



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Odontología

Escuela Profesional de Odontología

**Evaluación del efecto antibacteriano in vitro del  
extracto de *Stevia rebaudiana* sobre el *Actinomyces  
viscosus* y *Streptococcus sanguinis*, bacterias  
iniciadoras en la formación de biofilm dental**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista

**AUTOR**

Katherine BRAÑEZ REYES

**ASESOR**

Donald RAMOS PERFECTO

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Brañez K. Evaluación del efecto antibacteriano in vitro del extracto de *Stevia rebaudiana* sobre el *Actinomyces viscosus* y *Streptococcus sanguinis*, bacterias iniciadoras en la formación de biofilm dental [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Odontología, Escuela Profesional de Odontología; 2017.

---



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)  
FACULTAD DE ODONTOLOGIA  
VICE DECANATO ACADÉMICO  
UNIDAD DE ASESORÍA Y ORIENTACIÓN DEL ESTUDIANTE



# ACTA

Los Docentes que suscriben, reunidos el diecinueve de julio del 2017, por encargo de la Sra. Decana de la Facultad, con el objeto de constituir el Jurado de Sustentación para obtener el Título Profesional de Cirujano Dentista de la Bachiller :

**BRAÑEZ REYES, Katherine**

## CERTIFICAN:

Que, luego de la Sustentación de la Tesis « **EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO DE STEVIA REBAUDIANA SOBRE EL ACTINOMYCES VISCOSUS Y STREPTOCOCCUS SANGUINIS, BACTERIAS INICIADORAS EN LA FORMACIÓN DE BIOFILM DENTAL**» y habiendo absuelto las preguntas formuladas,

demuestra un grado de aprovechamiento: Sobresaliente, siendo calificado con un promedio de: Dieciocho 18

(en letras)

(en números)

En tal virtud, firmamos en la Ciudad Universitaria, a los diecinueve días del mes de julio del dos mil diecisiete.

**PRESIDENTE DEL JURADO**

Mg. C.D. Marisa Cécilia Jara Castro

**MIEMBRO**

Mg. Blg<sup>a</sup>. Sofia Belinda Espinoza Escajadillo

**MIEMBRO (ASESOR)**

Mg. C.D. Donal Ramos Perfecto

Escala de calificación: Grado de Aprovechamiento:  
Sobresaliente (18-20), Bueno (15-17), Regular (12-14), Desaprobado (11 ó menos)  
Criterios : Originalidad, Exposición, Dominio del Tema, Respuestas.

## **JURADO DE SUSTENTACIÓN**

- **Presidente: Mg. C.D. Marisa Cecilia Jara castro**
- **Miembro: Mg. C.D. Sofía Espinoza Escajadillo**
- **Miembro Asesor: Mg. C.D. Donald Ramos Perfecto**

## **DEDICATORIA**

*A Dios por ser mi fortaleza.*

*A mis padres Máximo y Carolina por su confianza , amor  
y por el apoyo constante en todas las metas que me propongo.*

*A mis hermanos Luis, Marlon e Isabel, por toda su ayuda.*

*A mis tías y primas por su ayuda*

*A Eduardo por su cariño, paciencia y apoyo incondicional.*

## AGRADECIMIENTOS

Al Mg. C.D. Donald Ramos Perfecto, profesor de Microbiología de la Facultad de Odontología de la UNMSM, asesor de la presente tesis, por su constante apoyo y el tiempo dedicado a la realización de este trabajo de investigación.

A la Mg. C.D Marisa Cecilia Jara Castro, presidente de jurado, quien ha demostrado ser una excelente maestra, por su ayuda brindada.

Al Mg. C.D. Sofía Espinoza Escajadillo, docente de la facultad de odontología de la UNMSM, por su aportes como miembro del jurado en la presente investigación.

Al Dr. Américo Jorge Castro Luna, por su ayuda brindada en la obtención del extracto de *S. rebaudiana*.

Al personal del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la UNMSM, por su disposición y ayuda brindada durante la ejecución del proyecto.

A mi alma mater “Universidad Nacional Mayor de San Marcos” y a la Facultad de Odontología por la educación impartida, los llevare en mi corazón en todo momento y lugar.

## Resumen

**Objetivo:** El propósito del presente estudio fue determinar la actividad antibacteriana del extracto de *Stevia rebaudiana* (*S. rebaudiana*) frente a *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*) y *Actinomyces viscosus* (*A. viscosus*). **Materiales y método:** Se desarrolló la prueba de sensibilidad en placa de agar con discos, previo al desarrollo de la prueba se activaron las cepas de *S. sanguinis* y *A. viscosus* en placas de Agar Tripticasa soya (TSA) y agar sangre respectivamente e incubada a 37 °C por 48 horas a *S. sanguinis* y 7 días en condiciones de anaerobiosis a *A. viscosus*. Posteriormente se colocó en las 10 placas de agar sangre como de TSA un inóculo de 100 µL, que fue estandarizado al 0,5 de la escala de Mc Farland y sembrado por disseminación. Seguidamente se colocaron los discos de 6 mm de diámetro de forma equidistante, cargados con 10 µL de las diferentes concentraciones del extracto y se procedió a la incubación. **Resultados:** Las concentraciones de 15, 30, 50, 60 y 120 mg/ml presentaron un halo de inhibición promedio de 6,8; 8,2; 8,2; 8,3; 8,1mm respectivamente, para el caso de *S. sanguinis*. Las concentraciones de 15, 30, 50,60 y 120 mg/ml presentaron un halo de inhibición promedio 7,2; 9,65; 9,20; 8,05; 7,95 respectivamente para el caso de *A. viscosus*. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS Versión 19. la prueba de Kruskal Wallis determinó que existe diferencia estadísticamente significativa con  $p < 0,05$  de los promedios entre las concentraciones. **Conclusiones:** Se determinó que el extracto de *S. rebaudiana* no presenta actividad antibacteriana para las cepas de *S. sanguinis*, pero si presenta poca actividad antibacteriana sobre cepas de *A. viscosus* para las concentraciones de 30 y 50 mg/ml.

**Palabras clave:** *Stevia rebaudiana*, Biofilm dental, *Streptococcus sanguinis*, *Actinomyces viscosus*



## Summary

**Objective:** The purpose of the present study was to determine the activity antibacterial of the extract *Stevia rebaudiana* a *Streptococcus sanguinis* and *Actinomyces viscosus*.

**Materials and Methods:** The test of sensitivity in disc agar plates were developed, previous to the development of the test the strains of *S. sanguinis* was activated and *A. viscosus* en plaques of Agar trypticase Soy (TSA) and blood agar was respectively incubated at 37 °C for 48 hours to *S. sanguinis* and 7 days in condition of *anaerobiosis* to *A. viscosus*. Subsequently it was placed in the 10 plaques of blood agar like the TSA an inoculums of 100 µL, which was standardized to 0, 5 of the McFarland scale and seeded for dissemination. Consecutively the 6 mm of diameter of disks was placed equidistant, loaded with 10 µL of the different concentrations of the extract and proceeded the incubation. **Results:** The concentration of 15, 30, 50, 60 y 100 mg/ml register a halo inhibition with an average of 6, 8; 8,2; 8,2; 8,3; 8,1mm respectively, for the case of *S. sanguinis*. The concentration of 15, 30, 50, 60 y 100 mg/ml register an halo inhibition with an average of 7, 2; 9, 65; 9, 20; 8, 05; 7, 95 respectively for the case of *A. viscosus*. The analysis statistics was performed with the SPSS program version 19. The test of Kruskal Wallis determined that statistically a significant difference exists with  $p < 0,05$  with the average within the concentrations.

**Conclusions:** It was determined that the of *S. rebaudiana* extract did not presents antibacterial activity for *S. sanguinis* strains, but it does present some antibacterial activity over *A. viscosus* strains for concentration 30 and 50 mg/ml.

**Keywords:** *Stevia rebaudiana*, Biofilm dental, *Streptococcus sanguinis*, *Actinomyces viscosus*

# ÍNDICE

I	INTRODUCCIÓN.....	11
II	PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN .....	13
	2.1 Área problema .....	13
	2.2 Delimitación .....	14
	2.3 Formulación de problema.....	14
	2.4 Objetivos de la investigación .....	15
	2.4.1 Objetivo general.....	15
	2.4.2 Objetivos específicos.....	15
	2.5 Justificación de la investigación .....	15
	2.6 Limitaciones .....	16
III	MARCO TEORICO.....	17
	3.1 Antecedentes .....	17
	3.2 Bases teóricas.....	25
	3.2.1 Stevia rebaudiana Bertoni.....	25
	3.2.2 Enfermedades buco-dentales .....	41
	3.2.3 Streptococcus sanguinis (S. sanguinis).....	50
	3.2.4 Actinomyces viscosus (A .viscosus).....	51
	3.3 Definición de términos.....	54
	3.4 Hipótesis principal.....	54
	3.5 Operacionalización de variables .....	54
IV	METODOLOGIA .....	56
	4.1 Tipo de investigación .....	56
	4.2 Población y muestra.....	56
	4.3 Procedimiento y Técnicas .....	57
	4.4 Recolección de datos .....	59
	4.5 Procesamiento y análisis de datos.....	59
V	RESULTADOS .....	60
	5.1 Actividad antibacteriana del extracto de S. rebaudiana sobre a S. sanguinis .....	61
	5.2 Comparación del efecto del extracto de S. rebaudiana en diferentes concentraciones sobre el crecimiento de S. sanguinis.....	64
	5.3 Comparación del efecto del extracto de S. rebaudiana en diferentes concentraciones sobre el crecimiento de A. viscosus .....	72

VI	DISCUSIÓN.....	76
VII	CONCLUSIONES.....	79
VIII	RECOMENDACIONES.....	80
IX	BIBLIOGRAFIA.....	81
X	ANEXOS.....	96

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.....</b>	<b>60</b>
<b>Tabla 2.....</b>	<b>61</b>
<b>Tabla 3.....</b>	<b>62</b>
<b>Tabla 4.....</b>	<b>63</b>
<b>Tabla 5.....</b>	<b>64</b>
<b>Tabla 6.....</b>	<b>65</b>
<b>Tabla 7.....</b>	<b>68</b>
<b>Tabla 8.....</b>	<b>69</b>
<b>Tabla 9.....</b>	<b>70</b>
<b>Tabla 10.....</b>	<b>71</b>
<b>Tabla 11.....</b>	<b>72</b>
<b>Tabla 12.....</b>	<b>73</b>
<b>Tabla 13.....</b>	<b>101</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 .....	25
Figura 2 .....	36
Figura 3 .....	37
Figura 4 .....	62
Figura 5 .....	63
Figura 6 .....	66
Figura 7 .....	66
Figura 8 .....	70
Figura 9 .....	72
Figura 10 .....	74
Figura 11 .....	75
Figura 12 .....	101
Figura 13 .....	102
Figura 14 .....	102
Figura 15 .....	102
Figura 16 .....	103
Figura 17 .....	103
Figura 18 .....	104
Figura 19 .....	104
Figura 20 .....	104
Figura 21 .....	105
Figura 22 .....	105
Figura 23 .....	106
Figura 24 .....	106
Figura 25 .....	107
Figura 26 .....	107

## I INTRODUCCIÓN

Los datos epidemiológicos sobre la caries dental siguen siendo altos según la Organización Mundial de la Salud (OMS), afirma que las principales afecciones bucales como caries dental y enfermedad periodontal constituyen un importante problema de salud debido a su alta prevalencia e incidencia en la salud general de la población mundial.<sup>1</sup>

La caries dental es una enfermedad multifactorial que se caracteriza por la desmineralización localizada y progresiva de las porciones inorgánicas del diente y el deterioro posterior de las porciones orgánicas del diente.<sup>2</sup> Este proceso destructivo se origina por la acción de los microorganismos que forman parte del biofilm dental y por el efecto enzimático que estos microorganismos ejercen sobre los carbohidratos fermentables generando la producción de ácido láctico y pirúvico seguida de la invasión bacteriana de los túbulos dentales. La lesión cariosa requiere un huésped susceptible (diente) y un tiempo suficiente de exposición que permita la desmineralización del tejido duro del diente.<sup>3,4</sup> La caries dental es una enfermedad localizada que resulta de los procesos metabólicos de la biomasa en contacto con la superficie dental, y la dieta proporciona los requerimientos nutricionales y por lo tanto energéticos a los microorganismos de la microbiota bucal.<sup>5</sup>

La caries dental y la enfermedad periodontal son causadas por un desequilibrio en las poblaciones bacterianas que están presentes de forma natural y ayudan a mantener el estado normal de la cavidad oral.<sup>6</sup> Esta situación hace que la investigación sobre el control de la enfermedad sea constante. Se han estudiado diferentes métodos, uno de ellos es el uso de propiedades de algunos fitoquímicos en el cual utilizaron dos plantas medicinales de nuestro medio: *Erythroxylum novogranatense var truxlense* (hoja de coca) y *Plantago major* (llantén), evaluando

la acción inhibitoria de la asociación de dichas sustancias frente al crecimiento de bacterias y hongos. <sup>7</sup>

Otros también analizaron el efecto de la *Camellia sinensis* (té verde) en la formación de la placa bacteriana por *Streptococcus mutans* (*S. mutans*). <sup>8</sup>

El presente estudio busca evaluar la capacidad antibacteriana de un fotoquímico como lo es la *S. rebaudiana*, cuyo cultivo ya ha sido introducido en nuestro país, hace una década y es perfectamente adaptable a las regiones tropicales y subtropicales del Perú, ya que presenta condiciones ideales de altitud, clima, suelo y situación geográfica para el cultivo de esta planta, actualmente se cultiva en Cajamarca, Amazonas, San Martín, Ucayali y Apurímac. <sup>9</sup>

## II PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

### 2.1 Área problema

El biofilm dental está formado por una serie de microorganismos aglutinados por una sustancia microbiana que los une y los adhiere a la superficie del diente<sup>10</sup>, que aumenta el riesgo de caries y enfermedad periodontal.<sup>11,12, 13</sup>

El *A. viscosus* y *S. sanguinis*<sup>14</sup> son los primeros que se adhieren a la película adquirida.<sup>10</sup> y dan pase a que otros microorganismos se agreguen o coagreguen.<sup>15</sup>

La caries dental ha sido descrita como una enfermedad multifactorial relacionada con la dieta, bacterias intraorales, composición de la saliva y otros factores.<sup>1</sup>

El factor dieta está relacionado con la cantidad de azúcares que ingerimos, siendo el más perjudicial los que contienen sacarosa, por ello, el interés por el uso de edulcorantes naturales y su efecto sobre la microbiología para restaurar y mantener la salud ha adquirido un gran interés en las últimas décadas.

La *S. rebaudiana Bertoni* es un edulcorante natural no calórico, con más dulzor que la sacarosa, 300 veces más dulce que el azúcar, sin efectos adversos, que ha demostrado tener múltiples beneficios para la salud sistémica y, recientemente, a la salud bucal.<sup>16</sup>

Estudios clínicos y microbiológicos han demostrado que el extracto etanólico de la *S. rebaudiana* si presenta efecto antibacteriano sobre *S. mutans*,<sup>2, 17</sup> y



que su posible uso en la dieta diaria podría tener beneficios en reducción de las lesiones cariosas, ayudando así en la prevención de dicha enfermedad.

## 2.2 Delimitación

Hoy en día la introducción de la *S. rebaudiana* como edulcorante natural en diferentes productos ha permitido que este actúe como un agente terapéutico causando efectos beneficiosos en las personas que lo ingieren.

A nivel bucal, ensayos clínicos y microbiológicos han demostrado que el extracto etanólico de *S. rebaudiana* posee un efecto antibacteriano en *S. mutans*,<sup>17,18,19</sup> mas no se ha probado el efecto antibacteriano frente al *A. viscosus* y *S. sanguinis*, estos dos microorganismos son iniciadores esenciales en la formación de biofilm dental asociado a la superficie del diente.

Con los antecedentes existentes, se puede postular a este edulcorante como un posible complemento terapéutico en la atención odontológica, sobre todo en pacientes que presentan: obesidad, diabetes e hipertensión.<sup>20</sup>

## 2.3 Formulación de problema

¿Cuál es el efecto antibacteriano *in vitro* de la *S. rebaudiana* sobre el *A. viscosus* y *S. sanguinis*?

## 2.4 Objetivos de la investigación

### 2.4.1 Objetivo general

Determinar el efecto antibacteriano de la *S. rebaudiana* sobre el *A. viscosus* y *S. sanguinis*.

### 2.4.2 Objetivos específicos

- a. Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto hidroalcohólico (7:3) de *S. rebaudiana* sobre *A. viscosus*.
- b. Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto hidroalcohólico (7:3) de *S. rebaudiana* sobre *S. sanguinis*.
- c. Comparar el efecto antibacteriano *in vitro* de las diferentes concentraciones (15, 30, 50,60 y 120 mg/ml) del extracto de *S. rebaudiana* sobre *S. sanguinis*.
- d. Comparar el efecto antibacteriano *in vitro* de las diferentes concentraciones (15, 30, 50,60 y 120 mg/ml) del extracto de *S. rebaudiana* sobre *A. viscosus*.

## 2.5 Justificación de la investigación

Actualmente hay estudios *in vitro* del efecto inhibitorio del extracto de *S. rebaudiana* sobre *S. mutans*, *Streptococcus sobrinus* (*S. sobrinus*) y *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*),<sup>17, 18,19</sup> organismos estrechamente relacionados en la producción y desarrollo de caries dental, pero no hay estudios sobre los efecto antibacteriano del extracto de *S. rebaudiana* sobre el *S. sanguinis* y *A. viscosus* que son los primeros colonizadores de la superficie dentaria y formadores del biofilm dental.

El presente trabajo pretenderá demostrar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto de *S. rebaudiana* sobre el *A. viscosus* y *S. sanguinis*, bacterias iniciadoras en la formación de biofilm dental. Para poder así impulsar el reemplazo de azúcares energéticos por azúcares no cariogénicos.

## 2.6 Limitaciones

- Obtención de las cepas bacterianas.
- Generar las condiciones óptimas de crecimiento de los microorganismos como lo son la microaerofilia y la de anaerobiosis.
- El desarrollo del perfil bioquímico, cromatografía de gases y espectrometría de gases por falta de equipo.
- Las condiciones de ser un estudio de tipo experimental, *in vitro*, dado que los microorganismos se desarrollarán en condiciones ambientales simuladas en el laboratorio utilizando los parámetros necesarios para su desarrollo ideal, a diferencia de los otros factores que puedan influir en las condiciones *in vivo*.

### III MARCO TEORICO

#### 3.1 Antecedentes

**Tovar y col 2016**<sup>21</sup> El objetivo fue demostrar la actividad antimicrobiana de la *Stevia* en comparación con el Xilitol, frente a los *S. mutans*. Método: se llevó al laboratorio microbiológico cepas de *S. mutans* (ATCC 25175) y se hizo el cultivo sobre Agar Mueller Hinton (OXOID) con sangre de cordero desfibrinada y se comparó el efecto antimicrobiano de la *Stevia* y el Xilitol utilizando la técnica de Agar difusión con bacterias y perforación en placa ,como control positivo se utilizó clorhexidina al 2 % (MAQUIRA) y el control negativo el agua; se colocaron en campanas de incubación a 37 °C y se evaluaron a las 24, 48 horas después para determinar el efecto de estos extractos sobre el crecimiento de las bacterias. Resultados: el promedio del halo de inhibición para la *Stevia* a las 48 horas es de 14.61 mm y para el xilitol es de 9.51 mm. Conclusión: La *Stevia* tiene mayor actividad antimicrobiana que el xilitol ya que en ambos controles se observó formación de halos de mayor tamaño demostrando el potencial anticariogénico de este endulzante natural.

**López Rodríguez G. (2014)**<sup>22</sup> El objetivo fue evaluar el efecto antibacteriano de la *Camellia sinensis* (té verde) frente al *S. mutans* y al *S. sanguinis*. Métodos: Se probaron dos extractos de té verde, uno comercial y otro a granel. Se utilizaron 24 discos para el primer extracto (Comercial) y la misma cantidad para el segundo extracto metanólico (Granel), se dividieron en grupos de 12 discos para cada bacteria, con un total de 4 placas Petri por cada uno. Además, cada placa contenía 3 discos embebidos de té y 1 disco con Clorhexidina al 0,12 % como grupo control. Estas muestras fueron analizadas con la prueba de difusión en agar con discos y los halos de inhibición se midieron a las 72 horas. Resultados: Se comprobó el efecto

antibacteriano para ambos extractos. El promedio del halo de inhibición para el extracto de té verde comercial fue de 19,72 mm y para el extracto de té verde a granel fue de 18.1 mm frente al *S. mutans*, mientras que para el *S. sanguinis* la medida obtenida fue de 17,94 mm y 16,46 mm respectivamente. Con respecto a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), para el caso de *S. mutans* se determinó una CMI de 0,08 gr/ml para ambos extractos. Mientras que para el caso de *S. sanguinis* la CMI fue de 0,08 gr/ml para el extracto comercial y de 0,25 gr/ml para el extracto a granel. En conclusiones ambos extractos metanólicos de té verde presentaron efecto antibacteriano contra las cepas del *S. mutans* y *S. sanguinis*. El té verde comercial fue el que demostró mayor efecto antibacteriano que el extracto a granel.

**Mendes F y col. (2014)**<sup>23</sup> El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto acidogénico de edulcorante comercial que contiene lactosa y esteviosido en *biofilm in vivo*. Nueve voluntarios se abstuvieron de cepillarse los dientes durante tres días en cinco fases. En el cuarto día de cada fase, el pH del biofilm se midió mediante el "método de la tira". El pH de la placa interproximal se midió antes y hasta 60 minutos después de un enjuague bucal 10 ml durante 1 minuto con las soluciones de ensayo: I - edulcorante con 93 % de lactosa y 7 % esteviósido; II - edulcorante con 6,8 % sacarina, ciclamato 13,6 %, y 0,82 % de esteviósido; III - solución de sacarosa al 18 % (control positivo); -IV agua mineral (control negativo); y V- 93 % solución de lactosa. Los resultados revelaron que la caída más pronunciada pH se encontró con sacarosa (control positivo), seguido por la solución de lactosa 93 %, el edulcorante con lactosa + esteviósido, la sacarina enerwith dulce + ciclamato + esteviósido, y finalmente agua (control negativo). De acuerdo con el área bajo la curva, los dos edulcorantes que contienen el esteviósido fueron significativamente diferentes, y el edulcorante con lactosa + esteviósido fue

significativamente diferente al de agua a partir de sacarosa. El pH crítico para la desmineralización de la dentina (pH 6,5) se alcanzó por todos los voluntarios después de enjuagar con una solución de sacarosa, solución de lactosa, y el esteviósido + edulcorante de la lactosa. Conclusión los edulcorantes esteviósido que contienen lactosa pueden ser cariogénicos, especialmente a la dentina.

**Pérez Guevara (2013)**<sup>17</sup> realizó un estudio con el objetivo de evaluar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de la *S. rebaudiana* sobre el *S. mutans*, se utilizó extractos de hojas fresca de *S. rebaudiana*, seis concentraciones en etanol de 70° y seis concentraciones en etanol de 30°, en total doce concentraciones. La CMI se obtuvo por el método de dilución en caldo y agar, para el efecto bactericida se empleó la técnica de difusión de discos Kirby y Bauer. Los hallazgos de los tres ensayos realizados en los cuales se trabajó con doce concentraciones del extracto para determinar la CMI y 12 concentraciones para determinar la Concentración Mínima Bactericida (CMB), permitieron seleccionar a la CMI en 1,07 mg/ml en el extracto en etanol de 70° y la concentración de 4,28 mg/ml, en el extracto en etanol de 30° y a la CMB en 10 mg/ml en el extracto en etanol de 30° ( $p < 0,01$ ). Concluyendo que el extracto etanólico de *S. rebaudiana* posee efecto antibacteriano sobre *S. mutans*.

**Contreras S. (2013)**<sup>24</sup> El objetivo de esta revisión es describir propiedades anticariogénicas y antiperiodontopáticas de sus extractos. Steviósido y rebaudiósido A son los glicósidos más importantes que contiene la *S. rebaudiana* y ninguno es cariogénico. Estudios *in vitro* han comprobado que extractos de *S. rebaudiana* presentan actividad antibacteriana sobre *S. mutans*, *Streptococcus sobrinus* (*S. sobrinus*) y *Lactobacillus acidophilus* (*L.*

*acidophilus*) organismos estrechamente relacionados en el desarrollo de la caries. *In vivo e in vitro* se ha observado que disminuye la producción de ácidos bacterianos atribuyéndosele un bajo potencial acidogénico y un menor efecto de desmineralización del esmalte en comparación con otros edulcorantes. Además, *in vivo* se ha demostrado un efecto antiplaca principalmente debido a una disminución en la producción de polímeros insolubles bacterianos. Estas características, más sus propiedades antiinflamatorias y cicatrizantes, podrían resultar potencialmente efectivas en el tratamiento de enfermedades periodontales en cifras significativas, como se ha observado en estudios desarrollados en animales. En conclusión la *S. rebaudiana* presenta propiedades contra la caries dental y las enfermedades periodontales.

**Gamboa Fredy (2012)<sup>18</sup>** El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de *S. rebaudiana* sobre microorganismos cariogénico, tales como las bacterias del género *Streptococcus* y *Lactobacillus*. A partir de las hojas secas de *S. rebaudiana* convertidas en polvillo se obtuvieron los extractos en dichos solventes. Se evaluó la actividad antimicrobiana de los 5 extractos sobre las 16 cepas bacterianas de los géneros *Streptococcus* (n=12) y *Lactobacillus* (n=4), el método empleado fue difusión en pozo. Las CMI de los extractos de hexano, metanol, etanol, acetato de etilo y cloroformo, sobre las 16 cepas bacterianas fueron respectivamente de 30 mg/ml, 120 mg/ml, 120 mg/ml, 60 mg/ml y 60 mg/ml, respectivamente. Los halos de inhibición determinados a las CMI fueron variables, el de menor valor fue 9 mm y el de mayor fue de 17,3 mm. Los resultados, sugieren que los halos de inhibición en el extracto de hexano son semejantes a los obtenidos para el etanol y metanol, sin embargo, la CMI (30 mg/ml) es menor. En las 4 especies de *Lactobacillus* los halos de

inhibición obtenidos entre 13 y 17,3 mm, son ligeramente mayores en los extractos de acetato de etilo y cloroformo. En conclusión los microorganismos más susceptibles fueron de la especie de *Lactobacillus*.

**Vitery Sapuyes (2010)<sup>19</sup>** realizó el estudio con el objetivo de evaluar la Actividad inhibitoria de la *S. rebaudiana* sobre el *L. acidophilus* y el *S. mutans*, mediante un estudio *in vitro* se comparó el efecto, en diferentes concentraciones, de extractos de la *S. rebaudiana*, obtenidos con solventes como agua, metanol, etanol, acetato de etilo y hexano, sobre el crecimiento de cepas de *S. mutans* y *L. acidophilus*, se utilizó la técnica de difusión en Agar Mueller Hinton, los controles positivos fueron Clorhexidina, Vancomicina y Penicilina, y los controles negativos cada uno de los solventes. El análisis estadístico indico que los resultados de los extractos de *S. rebaudiana* con metanol y etanol comparados con los de la Vancomicina son estadísticamente iguales, con un valor de p igual al 20 % para el extracto con metanol y el 79 % para el extracto con etanol, lo que indico que sus efectos son similares a los del control positivo. En el caso de los resultados con los extractos de *S. rebaudiana* con hexano y acetato de etilo muestran evidencias significativas, comparados con los resultados obtenidos con la Vancomicina, con valores de p inferiores al 5 %, lo que indica que la Vancomicina mostró mejores resultados en la inhibición del crecimiento que estos dos extractos. En conclusión se comprobó la actividad antibacteriana de *la S. rebaudiana* contra *del S. mutans* y *el L. acidophilus* y el posible potencial anticariogénico de este endulzante natural.

**Jayaraman y col. (2008)<sup>25</sup>** El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana y antitumoral del extracto de *S. rebaudiana*, mediante un estudio *in vitro* se comparó el efecto del extracto disuelto en cuatro solventes:



en acetato de etilo, acetona, cloroformo y agua; contra *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Salmonella typhi* (*S. typhi*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), y *Vibrio cholerae* (*V. cholerae*); utilizando el método de difusión de agar en pozos. Se evaluó la actividad antifúngica sobre *Candida albicans* (*C. albicans*), *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*), *Trichophyton mentagrophytes* (*T. mentagrophytes*) y *Epidermophyton*. Los efectos citotóxicos se evaluaron sobre células Vero (una Línea Celular derivada del riñón del mono verde africano) y Hep2 (células epiteliales humanas de estirpe neoplásica). Los resultados entre los cuatro extracto probados, el extracto de acetona tenía potencial antibacteriano efectivo, seguido por el extracto de acetato de etilo. El extracto de acetona mostró mayor actividad frente a Gram- positivos. Todos los extractos fueron activos contra especies de *Epidermophyton* y *C. albicans*. La dilución 1:8 del extracto de acetona no era tóxica para las células normales y también era anticancerígeno y antiproliferativo contra células cancerosas. En conclusión el estudio confirma la actividad antimicrobiana y antitumoral de las hojas de *S. rebaudiana* extraídos con diversos solventes, por lo que es un fármaco potencial que requiere más estudios.

**Manish B. y col (2006)**<sup>26</sup> El objetivo de este estudio fue investigar la actividad antimicrobiana de los extractos de *S. rebaudiana*. Se extrajeron en agua, metanol, acetato de etilo y hexano; sus actividades antimicrobianas fueron evaluados contra tales microorganismos: *B. subtilis*, *S. aureus*, *M. luteus*, *Serratia marcescens* (*S. marcescens*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Bacillus megaterium* (*B. megaterium*), *E. coli*, *Proteus vulgaris* (*P. vulgaris*), *Levadura*, *Aspergillus niger* (*A. niger*) y *Rhizopus oligosporus* (*R. Oligosporus*) utilizando el método de la placa taza. Los resultados demostraron actividad del extracto acuoso contra *B. subtilis* y *S. aureus* sólo. El metanol

extracto dio la mayor zona de inhibición frente a *P. aeruginosa*, mientras que la zona mínima de inhibición se encontró frente a *S. aureus* y la levadura. *B. megaterium* y la levadura se encontraron para ser altamente susceptible hacia extractos de acetato de etilo y hexano, respectivamente, mientras que *A. niger* y *B. subtilis* se encontró que son menos susceptible frente a extractos de acetato de etilo y hexano, respectivamente. Extracto de hexano indico la mayor actividad contra la levadura entre los microorganismos ensayados. En conclusión se confirma la posible potencialidad antimicrobiana del extracto de la hoja de *S. rebaudiana*.

**Monteiro y col. (2006)**<sup>27</sup> el objetivo fue evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto de *Anacardium occidentale* L (*A. occidentale*) sobre *S. mutans*, *S. sanguinis* y *Streptococcus. mitis* (*S. mitis*). La evaluación se llevó en placas petri por el método de difusión para la determinación de la CMI y concentración inhibitoria mínima de adherencia (CMIA). La CMI se observó con concentraciones de 12,5 mg/ml en *S. mutans*, 6,25 mg/ml en *S. mitis* y *S. sanguinis*. Los resultados sugieren que el extracto tiene efecto en la CMIA en concentraciones de 0,31 mg/ml en *S. mutans* y *S. mitis* es de 0,15 mg/ml en *S. sanguinis*; podemos concluir que el extracto hidroalcohólico de *A. occidentale* muestra actividad antibacteriana *in vitro* contra *S. mitis*, *S. mutans* y *S. sanguinis* presente en la película bacteriana supragingival, por lo tanto este podría ser usado terapéuticamente en la odontología como agente antibacteriano.

**Lin LH y col. (2004)**<sup>28</sup> el objetivo fue evaluar la actividad citotóxica y antibacteriana de los análogos de steviosido, steviolbiosido, steviol y isosteviol, un nuevo grupo de amidas de esteviolbiosido 2a-g derivados 2h-i y

su correspondiente esteviol e isosteviol amida 3a y 4a se prepararon haciendo reaccionar alquilamina alifática y alquildiaminas con PyBOP y DIEA. Los compuestos sintetizados tenían efectos citotóxicos sobre el cáncer y las células pulmonares embrionarias humanas. Los compuestos 2f, 2g, y 4 de esta serie tuvieron efecto favorables y fueron superiores a la penicilina G para inhibir el crecimiento de *B. subtilis*, ninguno de los compuestos exhibió efecto citotóxicos con *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) o *E. coli*, bacteria Gram-negativa. Los compuestos sintéticos fueron más activos contra las bacterias Gram-positivas. El compuesto 2g fue el más potente contra *B. subtilis* con valores de CIM de 32 mg/ml.

## 3.2 Bases teóricas

### 3.2.1 *Stevia rebaudiana* Bertoni

#### 3.2.1.1 Clasificación

En la Tabla 1, se presenta la clasificación sistemática de la *S. rebaudiana*:

**Figura 1. Clasificación de la *S. rebaudiana***

Nombre común	Hierba dulce
Reino	Vegetal
Subreino	Tracheobionta (plantas vasculares)
División	Magnolophyta (fanerógama angiosperma)
Subdivisión	Spermatophyta (plantas de la semilla)
Clase	Magnoliopsida (dicotiledóneas)
Subclase	Asteridae
Serie	Multiaristae
Tribu	Eupatorieas
Orden	Campanulares (asterales)
Familia	Compuestas (Asteráceas de Monochlamydeae, comositaseas)
Genero	<i>Stevia</i>
Especie	<i>Rebaudiana</i> Bertoni
Nombre científico	<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni ó <i>Eupatorium rabaudianum</i> Bertoni ó <i>Rebaudianum de Eupatorium</i>

**FUENTE: MARTINEZ (2002)<sup>29</sup>**

La *S. rebaudiana* es una de las 240 especies de hierbas y arbustos de la familia de las compuestas.<sup>30, 31,32</sup> Esta familia incluye a plantas tan conocidas como el diente de león, el girasol, la manzanilla y la achicoria.<sup>29</sup>

### 3.2.1.2 Descripción botánica y morfológica.

Es un arbusto herbáceo, perenne y erguido; alcanza 60-80 cm de altura en bosques naturales y llega hasta 120 cm bajo cultivo tecnificado. Bajo cultivo, la planta se trata normalmente como planta anual según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO).

La *S. rebaudiana* es una planta con tallo anual, subleñosa, levemente pilosa en las extremidades, se ramifica formando múltiples brotes con tendencia a inclinarse.<sup>29</sup>

La *S. rebaudiana* presenta la siguiente morfología:

- a. **Raíces:** tiene un rizoma vigoroso y un sistema radicular superficial.<sup>16</sup> La raíz es perenne, fibrosa, filiforme y abundante formando cepa.<sup>29</sup>
- b. **Tallos:** son semi-leñosos, pero débiles.<sup>16</sup>
- c. **Hojas:** las hojas son alternas, oval-elípticas, miden 3 - 6,5 cm de largo y 0,8 -1,9 cm de ancho.<sup>16</sup>
- d. **Flores:** son pequeñas, perfectas y blancas, nacen en pequeños corimbos de 2-6 flores. Las flores de lóbulos blancos se hallan dispuestas en pequeños capítulos terminales o axilares, agrupados en panículas corimbosas sueltas.<sup>16</sup>

- e. **Frutos:** las semillas están contenidas en aquenios delgados de unos 3 mm de longitud. Cada aquenio tiene alrededor de 20 persistentes pappus.<sup>16</sup>
  
- f. **Semillas:** las semillas son pequeñas y el peso de mil semillas de *S. rebaudiana* oscila por lo general entre 0,15 - 0,30 g.<sup>16</sup>

### 3.2.1.3 Historia y origen

Esta planta cuyo nombre científico es *S. rebaudiana Bertoni*, conocida como hierba dulce, dulce hoja y yerba miel es nativa de Paraguay.<sup>30,33,34</sup>

La *S. rebaudiana* es una planta que crece espontáneamente en el hábitat semiárido de las laderas montañosas de Paraguay.<sup>33</sup> Actualmente, se cultiva en muchos países de todo el mundo, entre ellos, países de América Latina y de Asia.<sup>35</sup> En el Perú se cultiva en la ceja de selva del Perú, así como en las regiones de Cajamarca y Arequipa.<sup>36</sup>

Las hojas de *S. rebaudiana* han sido conocidas por los Indios Guaraníes de Paraguay como kaá hâ-é, caá-êhé, caá-enhem, caá-hê-hê, azucá-caá eiracaa, o ca-a-yupe, todo ello significa “hierba dulce” y fue usado por siglos como endulzante en los mates.<sup>30,37</sup> También la usaban para endulzar sus comidas, bebidas y como golosina que llevaban a su boca cuando en sus deambular por el campo se encontraban con ella.<sup>29</sup>

Todo esto ocurre desde el siglo XVI, y tiempo después algunos “gauchos” la comenzaron a usar para endulzar sus tisanas.<sup>29</sup>

En 1887, el Dr. Moisés Santiago Bertoni, escritor, botánico y director de la Universidad de Agricultura de Asunción (Paraguay), tuvo conocimiento de esta hierba que le suministraron los nativos mientras hacía una exploración por aquellas tierras.<sup>29</sup>

#### **3.2.1.4 Descubrimiento y extensión de su conocimiento al mundo.**

El descubrimiento de la hierba dulce paraguaya fue revelado al mundo por Moisés Santiago Bertoni, un científico paraguayo. En 1899, hizo la primera descripción botánica como especie del género *Eupatorium*, puesto que son similares, después en 1905 se corrigió y la puso como especie del género *Stevia* en una publicación de su estudio más completo, llamándola “*Stevia rebaudiana Bertoni*” en honor a un químico paraguayo llamado Ovidio Rebaudi que fue el primero en aislar su componente activo dulce más importante.<sup>29</sup>

En 1931, dos químicos franceses, Bridel y Lavieller comenzaron a estudiar a la *Stevia* y aislaron los glucósidos que denominaron esteviósidos y rebaudiósido.<sup>20,38</sup> Los científicos franceses determinaron que la potencia endulzante del esteviósido era trescientas (300) veces mayor que la del

azúcar y establecieron que no causaba efectos tóxicos aparentes en diversos animales de laboratorio.<sup>16</sup>

Gracias a estos pioneros y a la creciente preocupación por la salud, el uso de la *S. rebaudiana* popularizó como sustituto del azúcar y de edulcorantes artificiales.<sup>16</sup>

En 1955, los japoneses comenzaron a desarrollar cultivos inicialmente en Paraguay.<sup>29</sup>

Alrededor de 1970, los japoneses comenzaron el cultivo de *S. rebaudiana* en el sur de Japón y en los países de su área, debido a que los edulcorantes artificiales estaban fuertemente regulados e incluso prohibidos a partir de los años 60.<sup>29</sup>

Hacia 1988, los extractos de *S. rebaudiana* habían capturado un 41 % del mercado de edulcorantes en Japón, donde se emplea en la preparación de bebidas, productos horneados y de pastelería, yogurt, helados, sidras y tés, dentífricos y enjuagues bucales. La *S. rebaudiana* se emplea también en alimentos en Corea del Sur, China, Malasia, Tailandia, Filipinas e Israel, siendo China el mayor exportador mundial de steviosido.<sup>31</sup> En Paraguay y Brasil se emplea ampliamente como remedio para regular los niveles de insulina en la diabetes.<sup>16</sup>



En el 2007 la empresa agroindustrial Cargill y Coca-Cola han patentado un edulcorante derivado de la *S. rebaudiana* conocido como Truvia.<sup>30</sup>

### **3.2.1.5 Características agronómicas.**

Estas plantas pueden utilizarse para producción comercial durante varios años, cinco o seis a lo sumo. Las raíces que quedan enterradas en el suelo permiten el rebrote de la planta cada vez que es cortada.<sup>29</sup> En el Perú, el número de cortes está supeditado a la zona agroecológica, llegándose a cosechar hasta ocho cortes al año, en las zonas más bajas de selva.<sup>9</sup> Se produce naturalmente en regiones tropicales y subtropicales, en los bordes de marismas o en pastizales de hasta 700 m de altitud. La floración ocurre en fotoperiodo crítico de 12 horas, 40-60 días después de la siembra o corte.<sup>16</sup> Los días largos, sin embargo, aumentan la producción de hojas, lo que resulta en un mayor contenido de esteviósido sobre materia seca. Según Equipo de Desarrollo Agropecuario de Cajamarca (EDAC),<sup>9</sup> en el Perú, las nuevas técnicas de producción permiten mejorar sustancialmente en rendimiento y en calidad en comparación al sistema tradicional de producción no tecnificado.<sup>9</sup> En tal sentido las zonas donde se recomienda masificar su producción es en la zona de selva, y en condiciones de sierra en los valles interandinos a altitudes menores a 1800 msnm.

Según FAO, los requerimientos agronómicos en el cultivo de la *S. rebaudiana* son los siguientes<sup>16</sup>

#### **a. Hábitat**

Se puede encontrar a lo largo del borde de marismas y en praderas.

#### **b. Ambiente**

- **Latitud** Se encuentra entre el Ecuador y 50° con un óptimo entre 15° - 30°. <sup>39</sup>
- **Temperatura** Su clima natural es subtropical y semi-húmedo con temperaturas extremas entre 21 a 43 °C, con un promedio de 24 °C. <sup>24</sup> Sumida indica que el rango óptimo de temperaturas de esta planta es de 15-30°C puede soportar temperaturas críticas de 0-2 °C; <sup>40</sup> aunque Miyazaki demostró que el límite absoluto era -3 °C. <sup>40</sup>
- **Agua** El rango reportado de precipitación anual para el crecimiento de la planta es de 500-1800 mm con un óptimo entre 1000-1400 mm.
- **Radiación** Rango e intensidad: requiere un lugar soleado y caluroso.
- **Suelo**
  - **Condiciones físicas:** crece naturalmente en suelos infértiles, ácidos y arenosos luz con las capas freáticas superficiales.
  - **Condiciones químicas:** el pH óptimo del suelo se encuentra en un rango de 5 – 6,5; suelo alcalino debe evitarse. <sup>41</sup>

#### **3.2.1.6 Distribución**

Es originaria de la región norte de América del Sur, todavía se encuentra en estado silvestre en las alturas de los distritos de

Amambay e Iguazú (zona fronteriza entre Brasil y Paraguay), también se encuentra en Venezuela y Colombia. Se estima que hasta 200 especies de *Stevia* son nativas de América del Sur, sin embargo, la *S. rebaudiana* es la única que da la esencia más dulce.<sup>42</sup> Este dulzor se debe gracias a su principio activo, denominado “esteviósido” en 1921 por la unión internacional de química.<sup>37</sup>

Esta planta fue introducida al Perú hace una década y actualmente se ha incorporado en el portafolio de cultivos en pequeñas extensiones en Cajamarca, Amazonas, San Martín, Ucayali y Apurímac de manera orgánica. La *S. rebaudiana* no se presenta como un cultivo que desplace a cultivos tradicionales como el café, maíz, etc., sino como un rubro complementario en la diversificación productiva y una alternativa económica para el minifundio permitiendo un ingreso adicional a los agricultores.<sup>9</sup>

### **3.2.1.7 Composición de la *S. rebaudiana***

Contiene más de 100 bioflavonoides y terpenos, a parte de los esteviósidos y rebaudiósidos. Tiene compuestos en todas las partes de la planta, tales como minerales, esteroides y bioflavonoides.<sup>43</sup> En la hojas encontramos estos componentes activos dulces, son glucósidos de esteviol, en mayor proporción el esteviósido (5 a 10 % del peso de la hoja) y en menor medida 2 a 3 % rebaudiósidos A, <sup>43,44</sup> y también contiene rebaudiósidos B, C, D, y E; dulcósido A; y esteviolbiósido. <sup>31, 45, 43,46</sup>

La hoja de *S. rebaudiana*, en su estado natural contiene:<sup>29</sup>

- Más de 50 % carbohidratos de fácil asimilación.
- Más del 10 % fibras, polipéptidos (proteínas vegetales).
- Más del 1 % lípidos, potasio.
- Entre 0,3 % al 1 % calcio, magnesio, fósforo.
- Menos del 0,01 %: cromo, cobalto, manganeso, hierro, silicio, selenio y zinc.
- Indicios de ácido ascórbico, aluminio, beta caroteno C, estaño, riboflavina, vitamina B1.<sup>44</sup>
- Varios aceites esenciales.<sup>29</sup>

**Composición química:** ácido clorogénico, ácido caféico, apigenina, isoscopoletina, umbeliferona, quercetina isoquercitrina, avicularin, polisacárido, óxido 25 cariofileno, spathulenol, camazuleno que también se encuentra en la manzanilla, sterebins E, F, G, H que son diterpenos, centaureidin (5,7,3' – trihidroxi-3,6,4'-trimethoxyflavone) y esteroides como el estigmasterol, sitosterol y campesterol.<sup>42,44</sup>

### 3.2.1.8 Glucósidos de esteviol

Son componentes naturales de la planta *S. rebaudiana*. En los glucósidos de esteviol radica sus propiedades edulcorantes y sus principales componentes son el esteviósido y el rebaudiósido A.<sup>16</sup>

Los diterpenos glucósidos contenidos en la *S. rebaudiana* tienen propiedades bactericidas y fungicidas, que pueden ser utilizados en la prevención de caries, los resfriados,

tratamiento de heridas, quemaduras y úlceras.<sup>47</sup> en el estudio realizado por Vitery<sup>19</sup> se observó que inhibe el crecimiento de *S. mutans* y *L. acidophilus*.

Estudios *in vitro* han demostrado que extractos de *S. rebaudiana* presentan actividad antibacteriana sobre *S. mutans*, *S. sobrinus* y *L. acidophilus*, organismos estrechamente relacionados en la producción y desarrollo de caries. *In vivo* e *in vitro* se ha observado que disminuye la producción de ácidos bacterianos atribuyéndosele un bajo potencial acidogénico y un menor efecto de desmineralización del esmalte en comparación con otros edulcorantes.<sup>24</sup>

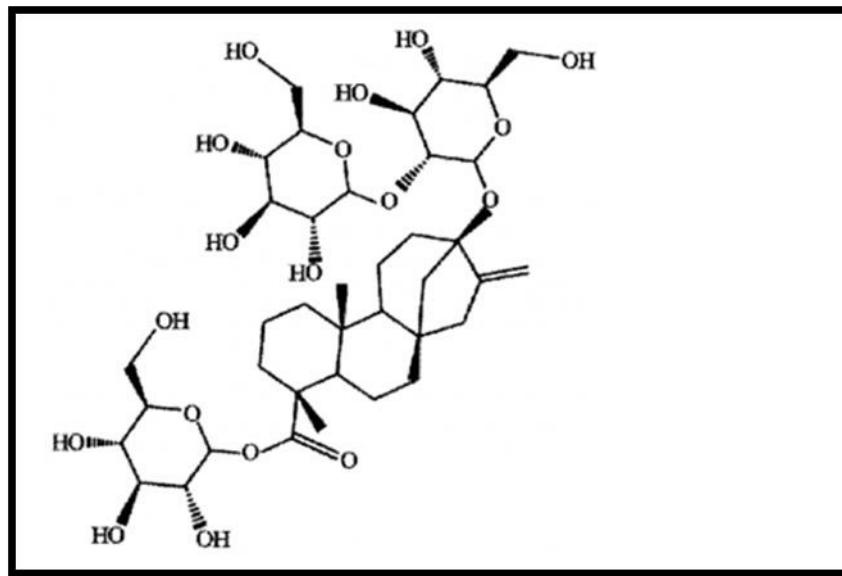
**Esteviósido:** fue llamado así por primera vez, de acuerdo con las normas aprobadas en el año 1931 por la " Unión Internacional de Química". Es un glucósido diterpeno de peso molecular 804,80 y su fórmula es C<sub>38</sub> H<sub>60</sub> O<sub>18</sub>. La estructura química fue dilucidada por Mosettig E. en 1963, en cuya fórmula se encuentra un aglucón (esteviol) y tres moléculas de glucosa.<sup>45, 46</sup>

Su punto de fusión es de 238 °C, su nombre completo es 13-O-beta-soforosil-19-O-beta-glucosil-steviol.<sup>48</sup> Su dulzor es 100 a 300 veces mayor que el de la sacarosa,<sup>43,49</sup> también se le ha atribuido un poder antihipertensivo según estudios en animales y humanos.<sup>50,24</sup> es usado en el tratamiento de la diabetes,<sup>51</sup> efecto hipotensor, que consiste en bloquear la entrada de iones Ca<sup>2+</sup> a las células del músculo liso vascular,

que promueve la vasodilatación así como reduce la resistencia periférica total y el volumen del líquido extracelular como resultado de un aumento de la diuresis y natriuresis,<sup>47</sup> es anticancerígeno debido a que el esteviósido tiene una actividad similar a muchos triterpenoides, en la producción de 12-O-tetradecanoil-phorbol-13-Acetato (tumores TPA),<sup>24</sup> antiinflamatorio e inmunomodulador porque disminuye significativamente la producción del factor de necrosis tumoral(TNF-R) y interleuquina 1 (IL-1) y ligeramente disminuye la producción de óxido nítrico (NO) en células estimuladas con lipopolisacáridos (LPS) y THP-1 (es una línea celular monocítica de leucemia humana).<sup>24</sup> es soluble en agua, metanol y etanol, el esteviósido puro no transgénico mantiene las propiedades curativas de la *S. rebaudiana* al 100 %.<sup>48</sup>

El esteviósido tiene propiedades antiinflamatorias, ejerce su efecto anti- inflamatorio mediante la inhibición de la activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas NF-k B y mitogén activado quinasa y la liberación de citoquinas pro- inflamatorias.<sup>52</sup>

Figura 2: estructura del esteviósido

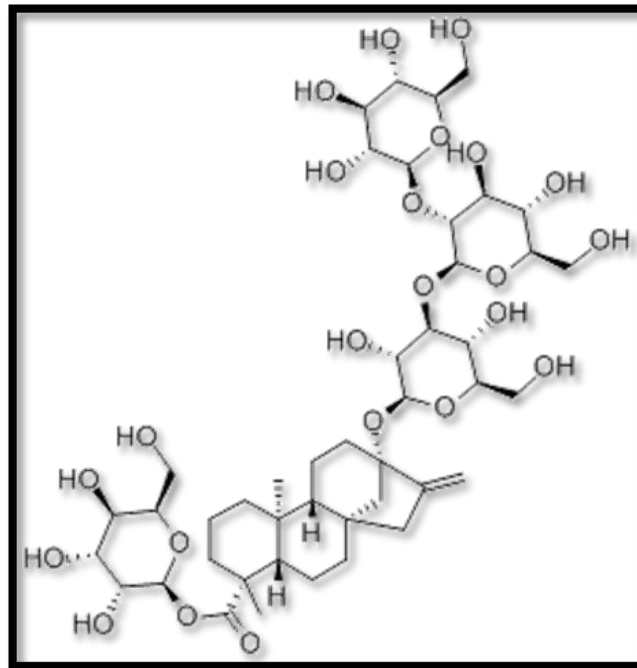


Fuente 36. Bravo A, et al Caracterización química de la *S. rebaudiana*. Rev. Per. Quím. Ing. Quím.2009; 12 (2): 5-8

**Rebaudiósido A:** es una de las 10 sustancias similares al azúcar,<sup>43,53</sup> es un polvo blanco su dulzor es unas 180 - 400 veces superior a la de la sacarosa, conocida como glucósido de esteviol que se encuentra en la *S. rebaudiana*,<sup>49</sup> es más soluble en agua que el esteviósido, y es totalmente soluble en una solución hidroalcohólica (50/50) (v/v)<sup>54</sup> y tiene una estructura similar al esteviósido, solo difieren en una molécula de glucosa<sup>7</sup>, masa molecular: 967,01; fórmula  $C_{44}H_{70}O_{23}$ <sup>55</sup> e intervalo de fusión: 242 -244° C<sup>55</sup>, densidad: 3710 kg/m<sup>3</sup>, 3,71 g/cm<sup>3</sup>. Su nombre completo es: 13-[(2-O-β-D-Glucopyranosyl-3-O-β-D-glucopyranosyl-β-D-glucopyranosyl)-oxy]kaur-16-en-8-oic-acid, p-Dglucopyranosyl ester.<sup>54</sup>

La ingesta diaria de rebaudiósido A está basada en la de esteviol, y es de 0 a 4 mg/kg (peso corporal).<sup>56</sup>

**Figura 3:** estructura del rebaudiósido A



Fuente 57: [http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB3736050.htm](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB3736050.htm)

### 3.2.1.9 Propiedades de la *Stevia rebaudiana*

Atención enumera las siguientes propiedades de la *S. rebaudiana*:<sup>16</sup>

- Posee propiedades hipoglucémicas.<sup>16,58,59</sup>
- Reduce la ansiedad por las comidas (dulces y grasas) y así, el cuerpo almacena menos grasas.<sup>59</sup>
- La *S. rebaudiana* retarda la aparición de la placa bacteriana que produce la caries dental.<sup>59</sup> Es por eso que se emplea para hacer enjuagues y como componente de la pasta de dientes.



- Es un hipotensor, baja la presión arterial cuando está demasiado alta. Tiene efecto vasodilatador, diurético y cardiotónico.<sup>59,60</sup>
- Colabora en la desintoxicación del organismo a causa del tabaco y el alcohol. Para aprovechar este beneficio, se puede preparar un té que reduce el deseo hacia estos dos tóxicos.
- Previene e inhibe la reproducción de bacterias y organismos infecciosos y mejorar la resistencia frente a resfríos y gripes. Posee propiedades antimicrobianas.<sup>17, 18, 19,61</sup>
- Múltiples estudios reportan un efecto antimicrobiano de los extractos de *S. rebaudiana*, sobre microorganismos como *Entamoeba coli*, *Staphylococcus aureus*<sup>62</sup> y *Corynebacterium diphtheriae*<sup>62</sup> y contra el hongo *Candida*,<sup>60</sup> como indica Lazanduri & Tigrero.<sup>63</sup> Por otro lado, otro estudio revela que el empleo de extractos obtenidos utilizando solventes orgánicos, específicamente de metanol, hexano y acetato de etilo, muestran mejor acción inhibitoria sobre *S. aureus*, que los extractos obtenidos utilizando agua.<sup>25</sup>
- Es adecuada para bajar el nivel el nivel de acidez de la sangre y de la orina,<sup>60,61</sup> y para problemas de acidez estomacal, por contener hierro, manganeso y cobalto. Mejora la digestión.<sup>61</sup>

- La *S. rebaudiana* sin ningún tipo de refinamiento posee propiedad bactericida, principalmente su efecto sobre bacterias causantes de la caries dental, problemas de encías y así como de la garganta irritada.<sup>60</sup> El extracto de hojas de *S. rebaudiana* es bactericida sobre el *S. mutans*, bacteria causante de la caries dental.<sup>31,43.</sup>
- La *S. rebaudiana* natural, sin refinar, contiene más de 100 fitonutrientes y aceites volátiles identificados. Esto era bien conocido por los nativos guaraníes que, la usaban para endulzar sus medicamentos y mates o simplemente masticaban sus hojas para disfrutar el dulce sabor que posee.<sup>16</sup>
- el edulcorante refinado es oficialmente catalogado como bajo en calorías.<sup>64</sup>

### 3.2.1.10 Cromatografía de capa fina (TLC) del extracto de *S.*

#### *rebaudiana*

realizado por Catalina Giraldo E y col. Después de la purificación y cristalización, se observó la presencia de tres bandas: una que aparece a la misma distancia del estándar de rebaudiósido A, otra a la distancia del estándar de esteviósido, y otra banda intermedia que sugiere la presencia de un tercer glucósido en la muestra. Según la intensidad de las bandas, los cristales obtenidos contienen mayoritariamente rebaudiósido A.<sup>65</sup>

### **3.2.1.11 Aprobación de su uso**

El Comité Mixto de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) en sus reuniones 68ª y 69ª evaluó los resultados de estudios específicos en humanos realizados y estableció una ingesta diaria aceptable (IDA) para los glucósidos de esteviol de 0–4 mg por kg de peso corporal, expresada como esteviol.<sup>16</sup>

La Administración de Alimentos Y Medicamentos (FDA) ha concluido que no existe fundamento para objetar el uso de ciertos preparados refinados de *S. rebaudiana* en alimentos. Éstos refinados de *S. rebaudiana* pueden ser legalmente vendidos y añadidos a productos alimenticios en los Estados Unidos.<sup>16</sup>

En el 2008, la FDA dio su aprobación para Rebaudiósido A, logrando un status GRAS “Generally Recognised As Safe”.<sup>66</sup>

### **3.2.1.12 Mecanismo de acción antibacteriana del extracto *S.***

#### ***rebaudiana***

El extracto es citotóxico e inhibe el crecimiento bacteriano, según Sayaraman y lin tiene mayor actividad con bacterias Gram- positivas.<sup>25, 28</sup>

Se ha podido determinar que los compuestos que estarían asociados con su propiedad antibacteriana serían los

glucósidos diterpenos presentes en la *S. rebaudiana*, como el esteviósido y esteviol y de sus aglicones que depende de la dimerización que se generan entre ellos, así también presenta bajo potencial acidogénico, disminuye la hidrofobicidad celular, inhibe la síntesis de polisacáridos extracelulares, reduciendo la agregación bacteriana, alterando la formación de biofilm dental.<sup>67</sup>

### **3.2.2 Enfermedades buco-dentales**

Como ha señalado la OMS recientemente las enfermedades bucodentales y, en particular, la caries y las enfermedades periodontales constituyen un problema de salud de alcance mundial que afecta a los países industrializados y cada vez con más frecuencia a los países en desarrollo, en especial, entre las comunidades más pobres.<sup>68</sup> Estas enfermedades tienen su origen en el biofilm dental.

#### **3.2.2.1 Biofilm dental**

Gran cantidad de las enfermedades infecciosas en las personas son causadas o exacerbadas por las biopelículas. El biofilm de la placa dental tiene un papel fundamental en la progresión de las enfermedades dentales.<sup>69</sup> La caries dental es un ejemplo de una enfermedad de biofilm dependiente, como resultado de las interacciones de los microorganismos, los factores del huésped, y la dieta (azúcares), que modifican la formación dinámica de biopelículas en las superficies dentales.<sup>70</sup> El biofilm es el principal agente etiológico de la caries y de las enfermedades periodontales.<sup>12,71</sup>

Los biofilms son comunidades estructuradas de células microbianas que son unidos a una superficie y enredados en un matriz extracelular, <sup>71,72,73</sup> de origen bacteriano y salival.<sup>14</sup> Una matriz extracelular de exopolímeros en la mucosa y las superficies dentales, estas biopelículas se encuentran naturalmente en la salud, y proporcionan beneficios para el anfitrión. No obstante, esta relación puede romperse, y la enfermedad puede ocurrir; debido al desequilibrio de las especies dentro del biofilms.<sup>72</sup>

Según la OMS, el biofilm se puede definir también como un ecosistema bacteriano proliferante y enzimáticamente activo.<sup>74</sup>

La cavidad oral es un ecosistema donde albergan principalmente comensales (aproximadamente  $10^{10}$  bacterias) pertenecientes a 500 o 700 especies, que colonizan las mucosas y dientes, donde forman la biopelícula o biofilm.<sup>75</sup>

La cavidad oral natural alberga una gran variedad de diferentes bacterias.<sup>4</sup> El *S. sanguinis* se encuentra entre las bacterias iniciadoras en la formación de biopelículas orales anteriores a la fijación de los colonizadores posteriores y, por tanto, de gran importancia en el desarrollo de enfermedades periodontales.<sup>76</sup>

La proporción de una especie bacteriana varía en función de la región anatómica que consideremos. Así por ejemplo en la

superficie dental las especies predominantes son *S. sanguinis*, *S. mutans*, *A. viscosus*. En cambio, *Streptococcus* (*S. salivarius*) y *Veillonella spp* tienen predisposición por la lengua y la mucosa oral y *Fusobacterium spp*, *Porphyromonas spp*, *Prevotella spp* y espiroquetas anaerobias por el surco gingival.<sup>77</sup>

En algunas condiciones, tales como el alto consumo de hidratos de carbono, puede cambiar la composición bioquímica y microbiológica de biofilm, lo que lleva a un aumento en la proporción de especies patógenas y la modificación de biofilm saludable en biofilm cariogénico. Por otra parte, dependiendo de la frecuencia esto puede conducir a la formación y desarrollo de la caries dental (enfermedad).<sup>78</sup> En la cavidad oral, los microorganismos en el biofilm dental están expuestos a grandes cantidades de azúcar durante un corto período de tiempo y algunos microorganismos tienen la capacidad de utilizar estos hidratos de carbono para producir ácido, sintetizar polisacáridos extracelulares y almacenar energía. Después de esta rápida exposición al azúcar, el biofilm dental se somete a largos períodos de inanición de azúcar. Estas condiciones fisiológicas de crecimiento bacteriano son conocidas como episodios de todo o nada <sup>78</sup> y puede causar selección microbiológica estrategias que aumentan la proporción de especies tolerantes a ácidos tales como *S. mutans* en biofilm.<sup>79,80</sup>

### 3.2.2.1.1 Formación de la placa dental

#### a. Formación de la película adquirida sobre la superficie del diente:

La formación de la película adquirida es la etapa inicial en la formación de la placa dental. Sobre la superficie del esmalte comienza a depositarse una película delgada amorfa que oscila entre 0,1 y 1,0 micrómetros de espesor, denominada película adquirida, compuesta por proteínas y glucoproteínas aniónicas unidas a la hidroxiapatita del esmalte. Estas proteínas y glucoproteínas provienen de elementos salivales y del fluido crevicular, así como de los desechos bacterianos y de las células de los tejidos.<sup>81,82</sup> Los mecanismos que intervienen en la formación de la película sobre el esmalte incluyen fuerzas electroestáticas, tipo van der Waals e hidrófobas. Es por ello que en la superficie de la hidroxiapatita que posee grupos fosfatos con carga negativa, interactúa con proteínas y glucoproteínas salivales y del fluido crevicular con carga positiva.<sup>81,82</sup>

La película formada opera como barrera de protección proporcionando lubricación a las superficies e impidiendo la desecación del tejido. Asimismo, posee moléculas que funcionan como sitios de unión para la adherencia de microorganismos y enzimas de origen salival, como lisosimas, amilasas y peroxidases, que favorecen la colonización bacteriana sobre la superficie de la película.<sup>81,82</sup>

**b. Colonización por microorganismos específicos:** La colonización por microorganismos específicos abarca varias etapas que son: la deposición, adhesión, coagregación, crecimiento y reproducción de los microorganismos adheridos sobre la película adquirida. Luego de formada la película adquirida, ésta es colonizada por microorganismos que residen en la cavidad bucal. Las bacterias se adhieren inmediatamente a las glucoproteínas de la película adquirida depositada en la superficie del diente.<sup>82</sup> Algunos mecanismos por los cuales las bacterias se adhieren a la película adquirida son: a través de moléculas específicas, denominadas "adhesinas", presentes en la superficie bacteriana que se unen con receptores específicos de la película adquirida; mediante estructuras proteínicas fibrosas, llamadas "fimbrias".

82

*S. sanguinis*,<sup>14</sup> es el primer microorganismo que se adhiere a la película adquirida y como tal, inicia la colonización microbiana en la formación de placa dental supragingival y seguidamente se adhiere a *A. viscosus*.<sup>10</sup> Algunos señalan que *S. sanguinis* y *A. viscosus* son los microorganismos pioneros en la colonización de la placa dental, y que la asociación de estas bacterias con la superficie del diente es un prerrequisito para la colonización posterior de especies de *Veillonella* y *Fusobacterium*.<sup>15</sup> Otras bacterias que inician el proceso de colonización son *Streptococcus del grupo oralis* (*S. oralis*, *S. mitis*), *Actinomyces spp.*, *Neisserias spp.*, y *Haemophilus spp.*<sup>82i</sup>



Luego viene la coagregación entre células microbianas, en el cual la adherencia de nuevos microorganismos se realiza sobre la primera capa de estos ya unidos a la superficie del diente. Estas interacciones se dan específicamente a través de proteínas de tipo lectinas y menos específicas resultantes de las fuerzas hidrófobas, electrostáticas y de Van der Waals.<sup>83</sup> Se han descrito coagregaciones entre *S. sanguinis* con *A. viscosus*, *A. naeslundii*, *Corynebacterium matruchotii* y *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), entre *Prevotella loescheii* (*P. loescheii*) con *A. viscosus* y entre *Capnocytophaga ochracea* con *A. viscosus*. También entre especies Gram positivas como *Streptococcus gordonii*, *S. mitis*, con *C. matruchotii* o con *Propionibacterium acnes*; entre especies Gram positivas con Gram negativas como *Streptococcus spp.* o *Actinomyces spp.* con *Prevotella spp.* y *Porphyromonas spp.*, *Capnocytophaga spp.*, *F. nucleatum*, *Eikenella corrodens*, *Veillonella spp.* y entre especies Gram negativas como *Prevotella melaninogenica* con *F. nucleatum*.<sup>72,84</sup> En las últimas fases de la formación de la placa, es probable que predomine la coagregación entre especies Gram negativas anaerobias, como *F. nucleatum* con *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*). Este fenómeno provee las condiciones para la interacción patogénica característica de las infecciones periodontales.<sup>82</sup>

**c. Formación de la matriz de la placa:** El crecimiento y reproducción de los microorganismos adheridos sobre la

película, puede conllevar a la formación de la placa dental madura. Estos microorganismos existen en una matriz intercelular, la cual está constituida por productos bacterianos, células (epiteliales, macrófagos y leucocitos), materiales orgánicos (polisacáridos, proteínas, y glucoproteínas) e inorgánicos (calcio y fósforo) derivados de la saliva o del líquido del surco gingival. Esta matriz forma un gel donde proliferan e interactúan las bacterias de diferentes especies. Especies de *Streptococcus* y *Actinomyces*, microorganismos pioneros en la colonización de la placa dental, utilizan el oxígeno lo que favorece el desarrollo de especies anaerobias, a su vez estas bacterias utilizan azúcares como fuente de energía y saliva como fuente de carbono; caso contrario ocurre con las bacterias anaerobias asacarolíticas en la placa madura que usan aminoácidos y péptidos como fuentes de energía. Los productos generados del metabolismo bacteriano como protohemina y hemina, derivado de la descomposición de la hemoglobina del hospedero favorecen el desarrollo de especies de anaerobios como *P. gingivalis*.<sup>82</sup> Como consecuencia de estos procesos e interacciones, se favorece el crecimiento y la supervivencia de especies anaerobias en la placa dental, así como, condiciones apropiadas para el desarrollo de periodontitis.<sup>82</sup>

#### **3.2.2.1.2 Tratamiento**

Como se ha comprobado por lo presentado hasta ahora, al organizarse en biofilm dental, las bacterias se convierten en

adversarios a tener en cuenta, pues son más resistentes a las distintas actuaciones encaminadas a combatirlos.<sup>12</sup>

Frente al biofilm dental podemos actuar:

1. Evitando o retrasando la aparición del mismo.

Se pueden realizar cambios en las características físicas y/o químicas de las superficies a las que se adhieren los biofilm, de forma que se impida o retrase la adhesión de los mismos.<sup>12</sup>

También se podría actuar sobre el medio líquido de crecimiento del biofilm.<sup>12</sup>

Se pueden realizar tratamientos que cambien el medio ambiente bacteriano (tratamiento ecológico), lo que imposibilitaría el desarrollo de determinados biofilms; de esta forma, mediante un buen control de la placa supragingival, se produciría un cambio en las condiciones ambientales subgingivales, dificultando el desarrollo de biofilm patógeno.<sup>12</sup>

2. Una vez el biofilm se ha desarrollado, fundamentalmente podría actuarse de dos formas para eliminarlos:

- Por medios físicos.
- Por medios químicos.

Siendo la cavidad oral de fácil acceso, se pueden eliminar el biofilm por medios físicos, bien a nivel supragingival (por medio del cepillado y profilaxis dental), bien a nivel

subgingival (por medio de raspado y alisado radicular, o cirugía periodontal). Una limitación de los procedimientos mecánicos de control de placa es que se concentran únicamente en las superficies duras de la cavidad oral.<sup>82</sup> Estudios recientes han demostrado que los microorganismos involucrados en la causa de la gingivitis y la periodontitis es la acumulación de placa sobre superficies de los tejidos blandos de la boca, que sirven como una fuente de bacterias para la colonización de superficies de los dientes.<sup>85</sup>

A nivel supragingival se pueden utilizar distintos antisépticos, y a nivel subgingival distintos antibióticos y antisépticos. Para que estos productos consigan el mayor efecto posible, sería deseable producir de forma física una desestructuración previa del biofilm.<sup>12</sup>

Los colutorios, en particular, la clorhexidina y los aceites esenciales disminuyen la formación de placa y la gingivitis, incluso en zonas de difícil acceso, teniendo extraordinarias características de seguridad y tolerabilidad. Además, entre los antisépticos comunes en los colutorios se incluyen, el triclosán, la hexetidina, los compuestos de amonio cuaternario, el delmopinol, la sanguinarina, y otros.<sup>85</sup> En términos microbiológicos, se ha visto que el uso a largo plazo de enjuagues de aceites esenciales es seguro.

La ventaja de los colutorios de aceites esenciales sobre los colutorios a base de clorhexidina es que no provoca la

aparición de manchas y tinciones oscuras en los dientes y la lengua y restauraciones.<sup>85</sup>

### 3.2.3 *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*)

#### 3.2.3.1 Taxonomía<sup>75,86</sup>

<b>Reino</b>	<i>Bacteria</i>
<b>Filo</b>	<i>Fermicutes</i>
<b>Clase</b>	<i>Bacilli</i>
<b>Orden</b>	<i>Lactobacillales</i>
<b>Familia</b>	<i>Streptococcacea</i>
<b>Genero</b>	<i>Streptococcus</i>
<b>Especie</b>	<i>S. sanguinis</i>

#### 3.2.3.2 *Streptococcus sanguinis* y grupo *viridans*

*S. sanguinis* se encuentra en el grupo sanguis dentro del grupo *viridans*, aunque algunos investigadores lo consideran dentro del grupo *mitis* basándose en la secuencia del gen 16SrRNA, pero puede diferenciarse fácilmente desde el punto de vista fenotípico de ese grupo por sus reacciones positivas para arginina dihidrolasa e hidrolisis de esculina.<sup>86</sup>

#### 1.2.1.1 Estructura celular

El nombre de la especie fue dada por White y Niven en 1944,<sup>75,88</sup> a los estreptococos  $\alpha$  -hemolíticos, aislados de la sangre de pacientes con endocarditis subaguda,<sup>75</sup> coco, Gram

positivo, inmóvil, pertenece al alfa hemolítico o gama del grupo de Lancefield presentes en la placa dental de la cavidad oral. <sup>89</sup> Su pared celular está formada por aminoácidos como cadena hidrófobas.<sup>90</sup>

El *S. sanguinis*, *S. mitis*, *Streptococcus milleri* (*S. milleri*), *S. salivarius*, y *S. mutans* constituye hasta 60 % de la microflora de la boca. Reside en la superficie del diente. *S. sanguinis* I y II producen el 16,4 % de la endocarditis infecciosa (IE). <sup>91</sup>

El *S. sanguinis* ha sido indicado como protector del diente contra la caries, pero principalmente en niños. <sup>92</sup>

### 3.2.4 *Actinomyces viscosus* (*A .viscosus*)

#### 3.2.4.1 Clasificación <sup>93,94</sup>

Esta especie bacteriana presenta la siguiente clasificación taxonómica:

<b>REINO</b>	<i>Actinobacteria</i>
<b>CLASE</b>	<i>Actinobacteria</i>
<b>SUBCLASE</b>	<i>Actinobacteridae</i>
<b>ORDEN</b>	<i>Actinomycetales</i>
<b>SUBORDEN</b>	<i>Actinomycineae</i>
<b>FAMILIA</b>	<i>Actinomycetaceae</i>
<b>GÉNERO</b>	<i>Actinomyces</i>
<b>ESPECIE</b>	<i>Actinomyces viscosus</i>

### 3.2.4.2 Descripción

Bacilo irregular, Gram positivo, condiciones anaeróbicas facultativas y CO<sub>2</sub> estimulan su crecimiento.<sup>95</sup>

*A. viscosus* crece en condiciones atmosféricas normales incluso algunas pueden crecer a temperaturas de hasta 45 °C, forman colonias.<sup>95</sup>

Se encuentra en la cavidad bucal de los seres humanos y animales, la placa subgingival, placa transparente, y cálculo dental son sus centros de crecimiento, es una bacteria cariogénica se encuentra en la caries radicular y se relaciona con enfermedades periapicales.<sup>95</sup>

*A. viscosus* y *A. naeslundii* son agentes microbianos de lesiones de caries radicular.<sup>96,97</sup>

*A. viscosus* puede generar microcolonias filiforme, la colonia típica es grande y pegajosa.<sup>95</sup>

### 3.2.4.3 Factores de virulencia

- **Adhesión:** *A. viscosus*, tiene una excelente capacidad para adherirse a una superficie con sus estructuras superficiales especiales, fimbria tipo I. Estas presentes en *A. viscosus* tienen afinidad por las proteínas ricas en prolina<sup>98</sup> y estaterina; se adhiere al esmalte del diente a través de adhesina- receptor.<sup>93</sup> Las fimbrias tipo 2 del *A. viscosus* interactúan con residuos de galactosa de *S. sanguinis*.<sup>90</sup> El *S.*

*sanguinis* también se une a través de las proteínas fijadoras: adhesinas.<sup>90</sup>

- **Hidrofobicidad:** el *S. sanguinis* tiene alta hidrofobicidad. La hidrofobicidad es inversamente proporcional a la electrocinética (potencial Z).<sup>90</sup>

- **Síntesis de polisacáridos extracelulares:** a partir de la fermentación de hidratos de carbono principalmente de la sacarosa que se ingiere en exceso y se queda en la placa o en los espacios retentivos de los dientes, el *S. sanguinis* produce polisacáridos extracelulares gracias a la acción de exoenzimas (de acción extracelular) que originan mutano, o dextrano (que son glucanos) y levano que es un fructano soluble. El mutano es muy adhesivo y les permite a muchas bacterias resistir las fuerzas de desplazamiento, los dextranos y levanos usualmente son reserva alimenticia bacteriana.<sup>99</sup> Estos polisacáridos en conjunto promueven la adherencia selectiva y acumulación de un amplio número de estreptococos cariogénicos en los dientes, también aumenta la porosidad y dimensión de la matriz de la placa dental. Esto posibilita una mayor difusión de sustrato a través de la superficie del esmalte, se produce un declive de los valores de pH en capas más profundas de la placa y se favorece el desarrollo de la caries.<sup>100</sup>

- **Quimiorganótrofos:** el *A. viscosus* fermenta los carbohidratos con producción de ácido, pero no gas. Los



productos finales de la fermentación de la glucosa pueden incluir ácido acético, fórmico, láctico y succínico, pero no ácido propiónico.<sup>101</sup>

### 3.3 Definición de términos

- **Actividad antibacteriana:** se define como la capacidad de matar, destruir y/o inactivar microorganismos; impedir su proliferación y/o impedir su acción patógena.<sup>102</sup>
- **Concentración Inhibitoria Mínima (CIM):** Es la menor concentración de una sustancia capaz de inhibir el crecimiento de 10<sup>5</sup> bacterias en 1 mL de medio de cultivo, tras 18-24 h de incubación. Se clasifica la sensibilidad de un germen frente a un antibiótico en función de su CMI.<sup>103</sup>
- **Concentración Mínima Bactericida (CMB):** Es la menor concentración capaz de destruir o matar al microorganismo, 10<sup>5</sup> bacterias en 1 ml de medio de cultivo, tras 18-24 h de incubación.<sup>104</sup>

### 3.4 Hipótesis principal

Existe efecto antibacteriano del extracto de *S. rebaudiana* sobre el *S. sanguinis* y *A. viscosus*.

### 3.5 Operacionalización de variables

**Variable independiente:** Efecto antibacteriano del extracto de *S. rebaudiana*

**Variable dependiente:** sensibilidad de *S. sanguinis* y *A. viscosus*.

Variable	Descripción	Dimensiones	Indicador	Escala	Categoría
<b>VARIABLE INDEPENDIENTE</b> <b>Efecto antibacteriana del extracto de <i>S. rebaudiana</i></b>	Capacidad de inhibir el crecimiento y desarrollo de bacterias por acción de la <i>S. rebaudiana</i>	Presencia o ausencia de efecto sobre Gram positivos	Presencia de halo de inhibición  Diámetro del halo de inhibición	Nominal  Intervalo	Sí / No  Mm
<b>VARIABLE DEPENDIENTE</b> <b><i>S. sanguinis</i> ATCC 10556</b>	Microorganismos iniciadores del biofilm dental.	Bacterias Gram positivas	Cocos en cadena.	Nominal  Intervalo	Mm Nula ( ) ≤ 8 mm. Sensibilidad límite (+) de 9 a 14 mm. Media (++) de 15 a 19 mm. Sumamente sensible (+++) ≥20 mm.
<b><i>A. viscosus</i> ATCC 15985</b>	Microorganismos iniciadores del biofilm dental.	Bacterias Gram positivas	Bacilos ramificados	Nominal  Intervalo	Mm Nula ( ) ≤ 8 mm. Sensibilidad límite (+) de 9 a 14 mm. Media (++) de 15 a 19 mm. Sumamente sensible (+++) ≥20 mm.

## IV METODOLOGIA

### 4.1 Tipo de investigación

El análisis del estudio pertenece al tipo:

- **Experimental:** porque el investigador controla la acción de una variable sobre otra, existiendo controles positivo y negativo.
- **Longitudinal:** debido a que el registro de la información se realizará después de efectuado el experimento.
- **In vitro:** porque el estudio se realizó en el laboratorio de microbiología de la facultad de odontología de la UNMSM.

### 4.2 Población y muestra

**Población:** son alrededor de 500 a 700 especies, que colonizan las mucosas y dientes, donde forman la biopelícula o biofilm.<sup>71</sup>

**Muestra:** bacterias iniciadoras de biofilm dental, cepas de *S. sanguinis* y *A. viscosus*.

#### Criterios de inclusión

- Cepas de *S. sanguinis* ATTC 10556 y *A. viscosus* ATTC 15985 *a priori* al enfrentamiento con el extracto.
- Placas que después del proceso de incubación no presentaron contaminación por microbios (hongos). Se observa la no presencia de formas miceliales u otros tipos de colonias.

### **Criterios de exclusión**

- Placas que después del proceso de incubación mostraron contaminación por otros microbios (hongos). Se observa la presencia de formas miceliales u otros tipos de colonias que no sean *S. sanguinis* y *A. viscosus*

### **4.3 Procedimiento y Técnicas**

#### **Obtención del extracto de *S. rebaudiana*.**

La extracción se realizó por maceración a temperatura ambiente con etanol al 96 %, solución hidroalcohólica (7:3). Luego el solvente fue evaporado a sequedad en rotavapor a temperatura menor a 40 °C

#### **Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto de *S. rebaudiana* frente a *S. sanguinis* y *A. viscosus* → Método de difusión en agar con discos.**

Fundamento<sup>90</sup> Este procedimiento representa la prueba de susceptibilidad más empleada en bacteriología clínica, permite obtener resultados exactos mediante un procedimiento estandarizado, sencillo, económico y reproducible. Se utiliza en el estudio de la inhibición del crecimiento bacteriano, mediante la difusión de las sustancias activas en un medio sólido la que se evidencia con la formación de halos de inhibición.

- **Microorganismo:**

**Bacterias Gram positivas:** *S. sanguinis* ATCC 10556 y *A. viscosus* ATCC 15987.

- **Control positivo:**

Clorhexidina al 0,12%.

- **Control negativo:**

Etanol 96 °

- **Muestra:**

Extracto de *S. rebaudiana* en concentraciones de 15 mg/ml, 30 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 120 mg/ml.

### **Prueba de sensibilidad de difusión en placa de agar con disco**

Activación de la cepas, para ellos hacemos la siembra por agotamiento de la cepas en medios, las cepas de *S. sanguinis* y *A. viscosus* en medios de agar TSA por 24- 48 horas en medio CO<sub>2</sub> y agar sangre por 7 días en anaerobiosis respectivamente, a 37 °C, para el periodo de adaptación y crecimiento, luego de la activada las cepas, medimos el nivel de turbidez de las cepas, colocando suero fisiológico en tubo de prueba y vamos colocando las cepas aproximadamente 5 colonias hasta alcanzar un nivel de turbidez de 0,5 McFarland, la siembra por disseminación de 100 ul de la dilución en agar TSA y sangre, con la ayuda de un hisopo. Seguidamente colocamos los discos cargados con 10 µl de las diferentes concentraciones de *S. rebaudiana* (15 mg/ml, 30 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml y 120 mg/ml), colocando un disco para el control positivo (clorhexidina al 0,12 %) y otro para el control negativo (etanol 96 °). Posteriormente procedemos a incubar a 37°C por 48 horas en medio CO<sub>2</sub> (*S. sanguinis*) y 7 días en anaerobiosis (*A. viscosus*), seguidamente procedemos a hacer la lectura en función al diámetro del halo de inhibición del crecimiento del microorganismo (HICM) según la escala de Duraffourd : nula ( ) si fue inferior o igual a 8 mm; sensibilidad límite (sensible

= +) de 9 a 14 mm; media (muy sensible = ++) de 15 a 19 mm y sumamente sensible (S.S = +++) si fue igual o superior a 20 mm

#### **4.4 Recolección de datos**

Se utilizó la ficha de recolección de datos (ver anexo 1) en la cual se anotaron los resultados obtenidos de la prueba de susceptibilidad; a través de la medición en milímetros de los halos de inhibición.

#### **4.5 Procesamiento y análisis de datos**

Los datos obtenidos fueron procesados en el programa estadístico SPSS versión 19.0. Para el análisis se comparó los resultados obtenidos del efecto a diferentes concentraciones del extracto de *S. rebaudiana* frente al *S. sanguinis* y *A. viscosus*, control positivo y control negativo utilizando el método de análisis estadístico, los promedios, desviación estándar y errores estándar de las variables. Para ver si hay diferencia significativa entre los extracto se utilizó la prueba Kruskal Wallis y Para evaluar entre quienes existen diferencias significativas, se comparó por pares de medianas utilizando la prueba U de Mann Whitney.

## V RESULTADOS

Se realizaron 10 ensayos válidos para cada concentración de extracto de *S. rebaudiana* frente a *S. sanguinis* y otros 10 ensayos para enfrentarlos con *A. viscosus*, donde se obtuvieron las mediciones observadas en la Tabla 1 y Tabla 7.

**Tabla 1: Halo de inhibición según diferentes concentraciones del extracto de *S. rebaudiana* sobre a *S. sanguinis***

		concentración del extracto de <i>S. rebaudiana</i>					Clorhexidina 0,12 %	Alcohol 96°
		15 mg/ml	30 mg/ml	50 mg/ml	60 mg/ml	120 mg/ml	C(+)	C(-)
<b>HALO DE INHIBICION EN (mm) <i>S. sanguinis</i></b>	<b>Placa N° 1</b>	6.5	8	7	7	9	11	6
	<b>Placa N° 2</b>	6,5	6,5	8	8	7,5	9	6
	<b>Placa N° 3</b>	6,5	7,5	7	9	8	9	6
	<b>Placa N° 4</b>	7	8	8	8,5	9	9	6
	<b>Placa N° 5</b>	6,5	10	10	9	8,5	9	6
	<b>Placa N° 6</b>	7	7	7	7,5	7,5	9	6
	<b>Placa N° 7</b>	7	9	9	7,5	7	9	6
	<b>Placa N° 8</b>	7	10	10	9	7	13	6
	<b>Placa N° 9</b>	7	8	8	8	9	9	6
	<b>Placa N° 10</b>	7	8	8	9,5	8,5	13	6

## 5.1 Actividad antibacteriana del extracto de *S. rebaudiana* sobre a *S.*

### *sanguinis*

Con los datos obtenidos se procedió al análisis estadístico de la siguiente manera:

Se realizó la prueba de normalidad para los halos de inhibición de cada concentración con la finalidad de demostrar que estos tienen una distribución normal ( $P \geq 0,05$ ) al 95 % de nivel de confianza. Se encontró que el extracto de *S. rebaudiana* en concentraciones de 30, 50, 60 y 120 mg/ml presentan distribución normal ( $P \geq 0,05$ ), mientras que la concentración del extracto de 15 mg/ml no presenta distribución normal ( $P < 0,05$ ).

**Tabla 2: Prueba de normalidad**

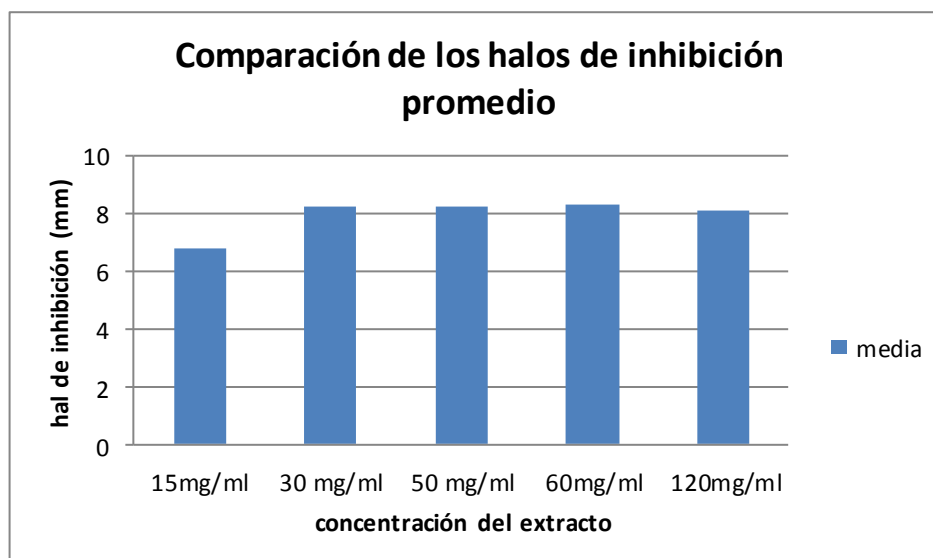
	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	Gl	Sig.	Estadístico	Gl	Sig.
Concentración 15 mg/ml	,381	10	,000	,640	10	,000
Concentración 30 mg/ml	,268	10	,040	,909	10	,274
Concentración 50 mg/ml	,270	10	,037	,848	10	,055
concentración 60 mg/ml	,202	10	,200*	,938	10	,532
concentración 120 mg/ml	,189	10	,200*	,873	10	,109
control +	,422	10	,000	,628	10	,000



**Tabla 3: Halo de inhibición promedio según diferentes concentraciones del extracto de *S. rebaudiana* sobre el *S. sanguinis***

	concentración 15 mg/ml	Concentración 30 mg/ml	concentración 50 mg/ml	concentración 60 mg/ml	concentración 120 mg/ml	control +	Control -
<b>N Válidos</b>	10	10	10	10	10	10	10
<b>Perdidos</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>Media</b>	6,80	8,20	8,20	8,30	8,10	10,00	6,00
<b>Mediana</b>	7,00	8,00	8,00	8,25	8,25	9,00	6,00
<b>Desv. tip.</b>	,258	1,15	1,13	,823	,80	1,69	,00
<b>Varianza</b>	,067	1,34	1,28	,678	,65	2,88	,00

**Figura 4: Halo de inhibición promedio según diferentes concentraciones del extracto**

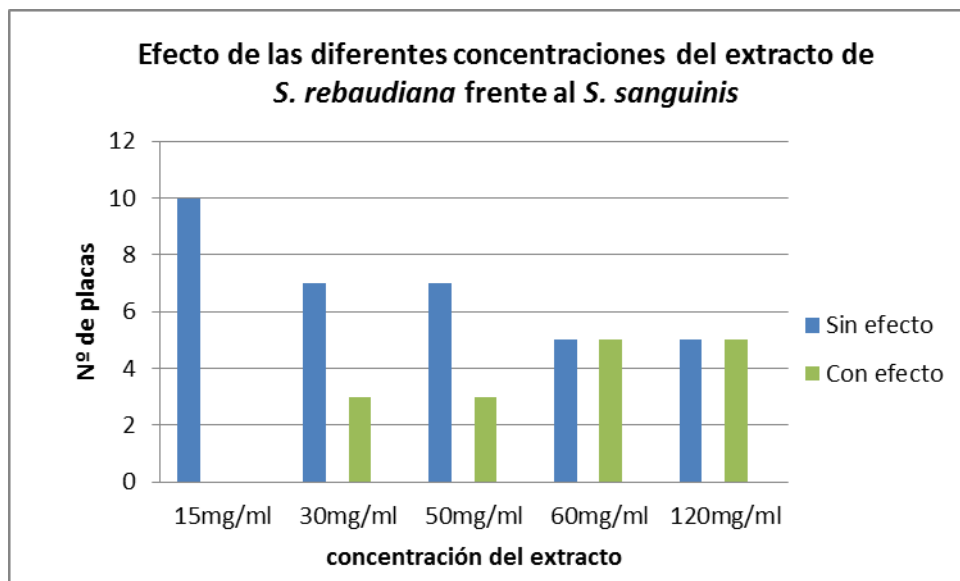


Los halos de inhibición de mayor diámetro se presentan en la concentración del extracto al 60 mg/ml, con una media de 8,30 y mediana de 8,25 mm; le sigue la concentración del extracto al 50 mg/ml , con una media de 8,20 y mediana de 8 mm; y la concentración de 30 mg/ ml, con una media de 8,20 y mediana de 8 mm, seguidamente la concentración de 120 mg/ ml, con una media de 8,10 y mediana de 8,25 mm por último, la concentración del extracto de 15 mg/ml presenta los halos de inhibición de menor tamaño, con una media de 6,8 y mediana de 7 mm.

**Tabla 4: Efecto de las diferentes concentraciones del extracto**

Concentración del extracto	Sin efecto		Con efecto		Total
	Nº	%	Nº	%	
15 mg/ml	10	100	0	0	10
30 mg/ml	7	70	3	30	10
50 mg/ml	7	70	3	30	10
60 mg/ml	5	50	5	50	10
120 mg/ml	5	50	5	50	10

**Figura 5: Efecto de las diferentes concentraciones del extracto**



Las concentraciones del extracto 30, 50, 60 y 120 mg/ml presenta efecto frente al *S. sanguinis*. Pero la concentración del 15 mg/ml no presenta efecto.

**5.2 Comparación del efecto del extracto de *S. rebaudiana* en diferentes concentraciones sobre el crecimiento de *S. sanguinis***

Dado que una de las concentraciones del extracto no presenta distribución normal, se utilizó la prueba de Kruskal Wallis para comparación de más de dos medianas.

**Tabla 5: Kruskal Wallis para comparar las medianas**

**Rangos**

concentración	N	Suma- rango	X <sup>2</sup>	P
Concentración 15,00	10	84,0	18. 09	0.001
30,00	10	290,5		
50,00	10	290,5		
60,00	10	318,5		
120,00	10	291,5		
Total	50			

Utilizando la prueba de Kruskal Wallis se observa que existen diferencias significativas entre las cinco concentraciones del extracto, ( $P < 0,05$ ). Para evaluar entre quienes existen diferencias significativas, se comparó por pares de medianas utilizando la prueba U de Mann Whitney (Suma de rangos de Wilcoxon).

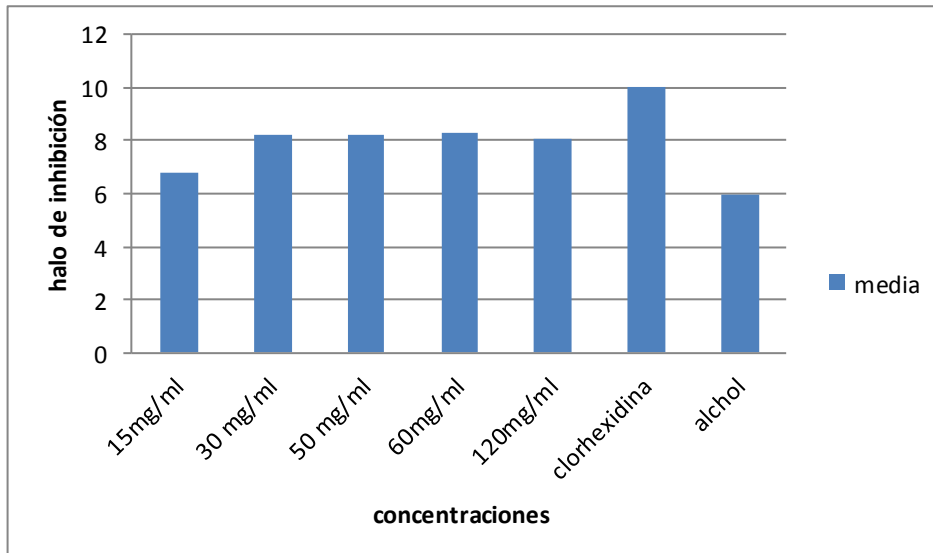
**Tabla 6:** prueba U de Mann Whitney

<b>Extracto</b>	<b>Nº</b>	<b>Z</b>	<b>P</b>
15mg/ml vs 30mg/ml	10	-3,05	0,02 < 0.05
15mg/ml vs 50mg/ml	10	-3,28	0,001 < 0.05
15 mg/ml vs 60mg/ml	10	-3,65	0,00 < 0.05
15 mg/ml vs 120 mg/ml	10	-3,46	0,001 < 0.05
30 mg/ml vs 50 mg/ml	10	0,00	1,00 > 0.05
30 mg/ml vs 60 mg/ml	10	-0,30	0,75 > 0.05
30 mg/ml vs 120 mg/ml	10	-0,04	0,96 > 0.05
50 mg/ml vs 60 mg/ml	10	-0,38	0,70 > 0.05
50 mg/ml vs 120 mg/ml	10	-0,04	0,96 > 0.05
60 mg/ml vs 120 mg/ml	10	-0,58	0,56 > 0.05
Clorhexidina vs 15mg/ml	10	-3,93	0,00 < 0.05
Clorhexidina vs 30 mg/ml	10	-2,55	0,01 < 0.05
Clorhexidina vs 50 mg/ml	10	-2,55	0,01 < 0.05
Clorhexidina vs 60 mg/ml	10	-2,62	0,01 < 0.05
Clorhexidina vs 120 mg/ml	10	-3,19	0,00 < 0.05

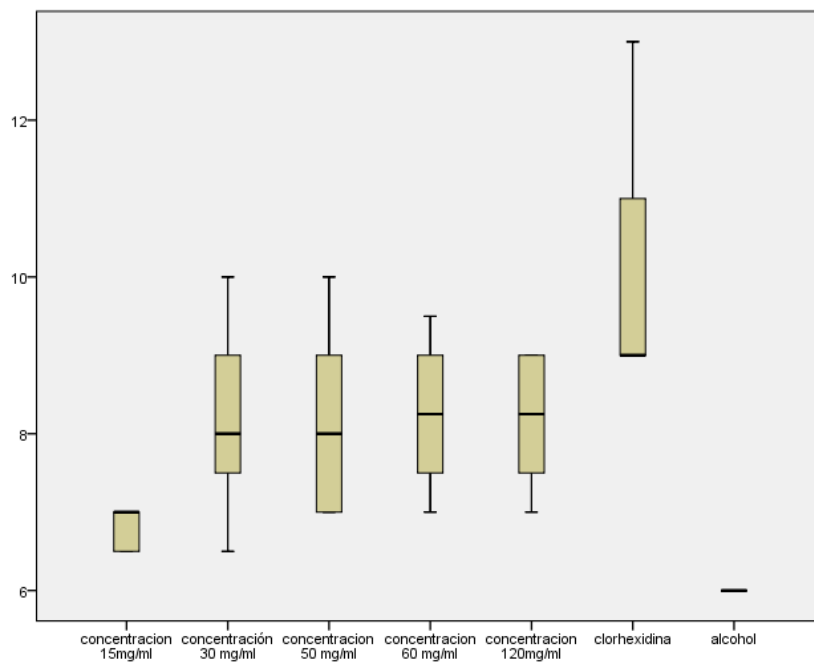
El resultado de la prueba de suma de rangos de Wilcoxon estandarizó a un valor Z, el cual nos muestra que existe diferencias significativas entre los pares de 15 mg/ml vs 30 mg/ml, 15 mg/ml vs 50 mg/ml, 15 mg/ml vs 60 mg/ml, 15 mg/ml vs 120 mg/ml concentraciones del extracto ( $P < 0,05$ ). en el resto no hubo diferencia significativa ( $P > 0,05$ ). Al comparar las concentraciones del extracto con la clorhexidina, en todas hubo diferencias significativas.

Ahora procedemos a comparar las medias de las concentraciones y la clorhexidina.

**Figura 6: Halo de inhibición de las diferentes concentraciones del extracto y de la clorhexidina al 0,12 % sobre el *A. sanguinis*.**



**Figura 7: Diagrama de caja**



En la concentración de 15 mg/ml los diámetros de los halos están dispersos entre el 25 % y 50 %.

En la concentración del 30 mg/ml los diámetros de los halos están más dispersos entre el 50 % y 75 % de la muestra.

En la concentración 50 mg/ml, 60 mg/ml y 120 mg/ml los diámetros de los halos está disperso equitativamente entre el 25 a 50 % y 50 a 75 %.

### **Análisis estadísticos del efecto antibacteriano del extracto de *S. rebaudiana* sobre el *A. viscosus***

Se realizaron 10 ensayos válidos para cada concentración de extracto de *S. rebaudiana* sobre a *A. viscosus*, donde se obtuvieron los resultados observados en la tabla 7. Las mediciones de los halos de inhibición fueron registradas en la recolección de datos que se observa en la tabla 7.

**Tabla 7: Halo de inhibición según diferentes concentraciones del extracto de *S. rebaudiana* sobre al *A. viscosus*.**

		Concentración del extracto de <i>S. rebaudiana</i>					Clorhexidina 0,12 %	Alcohol 96°
		15 mg/ml	30 mg/ml	50 mg/ml	60 mg/ml	120 mg/ml	C(+)	C(-)
<b>HALO DE INHIBICION EN <i>A. viscosus</i> (mm)</b>	<b>Placa Nº 1</b>	6.5	7.5	7	8	8	13	6
	<b>Placa Nº 2</b>	6.5	7.5	6.5	6.5	8	11	6
	<b>Placa Nº 3</b>	7	7.5	6.5	7.5	9	18	6
	<b>Placa Nº 4</b>	7	10	11	7	7	16	6
	<b>Placa Nº 5</b>	7	7	8	7	7	13	6
	<b>Placa Nº 6</b>	7	11	11	9	10	17	6
	<b>Placa Nº 7</b>	8	10	12	10	8	18	6
	<b>Placa Nº 8</b>	9	12	10	7.5	8.5	18	6
	<b>Placa Nº 9</b>	7	13	10	8	8	16	6
	<b>Placa Nº 10</b>	7	11	10	9	7	15	6

Con las medidas obtenidas se procedió al análisis estadístico de la siguiente manera:

Se realizó la prueba de normalidad para los halos de inhibición de cada concentración con la finalidad de demostrar que estos tienen una distribución normal ( $P \geq 0,05$ ) al 95 % de nivel de confianza. Se encontró que el extracto de *S. rebaudiana* en concentraciones de 30, 50, 60 Y 120 mg/ml presentan distribución normal ( $P \geq 0,05$ ), mientras que la concentración del extracto al 15 mg/ml no presenta distribución normal ( $P < 0,05$ ).

**Tabla 8: prueba de normalidad**

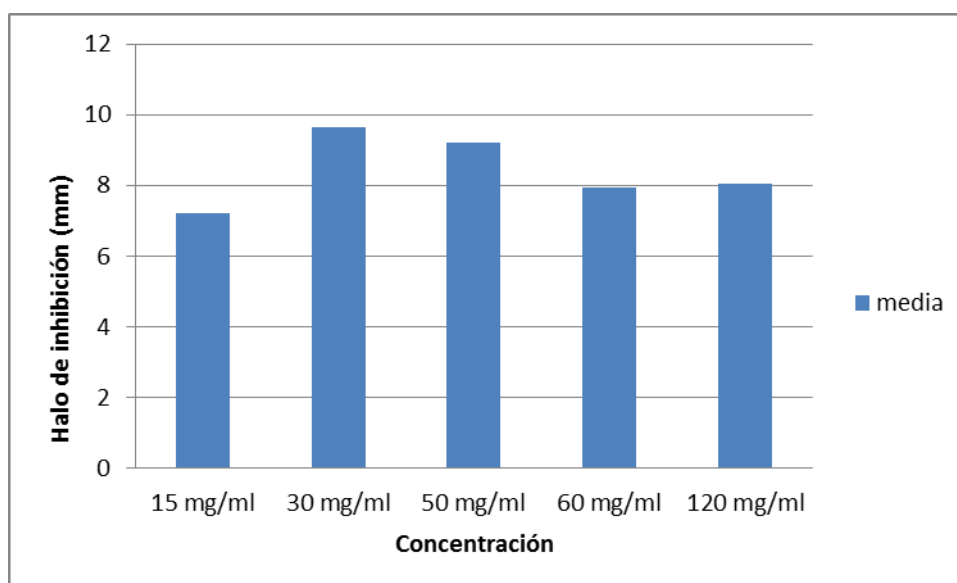
	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Concentración 15 mg/ml	,405	10	,000	,729	10	,002
Concentración 30 mg/ml	,242	10	,102	,897	10	,202
Concentración 50 mg/ml	,253	10	,069	,888	10	,160
Concentración 60 mg/ml	,182	10	,200*	,941	10	,559
Concentración 120 mg/ml	,221	10	,182	,887	10	,156



**Tabla 9: Halo de inhibición promedio según diferentes concentraciones del extracto de *S. rebaudiana* sobre el *A. viscosus***

	concentración 15 mg/ml	Concentración 30 mg/ml	Concentración 50 mg/ml	Concentración 60 mg/ml	concentración 120 mg/ml	Contro l +	Control -
<b>N Válidos</b>	10	10	10	10	10	10	10
<b>Perdidos</b>	0	0	0	0	0	0	0
Media	7,20	9,65	9,20	7,95	8,05	15,50	6,00
Mediana	7,00	10,00	10,00	7,75	8,00	16,00	6,00
Moda	7,00	7,50	10,00	7,00	8,00	13,00 <sup>a</sup>	6,00
Desv. típ.	0,75	2,15	2,03	1,09	0,96	3,24	0,00
Varianza	0,57	4,61	4,12	1,19	0,91	10,50	0,00

**Figura 8: Comparación de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones**



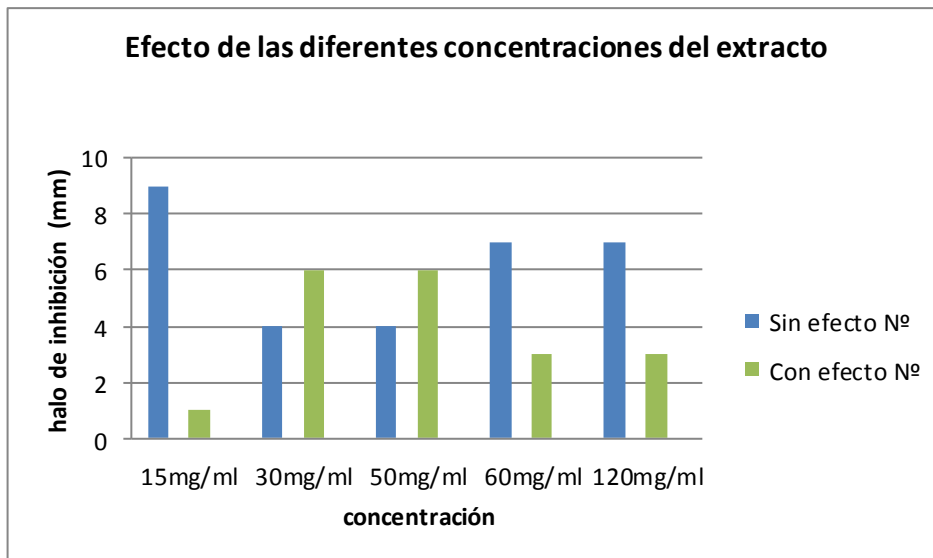
Los halos de inhibición de mayor diámetro se presentan en la concentración del extracto 30 mg/ml, con una media de 9,65 y mediana de 10 mm; le sigue la concentración del extracto 50 mg/ml, con una media de 9,2 y mediana de 10 mm; posteriormente la concentración 120 mg/ml, con una media de 8,05 y una mediana de 8 mm, le sigue la concentración del extracto 60 mg/ml, con una media de 7,95 y una mediana de 7,75 mm y por último le sigue la concentración del extracto 15 mg/ml presenta los halos de inhibición de menor tamaño, con una media de 7,2 y mediana de 7 mm.

**Tabla 10: Efecto de las diferentes concentraciones del extracto**

Concentración del extracto	Sin efecto		Con efecto		Total
	Nº	%	Nº	%	
15 mg/ml	9	90	1	10	10
30 mg/ml	4	40	6	60	10
50 mg/ml	4	40	6	60	10
60 mg/ml	7	70	3	30	10
120 mg/ml	7	70	3	30	10

**Figura 9: Efecto de las diferentes concentraciones del extracto frente al *A.***

***viscosus***



Todas las concentraciones del extracto presenta efecto antibacteriano frente al *A. viscosus*.

**5.3 Comparación del efecto del extracto de *S. rebaudiana* en diferentes concentraciones sobre el crecimiento de *A. viscosus***

Dado que una de las concentraciones del extracto no presenta distribución normal, se utilizó la prueba de Kruskal Wallis para comparación de más de dos medianas.

**Tabla 11: Kruskal Wallis para comparar las medianas**

Concentración	N	Suma de rango	X <sup>2</sup>	P
15,00	10	140,0	11.7	0.02
30,00	10	344,5		
50,00	10	305,0		
60,00	10	233.0		
120,00	10	252.5		
Total	50			

Utilizando la prueba de Kruskal Wallis se observa que existen diferencias significativas entre las cinco concentraciones del extracto, ( $P < 0,05$ ). Para evaluar entre quienes existen diferencias significativas, se comparó por pares de medianas utilizando la prueba U de Mann Whitney (Suma de rangos de Wilcoxon).

**Tabla 12: Prueba U de Mann Whitney**

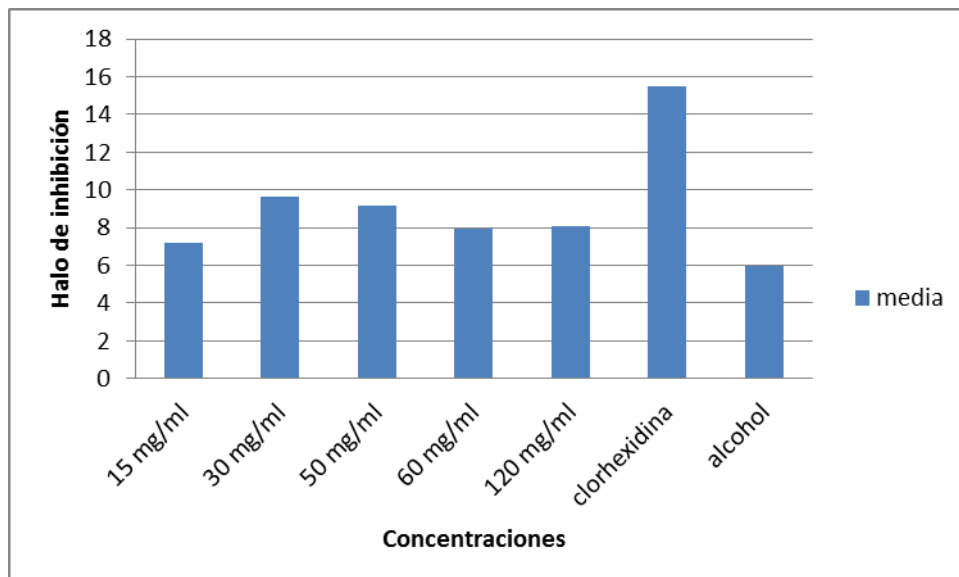
<b>Extracto</b>	<b>Nº</b>	<b>Z</b>	<b>P</b>
15mg/ml vs 30mg/ml	10	-3,02	0,00 < 0.05
15 mg/ml vs 50 mg/ml	10	-1,98	0,05< 0.05
15 mg/ml vs 60 mg/ml	10	-1,80	0,07>0.05
15 mg/ml vs 120 mg/ml	10	-2,20	0,03< 0.05
30 mg/ml vs 50 mg/ml	10	-0,61	0,54>0.05
30 mg/ml vs 60 mg/ml	10	-1,76	0,08> 0.05
30 mg/ml vs 120 mg/ml	10	-1,49	0,14> 0.05
50 mg/ml vs 60 mg/ml	10	-1,34	0,18>0.05
50 mg/ml vs 120 mg/ml	10	-1,15	0,25>0.05
60 mg/ml vs 120 mg/ml	10	-0,34	0,72>0.05
Clorhexidina vs 15mg/ml	10	-4,05	0,00<0.05
Clorhexidina vs 30 mg/ml	10	-3,50	0,00<0.05
Clorhexidina vs 50 mg/ml	10	-3,64	0,00<0.05
Clorhexidina vs 60 mg/ml	10	-3,79	0,00<0.05
Clorhexidina vs 120 mg/ml	10	-3,80	0,00<0.05

El resultado de la prueba de suma de rangos de Wilcoxon estandarizó a un valor Z, el cual nos muestra que existe diferencias significativas entre los pares de 15 mg/ml vs 30 mg/ml, 15 mg/ml vs 50 mg/ml, 15 mg/ml vs 120

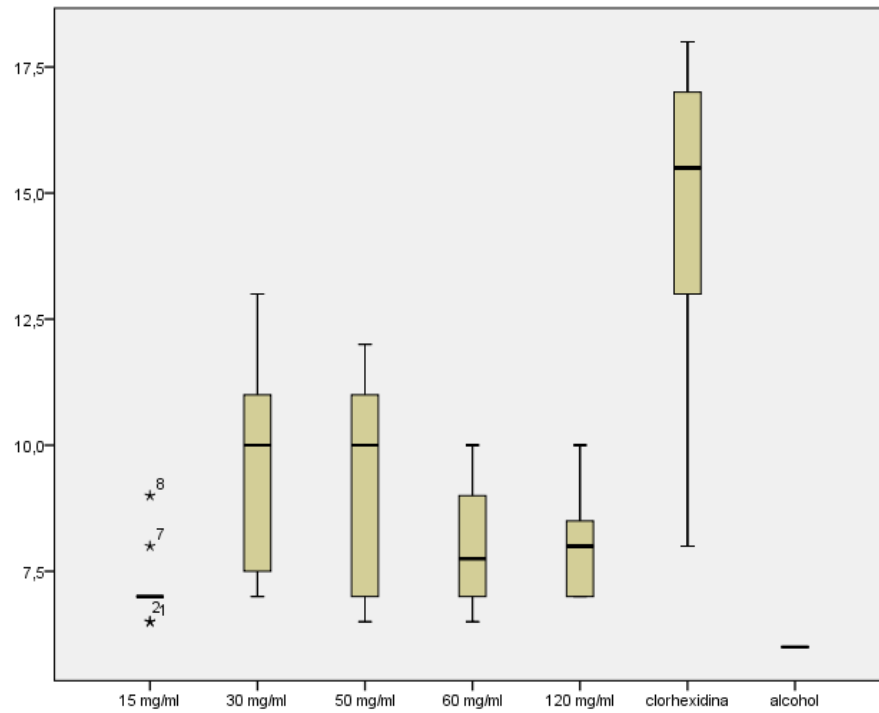
mg/ml, concentraciones del extracto ( $P < 0,05$ ), en el resto no hubo diferencia significativa. ( $P > 0,05$ ). Al comparar las concentraciones del extracto con la clorhexidina, en todas hubo diferencias significativas.

Ahora procedemos a comparar las medias de las concentraciones y la clorhexidina.

**Figura 10: Halo de inhibición de las diferentes concentraciones del extracto y de la clorhexidina al 0,12 % sobre el *A. viscosus***



**Figura 11: diagrama de caja**



En las concentración de 30 mg/ml, 50 mg/ml y 120 mg/ml los diámetros de los halos están más disperso entre el 25 % y 50 %.

En la concentración de 60 mg/ml los diámetros de los halos están más disperso entre el 50% y 75 %.

## VI DISCUSIÓN

- Actualmente se investigan numerosas plantas con la objetivo de encontrar en ellas componentes antimicrobianos que luego puedan ser utilizados medicinalmente. *S. rebaudiana* es una planta que es utilizada en la medicina tradicional por sus múltiples propiedades. En la presente investigación se buscó determinar la actividad antibacteriana “*in vitro*” del extracto de *S. rebaudiana* frente a *S. sanguinis* y *A. viscosus*. No se encontró un trabajo sobre el efecto antibacteriano del extracto de *S. rebaudiana* sobre las cepas de *S. sanguinis* pero en los trabajos revisados tales como **Pérez**<sup>17</sup> en su estudio con el objetivo de evaluar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de la *S. rebaudiana* sobre el *S. mutans*, se utilizó extractos de hojas fresca de *S. rebaudiana*, seis concentraciones en etanol de 70° y seis concentraciones en etanol de 30°, en total doce concentraciones. Concluyendo que el extracto etanólico de *S. rebaudiana* posee efecto antibacteriano sobre *S. mutans*, bacteria del mismo género al cual pertenece el *S. sanguinis*, a su vez también **Gamboa y col**<sup>18</sup> en un estudio acerca de la actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de *S. rebaudiana* sobre microorganismos cariogénico, tales como las bacterias del género *Streptococcus* y *Lactobacillus*. En sus resultados, logro un mejor resultado en la inhibición del desarrollo de *Lactobacillus*, pero también pudo inhibir al género *streptococcus*, al cual pertenece el *S. sanguinis*, a su vez **Vitery y col**<sup>19</sup> en su estudio al evaluar la actividad inhibitoria de la *S. rebaudiana* sobre el *L. acidophilus* y *S. mutans*, se comprobó la actividad antibacteriana sobre el *L. acidophilus* y *S. mutans*. Así también **Tovar y col**<sup>21</sup> evaluó la actividad antimicrobiana del extracto de *Stevia* en comparación con el xilitol sobre el *S. mutans* obteniendo como resultado que la *S. rebaudiana* presenta mayor efecto antimicrobiano que el xilitol, además **Jayaraman y col.**<sup>25</sup> evaluó las actividades antimicrobianas y antitumorales del extracto de *S. rebaudiana*, se comparó el efecto de los cuatros extracto disueltos en aceato de etilo, acetona,

cloroformo y agua, contra *S. aureus*, *S. typhi*, *E. coli*, *B. subtilis*, y *V. cholerae*, utilizando el método de difusión de agar en pozos. Se evaluó la actividad antifúngica sobre *C. albicans*, *C. neoformans*, *T. mentagrophytes* y *Epidermophyton*. El extracto de acetona mostro mayor actividad frente a Gram-positivos, el *S. sanguinis* y *A. viscosus* son Gram – positivas. En estos antecedentes se pudo comprobar la actividad antibacteriana del extracto de *S. rebaudiana* sobre el género *Streptococcus*, bacterias Gram positivas. **Lin y col.**<sup>28</sup> comprobó la acción antibacteriana y antitumorales de los análogos de esteviósido, los compuestos sintetizados fueron más activos contra bacterias Gram positivos como el *B. subtilis*.

- Nuestro estudio también evaluó el efecto antibacteriano del extracto de *S. rebaudiana* sobre *A. viscosus*, cuyo resultado fue que a la concentración de 30 y 50 mg/ml presentan sensibilidad limite según la escala de Duraffort, pero no se encontró estudios donde lo hayan enfrentado contra esta bacteria.
- Las cepas bacterianas que empleamos en este trabajo son bacterias iniciadoras del biofilm dental. Según **Schmidt**<sup>76</sup> y **Marsh**<sup>14</sup> el *S. sanguinis* se encuentra entre las bacteria iniciadoras en la formación del biofilm dental; a su vez **Guillarte**<sup>82</sup> afirma que el *S. sanguinis* es el primer colonizador del biofilm seguido del *A. viscosus*. **Guillarte**<sup>82</sup> y **Kamma**<sup>15</sup> también afirman que ambas bacterias son microorganismos pioneros en la colonización de la placa dental, y a su vez son prerequisites para la colonización posterior de especies tipo *Veillonella* y *Fusobacterium*.
- En este estudio no se realizó cromatografía para determinar los componentes, pero en un estudio realizado por **Giraldo y col**<sup>65</sup> donde realizó cromatografía en capa fina (TLC) e infrarrojo se encontró que el componente principal o



mayoritario es el rebaudiósido A, y le sigue el esteviósido; pero **kujur**,<sup>37</sup> **Duran**,<sup>44</sup> y **Soto**<sup>46</sup> afirman que el componente mayoritario es el esteviósido (5-10 % del peso de hoja), seguidamente del rebaudiósido A (2-4 %), por lo cual se podría atribuir la actividad antibacteriana al esteviósido y al rebaudiósido A, presente en la *S. rebaudiana*.

- El mecanismo de acción de la *S. rebaudiana* según **Paredes**<sup>67</sup> es gracias a su bajo potencial acidogénico, baja acumulación de placa bacteriana, disminución de la hidrofobicidad celular e inhibición de la síntesis de polisacáridos extracelulares.

## VII CONCLUSIONES

Del estudio se concluye:

- Existe poca actividad antibacteriana “*in vitro*” del extracto de *S. rebaudiana* sobre el *A. viscosus* para las concentraciones de 30 y 50 mg/ml.
- No existe actividad antibacteriana “*in vitro*” del extracto de *S. rebaudiana* sobre el *S. sanguinis*. La *S. rebaudiana* tuvo mayor halo de inhibición frente a *A. viscosus*.
- Las concentraciones estudiadas del extracto al 30, 50, 60 y 120 mg/ml no presentan efecto antibacteriano frente a *S. sanguinis*, y pero existe diferencias significativas entre los pares de 15 mg/ml vs 30 mg/ml, 15 mg/ml vs 50 mg/ml, 15 mg/ml vs 60 mg/ml, 15 mg/ml vs 120 mg/ml concentraciones del extracto ( $P < 0.05$ ).
- Las concentraciones del extracto al 60 y 120 mg/ml no presentan efecto antibacteriano pero las concentraciones al 30 y 50 mg/ml presentan poco efecto antibacteriano frente a *A. viscosus*, y existe diferencias significativas entre los pares de 15 mg/ml vs 30 mg/ml, 15 mg/ml vs 50 mg/ml, 15 mg/ml vs 120 mg/ml, concentraciones del extracto ( $P < 0.05$ )

## VIII RECOMENDACIONES

- Evaluar la actividad antifúngica y antibacteriana del extracto de *S. rebaudiana* frente a otros microorganismos de interés estomatológico.
- Ampliar estudios enfocados a la caracterización del extracto de *S. rebaudiana*, incluyendo la identificación del o los principios activos, y determinar su mecanismo de acción, así como su efecto en otros microorganismos de importancia médica.
- Realizar estudios comparativos similares utilizando el extracto de *S. rebaudiana* y el aceite de *S. rebaudiana*

## IX BIBLIOGRAFIA

1. Gonzáles A, Martínez T, Alfonzo B, Rodríguez JA, Morales A. Caries dental y factores de riesgo en adultos jóvenes: Distrito Capital, Venezuela. Rev Cubana Estomatol 2009; 46(3): 30 -37.
2. Thylstrup A, Fejerskov O. Caries. Barcelona, España: Ediciones Doyma. 1986: 59-91.
3. Campos C. Etiología de la caries, *Streptococcus mutans*, capacidad buffer salival y tipo de dieta. Revista ADM. 1985; 42: 43-50.
4. Szpunar S, Eklund SA, Burt BA. Sugar consumption and caries risk in schoolchildren with low caries experience. Community Dent Oral Epidemiol.1995; 23(3):142-146.
5. Bascones A. Tratado de odontología. Barcelona: Ediciones Avances. 2001; tomo 1: 682.
6. Escribano M, Matesanz P, Bascones A. Pasado, presente y futuro de la microbiología de la periodontitis. Av Periodoncial. 2005; 17(2):79-87.
7. Bazalar D, Choquesillo F, Milla H, Herrera O, Félix M. Acción inhibitoria de crecimiento de la asociación de los extractos acuosos de *Erythroxylum novogranatense* (morrays) Var. *Truxyllense* (rusby) y *Plantago major* (llantén) frente a bacterias y hongos. Ciencia e investigación unmsm 1998; 1(2):58-61.

8. Moromi H, Martínez E, Villavicencio J. Efecto del té verde en la formación de la placa bacteriana por *Streptococcus mutans*. Odontol. Sanmarquina.2006; 9(2):15-17.
9. EDAC [Internet].Cajamarca: EDAC;2008 [citado 3 de noviembre de 2016]. Disponible en: <http://agricultura-ecologica.servidor-alicante.com/documentos-agricultura-ecologica/Agricultura-Ecologica-Manual-tecnico-de-produccion-de-Stevia.pdf>.
10. Chica G, Ludeña R. Eficacia del Propóleo al 25 por ciento vs. la Clorhexidina al 0.12 por ciento usado conjuntamente con técnica de Bass para disminuir la placa bacteriana. [tesis].Cuenca: Universidad de Cuenca; 2005.
11. Zúñiga G, Pastén C, Araya-D, Palomino M. Evaluación de la eficacia de dos prescripciones de cepillos dentales en la remoción de placa bacteriana en pacientes ortodóncicos. Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral 2012; 5(3): 114-116.
12. Serrano-Granger J. La placa dental como biofilm. ¿Cómo eliminarla? RCOE, 2005; 10(4): 431-439.
13. Poyato F, Segura E, Ríos S, Bullón F. La placa bacteriana: Conceptos básicos para el higienista bucodental. Periodoncia 2001; 11 (2) Fasc. 5:149-164.
14. Marsh P, Martin M. Oral Microbiology. 2000 Fifth edition. Wright. England.

15. Kamma JJ, Nakou M, Manti FA. Predominant microflora of severe, moderate and minimal periodontal lesions in young adults with rapidly progressive periodontitis. *J Periodont Res*, 1995; 30: 66-72.
16. Caruajulca B. Efecto de la concentración de extracto de *Stevia (Stevia rebaudiana bertonii)* en las características fisicoquímicas y sensoriales de néctar de membrillo. [Tesis]. Trujillo: UNT; 2012.
17. Pérez Guevara SP. Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175. [tesis para optar el título de estomatología]. Trujillo: UNT; 2013.
18. Gamboa F, Chaves M y col. Antimicrobial potential of extracts from *Stevia rebaudiana* leaves against bacteria of importance in dental caries. *Acta Odontol Latinoam* 2012; 25(2):171-175.
19. Vitery S, Escribano V, Gamboa J, Chavarria B, Gómez S. Actividad inhibitoria de la *Stevia rebaudiana* sobre el *Lactobacillus acidophilus* y el *Streptococcus mutans*; *Rev Nal Odo UCC* 2010; 6(10): 57-64.
20. Gupta E, Purwar S, Sundaram S, et al. Nutritional and therapeutic values of *Stevia rebaudiana*: A Review *J Med Plants Res* 2013; 7(46):3343-53.
21. Tovar G, Cupé A. Actividad antimicrobiana de la *Stevia* en comparación con el xilitol, frente a los *Streptococcus mutans* – un estudio *in vitro*. *Rev OACTIVA UC Cuenca* 2016; 1(2):51-54.

22. López R. Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano de la *Camellia sinensis* (té verde) frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y al *Streptococcus sanguinis* (ATCC) 10556). [Tesis para optar el título de Cirujano-Dentista]. Lima, Perú: UPC; 2014.
23. Mendes de Santana G, Mua B, Fatturi P, Carlén A, Maltz M. Effects of lactose-containing stevioside sweeteners on dental biofilm acidogenicity, Braz Oral Res 2014;28(1):1-6.
24. Contreras S. Anticariogenic properties and effects on periodontal structures of *Stevia rebaudiana Bertoni*. Narrative Review. J Oral Res 2013; 2(3): 158-166.
25. Jayaraman S, Manoharan MS y Lllanchezian S. In-vitro antimicrobial and antitumor activities of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leaf extracts. Trop J Pharm Res 2008; 7 (4): 1143-1149.
26. Manish B. Tadhani, Rema S. *In vitro* antimicrobial activity of *Stevia rebaudiana bertonii* leaves. Trop J Pharm Res 2006; 5 (1): 557-560.
27. Monteiro de Melo, Vasconcelos S, Cordeiro de S, Carvalho, Pereira, Higino. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Anacardium occidentale L.* sobre espécies de *Streptococcus*. Braz J Pharmacogn 2006; 16(2): 202-205.
28. Lin LH, Lee LW, Sheu SY, Lin PY, Study on the Stevioside, Steviol, and Isosteviol 19-Alkyl Amide Dimers: Synthesis and cytotoxic and antibacterial activity. Chem Pharm Bull; 2004: 52(9): 1117-1122.

29. Martínez P., T. 2002. La Hierba Dulce. Historia, Usos y Cultivo de la *Stevia rebaudiana bertonii*. 1ª ed. Albacete.2002.
30. Tucker A y Debaggio T. The Encyclopedia of herbs. A comprehensive reference to herbs of flavor and fragrance. 2ª ed. Londres: Editorial Timber Press. 2009: 467.
31. Kujur RS, Singh V, Ram M, Yadava HN, Singh KK, Kumari S, et al. Antidiabetic activity and phytochemical screening of crude extract of *Stevia rebaudiana* in alloxan-induced diabetic rats. *Pharmacognosy Res* 2010; 2(4): 258-63.
32. Mohammadi-Sichani, Vajihah K, Fatemeh A, Mohammad R. Effect of different extracts of *Stevia rebaudiana* leaves on *Streptococcus mutans* growth. *J Med Plants Res* 2012; 6(32): 4731-4734.
33. Delgado E. Estudio de pre-factibilidad para la industrialización y comercialización de la *Stevia*. [tesis].Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 2007.
34. Carakostas MC, Curry LL, Boileau AC, Brusick DJ. Overview: the history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. *Food Chem Toxicol* 2008; 46:S1-S10.
35. Matsukudo T, Takazoe I. Sucrose substitutes and their role in caries prevention. *Int Dent J* 2006; 56 (3): 119-130.



36. Bravo A, Ale B, Rivera C, Huamán M, Delmás R, Rodríguez B, et al  
Caracterización química de la *Stevia rebaudiana*. Rev Per Quím Ing Quím  
2009; 12 (2): 5-8.
37. López T, Peña G. Plan estratégico para la creación de una empresa dedicada a  
la producción y comercialización de edulcorante a base de Stevia. [Tesis de  
grado]. Colombia: PUJ; 2004.
38. Tadesse B, Antidiabetic activity and phytochemical screening of crude extracts  
of *Stevia rebaudiana bertonii* and *Ajuga remota Benth* grown in Ethiopia on  
alloxan-induced diabetic mice. [tesis]. Etiopía: Universidad de Adís Abeba 2008.
39. Jarma O, Cardona A, Fernández H. Temperature and radiation effect on steviol  
glycosides production in *Stevia rebaudiana* in the Colombian humid Caribbean  
region. Rev UDCA Act & Div Cient 2012; 15(2): 339 – 347.
40. Uddin, MS, Chowdhury MSH, Khan MMH, Uddin MB, Ahmed R, Baten MA. *In  
vitro* propagation of *Stevia rebaudiana Bert* in Bangladesh. Afr J Biotechnol  
2006; 5(13): 1238-1240.
41. Savita S.M, K. Sheela, Sharan S, A.G. Shankar, Parama R, Srinivas S. Health  
implications of *Stevia rebaudiana*. J Hum Ecol, 2014; 15: 191-194.
42. Luke R.B, Bucci. Report on structure/function claims for Stevia [internet].  
EE.UU: FDA; 1997. [citado 5 de junio de 2015]. Disponible en:  
<http://www.fda.gov/OHRMS/dockets/DOCKETS/97s0162/let0518.pdf>

43. Freeservers [internet]. 2008 [citado 6 de junio de 2016]. Disponible en:  
<http://steviadulri.freeservers.com/page5.html>
44. Durán S, Rodríguez M, Córdón K, Record J. Estevia (*Stevia rebaudiana*), edulcorante natural y no calórico. Rev Chil Nutr 2012; 39(4):203-206.
45. Salvador R, Sotelo H, Paucar M. Estudio de la Stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*) como edulcorante natural y su uso en beneficio de la salud. Scientia Agropecuaria 2014; 5: 157 – 163.
46. Soto AE, Del Val S. Extracción de los principios edulcorantes de la *Stevia rebaudiana*. Revista de Ciencias Agrarias y Tecnología de los Alimentos. 2002; 20: 5-9.
47. Marcinek K, Krejpcio Z. Stevia rebaudiana Bertoni: health promoting properties and therapeutic applications J Verbr Lebensm (2016) 11:3–8
48. CENIC CENTER DIV. SALUD. . [internet]. 2008 [citado 5 de junio de 2015]. Disponible en: <http://cenicsalud.jimdo.com/plantas-medicinales/la-stevia/>
49. Lavini A, Riccardi M, Pulvento C, et al. Yield, Quality and Water Consumption of *Stevia rebaudiana Bertoni* Grown under Different Irrigation Regimes in Southern Italy. Ital J Agron 2008; 3(2):135-143.
50. Chan P, Tomlinson B, Chen YJ, Liu JCH, Hsieh MH, Cheng JT. A double-blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension. Br J Clin Pharmacol. 2000 ; 50(3): 215–20

51. Jiménez T, Cabrera G, Alvarez E, Gómez F. Evaluación del contenido de esteviosido y rebaudiosido A en una población de Stevia rebaudiana Bertoni (kaâ heê) cultivado comercialmente. Estudio preliminar. Men Inst Investing Cienc Salud 2010; 8(1): 47-53.
52. Ferrazano GF, Cantile T, Alcidi B, Coda M, Ingenito A, Zarrelli A, et al. Is Stevia rebaudiana Bertoni a Non Cariogenic Sweetener? A Rev Molecules. 2016; 21 (38):1-12.
53. Giraldo C, Marín L.D, Habeych D.I. Obtención de Edulcorantes de Stevia Rebaudiana Bertoni. Rev.CENIC Ciencias Biológicas.2005; 36: 1-9.
54. Rancho SM. comprehensive gras assessment of rebaudioside a (97%) [Internet]. EE.UU: FDA; 2009. [citado 5 de junio de 2015]. Food and Drug Administration. [citado 10 de junio de 2016]. Disponible en: <https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm269244.pdf>
55. US Niutang Chemical Inc. [internet].California: Niutang; 2008 [citado 5 de junio de 2016]. Disponible en: <http://www.viacheminc.com/wp-content/uploads/MSDS-Stevia-Reb-A-97.pdf>
56. JECFA. Steviol glycosides INS 960 Monographs 5. [internet].China: FAO;2008 [citado 5 de junio de 2016]. disponible en: <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/monograph5/additive-442-m5.pdf>
57. Chemicalbook [internet].China; 2016 [citado 5 de junio de 2016]. Disponible en: [http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB3736050.htm](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB3736050.htm)

58. Gil J. Long-term effects of the consumption of *Stevia rebaudiana* (Magnoliopsida, Asteraceae) on fertility mice's. Rev Peru biol 2008; 15(1): 85-90.
59. Gomez JI, Neira MS. Estudio de viabilidad comercial para la exportación de rebaudiósido A de Stevia al mercado de EE.UU, por parte de la empresa Stevia ONE PERÚ S.A.C de la región de San Martín. [tesis]. Chiclayo: Universidad Católica Santo Toribio de Mogrovejo; 2014.
60. Reyes SA. Extracción y cuantificación de compuestos activos presentes en la stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*), mediante procesos físicos. [tesis]. México. UAAAN. 2015.
61. Rodríguez  
G, Acosta DL, Hechevarria I. Rivera RM, Rodríguez CA, Sánchez E, Milanés M. Comportamiento del cultivo de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni en Cuba. Rev Cubana Plant Med 2007; 12(4):1-5.
62. González-Moralejo. Aproximación a la comprensión de un endulzante natural alternativo, la *Stevia rebaudiana Bertoni*: producción, consumo y demanda potencial. Rev agroalimentaria 2011; 17 (32):57-69.
63. Lazandázeni PA, Tigrero JO, 2009. *Stevia rebaudiana Bertoni*, una planta medicinal, Bol. Téc. Edición Especial, ESPE, Sangolquí, Ecuador.

64. Mizutani, K.; Tanaka O. Use of *Stevia rebaudiana* sweeteners in Japan. En: Kinghorn AD. (Ed.), *Stevia, the Genus Stevia. Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles* 2002; 19: 178-195.
65. Giraldo C, Marín L.D, Habeych D.I. Obtención de Edulcorantes de *Stevia Rebaudiana* Bertoni. *Rev CENIC Ciencias Biológicas* 2005; 36: 1-9.
66. Baker M. Developing a sustainable supply. Sweeteners and the wellness debate. [Internet]. Londres: truvia; 2010. [Citado 5 de junio de 2016]. Disponible en: [https://truvia.com/pdf/ECM\\_Truvia.pdf](https://truvia.com/pdf/ECM_Truvia.pdf).
67. Paredes AE, Naranjo MC. La *Stevia rebaudiana* como coadyuvante en la prevención y el control de la caries dental: una revisión de la literatura. *Acta Odontol Col* 2016; 6(2):45-60.
68. Enrile de Rojas, Santos A. Colutorios para el control de placa y gingivitis basados en la evidencia científica. *RCOE* 2005; 10(4):445-452.
69. Ramona R, Gilad B, Moshe B, Itzhak G, Doron S. The role of fructans on dental biofilm formation by *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii* and *Actinomyces viscosus*. *FEMS Microbiol Lett* 195 .2001; 205-210.
70. Koo H, Falsetta ML, Klein MI. The Exopolysaccharide Matrix: A Virulence Determinant of Cariogenic Biofilm, *J Dent Res* 2013; 92(12):1065-1073.
71. Caridad C. El pH, Flujo Salival y Capacidad Buffer en Relación a la Formación de la Placa Dental. *ODOUS Científica* 2008; 9(1): 25-32.

72. Marsh PD. Are dental disease examples of ecological catastrophes? *Microbiol* 2003; 149(2):279-94.
73. Thuy Do, Oral biofilms: molecular analysis, challenges, and future prospects in dental diagnostics. *Clinical, Clin Cosmet Investig Dent* 2013; (5):11-19.
74. Sirvent E, García B. Biofilm. Un nuevo concepto de infección en Endodoncia. *Endodoncia* 2010; 28 (4):241-256.
75. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev.* 1980; 44(2):331.
76. Schmidt, Bux M, Filipuzzi-Jenny, Kulik E, Waltimo T, Weiger R, Walter C. Influence of time, toothpaste and saliva in the retention of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* on different toothbrushes. *J Appl Oral Sci* 2014; 22(3): 152-8.
77. Chow AW. Infections of the oral cavity, neck, and head. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Principles and Practice of infectious diseases*. 5th edition. Churchill Livingstone. Philadelphia 2000; 689-701.
78. Ccahuana R. S. mutans biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. *Braz oral res* 2010; 24(2).
79. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in a human dental decay. *Microbiol Rev* 1986; 50(4):353-80.

80. Marsh PD. Dental plaque biofilm and a microbial community: implications for health and disease. *BMC Oral Health* 2006; 6 (1):S1-S14.
81. Liebana J. 2002: *Microbiología Oral*. 2da. Edición. Mc Graw-Hill. Interamericana. 30 España.
82. Guilarte C, Perrone M. Microorganismos de la placa dental relacionados con la etiología de la periodontitis. *Acta Odontol Venez* 2004; 42(3): 213-217.
83. Kolenbrander, P.; Phucas, C. Effect of saliva on coaggregation of *Actynomices* and *Streptococcus* species. *Infect Immun* 1984; 44: 228 - 233.
84. Marsh PD, Motter A. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontol* 2000, 2011; 55: 16–35.
85. Palmier T, Fonseca T. Antimicrobial agents used in the control of periodontal biofilms: effective adjuncts to mechanical plaque control? *Braz oral res* 2009; 23 (1):39-48.
86. *Streptococcus sanguinis*- Microbewiki [internet]. [Microbewiki.kenyon.edu](http://Microbewiki.kenyon.edu).2016 [citado 11 agosto 2016].disponible desde: <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Streptococcus> .
87. Koneman et al. 2006, *Koneman diagnóstico microbiológico*, 6ta ed. Ed. medica panamericana. España.

88. White JC, Niven CF, Jr. 1946. *Streptococcus* S.B.E.: a *Streptococcus* associated with subacute bacterial endocarditis. *J Bacteriol* 1946;51(6): 717-722.
89. Romero C. Microbiología y parasitología humana 3ª Ed. [internet]. México: Médica Panamericana; 2007 [citado 5 de junio de 2016].706p en:  
[https://books.google.com.pe/books?id=Wv026CUhR6YC&pg=PA706&dq=streptococcus+sanguis&hl=es&sa=X&ei=0LyKVfKgCluZNqP\\_g\\_AB&ved=0CE8Q6AEwCA#v=onepage&q=streptococcus%20sanguis&f=false](https://books.google.com.pe/books?id=Wv026CUhR6YC&pg=PA706&dq=streptococcus+sanguis&hl=es&sa=X&ei=0LyKVfKgCluZNqP_g_AB&ved=0CE8Q6AEwCA#v=onepage&q=streptococcus%20sanguis&f=false)
90. Negróni M. Microbiología Estomatológica. Fundamentos y guía práctica. 2da Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. 2009
91. John L. Bruschi. Infective Endocarditis: Management in the Era of Intravascular Devices. [internet]. EE.UU: CRC Press; 2007. [Citado 5 de junio de 2016]. Disponible en:  
[https://books.google.com.pe/books?id=qkxb4CWTYAC&dq=streptococcus+sanguis+INFECTIVE+ENDOCARDITIS&hl=es&source=gbs\\_navlinks\\_s](https://books.google.com.pe/books?id=qkxb4CWTYAC&dq=streptococcus+sanguis+INFECTIVE+ENDOCARDITIS&hl=es&source=gbs_navlinks_s)
92. Giacaman RA, Muñoz SC, Bravo G.E, Farfán-Cerda. Cuantificación de bacterias relacionadas con la caries dental en saliva de adultos y adultos mayores. Santiago. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral* 2013; 6(2): 71-74.



93. Nanna S. Oral Actinomyces Species in Health and Disease: Identification, Occurrence and Importance of Early Colonization. Publications of the National Public Health Institute. 2007
94. Eija K, William W. Actinomyces and Related Organisms in Human Infections. CMR 2015; 28 (2):419-442.
95. Xuedong Z. Atlas of oral microbiology: From Healthy Microflora to Disease. China: Academic Press; 2015. [citado 5 de junio de 2016]. 44p. Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=OAe5BAAAQBAJ&pg=PA41&dq=actinomyces+viscosus+oral&hl=es&sa=X&ei=w6qKVc3yE4uaNsKdgeAB&ved=0CBsQ6AEwAA#v=onepage&q=actinomyces%20viscosus%20oral&f=false>.
96. Figueroa M, Alonso G, Acevedo AM. Microorganismos presentes en las diferentes etapas de la progresión de la lesión de caries dental. Acta Odontol Venez 2009; 47(1):1-13.
97. Delisle AL, Nauman RK, Minah GE. Isolation of a Bacteriophage for *Actinomyces viscosus*. 1978; 20(1):303- 306
98. Gibbons RJ, Hay DI. Adsorbed salivary proline-rich proteins as bacterial receptors on apatitic surfaces. New York, Molecular Mechanisms of Microbial Adhesion. 1988; 143-163.
99. Peña S, Calzado da Silva, González P, Cordero G y Azahares A. Patógenos periodontales y sus relaciones con enfermedades sistémicas. Cuba. MEDISAN 2012; 16(7).

100. Flores J. Determinación de la actividad antibacteriana “in vitro” del aceite esencial de Luma chequen (Molina) A. Gray “arrayán” frente a Streptococcus mutans. [tesis].Perú.UNMSM.2014.
101. Antonio Serrano J, Sandoval y Trujillo AH. Identificación y diagnóstico de Actinomicetales patógenos. 1ª ed. Mérida: Editorial Venezolana CA; 2005.
102. Wikilengua del español. Terminesp: actividad antibacteriana. [citado 5 de junio de 2016]. Disponible en: [http://www.wikilengua.org/index.php/Terminesp:actividad\\_antimicrobiana](http://www.wikilengua.org/index.php/Terminesp:actividad_antimicrobiana).
103. Infomed. Glosario de términos farmacológicos. Formulario Nacional de Medicamentos. [citado 5 de junio de 2016]. Disponible en: <http://glosario.sld.cu/terminosfarmacologicos/2011/04/29/concentración-inhibitoria-minima-cim/>
104. Infomed. Glosario de términos farmacológicos. Formulario Nacional de Medicamentos. [citado 8 de junio de 2016]. Disponible en: <http://glosario.sld.cu/terminosfarmacologicos/2011/04/29/concentración-mínima-bactericida-cmb/>.

## X ANEXOS

### 9.1 CUADROS DE CONSISTENCIA



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
**MUSEO DE HISTORIA NATURAL**



"Año de la Diversificación Productiva y del Fortalecimiento de la Educación"

### CONSTANCIA N° 195-USM-2015

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (hojas) recibida de **Katherine BRAÑEZ REYES**, alumna de la UNMSM de la Fac. de Odontología, ha sido estudiada y clasificada como: ***Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

**DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**

**CLASE: MAGNOLIOPSIDA**

**SUBCLASE: ASTERIDAE**

**ORDEN: ASTERALES**

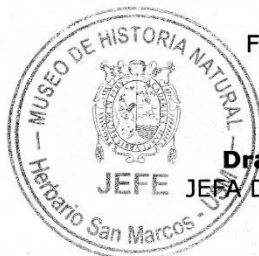
**FAMILIA: ASTERACEAE**

**GENERO: *Stevia***

**ESPECIE: *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni**

Nombre vulgar: "stevia"  
Determinado por Blgo. Mario Benavente Palacios.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.



Fecha, 12 de octubre de 2015

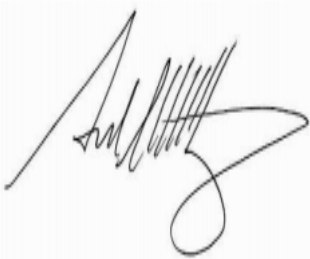
*Haydee Montoya Terreros*  
**Dra. Haydee Montoya Terreros**  
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

## 9.2 CUADROS DE CONSISTENCIA



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release


<p><b>Specifications</b></p> <p><b>Microorganism Name:</b> Streptococcus sanguinis</p> <p><b>Catalog Number:</b> 0858</p> <p><b>Lot Number:</b> 858-41</p> <p><b>Reference Number:</b> ATCC® 10556™*</p> <p><b>Purity:</b> &lt; 0.1% Total Pellet CFU</p> <p><b>Recovery:</b> &gt; 1000 CFUs per Pellet</p> <p><b>Passage from Reference:</b> 2</p>	<p><b>Expiration Date:</b> 2017/5/31</p> <p><b>Release Information:</b></p> <p><b>Quality Control Technologist:</b> Christine Condon</p> <p><b>Release Date:</b> 2015/7/10</p>
---	--

Performance	
<p><b>Macroscopic Features:</b> Small, gray/green, translucent, alpha hemolytic colonies.</p> <p><b>Microscopic Features:</b> Gram positive cocci in medium or long chains.</p>	<p><b>Medium:</b> SBAP</p> <p><b>Method:</b> Gram Stain (1)</p>
<p><b>ID System:</b> Vitek GP (1)</p> <p>See attached ID System results document.</p>	<p><b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): negative</p> <div style="text-align: center;">  <p>Brad Goskowicz, President AUTHORIZED SIGNATURE</p> </div>
<p><small>Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</small></p> <p><small>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</small></p>	

### 9.3 CUADRO DE CONSISTECIA



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<b>Specifications</b> Microorganism Name: Actinomyces viscosus Catalog Number: 0750 Lot Number: 750-27 Reference Number: ATCC® 15987™* Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4		<b>Expiration Date:</b> 2016/9/30 <b>Release Information:</b> Quality Control Technologist: Tracy A Blenker Release Date: 2014/12/19	
<b>Performance</b>			
<b>Macroscopic Features:</b> Two colony types: small, circular, convex, entire edge, pale white, shiny, translucent; and small to large, circular, dome, entire, white, dull, opaque.		<b>Medium:</b> A/R SBAP	
<b>Microscopic Features:</b> Straight to slightly curved gram positive rods and slender filaments, also some short rods; branching may be observed.		<b>Method:</b> Gram Stain (1)	
<b>ID System:</b> Vitek ANC (1)		<b>Other Features / Challenges: Results</b> (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive	
<b>Phenotypic Features</b> D-GALACTOSE Leucine ARYLAMIDASE ELLMAN Phenylalanine ARYLAMIDASE L-Proline ARYLAMIDASE L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE D-CELLOBIOSE Tyrosine ARYLAMIDASE Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE D-GLUCOSE D-MANNOSE D-MALTOSE SACCHAROSE/SUCROSE ARBUTIN N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-glucoside UREASE 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-glucuronide BETA-GALACTOPYRANOSIDASE Indoxyl ALPHA-ARABINOSIDASE 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-alpha-galactoside BETA-MANNOSIDASE ARGININE GP PYRUVATE MALTOTRIOSE ESCULIN hydrolyse BETA-D-FUCOSIDASE 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-N-acetyl-glucosamide 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-alpha-mannoside ALPHA-L-FUCOSIDASE PHOSPHATASE L-ARABINOSE D-Ribose 2 Phenylphosphonate ALPHA-L-ARABINOFURANOSIDE D-XYLOSE GRAM STAIN MORPHOLOGY AEROTOLERANCE	<b>Results</b> + + + + + - - + + + + + + + + - - - - - + - - - - - - - - - - - + - -	  Brad Goskovicz, President AUTHORIZED SIGNATURE	

#### 9.4 INSTRUMENTO DE RECOLECCION DE DATOS

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA EL TEST DE DIFUSIÓN EN AGAR CON DISCOS

CRECIMIENTO DE *S. sanguinis* SEGÚN LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL

EXTRACTO DE *S. rebaudiana*

		concentración del extracto de <i>S. rebaudiana</i>					Clorhexidina 0,12 %	Alcohol 96°
		15 mg/ml	30 mg/ml	50 mg/ml	60 mg/ml	120 mg/ml	C(+)	C(-)
HALO DE INHIBICION EN (mm) <i>S. sanguinis</i>	Placa N° 1							
	Placa N° 2							
	Placa N° 3							
	Placa N° 4							
	Placa N° 5							
	Placa N° 6							
	Placa N° 7							
	Placa N° 8							
	Placa N° 9							
	Placa N° 10							

		concentración del extracto de <i>S. rebaudiana</i>					Clorhexidina 0,12 %	Alcohol 96°
		15 mg/ml	30 mg/ml	50 mg/ml	60 mg/ml	120 mg/ml	C(+)	C(-)
HALO DE INHIBICION EN (mm) <i>A. viscosus</i>	Placa N° 1							
	Placa N° 2							
	Placa N° 3							
	Placa N° 4							
	Placa N° 5							
	Placa N° 6							
	Placa N° 7							
	Placa N° 8							
	Placa N° 9							
	Placa N° 10							

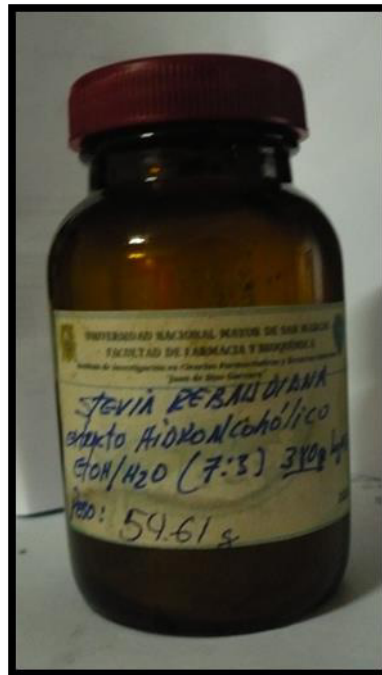
## 9.5 CUADROS Y GRÁFICOS

Tabla 13. Actividad antibacteriana de las diferentes concentraciones del extracto de *S. rebaudiana*

Concentración del extracto	Sin efecto		Con efecto		Total
	Nº	%	Nº	%	
15 mg/ml					
30 mg/ml					
50 mg/ml					
60 mg/ml					
120 mg/ml					

## 9.6 FIGURAS

Figura 12: Extracto de *S. rebaudiana*





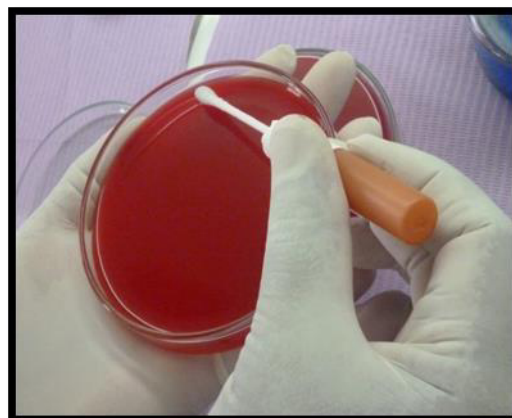
**Figura 13: cepas**



**Figura 14: Activación de la cepa de *S. sanguinis***



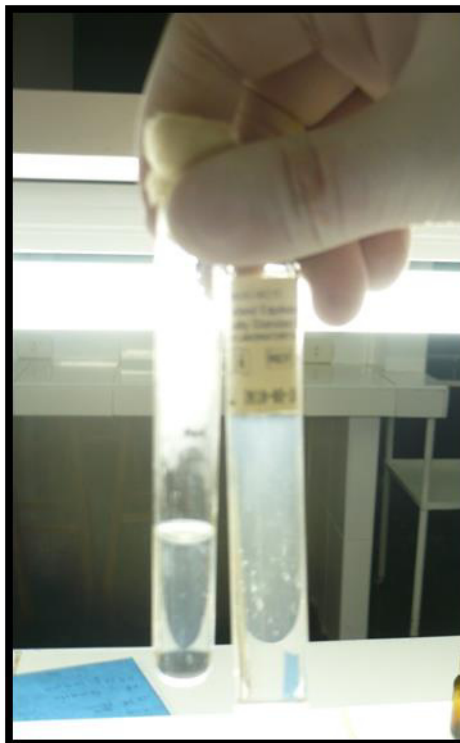
**Figura 15: Activación de la cepa de *A. viscosus***



**Figura 16: Incubación de la muestras.**



**Figura 17: Luego de activado la cepa, medimos el nivel de turbidez final equivalente al 0,5 de la escala de Mc Farland, que corresponde a 108 UFC/m**



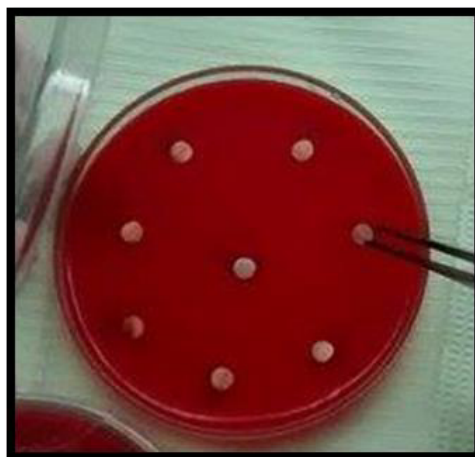
**Figura 18:** Sembrado de la cepa de *A. viscosus* en agar sangre.



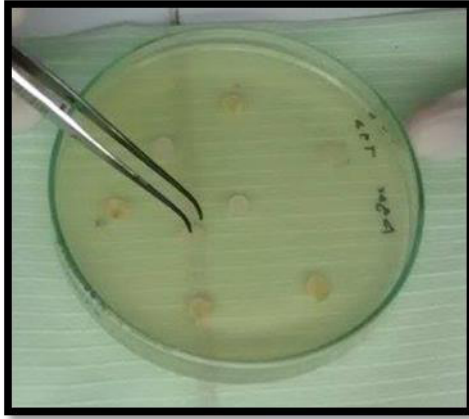
**Figura 19:** Sembrado de la cepa de *S. sanguinis* en TSA.



**Figura 20:** Colocación de los discos cargados con 10  $\mu$ L de las diferentes concentraciones del extracto de *S. rebaudiana* sobre el *A. viscosus*.



**Figura 21: Colocación de los discos cargados con 10  $\mu$ L de las diferentes concentraciones del extracto de *S. rebaudiana* sobre el *S. sanguinis*.**



**Figura 22: Incubación**



Figura 23: halos de inhibición del crecimiento bacteriano de *S. sanguinis*

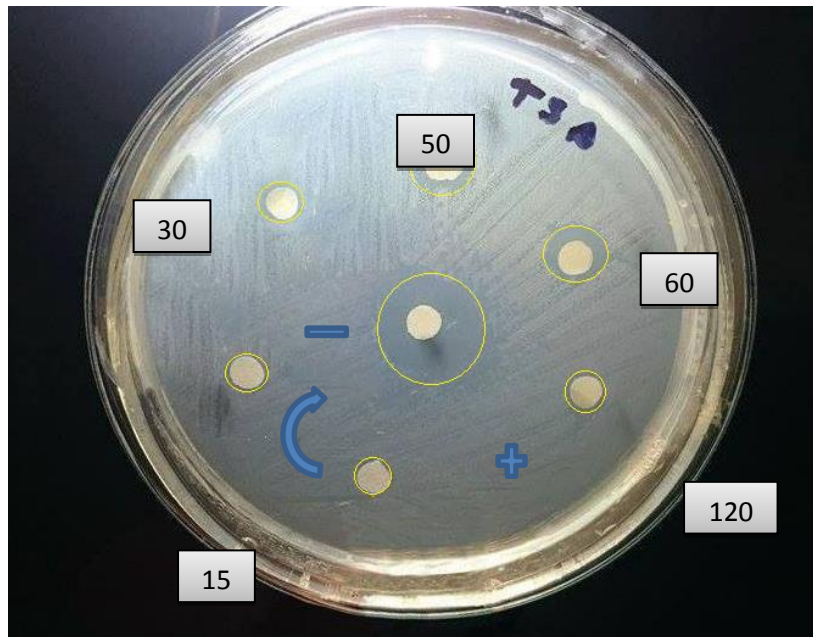
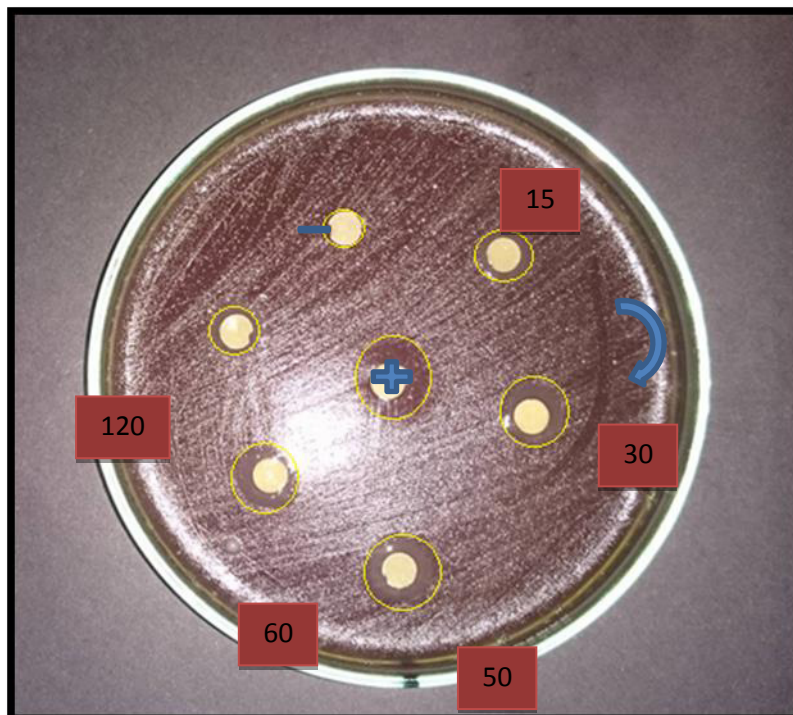
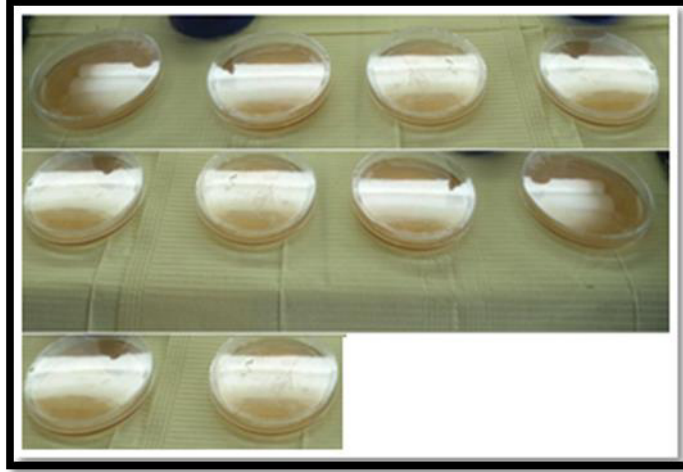


Figura 24: halos de inhibición del crecimiento bacteriano de *A. viscosus*. Lectura de la prueba



**Figura 25: total de placas para *S. sanguinis***



**Figura 26: total de placas para *A. viscosus***

