



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO DE LA
PLANTA *STEVIA REBAUDIANA* SOBRE EL *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*”

Autora

Elizabeth Violeta Cox Terán

Año
2018



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO DE LA
PLANTA *STEVIA REBAUDIANA* SOBRE EI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*”

Trabajo de titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Médico Veterinario y Zootecnia

Profesor Guía

Joar Marcelino García Flores

Autora

Elizabeth Violeta Cox Terán

Año

2018

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido el trabajo, evaluación del efecto antimicrobiano del extracto de la planta *Stevia rebaudiana* sobre el *Staphylococcus aureus*, a través de reuniones periódicas con la estudiante Elizabeth Violeta Cox Terán, en el semestre 2018-2, orientado 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”

Joar Marcelino García Flores
Médico Veterinario Zootecnista
CI: 1708655475

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, evaluación del efecto antimicrobiano del extracto de la planta *Stevia rebaudiana* sobre el *Staphylococcus aureus*, a través de reuniones periódicas con la estudiante Elizabeth Violeta Cox Terán, en el semestre 2018-2, a través de reuniones periódicas con el estudiante, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Francisco Javier Jaramillo Cisneros
Médico Veterinario Zootecnista
CI: 1711695849

DECLARACIÓN DE AUDITORIA 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”

Elizabeth Violeta Cox Terán

CI: 1719736298

AGRADECIMIENTOS

A Dios, que me ha permitido continuar con mis metas y anhelos que tengo en mi vida, me ha bendecido con esta hermosa vocación y dedicación por los animales.

A mi familia, Ricardo, Elizabeth, Milton, por su apoyo incondicional y por la motivación que me daban y me dan para continuar con mi carrera.

A Estefanía Arizaga, quien me ayudo desde que inicie este proceso. A pesar, de las circunstancias siguió guiándome con la elaboración de esta investigación, como siempre una excelente persona, profesional y amiga.

A Joar García, mi tutor guía, quien me tendió la mano sin importar las circunstancias o quien me rodeaba, como me lo dijo: "Jamás he dejado abandonado un amigo en plena guerra".

A Gonzalo Chávez y Lesli Lara, quienes me colaboraron con la investigación, buscando soluciones para que pueda continuar en este proceso, ustedes son muy buenos profesionales.

A Mauricio Racines por brindarme su colaboración y su tiempo a pesar de no pertenecer a la misma facultad.

DEDICATORIA

A mi familia, Ricardo, Elizabeth, Milton porque son el soporte y el impulso para salir siempre adelante.

A mis amigos, Julián Murillo, Anaí Ortiz, Melissa Maldonado, Arturo Arteaga, Karen Recalde, Majo Araujo, Hillary Jarrín, Carolina Aldás, José Velásquez, José Cabrera, Daniel Barreno, Dayna Delgado y Jessy Arteaga por haberme acompañado y apoyado, siempre, los amo.

A Pablo Patiño, quien, aunque está lejos, se ha convertido en una persona muy especial en mi vida, más de lo que alguna vez alguien lo fue.

RESUMEN

La *Stevia rebaudiana* es una planta que contiene en sus hojas 0.3% de Dulcósido, 0.6% de Rebaudiósido C, 3.8% de Rebaudiósido A y 9.1% de Esteviósido, se ha descrito que el extracto de la planta *Stevia Rebaudiana* posee efecto antimicrobiano debido a un compuesto denominado esteviósido, el cual inhibe el glucano, por tanto, aunque la planta es un edulcorante, no es fermentado en ácidos por las bacterias y este compuesto posee efecto sobre las enzimas que se encargan de la descomposición de azúcares.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto antimicrobiano del extracto de la planta *Stevia rebaudiana* sobre *Staphylococcus aureus*. La muestra fue tomada de la flora bucal de caninos de entre cinco y siete años que presentaban sarro moderado a grave. Posteriormente, por medio del método de destilación agua vapor, se obtuvo el extracto de la planta. La bacteria fue enfrentada a dos antibióticos comerciales tales como, amoxicilina y tetraciclina y a 4 concentraciones del extracto de la planta (25%, 50%, 75% y la solución madre). Los resultados fueron analizados con la prueba no paramétrica Kruskal Wallis, encontrando que el extracto de la planta si posee un efecto antimicrobiano en las concentraciones 75% y la solución madre.

La media del halo de inhibición obtenido con la amoxicilina fue de 20,4 mm, de la tetraciclina fue de 33 mm, 1.47 mm con el extracto al 75% y 9.3 mm con la solución madre. Demostrando que el extracto de la *Stevia rebaudiana* si tiene efecto antimicrobiano. Sin embargo, se lo debe utilizar como método preventivo, mas no para tratar infecciones bacterianas.

Palabras clave: *Stevia rebaudiana*, efecto antimicrobiano.

ABSTRACT

Stevia rebaudiana is a plant that contains in its leaves 0.3% Dulcoside, 0.6% Rebaudioside C, 3.8% Rebaudioside A and 9.1% Stevioside, it has been described that the extract of the *Stevia Rebaudiana* plant has an effect antimicrobial due to a compound called stevioside which inhibits glucan, therefore, although the plant is a sweetener, is not fermented in acids by bacteria and this compound influences the enzymes that are responsible for the decomposition of sugars.

The objective of this study was to evaluate the antimicrobial effect of *Stevia rebaudiana* plant extract on *Staphylococcus aureus*. The sample was taken from the oral flora of canines between five and seven years old that presented moderate to severe tartar. Subsequently, by means of the steam water distillation method, the extract of the plant was obtained. The bacterium was confronted with two synthetic antibiotics, such as amoxicillin and tetracycline and at 4 concentrations of the plant extract (25%, 50%, 75% and the stock solution). The results were analyzed with the nonparametric test Kruskal Wallis, 0. finding that the extract of the plant does have an antimicrobial effect in 75% concentrations and the mother solution.

The inhibition halo obtained with amoxicillin was 20.4 mm, tetracycline was 33 mm, 1.47 mm with the extract 75% and 9.3 mm with the stock solution. Proving that the extract of *Stevia rebaudiana* does have an antimicrobial effect. However, it should be used as a preventive method, but not to treat bacterial infections.

Key words: *Stevia rebaudiana*, antimicrobial effect

ÍNDICE

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos.....	2
1.1.1 Objetivo General	2
1.1.2 Objetivos Específicos.....	3
1.2 Hipótesis de la investigación	3
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	4
2.1 <i>Stevia rebaudiana</i>	4
2.1.1 Descripción	4
2.1.2 Componentes	5
2.1.3 Propiedades.....	6
2.1.4 Efecto antimicrobiano	6
2.2 Flora bucal de caninos	7
2.2.1 <i>Staphylococcus spp.</i>	7
2.2.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	8
A. Identificación	9
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1 Ubicación de la investigación	10
3.2 Población.....	10
3.3 Materiales.....	11
3.3.1 De campo	11
3.3.2 De laboratorio	11
3.3.3 De oficina.....	12
3.4 Metodología	12
3.4.1 Muestreo.....	12
3.4.2 Obtención de la muestra.....	13
3.4.3 Análisis de la muestra.....	15
3.4.4 Análisis del efecto antimicrobiano.....	16
3.5 Diseño Experimental.....	17
3.5.1 Variables.....	17
3.5.2 Diseño experimental.....	18

3.5.3 Análisis estadístico	18
Capítulo IV: Resultados y Discusión.....	19
4.1 Resultados	19
4.2 Discusión	24
4.3 Limitantes	28
Capítulo V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES ...	29
5.1 Conclusiones.....	29
5.2 Recomendaciones	29
REFERENCIAS	30
ANEXOS	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la Stevia rebaudiana	5
Tabla 2. Identificación para Staphylococcus aureus	9
Tabla 3. Criterios de selección	12
Tabla 4. Variables	17
Tabla 5. Halos de inhibición con el extracto al 25%	19
Tabla 6. Halos de inhibición con el extracto al 50%	20
Tabla 7. Halos de inhibición con el extracto al 75%	20
Tabla 8. Halos de inhibición con la solución madre.....	21
Tabla 9. Halos de inhibición con tetraciclina	21
Tabla 10. Halos de inhibición con amoxicilina	22
Tabla 11. Prueba de bondad de ajuste (Kolmogorov-Smirnov).....	22
Tabla 12. Prueba de Kruskal Wallis	23
Tabla 13. Comparación post hoc.....	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación de la empresa Doggies cake.....	10
Figura 2. Bacteria en estudio, cultivada en agar manitol salado.....	15

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

El uso de una amplia gama de antibióticos sintéticos, y la carencia de respuesta a los antibióticos tradicionales en las infecciones ocasionadas por bacterias resistentes, resulta en una duración mayor de la enfermedad, que incluso puede llegar a la muerte del paciente. El origen del problema se debe al uso inapropiado y abuso en el uso de los antibióticos. Esta actividad provoca un acelerado aumento de las resistencias bacterianas y, por consiguiente, una pérdida de la eficacia de estos medicamentos en el tratamiento de algunas infecciones (OMS, 2017).

Es de suma importancia, que se genere un cambio en la manera del uso y prescripción de los antibióticos, ya que así se generen fármacos nuevos, si no existe un cambio en la utilización de estos medicamentos, la resistencia continuará y, poco a poco generará una gran amenaza y no se podrá controlar las infecciones bacterianas. Sin embargo, esto debe estar acompañado con medidas de bioseguridad y biocontención (OMS, 2017).

Es por esta razón que, la utilización de una alternativa natural antimicrobiana como la *Stevia rebaudiana* es de suma importancia. Además, se ha demostrado que, el extracto de esta planta se lo puede utilizar como antimicrobiano natural en humanos y así reducir problemas periodontales.

Se ha descrito que, en el continente americano existen más de 80 especies de *Stevia*, siendo la *Stevia rebaudiana*, junto con otras plantas extintas, las que poseen esa característica endulzante en sus hojas, esto se atribuye a los glucósidos de esteviol denominados esteviósido, rebaudiósido A, B, C, D, E y F y dulcósido presentes en sus hojas. Debido a, que esta planta es un edulcorante no calórico, con mayor dulzor que la sacarosa, se han realizado distintas investigaciones, en los cuales se ha evidenciado que esta planta herbácea perenne tiene beneficios tanto para la salud sistémica como para la salud oral (Cáceres, 2017; Juca, 2016).

En un estudio llevado a cabo por Cáceres en 2017, estudiante de la Universidad Nacional del Antiplano en Puno, Perú, investigó acerca del efecto antimicrobiano in vitro del extracto de *Stevia rebaudiana* sobre el *Streptococcus mutans*, donde por medio del método de destilación agua-vapor, obtuvo el extracto de las hojas secas de la planta, el cual utilizó en concentraciones de 25%, 50%, 100%, dando como resultado que, el efecto antimicrobiano sobre dicha bacteria en promedio de la concentración del 25%, el halo de inhibición fue de 10.47 mm, en 50% de 12.46 mm y al 100% de 13.49 mm.

En otra investigación realizada por Juca en 2016, estudiante de la Universidad de las Américas en Quito, Ecuador, evaluó la susceptibilidad de una cantidad de bacterias frente al extracto de la *Stevia rebaudiana*, el cual tuvo como resultado que, el extracto de dicha planta posee un efecto bacteriostático contra microorganismos presentes en la placa dental, lo que demuestra que existe una disminución de bacterias que generan la caries dental y, posterior enfermedad periodontal.

Un estudio de esta magnitud permite conocer un producto natural que posee efectos favorecedores para la salud de las mascotas de casa. Además, generará un ahorro de dinero a los propietarios, ya que, una vez conocido su efecto, se podrá pensar en formular un dentífrico a base de Stevia y los dueños podrán adquirirlo, consecuentemente, la acumulación de sarro será menos severa, por tanto, el proceso de limpieza dental será poco invasivo. Adicionalmente, esta investigación da paso a posteriores formulaciones nutricionales, en las cuales se podría probar la inclusión de Stevia con fines preventivos.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo General

Evaluar el efecto antimicrobiano del extracto de la planta *Stevia rebaudiana*, mediante la realización de un antibiograma, para conocer si tiene acción sobre la bacteria presente en la flora bucal de caninos, *Staphylococcus aureus*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Obtener el extracto de las hojas secas de la planta *Stevia rebaudiana* mediante la metodología de extracción agua y vapor junto con la determinación HPLC para realizar un antibiograma con la bacteria *Staphylococcus aureus* obtenida de las muestras tomadas de la población definida.
- Determinar la presencia de *Staphylococcus aureus* en la boca de un grupo de 30 caninos, por medio de kits diagnósticos rápidos, Compact dry, para obtener la bacteria en estudio y conocer la prevalencia de la misma en la población de muestra.
- Comparar el halo de inhibición formado de los antibióticos comerciales junto con los halos de inhibición esperados con el extracto de la *Stevia rebaudiana* en concentraciones del 25, 50, 75% y solución madre para conocer si el extracto posee un efecto antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus*.

1.2 Hipótesis de la investigación

H0: El extracto de la *Stevia rebaudiana* no posee efecto antimicrobiano sobre *Staphylococcus aureus*.

H1: El extracto de la *Stevia rebaudiana* posee efecto antimicrobiano sobre *Staphylococcus aureus*.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 *Stevia rebaudiana*

La *Stevia rebaudiana* es una planta nativa de Sudamérica, específicamente de la región tropical, hallándose todavía en estado silvestre en Paraguay y en Misiones, Provincia Argentina. Por otro lado, durante varias décadas se ha venido cultivando esta especie, ya que posee propiedades edulcorantes y contenido no calórico. En 1964, se evidenció el primer cultivo comercial de esta planta en Paraguay, por lo que poco a poco se ha introducido en distintos países, tales como, Canadá, Estados Unidos, México, Brasil, Corea, Indonesia y Tanzania. Sin embargo, actualmente en China se encuentra la producción más centrada y en Japón se halla el mercado principal (Martínez, 2015).

Estudios realizados con la *Stevia*, como el de Contreras en 2013 y la revisión bibliográfica de Martínez en 2015, han demostrado que esta planta es medicinal, debido a sus efectos beneficiosos para la salud sistémica, es decir, ayuda en la absorción de la grasa, regula la presión arterial y no incrementa los niveles de azúcar en la sangre. En sus hojas se encuentra el esteviósido y rebaudiósido A, principios activos principales de la edulcoración, el cual es considerado treinta veces mayor que el azúcar.

La *Stevia rebaudiana* posee otras aplicaciones, es decir, es utilizada en gomas de mascar y dentífricos para prevenir la formación de caries. Además, se la usa en helados, postres, productos agrídulces, salsas, por el dulzor que brinda sin alterar el sabor de los otros ingredientes. En la industria farmacéutica es utilizada en formulaciones medicamentosas, ya que la planta no se altera si se encuentra en medios ácidos y es estable térmicamente (Martínez, 2015).

2.1.1 Descripción

La *Stevia rebaudiana* durante su desarrollo inicial no tiene ramificaciones, esta planta herbácea perenne posee un tamaño que va entre los treinta a noventa centímetros de altura, su raíz es filiforme y poco profunda. Además, su tallo es recto y poco piloso, sus hojas son de forma elíptica o lanceoladas, sus flores

son pequeñas, hermafroditas y de color blanco y su fruto cuando es claro es estéril y cuando es oscuro es fértil, el cual es diseminado por el viento (Martínez, 2000).

Por otra parte, la clasificación taxonómica es la siguiente:

Tabla 1

Clasificación taxonómica de la *Stevia rebaudiana*

Reino	<i>Plantae, Angiospermae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida, Dicotyledonea</i>
Grupo	<i>Monochlamydae</i>
Orden	<i>Monochlamydae</i>
Familia	<i>Asteraceae</i>
Subfamilia	<i>Asteroideae</i>
Tribu	<i>Eupatorieae</i>
Género	<i>Stevia</i>
Especie	<i>S. rebaudiana</i>

Tomado de Chaves y Chavarría, 2011.

2.1.2 Componentes

La *Stevia* está constituida por: Dulcósido, Rebaudiósido A, Rebaudiósido C y Esteviósido, compuestos denominados glucósidos; Microminerales, tales como, cromo, cobalto, hierro, zinc; Macrominerales como: magnesio, potasio, fósforo y minerales menores como el estaño. Además, está compuesta por: ácido ascórbico o vitamina C, tiamina o vitamina B1, caroteno o vitamina A y agua (Martínez, 2002).

Por otra parte, la *Stevia* posee apigenina, compuesto de los glucósidos que no contiene azúcar y productos naturales perteneciente a los metabolitos secundarios de la planta tales como, avicularina, la cual permite la supresión de

acumulación de lípidos y centaureidin que brinda resistencia a la planta de la fotooxidación de los rayos solares (Martínez, 2000 y Martínez, 2002).

Por otro lado, la planta perenne tiene esteroides vegetales como: campesterol, B-sitosterol y estigmasterol, los cuales ayudan a mantener y estabilizar las membranas. También, se encuentra el ácido cafeico y ácido clorogénico, que intervienen en la biosíntesis de lignina, la clorofila, luteolina y kaempferol, que brindan la pigmentación a las hojas, corteza, tallos, y flores. Finalmente, posee Cariofileno, terpeno de 15 carbonos que actúa como antibióticos generados por la planta en respuesta a la aparición de microbios y un antioxidante denominado quercetina (Martínez, 2000 y Martínez, 2002).

2.1.3 Propiedades

Antiguamente, las plantas del género *Stevia*, principalmente la *Stevia Rebaudiana* eran utilizadas únicamente como endulzantes en los medicamentos para aumentar la palatabilidad. Sin embargo, se ha evidenciado que las propiedades de la *Stevia rebaudiana* incluyen, regulación del azúcar en sangre y efecto hipoglucemiante, no aporta calorías, ayuda a combatir el estreñimiento, ayuda a la digestión, estimula al sistema inmune, genera acción hipotensora, reduce la ansiedad, combate la fatiga, es un vasodilatador, tiene acción diurética y cardiotónica. Por otra parte, se ha reportado que posee acción anticonceptiva y se la puede utilizar en tratamientos de alteraciones de la piel y prevención de caries. Además, tiene propiedades antibacteriana y antiviral (Martínez, 2015).

2.1.4 Efecto antimicrobiano

La *Stevia rebaudiana* es una planta que no aporta calor, contiene en sus hojas 0.3% de Dulcósido, 0.6% de Rebaudiósido C, 3.8% de Rebaudiósido A y 9.1% de Esteviósido. Siendo el esteviósido, el que posee efecto sobre las enzimas que se encargan de la descomposición de azúcares (Cáceres, 2017).

Además, el compuesto denominado esteviósido inhibe el glucano, por tanto, aunque la planta *Stevia rebaudiana* es un edulcorante, no es fermentado en ácidos por las bacterias (Cáceres, 2017).

Por otro lado, se ha evidenciado que la *Stevia rebaudiana* posee actividad inhibitoria in vitro en contra de bacterias Gram positivas (*B. subtilis*, *M. luteus*, *B. megaterium*, *Streptococcus mutans*) y bacterias Gram negativas (*E. coli*, *P. vulgaris*, *S.P aeruginosa*, *marcensesn*) (Contreras, 2013). También, se ha visto actividad inhibitoria in vitro contra *Staphylococcus epidermidis* y valores bajos de concentración mínima inhibitoria para la cepa *S. aureus* (Arámbula et al, 2017).

2.2 Flora bucal de caninos

La composición de la flora bucal de perros y gatos no se encuentra totalmente conocida, debido a que es muy compleja, se han encontrado varias nuevas especies bacterianas y se han reclasificado a otras bacterias. Sin embargo, se conoce que la composición de la microbiota de la cavidad oral varía de acuerdo con la edad y estado de salud de toda la cavidad oral del animal, es decir de los dientes y encías. Por otra parte, las bacterias que han sido aisladas de la boca sana de dichos animales son especies anaerobias facultativas. Mientras que de animales con enfermedad periodontal se han aislado de la flora subgingival especies anaerobias. Entre las cuales se evidencian a *Pasteurella multocida*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, especies de *Enterobacteriaceae* y *Corynebacterium spp.* Además, las nuevas especies que se han encontrado son *Moraxella canis*, *Neisseria weaveri*, *Capnocytophaga canimorsus*, *Capnocytophaga cynodegmi* y *Bergeyella (Weeksella) zoohelcum* (Martínez, 2005).

2.2.1 Staphylococcus spp.

Staphylococcus proviene del griego *staphyle* que significa racimos de uvas, se los ha descrito así por ser los principales responsables de la inflamación y supuración. El género de bacterias denominado *Staphylococcus* está compuesto por cocos Gram positivos, que poseen de 0.5 a 1.5 μm de diámetro,

se encuentran acoplados individualmente, en parejas, tétradas, en racimo de uvas o formando cadenas cortas. *Staphylococcus spp.* son bacterias que no se mueven, son no esporuladas, sin cápsula y son anaerobias facultativas (Cervantes, García y Paz, 2014).

Anteriormente, los estafilococos se encontraban en un género común de la familia Micrococacea junto con los géneros Micrococcus, Stomacoccus y Pianococcus. Sin embargo, en estudio realizados se evidenció que se encuentran más relacionados con los géneros Bacillus y Streptococcus. Por otro lado, en el género Staphylococcus se encuentran 32 especies, de las cuales se ha evidenciado que 16 de estas especies se localizan en la microbiota de la piel, mucosas de los humanos y en la flora de aves y otros mamíferos. Estas bacterias se vuelven patógenas cuando hay predisposición e inmunodepresión en el hospedador, heridas o presencia de cuerpos extraños. Entre las especies que colonizan a los animales se encuentran *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus intermedius* (Cervantes, García y Paz, 2014).

2.2.1.1 *Staphylococcus aureus*

El *Staphylococcus aureus* es una bacteria que se encuentra dispersada entre los primates. Sin embargo, se ha encontrado que en el ganado bovino y ovino produce mastitis y en el ser humano se sitúa principalmente a nivel de la cavidad nasal, lugar que le permite su diseminación. En cultivos comúnmente utilizados, esta especie crece entre las 18-24 horas después de haber sido incubada, se observan colonias que tienen de 0.5-1.5 milímetros de diámetro, dichas colonias se visualizan de pigmentación amarilla a dorado, brillantes, de consistencia cremosa, lisas y elevadas, además es resistente al calor (Cervantes, García y Paz, 2014).

Por otra parte, el *S. aureus* al ser cultivado en agar sangre, se observa β -hemólisis o hemólisis total alrededor de las colonias. Otra característica, que permite la diferenciación de esta especie, es que posee la capacidad de coagular el plasma y soporta medio que contienen altas cantidades de cloruro de sodio. Otros medios que, pueden ser utilizados para cultivar *S. aureus* son

agar chocolate y cerebro corazón infusión agar. Sin embargo, cuando existen bacterias Gram negativas junto con *Staphylococcus aureus* es recomendable usar medios selectivos como agar sal manitol o medio de Chapman (Cervantes, García y Paz, 2014).

Además, existen otros medios que sirven para el aislamiento de dicha bacteria, los cuales son, agar sangre suplementado con colistina y el ácido nalidíxico y agar feniletanol. Actualmente, ya se han realizados medios de cultivos específicos para *S. aureus.*, estos contienen agar base cromogénico, el cual, en presencia de enzimas específicas, los cromógenos les dan color a las colonias (Cervantes, García y Paz, 2014).

A. Identificación

La identificación de *Staphylococcus aureus* se realiza mediante la tinción Gram y pruebas bioquímicas con la finalidad de lograr diferenciar entre el género *Staphylococcus* del género *Micrococcus* (Cervantes, García y Paz, 2014).

Tabla 2

Identificación para *Staphylococcus aureus*

Pruebas	Resultado
Tinción Gram	+
Catalasa	+
Fermentación de glucosa	+
Coagulasa	+
Oxidasa	-
Fermentación de manitol	+
Producción de fosfatasa alcalina	+

Tomada de Cervantes, García y Paz, 2014

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación de la investigación

El estudio se llevó a cabo en la ciudad de Quito, Ecuador, en la parroquia del Batán, en el centro Doggies cake, ubicado en la Provincia de Pichincha localizado en la región sierra norte del país.



Figura 1. Ubicación de la empresa Doggies cake

3.2 Población

El estudio no posee una población como tal, ya que se trabajó sobre un cultivo bacteriano. Sin embargo, este cultivo bacteriano se obtuvo de un isopado de 30 perros caninos adultos (fuente de obtención) para asegurar conseguir la bacteria.

El presente trabajo de investigación se realizó con la colaboración de la docente MVZ Estefanía Arizaga MgSc, docente de Maestría de la FICA de la Universidad de las Américas, con la cual se realizó el proceso de extracción, formulación y análisis del preparado.

Se emplearon hojas de Stevia para la obtención del extracto y determinación del compuesto junto con HPLC.

Posteriormente, se tomaron las muestras de los caninos adultos con formación de sarro por biofilm en un día y se realizó una comprobación de presencia y conteo rápido de *Staphylococcus aureus* a través de kits diagnósticos microbiológicos específicos para este microorganismo.

Finalmente, se realizó el estudio antibiograma de las muestras positivas con tratamiento de Stevia para definir su eficacia frente a antibióticos comerciales.

3.3 Materiales

3.3.1 De campo

- Hisopos para toma de muestras
- Agua destilada
- Envases de recolección de muestra
- Lápiz de cera para rotulación de muestras
- Mandil
- Guantes

3.3.2 De laboratorio

- Hojas de la planta *Stevia rebaudiana*
- Agua
- Filtros de 1 mm
- Molino
- Colador
- Recipiente de plástico
- Recipientes de vidrio ámbar
- Ollas
- Cajas de kits diagnósticos rápidos para *Staphylococcus aureus*, Compact Dry XSA.
- Incubadora Alemana, voltaje 120, con dimensiones de cámara interna de 0.42 x 0.32 x 0.32 con estantes de acero inoxidable.
- Tubos de ensayo

- Gradilla
- Mechero Bunsen
- Medios de cultivo
- Discos de sensibilidad de Tetraciclina (30 µg)
- Discos de sensibilidad de Amoxicilina (25 µg)

3.3.3 De oficina

- Esferos
- Corrector de tinta
- Computador
- Cámara fotográfica
- Hojas de papel A4

3.4 Metodología

3.4.1 Muestreo

La recolección de datos se realizó en el segundo trimestre del año 2018, aunque el estudio no tuvo una población como tal, se eligió la muestra en base a criterios de inclusión y exclusión de la siguiente manera:

Tabla 3

Criterios de selección

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Caninos entre 5-7 años	Caninos que no están entre 5-7 años
Caninos que presentan sarro moderado a grave	Caninos que no presentan sarro moderado a grave
Cajas de siembra que presentan <i>Staphylococcus aureus</i> en el diagnóstico rápido.	Cajas de siembra que no presentan crecimiento del microorganismo.

3.4.2 Obtención de la muestra

Se consideraron 30 perros, pacientes de la Empresa Doggies cake, sitio al que asisten propietarios que llevan a sus mascotas paulatinamente a control veterinario, peluquería, asesoramiento nutricional y alimentación formulada específicamente para las mascotas de casa. Los caninos tomados en cuenta en el estudio tenían entre 5-7 años, y presentaron sarro moderado a grave. Al grupo seleccionado se le realizó un lavado bucal, mediante una técnica experimental que consiste en:

- Aplicar a chorro el agua destilada sobre las piezas dentales que presentan acumulación de placa.
- Hisopar la boca de los caninos para obtener la muestra.
- Guardar la muestra en recipientes estériles, rotulados e identificados.

Posteriormente, se avanzó a la siguiente etapa, la cual consistió en la identificación de la bacteria, *Staphylococcus aureus*. Para esta etapa, se consideró la determinación de la prevalencia de *S. aureus*. Este dato es relevante, porque se logró verificar el estado de salud de los caninos o el número de casos que presentaron *Staphylococcus aureus* en alto número, es decir, se logró diferenciar entre una bacteria saprófita y una bacteria patógena. Este procedimiento se lo realizó de acuerdo con el manual de los kits diagnósticos rápidos, de la siguiente manera:

1. Se destapó la placa y se depositó en el centro de la placa Compact Dry, 1 ml de la muestra tomada de cada animal.
2. Automáticamente, la muestra se fue dispersando de manera homogénea sobre la superficie de la placa Compact Dry, obteniendo como resultado en segundos, la transformación de la lámina seca en un gel.
3. Se tapó la placa y se rotuló la muestra en el espacio destinado para escribir.
4. Se cerró la placa y se la colocó en la incubadora de manera invertida.
5. Se repitieron los pasos anteriores, con las demás placas.

6. Transcurrido el periodo de incubación (48 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$), se contó el número de colonias que se observaron de color azul claro.
7. Solo se tomó en cuenta las colonias de *Staphylococcus aureus*, ya que como se menciona en la prueba, existen otras colonias que pueden crecer, pero se visualizan de color blanco rojo y/o púrpura. Además, otras bacterias del género *Bacillus*, crecen y exhiben colonias de color azul o azul claro, pero son de mayor diámetro y planas.

Para la siguiente etapa se tomó en cuenta, los animales que resultaron positivos para la identificación de la bacteria y, se realizó la siembra:

1. Se inició, con la preparación del inóculo del microorganismo, *Staphylococcus aureus*, en 0.5 de la escala Mc Farland, para la determinación de las unidades formadoras de colonias.
2. Se trabajó cerca del mechero, para así esterilizar el asa, el tubo de ensayo y la caja Petri con agar, antes y después del proceso.
3. Con la mano izquierda, se tomó el tubo de ensayo y se lo destapó con el dedo meñique de la mano derecha, con el objetivo de tener mejor manipulación durante el proceso.
4. Una vez flameada la boca del tubo de ensayo y el asa, se introdujo el asa en el tubo de ensayo ligeramente inclinado, procurando no topar las paredes del tubo, para así cargarla con la suspensión.
5. Nuevamente, se flameo el tubo de ensayo y se lo tapó.
6. Apoyando suavemente el asa sobre la superficie, se realizó líneas o estrías sin destruir o dañar el medio de cultivo, que en este caso fue agar Manitol salado.
7. Se flameo el asa de Kolle.
8. Se rotuló la placa.
9. Se incubó a 35°C - 37°C durante 48 horas.
10. Transcurrido el tiempo especificado, se observó colonias de 0.5-1.5 mm de pigmentación amarilla, brillantes, de consistencia cremosa, lisas y elevadas.

11. Posteriormente, se realizaron pruebas de identificación para *Staphylococcus aureus*, tales como, catalasa y coagulasa

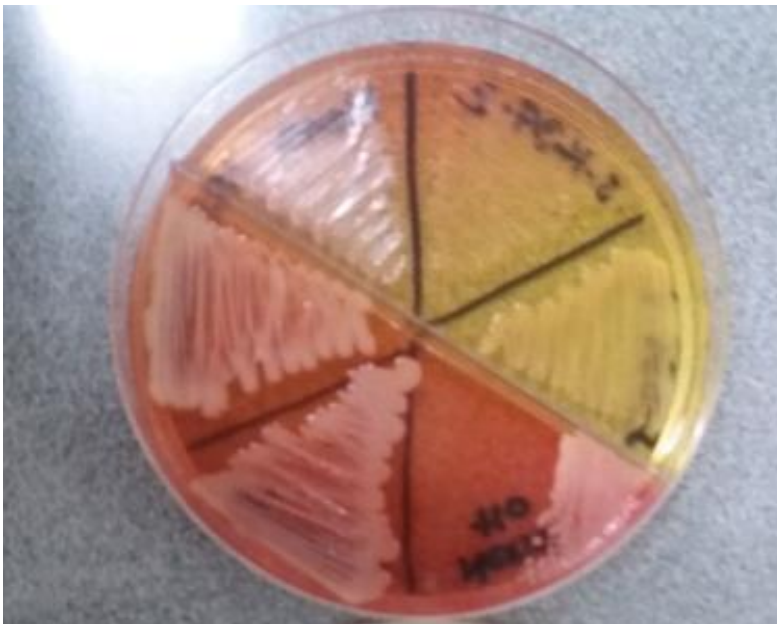


Figura 2. Bacteria en estudio, cultivada en agar manitol salado

3.4.3 Análisis de la muestra

La obtención del extracto se realizó por medio del método destilación agua-vapor, el cual consistió en:

1. Pesar las hojas trituradas en una balanza.
2. Colocar el producto en el destilador y remojarlo en tres litros de agua destilada.
3. Tapar el tanque de extracción y sellarlo herméticamente.
4. Someter a calentamiento, entre 100 a 200 °C durante una hora y cincuenta minutos, posteriormente recoger el producto.
5. Conservar el extracto en recipientes de vidrio ámbar.
6. Verificar la concentración a la cual la planta herbácea tiene un efecto antimicrobiano, probando las concentraciones al 25, 50, 75% y la solución madre.

3.4.4 Análisis del efecto antimicrobiano

Para la etapa final de este proceso, se utilizaron cajas Petri divididas, para que el extracto de la planta Stevia Rebaudiana y los antibióticos sintéticos no vayan a intervenir una con la otra.

1. De la bacteria cultivada, con un hisopo estéril se tomaron de 3 a 5 colonias de *Staphylococcus aureus*.
2. En un tubo de ensayo con 3 ml de solución salina, se introdujo el hisopo sin topar las paredes y se realizó la suspensión, recordando que antes de tapar y destapar el tubo con la solución se debe flamear la boca del tubo.
3. Se flameo la caja Petri con agar Müller Hilton, se la destapó e inmediatamente, con el hisopo se sembró la bacteria llevando el hisopo de un lado a otro, de manera vertical, horizontal y diagonal.
4. En el lado derecho de la caja Petri se colocaron los discos de antibióticos sintéticos, amoxicilina (25 µg), tetraciclina (30 µg).
5. Se utilizó papel filtro (6 mm) para realizar los discos de sensibilidad con las muestras obtenidas del extracto.
6. En el lado izquierdo de la caja Petri se colocaron los sensidiscos con extracto de Stevia al 25, 50, 75 % y la solución madre.
7. Se dejó en la incubadora durante 24 horas y se observó los resultados.
8. Se realizaron 10 repeticiones por concentración.
9. A la solución que hizo efecto el extracto se la analizó con HPLC.

3.5 Diseño Experimental

3.5.1 Variables

El estudio se llevó a cabo tomando en cuenta las siguientes variables:

Tabla 4
Variables

Variable	Característica	Tipo de variable	Definición	Indicador	Unidad de medida	Instrumentos
Halo de inhibición del extracto	Independiente	Cuantitativa/Continua	Anillo que se forma alrededor del compuesto (antimicrobiano)	Tamaño del halo	mm	Medición directa
Extracto de la Stevia Rebaudiana	Dependiente	Cualitativa/Discontinua	Concentración de extracto a ser utilizado	Cantidad de estevósido	%	Medición directa
Halo de inhibición de amoxicilina	Independiente	Cuantitativa/Continua	Anillo que se forma alrededor del compuesto	Tamaño del halo	mm	Medición directa
Halo de inhibición de tetraciclina	Independiente	Cuantitativa/Continua	Anillo que se forma alrededor del compuesto	Tamaño del halo	mm	Medición directa

3.5.2 Diseño experimental

- Estudio experimental: El trabajo evalúa el efecto antimicrobiano de la planta herbácea sobre la bacteria Gram positiva, *Staphylococcus aureus*, mediante la obtención, determinación del extracto de la Stevia y posterior realización del antibiograma con el compuesto para medir el halo de inhibición.
- Estudio de campo: Durante el estudio se tomaron muestras bucales de 30 caninos adultos (entre 5 y 7 años) de la Ciudad de Quito, de la parroquia el Batán, sector Norte.
- Estudio transversal: en el estudio se trabajó en el segundo trimestre del año 2018, únicamente con la muestra bucal de los caninos, más no con el paciente.

3.5.3 Análisis estadístico

Se utilizará la prueba de bondad de ajuste Kolmogorov, para conocer si los datos siguen una distribución normal. Posteriormente, se usará la prueba de Kruskal Wallis, ya que los datos son no paramétricos. Además, esta prueba indicará también si existe diferencia entre las medias obtenidas en los halos de inhibición del extracto de la planta Stevia y los antibióticos comerciales. Finalmente, la comparación post hoc determinan que medias son las que difieren.

Capítulo IV: Resultados y Discusión

4.1 Resultados

La prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov Smirnov permite determinar si los datos siguen una distribución normal, para así aplicar pruebas paramétricas o no paramétricas.

La prueba de Kruskal Wallis, permite decidir si se acepta la hipótesis de que k muestras independientes provienen de una misma población o de poblaciones similares con la misma mediana. El único supuesto es que las distribuciones subyacentes de las variables sean continuas y que haya sido medidas en una escala ordinal (Sánchez, 2004). Por lo que, este análisis se utilizará para determinar si existe diferencia entre el extracto de las hojas de *Stevia rebaudiana* y los antibióticos comerciales.

Posteriormente, se utilizará la comparación post hoc, para conocer cual de las medias son las que difieren.

Tabla 5

Halos de inhibición con el extracto al 25%

Repetición 1	0 mm
Repetición 2	0 mm
Repetición 3	0 mm
Repetición 4	0 mm
Repetición 5	0 mm
Repetición 6	0 mm
Repetición 7	0 mm
Repetición 8	0 mm
Repetición 9	0 mm
Repetición 10	0 mm

Halos de inhibición con el extracto de *Stevia* al 25% medido en milímetros

Tabla 6

Halos de inhibición con el extracto al 50%

Repetición 1	0 mm
Repetición 2	0 mm
Repetición 3	0 mm
Repetición 4	0 mm
Repetición 5	0 mm
Repetición 6	0 mm
Repetición 7	0 mm
Repetición 8	0 mm
Repetición 9	0 mm
Repetición 10	0 mm

Halos de inhibición con el extracto de Stevia al 50% medido en milímetros*Tabla 7*

Halos de inhibición con el extracto al 75%

Repetición 1	2 mm
Repetición 2	1.6 mm
Repetición 3	1 mm
Repetición 4	1.5 mm
Repetición 5	1.2 mm
Repetición 6	1.5 mm
Repetición 7	2 mm
Repetición 8	1.2 mm
Repetición 9	1.3 mm
Repetición 10	1.4 mm

Halos de inhibición con el extracto de Stevia al 75% medido en milímetros

Tabla 8

Halos de inhibición con la solución madre

Repetición 1	10 mm
Repetición 2	9.3 mm
Repetición 3	9.4 mm
Repetición 4	9.6 mm
Repetición 5	9.5 mm
Repetición 6	9.2 mm
Repetición 7	8.9 mm
Repetición 8	9.3 mm
Repetición 9	9.4 mm
Repetición 10	8.4 mm

Halos de inhibición con la solución madre de Stevia medido en milímetros

Tabla 9

Halos de inhibición con tetraciclina

Repetición 1	33 mm
Repetición 2	33 mm
Repetición 3	33 mm
Repetición 4	33 mm
Repetición 5	33 mm
Repetición 6	33 mm
Repetición 7	33 mm
Repetición 8	33 mm
Repetición 9	33 mm
Repetición 10	33 mm

Halos de inhibición con tetraciclina medido en milímetros

Tabla 10

Halos de inhibición con amoxicilina

Repetición 1	21 mm
Repetición 2	21 mm
Repetición 3	21 mm
Repetición 4	21 mm
Repetición 5	21 mm
Repetición 6	15 mm
Repetición 7	21 mm
Repetición 8	21 mm
Repetición 9	21 mm
Repetición 10	21 mm

Halos de inhibición con amoxicilina medido en milímetros

Tabla 11

Prueba de bondad de ajuste (Kolmogorov-Smirnov)

Variable	n	Media	Ajuste	Varianza	Estadístico D	P valor
HALO DE INHIBICIÓN	60	10.70	Normal (0.1)	154.41	0.53	0,0001

Puesto que el valor p es < 0.05 , indica que los datos no siguen una distribución normal.

Tabla 12

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	p
TRATAMIENTO						
HALO DE INHIBICIÓN DEL EXTRACTO AL 25%	10	0.00	0.00	0.00	5	0,0001
HALO DE INHIBICIÓN DEL EXTRACTO AL 50%	10	0.00	0.00	0.00		
HALO DE INHIBICIÓN DEL EXTRACTO AL 75%	10	1.47	0.33	1.45		
HALO DE INHIBICIÓN SOLUCIÓN MADRE	10	9.30	0.42	9.35		
HALO DE INHIBICIÓN TETRACICLINA	10	33.00	0.00	33.00		
HALO DE INHIBICIÓN AMOXICILINA	10	20.40	1.90	21.00		

Puesto que el valor p es < 0.05 , al menos una de las medias es distinta.

Tabla 13

Comparación post hoc.

TRATAMIENTO	\bar{x}	\pm SD	Análisis no paramétrico
Tetraciclina	33,00 mm	0,00	D
Amoxicilina	20,40 mm	1,90	C D
Solución Madre	9,30 mm	0,42	B C
Solución al 75% de Stevia	1,47 mm	0,33	A B
Solución al 50% de Stevia	0,00 mm	0,00	A
Solución al 25% de Stevia	0,00 mm	0,00	A

Las medias con una letra común no son significativamente diferentes, es decir que estadísticamente la solución del extracto de la Stevia al 75% y la solución madre realizan un mismo efecto. De igual manera, la solución madre y la amoxicilina tienen una misma acción.

4.2 Discusión

En este estudio se demuestra que el extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* posee efecto antimicrobiano sobre una de las bacterias presentes en los caninos, *Staphylococcus aureus*. En este trabajo, se obtuvo una media de halo de inhibición de 9.30 mm con la solución madre, la cual, por medio de HPLC, se determinó que la solución tiene 5.39% de rebaudiósido A y 12.57% de esteviósido. Con la solución al 75%, se consiguió una media de halo de inhibición de 1.47 mm, con 4.13% de rebaudiósido A y 8.92% de esteviósido. Mientras que, con las otras concentraciones, al 25 y 50% no se observó la formación de un halo de inhibición.

La *Stevia rebaudiana* es una planta que contiene en sus hojas 0.3% de Dulcósido, 0.6% de Rebaudiósido C, 3.8% de Rebaudiósido A y 9.1% de Esteviósido. Siendo el esteviósido, el que posee efecto sobre las enzimas que

se encargan de la descomposición de azúcares, este compuesto inhibe el glucano, por tanto, aunque la planta *Stevia rebaudiana* es un edulcorante, no es fermentado en ácidos por las bacterias (Cáceres, 2017).

Lo dicho anteriormente, se evidenció en un estudio realizado por Ghosh, Subudhi y Nayak en 2008, en donde el extracto de las hojas de *Stevia* eran sometidas a un ensayo microbiano, usando seis solventes, tales como, agua, éter de petróleo, extracto de acetona, ciclohexano y cloroformo, frente a diez patógenos, micóticos (*Alternaria solani*, *Helminthosporium solani*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*) y patógenos bacterianos (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*). En dicha investigación, se obtuvo que la actividad antimicrobiana del extracto de agua va contra *E. Coli*, *S. aureus*, y *B. subtilis*. Además, *S. aureus* y *P. chrysogenum* exhibieron el mayor rango de susceptibilidad frente a otros tres extractos, tales como, éter de petróleo, ciclohexano y cloroformo. Por otra parte, el halo de inhibición que se presentó con el extracto acuoso de *Stevia* contra *S. aureus* fue de 9.3 mm.

Además, también se justifica con la investigación de Tadhani y Subhash en 2006, en donde utilizaron el extracto acuoso de *Stevia*, extracto metanoico de *Stevia*, acetato de etilo, extracto hexanoico de *Stevia* frente a distintos microorganismos, tales como, *M. luteus*, *S. marcenscens*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *Yeast*, *R. oligosporus*, *A. niger*. Los resultados evidenciados con el extracto acuoso de *Stevia* arrojaron que únicamente contra dos microorganismos, se observó una actividad antimicrobiana, *B. subtilis* y *S. aureus*, con un halo de inhibición de 8.33 mm y 9.33 mm respectivamente.

Es pertinente mencionar que, Jayaraman, Saravanan y Illanchezian en 2008 evaluaron las actividades antimicrobianas, antifúngicas y tumorales del extracto de las hojas de *Stevia*, mediante cuatro solventes, acetato de etilo, acetona, cloroformo y agua. El extracto fue investigado contra microorganismos bacterianos, tales como, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Aeromonas hydrophila* y *Vibrio cholerae* mediante el

método de difusión de pozos de agar. También, frente a hongos como, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton mentagrophytes* y especies de *Epidermophyton*. Los resultados entre los cuatro extractos probados fueron que, el extracto de acetona tuvo un potencial antibacteriano efectivo, seguido por el extracto de acetato de etilo. El extracto de acetona mostró una mayor actividad contra organismos Gram positivos que contra organismos Gram negativos, todos los extractos fueron activos contra especies de *Epidermophyton* y *Candida albicans*. Sin embargo, el extracto de hojas de *Stevia rebaudiana* obtenido por agua fue prácticamente ineficaz contra los microorganismos bacterianos. Aunque, la investigación no menciona la cantidad de extracto utilizado, sin embargo, los resultados obtenidos coinciden con lo obtenido con las soluciones al 25% y 50% del extracto de la planta *Stevia rebaudiana*.

Por otro lado, en cuanto a los resultados que se observaron con la amoxicilina y tetraciclina frente al *Staphylococcus aureus*. Indicaron que, la media del halo de inhibición de la amoxicilina fue de 20.4 mm, es decir de las 10 repeticiones realizadas, solo una reaccionó de manera diferente, obteniendo 15 mm de halo de inhibición. Mientras que, con la tetraciclina, el halo de inhibición fue de 33 mm en todas las repeticiones.

Se menciona que, la amoxicilina es un antibiótico que mata a las bacterias que son sensibles a ella, es decir es un bactericida, por lo que detiene la reproducción de estos organismos. Este fármaco elimina muchas bacterias aerobias Gram negativas, siendo su acción mejor que la penicilina natural. Sin embargo, la amoxicilina no es la de primera elección contra las bacterias que generan betalactamasas, como *Staphylococcus aureus* (Ramsey, 2014 p. 63). Debido a esta explicación, pudo haberse dado ese resultado inesperado.

Por otro parte, en la investigación de la determinación de la sensibilidad a la amoxicilina y a la clindamicina de *Staphylococcus spp* aislado de cavidad oral de pacientes con alto riesgo de endocarditis infecciosa, obtuvieron que de 46 pacientes el 28.2% se identificaron *Staphylococcus spp*. de los cuales, 61.5% fueron *Staphylococcus aureus*, el 30.7% *S. epidermidis* y 7.6% *S. hominis*. Los

resultados hallados fueron que el 30.8% los *Staphylococcus spp* fueron resistentes a la clindamicina y 76.9%, a la amoxicilina. Llegando a la conclusión de que, los antibióticos utilizados en odontología como, amoxicilina y clindamicina dejan un gran porcentaje de microorganismos sin cubrir como lo fue el *Staphylococcus spp* (Barrientos et al, 2011).

En cuanto a, la tetraciclina fue el compuesto con el que se obtuvo mayor tamaño de halo de inhibición. Esto se sustenta porque es uno de los grupos de antibióticos de amplio espectro, dichos compuesto son antibióticos bacteriostáticos. Sin embargo, se conoce que tienen acción bactericida al utilizar en contra de patógenos bacterianos susceptibles o al emplearlos en altas concentraciones. Estos medicamentos generan la inhibición de síntesis proteica en los ribosomas bacterianos y las células eucariotas de la mayoría de los mamíferos. Además, se ha evidenciado que la tetraciclina altera la membrana citoplasmática, es decir permite la salida de componentes intracelulares (Pérez e Iglesias, 2003).

Por el contrario, Khan y Novick en 1983, realizaron una investigación acerca de que el *Staphylococcus aureus* posee resistencia a la tetraciclina, debido a la presencia de un plásmido (pT181) de origen natural que codifica resistencia inducible a dicho antibiótico. El plásmido tiene un número de copia de aproximadamente 20 por célula y pertenece al grupo de incompatibilidad inc3. Se descubrió que pT181 contenía cuatro marcos de lectura abiertos capaces de codificar polipéptidos que contienen más de 50 aminoácidos. Todos los polipéptidos putativos están codificados por una cadena. El polipéptido A corresponde a la proteína repC, que se mostró específicamente requerida para la replicación de pT181. El polipéptido B (y posiblemente el polipéptido D) están implicados en la resistencia a la tetraciclina. Los resultados de la secuenciación se discuten en relación con las propiedades de replicación y la resistencia a la tetraciclina asociada con el plásmido pT181.

Finalmente, esta planta puede ser utilizada para elaboración de productos en conjunto con algún otro elemento. Adicionalmente, esta investigación da paso a

posteriores formulaciones nutricionales, en las cuales se podría probar la inclusión de Stevia con fines preventivos.

4.3 Limitantes

Para que la investigación tenga mayor impacto, se deben hacer más trabajos de este tipo en medicina veterinaria. Ya que, en odontología humana, se han obtenido resultados favorables. Por otra parte, el enfrentar a la planta a otras bacterias podría arrojar resultados favorecedores, con los cuales se puede incluir a la Stevia como método preventivo o en formulaciones nutricionales, por tema de costos solo se probó con una bacteria.

Además, analizar el extracto a profundidad y a concentraciones mayores, ya que como explica la bibliografía y como se evidenció con esta investigación a mayor concentración, mayor es el halo de inhibición. No se realizó con más concentraciones porque pocos son los laboratorios que realizan HPLC para Stevia, ya que, no existen o no le dan mucha importancia al efecto antimicrobiano de un producto natural, este análisis tiene un precio alto o no analizan todos los compuestos que la planta posee.

Capítulo V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- El estudio permitió evaluar el efecto antimicrobiano que posee el extracto de la planta *Stevia rebaudiana* sobre *Staphylococcus aureus*, hallando que al 75% y la solución madre existe una acción.
- Se determinó que, del grupo de treinta caninos, el 40% de la población presentó la bacteria, *Staphylococcus aureus* en la boca, mismos animales que presentaron sarro moderado a grave.
- Se comparó el halo de inhibición de los antibióticos comerciales y el del extracto de la planta y se obtuvo que el mayor halo de inhibición se formó con los antibióticos tetraciclina y amoxicilina, 33 mm y 21 mm, respectivamente. Para la solución madre, se evidenció un halo de inhibición de 9.30 mm y para la concentración al 75% un halo de inhibición de 1.47 mm. Por lo que se menciona que la *Stevia Rebaudiana* si posee un efecto antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus* y es posible incluirla en formulaciones nutricionales o usarla como método preventivo.

5.2 Recomendaciones

- Realizar otra investigación con muestras tomadas de la piel de los caninos, para probar la inclusión de la *Stevia* con más de un objetivo.
- Probar distintos extractos de productos naturales, para evidenciar cual de estos posee un efecto antimicrobiano.
- Comparar el extracto de la planta *Stevia rebaudiana* con diferentes microorganismos, para conocer contra cuál de estos llegan a ser realmente efectiva.

REFERENCIAS

- Ancalli, F. (2014). *DETERMINACION DE LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS Y ORGANOLÉPTICAS DEL ZUMO MIX DE MULLACA Y NARANJA EDULCORADO CON STEVIA* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Huancavelica, Perú.
- Barrientos, S., Gómez, M., Diez, H., Alarcón, E., Yabrudy, N., Molina, G. (2011). *Determinación de la sensibilidad a amoxicilina y a clindamicina de Staphylococcus spp aislado de cavidad oral de pacientes con alto riesgo de endocarditis infecciosa*. Revista LOGOS.
- Cáceres, N. (2017). *EFFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DEL EXTRACTO DE Stevia rebaudiana SOBRE EL Streptococcus mutans, PUNO-2017* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional del Antiplano, Perú
- Cervantes, E., García, R., Paz, M. (2014). *Características generales del Staphylococcus aureus*. [archivo PDF]. México, D.F. Mediagraphic. Recuperado de: <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>
- Cháves, M., Chavarría, E. (2011). *Stevia: endulzante natural de gran potencial comercial*. Recuperado de: <https://www.laica.co.cr/biblioteca/servlet/DownloadServlet?c=443&s=2521&d=5939>
- Contreras, M. (2013). *Anticariogenic properties and effects on periodontal structures of Stevia rebaudiana Bertoni*. Narrative review. Journal of Oral Research, 2 (3), 158-166.
- Díaz, A. (2009). *Diseño estadístico de experimentos* (2a. ed.). Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia.
- Giraldo, C., Marín, L., Habeych, D. (2005). *Obtención de edulcorantes de Stevia Rebaudiana Bertoni*. [archivo PDF]. Cuba. Redalyc. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181220525077.pdf>
- Gutiérrez, H., Salazar, R. (2008). *Análisis y diseños de experimentos* (2a. ed.). México D.F., México: McGraw-Hill Interamericana.

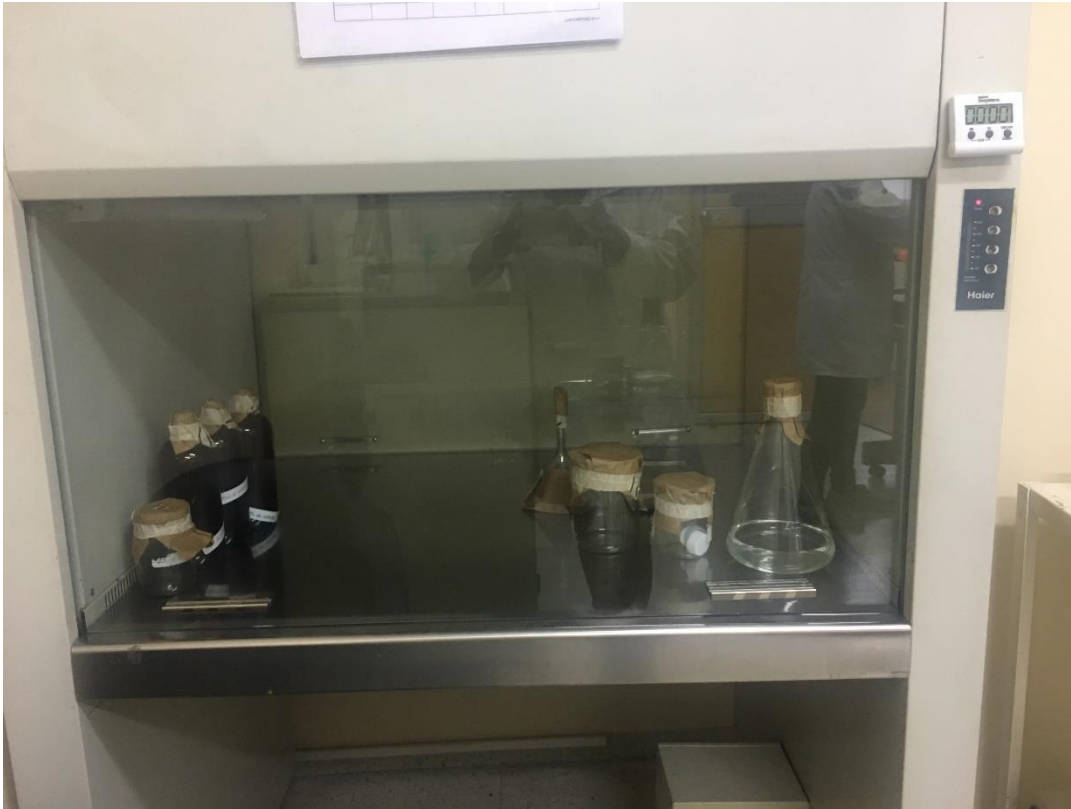
- Jiménez, T., Cabrera, G., Álvarez, E., Gómez, F. (2010). *Evaluation of the content of stevioside and rebaudioside A in a population of Stevia Rebaudiana commercially cultivated. A preliminary study*. Memorias del instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, 8(1), 47-53.
- Juca, A. (2016). *Evaluación del efecto antimicrobiano del extracto de la Stevia Rebaudiana* (Tesis de pregrado). Universidad de las Américas, Ecuador.
- Khan, S., Novick, R. (1983). *Complete nucleotide sequence of pT181, a tetracycline-resistance plasmid from Staphylococcus aureus*. International Journal of Medical Microbiology.
- Lindsay, J. (2014). *Staphylococcus aureus genomics and the impact of horizontal gene transfer*. International Journal of Medical Microbiology.
- López, L., Peña, L. (2004). *PLAN ESTRATEGICO PARA LA CREACIÓN DE UNA EMPRESA DEDICADA A LA PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DE EDULCORANTE A BASE DE STEVIA*. [archivo PDF]. Universidad Javeriana. Recuperado de: https://aseretselene.files.wordpress.com/2010/08/tesis_industrial_de_la_stevia.pdf
- Llacta, M. (2014). *EXTRACCIÓN DE EDULCORANTE-A PARTIR DE LA HOJA DE STEVIA (Stevia rebaudiana Bertoni) PROVENIENTE DE CULTIVO INVITRO*. Universidad de Huancavelica, Perú.
- Martínez, M. (2005). *Microorganismos asociados a infecciones por mordeduras de perros y gatos*. [archivo PDF]. Chile. Recuperado de: <http://www.patologiaveterinaria.cl/Monografias/MEPAVET1-2005/PDF/MEPAVET07.pdf>
- Martínez, P. (2000). *La hierba dulce, historia, usos y cultivo de Stevia rebaudiana Bertoni*. Ciencias de la salud. Madrid.
- Martínez, M. (2015). *Stevia Rebaudiana Bertoni. Una revisión*. Recuperado de: <http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v36s1/ctr01s115.pdf>
- Martínez, T. (2002). *La hierba dulce. Historia, usos y cultivo de la Stevia Rebaudiana Bertoni*. Recuperado de:

www.ecostevia.es/app/download/.../La+hierba+dulce.+Historia%2C+usos+y+cultivo.pdf

- Mendoza, N., Campos, A. (s.f.). *Tetracilinas*. Recuperado de: <http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no51-1/RFM051000106.pdf>
- Núñez, P. (2016). *Estadificación de los grados de severidad de la periodontitis en caninos en base al conteo leucocitario en el líquido gingivo crevicular* (Tesis de pregrado). Universidad de las Américas, Ecuador.
- OMS. (2017). Resistencia a los antibióticos. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/es/>
- Paredes, A., Naranjo, M. (2016). *La Stevia rebaudiana como coadyuvante en la prevención y el control de la caries dental: una revisión de literatura*. [archivo PDF]. Colombia. ACTA. Recuperado de: <http://www.bdigital.unal.edu.co/60140/1/61751-313873-1-SM.pdf>
- Pérez, S. (2013). *Efecto antimicrobiano in vitro del extracto etanólico de Stevia rebaudiana sobre Streptococcus mutans ATCC 25175*. Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Pérez, E., Iglesias L. (2003). *Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol*. Recuperado de; <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-tetraciclinas-sulfamidas-metronidazol-S0213005X09005187>
- Ramsey, I. (2014). *Vademécum farmacológico de pequeños animales y exóticos* (7. ° ed.). Barcelona: BSAVA.
- Sánchez, J. (2004). *Introducción a la estadística no paramétrica y al análisis multivariado*. Quito, Ecuador: Quality printed.
- Jayaraman, S., Manoharan, M., Illanchezian S. (2008). *In-vitro Antimicrobial and Antitumor Activities of Stevia Rebaudiana (Asteraceae) Leaf Extracts*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research.
- Shyamapada, M., Manisha, D., Nishith, K., Krishnendu, S. (2010). *Synergistic anti-Staphylococcus aureus activity of amoxicillin in combination with Emblica officinalis and Nymphae odorata extracts*. International Journal of Medical Microbiology.

- Tadhani, M., Subhash, R. (2006). *In Vitro Antimicrobial Activity of Stevia Rebaudiana Bertoni Leaves*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research
- Tennat, B. (2012). *Vademécum farmacológico de pequeños animales y exóticos* (5. ° ed.). Barcelona: BSAVA.
- Ghosh, S., Subudhi, E., Nayak, S. (2008). *Antimicrobial assay of Stevia rebaudiana Bertoni leaf extracts against 10 pathogens*. International Journal of Integrative Biology.

ANEXOS



Anexo 1. Cámara de flujo laminar con materiales de laboratorio



Anexo 2. Diluciones del extracto con agua destilada y esterilizada



Anexo 3. Rotulación de muestra.



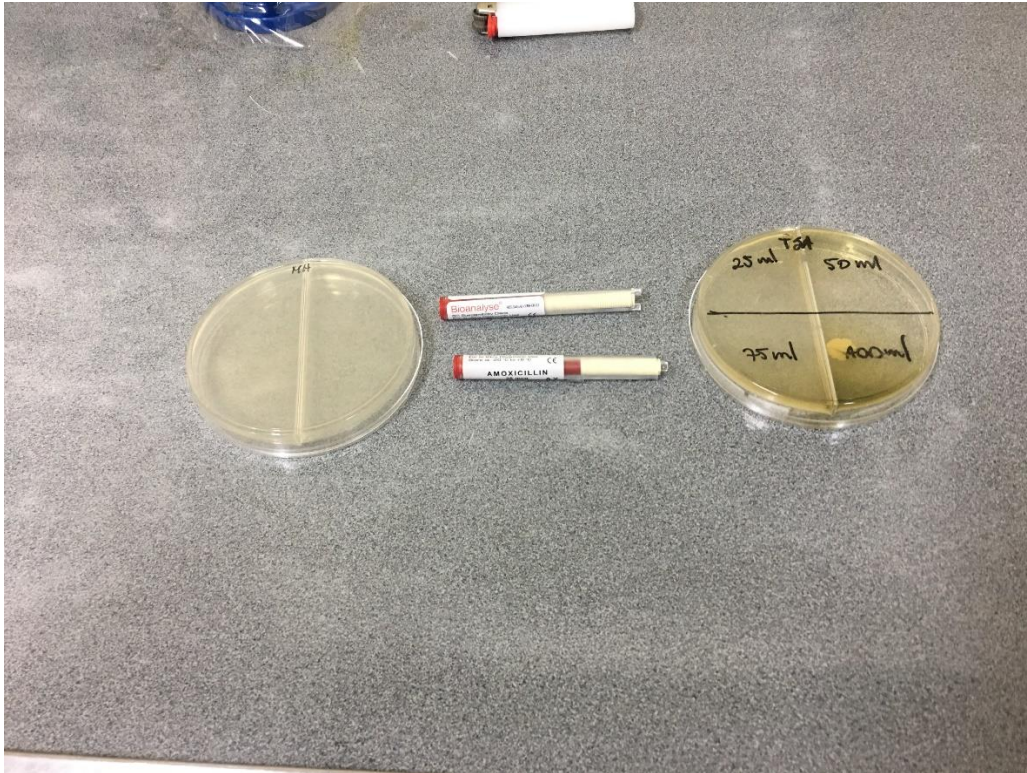
Anexo 4. Materiales utilizados para la prueba de esterilidad



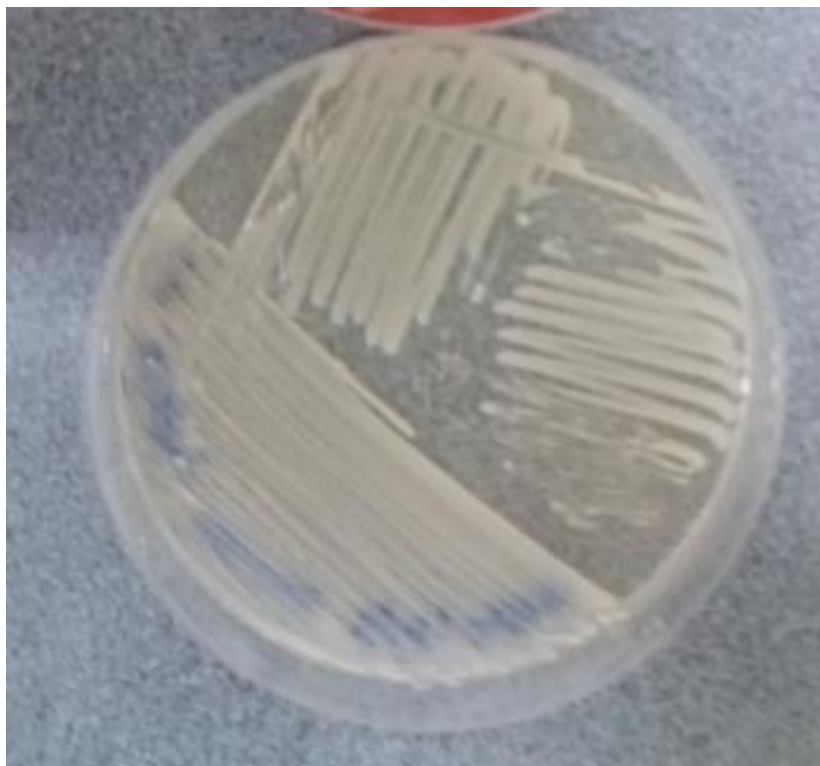
Anexo 5. Esterilización de Asa en mechero



Anexo 6. Estriación con Asa



Anexo 7. Caja Petri con la bacteria, discos de antibióticos, prueba de esterilidad del extracto



Anexo 8. Staphylococcus aureus en agar Triptona Soja



Anexo 9. Compact dry con *Staphylococcus aureus*



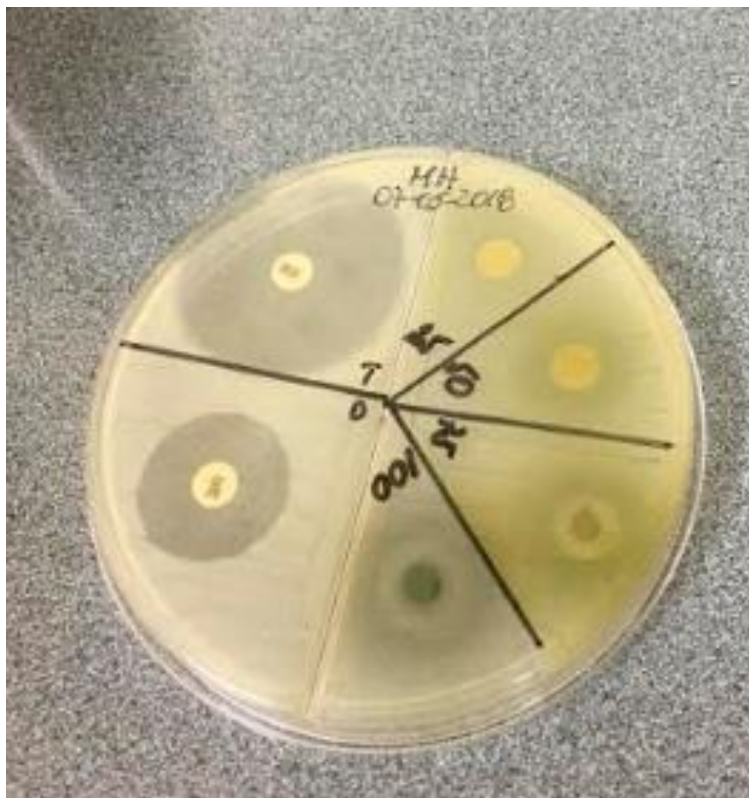
Anexo 10. Caja Petri con discos de sensibilidad de antibióticos y del extracto



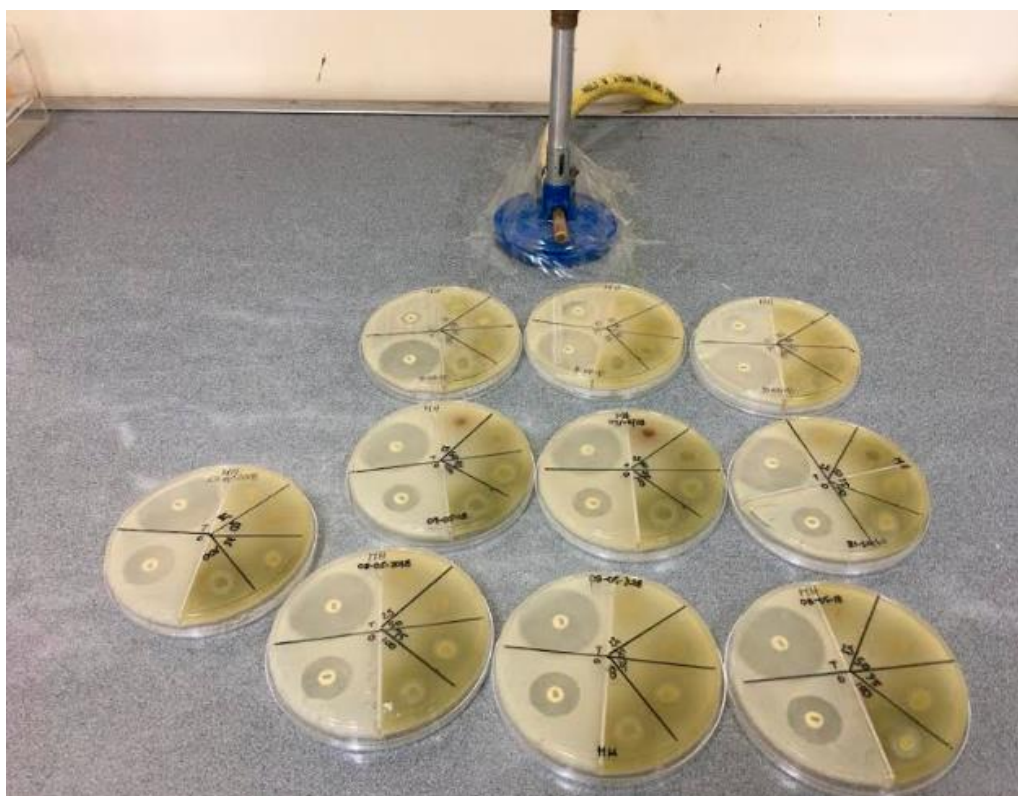
Anexo 11. Caja Petri con discos de sensibilidad y concentraciones del extracto



Anexo 12. Halos de inhibición



Anexo 13. Halos de inhibición



Anexo 14. Repeticiones de las concentraciones del extracto y antibióticos



Anexo 15. Boca de canino con sarro

