comprobando la turbidez mediante espectrofotometría.

Se aconseja la búsqueda de más agentes antibacterianos que ayuden con información para poder combatir la resistencia a antibióticos que existe en la actualidad.

Capítulo VII

Bibliografía

- Alzate Tamayo, L. M., Arteaga González, D. M., & Jaramillo Garcés, Y. (3 de Junio de 2011). Determinación de las propiedades conservantes de la pulpa de algarrobo (*hymenaea courbaril linneaus*) para la industria de alimentos. En C. U. Lasallista, *Perspectivas y avances de investigación* (págs. 367-393). Corporación Universitaria Lasallista. *Perspectivas y Avances de Investigación de la serie Lasallista Investigación y Ciencia*: <http://hdl.handle.net/10567/77>
- ArgenBio. (2022). *La miel como antibiótico: identifican el ingrediente secreto que mata a las bacterias*. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología : <https://www.argenbio.org/novedades/72-mas-novedades/mas-novedades-en-el-mundo/10031-la-miel-como-antibiotico-identifican-el-ingrediente-secreto-que-mata-a-las-bacterias3>
- Arumí Rovira, M. (2 de Octubre de 2019). *Medios de Cultivo*. Microbiología para humanos: <https://microbiologiaparahumanos.wordpress.com/medios-de-cultivo/>
- Barnett, T. C., Cole, J. N., Rivera Hernández, T., Henningham, A., Paton, J. C., Nizet, V., & Walker, M. J. (3 de Octubre de 2015). Streptococcal toxins: role in pathogenesis and disease. *Cellular Microbiology*, 17(12), 1721-1741. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/cmi.12531>
- Bassolé, I. H., & Juliani, H. R. (2 de Abril de 2012). Aceites esenciales en combinación y sus propiedades antimicrobianas. *Moléculas*, 17(4), 3989-4006. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules17043989>
- Boire, N. A., Riedel, S., & Parrish, N. M. (Junio de 2013). Aceites esenciales y futuros antibióticos: ¿nuevas armas contra las 'superbacterias' emergentes? *Journal of Ancient Diseases & Preventive Remedies*, 1(2). <https://doi.org/1.10.4172/jadpr.1000105>

- Bush, L. M. (4 de Marzo de 2021). *Infecciones por estreptococo*. Manual MSD Versión Para Público General: <https://www.msdmanuals.com/es-ec/hogar/infecciones/infecciones-bacterianas-bacterias-grampositivas/infecciones-por-estreptococo>
- Canut Blasco, A., Aguilar Alfaro, L., Cobo Reinoso, J., Giménez Mestre, M. J., & Rodríguez Gascón, A. (2015). Análisis farmacocinético-farmacodinámico en microbiología: herramienta para evaluar el tratamiento antimicrobiano. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(1), 48-57.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.04.023>
- CDC. (16 de Julio de 2020). *Prescripción y uso de antibióticos*. Centros Para El Control Y La Prevención de Enfermedades: <https://www.cdc.gov/antibiotic-use/sp/antibiotic-resistance.html#:~:text=PDF%20%E2%80%93%20pages%5D-%C2%BFQu%C3%A9%20es%20la%20resistencia%20a%20los%20antibi%C3%B3ticos%3F,se%20eliminan%20y%20contin%C3%BAan%20multiplic%C3%A1ndose.>
- Cerutti, M., & Neumayer, F. (2004). Introducción a la obtención de aceite esencial de limón. *Invenio*, 7(12), 149-155. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=87701214>
- CFSPH. (1 de Mayo de 2005). *Streptococia*. In The Center for Food Security & Public Health: <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/streptococcosis-es.pdf>
- CoEsAnt-SEIMC. (2001). *Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos*. Comité Español del Antibiograma-Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica: http://coesant-seimc.org/documents/M%C3%A9todosEspeciales_Sensibilidad.pdf
- Combarros Fuertes, P. (13 de Diciembre de 2021). *La miel, una alternativa frente a bacterias resistentes a antibióticos*. The Conversation: <https://theconversation.com/la-miel-una-alternativa-frente-a-bacterias-resistentes-a-antibioticos-173175>
- Combarros Fuertes, P., Estevinho, L., Días, L., Castro, J., Tomás Barberán, F., Tornadijo, M. E., & Fresno Baró, J. M. (2018). Componentes Bioactivos y Actividades Antioxidantes y

Antibacterianas de Diferentes Variedades de Miel: Un Cribado Previo a su Aplicación Clínica. *Revista de química agrícola y alimentaria*, 67(2), 688-698.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05436>

De la Osa Busto, M., Reyes Hernández, K., Reyes Gómez, U., Perea Martínez, A., Luévanos Velázquez, A., Hernández Lira, I., & Avila Correa, A. (2017). Sensibilidad antimicrobiana de cepas de *Streptococcus pneumoniae*, período 2012-2015 en niños menores de 6 años que cursaron con neumonía. *Salud Jalisco*, 4(2), 128-134.

<https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=76927>

FAO. (2020). *Miel*. Organización de Las Naciones Unidas Para La Alimentación Y La Agricultura: <https://www.fao.org/publications/card/es/c/CA4657ES/>

Fernández Rivero, M. E., & del Pozo, J. L. (Febrero de 2018). Infecciones por estreptococos. *Medicine*, 12(49), 2883-2889. <https://doi.org/10.1016/j.med.2018.02.001>

Fica, A. (2005). Aspectos básicos sobre antimicrobianos I. *Medwave*, 5(2).

<https://doi.org/10.5867/medwave.2005.02.2522>

Fisher Scientific. (2022). *Thermo Scientific™ Prueba de aglutinación de látex rápida Streptex™*. Thermo Fisher Scientific Inc: <https://www.fishersci.es/shop/products/remel-streptex-rapid-latex-agglutination-test-lancefield-groups/11923152>

Fox, A. (s.f.). *Bacteriología - Capítulo doce Estreptococos*. Microbiología e Inmunología: <https://www.microbiologybook.org/Spanish/chapter12.htm>

Gil, M. (3 de Enero de 2019). *Agar sangre: fundamento, usos y preparación*. Lifeder: <https://www.lifeder.com/agar-sangre/>

Hayes, K., O'Halloran, F., & Cotter, L. (2020). A review of antibiotic resistance in Group B *Streptococcus*: the story so far. *Critical reviews in microbiology*, 46(3), 253–269.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1758626>

- Huerta, B. (2011). Los ACEITES ESENCIALES: una alternativa a los antibióticos. *Cunicultura*.
<https://cunicultura.com/pdf-files/2011/12/6405-los-aceites-esenciales-una-alternativa-a-los-antibioticos.pdf>
- IDEXX. (Junio de 2022). *Guía microbiológica para interpretar la concentración mínima inhibitoria (CMI)*. IDEXX Laboratories, Inc: <https://www.idexx.es/files/mic-gui%CC%81a-microbiolo%CC%81gica-es.pdf>
- IFA. (s.f.). *¿Cómo se realiza la extracción de aceites esenciales?* International Federation of Aromatherapists: https://ifaroma.org/es_ES/home/explore_aromatherapy/essential-oil-extraction
- INSST. (6 de Abril de 2022). *Streptococcus spp.* Instituto Nacional de Seguridad Y Salud En El Trabajo (INSST): [https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/bacterias/streptococcus-spp.#:~:text=Streptococcus%20pertenece%20a%20la%20familia,\(diplococcus\)%20o%20m%C3%A1s%20bacterias](https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/bacterias/streptococcus-spp.#:~:text=Streptococcus%20pertenece%20a%20la%20familia,(diplococcus)%20o%20m%C3%A1s%20bacterias)
- Jaramillo, A. S., Cobo, C. G., Moreno, Y., & Ceballos, A. (2018). Resistencia antimicrobiana de *Streptococcus agalactiae* de origen humano y bovino. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 13(1), 62-79.
- Kim, Y. H., & Lee, S. Y. (2020). Antibiotic Resistance of Viridans Group Streptococci Isolated from Dental Plaques. *Biocontrol science*, 25(3), 173-178.
<https://doi.org/https://doi.org/10.4265/bio.25.173>
- Klimek Szczykutowicz, Szopa , & Ekiert. (2020). Fenómeno de Citrus limon (limón): una revisión de la química, las propiedades farmacológicas, las aplicaciones en las industrias farmacéutica, alimentaria y cosmética moderna, y los estudios biotecnológicos. *Plants*, 9(1), 119. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/plants9010119>
- López Luegon, T. M. (Julio de 2004). Los aceites esenciales. *Elsevier*, 23(7), 88-91. Elsevier: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-los-aceites-esenciales-13064296>

- Lui, Y., Lui, P., Wang, L., Shi, Y., Chen, J., Wang, H., & Zhang, X. (2020). Efectos inhibidores del aceite de limón cítrico y limoneno en *Streptococcus sobrinus* - Caries dental inducida en ratas. *Archivos de biología oral*, 118, 104851.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104851>
- Luis, A., Neiva, D., Pereira, H., Gominho, J., Domingues, F., & Duarte, A. P. (2014). Tocones de *Eucalyptus globulus* como fuente de polifenoles antioxidantes y antimicrobianos. *Moléculas*, 19(10), 16428–16446.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3390/molecules191016428>
- Lusby, P. E., Coombes, A. L., & Wilkinson, J. M. (2005). Bactericidal Activity of Different Honeys against Pathogenic Bacteria. *Archives of Medical Research*, 36(5), 464-467.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.03.038>
- Middlesex Health. (2020). *Miel*. M+ Middlesex Health: <https://middlesexhealth.org/learning-center/espanol/articulos/miel>
- Nolazco Cama, D., Villanueva Quejia, E., Hatta Sakoda, B., & Téllez Monzón, L. (4 de Septiembre de 2020). Extracción y caracterización química del aceite esencial de Eucalipto obtenido por microondas y ultrasonido. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 22(3), 274-284. <https://doi.org/https://doi.org/10.18271/ria.2020.661>
- OIE. (2019). *Métodos de laboratorio para las pruebas de sensibilidad de las bacterias frente antimicrobianos*. Organización Mundial de Sanidad Animal:
[https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.01.01_M%C3%A9t](https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.01.01_M%C3%A9todos_laboratorio.pdf)
[odos_laboratorio.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.01.01_M%C3%A9todos_laboratorio.pdf)
- Ramírez Zamora, C., & Huamanchumo Toro, C. (2021). Actividad antibiótica del *Eucalyptus globulus* frente a bacterias Gram positivas: un artículo de revisión. *Revista Médica*, 10(2), 93-104. <https://doi.org/https://doi.org/10.18050/revistamedicavallejiana.v10i2.07>

- Tan, J., & File, T. (2013). *Especies de estreptococos (estreptococos del grupo G y del grupo C, grupo Viridans, estreptococos nutricionalmente variantes)*. Antimicrobe:
<http://www.antimicrobe.org/b241.asp>
- Vazquez Pertejo, M. T. (Junio de 2020). *Pruebas de sensibilidad o antibiogramas*. Manual Merck Versión Para Profesionales: <https://www.merckmanuals.com/es-us/professional/enfermedades-infecciosas/diagnostico-de-laboratorio-de-las-enfermedades-infecciosas/pruebas-de-sensibilidad-o-antibiogramas>
- Wessels, M. R. (18 de Agosto de 2020). *Infección estreptocócica del grupo C y del grupo G*. UpToDate: <https://www.uptodate.com/contents/group-c-and-group-g-streptococcal-infection#H30585830>
- WHO. (31 de Julio de 2020). *Resistencia a los antibióticos*. World Health Organization: WHO: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>
- Zamora, L. G., & Arias, M. L. (2011). Calidad microbiológica y actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón. *Revista biomédica*, 22(2), 59-66.
<https://www.revistabiomedica.mx/index.php/revbiomed/article/view/101>