



FACULTAD DE ODONTOLOGIA

EVALUACION DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO DE LA
STEVIA REBAUDIANA

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Odontóloga

Profesor Guía

Dr. Pablo Quintana

Autora

Adela Estefanía Juca Pazmiño

Año

2016

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Dr. Pablo Alfredo Quintana Ramírez

Periodoncista e Implantólogo

C.I.: 1708586605

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

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

Adela Estefanía Juca Pazmiño

C.I.: 1719154799

DEDICATORIA

A Dios quien con su infinito amor me ha guiado y me ha llenado de fortaleza en el transcurso de esta etapa universitaria.

A mis padres Jazmín y Marcelo, por ser mi ejemplo, por la paciencia, por su amor y apoyo incondicional.

A mi compañero de vida Santiago, por su amor cada día y más en los peores momentos, por no dejarme caer cuando estuve a punto de dejarlo todo y por toda la paciencia a lo largo de este camino.

Adela Juca P.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Pablo Quintana, por su valioso asesoramiento y por la paciencia en la realización de esta tesis.

A mi papá Marcelo Juca porque gracias a él no hubiera escogido esta hermosa carrera, además que sin su ayuda y sin su ejemplo no hubiera podido cumplir mi sueño.

A mi mamá por ser mi mejor amiga, por impulsarme cada día a ser mejor persona y por no dejarme vencer ante las adversidades.

A mi prima Paola Pazmiño que por compartirme sus conocimientos en agricultura me ayudo a llegar a esta valiosa planta Stevia Rebaudiana.

A mi amiga de toda la vida Paola Jaramillo por su gran ayuda en la elaboración del extracto y además por brindarme apoyo y motivación en la elaboración de esta tesis.

A Santy Benavides por ser mi mano derecha, por no dejarme vencer en los peores momentos, por darme motivación para ser la mejor.

Adela Juca P.

RESUMEN

En la actualidad se ha dado un gran interés por el uso de compuestos antimicrobianos naturales, en especial los de extractos de plantas que incluso pueden ser utilizados como sustituto antibiótico. Aproximadamente el 20% de las plantas alrededor del mundo han sido investigadas, siendo expuestas a métodos químicos, bioquímicos, farmacológicos, investigaciones clínicas y toxicológicas. Gracias a esto ha habido un gran interés en la utilización de compuestos antimicrobianos naturales de origen vegetal, han sido aplicados en el tratamiento de enfermedades las cuales han desarrollado resistencia a patógenos.

La Stevia Rebaudiana es una planta que se ha desarrollado casi mundialmente, conocida por sus excelentes beneficios como alternativa natural del azúcar tradicional para pacientes que tienen restringido su consumo, ayudando también a inhibir la acumulación de grasa, reducción de la presión arterial y entre otros beneficios en la salud sistémica y oral.

Esta investigación tiene como fin la elaboración del extracto de las hojas de Stevia Rebaudiana, que presentan compuestos edulcorantes acalóricos (esteviósidos y rebaudiósidos), los cuales van ayudar a inhibir el crecimiento de las bacterias del biofilm dental. El propósito del estudio es evaluar la cantidad de bacterias que son susceptibles a los compuestos del extracto de la Stevia Rebaudiana, aplicando el mismo en un cultivo *in Vitro*, ya que se ha demostrado que este presenta actividad bactericida y bacteriostática contra las bacterias encargadas de la producción y desarrollo de la caries dental y enfermedad gingival.

En comparación con otros edulcorantes, los componentes del extracto de Stevia Rebaudiana van a llevar a la disminución de la producción de ácidos bacterianos causando un bajo potencial acidogénico, también disminuyendo la

producción de polímeros insolubles bacterianos y dando un efecto menor en la desmineralización del esmalte.

El extracto de Stevia Rebaudiana mostró un efecto bacteriostático frente a los microorganismos recolectados de la placa dental, lo que conlleva a una disminución de las bacterias encargadas de la producción de la caries dental y enfermedad periodontal, por lo tanto sería ideal el uso diario del extracto de Stevia Rebaudiana para evitar el desarrollo de estas enfermedades.

ABSTRACT

Nowadays there is a great interest about the use of natural antimicrobial compounds, in particular plant extracts that can be used even as antibiotics substitutes. Approximately 20% of the plants around the world have been investigated, exposed to chemical methods, biochemical, pharmacological, clinical and toxicological research. Because of this there has been a great interest in the use of natural antimicrobial compounds from plants, applied in the treatment of diseases that have developed resistance to pathogens.

Stevia Rebaudiana is a plant that has been developed almost universally known for its excellent natural alternative benefits of traditional sugar for patients with restricted consumption, also helping to inhibit the accumulation of fat, lowering blood pressure and other benefits in systemic health and oral health.

This research is aimed to developing the extract from the leaves of *Stevia Rebaudiana*, which have non caloric sweeteners compounds (stevioside and rebaudioside), which will help the growth inhibition of dental biofilm bacterias. The purpose of this study is to evaluate the amount of bacteria that are susceptible to the compounds of the *Stevia Rebaudiana*, applying the extract to the biofilm as it has shown that this presents antimicrobial activity against bacteria that are related in the production and development of caries dental.

Compared with other sweeteners, extract components will decreased bacterial acid production attributed to a low acidogenic potential, also decreasing the production of bacterial and insoluble polymers giving less effect on enamel demineralization.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCION..... | 1 |
| 1.1 Planteamiento del problema. | 1 |
| 1.2 Justificación | 3 |
| 2. MARCO TEÓRICO | 4 |
| 2.1 Definición del biofilm | 4 |
| 2.2 Estadíos de la formación del biofilm..... | 5 |
| 2.2.1 Fase I o primer estadio: | 5 |
| 2.2.2 Fase II o segundo estadio. | 5 |
| 2.2.3 Fase III o estadio tercero. | 6 |
| 2.2.4 Fase IV | 6 |
| 2.3 Características del biofilm. | 7 |
| 2.3.1 Heterogeneidad fisiológica..... | 7 |
| 2.3.2 Fenotipos del biofilm. | 7 |
| 2.3.3 Señales en el biofilm..... | 7 |
| 2.3.4 Capacidad adaptativa | 8 |
| 2.3.5 Resistencia frente antimicrobianos | 8 |
| 2.3.6 Susceptibilidad individual a la enfermedad | 8 |
| 2.3.7 Factores endógenos: respuesta inmunitaria | 9 |
| 2.3.8 Factores exógenos | 9 |
| 2.4 Estrategias fisiológicas para el control de la placa dental | 9 |
| 2.4.1 Control químico del biofilm..... | 10 |
| 3. CARIES DENTAL | 12 |
| 3.1 Introducción | 12 |
| 3.2 Etiología de la caries dental. | 12 |
| 3.3 Microorganismos asociados con la caries dental | 13 |
| 3.3.1 Aerobios..... | 14 |
| 3.3.2 Anaerobios..... | 14 |
| 3.3.3 Aerotolerantes | 14 |
| 3.4 Efectos de los bajos valores del pH | 14 |

| | |
|---|----|
| 4. GINGIVITIS..... | 16 |
| 4.1 Introducción | 16 |
| 4.2 Etiología..... | 16 |
| 4.3 Características clínicas de las enfermedades gingivales | 16 |
| 4.4 Clasificación de la enfermedad gingival | 18 |
| 5. STEVIA REBAUDIANA | 21 |
| 5.1 Historia de la Stevia Rebaudiana..... | 21 |
| 5.2 Descripción de la Stevia. | 21 |
| 5.3 Beneficios del consumo de la Stevia Rebaudiana | 22 |
| 5.4 Componentes | 23 |
| 5.5 Productos que se obtienen de la planta. | 23 |
| 5.5.1 Hojas frescas | 23 |
| 5.5.2 Hojas secas | 24 |
| 5.5.3 Extractos sólidos..... | 24 |
| 5.5.4 Líquido concentrado..... | 24 |
| 5.6 Usos en odontología..... | 25 |
| 5.7 Acción de la Stevia en la caries dental..... | 25 |
| 5.8 Principales ventajas. | 26 |
| 5.9 Contraindicaciones y efectos secundarios. | 26 |
| 6. OBJETIVOS. | 27 |
| 6.1 Objetivo general..... | 27 |
| 6.2 Objetivos específicos..... | 27 |
| 6.3 Hipótesis..... | 27 |
| 7. METODOLOGÍA..... | 28 |
| 7.1 Tipo de estudio. | 28 |
| 7.2 Población y muestra | 28 |
| 7.2.1 Población..... | 28 |
| 7.2.2 Muestra..... | 28 |
| 7.2.3 Criterios de inclusión..... | 29 |

| | |
|---|-----------|
| 7.2.4 Criterios de exclusión..... | 29 |
| 7.2.5 Determinación de la muestra | 29 |
| 7.2.6 Procedimientos experimentales | 29 |
| 7.2.7 Operacionalización de variables | 30 |
| 8. MATERIALES Y METODOS | 31 |
| 8.1 Materiales | 31 |
| 8.2 Métodos | 32 |
| 8.2.1 Recolección de la materia prima..... | 32 |
| 8.2.2 Molido | 32 |
| 8.2.3 Tamizado..... | 33 |
| Figura 5. Resultado del tamizado | 34 |
| 8.2.4 Extracción | 34 |
| Figura 6. Extracción..... | 35 |
| 8.2.5 Filtrado..... | 35 |
| 8.3 Toma de la muestra | 36 |
| 8.3.1 Procedimiento..... | 37 |
| 8.3.2 Método de macro dilución..... | 39 |
| 8.3.3 Preparacion de la suspensión..... | 40 |
| 9. RESULTADOS..... | 43 |
| 9.1 Antes de las 24 horas | 43 |
| 9.2 Resultados con Stevia Rebaudiana | 45 |
| 10. DISCUSIÓN..... | 47 |
| 11. CONCLUSIONES..... | 50 |
| 12. RECOMENDACIONES..... | 51 |
| 13. REFERENCIAS | 52 |
| 14. ANEXOS: | 57 |

1. INTRODUCCION

1.1 Planteamiento del problema.

Recientes investigaciones han determinado que las enfermedades de la cavidad oral pueden causar diversas alteraciones en el organismo presentando bacterias que pueden contribuir al riesgo de ataques cardíacos, accidentes cerebro vasculares, enfermedades pulmonares y pueden estar asociados con el parto prematuro en algunas mujeres (Wu, 2012). Las enfermedades más prevalentes como la caries dental y la enfermedad periodontal, pueden prevenirse mediante la inhibición directa a los patógenos causantes de estas enfermedades, o también interfiriendo en los factores ambientales que promueven al crecimiento de los mismos (Luyo, 2014).

Las plantas pueden producir una gran cantidad de moléculas bioactivas, las mismas que se pueden tomar como fuente para diferentes tipos de medicamentos (Mohammadi, Karbasizadeh, Aghai, Reza. 2012). Diversos estudios se han dedicado a la búsqueda de sustancias antimicrobianas teniendo como fuente las diferentes estructuras de las plantas medicinales como la raíz, tallo, hojas, semillas y flores (Malik, Hussain, Mirza, Hameed, Sahmad, Riaz, Akhtar Shah, Usmanghani, 2011).

Por ende se ha incrementado el uso de compuestos naturales antimicrobianos en la sociedad especialmente extraídos de plantas, para la conservación de alimentos, medicamentos y otros productos que nos sirven para la prevención de enfermedades y promoción de la salud, como por ejemplo la Stevia Rebaudiana, que es una fuente alternativa natural del azúcar tradicional (Wu, 2012).

La Stevia Rebaudiana también conocida como "hierba dulce" es de 200 a 300 veces más dulce que la sacarosa por lo que es utilizada como edulcorante dietético natural, presenta sustancias nutricionales como austroinullin, β -

caroteno, dulcósido, niacina, óxidos rebaudi, riboflavina, steviol, esteviósido y tiamina que afectan a la flora microbiana de la boca, impidiendo su crecimiento e incluso evitando que se dé la aparición de caries dental (Mohammadi, Karbasizadeh, Aghai, Reza, 2012). Entre otros glucósidos diterpénicos de los componentes está el esteviósido y rebaudiósido A, que son los glucósidos más importantes de la Stevia y ninguno es cariogénico, según los estudios *in Vitro* se ha demostrado que presentan su actividad bacteriana sobre el *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* y *Lactobacillus acidophilus* que son los principales microorganismos para la aparición de la caries dental (Contreras, 2013). El consumo diario de estos componentes ha ido creciendo en la sociedad por su alto poder endulzante y baja toxicidad; al esteviósido también se ha atribuido un poder antihipertensivo, entre otros beneficios (Jiménez, Cabrera, Álvarez, Gómez, 2010).

Se ha demostrado que los microorganismos Gram positivos son más sensibles a los extractos de las hojas de Stevia Rebaudiana ya que estos presentan diferencias de organización de la pared celular, en donde los extractos pueden penetrar fácilmente las bacterias causando daño en la pared de la misma (Gamboa, Chávez, 2012)

1.2 Justificación

Dar a conocer a nivel odontológico los beneficios medicinales que presenta el extracto de la planta Stevia Rebaudiana, ya que es preferible y recomendable el uso de productos naturales para tratar diferentes patologías. Es por este motivo que he puesto interés en este tema, ya que la población no conoce los diferentes beneficios del uso de Stevia Rebaudiana cuando reemplaza a la azúcar refinada ya que además de presentar propiedades preventivas, tiene también el beneficio de no producir ningún efecto adverso.

La elaboración del extracto de Stevia Rebaudiana nos ayudará al tratamiento de enfermedades orales en donde su etiología sea la placa bacteriana y de esta manera nos ayudará a disminuir el índice de caries dental gracias al efecto antimicrobiano contra el *Streptococcus mutans* que es la principal bacteria en el desarrollo de la caries.

Así, también se puede incentivar a la gente para sacar provecho de los grandes beneficios que presenta esta planta, luego poderla incorporar en colutorios, dentífricos, gotas para aplicación tópica, etc. y así lograremos que la evolución del tratamiento contra las enfermedades producidas por la acumulación de placa sea notoria.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Definición del biofilm

El biofilm se define como una comunidad microbiana que se encuentra en la superficie dental, la formación involucra una interacción entre bacterias colonizadoras primarias y la película adquirida del esmalte (Luyo, 2014). Está compuesto por bacterias de 15% -20% del volumen y una matriz o glicocálix que representa 75% – 80%, la matriz está compuesta por una mezcla de exopolisacáridos, proteínas, sales minerales y material celular. Los exopolisacáridos pueden tener una carga neutra o carga polianiónica, lo que le permite interactuar con distintos antimicrobianos, de modo que puedan quedar atrapados en la matriz sin poder actuar sobre las bacterias. La composición química y la estructura terciaria de los exopolisacáridos determinan la capacidad de adhesión de los mismos y también favorece la adhesión de las bacterias a las superficies (Serrano, Herrera, 2005).

Los biofilms se describen como una colección de microorganismos rodeados por sus productos de secreción, que están asociados con una superficie y embebidos en una matriz de polisacáridos extracelulares (Viviani, 2008). Se va a encontrar en todo lugar asociado con la humedad, en la cavidad oral están localizadas en los dientes, la lengua, mucosa oral, paladar duro, lesiones cariosas, sacos periodontales, etc. (Huang, Gregory, 2011).

La mayoría de investigaciones se han centrado solo en bacterias patógenas, dando así una imagen que las bacterias son enemigas del cuerpo, pero la mayor parte de microflora beneficia nuestra salud en general, e incluso existen componentes esenciales para nuestra salud (Huang, Gregory, 2011). Sin embargo la microflora de todas las partes del cuerpo contribuye para el desarrollo normal de la fisiología como también para las defensas del huésped (Marsh, 2006). Las bacterias pueden contribuir a la enfermedad por la acción directa de las toxinas, enzimas y productos metabólicos, luego afectarán a la

composición local de la microbiota favoreciendo el crecimiento de bacterias patogénicas o no patogénicas (Contreras, 1992).

2.2 Estadíos de la formación del biofilm.

2.2.1 Fase I o primer estadío:

Los rastros orgánicos son las primeras sustancias asociadas con la superficie limpia del diente antes de las bacterias, una vez que existe contacto con agua se forma una capa condicionada, que ayudará a evitar que la célula bacteriana se aproxime lo suficientemente cerca para iniciar la adhesión (Viviani, 2008). La biopelícula en esta fase está formada por glicoproteínas y anticuerpos y tiene la función de modificar la carga y la energía libre de la superficie del diente (Serrano, Herrera, 2005)

Las películas operan como una barrera de protección y lubricación de la superficie, si es eliminada por instrumentación mecánica, ésta se volverá a formar en minutos, comienza a adsorberse en la superficie y vuelve a formar la película condicionante. Algunas bacterias muestran la capacidad de desarrollar estructuras de superficie que favorecen la adhesión de las mismas hacia una superficie sólida, como las fimbrias y fibrillas (Serrano, Herrera, 2005). Otras bacterias requieren una exposición prolongada para lograr unirse con firmeza (Guerra, Carlos 2011).

2.2.2 Fase II o segundo estadío.

La adhesión tiene un papel muy importante para la colonización bacteriana, las proporciones finales de una especie dentro de la placa dental, dependerá en última instancia de la capacidad de los organismos para poder crecer y competir de otras células vecinas (Marsh, 2006). En esta fase se observa la adhesión de un determinado grupo de bacterias hacia la película previamente formada (Serrano, Herrera. 2005). La adhesión inicial está basada en fuerzas

físicas y de atracción electrostática y no por uniones químicas, algunas bacterias planctónicas se aproximarán a la superficie condicionada y se ubicarán en una capa divisoria, estas células comenzarán a prepararse para una larga permanencia formando estructuras que se pueden adherir a la superficie (Viviani, 2008).

2.2.3 Fase III o estadio tercero.

Esta fase se caracteriza por la multiplicación bacteriana donde van a predominar las formas filamentosas Gram positivas en especial el *Actinomyces spp* (Serrano, Herrera. 2005). En esta fase se disminuye la velocidad de crecimiento de las bacterias y empieza la incorporación de otros microorganismos como *Prevotella intermedia*, *P. Loescheii*, *Capnocytophaga spp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Veillonella* y *Porphyromonas gingivalis*. (Guerra, Carlos 2011)

Los colonizadores primarios del biofilm excretan sustancias poliméricas extracelulares o polímeros pegajosos, los cuales unirán el biofilm con el cemento de la superficie condicionada. Aparte los polímeros atrapan escasas sustancias nutritivas y protegerán a las bacterias de los agentes antimicrobianos al mismo tiempo que acumulan nutrientes, haciendo que la célula pionera empiece a reproducirse. (Viviani, 2008)

2.2.4 Fase IV

Después de la multiplicación celular en la fase anterior y con la aparición de nuevas condiciones, empieza la congregación de nuevas especies bacterianas, por ejemplo *Veillonella spp.*, *Fusobacterium nucleatum* y otras bacterias Gram negativas (Serrano, Herrera, 2005). La placa dental con el tiempo, será una estructura organizada espacialmente con organismos que presentan funciones definidas, debido a sus propiedades físicas y biológicas del lugar donde se van a encontrar (Luyo, 2014).

2.3 Características del biofilm.

2.3.1 Heterogeneidad fisiológica.

En el biofilm se observa un amplio rango de micro nichos, que se encuentran separados por mínimas distancias. También podemos encontrar diferentes ambientes en cuanto al contenido de nutrientes que se encuentran en el medio, tensión de O₂, tensión de CO₂, pH; de esta manera las especies bacterianas presentan estados fisiológicos diferentes, como también diferentes necesidades fisiológicas (anaerobias, aerobias, microaerobias) (Serrano, Herrera, 2005).

2.3.2 Fenotipos del biofilm.

Una de las características que presentan las bacterias cuando crecen en el biofilm es que lo hacen de forma sésil, manifestándose de forma planctónica. Estos fenotipos son más resistentes frente a diversos antimicrobianos, los cuales mantienen su resistencia incluso cuando se desprenden del biofilm (Vázquez, 2011).

2.3.3 Señales en el biofilm.

Entre la capacidad de comunicarse por señales químicas, es de gran importancia el fenómeno de "Quorum Sensing" o también llamada como regulación de la expresión de los genes, que proporciona al biofilm algunas propiedades características en cuanto al desarrollo de los mismos y la mayor resistencia frente a los antimicrobianos, también tienen la capacidad de influir en la estructura del biofilm estimulando al crecimiento de bacterias beneficiosas para el biofilm e inhibiendo el crecimiento de las especies competidoras (Vázquez, 2011).

2.3.4 Capacidad adaptativa

El equilibrio es esencial para el crecimiento en condiciones favorables de aporte de nutrientes y del medio ambiente del biofilm para que de esta manera se mantenga la estructura del mismo (Serrano, Herrera, 2006). Si las condiciones son desfavorables, se puede llegar a involucionar a estadíos anteriores, pero en la mayoría de situaciones se mantiene parte del mismo unido a la superficie. Las bacterias presentan un metabolismo más eficiente que de forma planctónica, desarrollando la capacidad de degradar moléculas complejas cuando crecen en forma de un biofilm (Vázquez, 2011).

2.3.5 Resistencia frente antimicrobianos

Es muy importante tomar en cuenta que la resistencia de las bacterias a los antibióticos está afectada por su estado nutricional, la tasa de crecimiento, la temperatura, el pH y la exposición previa a dosis subletales del agente antibiótico, ciertas enzimas suponen la ineficacia de ciertos antibióticos, como las B-lactamasas, formaldehído, deshidrogenasa (Zambrano, 2006). Las bacterias que presentan mayor resistencia frente a los distintos antimicrobianos tienen como característica crecer de forma sésil, por ende se está desarrollando nuevas investigaciones en modelos de boca artificial, de manera que se pueda comprobar la eficacia de los antimicrobianos frente a los biofilms (Serrano, Herrera, 2005).

2.3.6 Susceptibilidad individual a la enfermedad

La especie patógena puede colonizar al huésped y este puede no manifestar características clínicas de la enfermedad durante un periodo de tiempo determinado, esto indica que el progreso de la enfermedad depende de la incidencia de una gran cantidad de factores que pueden ser endógenos o también llamados propios del huésped y los factores exógenos o factores

ambientales (Matesanz, Figuro, Jiménez, Aguilar, Llor, Prieto, Bascones, 2005).

2.3.7 Factores endógenos: respuesta inmunitaria

Los primeros encargados de parar el avance bacteriano son los neutrófilos, macrófagos y el sistema del complemento.

Estos inician la respuesta inmunitaria que después dará la producción de citocinas inflamatorias y otros mediadores químicos que desempeñan la respuesta inflamatoria clásica, sin embargo estas reacciones defensivas son perjudiciales al propio huésped ya que la inflamación puede dañar a los tejidos circundantes que incluso pueden extenderse al tejido conectivo dañando al hueso alveolar (Matesanz, Figuro, Jiménez, Aguilar, Llor, Prieto, Bascones, 2005).

2.3.8 Factores exógenos

Estos factores son ajenos a la biología humana que están en la capacidad de cambiar la respuesta natural ante las bacterias que son las causantes de la enfermedad (Matesanz, Figuro, Jiménez, Aguilar, Llor, Prieto, Bascones, 2005). Estas especies causan daño en el tejido periodontal y todas sus estructuras, entre los más comunes tenemos la higiene bucal, tabaquismo, causas medicamentosas y las iatrogenias causada por el odontólogo, además la mala oclusión, la nutrición del paciente, prótesis mal adaptadas, entre otras; son causas de enfermedad periodontal (León, 2013).

2.4 Estrategias fisiológicas para el control de la placa dental

La acumulación de la placa dental se origina por los cambios medioambientales del hábitat microbiano, donde podría prevenirse no solo atacando a los agentes

patógenos sino también interfiriendo con los factores responsables de su crecimiento (Luyo, 2014).

Se puede realizar tratamientos para cambiar el medio ambiente bacteriano para evitar el desarrollo del biofilm y mediante un control de placa supragingival se producirá un cambio en las condiciones ambientales subgingivales, lo que dificulta al desarrollo del biofilm bacterianos (Serrano, Herrera, 2005).

2.4.1 Control químico del biofilm

Los agentes químicos se caracterizan por el control de la placa bacteriana, ya que tienen la capacidad de reducir o retardar su formación, algunos interfiriendo la absorción de la película adquirida y otros interfiriendo con la adherencia de las bacterias en la superficie dentaria (Plat, Machado, 2004).

Tabla 1. Control del biofilm.

| | | |
|------------------|--|--|
| Alimentación | El crecimiento de la placa dental se debe a la presencia de los carbohidratos, en especial la sacarosa. | |
| Control mecánico | La cavidad oral presenta fácil acceso para eliminar el biofilm bacterianos por medios físicos. | <p>A nivel supragingival.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Profilaxis dental. • Técnicas de cepillado. <p>A nivel subgingival:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Raspado y alisado radicular. • Cirugía periodontal |
| Control químico | Se caracterizan por el control de la placa bacteriana, por tener la capacidad de reducir o retardar su formación, algunos interfiriendo en | <ul style="list-style-type: none"> • Amonio cuaternario. • Enzimas • Aceites esenciales y fenoles • Triclosan |

| | | |
|--|---|---|
| | la absorción de la película adquirida y otros interfiriendo con la adherencia de las bacterias en la superficie dentaria (Plat, Machado. 2004). | Productos naturales: <ul style="list-style-type: none">• Sanguinarina• Fluoruros• Hexetidina• Clorhexidina |
|--|---|---|

3. CARIES DENTAL

3.1 Introducción

Aproximadamente del 95% al 99% de la población en el mundo presenta caries dental, situándola como la principal causa de pérdida de piezas dentales, ya que de cada 10 personas, 9 presentan la enfermedad o las secuelas de ésta (Duque de Estrada, Rodríguez, Coutin, Riveron, 2003). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se define a la caries dental como un proceso localizado de origen multifactorial, que se inicia después de la erupción de las piezas temporales, lo que determina un reblandecimiento del tejido duro del diente y que evoluciona hasta la formación de una cavidad (Polomer, 2006).

Las bacterias cariogénicas son un pre-requisito para la formación de caries y estas aparecen por la presencia de sacarosa (Duque de Estrada, Pérez, Hidalgo, 2006). Este proceso ocurre en la superficie dentaria en contacto con los depósitos microbianos ya que ocurre un desequilibrio entre la superficie dental y el fluido de la placa bacteriana circundante, trayendo como consecuencia la pérdida de mineral de la superficie dental, provocando la destrucción localizada de tejidos duros (Núñez, García, 2010).

3.2 Etiología de la caries dental.

Cada microambiente dentro de la cavidad oral y de las superficies dentarias alberga una flora única. Existe un gran número de bacterias que se encuentran en la cavidad oral, entre el género *Streptococcus* básicamente las especies *mutans*, *sanguis*, *sobrinus* y *crictus*, están asociados con la caries dental, pero se ha demostrado que el principal es el grupo *mutans*, que se ha implicado como el más importante y virulento patógeno asociado con lesiones cariosas humanas ya que es el primero en colonizar la superficie dental, incluso después de la erupción dentaria (Pérez, Duque de Estrada, Hidalgo, 2007). Los microorganismos van a producir ácido suficiente para descalcificar la estructura

de las piezas dentales y es esencial para el proceso carioso. Además existen microorganismos que tienen menor importancia en la caries dental como el *Lactobacillus*, *Actinomyces* y otros *Streptococcus* (Polomer, 2006).

Para su desarrollo intervienen conjuntamente 4 factores importantes:

1. *Características del huésped*: La susceptibilidad del diente, composición y la cantidad de saliva.
2. *Dieta favorecedora*: consumo de carbohidratos.
3. *Presencia de microorganismos cariogénicos*: los más importantes *Streptococcus mutans*, *Lactobacilos*, *Actinomyces*.
4. *Tiempo*: indispensable para que los microorganismos actúen (Rubio, Cueto, Suárez, Frieyro, 2006)

Estos factores de riesgo no actúan aisladamente, sino interrelacionadamente lo que fortalece su efecto nocivo para la salud. Es importante señalar que la inespecificidad de los factores para que se lleve a cabo las enfermedades o la clase de enfermedades requiere la utilización de la concepción de factores de riesgo (Duque de Estrada, Rodríguez, Coutin, Riveron, 2003).

3.3 Microorganismos asociados con la caries dental

La caries sigue un proceso, del cual se da una transmisión de bacterias donde encontramos, bacterias anaerobias facultativas Gram positivas que predominan en las etapas iniciales de la lesión cariosa, bacterias anaerobias estrictas Gram positivas y Gram negativas que predominan en lesiones cariosas más avanzadas (Figuroa, Alonso, Acevedo, 2008). Para abordar este tema debemos tener una idea general de la clasificación de los microorganismos, entre estos tenemos:

3.3.1 Aerobios

Son microorganismos que tienen la capacidad de vivir en presencia de oxígeno, que lo utilizan como aceptor final de los electrones (Mena, 2011). Estas bacterias han desarrollado una serie de receptores específicos que les permite el anclaje a las diferentes estructuras de la cavidad oral (Prieto, Calvo, 2004).

3.3.2 Anaerobios

Son gérmenes que pueden desarrollarse en medios con ausencia de oxígeno y bajo condiciones de potenciales redox muy reducidos, estas mueren cuando son expuestas al oxígeno molecular libre en la atmósfera (Rivas, Mota, 2006). Presentan condiciones que favorecen a las existencias de los microorganismos en la cavidad oral ya que poseen una serie de adaptación en el medio bucal. (Prieto, Calvo, 2004).

3.3.3 Aerotolerantes

Estos microorganismos no utilizan oxígeno, sin embargo no son perjudicados por él y también pueden seguir su crecimiento en su presencia (Mena, 2011).

3.4 Efectos de los bajos valores del pH

Un factor muy importante del cual depende la caries dental es el pH, ya que la disminución de éste en la biopelícula, permite la selección y la proliferación de bacterias que inducen a la formación de la caries dental (Vilchis, Castillo, Clavel, 2013). En los primeros minutos existe un descenso del pH que va decreciendo gradualmente, sin embargo se plantea que a los 30 minutos debe retornar a sus niveles normales, pero esto depende de las concentraciones de bicarbonato ya que el incremento de este resulta en un incremento del pH (Duque de Estrada, Pérez, Hidalgo, 2006).

Para prevenir los procesos cariogénicos, es importante reforzar la estructura del esmalte dental mediante la aplicación tópica de flúor de sodio en gel, este procedimiento puede ser utilizado desde los 3 años hasta los 13 años y esta aplicación se debe realizar cada seis meses (Jiménez, 2001).

4. GINGIVITIS

4.1 Introducción

La enfermedad gingival ocupa un segundo lugar en problemas de la salud bucal, esta es la causa más común de la enfermedad periodontal, donde ya existe una afectación de los tejidos que soportan al diente (Pérez, Rodríguez, Pérez, Rodríguez, & Paneque, 2009). Las enfermedades gingivales son el resultado de diferentes patologías que se encuentran relacionadas con la encía, sin embargo esta enfermedad no afecta a la inserción ni al resto del periodonto. La gingivitis puede detectarse en un 50% de los individuos mayores de 19 años y en especial en pacientes varones y aunque las diferencias entre las diferentes etnias son pequeñas, la enfermedad gingival es más relevante entre sujetos caucásicos (Matesanz, Matos, Bascones, 2008).

4.2 Etiología

La etiología es compleja, existen factores locales y sistémicos, sin embargo el principal agente principal son los microorganismos bacterianos de la placa bacteriana que colonizan las superficies blandas de la cavidad oral (Fajardo, 2015). Existen pruebas donde los microorganismos de la placa dental en la zona gingival y en la bolsa periodontal que junto a sustancias propias derivadas son el factor primario y posiblemente el único en la enfermedad gingival, ya que después de 20 minutos de la acumulación de alimentos existe la mayor actividad bacteriana (Pérez, Rodríguez, Pérez & Paneque, 2009).

4.3 Características clínicas de las enfermedades gingivales

Clínicamente se puede observar una encía inflamada, donde su contorno es alargado a la existencia de un edema o fibrosis de coloración roja o azulada, la temperatura del sulcular se encuentra elevada, además de presentar sangrado al sondaje y un incremento de sangrado gingival. Todos estos signos se

pueden apreciar mediante inspección visual, sin embargo es necesaria una inspección con sonda periodontal para que estimule el sangrado y así detectar la inflamación de las bolsas gingivales (Matesanz, Matos, Bascones, 2008).

4.4 Clasificación de la enfermedad gingival

Tabla 2. Clasificación de la gingivitis

| | | | |
|---------------------------------|--|---|---|
| Inducidas por placa bacteriana. | Enfermedades gingivales modificadas por factores sistémicos. | <i>Asociadas con el sistema endocrino</i> | Gingivitis asociada a la pubertad. |
| | | | Gingivitis asociada al ciclo menstrual. |
| | | | Asociada al embarazo. |
| | | | Gingivitis asociada a Diabetes mellitus. |
| | | | Gingivitis asociada a la leucemia. |
| | | | Otras |
| | Enfermedades gingivales modificadas por medicamentos | <i>Asociadas a discrasias sanguíneas.</i> | Agrandamientos gingivales influidos por drogas. |
| | | | Gingivitis influidas por drogas. |
| | Enfermedades gingivales de origen viral. | <i>Inducidas por drogas.</i> | Gingivitis asociadas a contraceptivos orales |
| | | | Otras |
| | Enfermedades gingivales de origen fúngico. | <i>Infecciones por herpes virus</i> | Gingivoestomatitis herpética primaria. |
| | | | Herpes oral recidivante |
| | | | Infecciones por varicela zóster. |

| | | | |
|-----------------------------------|---|---|--|
| | | | Otras |
| | | <i>Infecciones por Cándida.</i> | |
| | | <i>Eritema Gingival Lineal.</i> | |
| | | <i>Histoplasmosis.</i> | |
| | | <i>Otras.</i> | |
| No inducidas por placa bacteriana | Enfermedades gingivales de origen bacteriano específico | <i>Lesiones asociadas a Neisseria gonorrhoea.</i> | |
| | | <i>Lesiones asociadas a Treponema pallidum.</i> | |
| | | <i>Lesiones asociadas a Streptococcus</i> | |
| | | <i>Otras</i> | |
| | Enfermedades gingivales de origen viral | <i>Infecciones por herpes virus</i> | Gingivoestomatitis herpética primaria. |
| | | | Herpes oral recidivante. |
| | | | Infecciones por varicela zóster. |
| | | | Otras |
| | Lesiones gingivales de origen genético | <i>Fibromatosis gingival hereditaria</i> | |

El resultado de estos factores de riesgo depende del grado de susceptibilidad del individuo para contraer la enfermedad o para que la salud presente diferentes alteraciones. Sin embargo se puede prevenir la enfermedad gingival con una buena higiene oral, un correcto cepillado de dientes de 3 veces diarias y la correcta utilización de seda dental, además de utilizar cremas dentales antiplaca para evitar la acumulación de la misma que se da a partir de los 20 minutos de la ingestión de alimentos (Fajardo, 2015).

5. STEVIA REBAUDIANA

5.1 Historia de la Stevia Rebaudiana

La Stevia Rebaudiana fue originada en las zonas altas del noreste de Paraguay con la frontera de Brasil, los indios guaraníes la llamaban hierba dulce ya que la utilizaban como edulcorante para su té de hierbas verdes (Yadav, Singh, Dhyani, Ahuja, 2010). Se estima que aproximadamente existen más de 80 especies de Stevia que crecen en el continente americano, sin embargo solo Stevia Rebaudiana y otras especies extintas poseen esta característica endulzante, que se encuentra concentrada en sus hojas (Contreras, 2013).

Las hojas de Stevia son de un sabor a regaliz agradable y contienen glucósidos de diterpeno, esteviósido y el rebaudiósido, es 300 veces más dulce que el azúcar normal, sin embargo es recomendado para pacientes con diabetes, pacientes con hipoglucemia, hipertensión arterial, obesidad e infecciones crónicas ya que no presenta efectos secundarios (Debnath, 2008).

5.2 Descripción de la Stevia Rebaudiana.

Martínez (2000) describe a la planta de la siguiente manera, sus hojas son lanceoladas, festoneadas, opuestas en vericilos alternos sésiles, su anchura se encuentra a la mitad de la parte superior de la hoja, puede alcanzar los 80 cm de altura, su tallo se ramifica formando múltiples brotes que tienden a inclinarse. Tiene una raíz perenne, fibrosa, filiforme, abundante y formando cepa y sus frutos son un típico de la familia de las compuestas con aquenio delgado y plumoso en el extremo.

5.3 Beneficios del consumo de la Stevia Rebaudiana

Tabla 3. Beneficios de la Stevia Rebaudiana.

| | |
|------------------|---|
| Diabetes | Mejoran los niveles de tolerancia a la glucosa lo cual sirve de mucha ayuda para los pacientes diabéticos ya que no presentan efectos secundarios a diferencia de otros edulcorantes sintéticos. (Martínez, 2002). El esteviósido mejora la secreción y la sensibilidad a la insulina y existe reducción de la reabsorción tubular renal de la glucosa (Contreras 2013). |
| Pérdida de peso | Se realizaron estudios evaluando el efecto de la Stevia que indicaron una saciedad hasta la siguiente comida, además presentaron una reducción de los niveles de glucosa plasmática e insulina, dando como resultado la regulación de glucosa (Durán, Rodríguez, Cordón, Record, 2012). |
| Hipertensión | Presenta un efecto vasodilatador, diurético y cardiotónico por lo que controla la presión arterial sin embargo se necesita una ingesta en cantidades mayores del rango normal (Martínez, 2002). |
| Renal | Demostraron que el esteviósido y esteviol inducen a la diuresis y natriuresis, sin presentar cambios en la tasa de filtración glomerular o el flujo plasmático renal (Durán, Rodríguez, Cordón, Record, 2012). |
| Antibacteriano | Tiene una actividad antibiótica, en especial con los microorganismos de la mucosa oral y los hongos que producen la vaginitis en la mujer (Martínez, 2002). Los extractos de las hojas de Stevia en solventes como agua, metanol, acetato de etilo y hexano. Han encontrado actividad inhibidora <i>in Vitro</i> contra cuatro células Gram positivas (<i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>M. luteus</i> , <i>B. megaterium</i>), cuatro Gram negativas (<i>S.P aeruginosa</i> , <i>marcensesn</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. vulgaris</i>) y hongos como <i>R. oligosporus</i> y <i>A. niger</i> (Contreras, 2013). |
| Cicatrizante | En lugares donde existen cortes y rasguños se ha demostrado que con unas pocas gotas se puede sanar rápidamente, elastificando la piel (Contreras, 2013) |
| Otros beneficios | Contrarresta la fatiga, facilita la digestión y las funciones gastrointestinales, ayuda al hígado, páncreas y el bazo (Martínez, 2002) |

| | |
|--|---|
| | <p>Sirve también para eliminar manchas de piel y acné (Contreras, 2013).</p> <p>En el cerebro y el nivel psicológico disminuye el deseo de comer grasas y dulces y reduce el deseo de consumir alcohol y tabaco (Contreras, 2013).</p> <p>Presenta características físico químicas y toxicológicas que permite agregar a la dieta humana como un edulcorante dietético natural, sin presentar efectos adversos (Henaó, Trujillo, 2007)</p> <p>Mejora la defensa antioxidante en el tejido adiposo, y entre el tejido y la pared vascular evita el desarrollo de la placa arteriosclerótica (Contreras, 2013).</p> |
|--|---|

5.4 Componentes

Entre los componentes de la Stevia Rebaudiana tenemos al austroinullin, β -caroteno, dulcósido, niacina, óxidos rebaudi, riboflavina, steviol, esteviósido y tiamina que afectan a la flora microbiana de la boca, impidiendo su crecimiento e incluso evitando que se dé la aparición de caries dental, las hojas también contienen una alta cantidad de agua (80 a 85%) (Mohammadi, Karbasizadeh, Aghai, Reza, 2012). Además químicamente hablando esta planta contiene aluminio, calcio, cinc, cobalto, cromo, fósforo, hierro, magnesio, manganeso, potasio, selenio, silicio, sodio, ácido ascórbico, tiamina y proteínas (Martinez, 2000). De todos estos componentes el más importante en este estudio es el esteviósido.

5.5 Productos que se obtienen de la planta.

5.5.1 Hojas frescas

Esta es la forma de consumo más natural, una hoja fresca masticada nos da una sensación de dulzor muy acusada, dejando un fuerte sabor similar al del regaliz y al final con un amargor residual. De esta manera la hoja puede ser

utilizada como té, o también como edulcorante, para esto se debe realizar un proceso de secado ya que el sabor dulce se concentra más pero también los sabores residuales (Martínez, 2000).

5.5.2 Hojas secas

El proceso de secar las hojas hace que el sabor dulce de la hoja aumente, esto también puede suceder cuando se las hace polvo moliéndolas, que puede ser utilizada en una amplia variedad de alimentos y bebidas, como arroz con leche, zumos, mermeladas, roscos ritos, etc. (Martínez, 2000).

5.5.3 Extractos sólidos.

Se trata de un extracto pulverizado blanco, es la forma más común de todos los edulcorantes. Presenta un dulzor fuerte por lo que su utilización debe ser con moderación y sumo cuidado ya que es de 250 y 400 veces más dulce que el azúcar de remolacha (Martínez, 2000).

5.5.4 Líquido concentrado

Puede darse al hervir las hojas de Stevia en agua, de la cual potencia los sabores de los alimentos que lo añadamos. Puede ser de consumo humano a través del macerado de las hojas de Stevia en agua destilada o en la mezcla de licor alcohólico. La purificación del extracto de agua y deshidratación por evaporación es uno de los métodos que se utiliza para conseguir el extracto acuoso natural de la Stevia, ya que es totalmente natural el cual va a producir un cristal blanco puro (Martínez, 2000).

5.6 Usos en odontología

La *Stevia Rebaudiana* tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de ciertas bacterias lo que ayuda a explicar el uso tradicional en el tratamiento de heridas, llagas y gingivitis, además esto contribuye su efecto antiplaca y antiinflamatoria. El extracto de *Stevia* mostró la inhibición del crecimiento por *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*, después de dos días la inhibición de halos se formaron con una media de 14,5 mm con *Streptococcus mutans* y 15,5 mm de *Lactobacillus acidophilus* a una concentración de 50 mg/ml, la diferencia que existe con otros disolventes es que fue necesario aumentar las concentraciones (Contreras 2013). En otro estudio *in Vivo* se encontró que el edulcorante esteviósido comercial que contenga lactosa ha promovido la formación de biofilm dental, como también la acidogenicidad que es similar a la solución de sacarosa al 18%, a pesar de las diferencias en los valores mínimos de pH en los cuales encontramos que el esteviósido se va a encontrar en niveles más bajos que azúcares con lactosa (Giong, Mua, Parolo, Carlén, Maltz, 2014).

Los ácidos que producen estas bacterias son los responsables de la desmineralización dental en el proceso de la caries, sin embargo se ha comprobado que el *Streptococcus mutans* genera una menor producción de ácido en un medio que contiene esteviósido en comparación con los que se cultivan sacarosa, glucosa o fructosa, ya que el esteviósido tiene efecto sobre las enzimas que son responsables de la descomposición de azúcares (Contreras, 2013).

5.7 Acción de la *Stevia* en la caries dental.

Se cree que el sustituto de la sacarosa ha contribuido en la reducción de caries dental en los países industrializados pero estudios demuestran que es insuficiente. Para esto se realizó un estudio en ratas que fueron alimentadas con una dieta que contenía 0,5% de esteviósido o 0,5% de rebaudiósido, de los

cuales no se mostró un potencial del aumento en el riesgo del desarrollo de la caries dental (Contreras, 2013). Desde 1990 se ha venido estudiando al esteviósido, tratando su compatibilidad con el fluoruro para inhibir el crecimiento de la placa bacteriana en relación con la reducción de la caries dental, de los cuales todos los resultados han sido favorables para el mantenimiento de la salud oral. Sin embargo recientes estudios también han demostrado que interviene en el crecimiento y reproducción de algunas bacterias que están involucradas en el proceso inicial de la caries dental y de las enfermedades gingivales (Martínez, 2000).

Martínez (2000) menciona que el esteviósido es un elemento potencial anticaries de los más poderosos, que unido a su alto poder edulcorante puede formar parte en las composiciones de los productos que se usan para el cuidado de la salud oral.

5.8 Principales ventajas.

- El esteviósido no presenta ninguna caloría.
- Solo se utiliza una mínima cantidad de hojas de las cuales se las puede utilizar en su estado natural.
- No tiene toxicidad la planta.
- No se fermenta.
- Es una planta estable que resiste hasta los 200°.
- Potente sabor (Martínez, 2000).

5.9 Contraindicaciones y efectos secundarios.

Varias investigaciones han demostrado que el extracto purificado de la hoja de Stevia es seguro para embarazadas, niños y adultos; e incluso niños que padecen diabetes, sin presentar ningún efecto secundario negativo (Salvador, Sotelo, Paucar, 2014)

6. OBJETIVOS.

6.1 Objetivo general.

Elaborar el extracto de las hojas de Stevia Rebaudiana utilizando etanol al 75% mediante una técnica casera y comprobar su efectividad en 24 horas frente a las bacterias que se cultivaron de la placa bacteriana.

6.2 Objetivos específicos.

- Identificar las bacterias que más predominan en las muestras de placa dental.
- Determinar qué efecto antimicrobiano tiene el extracto de Stevia Rebaudiana en las bacterias identificadas de las muestras de placa dental.
- Identificar las bacterias que más prevalencia tienen en las muestras de la placa dental.

6.3 Hipótesis.

El extracto casero de Stevia Rebaudiana presenta actividad bacteriostática frente a las bacterias que se encuentran en la cavidad oral.

7. METODOLOGÍA.

7.1 Tipo de estudio.

Este estudio es clínico experimental ya que evaluamos la efectividad antimicrobiana de la Stevia Rebaudiana durante las siguientes 24 horas de colocar el extracto de la planta, en las bacterias encontradas en el cultivo de la placa bacteriana de las muestras que se tomaron a pacientes que presentaron un porcentaje mayor al 10% en el índice de placa dental.

7.2 Población y muestra

7.2.1 Población.

El universo finito está constituido por 15 voluntarios de la Clínica Odontológica de la UDLA, los cuales serán seleccionados siguiendo los criterios de inclusión y exclusión. La población estará constituida por individuos desde la segunda década en adelante hasta los 60 años de edad.

7.2.2 Muestra.

Los voluntarios serán seleccionados en la Clínica Odontología de la UDLA, los cuales firmaron el consentimiento informado como aceptación en la participación de la presente investigación. Se seleccionaron 15 pacientes a partir de los criterios de inclusión y exclusión.

7.2.3 Criterios de inclusión.

- Pacientes de 18 a 60 años de edad.
- Pacientes con enfermedad periodontal.
- Pacientes fumadores.
- Pacientes con un índice de placa superior al 10%.
- Pacientes que no utilicen colutorios diarios.

7.2.4 Criterios de exclusión.

- Pacientes que se encuentre en terapia de medicamentos.
- Mujeres embarazadas.

7.2.5 Determinación de la muestra

Para esta investigación, según los métodos de inclusión se tomó en cuenta a aquellos pacientes donde la evaluación del porcentaje de placa bacteriana demostró valores superiores al 10% del índice de O`leary.

7.2.6 Procedimientos experimentales

Se comunicó de manera oral y escrita a la Dra. Carolina Gudiño encargada de la Clínica Odontológica de la facultad, la autorización para el ingreso a la clínica para realizar la toma de las muestras y la recolección de los datos que se requerían de los pacientes voluntarios.

El examinador usó las barreras de bioseguridad como: uniforme, mascarillas, guantes y gorro. Al paciente se le colocó adecuadamente en el sillón dental, después se explica de manera rápida pero concisa sobre el tema del proyecto y para qué era requerida la muestra. Se revisó la historia clínica del paciente para comprobar si podía ser apto para el estudio, siguiendo los criterios de exclusión e inclusión. Si el voluntario cumplía con los criterios de inclusión, se

realizaba la encuesta para la recolección de datos y por último la recolección de la muestra.

7.2.7 Operacionalización de variables

Tabla 7. Operacionalización de las variables.

| VARIABLES | DIMENSIÓN | INDICADOR | ESCALA |
|-------------------------------|--------------------------------|--|---|
| Actividad antimicrobiana | Bactericida Bacteriostático | Evaluación mediante aumento de bacterias | 0= la bacteria no responde al extracto. 1= la bacteria responde al extracto pero no muere. 2= la bacteria responde al extracto y muere. |
| | | Escala de tiempo | Antes de 24 horas |
| Paciente | Porcentaje de placa dental. | Evaluación a través del índice de O'Leary | 0= menos de 10% de placa dental 1= más de 10% de placa dental. |
| Extracto de Stevia Rebaudiana | Actividad antimicrobiana | Evaluación 24 horas después de la mezcla con el cultivo de las bacterias de la placa bacteriana. | 0=crecimiento bacteriano 1= sin crecimiento bacteriano |

8. MATERIALES Y METODOS

8.1 Materiales

Tabla 4. Materiales de uso odontológico

| | | |
|---|--|--------------------|
| Sillón odontológico | Equipos de diagnóstico esterilizados: espejo, explorador, pinza algodонера | Hisopos. |
| Bandeja de plástico para instrumental utilizado | Savlón | Suero fisiológico. |
| Campos | Caja de guantes | Tubos de ensayo. |
| Gorros | maskarillas | |

Tabla 5. Materiales para el extracto

| | | | | |
|----------------------------------|---------------------|----------------|--------------------|--------|
| Hojas secas de Stevia Rebaudiana | Alcohol etílico 90% | Agua destilada | Filtros de 1 mm | Molino |
| Frascos de vidrio | Cernideros | Ollas | Tarros de plástico | |

Tabla 6. Materiales adicionales

| | | | | |
|---------|--------------------|--------|----------|---------------------|
| Esferos | Corrector de tinta | Copias | Carpetas | Cámara fotográfica. |
|---------|--------------------|--------|----------|---------------------|

8.2 Métodos

Metodología de extracción de las infusiones y del jarabe a base de Stevia Rebaudiana que inicia desde la preparación de la materia prima, el corte, el secado, la molido y el tamizado de la hoja de la planta y para terminar con la caracterización de los productos de interés obtenidos.

8.2.1 Recolección de la materia prima

Las hojas secas de Stevia se encuentran disponibles en el mercado en fundas de 100 gramos y alcohol etílico al 96%.



Figura 1. Recolección de la materia prima

8.2.2 Molido

Las hojas secas son trituradas en un molino casero hasta que tomen un aspecto de polvo.



Figura 2. Molido

8.2.3 Tamizado

Una vez que las hojas han sido molidas, son tamizadas en un tamiz de 1 mm para obtener un pulverizado muy fino de las hojas.



Figura 3. Tamizado



Figura 4. Residuos del tamizado



Figura 5. Resultado del tamizado

8.2.4 Extracción

Se procede a realizar la mezcla de Stevia triturada con etanol al 96% y con agua destilada, para lograr bajar la concentración al 75% del etanol, se pone a una temperatura de 90 °C durante un tiempo de reacción de 20 minutos.



Figura 6. Extracción

8.2.5 Filtrado

Una vez que se realizó el proceso de extracción el extracto pasa por una serie de filtros con el fin de retener partículas superiores a 1 micra.



Figura 7. Filtrado con cernidora



Figura 8. Filtrado con papel filtro de 1 micra

8.3 Toma de la muestra

Siguiendo los códigos de bioética se explica a los pacientes del objetivo del estudio y una vez que el paciente firma el consentimiento informado, se prosigue con una serie de preguntas siguiendo los marcos de inclusión y exclusión, además revisamos el porcentaje de placa dental en el índice O'leary de esta manera se toma la muestra de la placa dental en la piezas #6 utilizando un hisopo, se toma la muestra entre el borde gingival y la cara libre de la pieza dental. Una vez recolectada la muestra con el hisopo se coloca en tubo de ensayo que tiene suero fisiológico el cual es tapado y luego es transportado al laboratorio.

8.3.1 Procedimiento



Figura 9. Tubos con la muestras



Figura 10. Recolección de la muestra para el cultivo



Figura 11. Cultivo de la muestra en Agar.

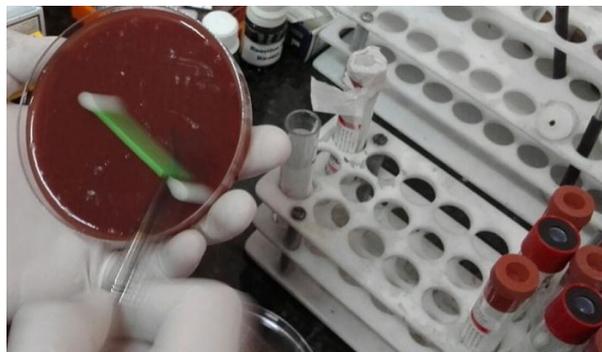


Figura 12. Se siembra en Agar sangre y chocolate.



Figura 13. Se coloca en un frasco con una vela cerrado para generar un ambiente de microaerofilia al 5%

8.3.2 Método de macro dilución.

En el método de macro dilución se emplea por cada combinación microorganismo/antimicrobiano una batería de tubos.

Al primero de ellos se añade 1 mg/ml de la solución inicial del tubo de antimicrobiano, en este caso no se procede a realizar más diluciones.

Se prepara la suspensión con cada bacteria aislada, se colocan en alícuotas de 1 mg/ml y se mezcla con 1 mg/ml de la solución de Stevia Rebaudiana.

Se realiza la siembra en Agar sangre de cordero a las 24 horas respectivamente después de preparada la mezcla microorganismo/antimicrobiano para realizar el conteo de colonias en caso de existir crecimiento. Se incuba a 35° hasta observar crecimiento.

Los medios y las suspensiones se prepararon usando como referencia las indicaciones de CLSI (Clinical and Laboratory Estándars Institute).



Figura 14. Stevia Rebaudiana en solución al 70% en etanol.



Figura 15. Solución de Stevia Rebaudiana mas la solución al 0,5 McFarland de cada bacteria aislada.

8.3.3 Preparacion de la suspensión

Se coloca una o dos colonias de cada bacteria en caldo BHI, hasta obtener una turbidez 0,5 McFarland que se lee en el turbidimetro.



Figura 16. Se incuba por 24 horas a 35°C en microaerofilia

Después de 24 horas se procede a realizar una siembra en Agar sangre monopetri y se realiza el respectivo conteo de colonias.



Figura 17. Conteo de colonias.

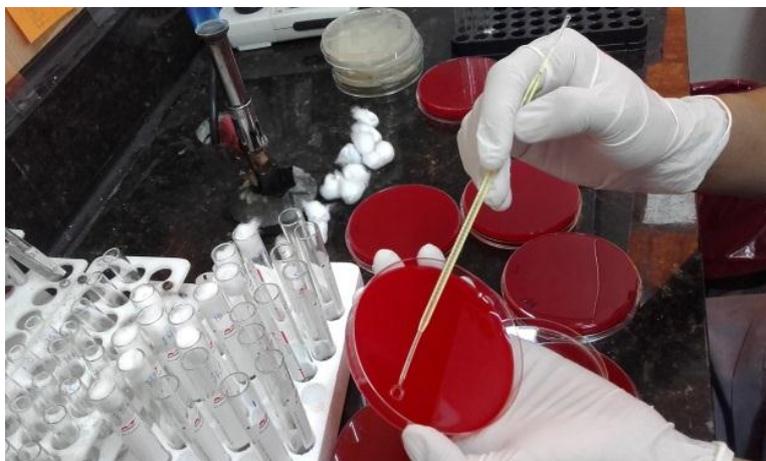


Figura 18. Incubación y siembra



Figura 19. Jarro sellado para generar microaerofilia.

9. RESULTADOS

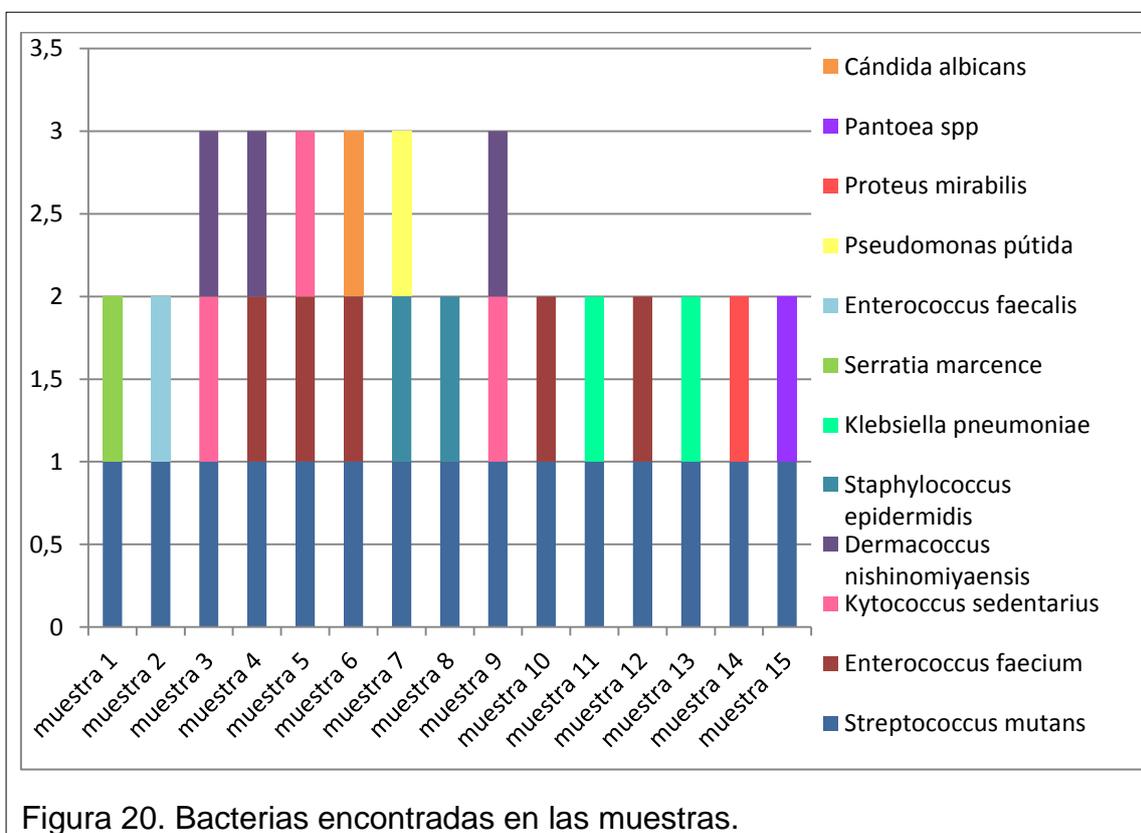
El presente estudio de tipo experimental *in Vitro*, tiene como objetivo identificar las bacterias que mas predominan en las 15 muestras de placa bacteriana y de esta manera comprobar la actividad antimicrobiana del extracto obtenido de las hojas de Stevia Rebaudiana mediante una técnica casera.

9.1 Antes de las 24 horas

Tabla 8. Bacterias aisladas.

| ITEM | Conteo inicial | Clase de bacteria | Conteo inicial | Clase de bacteria | Conteo inicial | Clase de bacteria |
|------------|----------------|-----------------------------|----------------|-----------------------------------|----------------|-------------------------------------|
| Muestra 1 | 210000 | <i>Streptococcus mutans</i> | 5000 | <i>Serratia marcescens</i> | | |
| Muestra 2 | 345000 | <i>Streptococcus mutans</i> | 6000 | <i>Enterococcus faecalis</i> | | |
| Muestra 3 | 195000 | <i>Streptococcus mutans</i> | 40000 | <i>Kytococcus sedentarius</i> | 25000 | <i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i> |
| Muestra 4 | 80000 | <i>Streptococcus mutans</i> | 5000 | <i>Enterococcus faecium</i> | 1000 | <i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i> |
| Muestra 5 | 450000 | <i>Streptococcus mutans</i> | 20000 | <i>Enterococcus faecium</i> | 10000 | <i>Kytococcus sedentarius</i> |
| Muestra 6 | 150000 | <i>Streptococcus mutans</i> | 10000 | <i>Enterococcus faecium</i> | 1500 | <i>Cándida albicans</i> |
| Muestra 7 | 200000 | <i>Streptococcus mutans</i> | 1000 | <i>Pseudomonas pútida</i> | 1000 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| Muestra 8 | 18000 | <i>Streptococcus mutans</i> | 10000 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | | |
| Muestra 9 | 195000 | <i>Streptococcus mutans</i> | 35000 | <i>Kytococcus sedentarius</i> | 30000 | <i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i> |
| Muestra 10 | 185000 | <i>Streptococcus mutans</i> | 15000 | <i>Enterococcus faecium</i> | | |
| Muestra 11 | 240000 | <i>Streptococcus mutans</i> | 18000 | <i>Kytococcus sedentarius</i> | | |
| Muestra 12 | 160000 | <i>Streptococcus mutans</i> | 22000 | <i>Enterococcus faecium</i> | | |
| Muestra 13 | 650000 | <i>Streptococcus mutans</i> | 35000 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | | |
| Muestra 14 | 175000 | <i>Streptococcus mutans</i> | 58000 | <i>Proteus mirabilis</i> | | |
| Muestra 15 | 160000 | <i>Streptococcus mutans</i> | 5000 | <i>Pantoea spp</i> | | |

Según el cultivo que se realizó de las quince muestras de placa bacteriana, encontramos que la especie que más predominó fue el *Streptococcus mutans* la cual estuvo presente en todas las muestras con cantidades variables. El *Enterococcus faecium* estuvo presente en cinco muestras, *Kytococcus sedentarius* y *Dermacoccus nishinomiyaensis* fueron encontradas en tres muestras, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* fueron encontrados en dos muestras, y *Serratia marcence*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas pútida*, *Proteus mirabilis*, *Pantoea spp*, que solo se encontraron en una muestra cada una.



9.2 Resultados con Stevia Rebaudiana

Tabla 9. Bacterias sensibles al extracto.

| ITEM | Conteo | Clase de bacteria | Conteo | Clase de bacteria | Conteo | Clase de bacteria |
|------------|--------|-----------------------------|--------|-----------------------------------|--------|-------------------------------------|
| Muestra 1 | 210000 | <i>Streptococcus mutans</i> | 25000 | <i>Serratia marcescens</i> | | |
| Muestra 2 | 345000 | <i>Streptococcus mutans</i> | 50.000 | <i>Enterococcus faecalis</i> | | |
| Muestra 3 | 195000 | <i>Streptococcus mutans</i> | 40000 | <i>Kytococcus sedentarius</i> | 25000 | <i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i> |
| Muestra 4 | 80000 | <i>Streptococcus mutans</i> | 20.000 | <i>Enterococcus faecium</i> | 1000 | <i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i> |
| Muestra 5 | 450000 | <i>Streptococcus mutans</i> | 20000 | <i>Enterococcus faecium</i> | 10000 | <i>Kytococcus sedentarius</i> |
| Muestra 6 | 150000 | <i>Streptococcus mutans</i> | 30000 | <i>Enterococcus faecium</i> | 5000 | <i>Cándida albicans</i> |
| Muestra 7 | 200000 | <i>Streptococcus mutans</i> | 9000 | <i>Pseudomonas pútida</i> | 10000 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| Muestra 8 | 18000 | <i>Streptococcus mutans</i> | 60000 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | | |
| Muestra 9 | 195000 | <i>Streptococcus mutans</i> | 35000 | <i>Kytococcus sedentarius</i> | 30000 | <i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i> |
| Muestra 10 | 185000 | <i>Streptococcus mutans</i> | 40000 | <i>Enterococcus faecium</i> | | |
| Muestra 11 | 240000 | <i>Streptococcus mutans</i> | 30000 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | | |
| Muestra 12 | 160000 | <i>Streptococcus mutans</i> | 30000 | <i>Enterococcus faecium</i> | | |
| Muestra 13 | 650000 | <i>Streptococcus mutans</i> | 50000 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | | |
| Muestra 14 | 175000 | <i>Streptococcus mutans</i> | 100000 | <i>Proteus mirabilis</i> | | |
| Muestra 15 | 160000 | <i>Streptococcus mutans</i> | 50000 | <i>Pantoea spp</i> | | |

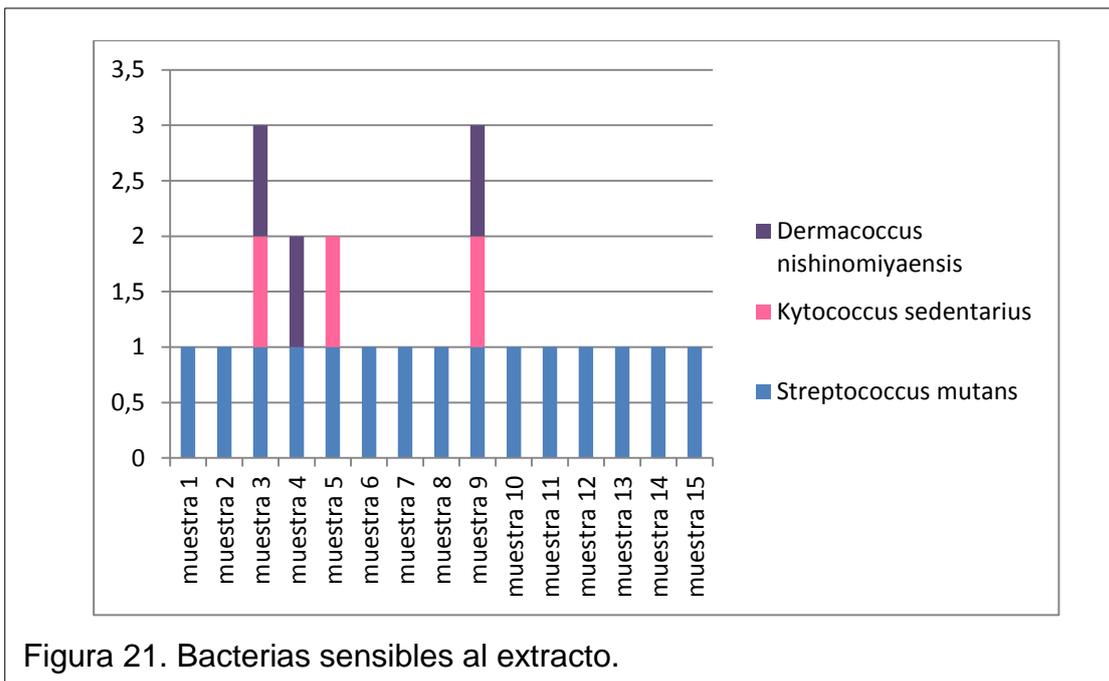


Figura 21. Bacterias sensibles al extracto.

Después de 24 horas de la aplicación de 1mg/ml del extracto elaborado de *Stevia Rebaudiana* en los cultivos de cada muestra de placa bacteriana, obtuvimos que el extracto detiene el crecimiento de todas las colonias de *Streptococcus mutans* que estuvieron presentes en todas las muestras recogidas. Además, las especies de *Kytococcus sedentarius* y *Dermacoccus nishinomiyaensis* estuvieron presentes en tres muestras, ya que a diferencia de las otras especies cultivadas, estas tres colonias mantuvieron su número de bacterias igual al de la toma inicial sin el extracto de *Stevia*, por lo tanto el efecto antimicrobiano del extracto de *Stevia Rebaudiana* es bacteriostático ya que impide el progreso del crecimiento bacteriano.

Sin embargo en el resto de colonias de bacterias de las muestras *Enterococcus faecalis*, *Serratia marcescens*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus epidermidis*, *Cándida albicans*, *Pseudomonas pútida*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pantoea spp* no se presentó ningún efecto antibacteriano.

10. DISCUSIÓN.

La placa bacteriana se considera como el principal agente fisiológico de diversas enfermedades de la cavidad oral, por esta razón se han desarrollado compuestos antibacterianos que ayudan a quitar o matar las bacterias orales con el objetivo de que la superficie del diente se mantenga libre de bacterias patógenas. Este estudio establece la utilización del extracto de Stevia Rebaudiana dirigido a las bacterias de la cavidad oral, inhibiendo su crecimiento y desarrollo de otras bacterias, por el cual este estudio propone identificar las bacterias recolectadas de la muestra del biofilm para analizar su reacción con el extracto de Stevia Rebaudiana y verificar si existe crecimiento bacteriano después de colocar el extracto de Stevia rebaudiana.

Contreras (2013) señala la capacidad de la Stevia para inhibir el crecimiento de bacterias, que se utiliza para el tratamiento de heridas, úlceras, enfermedades en las encías y además contribuye al efecto antiinflamatorio y antiplaca. También explica que la stevia sirve para complementar los procedimientos de raspado, alisado y cirugía periodontal existente, con el fin de mejorar la salud bucodental de las personas que presentan enfermedad periodontal.

Esto relacionado a nuestro estudio, confirma la capacidad que posee el extracto etanólico de Stevia Rebaudiana para impedir el progreso de la enfermedad periodontal, ya que su efecto en boca podría dar lugar a la inhibición de la proliferación de nuevas colonias bacterianas evitando que estas especies se vuelvan patógenas y causen daño a la cavidad oral.

Ghosh (2008) realizó 4 extractos utilizando metanol, etanol y acetona de los cuales todos estos eran eficaces al *S. mutans* sin embargo el extracto de acetona tiene mayor efecto antibacteriano contra esta bacteria. Brambilla (2013) realizó dos extractos de Stevia Rebaudiana los cuales no apoyaron el crecimiento de *S. mutans* en pruebas *in Vitro* y no fue fermentada por el biofilm oral, cuando se administra como un enjuague oral. Por otro lado Mohammadi, Karbasizadeh, Aghai, Reza, (2012) señala en su estudio que los tres extractos

metanol, etanol y acetona fueron muy eficaces contra *S. mutans* pero en exposiciones de extracto acuosos no existe actividad. A esto podemos agregar que nuestro extracto también ejerce una importante actividad contra el *S. mutans* de esta manera podemos recomendar la elaboración de un colutorio de esta planta y de esta manera poder disminuir el riesgo de caries y otras enfermedades que tienen de etiología la placa bacteriana.

Chilaca y Cava (2012) realizó el extracto de *Stevia Rebaudiana* en agua, con el fin de evaluar su actividad antimicótica frente a *Candida albicans* el cual se comprueba que sí es sensible al extracto de *Stevia* ya que formó un halo de inhibición promedio de 20 mm comparado con el halo de inhibición formado con el antimicótico ketoconazol que fue en un 26 mm de diámetro promedio, sin embargo al igual que Debnath (2008) elaboró extracto de cloroformo y metanol de *Stevia Rebaudiana* que no fueron sensibles frente a esta bacteria, con estos resultados podemos comprobar que nuestro extracto de etanol, tampoco presenta eficacia frente a *Cándida albicans*.

Solo existe una investigación de Thamin (2010), que al igual que nuestro estudio, comprueba una potencial actividad antibacteriana del extracto de *Stevia Rebaudiana* contra *Klebsiella pneumoniae*, en donde utilizó dos tipos de extractos, etanol y el metanol. Además concluyó que otras bacterias Gram negativas fueron más sensibles que las bacterias Gram positivas en el extracto de la planta seleccionada.

Está determinado que el uso continuo de *Stevia* en la dieta traerá muchos beneficios, no solo a la cavidad oral sino también a la salud en general, además de todos los resultados vistos se puede concluir que la *Stevia Rebaudiana* muestra su actividad bacteriostática en cierto tipo de bacterias y también puede ser utilizada como una planta medicinal. Gracias a estos nuevos estudios sobre todo los beneficios de esta planta y sus diferentes extractos, tenemos una visión más clara de que esta planta es una excelente ayuda como coadyuvante en la higiene oral ya que aparte de ayudarnos en la prevención de

caries, evita la acumulación de colonias bacterianas, de esta manera estaríamos ayudando también a la prevención de la enfermedad periodontal. Por otro lado la empresa Blendax ya ha iniciado la comercialización de una pasta dental a base de Stevia Rebaudiana para el uso de mujeres embarazadas ya que por su buen sabor ayuda a evitar náuseas causadas por el sabor de las pastas dentales comunes.

Para concluir quiero hacer énfasis en las propiedades que la Stevia Rebaudiana tiene sobre la salud en general, ya que si bien es cierto se ha demostrado su eficacia contra ciertas bacterias, podríamos expandir las investigaciones sobre la acción bactericida y bacteriostática de la Stevia contra bacterias en diferentes tipos de enfermedades, para que de esta manera podamos ampliar la comercialización de la Stevia Rebaudiana en diferentes productos y no solo en endulzantes sino también a nivel medicinal en el campo de la salud.

11. CONCLUSIONES

- La elaboración del extracto de la Stevia fue realizada de manera sencilla y efectiva ya que a las 24 horas tuvo acción bacteriostática en las especies de las muestras de placa dental, sin embargo no existió efecto bactericida en ninguna especie encontrada en la misma.
- El efecto antimicrobiano que tuvo el extracto de Stevia Rebaudiana sobre el *Streptococcus mutans*, *Kytococcus sedentarius* y *Dermacoccus nishinomiyaensis* es bacteriostático ya que en 24 horas no tuvo ningún tipo de crecimiento, además que no aportó al desarrollo de nuevas colonias bacterianas, con una concentración mínima inhibitoria del extracto de 1 mg/ml.
- Se concluye que el extracto de Stevia Rebaudiana utilizado en este estudio no tiene ningún tipo de efecto bacteriostático ni bactericida sobre *Serratia marcescens*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Cándida albicans*, *Pseudomonas pútida*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pantoea spp*, que son las bacterias que se recolectaron de las muestras.
- Las cepas que más prevalencia tuvieron en todas las muestras tomadas es la del *Streptococcus mutans*, además fueron sensibles al extracto de Stevia Rebaudiana, lo que demuestra que el extracto ayudaría considerablemente al control de caries dental.

12.RECOMENDACIONES.

- Realizar investigaciones de la actividad del extracto de Stevia Rebaudiana, utilizando diferentes concentraciones de los alcoholes, además agregando sustancias naturales al extracto y en diferentes lapsos de tiempo para potenciar su acción y lograr un efecto bactericida que además traiga beneficios para el tratamiento de la enfermedad periodontal.
- Ejecutar estudios sobre el mecanismo de acción del extracto de Stevia Rebaudiana, para demostrar su efecto bactericida en bacterias de la cavidad oral.
- Se recomienda su consumo diario, ya sea como edulzante, en agua, en extracto, etc. Ya que sus componentes traen beneficios y hay que enfatizar que este extracto no produce efectos secundarios a nivel bucal.
- Elaborar análisis de la compatibilidad *in Vivo* del extracto de Stevia Rebaudiana para que a futuro pueda ser aplicado a manera de colutorios orales, dentríficos e incluso chicles.
- Continuar estudiando al extracto de Stevia Rebaudiana en cepas de especies patógenas de la cavidad oral, con el fin de utilizar este agente químico como tratamiento de prevención de diferentes patologías orales.

13. REFERENCIAS

- Brambilla, E., Cagetti, M. G., Ionescu, A., Campus, G., & Lingström, P. (2013). An *in Vitro* and *in Vivo* comparison of the effect of Stevia Rebaudiana extracts on different caries-related variables: a randomized controlled trial pilot study. *Caries research*, 48(1), 19-23.
- Canseco-Jiménez, J. F. (2001). Caries dental. La enfermedad oculta. *Bol Med Hosp Infant Mex*, 58(10), 673-6.
- Contreras, Adolfo. (1992). Patogénesis de la enfermedad periodontal. *Revista estomatologica*. Volumen 2(2). Cali, Colombia.
- Contreras, M. S. (2013). Anticariogenic properties and effects on periodontal structures of Stevia Rebaudiana Bertoni. Narrative review. *Journal of Oral Research*, 2(3), 158-166.
- Contreras, S. (Octubre 2013). Anticariogenic properties and effects on periodontal structures of Stevia Rebaudiana Bertoni. Narrative review. *Journal of Oral Research*. Chile.
- Debnath, M. (2007). Clonal propagation and antimicrobial activity of an endemic medicinal plant Stevia Rebaudiana. *Journal of medicinal plants research*, 2(2), 045-051.
- Duque de Estrada Riverón, J., Pérez Quiñonez, J. A., & Hidalgo-Gato Fuentes, I. (2006). Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar. *Revista cubana de estomatología*, 43(1), 0-0.
- Duque de Estrada Riverón, J., Rodríguez Calzadilla, A., Coutin Marie, G., & Riveron Herrera, F. (2003). Factores de riesgo asociados con la enfermedad caries dental en niños. *Revista Cubana de Estomatología*, 40(2), 0-0.
- Durán, S., Rodríguez, M. D. P., Córdón, K., & Record, J. (2012). Stevia (Stevia Rebaudiana), edulcorante natural y no calórico. *Revista chilena de nutrición*, 39(4), 203-206.
- Fajardo, U. V. S. (2015). Comportamiento del tratamiento la gingivitis con colutorios de manzanilla y de clorhexidina. *Policlínico* 19 de abril.

- Figueroa-Gordon, M., Acevedo, A. M., & Alonso, G. (2009). Microorganismos presentes en las diferentes etapas de la progresión de la lesión de Caries dental. *Acta odontol. Venez*, 47(1), 227-240.
- Gamboa, F., & Chaves, M. (2011). Antimicrobial potential of extracts from *Stevia Rebaudiana* leaves against bacteria of importance in dental caries. *Acta odontológica latinoamericana: AOL*, 25(2), 171-175.
- Giongo Andres, Mua Bruna, Parolo Clarissa, Carlet Annet, Maltz Marisa. (Agosto, 2014). Effects of lactose-containing stevioside sweeteners on dental biofilm acidogenicity. *Scielo*. Vol. 28 (1). Sao Paulo, Brasil.
- Guerra, N., & Carlos, J. (2011). Relación del nivel de biofilm dental con flujo, PH y capacidad buffer salivales, en estudiantes de 15 y 16 años del 5° grado de secundaria de la institución educativa Rafael Narváez Cadenillas, Trujillo-2010.
- Henao Toro, A. L., Trujillo Londoño, S., & Roldan Parra, J. (2012). Determinación del poder antimicrobial del rebaudiosido A frente a los microorganismos *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en condiciones de laboratorio y aplicado a una matriz alimentaria (Doctoral dissertation).
- Huang, R., Li, M., & Gregory, R. L. (2011). Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence*, 2(5), 435-444.
- Jiménez, T., Cabrera, G., Álvarez, E., & Gómez, F. (2010). Evaluation of the content of stevioside and rebaudioside A in a population of *Stevia Rebaudiana* Bertoni (kaâ heê) commercially cultivated. A preliminary study. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 8(1), 47-53.
- León Iturralde, C. E. (2013). Factores exógenos y endógenos que influyen en la enfermedad periodontal.
- Luyo, A. G. P. (2014). La biopelícula: una nueva visión de la placa dental. *Revista estomatológica herediana*, 15(1).
- Malik, F., Hussain, S., Mirza, T., Hameed, A., Ahmad, S., Riaz, R., & Usmanghani, K. (2011). Screening for antimicrobial activity of thirty-

- three medicinal plants used in the traditional system of medicine in Pakistan. *J Med Plant Res*, 5(14), 3052-3060.
- Marsh, P. D. (2006). Dental plaque as a biofilm and a microbial community—implications for health and disease. *BMC Oral health*, 6 (Suppl 1), S14
- Martínez, E. R., Suárez, m. C., Feito, R. S., & González, j. F. (2006). Técnicas de diagnóstico de la caries dental. Descripción, indicaciones y valoración de su rendimiento. *Bol Pediatr*, 46, 23-31.
- Martínez, P. T. (2000). *La Hierba Dulce, Historia, Usos y Cultivo de Stevia Rebaudiana* Bertoni. Ciencias de la Salud. Madrid.
- Matesanz, P., Figuro, E., Giménez, M. J., Aguilar, L., Llor, C., Prieto, J., & Bascones, A. (2005). Del conocimiento de la etiología bacteriana al tratamiento y la prevención de las infecciones más prevalentes en la comunidad: las infecciones odontogénicas. *Rev Esp Quimioterap*, 18(2), 136-145.
- Matesanz-Pérez, P., Matos-Cruz, R., & Bascones-Martínez, A. (2008). Enfermedades gingivales: una revisión de la literatura. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*, 20(1), 11-25.
- Mena Tandazo, A. M. (2011). Estudio microbiológico del surco gingival en pacientes embarazadas que presentan gingivitis asociada a la placa bacteriana, y que acuden al hospital provincial General Isidro Ayora en el periodo febrero-agosto del 2011.
- Mohammadi-Sichani, M., Karbasizadeh, V., Aghai, F., & Mofid, M. R. (2012). Effect of different extracts of *Stevia Rebaudiana* leaves on *Streptococcus mutans* growth. *J Med Plants Res*, 6(32), 4731-4.
- Mohammadi-Sichani, M., Karbasizadeh, V., Aghai, F., & Mofid, M. R. (2012). Effect of different extracts of *Stevia Rebaudiana* leaves on *Streptococcus mutans* growth. *J Med Plants Res*, 6(32), 4731-4.
- Núñez, D. P., & García Bacallao, L. (2010). Bioquímica de la caries dental. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 9(2), 156-166.
- Palomer, L. (2006). Caries dental en el niño: Una enfermedad contagiosa. *Revista chilena de pediatría*, 77(1), 56-60.

- Pérez Barrero, B. R., Rodríguez Mediaceja, G., Pérez González, A., Rodríguez García, B., & Paneque Gamboa, M. R. (2009). Principales factores de riesgo de la gingivitis crónica en pacientes de 15 a 34 años. *Medisan*, 13(4), 0-0.
- Pérez Quiñones, J. A., Duque de Estrada Riverón, J., & Hidalgo Gato-Fuentes, I. (2007). Asociación del *Streptococcus mutans* y *Lactobacilos* con la caries dental en niños. *Revista Cubana de Estomatología*, 44(4), 0-0.
- Platt, C. E. T., & Machado, M. E. (2004). Uso de los diferentes agentes químicos para el control de la placa bacteriana como coadyuvantes en la prevención de las enfermedades gingivales. *Rev Odous Cient*, 5, 5-9.
- Prieto, J. P., & Calvo, A. (2004). Bases microbiológicas en las infecciones bucales y sensibilidad en los antibióticos. *Medicina Oral*, 9, S11-8.
- Rivas, C., & Mota, M. (2006). Bacterias anaerobias. U. d. República., *Temas de Bacteriología y Virología Médica*, 356-357.
- Salvador-Reyes, R., Sotelo-Herrera, M., & Paucar-Menacho, L. (2014). Estudio de la Stevia (*Stevia Rebaudiana Bertoni*) como edulcorante natural y su uso en beneficio de la salud. *Scientia Agropecuaria*, 5(3), 157-163.
- Serrano-Granger, J., & Herrera, D. (2005). La placa dental como biofilm: ¿Cómo eliminarla?. *RCOE*, 10(4), 431-439.
- Toledo Pimental, B., González Díaz, M. E., Alfonso Tarraú, M. S., Pérez Carrillo, A., & Rodríguez Linares, M. L. (2002). Tabaquismo y enfermedad periodontal. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2), 94-99.
- Soto, C. P. (2015). Fumar y enfermedad periodontal. *Revista Kiru*, 8(2).
- Vázquez García, G. (2011). Evaluación de los efectos del enjuague de gluconato de clorhexidina en el biofilm dental.
- Vilchis, D. B. C., Castillo, R. E. P., & Clavel, J. F. G. (2013). El concepto de caries: hacia un tratamiento no invasivo. *Revista adm*, 70(2), 54-60.
- Viviani, M. (2008). Patología periapical. Estructura del biofilm.
- Wu, C. D. (2012). The impact of food components and dietary factors on oral health. *J FoodDrug Anal*, 20(Suppl. 1), 270-274.

- Yadav, A. K., Singh, S., Dhyani, D., & Ahuja, P. S. (2011). A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* Bertoni]. *Canadian Journal of Plant Science*, 91(1), 1-27.
- Zambrano, M. A., & Londoño, L. S. (2006). Biofilms bacterianos: sus implicaciones en salud y enfermedad. *Universitas Odontológica*, 25(57), 19-25.

ANEXOS

Fotos gérmenes aislados



Anexo1. *Streptococcus mutans*



Anexo 2. *Enterococcus faecium*.



Anexo 3. *Kytococcus sedentarius*



Anexo 4. *Proteus mirabilis*



Anexo 5. *Dermacoccus nishinomiyaensi*



Anexo 6. *Staphylococcus epidermidis*



Anexo 7. *Serratia marcescens*



Anexo 8. *Candida albicans*