



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

EVALUACIÓN DE LA DIFUSIÓN DE ANTIBIÓTICO EN CERA DE ABEJA Y
CERA DENTAL MEDIANTE PRUEBAS *IN VITRO* CON BACTERIAS ATCC EN
LOS LABORATORIOS DE LA UDLA.

Autor

Álvaro Marcelo Palacios Zambrano

Año
2019



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

EVALUACIÓN DE LA DIFUSIÓN DE ANTIBIÓTICO EN CERA DE ABEJA Y
CERA DENTAL MEDIANTE PRUEBAS *IN VITRO* CON BACTERIAS ATCC EN
LOS LABORATORIOS DE LA UDLA.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Médico Veterinario Zootecnista

Profesor Guía

MVZ. David Francisco Andrade Ojeda

Autor

Álvaro Marcelo Palacios Zambrano

Año

2019

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Evaluación de la difusión de antibiótico en cera de abeja y cera dental mediante pruebas *In Vitro* con bacterias *ATCC* en los laboratorios de la *UDLA*, a través de reuniones periódicas con el estudiante Álvaro Marcelo Palacios Zambrano, en el semestre 201910, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

MVZ. David Francisco Andrade Ojeda
CI: 1712693165

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Evaluación de la difusión de antibiótico en cera de abeja y cera dental mediante pruebas *In Vitro* con bacterias *ATCC* en los laboratorios de la *UDLA*, del Álvaro Marcelo Palacios, en el semestre 201910, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

MVZ. Juan José Pesántez Valdivieso
CI: 1716395791

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Álvaro Marcelo Palacios Zambrano
CI: 1716366511

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, hermano y novia por su apoyo incondicional, ya que sin ellos esto no sería posible.

Agradezco a mi tutor David Andrade quien estuvo presente durante todo el proceso de elaboración del presente trabajo de titulación, desde la elección y creación del tema hasta su culminación, aportando sus conocimientos y experiencia.

A la Universidad de las Américas por todo el apoyo brindado para la elaboración de este proyecto, a mi formación personal y profesional.

DEDICATORIA

Este logro va dedicado a las siguientes personas, ya que sin ellos no sabría el valor del trabajo y luchar por llegar a cumplir mis metas.

A mis padres por el apoyo brindado siempre y su total entrega, buscando una educación de calidad dándome las herramientas para un futuro exitoso.

Mi hermano quien ha sido un ejemplo a seguir, siendo mi mejor amigo y confidente durante toda mi vida.

Mi novia, mi mejor amiga y compañera de vida, al igual que su familia quienes siempre me han brindado un apoyo total en mi carrera.

Mis amigos y hermanos Califas quienes han aportado con enseñanzas y conocimientos.

Querida Finca la Querencia, que me abrió las puertas y acogió como miembro de su familia, permitiéndome dar mis primeros pasos y enseñándome que “Es más fácil ser un profesional que ser una buena persona”.

A todos los profesionales que he conocido en este camino que han aportado algo para mi formación profesional y personal, dándome las directrices para ejercer y disfrutar esta linda profesión.

A mis profesores durante la carrera por todo lo enseñado.

RESUMEN

El presente trabajo experimental tiene como objetivo el evaluar la cera de abeja y cera dental como métodos de difusión de antibióticos. Este se realizó en los laboratorios de la Universidad de las Américas, las pruebas que se ejecutaron para el estudio fueron pruebas de antibiograma. Se diluyó la cera de abeja y cera dental y se mezcló cada una con antibiótico, midiendo la sensibilidad de éstas como difusoras de antibiótico contra bacterias ATCC en agar Mueller-Hinton de forma in-vitro. Para esto se realizaron diluciones de Amikacina con Cloruro de sodio al 0,09%, para los tres subgrupos que se ejecutaron para cada una de las ceras. El estudio tomó como referencia el procedimiento de perfusión regional, el cual argumenta que el aumento del volumen en una solución mantiene la misma acción de los solutos; así se realizaron treinta repeticiones por cada subgrupo los cuales fueron probados para los dos métodos de difusión. De igual forma se mantuvieron controles con papel filtro para ver la sensibilidad del antibiótico en dichas diluciones frente a las bacterias ATCC *S. Aureus* BAA976. Para evaluar la sensibilidad se utilizaron pruebas estadísticas univariadas y bivariadas. Realizando como prueba máxima una comparación de variables por el método estadístico ANOVA. Estas pruebas arrojaron que la cera de abeja y cera dental aunque tienen resultados favorables no son significativos estadísticamente. El estudio también determinó que el método es efectivo, pero si se logra homogenizar la mezcla y se logra que las ceras mantengan el antibiótico como una partícula estable.

Palabras Claves: Cera de abeja - Cera dental - Difusión - Agar Mueller-Hinton -Bacterias ATCC - Perfusión Regional.

ABSTRACT

The objective of this experimental study is to evaluate beeswax and dental wax as antibiotic diffusion methods. This study was performed in the laboratories of the Universidad de las Américas, by antibiogram tests. The beeswax and dental wax were diluted and each dilution was mixed with the antibiotic, measuring the sensitivity of these waxes as antibiotic diffusers against ATCC bacteria on Mueller-Hinton agar in the in-vitro way. For this, dilutions of Amikacin with 0.09% sodium chloride were made for the three subgroups that were executed for each of the waxes. The study took as reference the procedure of regional perfusion, which argues that the increase of the volume in a solution maintains the same action of the solutes; thus thirty repetitions were made for each subgroup, which was tested for the two methods of diffusion. In the same way, controls with filter paper were maintained to see the sensitivity of the antibiotic in these dilutions against the ATCC S. S. aureus BAA976 bacteria. To evaluate sensitivity, univariate and bivariate statistical tests were used, performing as a maximum test comparison of variables by the Anova statistical method. These tests showed that beeswax and dental wax, although they have favorable results, are not statistically significant. The study also determined that the method is effective if the mixture is homogenized and the waxes maintain the antibiotic as a stable particle.

Key Words: Beeswax - Dental wax - Diffusion - Mueller-Hinton Agar - ATCC Bacteria - Regional Perfusion.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1 Objetivos..... | 3 |
| 1.1.1 Objetivo general..... | 3 |
| 1.1.2 Objetivos específicos | 3 |
| 1.2 Hipótesis..... | 4 |
| 2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO..... | 4 |
| 2.1 La flora bacteriana normal de la piel..... | 4 |
| 2.2 Las bacterias en la piel de los animales | 5 |
| 2.2.1 Bacterias más comunes en la piel de los animales..... | 6 |
| 2.2.2 Crecimiento de Población Bacteriana | 6 |
| 2.2.3 Manejo de bacterias con el uso de Antibióticos | 7 |
| 2.3 Mecanismos de acción y difusión de los antibióticos..... | 7 |
| 2.3.1 Grupos de Antibióticos y acción..... | 8 |
| 2.3.2 Mecanismos de Acción de los Antibióticos. | 9 |
| 2.4 Excipientes y métodos de difusión de fármacos..... | 10 |
| 2.4.1 El uso de la cera de abeja en la medicina | 10 |
| 2.4.2 Propiedades de la cera de abeja | 11 |
| 2.4.3 El uso de la cera dental en la medicina | 12 |
| 2.4.4 Propiedades de la cera Dental..... | 12 |
| 2.5 Pruebas de Sensibilidad a Antibióticos (Antibiograma)..... | 13 |
| 2.5.1 Pruebas de difusión por disco..... | 14 |
| 2.5.2 Bacterias American Type Culture Collection (ATCC)..... | 15 |
| 3. CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS | 15 |
| 3.1 Ubicación..... | 15 |
| 3.2 Población y muestra | 16 |
| 3.3 Materiales..... | 17 |
| 3.4 Metodología..... | 18 |

| | |
|---|-----------|
| 3.4.1 Variables..... | 25 |
| 3.4.3 Diseño experimental | 25 |
| 4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 26 |
| 4.1 Resultados Univariados..... | 26 |
| 4.1.1 Frecuencias | 26 |
| 4.2 Resultados Bivariados | 30 |
| 4.3 Limitantes..... | 35 |
| 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 36 |
| 5.1 Conclusiones..... | 36 |
| 5.2 Recomendaciones | 36 |
| REFERENCIAS | 37 |
| ANEXOS | 41 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1 Grupos de Antibióticos y acción | 8 |
| Tabla 2 Grupos y Diluciones de Amikacina | 17 |
| Tabla 3 Materiales e Indumentaria | 17 |
| Tabla 4 Diluciones..... | 20 |
| Tabla 5 Tabulación de Datos Tamaño Halo de Inhibición (mm)..... | 24 |
| Tabla 6 Grupos de Susceptibilidad por Formación del Halo (mm) | 24 |
| Tabla 7 Variables | 25 |
| Tabla 8 División Grupos y Subgrupos | 26 |
| Tabla 9 Frecuencias Estadísticas Formación de Halos (mm) Subgrupos | 27 |
| Tabla 10 Frecuencias Subgrupos Susceptibilidad por Formación del Halo (mm)..... | 28 |
| Tabla 11 Formación del Halo | 29 |
| Tabla 12 Contaminación del Halo | 29 |
| Tabla 13 Formación de Halo Subgrupos y Controles durante 72horas (CA) ... | 31 |
| Tabla 14 Formación de Halo Subgrupos y Controles durante 72horas (CD) ... | 32 |
| Tabla 15 Anova Comparación de Variables Grupos y sub grupos | 33 |
| Tabla 16 Variables Dependientes Controles DMS | 34 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estratificaciones de la piel..... | 5 |
| Figura 2. Bacterias comunes en la piel de los animales..... | 6 |
| Figura 3. Ubicación del estudio | 16 |
| Figura 4. División y codificación de cajas Petri por subgrupos..... | 20 |
| Figura 5. Cultivo en Agar..... | 22 |
| Figura 6. Métodos de Difusión..... | 22 |
| Figura 7. Medición de halos de inhibición | 23 |

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

El médico veterinario actual tiene que estar preparado para ser un profesional con las herramientas y conocimientos necesarios para la investigación, al igual que buscar nuevos métodos para el control de las enfermedades y patógenos. De esta manera generará aportes al conocimiento de los futuros profesionales en el campo veterinario, ya que en la actualidad se buscan profesionales que generen buenos resultados efectuando un buen diagnóstico, al igual que un adecuado análisis clínico lo que podría ser la solución a la resistencia que existe a los antibióticos en la actualidad (Bragginton & Piddock, 2014).

Muchos de los avances y métodos que se aplican a la medicina humana se han descubierto en estudios experimentales en la medicina veterinaria, como por ejemplo la perfusión regional (Regional Limb Perfusion - RLP) que se describiera por primera vez en el año 1908 como un método para inducir la anestesia regional para ciertos procedimientos quirúrgicos, posteriormente se utilizó para la administración de antimicrobianos a humanos y otros animales.

En el año de 1990 Dietz & Kehnscherper, describieron la perfusión regional antimicrobiana en caballos. En la actualidad, la perfusión regional RLP con antimicrobianos se considera una terapia coadyuvante efectiva para el tratamiento de caballos con infecciones ortopédicas de las extremidades (Rubio-Martínez & Cruz, 2006).

Por esto, en la actualidad se buscan diferentes métodos que contengan acción antibacteriana, con el uso de ingredientes de orígenes naturales como cera y miel de abeja, aceite de oliva, donde se demuestra que estos también son una opción de tratamiento exitoso (Al-Waili, 2005). La busca de estos métodos se da como consecuencia a la resistencia a los fármacos y por los tratamientos realizados parcialmente para combatirlos.

Aunque la ciencia ha avanzado logrando determinar diferentes tipos de antibióticos específicos para cada bacteria, se presentan de igual manera inconvenientes para poder luchar contra éstas. La cualidad de las bacterias de tener una forma de replicación acelerada les permite generar cambios que les da una resistencia a medicamentos en poco tiempo (Janssen et al., 2018). Por lo general el tratamiento contra bacterias es por medio de la farmacología con el uso de distintos tipos de antibióticos al igual que en diferentes formas de administración como lo son: por vía oral, vía intramuscular o vía intravenosa, siendo éstas las más comunes (Fox-Lewis et al., 2018).

Debido a la problemática detectada con respecto a las vías de administración de antibióticos para evitar el crecimiento de bacterias desde la década de los 90's, al igual que el fallo a los tratamientos que se instauran; se tiene la necesidad de buscar una alternativa que ayude a tener una difusión continua del antibiótico generando una acción que evite y combata el crecimiento desde su primer día de aplicación, ofreciendo garantías al igual que un uso seguro para tener resultados favorables (Bragginton & Piddock, 2014).

Existen estudios que demuestran las cualidades y beneficios de la cera de abeja y algunos en los que se indica que varios años atrás se la utilizó mezclándola con otros productos para tener un efecto similar, así podemos ejemplificar con pronunciamientos como el de la FAO en el año 2005 que dice *“Desde hace mucho tiempo se habla de las propiedades de la miel de abeja y sus componentes, en la actualidad se la utiliza en diferentes campos de las industrias en la farmacéutica, cosméticos, entre otros”*.(FAO, 2005).

Dentro de lo que respecta al uso de la cera de abeja aplicado a combatir bacterias se ha descrito en diferentes estudios realizados años atrás que determinan y describen su eficacia para difundir antibióticos, pero estos estudios fueron realizados con la mezcla de un antibiótico con cera de abeja y aceite de maní, por lo que no se pudo evaluar si este resultado positivo se dio por la cera de abeja específicamente (KIRBY & LEIFER, 1945).

Así se encuentran artículos relevantes donde se inyectó esta solución de forma intramuscular y subcutánea para medir el alcance, al igual que el modo de acción de estas dos vías (KIRBY & LEIFER, 1945). También existe otro estudio donde se aplicó esta mezcla para el tratamiento de uretritis gonocócica con una sola inyección intramuscular (LEIFER, MARTIN, & KIRBY, 1945). En otro estudio, se evidenció la administración de este mismo compuesto para tratar sífilis primaria con una sola inyección (MJ, CR, & GE, 1946). Del mismo modo para el tratamiento de neumonía con una sola administración diaria (VOLINI, HOFFMAN, & HUGHES, 1949). Con esto se exponen los resultados favorables al utilizar cera de abeja mezclada con antibióticos para el tratamiento contra las bacterias.

El presente trabajo pretende determinar el efecto que tiene la cera de abeja como método de difusión de antibiótico, para comparar se utilizó la cera dental que posee cualidades similares, esperando un efecto positivo para la difusión de antibiótico en medios de cultivo, para valorar la capacidad de difusión de la cera de abeja.

Este estudio apertura este tipo de investigaciones que serán herramientas de gran ayuda a la medicina veterinaria en su trabajo cotidiano.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general

Evaluar de la difusión de antibiótico en cera de abeja y cera dental mediante pruebas *In Vitro* con bacterias ATCC en los laboratorios de la UDLA, para medir la eficacia de los dos métodos de difusión.

1.1.2 Objetivos específicos

- Evaluar la difusión de los dos métodos con diferentes concentraciones de antibiótico, valorando halos de inhibición.

- Verificar la eficacia de forma in vitro, valorando la difusión de la cera de abeja versus la difusión de la cera dental, y comparando las diferentes diluciones del fármaco.

1.2 Hipótesis

Al mezclar la cera de abeja y la cera dental con antibiótico, servirán como método de difusión formando halos de inhibición contra las bacterias ATCC

2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 La flora bacteriana normal de la piel

La piel es la superficie ideal para que microorganismos puedan sobrevivir, ya que está compuesta de epidermis, dermis y subcutis o tejido subcutáneo, cada una de las cuales está formada por varias subcapas Figura 1. Éstas al estar en contacto con el medio ambiente permiten que los microorganismos puedan sobrevivir en su superficie por sus características de pH, temperatura, humedad y la cantidad de nutrientes que estas pueden extraer de este medio. Generando así la flora normal de la piel que permite una simbiosis entre el huésped y las colonias de gérmenes sin causar enfermedades (Fossum, 2013).

La flora basal o flora bacteriana normal es específica para cada área del cuerpo y está compuesta por gérmenes que siempre se encuentran presentes en un área específica como por ejemplo:

- *Staphylococcus epidermidis*. (Específico de la piel).

La flora transitoria está compuesta por microorganismos no específicos que buscan la colonización de un área de forma oportunista una área de la piel, incluyendo bacterias patógenas para el individuo u otras especies que se encuentran en contacto con éste (M. E. Torres, 2002).

2.2 Las bacterias en la piel de los animales

Es común que cualquier traumatismo o afección a la estructura normal de la piel termine en una infección. Esto se debe a que la piel de los animales posee bacterias propias, al igual que existen bacterias en el ambiente o por interacción, es así que al presentarse infección en una herida se puede aislar bacterias propias como ajenas al animal.

Las infecciones de piel se caracterizan según su profundidad en superficiales y profundas, así para el presente trabajo nos enfocaremos en las bacterias que afectan a nivel profundo, ya que la piel es una barrera física y química que protege al animal frente a los patógenos que se encuentran en el ambiente, una vez que la piel sufre un traumatismo permite el paso de estas bacterias a un ambiente adecuado para su replicación, esto se puede dar en procesos traumáticos al igual que en procedimientos programados como cirugías, sino se tiene la asepsia adecuada (M. E. Torres, 2002).

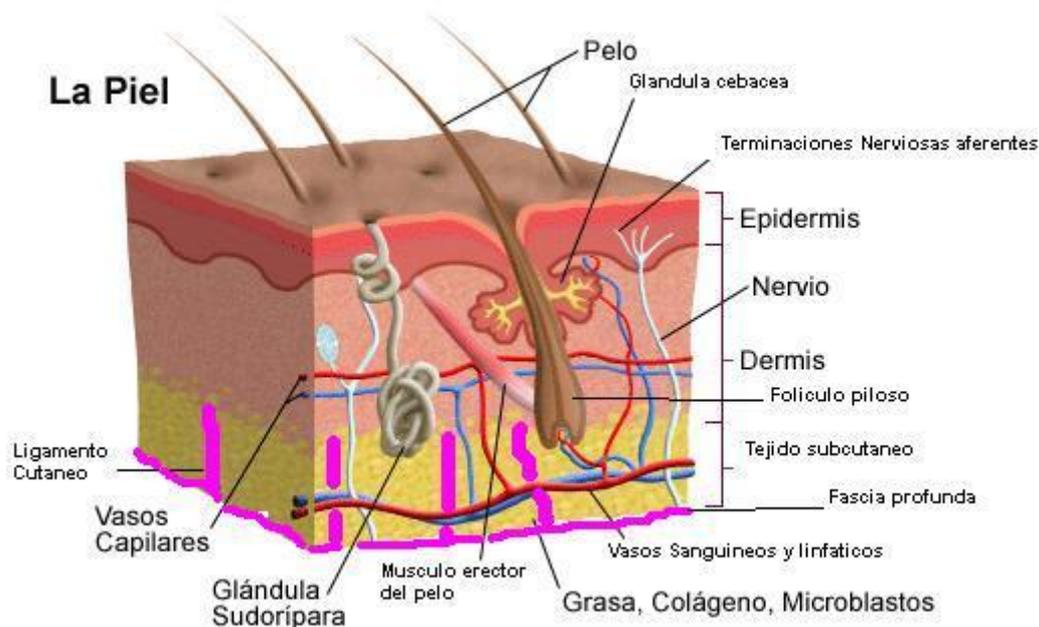


Figura 1. Estratificaciones de la piel

Tomado de: Modificado de <http://melisaanatomia.blogspot.com/2011/11/la-piel.html>.

2.2.1 Bacterias más comunes en la piel de los animales

Dentro de las bacterias que se encuentran en la piel tenemos a las que sobreviven en la superficie o en el pelo del animal, estas por lo general viven en simbiosis hasta que pueden traspasar la piel por un factor externo como el *Staphylococcus intermedius*. Dentro de estas existen dos grupos, los que son propios de la piel y los transitorios.

Los propios no producen patogenicidad solo se replican sobre la piel y los transitorios se encuentran sobre la superficie de la piel pero no se replican. Son potencialmente patógenos cuando se encuentran alteraciones en la piel esto se conoce como colonización bacteriana (S. M. F. Torres, Frank, & Hargis, 2013). Como se muestra a continuación en la Figura 2.

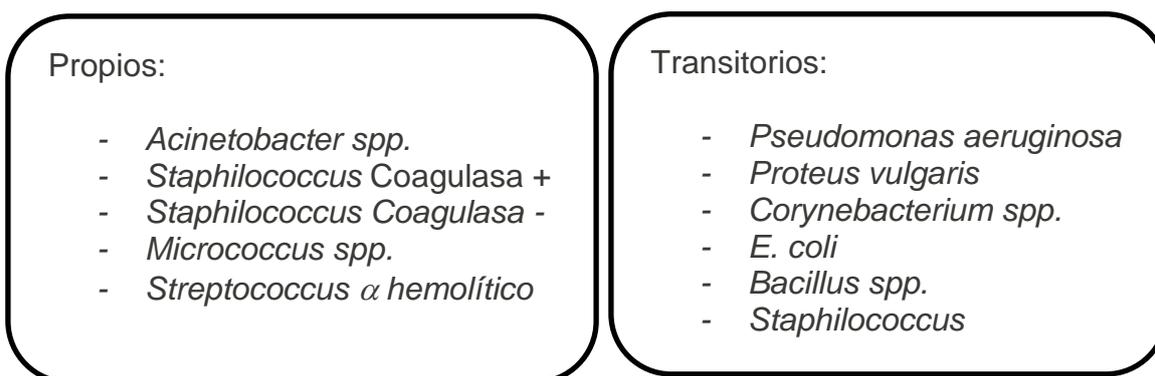


Figura 2. Bacterias comunes en la piel de los animales

Tomado de: Modificado de (Fossum, 2013)

2.2.2 Crecimiento de Población Bacteriana

Las bacterias poseen una extraordinaria capacidad de adaptación a distintos tipos de condiciones medioambientales, esto es posible por la base genética que posee este microorganismo, ya que la organización de la información genética les permite mutar para adaptarse al medio ambiente, al igual que generar una patogenicidad en su huésped colonizando los tejidos (L. Betancor, M. Gadea, 2008).

Esto está mediado por la denominada fisión binaria, que es la generación de dos células hijas iguales a partir de una célula madre, por esto las bacterias pueden generar el crecimiento exponencial conteniendo toda la información necesaria para que la bacteria pueda sobrevivir, la misma que está almacenada en el ácido desoxirribonucleico ADN (Donnell et al., 2013).

2.2.3 Manejo de bacterias con el uso de Antibióticos

Los antibióticos son producidos por microorganismos (generalmente hongos), estos detienen el crecimiento de las bacterias y los destruyen en algunas ocasiones. En la actualidad se le conoce como antibiótico a cualquier mecanismo de eliminación de bacterias ya sea de origen sintético o natural, de esta forma se les atribuyen propiedades antibióticas a distintos componentes.

Aunque muchas de las veces estas bacterias no pueden ser erradicadas o eliminadas, dado a que su ventaja más grande es su rápida propagación y proliferación, esto se da principalmente cuando los antibióticos que se utilizan para combatir las bacterias no son los adecuados, lo que ocasiona que se vuelva más complicado combatir contra el patógeno (Seija & Vignoli, 2006)

2.3 Mecanismos de acción y difusión de los antibióticos

Al existir gran cantidad y variedades de bacterias, se debe tener de igual manera una gran variedad de antibióticos o de métodos que permitan combatir las bacterias, así se han clasificado los antibióticos dentro de familias según su acción (Seija & Vignoli, 2006).

Esto está dado porque los antibióticos tienen una toxicidad selectiva para el patógeno por esto actúan de diferentes maneras.

2.3.1 Grupos de Antibióticos y acción.

Tabla 1
Grupos de Antibióticos y acción

| | |
|--|--|
| Penicilinas | Inhibidores de la betalactamasa, interrumpe la síntesis de la capa de peptidoglicanos de la pared celular bacteriana. |
| Primera Generación | Interfieren en la síntesis de peptidoglicanos de la pared celular bacteriana generando un efecto bacteriolítico. Mejor acción frente a Cocos y Gram+. |
| Segunda generación | Interfieren en la síntesis de peptidoglicanos de la pared celular bacteriana generando un efecto bacteriolítico, tienen menor actividad con Gram-. |
| Tercera Generación | Interfieren en la síntesis de peptidoglicanos de la pared celular bacteriana generando un efecto bacteriolítico. Son usadas con gran efectividad para Gram-. |
| Cefalosporinas Cuarta Generación | Interfieren en la síntesis de peptidoglicanos de la pared celular bacteriana generando un efecto bacteriolítico. Son usadas con gran efectividad para Gram- y Gram+, ya que tienen un espectro extendido para estas bacterias. Con mejor acción que los de tercera generación. |
| Quinta generación | Interfieren en la síntesis de peptidoglicanos de la pared celular bacteriana generando un efecto bacteriolítico. Mayor actividad contra <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina, <i>Streptococcus pneumoniae</i> resistente a penicilinas . |
| Aminoglucósidos | Se adhieren a la subunidad 30s del ribosoma y otros se unen a la unidad 50s. Estos inhiben la translocación de peptidil-ARNt generando un error en la lectura del ARNm, impidiendo que la bacteria pueda |

| | |
|-------------------|---|
| | sintetizar proteínas. |
| Macrólidos | Inhiben la biosíntesis de proteínas generando una unión irreversible del ribosoma 50s, impidiendo la translocación del peptidil-ARNt. |

Tomado de: Modificado de (Seija & Vignoli, 2006)

2.3.2 Mecanismos de Acción de los Antibióticos.

La selección de los antibióticos se clasifican según sus mecanismos de acción, estos se catalogan según el proceso o zona donde actúan, así ataca a una estructura o proceso bioquímico permitiendo destruir a la bacteria y no al hospedador, esto se da por la gran diferencia que existe entre las células de los animales y las células bacterianas, dando la posibilidad que los blancos que se atacan en una bacteria no existan en su hospedador (FAO, 2005).

Según Seija y Vignoli (2006), se clasifican en cuatro grupos:

- Inhibidores de la síntesis en la pared celular, actúan sobre la pared rígida que permite a esta soportar grandes presiones osmóticas, esta cualidad es típica de las bacterias por lo que se vuelve el lugar apropiado para combatirlas. Así estos antibióticos provocan que se rompa esta pared generando la muerte de la bacteria.
- Los que actúan en la membrana celular, estos tienen la facultad de alterar la membrana impidiendo que cumplan su función de barrera selectiva, estas son sustancias tóxicas las cuales también pueden afectar a las membranas de las células eucariotas del hospedador.
- Inhibidores de los ácidos nucleicos, impiden la síntesis de los ácidos, impidiendo la reproducción bacteriana.

- Inhibidores de la síntesis de proteínas, no permiten que la bacteria pueda fabricar proteínas, lo que no les permite formar la estructura de la bacteria (Seija & Vignoli, 2006).

2.4 Excipientes y métodos de difusión de fármacos

La United States Pharmacopoeial define los excipientes como: “Cualquier componente que se agrega intencionalmente a la formulación de una forma farmacéutica, que es diferente del principio activo” (2002).

También define como: “Sustancias, aparte del principio activo, que se encuentran en una forma de dosificación, las cuales se han evaluado de manera apropiada en su seguridad y que se incluyen en un sistema de suministro de fármacos para ayudar en su procesamiento o manufactura, para proteger, apoyar y mejorar la estabilidad, la biodisponibilidad o la aceptabilidad por el paciente, para apoyar en la identificación del producto, para mejorar cualesquier otros atributos de seguridad y efectividad de la forma de dosificación, durante su almacenamiento y durante su uso” (Good Manufacturing Practices Guide for pharmaceutical excipients, 2006).

Con esto podemos ver que los excipientes son vehículos que se adhieren a los fármacos para lograr que sean absorbidos y metabolizados con mayor eficacia que si se encontraría en un estado puro (Soler Carreño, 2015).

2.4.1 El uso de la cera de abeja en la medicina

El uso de la cera de abeja en la medicina y en la farmacéutica se remonta al antiguo Egipto en los 1550 AC. Esta era la base de muchas cremas y ungüentos que servían para tratar quemaduras y calmar el dolor de las articulaciones. Algunos años después Hipócrates el padre de la medicina recomendaba la cera de abeja para tratar amigdalitis graves (FAO, 2005).

Después en el Imperio Romano se la mezcló con otros elementos para realizar un ungüento llamado “Crema Fría” que se componía de cera de abeja, aceite

de oliva y agua de rosas. Este era utilizado para el tratamiento de quemaduras, heridas y cortes (FAO, 2005).

En la actualidad la cera de abeja desempeña un papel importante en la medicina de los países occidentales ya que se han empezado a buscar productos naturales para ser utilizados junto con fármacos o incluso para reemplazarlos. Precisamente esta se usa para el cuidado de heridas y quemaduras en forma de ungüento (Fratini, Cilia, Turchi, & Felicioli, 2016). Hoy en día, la cera de abejas es ampliamente estudiada y utilizada para la medicina humana (Fratini, Cilia, Turchi, & Felicioli, 2016).

2.4.2 Propiedades de la cera de abeja

La cera de abeja es un producto hidrofóbico compuesto por grasa en su mayoría, este se utiliza para la construcción de los panales, es fabricada por las mismas abejas ya que estas poseen 8 glándulas para producirla, las cuales se encuentran en su abdomen. La cera se produce a partir de la alimentación con miel, las abejas son capaces de crearla en su propio organismo (Universidad de Valencia, 2016).

La cera de abeja es sólida, de coloración pálida, pero esto varía según la polinización de las abejas y del método de su fundición para su extracción, la temperatura a la que se funde es de entre 60 a 65 grados Celcius. La cera se utiliza de manera comercial para la industria ya sea farmacología, cosmética, entre otras. Es la cera de opérculo, que es la que recubre las celdas de los panales de abejas, está constituida según Universidad de Valencia, (2016) por:

- 1% Ácidos Estéres
- 1% Alcoholes Libres
- 2% Ácidos Poliestéres
- 3% Triésteres
- 4% Hidróxido Monoésteres

- 8% Hidróxido Poliésteres
- 12% Ácidos Libres
- 14% Diésteres
- 14% Hidrocarburos
- 35% Monoésteres
- 6% No Identificado

2.4.3 El uso de la cera dental en la medicina

Se describe en la literatura que la odontología se practica como una especialidad a partir del 300A.C. Años después en Asia a orillas del Mar Mediterráneo se describe que los fenicios en el 2500 empezaron los tratamientos odontológicos para restauración. El aparecimiento de la cera dentro de estos procesos se da en 1756, Pfaff utiliza la cera como un método nuevo para realizar la tomas de impresiones dentales, esta da el inicio a diferentes procesos como por ejemplo la impresión en yeso de Paris (Anusavice, 2004) .

Años después en 1839, se inventa la goma vocalizadora por Charles Goodyear, la cual permite que se pueda moldear las prótesis, facilitando el trabajo de darle una forma precisa para que esta se pueda ajustar en la boca del paciente. Hasta la actualidad está a pasado por distintos procesos como la mezcla con resinas acrílicas buscando una mejora (Anusavice, 2004).

Así en la actualidad el uso de la cera dental dentro de la medicina se da en su mayoría para los tratamientos odontológicos para restauración, estas se clasifican en tres tipos: cera para patrones, cera para procesado y cera para impresiones (Baxter, Hastings, Law, & Glass, 2008).

2.4.4 Propiedades de la cera Dental

La ceradental se compone de fuentes naturales o sintéticas dependiendo de su propósito. En el caso de la ceras para el uso dentro de la cavidad bucal, se

busca que estas cumplan con las propiedades de ser hidrófobas y no generar una respuesta del sistema inmunitario, generando una reacción de la línea blanca (Baxter et al., 2008).

Este tipo de material es realizado de forma estandarizada mediante la mezcla de (Baxter et al., 2008):

- Gomas
- Grasas
- Ácidos Grasos
- Aceites
- Resinas Naturales
- Resinas Sintéticas
- Colorantes

Estos compuestos varían en cantidad de acuerdo al fin que se busque con la cera como para fusionarlas o u expansión térmica donde se busca una cera solida la cual se expanda y sea maleable a una temperatura de 37 °C (Baxter et al., 2008).

2.5 Pruebas de Sensibilidad a Antibióticos (Antibiograma)

Estas pruebas se realizan para medir la sensibilidad o resistencia que tiene una bacteria a un determinado grupo de antibióticos, se realizan por medio de técnicas estandarizadas en un laboratorio de microbiología donde se evalúan las reacciones que tienen las bacterias durante un periodo de tiempo determinado a un antibiótico específico (Coyle et al., 2005).

En el caso de los antibióticos, su uso por medio de estas pruebas se determina una vez estudiada la eficacia de la sustancia como agente microbiano. Esta debe tener la capacidad de combatir o impedir el crecimiento de las bacterias, Así en un futuro este elemento podrá ser utilizado como tratamiento después de varios estudios más (Cuervo Mulet, 2010).

El fin de las pruebas de antibiograma es brindar una opción segura al paciente que cursa por un proceso infeccioso ya que le brinda la posibilidad de tener un tratamiento acertado combatiendo el agente microbiano por completo. Por otro lado estas pruebas han servido a la ciencia como un método de control para tratamientos que se brindan a pacientes de forma irresponsable sin saber el verdadero agente causal. Permitiendo ver si el tratamiento es acertado o corregirlo (Coyle et al., 2005).

En algunas circunstancias se las puede utilizar como pruebas diagnósticas ya que se va descartando los agentes bacterianos dependiendo de su susceptibilidad o su resistencia siendo un método para la identificación del agente causal (Dolinsky, 1994).

2.5.1 Pruebas de difusión por disco

Las Pruebas por disco de difusión o también conocido como método de Kirby-Bauer, es un método diseñado para determinar la sensibilidad de una bacteria a un antibiótico específico, esta es una de las pruebas de antibiograma más comunes ya que permite medir la susceptibilidad de la bacteria seleccionada contra un agente antimicrobiano (Cuervo Mulet, 2010).

Este está compuesto por un agar, el cual es la superficie donde se colocará el micro organismo, para realizar pruebas de antibiograma. El agar que se debe utilizar es conocido como Muller-Hinton ya que este permite realizar las pruebas con alta sensibilidad, para la inoculación de las bacterias en el agar se debe poner una cantidad estandarizada y se cubre la superficie con la solución para luego colocar los discos de antibiograma con antibiótico hechos con papel filtro, cuando transcurre el tiempo el antibiótico se comienza a difundir en forma circular uniforme (Bush, 1991).

Este método se debe tener en incubación y después de las 24 horas se empiezan a realizar las lecturas donde se miden los halos de inhibición los que

indican la acción antibiótica de la sustancia colocada en los discos (Coyle et al., 2005).

2.5.2 Bacterias American Type Culture Collection (ATCC)

Estas bacterias son microorganismos usados como una herramienta precisa, para tener un proceso certificado y de calidad, cuando se realizan cultivos bacterianos. Ya que estas son certificadas y contienen un manual el cual especifica a que son resistentes o susceptibles cada una de las cepas de estas bacterias según su numeración. Así se las puede identificar por su fenotipo y genotipo. Siendo fáciles de identificar evitando el sesgo en los estudios de laboratorio (Acreditado et al., 2015)

3. CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación

El estudio de carácter experimental se realizó en Quito – Ecuador, en la sede Granados de la Universidad de las Américas, donde se encuentran los laboratorios de microbiología (Av. De los Granados y Colimes, Quito 170513), las coordenadas: Latitud: -0.16806; longitud: -78.470537 (Figura 2).

El Distrito Metropolitano de Quito se encuentra ubicado en la provincia de Pichincha, es la capital del Ecuador, por su altitud corresponde a una zona ecuatorial templada, en la que las variaciones de temperatura durante el día según las horas son muy significativas. La humedad relativa es de alrededor del 76% y la presión atmosférica promedio es de 548 milibares. La variación de los totales pluviométricos es grande así que se considera que tiene un promedio de pluviosidad de 2.000 mm. Estas variaciones están sujetas a las condiciones orográficas (altitud, orientación de las vertientes, relieves de los alrededores de las cuencas, etc.) (MDMQ, 2008).

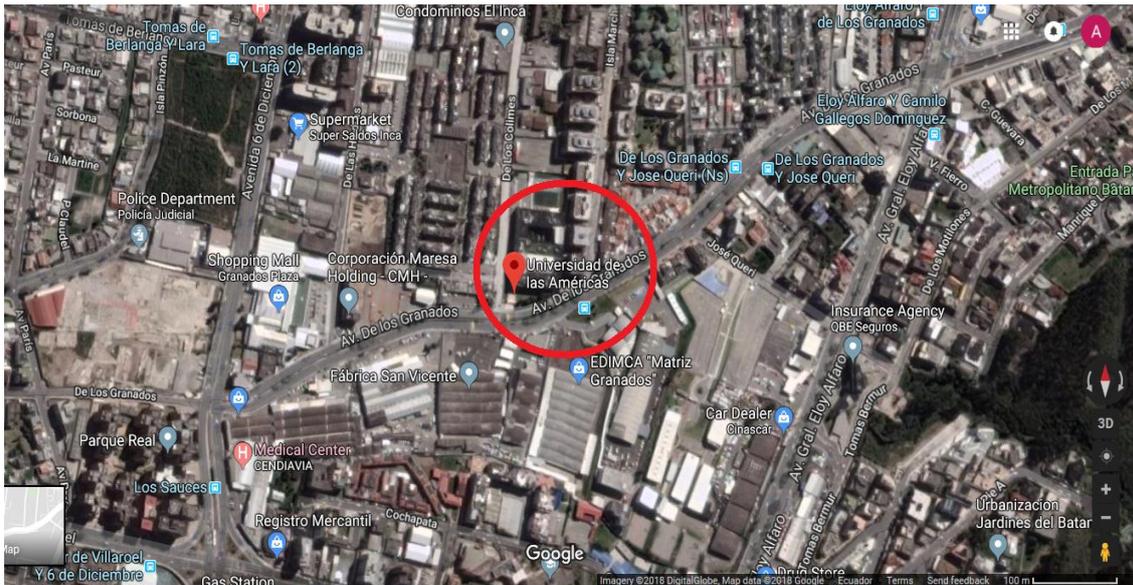


Figura 3. Ubicación del estudio

Referencia: Google Maps. Recuperado del internet el 20 de Mayo del 2018 de:
<https://www.google.com/maps/place/UDLA+Granados/@-0.1664299,-78.4857765,15z/data=!4m8!1m2!2m1!1sudla+granados!3m4!1s0x0:0xfce8200a72dfa9e4!8m2!3d-0.16789!4d-78.4725872>

3.2 Población y muestra

Este estudio fue realizado en laboratorio, con todos los parámetros controlados y con bacterias ATCC, por lo que no se contempla población, pero en su defecto se realizaron 30 repeticiones por muestra, para desarrollar un análisis estadístico con un 95% de confianza (Cuervo Mulet, 2010).

Las muestras para este estudio se dividieron en tres grupos con 30 repeticiones para cada una con las siguientes diluciones de antibiótico:

- Amikacina comercial de 1gramo con 20ml de cloruro de sodio dilución al 0.025% 30 repeticiones.
- Amikacina comercial de 1gramo con 40ml de cloruro de sodio dilución al 0.0125%. 30 repeticiones.
- Amikacina comercial de 1gramo con 60ml de cloruro de sodio dilución al y 0.0083%. 30 repeticiones.

Estas tres diluciones se realizarán por cada uno de los métodos de difusión. Para el grupo control se utilizará la Amikacina comercial diluida con cloruro de sodio (NaCl al 0.09%) y se colocará en los discos de papel filtro, por cada una de las evaluaciones (Tabla 2).

Tabla 2
Grupos y Diluciones de Amikacina.

| | Grupo 1 Método 1 Cera de abeja | Grupo 2 Método 2 Cera dental | Grupo 3 Grupo control Amikacina |
|--|---|---|--|
| Dilución 1gramo de Amikacina con 20ml de NaCl al 0.09%. <u>Dilución 0.025%.</u> | 30 Repeticiones | 30 Repeticiones | 2 Repeticiones |
| Dilución 1gramo de Amikacina con 40ml de NaCl al 0.09%. <u>Dilución 0.0125%.</u> | 30 Repeticiones | 30 Repeticiones | 2 Repeticiones |
| Dilución 1gramo de Amikacina con 60ml de NaCl al 0.09%. <u>Dilución 0.0083%.</u> | 30 Repeticiones | 30 Repeticiones | 2 Repeticiones |

3.3 Materiales

En la siguiente tabla se presentan los materiales y la indumentaria necesaria que se utilizó para este trabajo de titulación.

Tabla 3
Materiales e Indumentaria

| Materiales | Indumentaria |
|---|---------------------|
| - Cultivo bacterias ATCC | - Mandil |
| - Amikacina de 1g | - Cofia |
| - Cloruro de sodio NaCl 0,09% | - Mascarilla |
| - Jeringas de 60ml | - Guantes estériles |
| - Vidrios | - Gafas |
| - Agar Mueller-Hinton | |
| - Discos de cera de abeja (Estandarizada y esterilizada) | |
| - Discos de cera dental (Estandarizada de distribuidor comercial) | |
| - Discos de papel filtro | |
| - Regla | |
| - Asa de platino | |
| - Mechero | |

3.4 Metodología

El estudio es de carácter experimental de forma *in vitro* con bacterias ATCC *S. Aureus* ATCC BAA976 cultivadas en agar Mueller-Hinton. Lo primero que se realizó es un protocolo estandarizado para el cultivo de las bacterias ATCC en agar madre, 24 horas después de igual manera se utilizó el protocolo indicado para las 30 repeticiones de los agares como se detalla en el CLSI (Dolinsky, 1994).

Una vez realizado el agar madre se procedió a preparar los materiales que se utilizaron en este estudio, primero se perforó el papel filtro para simular los discos control proporcionados por las farmacéuticas manejados para las pruebas de antibiograma y control de los halos de inhibición, los discos una vez perforados se enviaron al auto clave y colocar el antibiótico una vez esterilizados, así para este estudio se manejó 2 grupos utilizando discos de Gentamicina 10mg los cuales son los utilizados por los laboratorios en pruebas con estas bacterias y bajo las condiciones en las que se desarrolló el estudio ya que las bacterias ATCC utilizadas son sensibles a la Gentamicina, por otra parte la Amikacina 10mg se la utilizo como se describe por Coyle et al,(2005).

Para este estudio se utilizó la misma cantidad de cera de abeja como de cera dental en cada una de las tres diluciones, siendo 21,50gr de cera para cada subgrupo Tabla 6. Se utilizó de igual manera 5ml de aceite de glicerina para las seis diluciones.

Tanto la cera de abeja como la cera dental son compuestos hidrófobos. Para poderlas mezclar con el antibiótico es necesario llevarlas a un estado líquido calentándolas, posteriormente se agregó el aceite de glicerina al tener una mezcla homogénea ya que este permite estabilizar la mezcla logrando que las ceras contengan el antibiótico (Cruz, López, Haro, & Berba, 2012).

La concentración de antibiótico destinada para cada uno de los 6 subgrupos se colocó ya cuando se retiraba la cera estabilizada con la glicerina del calor, colocándola posteriormente en un papel aluminio esterilizado con alcohol, extendiendo la cera para conseguir las láminas y enfriarla. Las láminas obtenidas luego se perforaban con una perforadora estéril realizando los discos de antibiograma. Este proceso se cumplió de la misma forma para la cera de abeja y cera dental.

Para realizar las diluciones de antibiótico en la cera de abeja y la cera dental se tomó en cuenta el criterio de RLP, el cual indica que se debe utilizar un gramo de Amikacina comercial mezclado con cloruro de sodio NaCl al 0.09%, el volumen con el que se mezcla el antibiótico dependerá de la región donde se desea hacer la perfusión teniendo siempre en cuenta que se puede diluir de la siguiente manera (Rubio-Martínez & Cruz, 2006).:

- 1 Gramo de Amikacina con 20ml de NaCl a 0.09%
- 1 Gramo de Amikacina con 40ml de NaCl a 0.09%
- 1 Gramo de Amikacina con 60ml de NaCl a 0.09%

Los cálculos para obtener estos volúmenes se realizaron con la fórmula: Ecuación de dilución ($C_i V_i = C_f V_f$) así se lograron realizar las diluciones requeridas para este estudio (Dolinsky, 1994). Tomando como volumen total 10ml de cada dilución, con la fórmula se logró completar la cantidad de Amikacina necesaria en un volumen de 10ml de NaCl al 0.09% para lograr el porcentaje de cada dilución como se muestra en la (Tabla 2). Así para completar los porcentajes de dilución en los 10ml, utilizando el mismo frasco de Amikacina comercial se necesitaron las concentraciones de Amikacina que se muestran en la (Tabla 4):

Tabla 4
Diluciones

| (%) Dilución | Cantidad de Amikacina miligramos (mg) | Cantidad en microlitros (μ l) |
|---|---|------------------------------------|
| 1 gramo de Amikacina con 20ml de NaCl al 0.09%. Dilución 0.025%. | 5 mg de Amikacina comercial de un gramo | 200 μ l |
| 1 gramo de Amikacina con 40ml de NaCl al 0.09%. Dilución 0.0125%. | 2,5 mg de Amikacina comercial de un gramo | 100 μ l |
| 1 gramo de Amikacina con 60ml de NaCl al 0.09%. Dilución 0.0083%. | 1,7 mg de Amikacina comercial de un gramo | 68 μ l |

Una vez perforadas, las láminas de cada una de las ceras en las diluciones antes mencionadas, se generaron los discos y se colocaron según su grupo y subgrupo.

Las 30 cajas Petri se dividieron cada una en 6 partes iguales por fuera como se indica en la figura 4, con un marcador. Una vez realizada la siembra de las bacterias se colocó un disco de cada una de las diluciones de cera de abeja y de cera dental en cada uno de los espacios según le correspondía, para así probar las seis diluciones distintas bajo el mismo medio bacteriano.

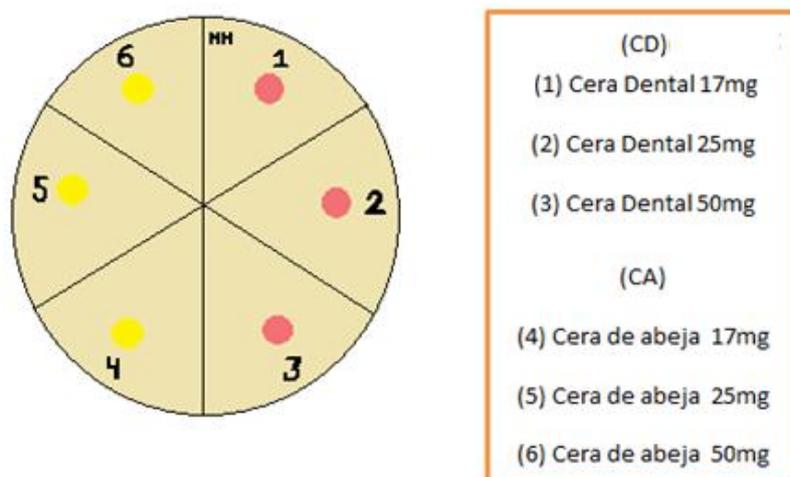


Figura 4. División y codificación de cajas Petri por subgrupos

Para los grupos control se escogieron dos cajas al azar que fueron la número 8 y 9, las cuales estaban divididas de la misma manera.

En la caja número 9 y se colocó tres discos de 10mg de Gentamicina y tres papeles filtros con 10mg de Amikacina en la forma comercial. En la caja número 8 se colocaron dos papeles filtros con cada una de las diluciones propuestas para el estudio simulando cada sub grupo, cada papel filtro contenía 5 microlitros de cada dilución. Este procedimiento se llevó a cabo con los protocolos estipulados en el CLSI (Coyle et al., 2005)

Una vez maduro, el agar madre con las cepas de *Staphylococcus aureus*. ATCC BAA976, de donde se extrajeron antes de cumplir 24 horas las colonias para hacer el método de dilución con la escala de McFarland, se procedió a realizar las 30 repeticiones en los agares Mueller-Hinton.

Este proceso consiste en seleccionar las colonias del agar madre que se consideran las más apropiadas para realizar la dilución de McFarland, se selecciona las colonias con mejor forma y madurez lo que asegura que las colonias son las ideales para realizar el caldo de cultivo, de igual manera permitirán una mejor estandarización de la suspensión, lo ideal es seleccionar de 3 a 5 colonias para tener un mayor éxito en la formación del caldo (Cuervo Mulet, 2010).

Para la preparación del inocuo, se utilizó el método de suspensión directa de colonias ya que esta provee resultados precisos y es la que se realiza en estudios de carácter experimental, así se busca una suspensión de turbidez estandarizada usando la escala de 0,5 de McFarland esta dilución contiene aproximadamente de $1,5 \times 10^8$ CFU/ml (Coyle et al., 2005).

La inoculación de los agares se realizó con el protocolo del CLSI. Se tomó todas las precauciones de bioseguridad utilizando guantes estériles, mascarilla y mandil. Así el protocolo que se instauró para el cultivo fue con el método Francés Figura 5, el cual consiste en flamear la asa de trépalos y tomar la muestra de las bacterias ATCC en la dilución de McFarland y se las colocó en la caja Petri con inoculación extendida por el agar Mueller-Hinton extendiendo de forma homogénea las bacterias en el agar (Cuervo Mulet, 2010).

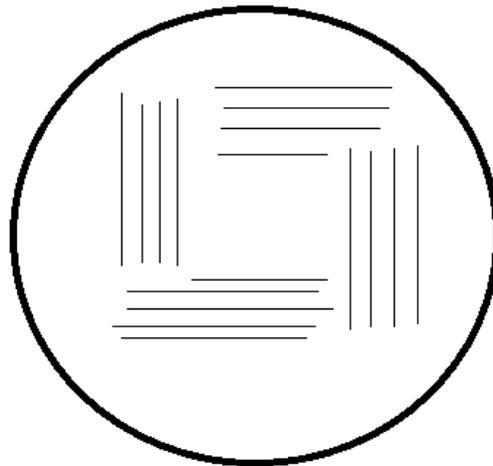


Figura 5. Cultivo en Agar

Todo este proceso y las mezclas se realizó de forma estéril para tener dentro del agar solo las bacterias ATCC del cultivo. Así se muestran a continuación los métodos de difusión en la Figura6. En esta finura también se muestra la codificación de los discos por grupos cera de abeja, cera dental y controles.

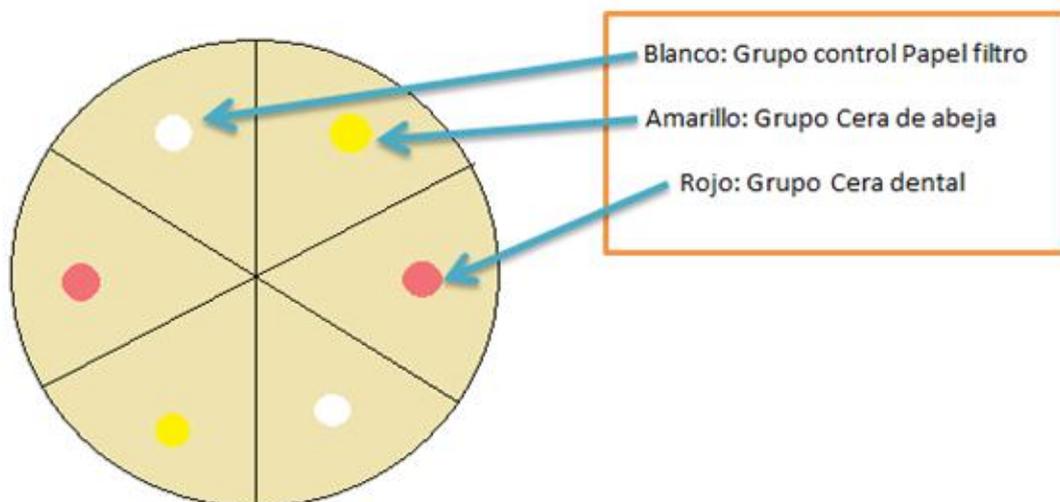


Figura 6. Métodos de Difusión

Las lecturas de los agares se realizaron tres veces. Para las tomas de datos se hicieron a las 24, 48 y 72 horas después de colocar las placas en la incubadora la lectura se realizaba en un tiempo aproximado de 15 minutos para que las

placas no se vean afectadas por el cambio de temperatura, la medición se la realizo en milímetros (mm), con un pie de rey electrónico se midieron solo los halos bien formados. La medida que se utilizo fue entre los bordes externos del halo.

Para realizar la medición se examinaba primero las placas y se utilizaban como datos los halos que tenían un crecimiento uniforme lo que permitía identificar claramente la zona de crecimiento bacteriano como se indica en la Figura 7, ya que en este estudio se midieron los halos de inhibición desde la parte trasera de la caja Petri donde se encontraba la numeración y codificación como se indicó en la figura 4 se utilizó luz para visualizar mejor los halos y luego se los midió como se mencionó anteriormente. Dado a que se utilizó un calibrador electrónico una vez que se realizaba la lectura de 5 placas se lo enceraba de nuevo para la medición de las 5 placas siguiente y así consecutivamente hasta terminar de leer todas las placas

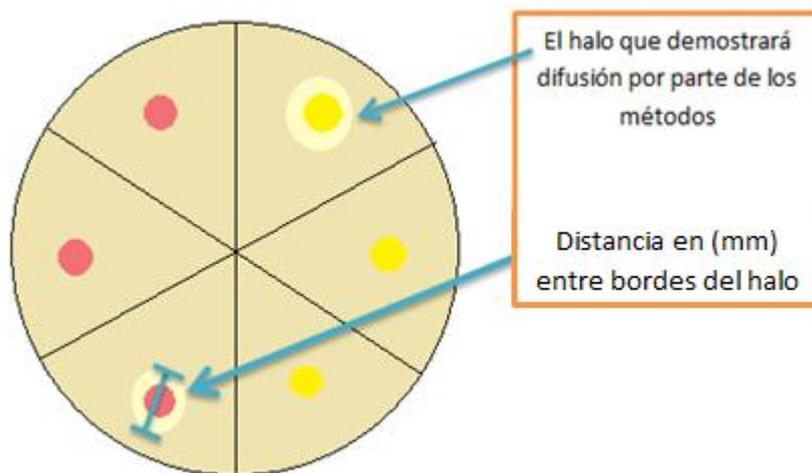


Figura 7. Medición de halos de inhibición

Los datos obtenidos de los halos de inhibición por cada sub grupo se tabularon en una tabla la cual compara la difusión de los subgrupos en milímetros (mm), y los compara con la misma dilución del otro grupo como se muestra a continuación en la Tabla 5. Esta tabla permitió tabular las 30 repeticiones por los tres días para cada numeración de caja así con la codificación ya mencionada en la Figura 4, se tabularon los datos con mayor rapidez y eficacia.

Tabla 5

Tabulación de Datos Tamaño Halo de Inhibición (mm)

| Día | Numero De Caja | 50mg/20ml | | 25mg/40ml | | 17mg/60ml | |
|-----|----------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|
| | | Cera de Abeja Halo (mm) | Cera Dental Halo (mm) | Cera de Abeja Halo (mm) | Cera Dental Halo (mm) | Cera de Abeja Halo (mm) | Cera Dental Halo (mm) |
| 1 | 1 | | | | | | |
| 1 | 2 | | | | | | |
| 1 | 3 | | | | | | |
| 2 | 1 | | | | | | |
| 2 | 2 | | | | | | |
| 2 | 3 | | | | | | |
| 3 | 1 | | | | | | |
| 3 | 2 | | | | | | |
| 3 | 3 | | | | | | |

Para la valoración de los halos de inhibición con la medida (mm), se los separo en cuatro grupos distintos como se muestra en la Tabla 6 a continuación donde se los agrupo según su crecimiento para ver si son significativos o no según el tamaño del halo y el uso de la Amikacina como antibiótico. Para realizar este grupo se tomaron las referencias otorgadas por el CLSI-2018 para la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 utilizada para las pruebas de antibiograma con difusión de discos en mm (Dolinsky, 1994).

Tabla 6

Grupos de Susceptibilidad por Formación del Halo (mm)

| Grupos de Susceptibilidad por Formación del Halo (mm) | | |
|---|-----------------------|-----------------|
| Grupo | Descripción | Diámetro (mm) |
| NFH | No Formación de Halo | 0 |
| + | Nada Sensible | 0,001 – 5, 000 |
| ++ | Medianamente Sensible | 5,001 – 10,000 |
| +++ | Altamente Sensible | 10,001 – 25.000 |

3.4.1 Variables

Las variables se presentan en a tabla 7.

Tabla 7
Variables

| Variables | Característica | Tipo Variable | Definición | Indicador | Unidad de medida | Ítems | Instrumentos |
|---------------------------------------|----------------|-------------------------|--|---|------------------|------------------|------------------|
| Ceras | Independiente | Cualitativa | El tipo de cera que se va a usar cera de abeja vs. cera dental | Uso del tipo de cera | N/A | Si o no | Medición directa |
| Concentración de dilución Antibiótico | Independiente | Cuantitativa / Continua | Cantidad de disolución de antibiótico en las ceras. antibiótico en diferentes diluciones de NaCl 0,09% | El halo que forma en el agar Mueller-Hinton con las bacterias ATCC cada 12 horas | mm. | # de centímetros | Medición directa |
| Halo de Inhibición | Dependiente | Cuantitativa / Continua | Ver la capacidad de difusión de cada una de las ceras por separado | El tamaño del halo cada 12h | mm | # de centímetros | Medición directa |
| Tamaño de formación del halo | Dependiente | Cuantitativa / Continua | El tamaño del halo permitirá ver la acción del antibiótico en contra de las bacterias | El tamaño del halo cada 12 horas | mm | # de centímetros | Medición directa |
| Bacterias ATCC | Controlada | Cualitativa | El tipo de bacterias estandarizadas que se utilizaran para las repeticiones del estudio | Bacterias controladas no resistentes a antibióticos | N/A | N/A | N/A |
| Antibiótico en estado puro | Controlada | Cuantitativa / continua | Valoración visual en base al crecimiento del halo | Valoración cada 12 horas del tamaño del halo | mm | # de centímetros | Medición directa |

3.4.3 Diseño experimental

Es un estudio experimental, transversal, observacional y aleatorio. En el cual se establecieron 2 grupos experimentales con tres subgrupos por las diluciones del antibiótico en cada uno de los grupos experimentales, a los que se sumaron dos grupos controles. Como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 8
División Grupos y Subgrupos

| Grupos | Subgrupo |
|------------------|-----------------------------|
| 1. Cera De Abeja | 1.1 Dilución Amikacina 50mg |
| | 1.2 Dilución Amikacina 25mg |
| | 1.3 Dilución Amikacina 17mg |
| 2. Cera Dental | 2.1 Dilución Amikacina 50mg |
| | 2.2 Dilución Amikacina 25mg |
| | 2.3 Dilución Amikacina 17mg |
| 3. Control | 3.1 Amikacina 10mg |
| 4. Control | 4.1 Gentamicina 10mg |

4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados que se muestran a continuación corresponden a 30 repeticiones donde se probaron dos grupos, Cera de Abeja y Cera Dental como métodos de difusión de tres diferentes diluciones de Amikacina en NaCl al 0,09%, usando como prueba de antibiograma bacterias ATCC *S. Aureus* BAA976 cultivadas en agar Mueller-Hinton.

4.1 Resultados Univariados

4.1.1 Frecuencias

Los resultados que se presentan son las frecuencias de formación de halos por cada uno de los sub grupos en sus 90 lecturas para las 30 repeticiones. Los valores que se obtuvieron por medio de la estadística descriptiva demuestran que los 90 datos son válidos, determinando que las medias entre grupos son diferentes. Por otro lado la desviación estándar nos muestra que existe mucha variación entre los datos como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9

Frecuencias Estadísticas Formación de Halos (mm) Subgrupos

Nota: 50mg_CeraAbeja_HALO = Formación de Halo Cera de Abeja 50mg; 50mg_CeraDental_HALO = Formación de

| | 50mg_CeraAbeja_HALO | 50mg_CeraDental_HALO | 25mg_CeraAbeja_HALO | 25mg_CeraDental_HALO | 17mg_CeraAbeja_HALO | 17mg_CeraDental_HALO |
|----------------------------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| N | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 |
| Válido | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 |
| Perdidos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Media | ,7292 | ,9928 | 1,5261 | ,4771 | ,9878 | 1,5177 |
| Error estándar de la media | ,27024 | ,32157 | ,32536 | ,21515 | ,28835 | ,32652 |
| Mediana | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 |
| Moda | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Desviación estándar | 2,56376 | 3,05067 | 3,08662 | 2,04108 | 2,73557 | 3,09765 |
| Varianza | 6,573 | 9,307 | 9,527 | 4,166 | 7,483 | 9,595 |
| Rango | 11,25 | 12,66 | 9,53 | 10,36 | 11,86 | 9,95 |
| Mínimo | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Máximo | 11,25 | 12,66 | 9,53 | 10,36 | 11,86 | 9,95 |

Halo Cera Dental 50mg; 25mg_CeraAbeja_HALO = Formación de Halo Cera de Abeja 25mg; 25mg_CeraDental_HALO = Formación de Halo Cera Dental 25mg; 17mg_CeraAbeja_HALO = Formación de Halo Cera de Abeja 17mg; 17mg_CeraDental_HALO = Formación de Halo Cera Dental 17mg.

La Tabla 9, nos demuestran la validez del estudio ya que no se considera ningún dato como perdido, los resultados positivos son en diferentes concentraciones y distintas repeticiones considerándose como datos dispersos.

Es una cantidad mínima a comparación del tamaño del estudio pero en estudios realizados como el de la "Lectura interpretada del antibiograma de cocos gram positivos" presentan que la Amikacina (AMK) es sensible para *S. Aureus*, demostrando que el uso de este antibiótico para la prueba de antibiograma es la adecuada (C. Torres & Cercenado, 2010)

La susceptibilidad de la formación de los halos por la parte de los subgrupos se agrupo según la Tabla 6.

Las frecuencias nos muestran que en los 6 subgrupos No Formación de Halo (NFH) varía entre el 80 y 94,4 %, mientras que la formación del halo es medianamente sensible (++) para todos los sub grupos, demostrando que el sub grupo con mayor porcentaje para esta concentración fue SCD17, por otro lado de los 6 sub grupos solo 4 logran tener Altamente Sensible (+++). Como se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10
Frecuencias Subgrupos Susceptibilidad por Formación del Halo (mm)

| | SCA50 | | SCD50 | | SCA25 | | SCD25 | | SCA17 | | SCD17 | |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % |
| NFH | 83 | 92,2 | 81 | 90,0 | 72 | 80,0 | 85 | 94,4 | 80 | 88,9 | 72 | 80,0 |
| + | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ++ | 4 | 4,4 | 6 | 6,7 | 18 | 20,0 | 2 | 2,2 | 9 | 10,0 | 18 | 20,0 |
| +++ | 3 | 3,3 | 3 | 3,3 | 0 | 0 | 3 | 3,3 | 1 | 1,1 | 0 | 0 |
| Total | 90 | 100,0 | 90 | 100,0 | 90 | 100,0 | 90 | 100,0 | 90 | 100,0 | 90 | 100,0 |

Nota: SCA50 = Susceptibilidad Cera de Abeja 50mg; SCD50 = Susceptibilidad Cera Dental 50mg; SCA25 = Susceptibilidad Cera de Abeja 25mg; SCD25 = Susceptibilidad Cera Dental 25mg; SCA17 = Susceptibilidad Cera de Abeja 17mg; SCD17 = Susceptibilidad Cera Dental 17mg.

En la Tabla 10, se muestra que dentro de la mayoría de grupos, la no formación del halo tiene un porcentaje de entre 80 al 94,4 %, esto nos indica que el método tiene una acción difusora parcial del antibiótico, sugiriendo una no homogenización dentro de la fórmula.

Pero en los dos grupos no se dio crecimiento bacteriano dentro de las ceras, lo que nos demuestra que estas retuvieron un porcentaje de antibiótico ya que según el estudio "Beeswax: A minireview of its antimicrobial activity and its application in medicine" donde muestra que el S. Aureus tiene un crecimiento moderado dentro de la cera de abeja (Fratini et al., 2016).

La formación del halo de inhibición en los 6 subgrupos estuvo entre un rango de 14 al 26,7%, estos datos recopilan la información de los tres días en las 30 repeticiones, demostrando que son pocos el número de discos de difusión que formaron los halos, como se evidencia en la Tabla 11.

Tabla 11
Formación del Halo

| | 50mg_FH | | | | 25mg_FH | | | | 17mg_FH | | | |
|----------|---------|-------|----|-------|---------|-------|----|-------|---------|-------|----|-------|
| | CA | | CD | | CA | | CD | | CA | | CD | |
| | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % |
| Sin Halo | 77 | 85,6 | 75 | 83,3 | 66 | 73,3 | 79 | 87,8 | 73 | 81,1 | 66 | 73,3 |
| Con Halo | 13 | 14,4 | 15 | 16,7 | 24 | 26,7 | 11 | 12,2 | 17 | 18,9 | 24 | 26,7 |
| Total | 90 | 100,0 | 90 | 100,0 | 90 | 100,0 | 90 | 100,0 | 90 | 100,0 | 90 | 100,0 |

Nota: 50mg_FH = Formación de Halo 50mg; 25mg_FH = Formación de Halo 25mg; 17mg_FH = Formación de Halo 17mg.

En la Tabla 11, las diluciones presentan formaciones de halos similares, donde se explica que no hay alteraciones con la formación del halo con las diluciones, sino que se mantienen la misma cantidad de solutos en una concentración de volumen mayor, afirmando lo dicho en el estudio "Antimicrobial regional limb perfusion in horses" demostrando que las cantidades de NaCl al 0,09% solo incrementan la osmolaridad con fines de intercambio por presiones a nivel de los capilares (Rubio-Martínez & Cruz, 2006).

La contaminación de los halos es algo normal dentro de estas pruebas, así si comparamos la Tabla 11 con la Tabla 12 donde tenemos que el crecimiento dentro del halo de inhibición para este estudio fue del 0,00% al 0,29%, teniendo un numero bajo de contaminaciones en los casos que se formó el halo.

Tabla 12
Contaminación del Halo

| | CDH50mg | | | | CDH25mg | | | | CDH17mg | | | |
|-------------------|---------|-------|----|-------|---------|-------|----|-------|---------|-------|----|-------|
| | CA | | CD | | CA | | CD | | CA | | CD | |
| | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % |
| Sin Contaminacion | 88 | 97,8 | 89 | 98,9 | 90 | 100,0 | 89 | 98,9 | 85 | 94,4 | 89 | 98,9 |
| Con Contaminacion | 2 | 2,2 | 1 | 1,1 | 0 | 0,0 | 1 | 1,1 | 5 | 5,6 | 1 | 1,1 |
| Total | 90 | 100,0 | 90 | 100,0 | 90 | 100,0 | 90 | 100,0 | 90 | 100,0 | 90 | 100,0 |

Nota: CDH50mg = Contaminación del Halo 50mg; CDH 25mg = Contaminación del Halo 25mg; CDH 17mg = Contaminación del Halo 17mg.

La Tabla 12, señala que los protocolos instaurados para el presente estudio son los adecuados, ya que la contaminación dentro de los halos es baja para el agar que se utilizó.

Se obtuvo como valor más alto el 5,6% demostrando que el antibiótico fue el adecuado en una correcta dilución, ya que la Amikacina es uno de los antibióticos predilectos para estas pruebas como se detalla en "Lectura interpretada del antibiograma de cocos gram positivos" pero se pudo encontrar crecimiento de bacterias medianamente resistente descrito por (C. Torres & Cercenado, 2010).

4.2 Resultados Bivariados

A continuación se presentan los datos bivariados de las frecuencias entre subgrupos al comparar las diferentes diluciones dentro del mismo grupo Cera de Abeja (CA), por medio de una tabla la cual permitió confrontar si hay diferencia entre la lectura de formación de halo de este grupo en cada una de las lecturas (24, 48 y 72 horas).

En la tabla 13, se muestra que no existen cambios, indicando que para el grupo la generación de halo dentro de las primeras 24 horas decide su presentación o no, durante las tres lecturas del estudio, con la excepción del subgrupo (17mg_FH_CA) donde pasadas las 24 horas se dio un cambio, generando una formación de halo más en una repetición.

Con respecto a los controles de las diluciones para cada subgrupo, estos se mantienen igual con lo que refiere a la presencia del halo formando durante la primera lectura (24 horas) hasta su última lectura (72 horas).

Tabla 13
Formación de Halo Subgrupos y Controles durante 72 horas (CA)

| | | 50mg_FH_CA | | 25mg_FH_CA | | 17mg_FH_CA | | |
|-------|---------|------------|----------|------------|----------|------------|----------|---|
| | | Sin Halo | Con Halo | Sin Halo | Con Halo | Sin Halo | Con Halo | |
| | | Recuento | Recuento | Recuento | Recuento | Recuento | Recuento | |
| Grupo | Muestra | Día 1 | 25 | 3 | 22 | 6 | 25 | 3 |
| | | Día 2 | 26 | 2 | 22 | 6 | 24 | 4 |
| | | Día 3 | 26 | 2 | 22 | 6 | 24 | 4 |
| | Control | Día 1 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 |
| | | Día 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 |
| | | Día 3 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 |

Nota: 50mg_FH_CA = Formación de Halo Cera de Abeja 50mg; 25mg_FH_CA = Formación de Halo Cera de Abeja 25mg; 17mg_FH_CA = Formación de Halo Cera de Abeja 17mg.

Los datos bivariados para el grupo Cera Dental (CD), se muestran en la Tabla 13, para evidenciar si existe o no diferencia en la formación del halo de inhibición para cada subgrupo durante cada una de sus lecturas (24,48 y 72 horas).

Por medio del mismo método estadístico se obtuvo que para este grupo las primeras 24 horas determinan si habrá presencia de halo para las repeticiones de cada sub grupo a lo largo del estudio.

Para el subgrupo 25mg_FH_CD se observó que existe la formación de halo posterior a las 24 horas. Con respecto a los controles en todos los subgrupos presentaron la formación del halo que mantuvieron durante el estudio antes de su primera lectura (24 horas), como se muestra a continuación en la (Tabla 14).

Tabla 14
Formación de Halo Subgrupos y Controles durante 72 horas (CD)

| | | 50mg_FH_CD | | 25mg_FH_CD | | 17mg_FH_CD | | |
|-------|---------|------------|----------|------------|----------|------------|----------|---|
| | | Sin Halo | Con Halo | Sin Halo | Con Halo | Sin Halo | Con Halo | |
| | | Recuento | Recuento | Recuento | Recuento | Recuento | Recuento | |
| Grupo | Muestra | Día 1 | 25 | 3 | 27 | 1 | 22 | 6 |
| | | Día 2 | 25 | 3 | 26 | 2 | 22 | 6 |
| | | Día 3 | 25 | 3 | 26 | 2 | 22 | 6 |
| | Control | Día 1 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 |
| | | Día 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 |
| | | Día 3 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 |

Nota: 50mg_FH_CD = Formación de Halo Cera Dental 50mg; 25mg_FH_CD = Formación de Halo Cera Dental 25mg; 17mg_FH_CD = Formación de Halo Cera Dental 17mg.

La presentación de los datos bivariados para la formación de halo por subgrupos y controles durante 72 horas como se muestra en las Tablas 13-14, se tiene como resultado que la formación del halo dentro de las primeras 24 horas será crucial para las lecturas posteriores hasta cumplir las 72 horas.

Demostrando el amplio espectro del antibiótico, al comparar los subgrupos se ve que la formación de los halos es baja para el método pero efectivamente alta para los controles los cuales utilizaron como difusores papel filtro más las mismas diluciones de los subgrupos, según el método convencional y estudios como "Lectura interpretada del antibiograma de cocos gram positivos" los datos obtenidos para los controles afirman la larga acción y alta sensibilidad de la Amikacina (C. Torres & Cercenado, 2010).

La Tabla 15, muestra las comparaciones de variables por un ANOVA donde se comparan los datos entre subgrupos evidenciando si los datos que se comparan son significativos o no, para el presente estudio los datos obtenidos en la siguiente tabla, muestran que no hay diferencia entre los datos obtenidos para los grupos y los subgrupos en cada una de sus diluciones.

Tabla 15
ANOVA Comparación de Variables Grupos y sub grupos

| | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|----------------------|---------------------|----------------------|----|---------------------|-------|------|
| 50mg_CeraAbeja_HALO | Entre grupos | 3,418 | 1 | 3,418 | ,517 | ,474 |
| | Dentro de grupos | 581,568 | 88 | 6,609 | | |
| | Total | 584,986 | 89 | | | |
| 50mg_CeraDental_HALO | Entre grupos | 6,336 | 1 | 6,336 | ,678 | ,412 |
| | Dentro de grupos | 821,950 | 88 | 9,340 | | |
| | Total | 828,286 | 89 | | | |
| 25mg_CeraAbeja_HALO | Entre grupos | 14,972 | 1 | 14,972 | 1,582 | ,212 |
| | Dentro de grupos | 832,948 | 88 | 9,465 | | |
| | Total | 847,921 | 89 | | | |
| 25mg_CeraDental_HALO | Entre grupos | 1,463 | 1 | 1,463 | ,349 | ,556 |
| | Dentro de grupos | 369,311 | 88 | 4,197 | | |
| | Total | 370,775 | 89 | | | |
| 17mg_CeraAbeja_HALO | Entre grupos | 6,272 | 1 | 6,272 | ,837 | ,363 |
| | Dentro de grupos | 659,747 | 88 | 7,497 | | |
| | Total | 666,019 | 89 | | | |
| 17mg_CeraDental_HALO | Entre grupos | 14,807 | 1 | 14,807 | 1,553 | ,216 |
| | Dentro de grupos | 839,189 | 88 | 9,536 | | |
| | Total | 853,996 | 89 | | | |

Nota: 50mg_CeraAbeja_HALO = Formación de Halo Cera de Abeja 50mg; 50mg_CeraDental_HALO = Formación de Halo Cera Dental 50mg; 25mg_CeraAbeja_HALO = Formación de Halo Cera de Abeja 25mg; 25mg_CeraDental_HALO = Formación de Halo Cera Dental 25mg; 17mg_CeraAbeja_HALO = Formación de Halo Cera de Abeja 17mg; 17mg_CeraDental_HALO = Formación de Halo Cera Dental 17mg;

Por medio del Anova y la comparación de los sub grupos, en las lecturas que se muestran no existe significancia para el estudio teniendo como resultado poca difusión, pero por los datos obtenidos por estudio y los protocolos instaurados para el presente estudio de evidencia que no se da una falla por parte del antibiótico (C. Torres & Cercenado, 2010).

Para culminar se muestra una tabla de comparaciones múltiples de los controles donde se toman como variables dependientes cada uno de los grupos controles y sub grupos controles teniendo como resultado que los datos

no son significativos y una ausencia del grupo (Amikacina_25mg), ya que el programa estadístico no los toma en cuenta por ser resultados que se repitieron.

Tabla 16
Variables Dependientes Controles DMS

| Variable dependiente | | | Diferencia de medias (I-J) | Error estándar | Sig. | 95% de intervalo de confianza | | |
|----------------------|-----|-------|----------------------------|----------------|-------|-------------------------------|-----------------|------|
| | | | | | | Límite inferior | Límite superior | |
| Amikacina | DMS | Día 1 | Día 2 | ,523 | 1,056 | ,638 | -2,06 | 3,11 |
| | | | Día 3 | ,923 | 1,056 | ,415 | -1,66 | 3,51 |
| | | Día 2 | Día 1 | -,523 | 1,056 | ,638 | -3,11 | 2,06 |
| | | | Día 3 | ,400 | 1,056 | ,718 | -2,18 | 2,98 |
| | | Día 3 | Día 1 | -,923 | 1,056 | ,415 | -3,51 | 1,66 |
| | | | Día 2 | -,400 | 1,056 | ,718 | -2,98 | 2,18 |
| Gentamicina | DMS | Día 1 | Día 2 | 1,533 | ,688 | ,067 | -,15 | 3,22 |
| | | | Día 3 | 1,773* | ,688 | ,042 | ,09 | 3,46 |
| | | Día 2 | Día 1 | -1,533 | ,688 | ,067 | -3,22 | ,15 |
| | | | Día 3 | ,240 | ,688 | ,739 | -1,44 | 1,92 |
| | | Día 3 | Día 1 | -1,773* | ,688 | ,042 | -3,46 | -,09 |
| | | | Día 2 | -,240 | ,688 | ,739 | -1,92 | 1,44 |
| Amikacina_50mg | DMS | Día 1 | Día 2 | -,260 | ,370 | ,509 | -1,17 | ,65 |
| | | | Día 3 | ,550 | ,370 | ,188 | -,36 | 1,46 |
| | | Día 2 | Día 1 | ,260 | ,370 | ,509 | -,65 | 1,17 |
| | | | Día 3 | ,810 | ,370 | ,071 | -,10 | 1,72 |
| | | Día 3 | Día 1 | -,550 | ,370 | ,188 | -1,46 | ,36 |
| | | | Día 2 | -,810 | ,370 | ,071 | -1,72 | ,10 |
| Amikacina_17mg | DMS | Día 1 | Día 2 | -1,490 | ,718 | ,083 | -3,25 | ,27 |
| | | | Día 3 | -,940 | ,718 | ,238 | -2,70 | ,82 |
| | | Día 2 | Día 1 | 1,490 | ,718 | ,083 | -,27 | 3,25 |
| | | | Día 3 | ,550 | ,718 | ,473 | -1,21 | 2,31 |
| | | Día 3 | Día 1 | ,940 | ,718 | ,238 | -,82 | 2,70 |
| | | | Día 2 | -,550 | ,718 | ,473 | -2,31 | 1,21 |

Nota: Tabla que contiene los controles del estudio

La Tabla 16, muestra como a pesar de tener resultados favorables no genera una significancia por los datos presentados y las repeticiones realizadas para los controles.

Teniendo dando como consecuencia que el uso de los antibióticos y las concentraciones no son las adecuadas, lo que pone en duda al método estadístico ya que se evidencian los datos positivos para la formación del halo de inhibición para los grupos detallados, incluso con el uso de la Gentamicina que estaba descrito por el laboratorio para la bacteria que se utilizó al igual que por otros estudios (C. Torres & Cercenado, 2010).

4.3 Limitantes

El número de muestras que se revelaron como positivas con la formación de los halos de inhibición en el presente estudio a pesar de manifestarse como inespecífico para las pruebas de antibiograma, nos sugieren que este estudio presenta como gran limitante la no homogenización de las ceras en los dos grupos como métodos de difusión, ya que se obtienen formaciones de halos indistintas a la codificación de las cajas y a la colocación dentro de las mismas. Esto sugiere que las muestras positivas son las que retuvieron una mayor cantidad del fármaco, ya que en ninguna de las ceras usadas como disco de difusión se dio crecimiento bacteriano.

La presencia de colonias de bacterias resistentes dentro de los halos de inhibición a pesar de ser relativamente baja para la magnitud del estudio, se dio como una consecuencia normal en esta clase de pruebas, lo que permite que las bacterias se manifiesten por la contaminación existente en el medio externo, teniendo como resultado una rápida replicación dentro del agar Mueller-Hinton utilizado para este estudio.

El número de controles utilizados para el estudio es pequeño lo que muestra por medio de la estadística como datos no significativos a pesar de haber sido positivos a la generación del halo de inhibición.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Como se describe en la literatura y se muestra en este estudio, el tener diferentes concentraciones de antibiótico no presenta diferencias al generar halos de inhibición al crecimiento bacteriano.

Al comparar los dos métodos: cera de abeja y cera dental; se verificó que son compuestos con capacidad de difusión, pero no completamente estables ante la incorporación de diferentes diluciones de Amikacina.

Se logró evaluar la difusión de antibiótico en cera de abeja y la cera dental mediante las pruebas *In Vitro* con las bacterias ATCC, donde se determinó que estos métodos son eficaces si se logra estabilizar el antibiótico en combinación con las ceras.

5.2 Recomendaciones

Se debe estandarizar la fórmula de las ceras convirtiéndolas en una partícula estable la cual pueda retener y difundir el antibiótico de una manera homogénea.

Aumentar el tamaño de la muestra y de los controles ya que a pesar de tener resultados favorables en algunas de las repeticiones no se obtiene resultados significativos con treinta repeticiones a pesar de la literatura indicar que es un número adecuado.

Probar el estudio con diferentes antibióticos y bacterias para probar si las ceras son más sensibles a generar una difusión con otras partículas.

REFERENCIAS

- Acreditado, L., La, P. O. R., Barcelona, U. D. E., Enero, E., Ordoñez, M., Danies, S. De, ... Smith, O. (2015). GUÍAS PRÁCTICAS PARA LOS LABORATORIOS, 37(1), 83–85.
- Al-Waili, N. S. (2005). Mixture of honey, beeswax and olive oil inhibits growth of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Archives of Medical Research*, 36(1), 10–13. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2004.10.002>
- Anusavice, K. (2004). *Phillips -Ciencia de los materiales dentales*. Elsevier (11e ed.). Madrid - España: Editorial Elsevier S.A. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Baxter, R., Hastings, N., Law, a., & Glass, E. J. . (2008). Ceras Dentales. *Animal Genetics*, 39(5), 561–563. Retrieved from http://odontologiavirtual.unicartagena.edu.co/FACULTAD_DE_ODONTOLOGIA/Oclusion_5_Unidad_files/CERAS DENTALES.pdf
- Bragginton, E. C., & Piddock, L. J. V. (2014). UK and European Union public and charitable funding from 2008 to 2013 for bacteriology and antibiotic research in the UK: An observational study. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(9), 857–868. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70825-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70825-4)
- Bush, B. M. (1991). *Interpretation of laboratory results for small animal clinicians*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Coyle, M. B., Cavalieri, S. J., Rankia, I. D., Harbeck, R. J., Sautter, R. I., McCarter, Y. S., ... Spiegel, C. A. (2005). *Manual of antimicrobial susceptibility testing*. *Manual of antimicrobial susceptibility testing* (Vol. 136). <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Cruz, F., López, I., Haro, J., & Berba, J. (2012). Manual de Practicas de Laboratorio Químico Orgánica. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA.
- Cuervo Mulet, R. A. (2010). *Manual de protocolos de microbiología general*. Retrieved from <https://goo.gl/LnUo5A>
- Dolinsky, A. L. (1994). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility*

- Testing This. Journal of Services Marketing* (Vol. 8).
<https://doi.org/10.1108/08876049410065598>
- Donnell, M. O., Langston, L., Stillman, B., Zielke, N., Edgar, B. A., Melvin, L., ... Gilbert, D. M. (2013). Principles and Concepts of DNA Replication.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010108>
- Fossum, T. W. (2013). *Small Animal Surgery*. Elsevier Health Sciences.
- Fox-Lewis, A., Takata, J., Miliya, T., Lubell, Y., Soeng, S., Sar, P., ... Turner, P. (2018). Antimicrobial Resistance in Invasive Bacterial Infections in Hospitalized Children, Cambodia, 2007-2016. *Emerging Infectious Diseases*, 24(5), 841–851. <https://doi.org/10.3201/eid2405.171830>
- Fratini, F., Cilia, G., Turchi, B., & Felicioli, A. (2016a). Beeswax: A minireview of its antimicrobial activity and its application in medicine. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(9), 839–843. <https://doi.org/10.1016/J.APJTM.2016.07.003>
- Fratini, F., Cilia, G., Turchi, B., & Felicioli, A. (2016b). Beeswax: A minireview of its antimicrobial activity and its application in medicine. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(9), 839–843. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.07.003>
- Janssen, H., Janssen, I., Cooper, P., Kainyah, C., Pellio, T., Quintel, M., ... Schulze, M. H. (2018). Antimicrobial-Resistant Bacteria in Infected Wounds, Ghana, 2014(1). *Emerging Infectious Diseases*, 24(5), 916–919. <https://doi.org/10.3201/eid2405.171506>
- KIRBY, W. M. M., & LEIFER, W. (1945). Intramuscular and subcutaneous administration of penicillin in beeswax-peanut oil. *Journal of the American Medical Association*, 129, 940–944.
- L. Betancor, M. Gadea, K. F. (2008). *Genética bacteriana*. Uruguay: INSTITUTO DE HIGIENE UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA URUGUAY. Retrieved from <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/GeneticaBacteriana.pdf>
- LEIFER, W., MARTIN, S. P., & KIRBY, W. M. M. (1945). The treatment of gonococcal urethritis with single injections of penicillin-beeswax-peanut oil mixtures. *The New England Journal of Medicine*, 233, 583–586.

- MDMQ. (2008). Atlas Ambiental del Distrito Metropolitano de Quito, 20–23. Retrieved from http://www.usfq.edu.ec/programas_academicos/colegios/cociba/quitoambiente/temas_ambientales/cambio_climatico/Documents/DC2AC1_atlas_ambiental_dmq_clima.pdf
- MJ, R., CR, R., & GE, R. (1946). Treatment of early syphilis with calcium penicillin-oil-beeswax. *Journal of the American Medical Association*, 132(14), 847–851. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1001/jama.1946.02870490025005>
- Rubio-Martínez, L. M., & Cruz, A. M. (2006). Antimicrobial regional limb perfusion in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228(5), 706–712, 655. <https://doi.org/10.2460/javma.228.5.706>
- Seija, V., & Vignoli, R. (2006). Principales grupos de antibióticos. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*, 631–647. Retrieved from <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA34.pdf>
- Soler Carreño, M. (2015). Revisión excipientes bibliográfica y su papel de los la absorción de medicamentos, 44.
- Torres, C., & Cercenado, E. (2010). Lectura interpretada del antibiograma de cocos gram positivos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(8), 541–553. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.02.003>
- Torres, M. E. (2002). FLORA HUMANA NORMAL. *INSTITUTO DE HIGIENE UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA (Uruguay)*, 1–5.
- Torres, S. M. F., Frank, L. A., & Hargis, A. M. (2013). Advances in Veterinary Dermatology. *Journal Veterinary Dermatology*, 7, 330. <https://doi.org/10.1002/9781118644317>
- Universidad de Valencia. (2016). La química de la miel que hace que sea un alimento "entero". *Master Universitario En Química*. Retrieved from <https://www.uv.es/uvweb/master-quimica/ca/master-universitari-quimica/quimica-miel-hace-sea-alimento-eterno-1285949129052/GasetaRecerca.html?id=1285954626299>

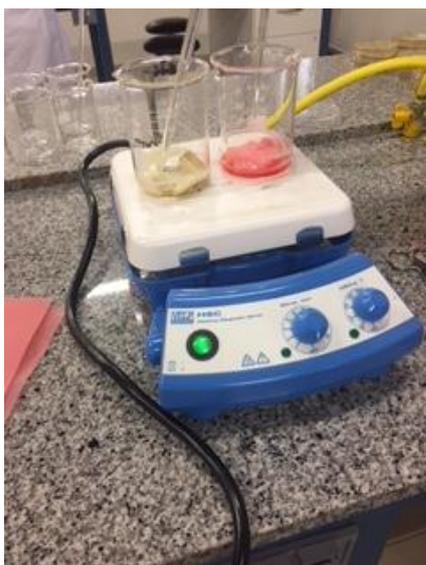
VOLINI, I. F., HOFFMAN, W. S., & HUGHES, J. J. (1949). Treatment of pneumonia by single injection daily of potassium penicillin in beeswax peanut oil mixture. *The Illinois Medical Journal*, 95(3), 147–155.

ANEXOS

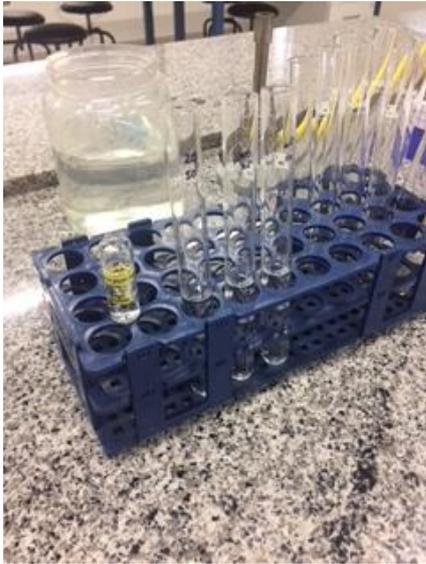
Anexo 1: Pesaje de Ceras



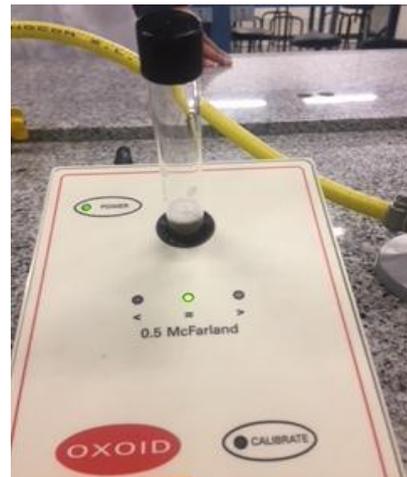
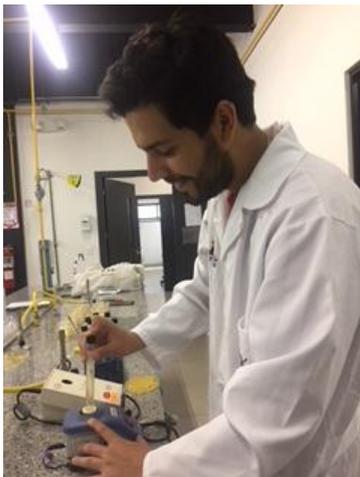
Anexo 2: Dilución de las Ceras



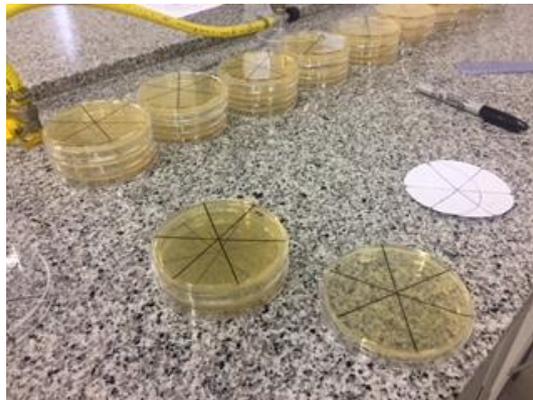
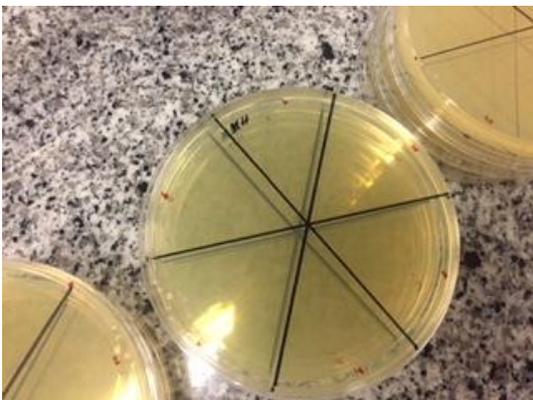
Anexo 3: Dilución Amikacina con NaCl 0,09%



Anexo 4: Solución de McFarland

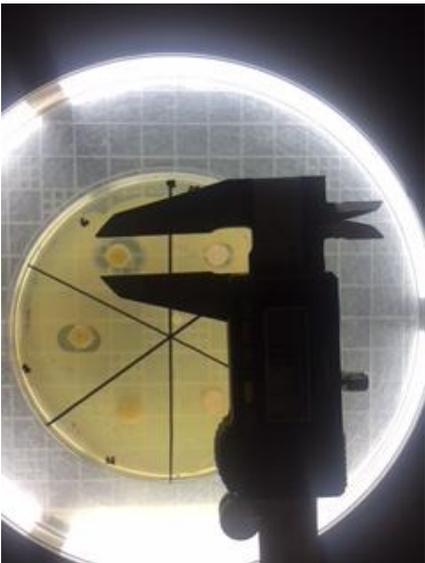


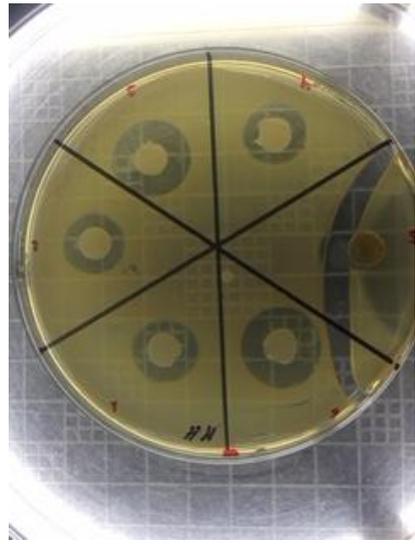
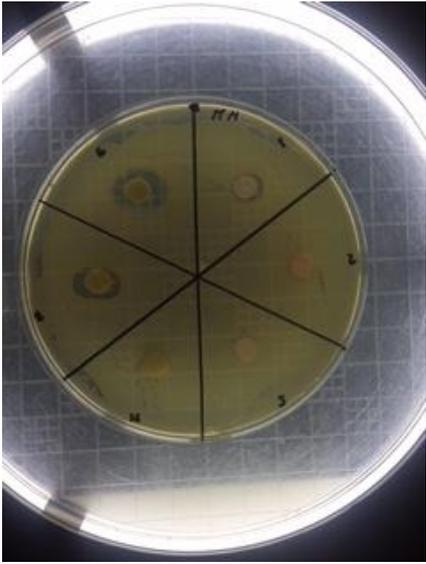
Anexo 5: Siembra agares (30 Repeticiones).





Anexo 6: Medición Halos de Inhibición





Anexo 7: Tabulación de Datos

