

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA



**EFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DEL
EXTRACTO DE *Stevia rebaudiana* SOBRE EL
Streptococcus mutans, PUNO-2017**

TESIS

PRESENTADA POR:

NATTY JANINA CACERES LUPACA

PARA OPTAR TITULO PROFESIONAL DE:

CIRUJANO DENTISTA

PUNO – PERU

2017



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA

EFFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DEL EXTRACTO DE *Stevia rebaudiana* SOBRE EL *Streptococcus mutans*, PUNO-2017

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. NATTY JANINA CACERES LUPACA

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE:

CIRUJANO DENTISTA

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 26-05-2017

APROBADO POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:

PRESIDENTE :
CD. CESAR A. MOLINA DELGADO

PRIMER MIEMBRO :
M.Sc. VILMA MAMANI CORI

SEGUNDO MIEMBRO :
C.D. MILAGROS MOLINA CHICATA

DIRECTOR DE TESIS :
Dr. JORGE L. MERCADO PORTAL

ÁREA: Medicina y Patología Estomatológica

TEMA: Fitoterapia y Productos Naturales de uso en Odontología

DEDICATORIA

A Dios por darme la fortaleza para superar las adversidades, por su infinito amor, por brindarme la oportunidad de vivir y aprender cada día un poco más.

A mis padres Néstor y Natty, quienes con su constante cariño, apoyo y sacrificio, muy en especial durante los años de formación en mi carrera profesional, están conmigo para lograr mis anhelos y seguir adelante con mis estudios.

A mi hermana Katerin, por sus consejos, su constante estímulo y apoyo moral, cuando más lo necesité.

Natty Janina

AGRADECIMIENTO

A nuestra alma mater, la Universidad Nacional del Altiplano – Puno por darme la oportunidad de realizarme profesionalmente.

A la escuela profesional de odontología, con su staff de docentes, por haberme brindado los conocimientos teórico-práctico para realizarme profesionalmente.

A los miembros del jurado calificador, CD. Cesar A. Molina Delgado, M. Sc. Vilma Mamani Cori, CD. Milagros Molina Chicata, por su tiempo, sus sugerencias y aportes que me brindaron para la culminación de la presente investigación.

A mi director de Tesis Dr. Jorge Luis Mercado Portal, por sus constantes orientaciones, apoyo moral y culminación de la presente investigación.

Al Lic. Lorgio Palacios trabajador del Laboratorio de la Facultad de Ciencias Biológicas, por el apoyo brindado, entusiasmo y paciencia en la realización de esta investigación.

Y muy especialmente a mi familia, a mi padre, madre, hermana por su aliento y motivación en la ejecución y culminación de la presente investigación.

Natty Janina

INDICE GENERAL

RESUMEN	8
ABSTRACT	9
I. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1. EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN	10
1.2. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	11
1.3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	12
1.4. IMPORTANCIA Y UTILIDAD DEL ESTUDIO.....	13
1.5. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	13
1.6. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE INVESTIGACIÓN	13
II. REVISIÓN DE LITERATURA	15
2.1. MARCO TEORICO	15
2.2. HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1. TIPO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	21
3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA DE INVESTIGACIÓN.....	21
3.3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	22
3.4. TECNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	23
3.5. PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	25
3.6. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	29
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
4.1. RESULTADOS.....	30
4.2. DISCUSIÓN.....	34
V. CONCLUSIONES.....	36
VI. RECOMENDACIONES	37
VII.REFERENCIAS.....	38
ANEXOS	41

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N° 1: EFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DEL EXTRACTO DE <i>Stevia rebaudiana</i> AL 25% SOBRE <i>Streptococcus mutans</i> , PUNO- 2017.....	30
TABLA N° 2: EFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DEL EXTRACTO DE <i>Stevia rebaudiana</i> AL 50% SOBRE <i>Streptococcus mutans</i> , PUNO-2017.	31
TABLA N° 3: EFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DEL EXTRACTO DE <i>Stevia rebaudiana</i> AL 100% SOBRE <i>Streptococcus mutans</i> . PUNO- 2017.....	32
TABLA N° 4: COMPARACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DEL EXTRACTO DE <i>Stevia rebaudiana</i> A DIFERENTES CONCENTRACIONES AL 25, 50 Y 100% SOBRE EL <i>Streptococcus mutans</i> PUNO-2017.	33

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

DE: Desviación estándar

DMS: Diferencia mínima significativa

FTF: Fructosiltransferasa

GE: Grupo experimental

GTF: Glucosiltransferasa

LI: Límite inferior

LS: Límite superior

MIC: Concentración mínima inhibitoria

OMS: Organización mundial de la salud

T: Prueba de T

RESUMEN

OBJETIVO: Fue determinar el efecto antimicrobiano in vitro del extracto de *Stevia rebaudiana* sobre el *Streptococcus mutans*, Puno-2017.

MATERIALES Y MÉTODOS: La muestra fue realizada por 36 placas Petri con sembrado de *Streptococcus mutans*. El grupo experimental estuvo conformada por concentraciones al 25%, 50% y 100% del extracto de *Stevia rebaudiana*. Se evaluó el efecto antimicrobiano por el método propuesto por INS de Kyrby – Bauer para determinar la concentración mínima inhibitoria del extracto de *Stevia rebaudiana*; para el análisis de datos se utilizó pruebas estadísticas la prueba de t y la prueba de significancia de Tukey.

RESULTADOS El extracto de *Stevia rebaudiana* tiene efecto antimicrobiano sobre el *Streptococcus mutans* en la concentración al 25% con un promedio del halo de inhibición de 10.47 mm, en la concentración de 50% de 12.46 mm y en la concentración al 100% de 13.49 mm de mejor efecto antimicrobiano.

CONCLUSIÓN: Se concluye que el extracto de las hojas secas de *Stevia rebaudiana* obtenido por el método de destilación agua-vapor tiene efecto antimicrobiano in vitro sobre los cultivos de la bacteria *Streptococcus mutans*.

Palabras claves: *Stevia rebaudiana*, *Streptococcus mutans*, efecto antimicrobiano y halo de inhibición

ABSTRACT

OBJECTIVE: To determine the in vitro antimicrobial effect of the extract of *Stevia rebaudiana* on the *Streptococcus mutans*, Puno-2017

MATERIALS AND METHODS: The sample was made by 36 Petri plates with *Streptococcus mutans*. The experimental group consisted of concentrations of 25%, 50% and 100% of *Stevia rebaudiana* extract. The antimicrobial effect was evaluated by the method proposed by Kyrby - Bauer INS to determine the minimum inhibitory concentration of *Stevia rebaudiana* extract; for the data analysis we used statistical tests the t test and the Tukey significance test.

RESULTS: *Stevia rebaudiana* extract has an antimicrobial effect on *Streptococcus mutans* in the 25% concentration with a mean inhibition halo of 10.47 mm, in the concentration of 50% of 12.46 mm and in the concentration of 100% of 13.49 mm of Better antimicrobial effect.

IN CONCLUSION: The extract of the dried leaves of *Stevia rebaudiana* obtained by the method of water-steam distillation in vitro antimicrobial effect on crops from the bacterium *Streptococcus mutans*.

Key words: *Stevia rebaudiana*, *Streptococcus mutans*. Antimicrobial effect and inhibition halo

I. INTRODUCCIÓN

1.1. EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

La caries dental es una enfermedad de naturaleza irreversible, cuyo proceso es dinámico crónico, infeccioso post-eruptivo, transmisible y multifactorial que se caracteriza por una disolución gradual y la destrucción de los tejidos mineralizados de los dientes.^{1, 2} De mayor prevalencia en el ser humano y uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial.³

Según la OMS la caries dental afecta entre el 60 % y 90 % de la población escolar.⁴ El Perú es uno de los países de Latinoamérica más afectados por las enfermedades bucales, como se demuestra al precisar que entre el 90% y el 95% de la población peruana equivalente a 30 millones de habitantes según proyección 2013, sufre de caries dental, además de tener uno de los índices más altos de caries en niños menores de 12 años, según OMS.⁵

El *Streptococcus mutans* es considerado el principal agente etiológico de la caries dental en humanos y animales de experimentación.⁶ La habilidad de este microorganismo en cuanto a su participación en la formación de placa bacteriana, está relacionada con la producción de las glucosiltransferasas, enzimas que tienen un rol principal en las interacciones adhesivas y expresión de virulencia de estos microorganismos debido a que catalizan la síntesis de polisacáridos extracelulares.⁷

En la actualidad ha surgido un interés en el desarrollo de las plantas medicinales, descubriendo cada día nuevas propiedades y sus principios activos. Uno de ellos es la *Stevia rebaudiana* que es un edulcorante natural, que contiene varios componentes que le brindan propiedades antibacterianas, hipoglucemiantes, antioxidantes, bactericidas, acción antihipertensiva, cicatrizante.^{8,9} La importancia de esta investigación radica en el uso de la *Stevia rebaudiana* aplicada en la higiene oral y de servicio en beneficio de la población.

El propósito de esta investigación fue Determinar el efecto antimicrobiano in vitro del extracto de *Stevia rebaudiana* sobre el *Streptococcus mutans*.

1.2. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

A NIVEL INTERNACIONAL

Gamboa y col (2012) Bogotá - Colombia. En su estudio potencial antimicrobiano de extractos obtenidos de hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni sobre bacterias de importancia en caries dental. Materiales y métodos: a partir de hojas secas de *Stevia rebaudiana* Bertoni convertidas en polvillo se obtuvieron los extractos en solventes de hexano, metanol, etanol, acetato de etilo y cloroformo. La evaluación de la actividad antimicrobiana de los 5 extractos sobre las 16 cepas bacterianas de los géneros *Streptococcus* (n=12) y *Lactobacillus* (n=4) se realizó por el método de difusión en pozo. Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los extractos 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. Resultados: Las zonas de inhibición de la CMI para los 5 extractos de las cepas bacterianas fueron variables, que van desde 9 mm a 17,3 mm. El extracto de hexano, que tenía la CMI más bajo, sin embargo es menor. Las zonas de inhibición de los 5 extractos es ligeramente mayor para las 4 cepas de *Lactobacillus* que para las 12 cepas de *Streptococcus*, como el valor más bajo para la zona de inhibición era 12,3 mm y el más alto fue 17,3 mm. Concluye que los extractos de hojas de *Stevia rebaudiana* posee actividad antimicrobiana frente a los microorganismos cariogénicos siendo ligeramente superior para *Lactobacillus* que para el *Streptococcus Mutans*.¹⁰

Mohammadi y col (2012) Esfahan- Irán. En su estudio efecto de diferentes extractos de hojas de *Stevia rebaudiana* sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans*. Se utilizó el Método de difusión en agar para determinar la actividad antibacteriana de los extractos de metanol etanol y acetona. Resultados: el extracto de acetona probado tenía mayor potencial antibacteriano seguido de extracto de etanol y luego el extracto de metanol. La inhibición máxima del crecimiento contra *S. mutans* se demostró por el extracto de acetona (28,7 mm) a 100 mg / ml que fue seguido por el extracto de etanol (27,0 mm). En conclusión extractos de acetona y etanol de hojas de *Stevia rebaudiana* mostraron la mayor actividad frente a *S. mutans*. Extracto acuoso de esta planta no fue efectivo en *S. mutans*.¹¹

A NIVEL NACIONAL

Pérez S (2013) Trujillo – Perú. En el estudio efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Método: Este estudio fue de tipo experimental in vitro. La CMI se obtuvo por el método de dilución en caldo. Resultados: la acción inhibitoria del extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* sobre *Streptococcus mutans* se presentó a partir de la concentración de 1,07mg/ml en el extracto en etanol de 70° y a partir de la concentración de 4,28mg/ml en el extracto de etanol de 30°. La acción bactericida de extracto etanolico de *S. Rebaudiana* sobre *Streptococcus mutans* se presentó a partir de 10mg/ml en extracto de etanol de 70° y a partir de concentración de 42.8mg/ml en extracto de etanol de 30° Conclusión: El extracto etanólico de la *Stevia Rebaudiana* posee efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans*.¹²

Becerra L (2016) Trujillo - Perú. En su estudio efecto antibacteriano in vitro de un enjuague bucal a diferentes concentraciones a base de *extracto etanólico* de *Stevia rebaudiana* sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Materiales y métodos, los extractos se obtuvieron a partir de hojas frescas de *Stevia Rebaudiana*, para luego ser agregado con solventes en la elaboración de un enjuague bucal a 6 concentraciones en etanol de 70° y 6 concentraciones en etanol de 30°. La concentración inhibitoria mínima se obtuvo por el método de dilución en caldo. Los Resultados que obtuvieron permitió seleccionar a la CMI en 1.07mg/ml en el enjuague a base de extracto de *Stevia rebaudiana* en etanol de 70° y la concentración de 2.14mg/ml, en etanol de 30° ($p>0.05$). Mientras la CMB en 75mg/ml en el enjuague bucal trabajado en etanol de 70° y siendo estadísticamente nulo en etanol de 30° ($p<0.01$). En conclusión el enjuague bucal a base de extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* posee efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans*.¹³

1.3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cuál es el efecto antimicrobiano in vitro del extracto de *Stevia rebaudiana* sobre el *Streptococcus mutans*, Puno - 2017?

1.4. IMPORTANCIA Y UTILIDAD DEL ESTUDIO

Siendo éste un estudio de tipo experimental, brindará una contribución científica y una aplicación práctica, en el sentido de mejorar la salud bucal de la población.

En tal sentido el aporte del presente estudio servirá como base para futuras investigaciones y conocer el efecto de la *Stevia rebaudiana*.

1.5. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo general

Determinar el efecto antimicrobiano in vitro del extracto de *Stevia rebaudiana* sobre el *Streptococcus mutans*, Puno-2017

Objetivos específicos

Determinar el efecto antimicrobiano in vitro del extracto de *Stevia rebaudiana* al 25% sobre el *Streptococcus mutans*.

Determinar el efecto antimicrobiano in vitro del extracto de *Stevia rebaudiana* al 50% sobre el *Streptococcus mutans*.

Determinar el efecto antimicrobiano in vitro del extracto de *Stevia rebaudiana* al 100% sobre el *Streptococcus mutans*.

Comparar el efecto antimicrobiano in vitro del extracto de *Stevia rebaudiana* a diferentes concentraciones al 25, 50 y 100% sobre el *Streptococcus mutans*.

1.6. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE INVESTIGACIÓN

La presente investigación se realizó en el Distrito de Puno, Provincia de Puno, Departamento de Puno.

La región Puno está localizado en la parte suroriental de Perú. Estratégicamente sus límites son: por el norte con los departamentos de Cusco y Madre de Dios; por el sur con los departamentos de Moquegua y Tacna; por el oeste con los departamentos de Cusco y Arequipa y por el este con la República de Bolivia. Su ancestral cultura, la presencia de culturas Pre - Incas, Incas y vestigios del Virreinato; aunado a innumerables atractivos de

carácter natural (lago Titicaca, lagunas, ríos, ceja de selva, flora, fauna, etc.), ruinas arqueológicas, templos coloniales y su rico y variado folclore.

Esta investigación se realizó en los laboratorios de la ciudad universitaria de la Universidad Nacional del Altiplano. Ubicado en la Av. Sesquicentenario N° 1150:

- Laboratorio de la Facultad de Ciencias Agrarias donde se hizo el extracto de *Stevia rebaudiana*.
- Laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, donde se realizó el procedimiento, análisis y lectura de resultados.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. MARCO TEORICO

2.1.1. STEVIA REBAUDIANA

La *Stevia* (*Stevia rebaudiana*) es una planta herbácea perenne que pertenece a la familia Asteraceae. Crece como arbusto salvaje en el suroeste de Brasil y Paraguay, donde es conocida con el nombre de ka'a he'ê (en guaraní, hierba dulce).¹² La *Stevia rebaudiana* también crece en ceja de selva del Perú, así como en las regiones de Cajamarca, Junín y Arequipa.¹⁴

Es valorada en estos países y el mundo, debido a su composición rica en un glucósido bajo en calorías llamado Esteviósido cuyo poder edulcorante en estado puro y cristalino es 300 veces mayor que el azúcar de caña.¹⁵

2.1.1.1. Descripción.

Fue descrita botánicamente en 1905, por el naturalista Moisés Santiago Bertoni, como una planta herbácea de 40 a 80 cm de altura.¹⁶

La raíz es fibrosa, filiforme y perenne, formando abundante cepa que apenas ramifica y no profundiza, distribuyéndose cerca de la superficie; es el único órgano de la planta que no contiene el esteviósido. En plantas que se propagan asexualmente por pedazos de tallos en arena gruesa, se ha observado abundante ramificación del sistema radicular.

El tallo es anual, subleñoso, más o menos pubescente, con tendencia a inclinarse, es más o menos ramificado. Durante su desarrollo inicial no posee ramificaciones, tornándose multicaule después del primer ciclo vegetativo llegando a producir hasta 20 tallos en 3 a 4 años. En condiciones óptimas, el tallo puede llegar hasta un metro y medio de altura.

Las hojas son elípticas oval o lanceoladas, pequeñas, simples; borde o margen dentado; a veces en verticilos; algo velludas. La hoja es el órgano con mayor contenido del edulcorante.

Una planta tarda más de un mes en producir todas sus flores. En Paraguay florece en octubre, diciembre y marzo pero se clasifica como una planta de día corto, situando el fotoperíodo crítico en 12 - 13 horas según el ecotipo. La flor es hermafrodita pequeña y blanquecina, en capítulos pequeños terminales o axilares, agrupados en panículas corimbosas.

La polinización es entomófila; se dice que la planta es autoincompatible de tipo esporofítico y clasificada como apomíctica obligatoria.

El fruto es un aquenio que es diseminado por el viento. Se clasifica en: claro estéril, oscuro fértil y oscuro estéril.

Se la puede cultivar en suelos muy variados. En su estado natural, la planta crece en suelos tanto de baja fertilidad, ácidos, de tipo arenoso como hasta orgánicos y con alta humedad.

2.1.1.2. Componentes

Los compuestos responsables del dulzor de la *Stevia rebaudiana* son los glucósidos de esteviol aislados e identificados como esteviósido, esteviolbiósido, rebaudiósido A, B, C, D, E y F y dulcósido.¹⁵ Éstos se encuentran en las hojas de la planta en porcentajes variables: 0,3% Dulcósido, 0,6% Rebaudiósido C, 3,8% Rebaudiósido A y el 9,1% de Esteviósido.¹⁷

2.1.1.3. Propiedades

La *Stevia rebaudiana bertonii* es un edulcorante natural no calórico, con mayor dulzor que la sacarosa, sin efectos adversos, que ha demostrado tener múltiples beneficios para la salud sistémica y recientemente para la salud oral. La *Stevia rebaudiana* es antihipertensivo, antioxidante, antiinflamatorio, antibacteriano, bactericida, cicatrizante, antiviral, disminuye el nivel de glucosa.^{8,9}

2.1.1.4. Efecto antibacteriano

El efecto antimicrobiano de *Stevia rebaudiana* se ha atribuido a la presencia de esteviósido,¹⁸ tiene efecto sobre las enzimas que son responsables de la descomposición de azúcares.⁸

2.1.2. STREPTOCOCCUS MUTANS

Microorganismo presente en la cavidad bucal. Son cocos Gram-positivos, no móviles, anaerobios facultativos.¹⁹ Fue aislado e identificado por Clarke a partir de lesiones cariosas. Lo denominó “mutans” por las formas mutantes en que presenta: cocobacilo (forma ovalada) en un medio ácido y coco (forma redondeada) en un medio alcalino.

Streptococcus mutans produce polisacáridos a partir de la sacarosa por la acción de dos enzimas, la glucosiltransferasa (GTF) y la fructosiltransferasa (FTF). La GTF es capaz de sintetizar glucano a partir de la glucosa; la FTF, fructano a partir de la fructosa.²⁰

Otra característica del *Streptococcus mutans* es su corto efecto post-pH, que puede definirse como el tiempo necesario para recuperar su actividad de crecimiento habitual, tras estar sometido a un bajo pH éste vuelve a la normalidad. Según lo expuesto, no es de extrañar que estas especies bacterianas sean las que consigan alcanzar más rápidamente el pH crítico 4.5 necesario para iniciar el proceso de desmineralización. *Streptococcus mutans* forma parte de la microbiota normal de la boca y aparece junto con la erupción de las piezas dentarias, pero se hace patógeno al aumentar su proporción relativa en la boca.²¹

2.1.2.1. Adquisición *Streptococcus mutans*

El *Streptococcus mutans* se encuentra de forma permanente en la cavidad oral después de la erupción dental, debido a que requiere de tejido duro no descomatativo para su colonización. La principal fuente de adquisición y transmisión de *Streptococcus mutans* en los niños es la saliva de la madre transmitida cuando hay un contacto salival con la comida que se le dará al bebé, estas evidencias provienen de estudios que demuestran un patrón idéntico de DNA cromosomal en las bacterias de los niños y de las madres.

Se ha demostrado que el tiempo exacto de colonización de esta bacteria es a los 26 meses de edad, periodo que ha sido denominado “ventana de infectividad”. Es importante recordar que el *Streptococcus mutans* forma parte de la flora oral microbiana, por lo que se puede encontrar en pacientes con y sin caries.²⁰

2.1.2.2. Factores de virulencia

Son aquellas condiciones o características específicas que hacen patógeno a este microorganismo. Entre ellas tenemos:

Acidogénesis: rápidamente se metabolizan los azúcares por la vía glicolítica, así se alcanza el pH crítico de desmineralización de 4.5 – 5.5 el *Streptococcus mutans* presenta distintos mecanismos enzimáticos para el transporte de azúcares al interior de la célula. Estos sufren un proceso de fermentación y producción de ácidos, principalmente ácido láctico.

Acidofilia: la acidificación del biofilm, producto de la fermentación de carbohidratos favorece el crecimiento de *S. mutans* y al mismo tiempo inhibe el crecimiento de microorganismos comensales.²²

Aciduricidad: Es la capacidad de producir ácido en un medio con pH bajo.²¹

2.1.3. CARIES DENTAL

La caries dental es una enfermedad cuyo proceso es dinámico, crónico, infeccioso post-eruptivo, transmisible que se caracteriza por una disolución gradual y la destrucción de los tejidos mineralizados de los dientes.^{1, 2} También es una enfermedad infectocontagiosa, de etiología multifactorial asociada a la interrelación de varios factores, imprescindible para que se inicie la lesión.²³ Dichos factores son el huésped, las bacterias y la dieta. Posteriormente fue adicionado un nuevo factor: el tiempo, que permitió esclarecer de una forma más precisa la formación de la caries dental.^{21, 23}

Según la OMS ha definido la caries dental como un proceso localizado de origen multifactorial que se inicia después de la erupción dentaria, determinando el reblandecimiento del tejido duro del diente y que evoluciona hasta la formación de una cavidad.²⁴ y es la tercera calamidad sanitaria, después de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer.²⁵

2.1.3.1. Factores etiológicos

Paul Keyes en 1960, estableció que la etiopatogenia de la caries obedece a la interacción simultánea de tres factores principales: un factor “microorganismo” que en presencia de un factor “sustrato” (ingesta de Carbohidratos), logra afectar a un factor “diente” (también denominado huésped). Dicho investigador, refirió tanto en forma teórica como experimental que la interacción entre estos tres factores constituye, la base fundamental para el desarrollo de la caries dental.²⁶

a. Huésped: La composición de su superficie y su localización hace que los dientes retengan más o menos placa dentobacteriana.

Los factores que determinan una distinta susceptibilidad ante la cariogénesis son básicamente: la saliva y la morfología del diente.²⁷

b. Tiempo: La placa dentobacteriana es capaz de producir caries debido a su

condición acidogénica y acidurica que poseen los microorganismos que la colonizan, de tal forma que los carbohidratos fermentables en la dieta no son suficientes, sino que además éstos deben actuar durante un tiempo prolongado para mantener un pH ácido constante a nivel de la interfase placa - esmalte.²⁷

c. Dieta: el *Streptococcus mutans* para poder producir glucano y polisacáridos responsables de la adhesión bacteriana, necesitan de un sustrato que consiste en la ingesta de hidratos de carbono, más específicamente la sacarosa, que es el carbohidrato fermentable con mayor potencial cariogénico. Durante el proceso de la caries, las bacterias orales fermentan los hidratos de carbono y producen ácidos que disuelven el esmalte dentario.²⁸

d. Bacterias: Se estima que en ella habitan entre 200 y 300 especies.^{28, 29} Aquellas capaces de adherirse a la película adquirida (formada por proteínas que precipitaron sobre la superficie del esmalte) y congregarse formando un "biofilm" (comunidad cooperativa) de esta manera evaden los sistemas de defensa del huésped que consisten principalmente en la remoción de bacterias saprófitas y/o patógenas no adheridas por la saliva, siendo estas posteriormente deglutidas. Inicialmente en el biofilm se encuentra una gran cantidad de bacterias Gram positivas con poca capacidad de formar ácidos orgánicos y polisacáridos extracelulares, pero estas posteriormente, debido a las condiciones de anaerobiosis de las capas más profundas son reemplazadas por un predominio de bacterias Gram negativas y es en este momento cuando es denominada a la placa "cariogénica" es decir, capaz de producir caries dental. Las bacterias se adhieren entre sí pero es necesario una colonización primaria a cargo del *Streptococcus mutans*, además se encuentran *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces viscosus* y otros.²⁷

2.1.3.2. EPIDEMIOLOGÍA

Según la OMS la caries dental Afecta entre el 60 % y 90 % de la población escolar.⁴ El Perú es uno de los países de Latinoamérica más afectados por las enfermedades bucales, como se demuestra al precisar que entre el 90 y 95% de la población peruana (equivalente a 30 millones de habitantes según proyección 2013, sufre de caries dental, además de tener uno de los índices más altos de caries en niños menores de 12 años, según OMS.⁵

En 2009, las enfermedades bucales fueron la segunda causa de consulta externa en los establecimientos de salud del Ministerio de Salud y representaron 8,5% de todas las consultas.³⁰

Según el reporte oficial ofrecido por Ministerio de Salud del Perú (MINSA) en el 2005. Los resultados mostraron como promedio 90% de prevalencia de caries dental en la población escolar. La prevalencia en el área urbana fue 90,6% y en el rural 88,7%. El promedio de piezas cariadas, perdidas y obturadas en la dentición temporal y permanente (índice ceo-d/ CPO-D) a nivel nacional fue de 5.84 y el promedio de piezas cariadas, perdidas y obturadas en la dentición permanente para la edad de 12 años (CPO-D-12) a nivel nacional fue 3.67 (IC95%: 3,37-3,97).³¹

2.2. HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN

H₁: El extracto de *Stevia rebaudiana* a diferentes concentraciones tiene efecto antimicrobiano sobre el *Streptococcus mutans*.

H₀: El extracto de *Stevia rebaudiana* a diferentes concentraciones no tiene efecto antimicrobiano sobre el *Streptococcus mutans*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. TIPO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

- a) Según el análisis y alcance de los resultados: Experimental.
- b) Según el tiempo de ocurrencia de los hechos y registros del estudio: Prospectivo.
- c) Según el periodo y secuencia del estudio: Transversal
- d) Diseño de investigación, según causa y efecto: explicativo

3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA DE INVESTIGACIÓN

3.2.1. Población

Cepas de *Streptococcus Mutans*.

3.2.2. Muestra

De tipo probabilístico, porque todas las muestras tienen la probabilidad de ser incluidas en la investigación. Se realizó en 36 placas Petri con sembrado de *Streptococcus mutans*

Tamaño de muestra

$$n = 2(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 (DE)^2 / d^2$$

Se usó la fórmula para comparar dos o más medias:

n : Tamaño de cada grupo de estudio

α : Probabilidad de cometer error tipo I

β : Probabilidad de cometer error tipo II

Z : Valor estándar de la distribución normal asociada a un tipo de error

DE : Desviación estándar

d : Diferencia entre promedios para rechazar igualdad de medias

Considerando los requerimientos de una confianza del 99% ($\alpha = 0.01$, $Z = 2.57$) y una potencia en la prueba del 80% ($\beta = 0.20$, $Z = 0.84$), para ($DE/d = 0.50$)

$$n = 2(2.57 + 0.84)^2 (0.5)^2$$

$$n = 5.8$$

$$n = 6$$

Con estos valores se determinó una muestra de 6 repeticiones para cada concentración.

Grupo de estudio

a. Grupos experimentales:

Grupo experimental 1 (GE₁): Extracto de *Stevia rebaudiana* al 25%

Grupo experimental 2 (GE₂): Extracto de *Stevia rebaudiana* al 50%

Grupo experimental 3 (GE₃): Extracto de *Stevia rebaudiana* al 100%

3.2.2.1. Criterios de selección de muestra:**Criterios de inclusión.**

- Placas que después del proceso de incubación presentaron halos de inhibición.

Criterios de exclusión.

- Placas que después del proceso de incubación no mostraron halos de inhibición.

3.3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.**Variable independiente:**

- Extracto de *Stevia rebaudiana*.

Variable dependiente:

- Efecto antimicrobiano sobre el *Streptococcus mutans*

VARIABLES		INDICADOR	UNIDAD DE MEDIDA	ESCALA	CATEGORÍA
INDEPENDIENTE	Extracto de <i>Stevia rebaudiana</i>	Porcentaje del extracto de <i>Stevia rebaudiana</i>	Razón	25% 50% 100%
DEPENDIENTE	Efecto antimicrobiano o sobre <i>Streptococcus mutans</i>	Tamaño de halos de inhibición de <i>Streptococcus mutans</i>	mm/ml	Razón	mm

3.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

La técnica que se utilizó es la observación directa

INSTRUMENTO:

- Ficha de observación: ficha de recolección de datos.
- Vernier o regla milimétrica

Prueba piloto

Se realizó la prueba piloto con el propósito de observar la efectividad antimicrobiana del extracto de *Stevia rebaudiana* sobre el *Streptococcus mutans* que se cultivó en 4 placas Petri. Con los resultados obtenidos me permitió mejorar en manejo de la metodología aplicada en esta investigación. Los resultados obtenidos al 25% con un promedio de halo de inhibición de 10.46mm, en la concentración de 50% con un promedio de 12.45 y en la concentración al 100% de 13.50mm, siendo de mejor efecto antimicrobiano.

3.4.1. Materiales de laboratorio

- ❖ Autoclave (horno a presión de calor húmedo).
- ❖ Microscopio Óptico Compuesto con objetivo de inmersión y láminas porta y cubre objetos.
- ❖ Estufa de Incubadora Microbiológica.
- ❖ Jarra Microbiológica de Anaerobios.
- ❖ Placas Petri
- ❖ Matríz
- ❖ Tubos de ensayo
- ❖ Mechero Bunsen
- ❖ Safranina, alcohol cetona, lugol y violeta de genciana.
- ❖ Solución peptonada.
- ❖ Solución para medio de transporte.
- ❖ Medios de cultivo.
- ❖ Agua destilada y suero fisiológico.
- ❖ Cocina eléctrica
- ❖ Jeringas desechables de 5 ml. y tuberculina.
- ❖ Hisopos esteriles
- ❖ Bandeja porta objetos
- ❖ Placa milimetrada de recuento de colonias
- ❖ Regla metálica milimetrada para medir espacios

3.4.2. Elementos de bioseguridad

- Mandil color blanco
- Gorra color blanco
- Guantes quirúrgicos estériles
- Mascarilla desechable
- Anteojos transparentes
- Detergente, desinfectantes y jabón carbólico.
- Escobilla para lavado de manos.

3.5. PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

3.5.1. Obtención de la *Stevia rebaudiana*

1. Se realizó un pedido de las hoja de *Stevia rebaudiana* en el mercado Bellavista de Puno que son proveniente de Satipo.
2. Almacenado en bolsa transparente.

3.5.2. Obtención del extracto

Se utilizó el método destilación con agua-vapor³²

El extracto se realizó en el laboratorio de Ciencias Agrarias.

Se procedió a pesar las hojas de *Stevia rebaudiana* en una balanza, el peso de las hojas es de 1kg y 500 gr.

Carga e inicio de la extracción: se coloca la *Stevia rebaudiana* en el destilador se remoja en 3 litros de agua destilada se tapó el tanque de extracción y se selló de forma hermética. Luego de 2 horas se sometió al calentamiento.

El tiempo de extracción fue de 110 min

Transcurrido el tiempo de destilación, se suspendió el calentamiento y se recogió el producto.

El producto fue envasado en recipientes de vidrio ámbar para su conservación

Para la obtención de las diferentes concentraciones del extracto de *Stevia*:

Se colocó 75ml y 50 ml de agua destilada en envases a las cuales se le agrego 25ml y 50ml del extracto de *Stevia rebaudiana*, para obtener las concentraciones de 25% y 50%. Para obtener el 100% se colocó el extracto puro en un envase.

3.5.3. Preparación de la muestra de experimentación

A. preparación del medio de cultivo

La preparación de los medios de cultivo comprende los siguientes tiempos fundamentales:³³

1. Pesada de los ingredientes y disolución con calor.
2. Adición de las sustancias de sostén: Agar-Agar, gelatina, etc.
3. Ajuste del pH. Por lo general las bacterias exigen una reacción neutra o ligeramente alcalina pH 6,8 - 7,2. Un pH alto o bajo retarda o inhibe el crecimiento de las bacterias.

Para determinar el pH, se ha empleado los siguientes métodos:

- Método del papel indicador universal de pH
 - Método colorimétrico
4. Repartición de tubos, frascos, etc.
 5. Esterilización a 121 °C a 15 libras de presión/pulg por 20 minutos.
 6. Control de la esterilidad en la estufa a 37°C por 24 horas.
 7. Almacenamiento de los medios en la nevera hasta el momento de usarlos.

B. Preparación de agar sangre

- Colocar en Baño María un frasco o balón con 100 ml de Agar nutritivo estéril hasta que licué completamente.
- Dejar enfriar hasta 45 - 50°C.
- Se añadió asepticamente sangre (humana) en proporción del 5-8%.
- Agitar suavemente para mezclar. Repetir en placas Petri, tubos; dejar solidificar.
- El color de este medio es rojo - cereza.
- Controlar la esterilidad. Guardar en nevera.

C. Siembra y aislamiento

Se sembró colocando los microorganismos en medios de cultivo adecuado (agar sangre) para que se desarrollen y multipliquen en condiciones óptimas. Obtenidos de la muestra de la placa dental.

Para sembrar se tomó en cuenta:

1. Realizar la siembra en medios de cultivo apropiado y estériles.
2. Trabajar cerca de la llama del mechero.
3. Esterilizar en la llama el asa de Kolle, antes y después de la siembra.
4. Flamear la boca del tubo, antes y después de realizada la siembra.

Se realizó la siembra por Trasplante.

Por trasplante: El material contiene una sola especie bacteriana, y se realizó con la finalidad de conservar el microorganismo renovando su medio de cultivo para conocer sus propiedades biológicas y bioquímicas.

- Siembra de una muestra líquida a un medio sólido.

Procedimiento

1. Esterilizar el asa por flameado.
2. Dejarla enfriar.
3. Se tomó con la mano izquierda el tubo con la muestra se le dio leve inclinación para evitar, contaminación con microorganismo del medio ambiente, al ser destapado.
4. Con la mano derecha, se sostuvo el asa y ayudado con el dedo meñique de esta misma mano, se sacó la lámina metálica del tubo con la cepa.
5. Flamear la boca del tubo, e introducir el asa sin tocar las paredes y cargarla con la suspensión o cepa. Retirar el asa.
6. Flamear de nuevo la boca del tubo, y tapar con la lámina metálica.
7. Inmediatamente tomar con la mano izquierda el tubo con el medio de cultivo sólido estéril, destapar con cuidado de esterilidad e introducir el asa hasta el fondo, y apoyando la aguja sobre la superficie, hacer una línea o estría sin romper el medio de cultivo.
8. Flamear la boca del tubo y el asa de Kolle.
9. Rotular la Placa, con el nombre y fecha
10. Incubar en la estufa a 37°C por 24 a 48 horas.
11. Transcurrido el tiempo se realiza la observación:

D. Obtención de la bacteria indicadora

Para brindarle la autenticidad al estudio. Las cepas de *Streptococcus mutans*, fueron aisladas a partir de muestras obtenidas de las piezas dentarias.

El transporte de las cepas, se hizo en un tubo de ensayo cuidadosamente esterilizado contenido de 3 ml. De solución peptonada. Las cepas fueron homogenizadas en cuatro tubos de ensayo contenido de caldo nutritivo, obteniéndose una dilución de 3 ml. Por cada tubo. Se llevó a la incubadora por 24 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo se realizó la siembra en, Agar sangre. El medio de cultivo Agar sangre nos sirvió para determinar la hemólisis de la bacteria e identificar si es alfa o beta para proceder su

aislamiento, para observar las características bioquímicas como catalasa y oxidasa. También se aisló en un medio selectivo para *Streptococcus mutans* y colocadas en una campana de anaerobiosis para ser cultivadas por 24 horas a 37°C.

La identificación de colonias de *Streptococcus mutans*, se realizó en base a la observación de la morfología colonial y la adherencia de la colonia al agar. Luego se hizo el diagnóstico microscópico a través de frotis y tinción de Gram de una muestra de la colonia aislada.

Para confirmar la identificación plena del *Streptococcus mutans* se complementó con pruebas bioquímicas.

E. Diseño de los grupos de experimentación

Se consideró la concentración del producto, el tiempo de crecimiento y el halo de inhibición en mm

- *Stevia rebaudiana* a concentraciones al 25%, 50% y 100%.

F. Dilución por método Mac Farlan

Se preparó en tubos de ensayo de 12cm con suero fisiológico 10ml, en el primer tubo 1ml de muestra diluidos en 9ml de suero fisiológico para obtener la escala 10^1 . En otro tubo de ensayo se echa 1ml de la solución de la escala 10^1 con 9ml de suero fisiológico obteniéndose una escala de 10^2 con la cual se trabajó.

G. Preparación del inóculo por el Método de Kirby Bauer

El inóculo del *Streptococcus mutans*, fue preparado en tubos de ensayo, suspendiendo las colonias puras aisladas en 0.5 ml de suero fisiológico hasta obtener una turbidez de 0.5 de Mac Farland, que corresponde a una concentración de 1.5×10^2 alfa unidades formadoras de colonias de *Streptococcus mutans* por 1ml (UFC/ml)

Fase experimental

❖ Control bacteriológico por horas determinadas

El control del desarrollo bacteriano se realizó de la siguiente manera:

- **Preparación de la dilución.**- En un matraz de Erlenmeyer de 300ml, se preparó el agar base sangre, hasta obtener una dilución homogénea, llevando para la licuación al autoclave a 15 atmosferas por 20 minutos, después de ese tiempo se dejó enfriar la solución a una temperatura de 37 a 39 °C, para luego agregar la sangre a una proporción de 8%.

❖ **Inoculación de la suspensión bacteriana**

Utilizando el asa de Kolle, se realizó la siembra de *Streptococcus mutans*, a cada placa con agar sangre completamente estériles.

Transcurrido la inoculación de la suspensión bacteriana, después de 10 minutos se procedió a realizar los pocillos en la placa Petri para luego introducir el disco de antibiograma sin contenido y estéril para aplicar con una pipeta automática el tratamiento con *Stevia rebaudiana* a concentraciones al 25%, 50% y 100%, en un volumen de 10 ul, para cada uno de los 6 pocillos por placa, se lleva a incubar la totalidad de las muestras a una temperatura de 36°C por 24 horas determinadas en medio anaerobio.

H. Métodos realizados para la medición de los halos de inhibición.

Para la medición de los halos de inhibición se tomó en cuenta la totalidad de los 6 pocillos con el tratamiento desarrolladas en la placa Petri, precisión del recuento.

- 1.- Se realizó la medición del diámetro del halo de inhibición en milímetros. Con un vernier digital, para una mejor medición.
- 2.- Sumar el número las medidas del halo de inhibición de los 6 pocillos por placa para sacar los promedios respectivos.

3.6. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para interpretar los resultados que se obtuvieron del presente estudio, se utilizaron pruebas estadísticas inferenciales. Se empleó la prueba de T y la prueba de significancia de Tukey entre las concentraciones del extracto de *Stevia rebaudiana*.

IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS

TABLA N° 1

EFEECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DEL EXTRACTO DE *Stevia rebaudiana* AL 25% SOBRE *Streptococcus mutans*, PUNO- 2017.

PRUEBA ESTADISTICA DE T	EFEECTO ANTIMICROBIANO DE <i>Stevia rebaudiana</i> AL 25% SOBRE <i>Streptococcus mutans</i>
PROMEDIO	10.47 mm
D.E	± 0.06
LI	10.43
LS	10.51
T	562.08
P	≤ 0.0001

FUENTE: Elaboración personal (Matriz de datos)

Interpretación: En la tabla 1 los resultados de las muestras registran un promedio de halo de inhibición de 10.47mm, siendo la Desviación Estándar de (DE) ± 0.06 teniendo una dispersión mínima con respecto al promedio, sin embargo siendo la t calculado para el contraste de hipótesis de 562.08 con una probabilidad de $P \leq 0.0001$, aceptando la hipótesis alterna. Por lo tanto no existe diferencia en la distribución, es decir la relación es al azar, la frecuencia de halo de inhibición son iguales.

TABLA N° 2

EFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DEL EXTRACTO DE *Stevia rebaudiana* AL 50% SOBRE *Streptococcus mutans*, PUNO-2017.

PRUEBA ESTADÍSTICA DE T	EFECTO ANTIMICROBIANO DE <i>Stevia rebaudiana</i> AL 50% SOBRE <i>Streptococos mutans</i>
PROMEDIO	12.46 mm
D.E	± 0.11
LI	12.39
LS	12.53
T	375.42
P	≤ 0.0001

FUENTE: Elaboración personal (Matriz de datos)

Interpretación: en la tabla 2 los resultados de los promedios se sometió al análisis estadístico de t para la frecuencia de la zona de inhibición con *Stevia rebaudiana* a una concentración al 50%. Observándose de la siguiente manera; el promedio de halo de inhibición es de 12.46mm, la Desviación Estándar de (DE) ± 0.11 siendo mínimo la dispersión en relación al promedio, la prueba de t calculado de 375.42 con una probabilidad de $P \leq 0.0001$, por lo que se asume que existe una distribución normal y homogéneo entre los resultados del promedio de los halos de inhibición en los diferentes datos obtenidos, por lo tanto no existe diferencia en la distribución.

TABLA N° 3

EFFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DEL EXTRACTO DE *Stevia rebaudiana* AL 100% SOBRE *Streptococcus mutans*. PUNO- 2017.

PRUEBA ESTADISTICA DE T	EFFECTO ANTIMICROBIANO DE <i>Stevia rebaudiana</i> AL 100% SOBRE <i>Streptococcus mutans</i>
PROMEDIO	13.49 mm
D.E	± 0.05
LI	13.46
LS	13.53
T	890.78
P	≤ 0.0001

FUENTE: Elaboración personal (Matriz de datos)

Interpretación: En la tabla 3 se puede observar que la relación entre el efecto inhibitor producido por *Stevia rebaudiana* a una concentración al 100% frente a las bacteria *Streptococcus mutans*. Tiene un promedio de 13.49mm, siendo la Desviación Estándar de (D.E) ± 0.05 siendo su dispersión de frecuencias mínimo en relación al promedio, con la prueba de t calculado de 890.78 con una probabilidad de $P \leq 0.0001$, aceptando la hipótesis alterna que el extracto de *Stevia rebaudiana* a una concentración al 100% tiene efecto antimicrobiano sobre el *Streptococcus mutans*. En tal sentido existe una distribución normal y homogénea entre los resultados del promedio, por lo tanto no existe diferencia significativa en la distribución.

TABLA N° 4

COMPARACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DEL EXTRACTO DE *Stevia rebaudiana* A DIFERENTES CONCENTRACIONES AL 25, 50 Y 100% SOBRE EL *Streptococcus mutans* PUNO-2017.

Extracto de <i>Stevia rebaudiana</i>	n	Efecto antibacteriano					
		Promedio	DE	LI	LS	T	P
Al 25 %	12	10.47	± 0.06	10.43	10.51	562.08	≤ .0001
Al 50 %	12	12.46	± 0.11	12.39	12.53	375.42	≤ .0001
Al 100 %	12	13.49	± 0.05	13.46	13.53	890.78	≤ .0001

FUENTE: Elaboración personal (Matriz de datos)

Interpretación estadística: En el análisis Estadístico observado entre la zona de inhibición de *Stevia rebaudiana* en las bacterias de *Streptococcus mutans* en las placas, fue notoriamente diferente y significativo entre la zona de inhibición tratado con *Stevia rebaudiana* al 100% con relación al tratamiento con *Stevia rebaudiana* al 50% y 25%, a su vez la concentración del 50% de *Stevia rebaudiana* es diferente y significativo en relación al tratamiento de *Stevia rebaudiana* al 25%, por lo tanto se demuestra que el mejor comportamiento en el tratamiento se da con *Stevia rebaudiana* al 100%, por lo que en la prueba de comparación todos estos presentan asociación, debido a que los resultados de la prueba de significancia de Tukey resultó significativa (Tukey Alfa = 0,05 DMS = 0,08207), en tal sentido existe relación entre las variables de las concentración de *Stevia rebaudiana* y el halo de inhibición de *Streptococcus mutans*.

4.2. DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar el efecto antimicrobiano in vitro del extracto de *Stevia rebaudiana* sobre el *Streptococcus mutans*, Puno-2017.

Gamboa F y Chaves M. (2012) Evaluaron el efecto antibacteriano de los extractos de hojas de *Stevia* en hexano, metanol, etanol, acetato de etilo y cloroformo. Reporto que las zonas de inhibición producidas por los 5 extractos en la concentración inhibitoria mínima (MIC) para las 16 cepas fueron variables, con cifras que van desde 9 mm a 17,3 mm. El mejor desempeño fue Hexanoico cuya CMI fue de 30 mg / ml, con un halo de inhibición de 12mm, tenía valores similares a los alcanzados con etanol y metanol (MIC = 120 mg / ml). En esta investigación los resultados tienen similitud con los rangos obtenidos, al del estudio de Gamboa y col, el extracto de *Stevia rebaudiana* del presente estudio fue realizado por destilación vapor-agua, por lo tanto se observa halos de inhibición que va de 10.31mm a 13.72mm, se puede decir que a mayor concentración del extracto de *Stevia rebaudiana* mayor será el halo de inhibición.

En esta investigación se encontró que el extracto de *Stevia rebaudiana* a concentración al 100% presento una actividad antibacteriana sobre cepas de *Streptococcus mutans* con un halo promedio de 13.49mm. Encontrando un resultado diferente en el estudio de Mohammadi y col (2012) quienes evaluaron el efecto de diferentes extractos de *Stevia rebaudiana* en *Streptococcus mutans*. La inhibición máxima del crecimiento contra *S. mutans* se demostró por el extracto de acetona (28,7 mm) a 100 mg / ml que fue seguido por el extracto de etanol (27,0 mm).

Pérez S y Becerra L. Demostraron que el extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* sobre el *Streptococcus mutans* tiene efecto antibacteriano. El método que utilizaron fue de dilución en caldo y agar. La acción inhibitoria para ambos autores, se presentó a partir de la concentración de 1,07mg/ml en el extracto en etanol de 70° y a partir de la concentración de 4,28mg/ml en el extracto de etanol de 30°. En relación a los resultados del presente estudio podemos afirmar que el extracto de *Stevia rebaudiana* tiene efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans*. Se observó que a partir de la concentración de 25% de extracto de *Stevia rebaudiana* posee efecto antimicrobiano sobre cepas nativas

de *Streptococcus mutans* con un halo de inhibición promedio de 10.47mm y la concentración al 50% posee un halo de inhibición promedio de 12.46mm.

Los resultados encontrados en el presente estudio son relevantes ya que el extracto de *Stevia rebaudiana* tiene efecto antimicrobiano sobre un factor de la caries dental, en tal sentido la importancia de esta planta coadyuva en la prevención de la caries dental. Por ende afirmamos que el extracto de *Stevia rebaudiana* a diferentes concentraciones tiene efecto antimicrobiano sobre el *Streptococcus mutans*.

La actividad antimicrobiana que ha demostrado el extracto de *Stevia rebaudiana* sobre los cultivos in vitro de *Streptococcus mutans* se debe a los compuestos de esta planta. El Esteviosido tiene efecto sobre las enzimas que son responsables de la descomposición de azúcares e inhibe el glucano, la *Stevia rebaudiana* es un edulcorante pero no es fermentado en ácidos por las bacterias.

V.CONCLUSIONES

1. El extracto de *Stevia rebaudiana* al 25% presenta efecto antimicrobiano sobre el *Streptococcus mutans*. Con un promedio de su halo de inhibición de 10.47 mm con una distribución normal y homogénea
2. El extracto de *Stevia rebaudiana* al 50% presenta efecto antimicrobiano sobre el *Streptococcus mutans*. Con un promedio de halo de inhibición de 12.46 mm con una distribución normal y homogénea.
3. El extracto de *Stevia rebaudiana* al 100% presenta efecto antimicrobiano sobre el *Streptococcus mutans*. Con un promedio de 13.49 mm con una distribución normal y homogénea.
4. Al comparar el efecto antimicrobiano de la *Stevia rebaudiana* a diferentes concentraciones al 25%, 50%, 100%; sobre el *Streptococcus mutans*, se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Es decir que el extracto de *Stevia rebaudiana* a medida que aumenta la concentración mayor será su efecto antimicrobiano.

VI.RECOMENDACIONES

En estudios posteriores se recomienda:

Tener máximo cuidado de esterilidad para no aumentar, gérmenes del exterior. El Agar sangre a añadir en cada placa Petri debe estar licuado; pero a no más de 45 ó 50°C, para no matar los gérmenes.

Realizar estudios de extracto de *Stevia rebaudiana* como cicatrizante de heridas.

Realizar estudios que demuestren de cómo actúa el principio activo de la *Stevia rebaudiana* sobre las bacterias anaerobias.

Realizar estudios in vivo con el extracto de *Stevia rebaudiana* para verificar el efecto antimicrobiano.

VII.REFERENCIAS

1. Veyga N, Pereira C, Adete O. Prevalence and determinants of dental caries in Portuguese children. Elsevier. 2014, 171: 995-1002.
2. Graciano M, Correa Y, Martinez MC, Burgos A, Ceballos J, Sanchez L. *Streptococcus mutans* y caries dental en América Latina. RNO. 2012; 8(14):1-14.
3. Gonzalez SA, Gonzalez NB; Gonzalez NE. Salud dental: relación entre la caries dental y el consumo de alimentos. ISNN. 2013; 28(4):64-71.
4. Díaz CS, Gonzales MF. Prevalencia de caries dental y factores familiares en niños escolares de Cartagena de Indias, Colombia. Rev. Salud pública. 2010; 12 (5): 843-851,
5. Chumpitaz DR, Ghezzy HL. Prevalencia e incidencia de caries a partir de vigilancia epidemiológica realizada a escolares en Chiclayo, Perú. KIRU.2013 10(2):107–15.
6. Reyes JO; Ramos QG; Ortega CF; Palacios SL. Efecto Antibacteriano In Vitro Del *Hidróxido De Magnesio* sobre El *Streptococcus Mutans* y *Enterococcus Faecalis*. Rev. Estomatologica del Altiplano. 2010; 1(1):1-3
7. Castro Arqueros Viviana. Inhibición Del Crecimiento In Vitro De *Streptococcus Mutans* por *Papaina* y *Sanitrend*. Santiago de Chile 2005; 1-75.
8. Contreras S. Anticariogenic properties and effects on periodontal structures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Narrative review. J Oral Res 2013; 2(3): 158-166.
9. Duran S, Rodríguez NA, Córdón K, Record CJ. Estevia (*Stevia rebaudiana*), edulcorante natural y no calórico. Chil Nurt. 2012; 39(4):1-4
10. Gamboa F., Chaves M. “Potencial Antimicrobiano De Extracto De Hojas *Stevia Rebaudiana* Contra Las Bacterias De Importancia En La Caries Dental” 2012 Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
11. Mohammadi S, Vajihah K, Fatemeh A; Reza M. Efecto de diferentes extractos de hoja de *Stevia rebaudiana* en crecimiento de *Streptococcus mutans*. J. Med. Plants Res. 2012.
12. Pérez G. Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Stevia Rebaudiana* sobre *Streptococcus mutans*. (Tesis pregrado) Trujillo- Perú. Universidad Nacional de Trujillo. 2013.
13. Becerra L. efecto antibacteriano in vitro de un enjuague bucal a diferentes concentraciones a base de extracto etanolico de *Stevia rebadiana* sobre el

- crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. (Tesis pregrado) Trujillo – Perú. Universidad Nacional de Trujillo. 2016.
14. Bravo A, Ale B, Rivera C, Huamán M, Delmás R, Rodríguez B. Caracterización química de la *stevia rebaudiana*. rev. Per. Quím. Ing. Quím. 2009; 12 (2):5-8.
 15. Salvador, R. Sotelo M. y Paucar L. Estudio de la Stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*) como edulcorante natural y su uso en beneficio de la salud. Scientia Agropecuaria Ancash-Perú 2014; 5: 157 – 163
 16. Taiariol D. Caracterización de la Stevia rebaudiana Bert. Disponible en <http://www.monografias.com/trabajos13/stevia/stevia.shtml>
 17. Goyal, SK, Samsher, Goyal, RK. *Stevia* (*Stevia rebaudiana*) a Bio- sweetener: a review. Int J food Sci Nutr. 2010; 61(1): 1-10.
 18. Fabrizio G, Cantile T, Alcidi B, Ingenito A, Zarrelli A, Coda M, et al. Is *Stevia rebaudiana Bertoni* a Non Cariogenic Sweetener? A Review. Mdpi. 2015; 21(1):1-22.
 19. Ani M. M, Kohanteb J, Dayaghi M. Inhibitory activity of garlic (*Allium sativum*) extract on multidrug-resistant *Streptococcus mutans*. J Indian Soc Pedod Prevent Dent 2007, December; 164-168.
 20. Gutiérrez PS. Fundamentos de Ciencias básicas aplicadas a la odontología. 1ª ed. Bogotá: pontificia Universidad Javeriana; 2006.
 21. Castro Arqueros Viviana. Inhibición Del Crecimiento In Vitro De *Streptococcus Mutans* Por *Papaina* Y *Sanitrend*. Santiago de Chile 2005; 1-75.
 22. Negroni N. Microbiología estomatológica fundamentos y guía práctica. 2da ed. Buenos aires: panamericana. 2009.
 23. Sánchez de López, Galdámez, J, Linares A, García Y. “Actividad cariosa y efectividad antimicrobiana del *Aloe Vera* y *Syzygium aromaticum* sobre el *Estreptococcus mutans*, aislado de la cavidad oral de los usuarios que asisten a las clínicas odontológicas de UNASA en el período de febrero a noviembre de 2013 (Tesis para la obtención del título). 2013: 1-38
 24. Palomer Leonor. Caries dental en el niño. Una enfermedad contagiosa. Rev. chil. pediatr. 2006; 77(1).
 25. Cigales R; Chaviano M, Sánchez S, Robaina R, García M. Comportamiento epidemiológica de urgencia por caries dental. Policlínico Universitario 7 de Diciembre. Jagüey Grande. Rev. Med. Electrón. 2011 33 (4): 1-7.

26. Medina R, Moreno L, Velasco M, Gutiérrez S. Estudio comparativo de medios de cultivo para crecimiento y recuperación del *Streptococcus mutans* ATCC 25175 “in vitro”. NOVA. 2005; 3(3): 25-30.
27. Vitoria M. Promoción de la salud bucodental. En Recomendaciones Previnfad / PAPPS Actualizado marzo de 2011; 1-34. Disponible en <http://www.aepap.org/previnfad/Dental.htm> 1
28. Henostroza G. Diagnóstico de caries dental. 2 ed. Lima: UPCH; 2005.
29. Sánchez V. Evaluación del estado de salud bucodental y su relación con estilos de vidas saludables en la Provincia de Salamanca. [Tesis para optar el título de Doctor]. Salamanca: Universidad de Salamanca; 2008.
30. Salud en las Américas, Perú. Disponible en: http://www.paho.org/saludenlasamericas/index.php?id=51&option=com_content
31. Epidemiología de la caries dental en América Latina. ALOP.2014; 4(2). Disponible en: <http://www.revistaodontopediatria.org/ediciones/2014/2/art-4/>
32. Gonzales VA. Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas. Universidad Nacional de Colombia. 2004.
33. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. INS 2002. Disponible en: http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/-1/manua_1%20sensibilidad.pdf

ANEXOS

Anexo I
MATRIZ DE DATOS

INOCULO DE LA CEPA DE <i>Streptococcus mutans</i> EN PLACAS PETRY PARA EL TRATAMIENTO		EFECTO ANTIMICROBIANO DE <i>Stevia rebaudiana</i> FRENTE A <i>Streptococcus mutans</i> .																		
		HALO DE INHIBICIÓN AL 25%						HALO DE INHIBICIÓN AL 50%						HALO DE INHIBICIÓN AL 100%						
		Repeticiones						Repeticiones						Repeticiones						
Prom						Prom						Prom								
1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6			
Placa 1	10.32	10.64	10.55	10.62	10.53	10.62	12.26	12.62	12.73	12.46	12.37	12.45	12.52	13.38	13.27	13.56	13.45	13.32	13.34	13.39
Placa 2	10.47	10.46	10.64	10.59	10.58	10.67	12.34	12.33	12.52	12.41	12.42	12.32	12.42	13.38	13.60	13.57	13.63	13.54	13.46	13.53
Placa 3	10.64	10.42	10.55	10.38	10.52	10.64	12.25	12.34	12.56	12.43	12.38	12.35	12.37	13.50	13.64	13.38	13.42	13.47	13.45	13.48
Placa 4	10.44	10.32	10.52	10.35	10.64	10.43	12.45	12.34	12.32	12.42	12.33	12.54	12.43	13.58	13.47	13.64	13.58	13.56	13.46	13.55
Placa 5	10.63	10.51	10.43	10.61	10.42	10.37	12.52	12.56	12.42	12.61	12.44	12.35	12.48	13.42	14.38	13.43	13.37	13.42	13.63	13.48
Placa 6	10.32	10.43	10.45	10.33	10.31	10.34	12.55	12.62	12.71	12.42	12.32	12.48	12.56	13.72	13.56	13.61	13.53	13.42	13.65	13.58
Placa 7	10.35	10.54	10.35	10.47	10.45	10.36	12.42	12.33	12.45	12.56	12.32	12.52	12.43	13.43	13.62	13.45	13.64	13.53	13.52	13.53
Placa 8	10.53	10.52	10.47	10.42	10.31	10.62	12.46	12.33	12.37	12.56	12.65	12.72	12.55	13.44	13.42	13.56	13.52	13.43	13.58	13.49
Placa 9	10.45	10.54	10.52	10.32	10.31	10.42	12.64	12.42	12.54	12.37	12.27	12.63	12.48	13.52	13.47	13.53	13.56	13.43	13.41	13.49
Placa 10	10.43	10.32	10.35	10.32	10.51	10.34	12.25	12.32	12.27	12.52	12.34	12.33	12.32	13.47	13.42	13.62	13.54	13.44	13.56	13.51
Placa 11	10.45	10.52	10.54	10.63	10.34	10.36	12.65	12.76	12.82	12.74	12.38	12.62	12.70	13.46	13.57	13.42	13.45	13.51	13.45	13.48
Placa 12	10.35	10.53	10.62	10.43	10.32	10.33	12.15	12.25	12.52	12.35	12.23	12.14	12.27	13.37	13.43	13.48	13.40	13.42	13.41	13.42
PROMEDIO	10.47						12.46						13.49							

PRUEBA T PARA UNA MEDIA

Valor de la media bajo la hipótesis nula: 0

VARIABLE	N	MEDIA	DE	LI	LS(95)	T	P(BILATERAL)
Halo de inhibición en mm de <i>Stevia</i> al 25%	12	10.47	0.06	10.43	10.51	562.08	<0.0001
Halo de inhibición en mm de <i>Stevia</i> al 50%	12	12.46	0.11	12.39	12.53	375.42	<0.0001
halo de inhibición en mm de <i>Stevia</i> al 100%	12	13.49	0.05	13.46	13.53	890.78	<0.0001

TES: TUKEY ALFA=0.05 DMS=0.08207

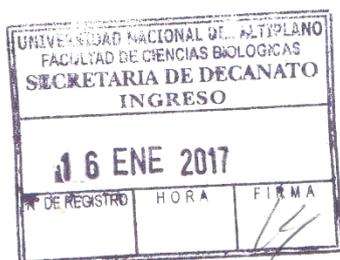
Error: 0.0067 gl: 33

TRATAMIENTO	MEDIAS	N	E.E	
Tratamiento con <i>Stevia</i> al 25%	10.47	12	0.02	A
Tratamiento con <i>Stevia</i> al 50%	12.46	12	0.02	B
Tratamiento con <i>Stevia</i> al 100%	13.49	12	0.02	C

Medias con una letra común no son común significativamente diferentes (p>0.05)

Anexo 2
PRUEBA PILOTO

INOCULO DE LA CEPA DE <i>Streptococcus mutans</i> EN PLACAS PETRY PARA EL TRATAMIENTO	EFECTO ANTIMICROBIANO DE <i>Stevia rebaudiana</i> FRENTE A <i>Streptococcus mutans</i> .														
	HALO DE INHIBICIÓN AL 25%				HALO DE INHIBICIÓN AL 50%				HALO DE INHIBICIÓN AL 100%				Promed		
	Repeticiones				Repeticiones				Repeticiones						
	1	2	3	4	Promed	1	2	3	4	Promed	1	2	3	4	Promed
Placa 1	10.32	10.55	10.43	10.61	10.46	12.73	12.62	12.54	12.48	12.46	13.52	13.42	13.47	13.57	13.53
Placa 2	10.63	10.52	10.57	10.34	10.44	12.37	12.52	12.32	12.25	12.49	13.43	13.56	13.62	13.59	13.44
Placa 3	10.48	10.36	10.36	10.57	10.42	12.55	12.28	12.57	12.36	12.42	13.58	13.41	13.38	13.46	13.47
Placa 4	10.37	10.34	10.32	10.53	10.51	12.19	12.56	12.25	12.64	12.43	13.62	13.38	13.42	13.54	13.54
Promedio					10.46					12.45					13.50

Anexo N^o 3

"AÑO DEL BUEN SERVICIO AL CIUDADANO"

SOLICITO: EJECUTAR MI PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
EN LOS LABORATORIOS DE MICROBIOLOGIA

SEÑOR DECANO DE LA FACULTAD DE CIANCIAS BIOLÓGICAS Ph. D SABINO ATENCIO LIMACHI

YO, **NATTY JANINA CACERES LUPACA**, egresada de la escuela profesional de odontología, identificada con DNI 70143505, con domicilio en el Av. Simón Bolívar N° 2705 de la ciudad de Puno ante Ud. Me presento y expongo:

Que me encuentro en proceso de ejecución de mi proyecto de investigación denominado "Efecto Antimicrobiano in vitro del Extracto de *Stevia rebaudiana* sobre el *Streptococcus mutans*, Puno-2017", para su ejecución implica utilizar laboratorios para los procesos microbiológicos, razón por la cual recorro a su digna autoridad para solicitar la utilización de los laboratorios de microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, para así poder culminar la ejecución de mi proyecto de investigación, requisito para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista.

Por lo expuesto:

Ruego a Ud. Señor decano de la Facultad de Ciencias Biológicas, acceder a mi petición.

Puno, 16 de Enero del 2017



NATTY JANINA CACERES LUPACA
DNI 70143505

Anexo N°4



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO – PUNO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGRONOMICA
LABORATORIO DE AGUAS Y SUELOS



CONSTANCIA

EL QUE SUSCRIBE LABORATORISTA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
AGRARIAS DE AGUAS Y SUELOS DE LA UNA-PUNO

HACE CONSTAR:

Que la Bachiller NATTY JANINA CACERES LUPACA, egresada de la escuela profesional de Odontología de la Universidad Nacional Del Altiplano, ha realizado el EXTRACTO DE LA PLANTA DE *Stevia Rebaudiana*, en el equipo de arrastre de vapor de agua, para su tesis titulada “EFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DEL EXTRACTO DE *Stevia rebaudiana* SOBRE EL *Streptococcus mutans*, PUNO-2017”. Realizado el 18 de enero del 2017.

Se emite la presente constancia a solicitud de la interesada para los fines que se estime por conveniente

Puno, 20 de Enero del 2017



ANALISTA
Tecn. Sergio Fernández Calloapaza
ANALISTA DE LAB. CONTROL DE CALIDAD DE AGUAS
PLANTAS, BOTANOTOLOGIA DE FENOMENOS Y FERTILIZANTES

Anexo N°5



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO – PUNO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA
LABORATORIOS

CONSTANCIA

EL QUE SUSCRIBE JEFE DEL LABORATORIO DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNA-PUNO

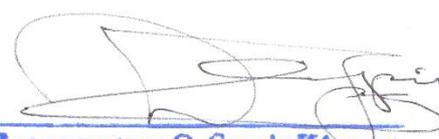
HACE CONSTAR:

Que la Bachiller NATTY JANINA CACERES LUPACA, egresada de la escuela profesional de Odontología de la Universidad Nacional Del Altiplano, ha realizado su trabajo de Investigación titulado “EFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO del EXTRACTO DE *Stevia rebaudiana* SOBRE EL *Streptococcus mutans* PUNO – 2017” en los Laboratorios de Zoología y Microbiología de la Escuela Profesional de Biología, entre los meses de enero a marzo del 2017.

Se emite la presente constancia a solicitud de la interesada para los fines que se estime por conveniente

Puno, 4 de abril del 2017


Beltrán Lugo Palacios Frisancho
C.P. 2125


Buenaventura O. Carpio Vásquez
C.B.P. N° 1063

GALERIA DE FOTOGRAFIAS

Stevia rebaudiana



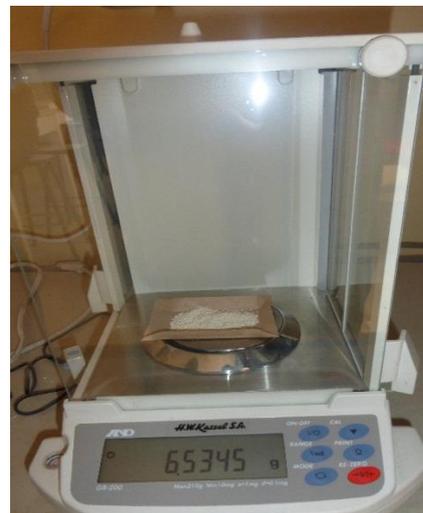
Destilador



Extracto de *Stevia*



Pesamos agar nutritivo



Diluyendo el agar



Agar y placas en autoclave



Esterilizando asa de kolle



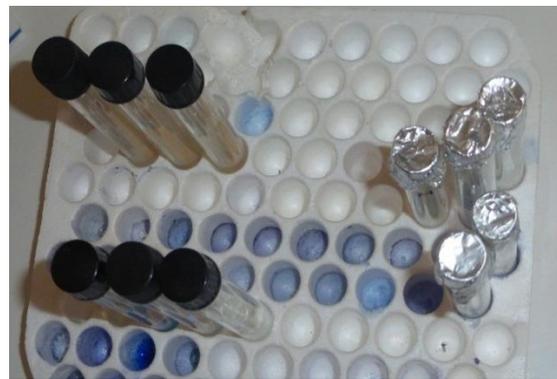
Realizando el trasplante



Hemolisis de la bacteria



Dilución método Mac Farlan



Pesamos agar Mueller Hinton



Dilución de agar



Esterilizando placas



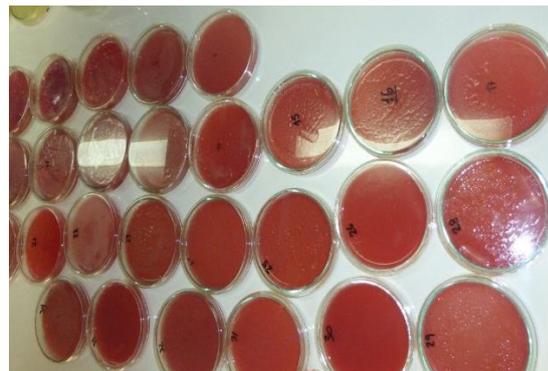
Preparación de agar sangre



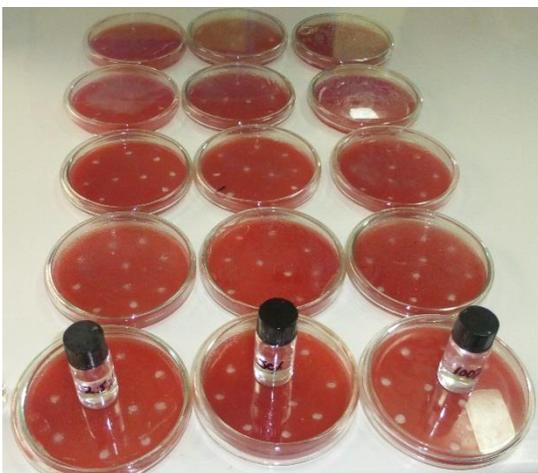
Colocar agar en las placas



Se deja solidificar



Se realiza los pasillos con sacabocados, se coloca papel filtro y se añade 10 de tratamiento



Incubar en campana de anaerobiosis



Medición de halos de inhibición



Inhibición de *Stevia rebaudiana* 100%



Placa de inhibición de 25%



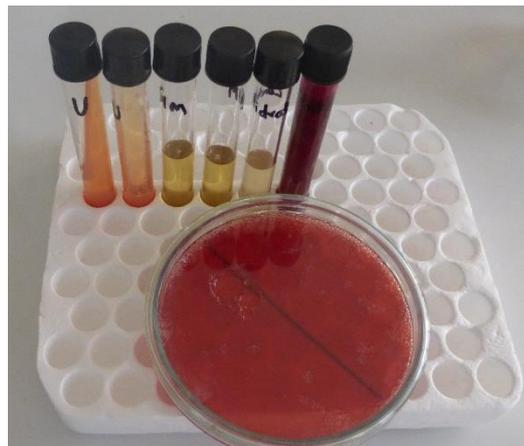
Placa de inhibición de 50%



Placa de inhibición de 100%



Prueba bioquímica para la susceptibilidad del *Streptococcus mutans*



Prueba bioquímica después de 24 horas

