



ESTUDIO IN VITRO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE *STEVIA REBAUDIANA BERTONI* SOBRE *STREPTOCOCCUS MUTANS* Y *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

Trabajo de Investigación  
Requisito para optar al  
Título de Cirujano Dentista

Alumnas: Estefanía Chamorro Urzúa.  
Diana Valencia Vallejos.

Docente guía: Prof. Dr. Rodrigo Fuentes Cortés.  
Cátedra de Patología y Diagnóstico Oral

Valparaíso- Chile  
2013



## **AGRADECIMIENTOS**

Dr. Rodrigo Fuentes Cortés le agradecemos por su paciencia y crítica constructiva. Debido a estas virtudes enriqueció nuestro aprendizaje en la metodología de este trabajo de investigación.

Dr. Jorge Torres le estamos muy agradecidas por ayuda y asesoría en materia de microbiología y técnicas de laboratorio. Le agradecemos su excelente disposición de colaboración con la presente investigación.

Sr. Javier Sainz le agradecemos por el apoyo e interés en la investigación

Dr. Pieringer le agradecemos por darnos sugerencias y ayudarnos con la etapa de laboratorio.

Francisco, Don Humberto, Don José, Don Carlos por abrirnos el laboratorio y esperarnos al cerrar.

Todos aportaron para el desarrollo de la presente investigación, gracias.

## INDICE

<b>I. Introducción</b>	1
<b>II. Marco Teórico</b>	3
II.1 Estevia	3
II. 1.1 Historia, Composición y Farmacocinética	3
II. 1.2 Propiedades antimicrobianas, Mecanismos de acción, toxicidad	8
II. 1.3 Obtención del extracto de estevia	11
II. 2 Microbios de referencia del Biofilm bucal para estudios <i>in vitro</i>	15
II.2.1 <i>Streptococcus mutans</i>	15
II.2.2 <i>Enterococcus faecalis</i>	16
II. 3 Medios de cultivo	17
<b>III. Objetivos</b>	23
<b>IV. Hipótesis</b>	23
<b>V. Materiales y Métodos</b>	24
1. Diseño	24
2. Universo	24
3. Muestra	24
4. Selección y tamaño de la muestra	24
5. Criterios de inclusión	25
6. Criterios de exclusión	25
7. Variables	26
8. Definiciones conceptuales y operacionales	26
9. Procedimiento experimental	27
<b>VI. Resultados</b>	31
VI. 1 Estadística descriptiva	31
VI. 2 Análisis estadístico	37

<b>VII. Discusión</b>	.....	<b>43</b>
<b>VIII. Conclusiones</b>	.....	<b>47</b>
<b>IX. Sugerencias</b>	.....	<b>48</b>
<b>X. Resumen</b>	.....	<b>49</b>
<b>XI. Referencias Bibliográficas</b>	.....	<b>50</b>
<b>XII. Anexos</b>	.....	<b>56</b>

## I. INTRODUCCION

Las enfermedades bucales son una de las enfermedades crónicas más comunes y constituyen un importante problema de salud pública debido a su alta prevalencia y al elevado costo de su tratamiento. Las patologías bucales más prevalentes en el mundo, así como en nuestro país, son la caries dental y las enfermedades del periodonto.

Debido a la alta prevalencia de caries dental en nuestra población y a las consecuencias que genera la falta de tratamiento oportuno, es que resulta de suma importancia lograr un efectivo control de la infección bucal mediante el cepillado y la utilización de productos antimicrobianos naturales y sintéticos. En la actualidad, existe una gran variedad de sustancias naturales que se utilizan en el área de la salud, tanto de forma preventiva como terapéutica, otorgando buenos resultados al utilizarlas de forma complementaria a los tratamientos médicos y dentales tradicionales.

Una de las plantas que ha sido objeto de investigación es la *Stevia Rebaudiana Bertoni*. En el plano internacional actual el uso más importante de la estevia se encuentra en la industria alimenticia y de bebidas, principalmente como edulcorante y saborizante. Existen estudios científicos que apoyan la utilización de estevia como edulcorante en Japón, Brasil y Dinamarca, entre otros países. Alrededor de 1500 investigaciones científicas se han originado solamente en Japón. Los estudios más conocidos confirman por un lado la seguridad del uso de estevia en diabéticos, y por el otro su propiedad inhibitoria de biofilm dental, y por lo tanto su capacidad para reducir caries. Diversos estudios realizados con estevia indican que ésta presenta propiedades antimicrobianas

Esta tesis busca detectar el posible efecto antimicrobiano en cultivos de patógenos orales, mediante la utilización de distintas concentraciones de estevia. La determinación de estas concentraciones permitirá el desarrollo potencial de nuevas

formulaciones antimicrobianas para uso odontológico, tales como dentífricos y colutorios.

La relevancia de este estudio se encuentra en el conocimiento que aportará a las escasas investigaciones científicas existentes en Chile sobre las propiedades antimicrobianas de sustancias naturales, específicamente de la estevia.

## II. MARCO TEORICO

### II.1 Estevia

#### II.1.1 Historia, composición y farmacocinética

##### Historia

La estevia es un arbusto pequeño originario de Sudamérica, específicamente de Brasil y Paraguay donde se le conoce como hoja de estevia o miel Kaa-he-e (Hanson & De Oliveira, 1993). Los pueblos nativos de América del Sur han usado estevia en la medicina tradicional como edulcorante por varios cientos de años (Kinghorn & Soejarto, 2002). A pesar de que los conquistadores españoles tuvieron conocimiento de esta planta en el siglo XVI, no atrajo su atención sino hasta fines del Siglo XIX, cuando fue descrita por primera vez en la literatura científica por el Dr. Moisés Santiago Bertoni, momento a partir del cual recibió el nombre científico *Stevia Rebaudiana Bertoni*. Existen más de 300 variedades de estevia en la selva Paraguayo-Brasilera, pero la *Stevia Rebaudiana Bertoni* es la única con propiedades endulzantes gracias a su principio activo, denominado “esteviósido”.

##### Composición

La hoja de estevia, en su estado natural, posee gran cantidad de nutrientes, que en orden de concentración son:

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

El glucósido que se encuentra en mayor proporción en la estevia es el esteviósido, generalmente entre un 5 a 10% del peso de la hoja y en menor medida, del 2 a 3% rebaudiósidos de tipo A, B, C, D, E y dulcósidos A y B. El esteviósido es un glucósido diterpenoide, que está formado por una aglicona (esteviol) y tres moléculas de glucosa. Además de esteviósido, de la hoja de estevia se pueden aislar varios otros compuestos dulces como el esteviosido y rebaudiósido A, B, C, D y E. Todos estos glucósidos diterpenoides tienen el mismo compuesto químico de cadena principal (esteviol), pero difieren en los residuos de carbohidratos en las posiciones C13 y C19 (Shibata et al., 1995). Los componentes principales de la hoja son el esteviósido (5-10% del peso seco total), el rebaudiósido A (2-4%), rebaudiósido C (1-2%) y dulcósido A (0.4-0.7%) (Wood et al., 1955). La dulzura de estos glucósidos en comparación con la sacarosa es de 50 a 120 veces para el dulcósido A, de 250 a 450 veces para el rebaudiósido A, de 300 a 350 veces para el rebaudiósido B, de 50 a 120 veces para el rebaudiósido C, de 250 a 450 veces para el rebaudiósido D, de 150 a 300 veces para el rebaudiósido E, de 100 a 125 veces para el esteviosido y de 300 veces para el esteviósido (Crammer y Ikan, 1986). Junto con dulzura, el esteviósido posee algunos regustos amargos y no deseables (Jakimovich et al., 1990). Sin embargo, este problema puede ser resuelto por modificación enzimática del esteviósido con pullanasa isomaltasa (Lobov et al., 1991),  $\beta$ -galactosidasa (Kitahata et al., 1989), o dextrina sacarasa (Yamamoto et al., 1994). El esteviósido es considerado como un sustituto del azúcar y edulcorante comercial, tanto en la forma de esteviósido y de extracto de estevia (Kinghorn & Soejarto, 1985; Brandle & Rosa, 1998).

La estevia es soluble en agua fría o caliente, no tiene nutrientes ni calorías, se puede hornear (es estable a los 200°C), no se fermenta, y no tiene efectos tóxicos.

### **Farmacocinética**

1. **Absorción:** El esteviósido, es un glucósido diterpenoide hidrófilo con un peso molecular relativamente alto (804,9). Por este motivo es poco probable que se absorba en el intestino. Además los jugos gástricos y enzimas digestivas de los animales y los seres humanos no han logrado degradarlo (Wingard et al.,

1980; Hutapea et al, 1997; Koyama et al, 2003a). Sin embargo, la flora bacteriana intestinal de ratas (Wingard et al., 1980), ratones (Hutapea et al., 1997), cerdos (Geuns et al., 2003a) y humanos (Gardana et al, 2003; Koyama et al., 2003) son capaces de convertir el esteviósido en su aglicona, el esteviol. La responsable de esta conversión en ratas y humanos es la bacteria *Bacteroides sp.* (Gardana et al., 2003). Estudios en humanos demostraron que después de 3 días de consumo de esteviósido (750 mg / día), no aparece ninguna cantidad medible de esteviósido en las heces, mientras que el esteviol libre si estaba presente (Geuns, 2007). Estudios experimentales en rata demostraron que la absorción de esteviol es mucho mayor que la de esteviósido (Geuns et al., 2003a). Investigaciones de las propiedades de transporte de esteviósido y esteviol en monocapas de líneas celulares humanas Caco-2 indicaron que el transporte de esteviósido es muy bajo, mientras que el transporte de esteviol es mucho más rápido y en favor de una gradiente de concentración. Además, el mecanismo de absorción del esteviol implica tanto difusión pasiva como transporte a través de un transportador monocarboxílico. Estos datos indican que en una ingestión oral de esteviósido, es el esteviol el que es absorbido por el intestino a la sangre.

2. **Distribución:** La distribución del esteviol en órganos vitales como el cerebro y el corazón se considera desfavorable ya que puede inducir reacciones adversas, mientras que para fines terapéuticos, la acumulación preferencial de esteviol en el órgano diana se considera deseable. El máximo nivel de radiactividad en sangre después de una dosis oral de 3H-esteviósido en ratas se encontró 8 horas después de la administración con una vida media de eliminación de 24 horas. El análisis de los niveles de radiactividad en los órganos principales demostró acumulación preferencial en el intestino delgado y grueso (Nakayama et al., 1986). La administración intravenosa de esteviósido radiactivo en ratas arrojó radioactividad en el corazón, estómago, testículos y músculo en un porcentaje menor al 1,8% de la dosis inyectada durante todo el experimento en 24 horas (Cardoso et al., 1996). Sin embargo,

una cantidad significativa de radiactividad se detectó en el hígado, intestino y riñón. La acumulación en el hígado es más alta después de 10 minutos de la administración. Una radiactividad significativa está presente en la bilis después de 120 minutos, con una cantidad acumulativa del 52% de la dosis inyectada. Su presencia es máxima en el intestino delgado y grueso después de 120 y 240 minutos después de la inyección de esteviósido, respectivamente. La cromatografía Líquida de alto rendimiento (HPLC) de la bilis mostró al esteviol como el mayor metabolito, mientras que el análisis de orina reveló la presencia de esteviósido como componente principal. Estos resultados indican que la conversión metabólica de esteviósido a esteviol en ratas se produce en el hígado, y que hay dos vías de excreción del esteviósido, a través de la bilis y de la orina. Además, el esteviol puede sufrir circulación enterohepática donde se excreta en la bilis y se reabsorbe de nuevo a la circulación.

3. **Metabolismo:** El esteviol parece ser el principal metabolito del esteviósido que aparece en la circulación después de la ingestión oral. Como consecuencia de ello, se ha prestado mucha atención a su metabolismo en el hígado, incubando el esteviol en microsomas hepáticos de ratas y humanos. Este proceso requiere sistema NADPH, lo que sugiere un metabolismo de fase I de esteviol por el citocromo P450. Sin embargo, en estudios in vivo en ratas se encontró metabolitos conjugados de esteviol en la bilis (Nakayama et al., 1986), además de que puede ocurrir una conjugación de metabolitos de esteviol (fase II del metabolismo). Recientemente, se ha informado que el esteviósido y el rebaudiósido A se metaboliza en glucurónido de esteviol, en ratas (Roberts & Renwick, 2008) Se ha encontrado glucurónido de esteviol en la orina de humanos después de la administración de esteviósido (Geuns et al., 2006). En estudios en humanos, se encontró que el metabolito esteviolglucurónido sólo se encuentra en la sangre y en la orina, mientras que no se detectó esteviósido o esteviol (Geuns et al., 2007). En el análisis de las heces sólo se encontró esteviol libre y no esteviósido o esteviolglucurónido, lo

que sugiere una vía adicional de eliminación de esteviol. En un estudio de la farmacocinética de esteviolglucurónido y de esteviol libre realizado en 8 varones adultos que recibieron una dosis oral única de rebaudiósido A (5 mg / kg de peso corporal) o esteviósido (4,2 mg / kg de peso corporal) se observó que los niveles plasmáticos de esteviol fueron de 121 ng / ml después de 6 horas de la administración (Wheeler et al., 2008). Después de la administración oral de esteviósido el esteviolglucurónido está presente en el plasma hasta alcanzar una concentración media máxima de 1,89 g / ml a las 8 horas. En la orina, la mayoría de los esteviol se encontraron en la forma de conjugados glucurónidos (62% de la dosis) con una cantidad mucho menor de esteviol libre (0,04% de la dosis). Por lo tanto, parece que, además de metabolismo de fase I, el esteviol experimenta la fase II del metabolismo en el que la mayor parte se conjuga con glucurónido antes de ser eliminado por la orina. Este estudio también sugiere la implicación de una vía metabólica similar para el rebaudiósido A.

4. **Excreción:** El metabolito principal encontrado en la circulación de los seres humanos y ratas es el esteviol glucurónido. Vías biliares y urinarias parecen ser las principales rutas de excreción del esteviol glucurónido. Sin embargo las extensiones en las que este metabolito se excreta a través de estas dos vías son diferentes en humanos y ratas. En estas últimas, la ruta principal es a través de la excreción biliar de esteviol glucurónido en las heces (Wingard et al., 1980; Nakayama et al, 1986;.Roberts & Renwick, 2008). En los seres humanos, la excreción urinaria parece jugar un papel predominante en el esteviolglucurónido (Cardoso et al, 1996;Geuns et al, 2006, 2007.;Wheeler et al., 2008). Un estudio metabólico en humanos mostró que a las 72 horas después de la ingestión oral de esteviósido, el esteviolglucurónido se excreta en la orina y en las heces en un 62% y el 5,2% de la dosis total administrada de esteviósido respectivamente (Wheeler et al., 2008). Se piensa que esta diferencia en las vías de excreción de esteviol glucurónido entre los seres humanos y ratas se debe al diferente umbral de peso molecular de aniones

orgánicos para la excreción biliar humana y de rata (por ejemplo glucurónidos). Aniones orgánicos con una masa molecular de más de 600 Da en los seres humanos y de 325 Da en ratas se excretan en la bilis en lugar de a través de un proceso de filtración glomerular en los riñones (Renwick, 2008). Así, en ratas el esteviolglucurónido, con un peso molecular de 512,9 Da, preferiblemente se elimina por excreción biliar en las heces. El principal metabolito del esteviósido es el esteviolglucurónido, siendo además el responsable de la excreción urinaria en humanos para la eliminación de la mayor parte de este compuesto del cuerpo. El proceso de excreción renal probablemente involucra transportadores de aniones orgánicos (Srimaroeng et al., 2005).

## **II.1.2 Propiedades antimicrobianas, mecanismo de acción, toxicidad.**

### **Propiedades inmunológicas**

Recientemente se ha demostrado una actividad inmunomoduladora in vivo del esteviósido (Sehar et al., 2008). El esteviósido en ratones promueve las funciones fagocíticas y aumenta la respuesta inmune humoral. Experimentos in vitro también demostraron los efectos estimulantes del esteviósido sobre la actividad fagocítica y en la proliferación de células B y T estimuladas por LPS y concanavalina A, respectivamente. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el consumo oral de esteviósido puede ser útil en la promoción de la inmunidad contra la infección por microorganismos.

### **Efecto antidiarreico**

La aplicación potencial de esteviósido en el tratamiento de la diarrea se propuso originalmente a partir de observaciones de la capacidad bactericida y antirotavirus del extracto acuoso caliente de *Stevia rebaudiana*. Este extracto presenta un efecto bactericida contra una amplia gama de bacterias patógenas transmitidas por los alimentos, incluyendo *Escherichia coli*, causante de hemorragia severa y diarrea exudativa (Tomita et al. 1997). Este extracto de estevia también inhibe el crecimiento

de rotavirus, un virus ARN cuya infección causa la gastroenteritis en los niños, al interferir con la unión del rotavirus a las células huésped (Takahashi et al., 2001).

El esteviósido tiene un efecto inhibitor sobre el músculo liso intestinal, lo que resulta en hipermotilidad (Shiozaki et al., 2006). Se cree que el mecanismo está relacionado a su efecto inhibitor sobre la afluencia de  $Ca^{2+}$  en las células musculares.

### **Mecanismo de acción antimicrobiano**

La revisión bibliográfica señala que la estevia presenta propiedades antimicrobianas sobre diferentes microorganismos, sin embargo ninguno de estos estudios revela su mecanismo de acción específico.

### **Toxicidad**

En estudios in vitro con líneas celulares de riñón y de intestino se indica que el esteviósido necesita ser expuesto a las células a una concentración tan alta como 2 mM para afectar su viabilidad celular (Srimaroeng et al, 2005b.; Boonkaewwan et al., 2008). Este efecto tóxico podría haber sido consecuencia de una interrupción en el metabolismo mitocondrial como se sugiere a partir de estudios anteriores (Toskulkao et al, 1997; Srimaroeng et al, 2005).

La administración oral de esteviol es letal con una dosis de 5-20 g / kg de peso corporal, dependiendo de la especie animal (Toskulkao et al., 1997). El examen histológico de hámsteres tratados con esteviol reveló degeneración celular tubular proximal, con un aumento de nitrógeno ureico en sangre y de creatinina plasmática, indicadores de un deterioro de la función renal. Por lo tanto, la posible causa de muerte en los hámsters tratados con esteviol es la insuficiencia renal aguda.

La ingestión de esteviósido (750 mg / día para los 3 meses) por individuos saludables o aquellos con enfermedades subyacentes como diabetes mellitus e hipertensión no produjo efectos adversos en el hígado y en los exámenes de función renal y electrolitos séricos (Hsieh et al., 2003; Barriocanal et al, 2008).

Para el esteviol se indica una Ingesta Diaria Admisible (IDA) de 0-2 mg / kg de peso corporal, equivalente a 0-5 mg / kg de peso corporal de esteviósido, como sugiere el Comité Mixto FAO / Comité de Expertos de la OMS sobre Aditivos Alimentarios (JECFA, 2006), esto para producir una concentración de esteviósido en el colon de aproximadamente 0.05-0.2 mm, concentración a la que no se produce ninguna toxicidad a las células intestinales (Boonkaewwan et al., 2008).

Los estudios en seres humanos indican que tras la administración oral de una dosis única de 4.2mg de esteviósido / kg de peso corporal, la concentración media máxima de esteviol glucurónido y esteviol libre en el plasma es de 1,89 g / ml (3,7 mM) y 0,19 g / ml (0,38 M), respectivamente (Wheeler et al., 2008). Este nivel de esteviol no debe ser tóxico para las células humanas.

### **Carcinogenicidad**

Análisis genéticos bacterianos revelaron que el esteviósido no es mutagénico (Pezzuto et al., 1985; Pezzuto et al., 1986;.Suttajit et al.,1993; Matsui et al., 1996a; Klongpanichpak et al, 1997).

En los ensayos de mutación usando *Salmonella typhimurium* TM677, el esteviol mostró toxicidad genética después de activación metabólica. (Pezzuto et al., 1985; Matsui et al., 1989; Matsui et al., 1996a; Temcharoen et al., 1998; Terai et al., 2002). Los mecanismos mutagénicos del esteviol mostraron ser la inducción de la transición, transversion, duplicación y eliminación de material genético (Matsui et al., 1996). Se especula que metabolitos oxidativos del esteviol, tales como el 15-oxo-esteviol, originarían esta mutagenicidad (Terai et al., 2002).

Estudios que utilizan *E. coli* (Nunes et al., 2006) y células de mamífero cultivadas (Matsui et al., 1996a) sugieren que el esteviol es capaz de producir lesiones genéticas que podrían conducir a la formación de cáncer. Sin embargo, otros ensayos bacterianos mutagénicos, como la mutación inversa, ensayos de Ames y REC no demostraron actividad mutagénica del esteviol (Matsui et al, 1996a; Klongpanichpak et al., 1997).

Los cultivos de linfocitos de sangre de donantes humanos no presentan alteraciones cromosómicas tras la exposición al esteviósido y esteviol (Suttajit et al., 1993; Temcharoen et al., 2000).

Se han realizado ensayos in vivo del potencial carcinogénico del esteviósido en ratón y rata. El esteviósido administrado por vía oral no aumenta la incidencia de cáncer en rata (Yamada et al, 1985; Hagiwara et al, 1984;. Xili et al, 1992; Toyoda et al, 1997; Sekihashi et al, 2002). A dosis de hasta 2,0 g / kg de peso corporal (machos) y 2,4 g / kg de peso corporal (hembras), el esteviósido no promovió ninguna incidencia de cáncer.

En conjunto, la mayoría de los estudios concuerdan en que el esteviósido oral, con una ingesta diaria admisible (5 mg / kg de peso corporal), es seguro y no cancerígeno.

### **II.1.3 Obtención del extracto de Estevia**

A continuación se describirán los métodos que se han utilizado para obtener extracto de estevia para su uso en diversas investigaciones in vitro.

#### **Obtención de extracto acuoso vegetal de estevia**

Este proceso se realiza a partir de la maceración de las hojas trituradas en agua destilada con carbonato de calcio a temperatura ambiente por 24 horas, luego de transcurrido el tiempo de maceración se procede a la filtración al vacío para eliminar el material innecesario. Posteriormente se procede a agregar hidróxido de calcio y se deja actuar durante 30 minutos. (**Tabla I**) Después de transcurrido este tiempo se procede a almacenar el extracto a temperaturas bajas en un frasco completamente estéril para su uso posterior (Luque Gutiérrez, 2008).

	<b>g. de stevia</b>	<b>Factor</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Extracto en ml.</b>
<b>Stevia Rebaudiana</b>	10	7.477	70.963	
<b>Agua destilada</b>		14	140	MI
<b>Carbonato de calcio</b>		0.05	0.5	G
<b>Hidróxido de calcio</b>		0.1	1	G

**Tabla I.** Cantidad de cada sustancia para la obtención de 71 ml de extracto de estevia, cada uno con sus diferentes factores.

Se realizaron 3 experiencias para observar la relación entre los gramos de estevia que se necesita para la obtención de una determinada cantidad de extracto, es decir, para obtener 71, 110 y 160 ml de extracto vegetal se ocuparon 10.70, 15.110 y 22.160 gr. de estevia respectivamente.

### **Obtención de esteviósido: proceso industrial**

En el proceso industrial para la extracción de esteviósido, compuesto principal de la planta *Stevia Rebaudiana*, se describen las siguientes etapas de laboratorio:

- 1. Reducción de tamaño:** En primer lugar se dispone el material en un molino de cuchillas para reducir el tamaño de las hojas a partículas pequeñas. Esta etapa tiene como objetivo maximizar el contacto de las partículas con el solvente, para extraer la mayor cantidad de soluto (en este caso los esteviósidos y rebaudiósidos).

- 2. Lixiviación:** Luego se realiza la etapa de Lixiviación (Batch). Esta es la etapa más importante del proceso. Para la lixiviación es necesario determinar la cantidad de solvente a emplear, éste se determina mediante una relación 1:5, es decir, por un gramo de estevia se ocupan 5 mililitros de agua o alcohol como solvente. En el experimento se midieron 102.43 gr. de estevia pulverizada, por lo que se determinó que la cantidad de agua a emplear fuera de 500 ml. Las temperaturas elevadas facilitan la transferencia de masa, ya que se establece un gradiente que favorece el fenómeno de transporte; conociendo esto se determinó que la temperatura de operación fuera de 70°C durante 40 minutos.
- 3. Filtración:** En esta etapa se pasa la mezcla por un filtro de tela para separar el refinado (fase solida) del extracto, luego el refinado se lleva al horno secador para determinar la cantidad de fibra que se retira del proceso. En el vaso de precipitado se reúne un volumen de 300 ml. de extracto.
- 4. Sedimentación:** En esta etapa se agregan 7 gr. de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  para realizar una suavización en caliente del extracto durante 1 hora a una temperatura de 70°C y un pH de 12. El objetivo de esta etapa es aglomerar los sólidos disueltos para que estos precipiten y se pueda retirar impurezas de la solución.
- 5. Centrifugado:** Antes de llevar a la centrífuga se neutraliza la mezcla, que después de agregar el  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , tenía un pH de 12.3. Las condiciones de la centrifuga son de 5000 rpm durante 20 min. Finalmente se obtiene un peso sólido de 32.01 gr. de un volumen inicial de 221.84 gr. de mezcla.
- 6. Cristalización y triturado:** Para la obtención de cristales de esteviósidos se requiere la etapa de cristalización y triturado, en ella el líquido que se retira por centrifugación es llevado al horno secador a 70 °C durante 96 horas para lograr la cristalización de los componentes en solución (mayormente

esteviósidos). Luego de esta etapa, se retira la escarcha de la caja petri con una espátula y se lleva a un mortero para obtener los cristales de edulcorante. (Gomez, Celis, Coronado, 2010.)

En lo que se refiere al rendimiento del proceso, en la literatura se describe que la composición de esteviósidos y rebaudiósidos son del 7% y 3% respectivamente, esto, daría un total de un 10% de producto deseado. Con respecto a la materia prima inicial 102.43 gr. se deduce que la cantidad de producto deseado tiene que ser de alrededor de 10 gr. Sin embargo se sabe que las hojas de estevia contienen hasta un 40% de sustancias hidrosolubles, por lo que un gran porcentaje, como mínimo un 40% del producto final corresponde a sustancias indeseadas. Para obtener un producto más concentrado en esteviósidos se debe utilizar una resina de intercambio iónico. La masa de sólidos suspendidos equivale a la masa de sólidos retirados en la centrífuga (asumiendo que la cantidad de agua retenida es la misma) más la cantidad de sólidos retenidos en el filtro, menos la cantidad de cal que se agregó durante la suavización. De esta manera se determinó que la cantidad de sólidos en base seca retirados por la centrífuga es de 8.93 gr.

Además en este estudio se hace una sugerencia, para mejorar el solvente la composición de éste debería ser 65% de Agua destilada, 15% Buffer de Fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), que ayuda a que la clorofila precipite y de 10% Sulfito de Sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ), el cual elimina el oxígeno disuelto de la solución. Al utilizar sulfito de sodio y buffer de fosfato en el solvente durante la lixiviación podría evitarse el uso de sistemas complejos y costosos de separación tales como membranas o resinas de intercambio iónico ya que estas últimas requieren el uso de otros solventes para recuperar el producto final (Gomez, Celis, Coronado, 2010.)

## II.2 Microbios de referencia del biofilm bucal para estudios in vitro

### II.2.1 *Streptococcus mutans*

*Streptococcus mutans* es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa que se encuentra normalmente en la cavidad bucal humana, formando parte del biofilm dental.

Los *Streptococcus mutans* son difícil de eliminar, ya que tienen componentes extracelulares que los hacen más adhesivos, favorecen la unión a las proteínas fijadoras de las células, mediado por sus fimbrias y estimulan los fenómenos de agregación y adhesión bacteriana. Además de esto producen un polímero homofructosa o fructano a partir de la sacarosa que se denomina levano. Los levanos son fácilmente degradados por enzimas (levanasas). Actúan como fuente de reserva de energía, puesto que son sintetizados en periodos con exceso de nutrientes y catabolizados en periodos de escases. *Streptococcus mutans* posee una fructosil transferasa extracelular que cataliza la reacción; que produce glucosa libre como residuo. No hay correlaciones entre el fructano y la cariogenicidad.

Para aislar *Streptococcus mutans* se pueden recolectar muestras salivales de personas, en una cantidad de 2 ml por persona dependiendo del flujo salival de cada una. Se determinó un promedio de 3 a 5 minutos para su recolección, para luego colocar la saliva obtenida en recipientes estériles, cubiertos con hielo. Después se procede a sacar 0,1 ml de la muestra en un tubo de ensayo con la ayuda de una micropipeta y se diluyen 5 ml de suero fisiológico. Posteriormente se toma una alícuota de 0,1 ml de esta disolución para realizar el sembrado. Este se ejecuta por medio de la utilización de un hisopo en el medio de cultivo para el desarrollo de la bacteria, todo esto en completa esterilidad. Luego se llevan las placas a incubación a 37°C, por 48 Hrs. Luego de transcurrido el tiempo de crecimiento de las bacterias, se procede a observar las bacterias al microscopio por medio de la técnica de tinción de Gram. De la misma manera se realizan las diferentes pruebas bioquímicas (reactivo de Kovac y la prueba de la catalasa) (Luque Gutiérrez, 2008).

### **II.2.2 *Enterococcus faecalis***

El *Enterococcus faecalis*, es una bacteria anaerobia facultativa presente en los fracasos endodónticos. Frecuentemente es aislada en el tracto urinario, cuadros septicémicos, infecciones de heridas y múltiples otros sitios anatómicos, destacándose últimamente la frecuencia de aislamientos desde infecciones endodónticas. Es resistente a la acción antimicrobiana del Hidróxido de Calcio. Se ha sugerido que la resistencia de *Enterococcus faecalis* al Hidróxido de Calcio, permite a esta bacteria sobrevivir en presencia del medicamento y proliferar cuando la acción de este finaliza. Ello resulta en la colonización e infección del conducto radicular.

*Enterococcus faecalis* es un coco Gram positivo, anaerobio facultativo, inmóvil y no esporulado. El tamaño de cada célula oscila entre 0,5 y 0,8 micrómetros y es habitante normal del tracto gastrointestinal humano. Esta bacteria ha atraído recientemente la atención de diversos investigadores porque ha sido identificada como una causa frecuente de infecciones periapicales persistentes.

La temperatura óptima de crecimiento in vitro de este microorganismo es de 35°C, no obstante, se ha observado crecimiento entre 10°C y 45°C. Todas las cepas pueden crecer en medios que contengan esculina, la cual hidrolizan en presencia de sales biliares al 40% (medio agar bilis-esculina). Casi todas las cepas son homofermentativas, siendo el ácido láctico el producto final principal de la fermentación de la glucosa, no producen gas y no contienen enzimas citocrómicas.

Una característica notable de *Enterococcus faecalis* la constituye su capacidad para sobrevivir y crecer en microambientes que pudieran ser tóxicos para muchas bacterias, en particular zonas con altas concentraciones de sales (6,5% de Cloruro de Sodio), temperaturas extremas (15-60°C) y puede resistir además a la acción de colorantes como Azul de Metileno al 0,1%. Esta capacidad de resistencia por parte de *Enterococcus faecalis* en microambientes tóxicos, está relacionada con su capacidad de supervivencia en los conductos radiculares de dientes que han sido sometidos a tratamiento endodóntico y en los cuales los nutrientes son limitados,

añadiéndose a esta situación el hecho de que algunos agentes antimicrobianos, pudieran influir en que esta especie permanezca en los conductos de los dientes afectados.

### **II.3 Medios de cultivo**

Los medios de cultivo son preparados que intentan reproducir artificialmente las condiciones del hábitat natural de las bacterias (Liébana, 2002)

El crecimiento bacteriano *in vitro* requiere de condiciones físico químicas básicas, que se otorgan mediante medios de cultivos.

#### **Composición General de los medios de cultivo**

Los componentes más importantes que se agregan a los medios de cultivo son:

- **Agua:** elemento básico para la vida y para la dispersión y mezcla de los nutrientes.
- **Peptonas:** constituyen una fuente de nitrógeno, carbono y azufre. Se obtienen a través de hidrólisis ácida o enzimática de proteínas.
- **Hidratos de Carbono:** por convención se utiliza la glucosa, que además de ser una fuente de energía es una fuente de carbono.
- **Extracto de carne:** es un concentrado de elementos hidrosolubles de composición indefinida (corazón, cerebro, músculo, hígado)
- **Extracto de levadura:** constituye una fuente importante de aminoácidos, vitaminas y factores de crecimiento.
- **Cloruro de Sodio:** equilibra la presión osmótica del medio.
- **Agentes solidificantes:** su función es dar consistencia sólida o semisólida, siendo el más utilizado el agar, polímero obtenido de las algas de *Gelidium corneum*.

#### **Condiciones de incubación de un cultivo**

Las Condiciones necesarias para la incubación de un medio de cultivo son (Liébana, 2002)

- **Temperatura:** por lo general  $36^{\circ}\text{C} + - 1^{\circ}\text{C}$ .
- **Atmósfera:** depende del tipo de respiración del microorganismo, las bacterias aerobias y anaerobias facultativas se incuban en presencia de oxígeno; por otro lado, las anaerobias estrictas necesitan de un 85% de nitrógeno, 10% de hidrógeno y un 5% de dióxido de carbono.
- **Presión Osmótica:** concentración del 1% de cloruro de sodio.
- **Humedad:** favorece el crecimiento de los microorganismos.
- **Ph:** los ph más cercanos a la neutralidad son los más favorables para la mayoría de las bacterias.

## **Clasificación de los medios de cultivo**

### **Según su contenido (Liébana, 2002)**

- **Definidos o sintéticos:** son aquellos medios donde se conoce perfectamente la composición química, ya que se elaboran con productos puros e individualizados.
- **No sintéticos o empíricos:** son los más utilizados, y corresponden a los que han traído buenos resultados durante la historia de su uso. ( ejemplo Agar cerebro-corazón o agar Muller- Hinton)

### **Según su estado físico (Liébana, 2002)**

- **Líquidos:** reciben el nombre caldo o infusión. Sus constituyentes están disueltos en agua sin sustancias solidificantes.
- **Semisólidos:** contienen agar en escasa proporción.
- **Sólidos:** se obtienen agregando agar al medio líquido en una cantidad suficiente para que solidifiquen (generalmente 1.5-2%)

### **Según su utilización en el laboratorio (Liébana, 2002)**

- **Básicos o comunes:** son aquellos formulados para bacterias no exigentes y contienen los nutrientes mínimos para su desarrollo.
- **Enriquecidos:** se suplementan con sustancias nutritivas para bacterias muy exigentes, como la sangre y el suero.
- **Selectivos:** son aquellos que permiten el crecimiento de algunas especies y la inhibición de otras. Esta selección puede ser mediante inhibición o mediante enriquecimiento.

### **Medio de cultivo para *Streptococcus mutans* Agar T.Y.C.S.B. (Tryptona - Yeast extract - Cistina - Sacarosa - Bacitracina)**

En relación a la preparación del medio de cultivo se tomará en cuenta un estudio comparativo de medios para el crecimiento de *Streptococcus mutans*. El medio que presenta la mayor cantidad de presencia del *Streptococcus mutans*, es el TYCSB: medio de cultivo que ha dado óptimos resultados tanto en recuperación como en selectividad. Este medio es económico y fácil de preparar, aspectos de valiosa importancia en nuestro medio.

El Agar TYCSB diseñado por J. D. de Stoppelaar et al., 1967 y posteriormente modificado por Van Palenstein et al., 1983 y W. G. Wade, 1986 permite el aislamiento selectivo de especies de *Streptococcus* productores de caries dentales, tales como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* (*Streptococcus mutans* serotipo d/g) y *Streptococcus sanguis*.

El desarrollo selectivo de estas especies de *Streptococcus* es facilitado por su formulación reductora, y por el contenido de bacitracina que inhibe la flora acompañante. La alta concentración de sacarosa estimula la síntesis de glucanos y dextranos por *Streptococcus mutans*. Su composición exacta se presenta en la **Tabla III.**

Estas características permiten obtener tasas de aislamiento de *Streptococcus mutans* a partir de muestras de saliva superiores a otras fórmulas, tales como Agar Mitis-salivari-bacitracina (Agar MSB).

**Conservación:**

Conservado refrigerado entre 2° y 12° C es estable hasta la fecha de caducidad. El medio de cultivo se debe almacenar sellado y con la cubierta de la placa (tapa) abajo. Se recomienda almacenar a temperaturas cercanas a 8°C. A menor temperatura de almacenamiento mayor probabilidad de condensación y por tanto mayor riesgo de filtración del sello de PVC.

0.2	G	L-cistina HCl monohidrato
15	G	Bactopeptona
5	G	Extracto de levadura
0.1	G	Sulfato de sodio
0.1	G	Cloruro de sodio
1	G	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O fosfato de sodio
2	G	NaHCO <sub>3</sub> carbonato de sodio
20	G	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> Na·3H <sub>2</sub> O acetato de sodio
200	G	20% p/v sacarosa
15	G	Agar granulado

0.2	U/ml	Bacitracina
741.4	MI	Agua destilada

**Tabla III.** Composición de Medio de Cultivo TYCSB

### **Medio de cultivo para *Enterococcus faecalis* Agar sangre**

El medio de cultivo Agar sangre es un medio enriquecido que permite el desarrollo de un gran número de bacterias tanto gram positivas como gram negativas, diferencial (por el tipo de hemólisis), no selectivo.

La Placa Agar Sangre está preparada con medio de cultivo en polvo de nombre Agar Base Sangre, tiene como ingredientes agar-agar, infusión músculo de corazón, peptona y cloruro de sodio.

El color del medio es ámbar claro una vez se halla agregado sangre un 5% o 10 % del volumen total, su color cambia a rojo cereza. La sangre utilizada para preparar el medio es sangre de cordero, sangre humana; se utiliza también sangre de caballo y de conejo, importante considerar que algunas bacterias varían el tipo de hemolisis de acuerdo a procedencia de la sangre.

El uso de este medio de cultivo se fundamenta en que la infusión de músculo de corazón y la peptona, otorgan al medio un alto valor nutritivo, que permite el crecimiento de una gran variedad de microorganismos, aún de aquellos nutricionalmente exigentes. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. La sangre agregada al medio base aporta nutrientes para el crecimiento bacteriano y permite detectar hemólisis.

Las especificaciones del fabricante son:

Medio de cultivo: Agar Sangre de 5% en base TSA

Incubación: 36°C por 24 horas.

Conservación: De 4 a 12°C hasta la fecha de vencimiento. No congelar.

### **Caldo de cultivo cerebro corazón**

Brain Heart Infusion Agar res es un medio de uso general para el cultivo de una amplia gama de microorganismos y se recomienda para las pruebas de sensibilidad de *Enterococcus* mediante detección en agar. Su composición se presenta en la

**Tabla IV.**

Infusión de cerebro de ternero	200 mg/litro
Infusión de carne de res	250 mg/litro
Peptona proteasa	10 mg/litro
Dextrosa	2 mg/ litro
Cloruro de sodio	5 mg/ litro
Fosfato disódico	2.5 mg/litro

**Tabla IV:** Fórmula de medio de cultivo cerebro corazón

El ph del caldo de cultivo cerebro corazón es a 25°C de 7.4 +- 0.2.

Para su preparación se deben suspender 37 gramos del medio en 1000 ml de agua destilada. Luego se debe dispensar en botellas o tubos y esterilizar en autoclave a 17 libras de presión, a 121°C por 15 minutos. Para mejores resultados el medio debe ser usado en el día que fue preparado.

### III. OBJETIVOS

#### Objetivo General:

- Evaluar la actividad antimicrobiana in vitro de la *Stevia Rebaudiana Bertoni* en cultivos de *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*

#### Objetivos específicos:

- Comparar el efecto antimicrobiano del extracto de *Stevia Rebaudiana Berttoni* al 10%,25%,50%,75%,100% con Hipoclorito de Sodio al 3% sobre *Streptococcus mutans In vitro*.
- Comparar el efecto antimicrobiano del extracto de *Stevia Rebaudiana Berttoni* al 10%,25%,50%,75%,100% con Hipoclorito de Sodio al 3% sobre *Enterococcus faecalis In vitro*.

### IV HIPOTESIS

- El extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* al 10%, 25%, 50%, 75% y/o 100% presenta actividad antimicrobiana sobre colonias de *Streptococcus mutans In vitro*.
- El extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* al 10%, 25%, 50%, 75% y/o 100% presenta actividad antimicrobiana sobre colonias de *Enterococcus faecalis In vitro*.

## V MATERIALES Y MÉTODOS

### I. Diseño

Estudio analítico experimental *in vitro*.

### II. Universo

Todas las cepas de *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* presentes en el Instituto de Salud pública.

### III. Muestra

Placas petri con colonias de ***Streptococcus mutans*** cultivadas en TYCSB en el Laboratorio de Investigaciones microbiológicas de la Universidad de Valparaíso. Placas petri con colonias de ***Enterococcus faecalis*** cultivadas en agar sangre en el Laboratorio de Investigaciones microbiológicas de la Universidad de Valparaíso.

#### Unidad muestral:

Colonias de ***Streptococcus Mutans*** y ***Enterococcus faecalis***

### IV. Selección y tamaño de la muestra

El tamaño mínimo de muestra adecuado para los grupos de antimicrobianos (Stevia vs Hipoclorito/Agua Destilada), denotados como  $n_1$  y  $n_2$ , está dado por:

$$n_1 = \frac{\{Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta}\}^2}{2 \cdot (\sqrt{R} - 1)^2}, \quad n_2 = R n_1$$

Donde:

- $\alpha$  = nivel de significancia.
- $1 - \beta$  = Potencia del test.

- $X_1$  = Conteo de UFC de bacteria en medios de cultivo bajo aplicación de Hipoclorito/Agua Destilada.
- $X_2$  = Conteo de UFC de bacteria en medios de cultivo bajo aplicación de Stevia.
- $R$  = Razón de tasas de UFC entre la aplicación de Stevia e Hipoclorito/Agua Destilada.
- $n_1$  = Tamaño de muestra de medios de cultivo bajo aplicación de Hipoclorito/Agua Destilada.
- $n_2$  = Tamaño de muestra de medios de cultivo bajo aplicación de Stevia.

De esta manera, utilizando un nivel de significancia del 5%, una potencia del test del 90% y bajo una razón de tasas de 2, se determinó que el tamaño mínimo de muestra para tubos de ensayo bajo aplicación de Hipoclorito/Agua Destilada es de 20 (10 de agua destilada y 10 de Hipoclorito) y de tubos de ensayo bajo aplicación de estevia es de 50, por bacteria.

#### **V. Criterios de inclusión:**

- Cepas de *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* obtenidas en el ISP.
- Medios de cultivo TYCSB y Agar sangre, obtenidos en los laboratorios VALTEK SA y Linsan SA, respectivamente.

#### **VI. Criterios de exclusión:**

- Medios de cultivo que hayan estado expuestos accidentalmente a condiciones de riesgo de mantención de los estándares predefinidos (corte de luz, u otro).

## VII. VARIABLES

### VARIABLES DEPENDIENTES

- Unidad formadora de colonias de *Streptococcus mutans*.
- Unidad formadora de colonias de *Enterococcus faecalis*

### VARIABLES INDEPENDIENTES

- Stevia Rebaudiana Bertoni al 10%
- Stevia Rebaudiana Bertoni al 25%
- Stevia Rebaudiana Bertoni al 50%
- Stevia Rebaudiana Bertoni al 75%
- Stevia Rebaudiana Bertoni al 100%
- Agua destilada
- Hipoclorito de Sodio al 3%

## VII. DEFINICIONES CONCEPTUALES/ OPERACIONALES

### DEFINICIONES CONCEPTUALES:

- **Estevia:** Dilución de Stevia al 10, 25, 50, 75 y 100% obtenido por técnicas de laboratorio a partir de hojas de la planta *Stevia rebaudiana Bertoni* diluidas en agua destilada. Variable cuantitativa continua que se mide en % de concentración.
- **UFC:** Unidad formadora de colonias. Grado de contaminación bacteriológica de un ambiente. Es el número mínimo de células separables sobre la superficie o dentro de un medio agar semisólido. Usa el orden de decena de millones de células descendientes.

- **Agua destilada:** es aquella agua cuya composición se basa en la unidad de moléculas de H<sub>2</sub>O. Es aquella a la que se le han eliminado las impurezas e iones mediante destilación. Se medirá en ml, por lo que es una variable cuantitativa continua.
- **Hipoclorito de Sodio:** líquido claro, pálido, verde amarillento, extremadamente alcalino que presenta una acción disolvente sobre el tejido necrótico y restos orgánicos. Potente agente antimicrobiano utilizado como irrigante endodóntico. Se medirá en ml, por lo que es una variable cuantitativa continua.

#### **Definiciones operacionales:**

- **Estevia:** Variable cuantitativa continua que se mide en ml.
- **UFC:** Variable cuantitativa discreta que se expresará en número de bacterias por 10<sup>6</sup>
- **Agua destilada:** Variable cuantitativa continua, medida en ml.
- **Hipoclorito de Sodio:** Variable cuantitativa continua, medida en ml.

#### **VIII. Procedimiento experimental:**

El estudio fue realizado en el Laboratorio de investigaciones odontológicas de la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso, bajo la supervisión del Doctor Jorge Torres, docente coordinador de la cátedra de microbiología.

Se solicitó al ISP (Instituto de Salud Pública de Chile, Sección Bacteriología, Laboratorio de Cepario) la cepa bacteriana *Enterococcus faecalis* cepa ATCC derivada de colección ATCC E/7272/013 y la cepa *Streptococcus mutans* S/79/2012 cepa ISP derivada de colección nativa mediante un formulario de solicitud de venta de cepa bacteriana.

El extracto de estevia “Stevia Pure Liquid AS Lot 338” adquirido a través de la empresa Prodalysa S.A. tiene una concentración de sólidos de un 36%. Un 97% de estos corresponden a glicósidos de esteviol. Por lo tanto un 34,9 % del peso del extracto corresponden a glicósidos de esteviol.

El medio de cultivo para *Streptococcus mutans*: TYCSB, fue solicitado a la empresa VALTECK S.A. El medio Agar sangre fue adquirido en la empresa Linsan S.A. El caldo de cultivo cerebro corazón se solicitó a la empresa BIOMARK laboratories.

La preparación de las diluciones de estevia al 10, 25, 50 y 75% se detalla en el Anexo 1.

La realización del conteo bacteriano de la solución madre de *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* se realizó siguiendo el procedimiento indicado en el Anexo 2.

### **Preparación de Soluciones de Estevia con *Streptococcus mutans***

Para la preparación de las soluciones de prueba se procedió a extraer con una micropipeta estéril 1 ml de solución de estevia al 10%. Este ml fue depositado en un tubo de ensayo estéril rotulado como Sm 10% 1:1.

Con la misma micropipeta se extrajo 1 ml de la solución de estevia al 25%. Este ml fue depositado en un tubo de ensayo estéril rotulado como Sm 25% 1:1

Inmediatamente se repitió el mismo procedimiento con la concentración de estevia al 50%. Con la misma micropipeta se extrajo 1 ml de la solución de estevia al 50% y se depositó en un tubo de ensayo estéril rotulado como Sm 50% 1:1.

Con la misma micropipeta utilizada anteriormente se extrajo 1 ml de solución de estevia al 75%, para luego depositarlo en un tubo de ensayo estéril rotulado como Sm 75% 1:1.

Finalmente con la misma micropipeta se extrajo 1 ml de solución de estevia al 100%, para luego depositarlo en un tubo de ensayo estéril rotulado previamente como Sm 100% 1:1.

A cada tubo de ensayo se le agregó 1 ml de caldo de *Streptococcus mutans* extraído de la solución madre con una micropipeta estéril. Acto seguido se procedió a la mezcla de las soluciones con una vibradora durante 5 segundos y se incubaron.

Transcurridos las 48 horas se realizó la siembra en las placas del medio de cultivo TYCSB en condiciones de anaerobiosis utilizando una campana Gaspak. El conteo se realizó a las 48 horas.

### **Preparación de Soluciones de Estevia con *Enterococcus faecalis***

Para la preparación de las soluciones de prueba se procedió a extraer con una micropipeta estéril 1 ml de solución de estevia al 10%. Este ml fue depositado en un tubo de ensayo estéril rotulado como Ef 10% 1:1.

Luego se extrajo 1 ml de la solución de estevia al 25%. Y se colocó en un tubo de ensayo estéril rotulado como Ef 25% 1:1

Inmediatamente se repitió el mismo procedimiento con la concentración de estevia al 50%. Se extrajo 1 ml de la solución de estevia al 50% y se depositó en un tubo de ensayo estéril rotulado como Ef 50% 1:1.

A continuación se extrajo 1 ml de solución de estevia al 75%, para luego depositarlo en un tubo de ensayo estéril rotulado como Ef 75% 1:1.

Finalmente se extrajo 1 ml de solución de estevia al 100%, para luego depositarlo en un tubo de ensayo estéril rotulado previamente como Ef 100% 1:1.

A cada tubo de ensayo se le agregó 1 ml de caldo de *Enterococcus faecalis* extraído de la solución madre con una micropipeta estéril. Acto seguido se procedió a la mezcla de las soluciones con una vibradora durante 5 segundos. Las diluciones resultantes se presentan en la figura 2.

Transcurridos las 48 horas, se realizó la siembra en el medio de cultivo Agar Sangre en condiciones de aerobiosis. El conteo de UFC se realizó a las 48 Hrs.

## VI. RESULTADOS

### VI.1 ESTADISTICA DESCRIPTIVA

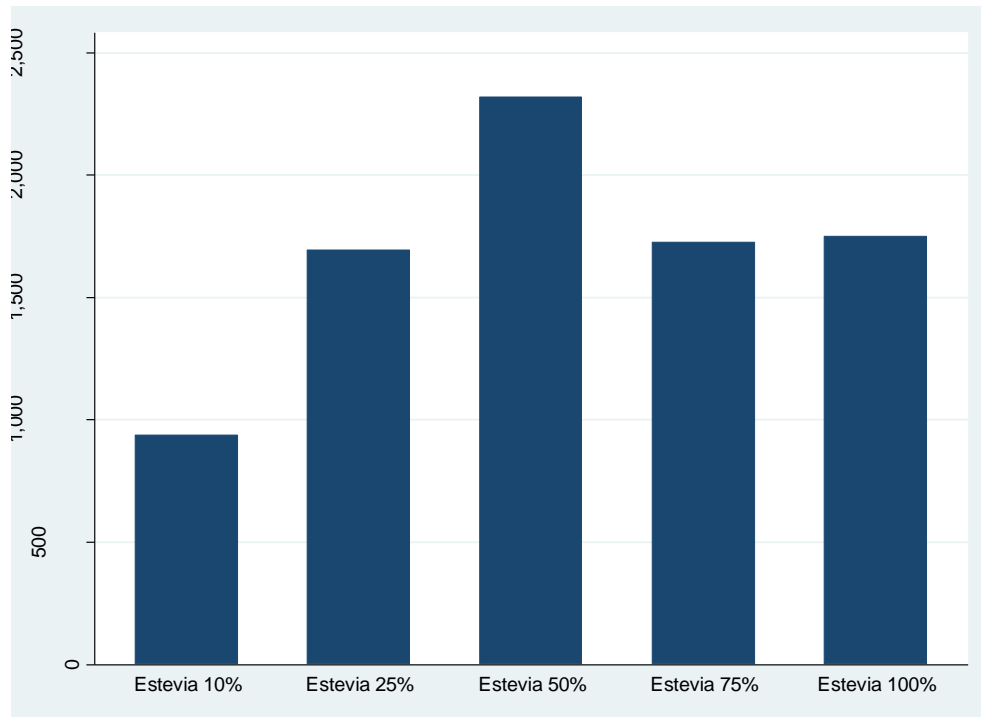
La base de datos del recuento bacteriano de *S. mutans* y *E. faecalis* con los 7 tratamientos recibidos se presenta en el Anexo 3.

A continuación se presenta la **Tabla V** que corresponde al análisis descriptivo de los siete tratamientos aplicados a *Streptococcus mutans*.

Tratamiento	Promedio
Estevia 10%	937,6
Estevia 25%	1695,2
Estevia 50%	2318,8
Estevia 75%	1726,4
Estevia 100%	1750,8
H2O	34,14
NaOCl	0,14

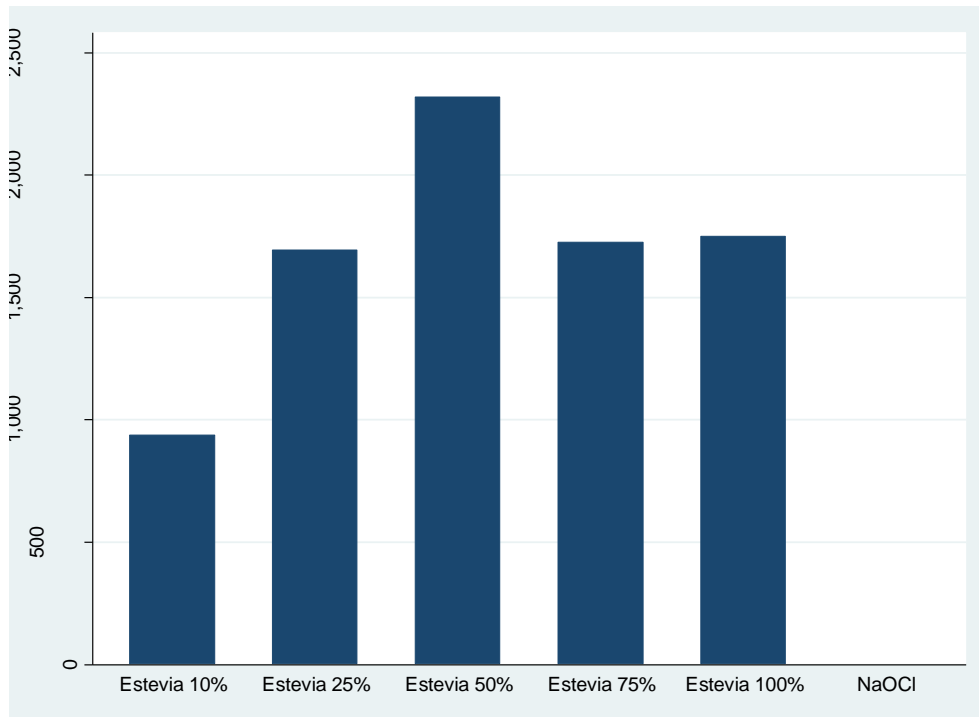
**Tabla V:** Medias de UFC de *S. mutans* para cada grupo de tratamiento

La **Figura 1** muestra las medias de UFC de *Streptococcus mutans*, obtenidas con las cinco concentraciones de estevia. La menor cantidad de UFC se obtuvo con estevia al 10%, mientras que la mayor se consiguió con el tratamiento de estevia al 50%. En las concentraciones 25, 75, y 100% se obtuvieron valores similares.

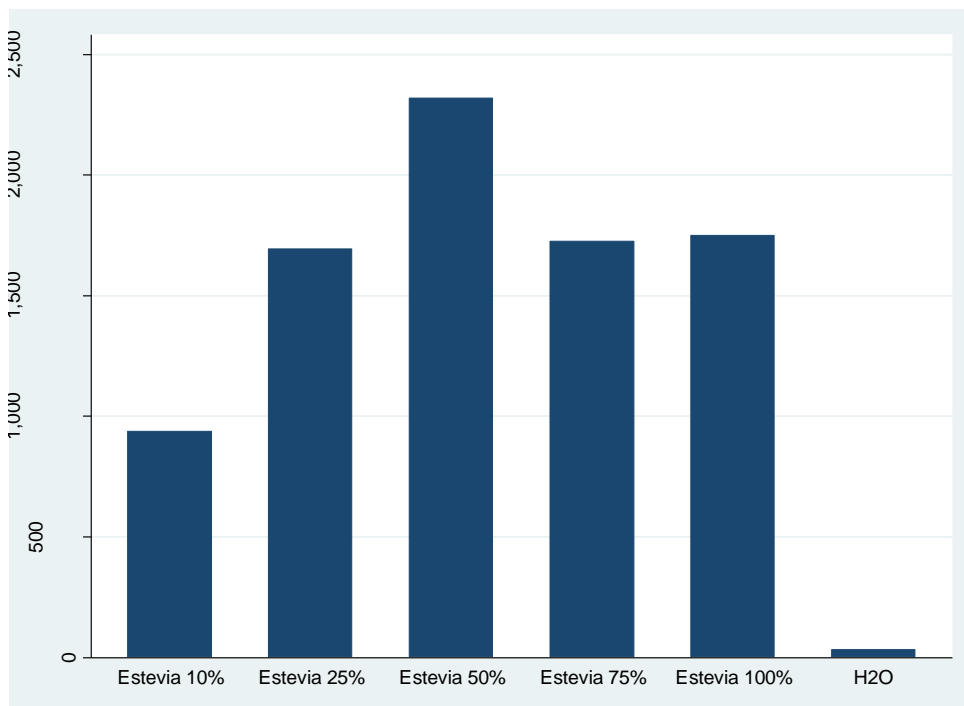


**Figura 1:** Gráfico que muestra las medias de UFC de *Streptococcus mutans* en los cinco tratamientos de estevia.

En la **Figura 2** se observa que la media de UFC de *Streptococcus mutans* tratados con Hipoclorito de Sodio es cero. El crecimiento bacteriano en el cultivo realizado con agua el promedio fue bajo, de 34, 14 UFC, tal como se observa en la **Figura 3**.



**Figura 2:** Gráfico que muestra las medias de UFC de *Streptococcus mutans* en estevia e Hipoclorito de Sodio.



**Figura 3:** Gráfico que muestra las medias de UFC de *Streptococcus mutans* en estevia y agua.

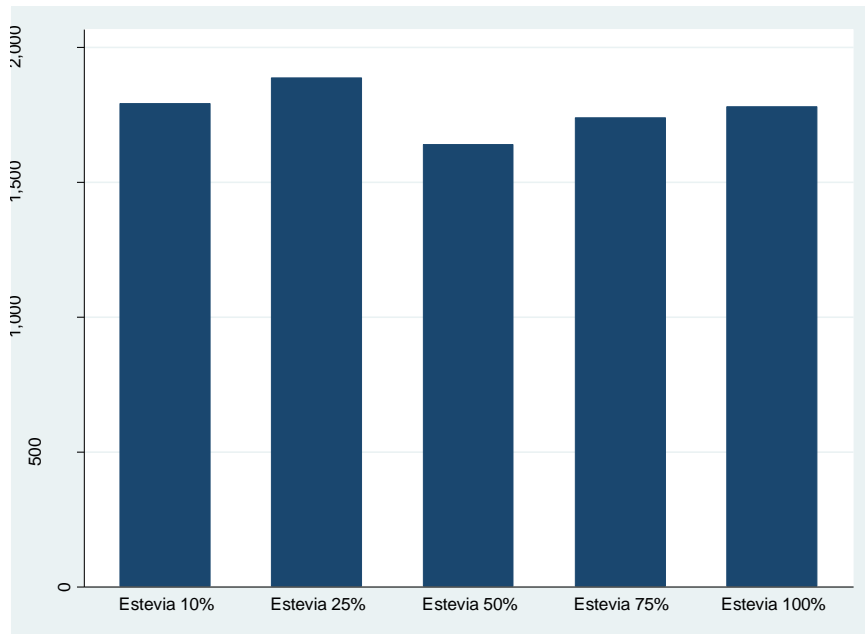
A continuación se presenta la **Tabla VI** que corresponde al análisis descriptivo de los siete tratamientos aplicados a *Enterococcus faecalis*.

<b>Tratamiento</b>	<b>Promedio</b>
Estevia 10%	1790,4
Estevia 25%	1886,6
Estevia 50%	1639,6
Estevia 75%	1737,6
Estevia 100%	1779,2
H2O	1846,67
NaOCl	0

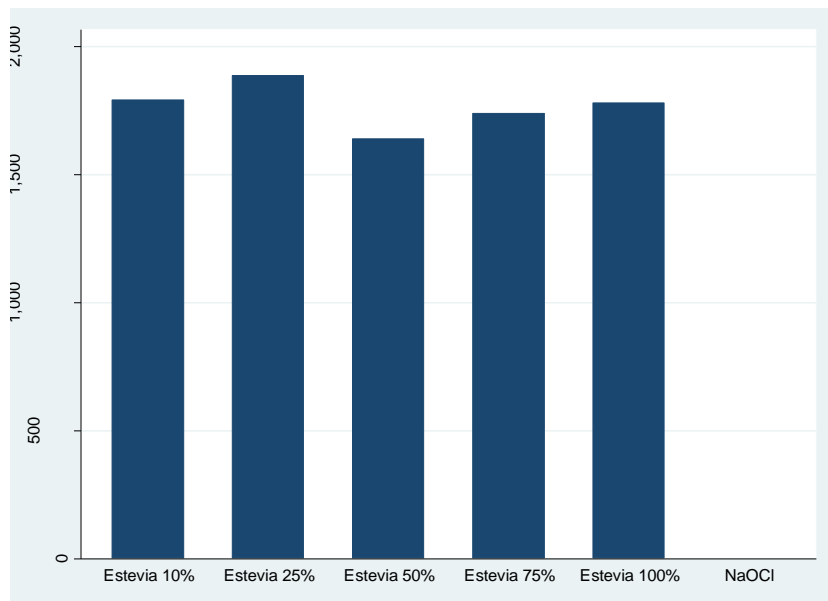
**Tabla VI:** Medias de UFC de *Enterococcus faecalis* para cada grupo de tratamiento.

En las **Figuras 4 y 6** podemos observar que las cantidades de UFC de *Enterococcus faecalis* en los cinco tratamientos de estevia y agua es similar.

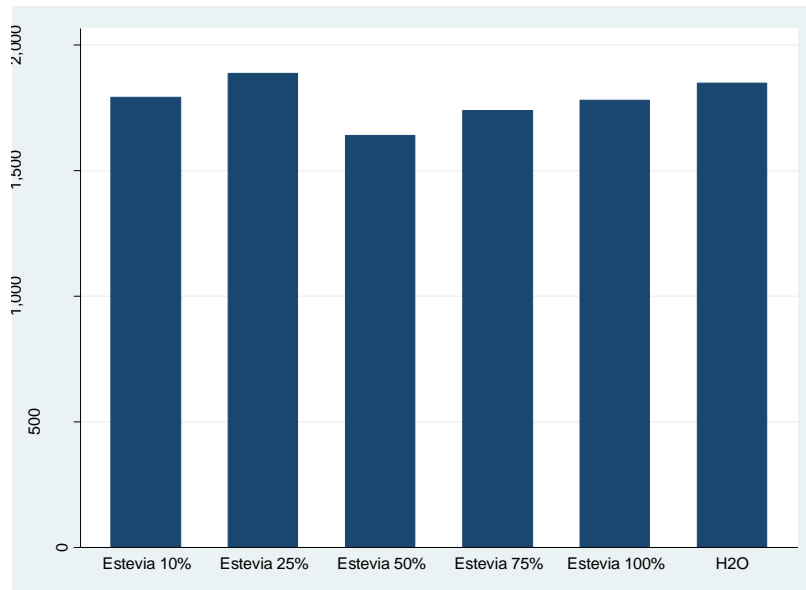
Por otro lado la **Figura 5** muestra que la media de los conteos de UFC en el Hipoclorito de sodio fue de 0.



**Figura 4:** Gráfico que muestra las medias de UFC de *Enterococcus faecalis* en los cinco tratamientos de estevia.

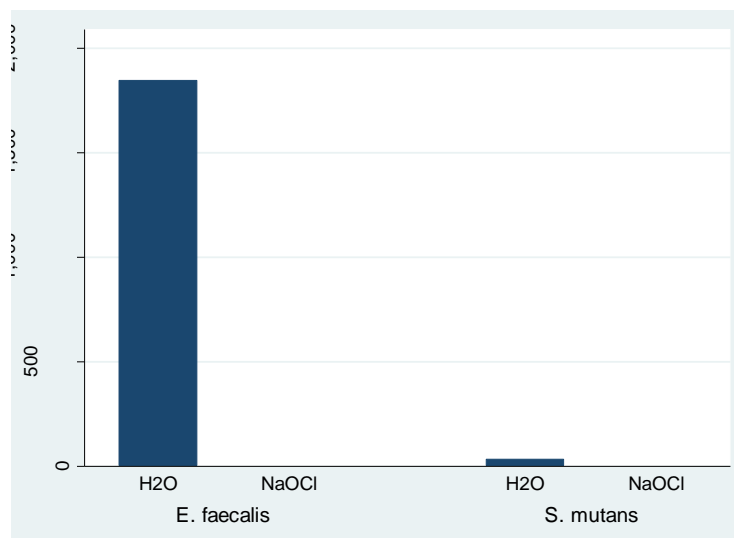


**Figura 5:** Gráfico que muestra las medias de UFC de *Enterococcus faecalis* en estevia e Hipoclorito de Sodio.



**Figura 6:** Gráfico que muestra las medias de UFC de *Enterococcus faecalis* en estevia y Agua.

La **Figura 7** muestra que el crecimiento bacteriano de *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus mutans* al recibir el tratamiento de Hipoclorito de Sodio fue cero. Por otro lado al utilizar Agua se observa una gran diferencia en las medias de UFC entre ambas bacterias.



**Figura 7:** Gráfico que muestra las medias de UFC de *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus mutans* en Agua e Hipoclorito de Sodio.

## VI.2 ANALISIS ESTADÍSTICO

Para realizar este trabajo se implementó el software estadístico Stata versión 12, software de gran utilidad en administración de datos y pruebas paramétricas y no paramétricas para estudios sociales, medicinales, y de diversas áreas.

Los datos fueron analizados mediante el test Anova y la prueba T Student para comparación de grupos ya sea por su varianza o su media respectivamente. De esta manera se determinó si existe o no diferencia significativa entre los tratamientos de estevia utilizados en el estudio (10%, 25%, 50%, 75%, 100%) comparándolos con agua destilada e hipoclorito de sodio.

La prueba T- Student de comparación de medias que se utilizó para comparar el agua destilada con el hipoclorito de sodio tiene como propósito probar si existe diferencia significativa entre estos dos grupos de estudio.

H0: No existe diferencia significativa v/s H1: Son diferentes

La prueba Anova, presentada en la **Tabla VII**, busca diferencias significativas entre 3 o más grupo de estudio, en este caso las 5 concentraciones de estevia estudiadas. Cuando se presentan diferencias significativas entre los grupos se realiza el test de Tukey para determinar cuál es el par que presenta las mayores diferencias.

H0: No existe diferencia significativa v/s H1: Son diferentes.

<b>Bacteria</b>	<b>Valor P</b>	<b>Condición</b>
E. faecalis	0,8861	No Rechazo
S. mutans	0,1066	No Rechazo

**Tabla VII:** Prueba Anova para probar diferencias de los grupos de Estevia.

Como podemos observar no rechazamos la hipótesis nula (H0) y asumimos que los tratamientos de estevia son estadísticamente iguales entre sí con un nivel de significancia del 5%.

Para comparar el crecimiento bacteriano entre los controles Hipoclorito de Sodio y Agua se empleó una Prueba T- Student., tal como se muestra en la **Tabla VIII**.

<b>Bacteria</b>	<b>Valor P</b>	<b>Condición</b>
E. faecalis	0,0000	Rechazo
S. mutans	0,0359	Rechazo

**Tabla VIII:** Prueba T-Student para probar diferencias significativas en el agua e hipoclorito de sodio.

Se puede observar que entre los grupos de Agua e hipoclorito de sodio si existe una diferencia significativa debido a que el hipoclorito de sodio tiene una media muy menor que el agua. Esto significa que en relación al agua el hipoclorito de sodio si tiene efecto antimicrobiano.

Para comparar los siete tratamientos aplicados utilizamos una Prueba de Anova agregando a las estevias, el Agua y el Hipoclorito de sodio. (**Tabla IX**) Como se encontró diferencia significativa se aplicó una prueba de intervalos de Tukey para ver cuál de las variables causó la diferencia significativa. Esto se determinó interpretando los intervalos resultantes, si estos intervalos contienen el '0', son estadísticamente iguales.

Bacteria	Tratamiento	Valor P	Condición
E. faecalis	H2O	0,9282	No Rechazo
	NaOCl	0,000	Rechazo
S. mutans	H2O	0,008	Rechazo
	NaOCl	0,007	Rechazo

**Tabla IX:** Prueba Anova para probar diferencias.

A partir de esta prueba podemos afirmar que en el grupo de *Enterococcus faecalis* sólo el Hipoclorito de sodio comparado con las estevias presenta una diferencia estadísticamente significativa, por lo que sólo se aplicó la prueba de Tukey a estos grupos. (**Tabla X**)

En el grupo de *Streptococcus mutans*, las estevias presentaron diferencia significativa tanto con el Agua como con el Hipoclorito de sodio. Como se muestra en la **Tabla XI** y **XII** se utilizaron intervalos de confianza de Tukey para probar cual fue el grupo que hizo esta diferencia, si uno de los grupos de estevia o bien, el Agua o Hipoclorito. Para determinarlo observamos en cuales comparaciones estaba presente el cero. Si éste está presente asumimos que entre esos grupos no existe diferencia significativa, en caso contrario se ve cual es el grupo que causa la diferencia.

Los intervalos se realizaron sólo a los grupos que presentaron diferencias, es decir a aquellos que en la prueba Anova rechazaron la hipótesis nula de igualdad.

Se designó como Grupo 1 a la estevia al 10%, como grupo 2 estevia al 25%, grupo 3 a estevia al 50%, grupo 4 a estevia al 75%, grupo 5 a estevia al 100%, y grupo 6 al Agua o el Hipoclorito de Sodio según sea el caso.

Grupo	Intervalo del 95%		Condición
2 vs 1	-563,2317	755,2317	Iguales
3 vs 1	-810,0317	508,4317	Iguales
4 vs 1	-712,0317	606,4317	Iguales
5 vs 1	-670,4317	648,0317	Iguales
6 vs 1	-2516,838	-1063,962	Distintos
3 vs 2	-906,0317	412,4317	Iguales
4 vs 2	-808,0317	510,4317	Iguales
5 vs 2	-766,4317	552,0317	Iguales
6 vs 2	-2612,838	-1159,962	Distintos
4 vs 3	-561,2317	757,2317	Iguales
5 vs 3	-519,6317	798,8317	Iguales
6 vs 3	-2366,038	-913,1621	Distintos
5 vs 4	-617,6317	700,8317	Iguales
6 vs 4	-2464,038	-1011,162	Distintos
6 vs 5	-2505,638	-1052,762	Distintos

**Tabla X:** Comparaciones múltiples Tukey, para las estevias versus el Hipoclorito dentro de *Enterococcus faecalis*.

Grupo	Intervalo del 95%		Condición
2 vs 1	-600,2992	2115,499	Igual
3 vs 1	23,30084	2739,099	Distintos
4 vs 1	-569,0992	2146,699	Igual
5 vs 1	-544,6992	2171,099	Igual
6 vs 1	-2399,789	592,8749	Igual
3 vs 2	-734,2992	1981,499	Igual
4 vs 2	-1326,699	1389,099	Igual
5 vs 2	-1302,299	1413,499	Igual
6 vs 2	-3157,389	-164,7251	Distintos
4 vs 3	-1950,299	765,4992	Igual
5 vs 3	-1925,899	789,8992	Igual
6 vs 3	-3780,989	-788,3251	Distintos
5 vs 4	-1333,499	1382,299	Igual
6 vs 4	-3188,589	-195,9251	Distintos
6 vs 5	-3212,989	-220,3251	Distintos

**Tabla XI:** Comparaciones múltiples Tukey, para las estevias versus el Agua dentro de *Streptococcus mutans*.

Grupo	Intervalo del 95%		Condición
2 vs 1	-600,1891	2115,389	Igual
3 vs 1	23,41095	2738,989	Distintos
4 vs 1	-568,9891	2146,589	Igual
5 vs 1	-544,5891	2170,989	Igual
6 vs 1	-2433,668	558,7535	Igual

3 vs 2	-734,1891	1981,389	Iguals
4 vs 2	-1326,589	1388,989	Iguals
5 vs 2	-1302,189	1413,389	Iguals
6 vs 2	-3191,268	-198,8465	Distintos
4 vs 3	-1950,189	765,3891	Iguals
5 vs 3	-1925,789	789,7891	Iguals
6 vs 3	-3814,868	-822,4465	Distintos
5 vs 4	-1333,389	1382,189	Iguals
6 vs 4	-3222,468	-230,0465	Distintos
6 vs 5	-3246,868	-254,4465	Distintos

**Tabla XII:** Comparaciones múltiples Tukey, para las estevias versus el Hipoclorito dentro de *Streptococcus mutans*.

El análisis de Tukey demostró que tanto en *Enterococcus faecalis* como en *Streptococcus mutans* el valor que hace la diferencia es el Hipoclorito de sodio y además el Agua en el caso de *Streptococcus mutans*.

Cabe destacar que en *Streptococcus mutans* también hay diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de estevia al 10% y estevia al 50%, ya que el valor de la estevia al 10% es mucho menor en promedio que la del 50%. En otras palabras en el *Streptococcus mutans* el conteo de UFC es mayor en el tratamiento de estevia al 50% que en el del 10%.

## VII. DISCUSION

Actualmente existen múltiples estudios en los que se ha utilizado la planta *Stevia Rebaudiana Bertoni* en el ámbito de la nutrición y la medicina. Se ha encontrado que la estevia puede ejercer un control de la glicemia y de los niveles de insulina, además de presentar propiedades antihipertensivas, antidiarreicas, inmunológicas y antimicrobianas. A pesar de este último descubrimiento, el número de estudios en los que se ha utilizado la estevia como agente antimicrobiano contra bacterias bucales es reducido. Es por este motivo que la presente investigación buscó evaluar el efecto antimicrobiano de la planta *Stevia Rebaudiana Bertoni* en el control de los agentes infecciosos orales, *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*.

Las enfermedades que se presentan en la cavidad bucal son multifactoriales. De todos los factores involucrados el principal factor desencadenante de las patologías dentarias es el biofilm dental. De esta manera el control de los agentes infecciosos del biofilm ayuda en gran medida a la prevención y al control de éstas enfermedades. En relación a éste tema se describen numerosas propiedades medicinales de la planta *Stevia Rebaudiana Bertoni*, entre ellas destaca el efecto antimicrobiano sobre bacterias cariogénicas como el *Streptococcus mutans* (Vitery et al., 2010) y otros tipos de bacterias como el *Stafilococcus aureus* (Tadhani & Subhash, 2006).

Los agentes patógenos que se escogieron en la investigación fueron el *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*. El primero es un microorganismo que participa activamente en la etiología de la caries dental y el segundo es un agente infeccioso relevante en patología endodóntica.

Se estudiaron múltiples solventes y métodos de obtención del extracto de *Stevia Rebaudiana Bertoni*. De todos los estudios revisados se escogió la técnica de extracción líquida con agua destilada como solvente, ya que es un método que elimina las impurezas y no altera las propiedades medicinales de la planta. El extracto resultante está libre de solventes orgánicos y enzimas. Este mecanismo de obtención del extracto es realizado por Prodalya S.A., empresa líder en este tipo de procedimientos en Latinoamérica. Este método de extracción es equivalente a otros

estudios que utilizan el extracto de estevia líquida ocupando como solvente agua destilada. (Vitery et al., 2010, Luque, 2008)

El protocolo de investigación utilizado difiere a otros estudios, en los que se efectuaron pruebas mediante discos de inhibición (Vitery et al., 2010, Luque, 2008). Se optó por el conteo de UFC por medio de cultivo debido a que este procedimiento permite una estimación cuantitativa más objetiva que los halos de inhibición.

Se utilizó Hipoclorito al 3% como control positivo debido a su conocida eficacia como antimicrobiano en el uso odontológico, específicamente en el ámbito de la endodoncia.

Por otro lado se empleó agua destilada como control negativo para descartar algún posible efecto antimicrobiano del solvente utilizado por la empresa Prodalysa S.A en el procesamiento de la estevia.

En el presente estudio se realizaron mediciones a las 48 horas tanto para *S. mutans* y como para *Enterococcus faecalis*, Estos son los tiempos de incubación para cada una de las bacterias, en condiciones de anaerobiosis y aerobiosis respectivamente, (Luque, 2008, Linossier et al., 2003 y Gajardo et al., 2005, Siqueira et al., 1997).

En el estudio de Vitery se realizaron controles a las 48 hrs 24 y 72 hrs (Vitery et al., 2010). En el presente estudio se realizaron controles sólo a las 48 horas debido a que el tiempo en el que se alcanza la mayor curva de crecimiento bacteriano de ambos microorganismos es de 48 horas. En un tiempo inferior a éste el recuento bacteriano no ha alcanzado su máximo potencial, mientras que en un tiempo mayor el conteo es el mismo que el alcanzado a las 48 horas.

Los resultados de la presente investigación arrojaron un mayor recuento bacteriano de *Streptococcus mutans* en el tratamiento de estevia al 50% en comparación con el tratamiento al 10%. Esto podría deberse a que *Streptococcus mutans* utiliza la estevia como sustrato provocando un mayor crecimiento bacteriano en el extracto de estevia más concentrado. Una posible hipótesis es que *Streptococcus mutans*

metaboliza la estevia de forma limitada, lo que explicaría el mayor recuento de UFC en estevia al 50% y no en las concentraciones del 75% y 100%.

Por otro lado se observó que el crecimiento bacteriano de *Streptococcus mutans* en agua fue mucho menor que *Enterococcus faecalis*. Una posible explicación a este hecho es que el *Streptococcus mutans* es una bacteria de cultivo difícil, necesita un medio de cultivo especial y condiciones de anaerobiosis, a diferencia de *Enterococcus faecalis* que no necesita condiciones especiales para su crecimiento.

El extracto utilizado en el presente estudio, Stevia Pure Liquid AS lote 338, presenta una concentración de sólidos de un 36%, un 97% de estos corresponden a glicósidos de esteviol, es decir este extracto presenta un 34.9% de glicósidos de esteviol del total.

La empresa Prodalya nos proporcionó además el extracto Stevia Liquid P2 lote 161112 que corresponde a un concentrado de un 21% de sólidos, un 53% de estos sólidos son glicósidos de esteviol, es decir presenta un 11.1% de glicósidos de esteviol del total, un 10% de polifenoles y otros componentes de la planta. Ninguna de las investigaciones revisadas especifica la concentración exacta de los extractos utilizados, sin embargo como el objetivo del presente estudio fue estudiar el efecto de la estevia en su estado puro, se escogió el extracto líquido de estevia Pure Liquid AS lote 338 en lugar del Stevia Liquid P2 lote 161112.

En la presente investigación se observó que el extracto líquido de Stevia Pure Liquid AS Lote 338 utilizada al 10, 25, 50, 75, 100% no inhibe el crecimiento bacteriano de *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*. Estos resultados contrastan con los estudios de Vitery y cols del año 2010, en el que se demostró la actividad antibacteriana de la *Stevia Rebaudiana* contra del *S. mutans* y el *L. acidophilus* y el estudio de Luque, 2008, quien obtuvo ausencia de crecimiento bacteriano con estevia al 100% mediante la utilización de discos de inhibición. Esta diferencia de resultados podría deberse a que en estas investigaciones podría haberse utilizado un extracto similar a Stevia Liquid P2 161112, en vez de estevia en su estado puro, extractos que difieren entre otras cosas en la presencia de compuestos fenólicos. En

el caso del propóleo son los compuestos fenólicos presentes en su composición los que le otorgan acción antimicrobiana, por lo tanto los polifenoles presentes en Stevia Liquid P2 161112 podrían otorgarle el mismo efecto.

Los resultados obtenidos descartarían la utilización de estevia pura como antimicrobiano, sin embargo la hipótesis de los polifenoles de Stevia Liquid P2 161112 abre la línea de investigación para futuros estudios.

## VIII. CONCLUSIONES

De acuerdo con lo realizado en este trabajo de investigación *in vitro*, cuyo objetivo fue determinar si la planta *Stevia Rebaudiana Bertoni* ejerce un efecto antimicrobiano contra *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*, podemos concluir lo siguiente:

El extracto utilizado en el presente estudio, Stevia Pure Liquid AS lote 338, no ejerce un efecto antimicrobiano sobre las bacterias *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*.

La concentración de estevia al 50% no ejerció un efecto antimicrobiano sobre *Streptococcus mutans* sembrado en Agar TYCSB. Más bien se observó un mayor crecimiento de colonias bacterianas en comparación a la concentración de estevia al 10% y al control negativo.

En relación al *Enterococcus faecalis* sembrado en Agar Sangre las diferentes concentraciones de estevia que se utilizaron no ejercieron un efecto antimicrobiano.

El hipoclorito de sodio al 3% ejerció un efecto antimicrobiano estadísticamente significativo en ambas cepas bacterianas.

## IX. SUGERENCIAS

La facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso, presenta un laboratorio de investigaciones odontológicas, el que cuenta con dos estufas bacteriológicas, dos campanas de Gaspak, una Lupa Spencer y diversos instrumentos de microbiología. Gracias al completo equipamiento del laboratorio toda la parte experimental de este trabajo de investigación fue realizada dentro de la misma Facultad de Odontología.

La empresa Linsan S.A demoró dos semanas en preparar el medio Agar sangre, mientras que VALTEK S.A tardó dos meses en preparar el medio de cultivo TYSCB. La empresa Prodalya S.A tardó un mes en preparar los concentrados de estevia y el ISP tardó dos meses en entregar las cepas bacterianas utilizadas. Las futuras investigaciones que utilicen estevia y cepas bacterianas deben considerar los largos tiempos de espera para la obtención de dichos materiales.

Una forma de facilitar el recuento bacteriano es utilizar una dilución de la solución madre de  $10^4$  y no la solución madre propiamente tal.

El extracto Stevia Liquid P2 161112 corresponde a un concentrado de un 21% de sólidos, un 53% de estos sólidos son glicósidos de esteviol, es decir presenta un 11.1% de glicósidos de esteviol del total, un 10% de polifenoles y otros componentes de la planta. Este extracto se podría utilizar en vez de estevia en su estado puro, Stevia Pure Liquid AS Lote 338. Ambos extractos difieren entre otras cosas en la presencia de compuestos fenólicos. En el caso del propoleo son los compuestos fenólicos presentes en su composición los que le otorgan acción antimicrobiana, por lo tanto los polifenoles presentes en Stevia Liquid P2 161112 podrían otorgarle el mismo efecto. Por lo tanto sugerimos investigaciones *in vitro* con este tipo de extracto, de tal manera que se pueda continuar esclareciendo los efectos antimicrobianos de la planta *Stevia Rebaudiana Bertoni*.

## X. RESUMEN

### **Objetivo:**

Evaluar la actividad antimicrobiana in vitro de la *Stevia Rebaudiana Bertoni* en cultivos de *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*

### **Materiales y Métodos:**

Se trabajó con 140 medios de cultivo. Se utilizaron diluciones de estevia al 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, agua destilada e hipoclorito de sodio al 3%. Se colocó 1 ml de cada dilución en siete tubos de ensayo y se agregó 1 ml del caldo bacteriano correspondiente. Se cultivó por 48 Hrs. A 37 °C. Las diluciones resultantes se sembraron en los medios de cultivo TYCSB para *Streptococcus mutans* y Agar sangre para *Enterococcus faecalis*, Transcurridas 48 Hrs se realizó el conteo de UFC. Para el análisis estadístico se implementó software Stata versión 12, test Anova, prueba T Student y la prueba de intervalos de Tukey, con un nivel de significancia del 5%

### **Resultados:**

Los tratamientos de estevia son estadísticamente iguales. En el grupo de *Enterococcus faecalis* sólo el Hipoclorito presenta diferencia estadísticamente significativa. En *Enterococcus faecalis* como en *Streptococcus mutans* el valor que hace la diferencia es el Hipoclorito de sodio y además el Agua en el caso de *Streptococcus mutans*. En *Streptococcus mutans* hay diferencia estadísticamente significativa entre Estevia al 10% y Estevia al 50%, ya que el conteo promedio de UFC de Estevia al 10% es menor que la de 50%.

### **Conclusión:**

El extracto utilizado en el presente estudio, Stevia Pure Liquid AS lote 338, no ejerce efecto antimicrobiano sobre las bacterias *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*.

**Palabras Clave:** estevia, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, UFC

## XI.BIBLIOGRAFÍA

1. Abudula, R., Jeppesen, P. B., Rolfsen, S. E.D., Xiao, J., & Hermansen, K. (2004): Rebaudioside A potently stimulates insulin secretion from isolated mouse islets: studies on the dose-, glucose-, and calcium-dependency. *Metabolism* 53 (10), 1378–1381.
2. Abudula, R., Matchkov, V. V., Jeppesen, P. B., Nilsson, H., Aalkjær, C., & Hermansen, K. (2008): Rebaudioside A directly stimulates insulin secretion from pancreatic beta cells: a glucose-dependent action via inhibition of ATP-sensitive K<sup>+</sup>-channels. *Diabetes Obes Metab* 10(11), 1074–1085.
3. Aino M., Claudio H., Rikka A. (2012): Effects of Xylitol on Xylitol-Sensitive Versus Xylitol-Resistant *Streptococcus mutans* Strains in a Three-Species in Vitro Biofilm.
4. Babu, E., Takeda, M., Narikawa, S., Kobayashi, Y., Yamamoto, T., Cha, S. H., et al. (2002): Human organic anion transporters mediate the transport of tetracycline. *Jpn J Pharmacol* 88(1), 69–76.
5. Bamias, G., & Cominelli, F. (2007): Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease: current concepts. *Curr Opin Gastroenterol* 23(4), 365–369.
6. Boeckh, E. M. A., & Humboldt, G. (1981): Efeitos cardiocirculatorios do extrato aquosototal em individuos normais e do esteviosideo em ratos. *Cienc Cult* 32, 208–210.
7. Boonkaewwan, C., Ao, M., Toskulkao, C., & Rao, M. C. (2008): Specific immunomodulatory and secretory activities of stevioside and steviol in intestinal cells. *J Agric Food Chem* 56(10), 3777–3784.

8. Boonkaewwan, C., Toskulkao, C., & Vongsakul, M. (2006): Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of stevioside and its metabolite steviol on THP-1 cells. *J Agric Food Chem* 54(3), 785–789.
9. Cardoso, V. N., Barbosa, M. F., Muramoto, E., Mesquita, C. H., & Almeida, M. A. (1996): Pharmacokinetic studies of <sup>131</sup>I-stevioside and its metabolites. *Nucl Med Biol* 23(1), 97–100.
10. Curi, R., Alvarez, M., Bazotte, R. B., Botion, L. M., Godoy, J. L., & Bracht, A. (1986): Effect of *Stevia rebaudiana* on glucose tolerance in normal adult humans. *Braz J Med Biol Res* 19 (6), 771–774.
11. Ferreira, E. B., De Assis Rocha Neves, F., Duarte Da Costa, M. A., Alves Do Prado, W., De Araujo Funari Ferri, L., & Bazotte, R. B. (2006): Comparative effects of *Stevia rebaudiana* leaves and stevioside on glycaemia and hepatic gluconeogenesis. *Planta Med* 72(8), 691–696.
12. Gajardo et al., (2005): Inhibición del crecimiento *in vitro* de *Streptococcus mutans* por papaina y sanitrend.
13. Gardana, C., Simonetti, P., Canzi, E., Zanchi, R., & Pietta, P. (2003): Metabolism of stevioside and rebaudioside A from *Stevia rebaudiana* extracts by human microflora. *J Agric Food Chem* 51(22), 6618–6622.
14. Geuns, J. M. (2003): Stevioside. *Phytochemistry* 64 (5), 913–921.
15. Geuns, J.M., (2007): Comments to the paper by Nunes et al., (2007), Analysis of genotoxic potentiality of stevioside by comet assay, *Food Chem Toxicol* 45 (2007) 662–666. *Food Chem Toxicol*, 45(12), 2601–2602; author reply 2603–2604.

16. Geuns, J. M., Augustijns, P., Mols, R., Buyse, J. G., & Driessen, B. (2003): Metabolism of stevioside in pigs and intestinal absorption characteristics of stevioside, rebaudioside A and steviol. *Food Chem Toxicol* 41(11), 1599–1607.
17. Geuns, J. M., Bruggeman, V., & Buyse, J. G. (2003). Effect of stevioside and steviol on the developing broiler embryos. *J Agric Food Chem* 51(17), 5162–5167. Geuns, J.M.C., Buyse, J., Vankeirsbilck, A., & Temme, E. H.M. (2007): Metabolism of stevioside by healthy subjects. *Exp Biol Med* 232 (1), 164–173.
18. Geuns, J.M. C., Buyse, J., Vankeirsbilck, A., Temme, E. H. M., Compernelle, F., & Toppet, S. (2006): Identification of steviol glucuronide in human urine. *J Agric Food Chem* 54(7), 2794–2798.
19. Gregersen, S., Jeppesen, P. B., Holst, J. J., & Hermansen, K. (2004). Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. *Metabolism* 53(1), 73–76. Gribble, F. M., & Reimann, F. (2002): Pharmacological modulation of KATP channels. *Biochem Soc Trans* 30(2), 333–339.
20. Hanson, J. R., & De Oliveira, B. H. (1993): Stevioside and related sweet diterpenoid glycosides. *Nat Prod Rep* 10(3), 301–309. 52 V. Chatsudthipong, C. Muanprasat / *Pharmacology & Therapeutics* 121 (2009) 41–54
21. Humboldt, G., & Boech, E. M. (1977): Efeito do edulcorante natural (stevioside) e sintético (sacarina) sobre o ritmo cardíaco em ratos. *Arq Bras Cardiol* 30, 257–277.
22. Jakinovich, W., Moon, C., Choi, Y. H., & Kinghorn, A. D. (1990): Evaluation of plant extracts for sweetness using the Mongolian gerbil. *J Nat Prod* 53(1), 190–195. JECFA, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, (2006). Steviol Glycosides [Addendum to stevioside]. In: Safety Evaluation of

Certain Food Additives: Sixtythird Meeting of the Joint FAO/WHO Expert on Food Additives, June 8–17, 2005, Geneva. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)/World Health Organization (WHO); Geneva, WHO Food Additives Series, No. 54, pp. 117–144&638.

23. Jeppesen, P. B., Gregersen, S., Alstrup, K. K., & Hermansen, K. (2002): Stevioside induces antihyperglycaemic, insulinotropic and glucagonostatic effects in vivo: studies in the diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *Phytomedicine* 9(1), 9–14.
24. Kinghorn, A. D., & Soejarto, D. D. (1985): Current status of stevioside as a sweetening agent for human use. In H. Wagner, H. Hikino, & N. R. Farnsworth (Eds.), *Economic and medical plant research Vol. 1* (pp. 1–52). London: Academic Press. Kinghorn, A. D., & Soejarto, D. D. (2002). Discovery of terpenoid and phenolic sweeteners from plants. *Pure Appl Chem* 74(7), 1169–1179. Kitahata, S., Ishikawa, H., Miyata, T., & Tanaka, O. (1989). Production of rubusoside derivatives by transgalactosylation of various  $\beta$ -galactosidases. *Agric Biol Chem* 53(11), 2923–2928.
25. Liébana, J., 2002. En: *Microbiología Oral. Segunda edición* México: McGraw Hill, pp 597-605.
26. Matsui, M., Matsui, K., Nohmi, T., Mizusawa, H., & Ishidate, M. (1989): Mutagenicity of steviol: an analytical approach using the Southern blotting system. *Eisei Shikenjo Hokoku* 107, 83–87.
27. Melis, E. (1997): Effects of steviol on renal function and mean arterial pressure in rats. *Phytomedicine* 3, 349–352.

28. Renwick, A. G. (2008): Toxicokinetics [section on elimination: excretion via the gut]. In W. Hayes (Ed.), Principles and Methods of Toxicology (pp. 188)., 5th ed. Philadelphia, PA: Taylor & Francis/CRC Press.
29. Renwick, A. G. (2008): The use of a sweetener substitution method to predict dietary exposures for the intense sweetener rebaudioside A. Food Chem Toxicol 46(7 Suppl 1), S61–69.
30. Roberts, A., & Renwick, A. G. (2008): Comparative toxicokinetics and metabolism of rebaudioside A, stevioside, and steviol in rats. Food Chem Toxicol 46(7 Suppl 1), S31–39. Sartor, R. B. (2008). Microbial influences in inflammatory bowel diseases. Gastroenterology 134 (2), 577–594.
31. Sehar, I., Kaul, A., Bani, S., Pal, H. C., & Saxena, A. K. (2008). Immune up regulatory response of a non-caloric natural sweetener, stevioside. Chem Biol Interact 173(2), 115–121.
32. Srimaroeng, C., Jutabha, P., Pritchard, J. B., Endou, H., & Chatsudthipong, V. (2005). Interactions of stevioside and steviol with renal organic anion transporters in S2 cells and mouse renal cortical slices. Pharm Res 22(6), 858–866.
33. Tadhani & Subhash, Manish B, et al. (2006): In vitro antimicrobial activity of Stevia Rebaudiana Bertoni leaves. Tropical Journal of Pharmaceutica Research.; 5: 557-560.
34. Takahashi, K., Matsuda, M., Ohashi, K., Taniguchi, K., Nakagomi, O., Abe, Y., et al. (2001): Analysis of anti-rotavirus activity of extract from Stevia rebaudiana. Antiviral Res 49(1), 15–24.

35. Toskulkao, C., Chaturat, L., Temcharoen, P., & Glinsukon, T. (1997): Acute toxicity of stevioside, a natural sweetener, and its metabolite, steviol, in several animal species. *Drug Chem Toxicol* 20(1–2), 31–44.
36. Toskulkao, C., Deechakawan, W., Leardkamolkarn, V., Glinsukon, T., & Buddhasukh, D. (1994): The low calorie natural sweetener stevioside: nephrotoxicity and its relationship to urinary enzyme excretion in the rat. *Phytother Res* 8(5), 281–286.
37. Wheeler, A., Boileau, A. C., Winkler, P. C., Compton, S. C., Prakash, J., Jiang, X., et al.(2008): Pharmacokinetics of rebaudioside A and stevioside after single oral doses in healthy men. *Food Chem Toxicol* 46, S54–S60.
38. Wingard, R. E., Jr., Brown, J. P., Enderlin, F. E., Dale, J. A., Hale, R. L., & Seitz, C. T. (1980): Intestinal degradation and absorption of the glycosidic sweeteners stevioside and rebaudioside A. *Experientia* 36(5), 519–520.
39. Yamada, A., Ohgaki, S., Noda, T., & Shimizu, M. (1985). Chronic toxicity of dietary stevia extracts. *J Food Hyg Soc Jpn* 26, 169–183. Yamamoto, K., Yoshikawa, K., & Okada, S. (1994): Effective production of glycosyl steviosides by  $\alpha$ -1,6 transglucosylation of dextrin dextranase. *Biosci Biotechnol Biochem* 58(9), 1657–1661.



## ANEXO 1

### Preparación de soluciones de Estevia al 10, 25, 50, 75 y 100%

Se dispusieron 5 tubos de ensayo estériles rotulados al 10, 25, 50, 75, y 100%. Para alcanzar dichas concentraciones en un volumen de 5 ml se utilizó la siguiente fórmula:

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

#### Obtención de Solución de Estevia al 100%

Para obtener estevia al 100% se colocaron 5 ml de “Stevia Pure Liquid AS Lot 338” en el tubo de ensayo rotulado al 100%.

#### Obtención de Solución de Estevia al 75%

Para obtener estevia al 75% se colocaron 3.75 ml de “Stevia Pure Liquid AS Lot 338” y 1.25 ml de agua destilada (**Figura 1**), de acuerdo a la fórmula:

$$V_2 = \frac{5\text{ml} \times 75}{100} = 3.75 \text{ ml de "Stevia Pure Liquid AS Lot 338"}$$

5 ml - 3.75 = 1.25 ml de agua destilada

#### Obtención de Solución de Estevia al 50%

Para obtener estevia al 50% se colocaron 2.5 ml de “Stevia Pure Liquid AS Lot 338” y 2.5 ml de agua destilada (**Figura 1**), de acuerdo a la fórmula:

$$V_2 = \frac{5\text{ml} \times 50}{100} = 2.5 \text{ ml de "Stevia Pure Liquid AS Lot 338"}$$

5 ml - 2.5 = 2.5ml de agua destilada

### Obtención de Solución de Estevia al 25%

Para obtener estevia al 25% se colocaron 1.25 ml de “Stevia Pure Liquid AS Lot 338” y 3.75 ml de agua destilada (**Figura 1**), de acuerdo a la fórmula:

$$V_2 = \frac{5\text{ml} \times 25}{100} = 1.25 \text{ ml de "Stevia Pure Liquid AS Lot 338"}$$

5 ml - 1.25 = 3.75 ml de agua destilada

### Obtención de Solución de Estevia al 10%

Para obtener estevia al 10% se colocaron 0.5 ml de “Stevia Pure Liquid AS Lot 338” y 4.5 ml de agua destilada (**Figura 1**), de acuerdo a la fórmula:

$$V_2 = \frac{5\text{ml} \times 10}{100} = 0.5 \text{ ml de "Stevia Pure Liquid AS Lot 338"}$$

5 ml - 0.5 = 4.5 ml de agua destilada

Finalmente se obtuvieron 5 ml de Estevia al 10, 25, 50, 75, y 100%, tal como se muestra en la **Figura 2**.



*Figura 1: Tubos de ensayo con agua destilada previa mezcla con estevia*



*Figura 2: Diluciones de estevia al 100, 75, 50, 25 y 10%*

## ANEXO 2

### Preparación de la solución madre para *Streptococcus mutans*.

Las cepas Bacterianas obtenidas del ISP fueron cultivadas en 100 ml de Brain Heart Infusion Agar a 37° C por 2 días en un ambiente de aerobiosis. (**Figura 1**)

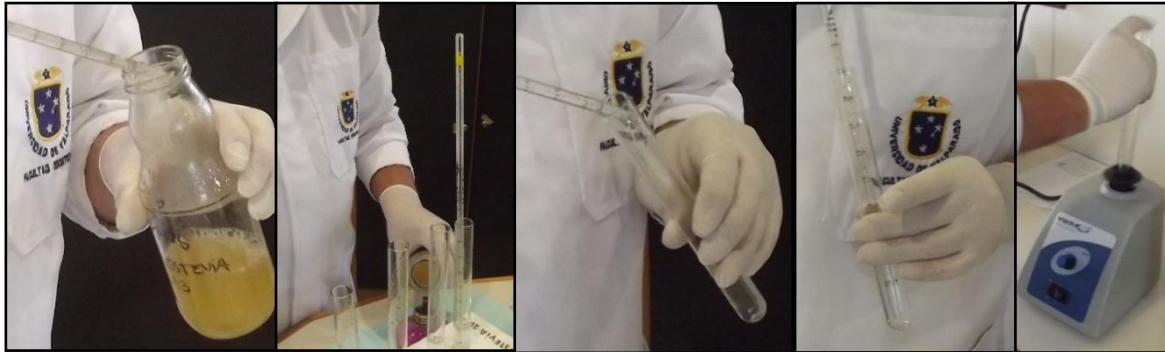


Figura 1: Solución Madre de *S. mutans*

### Preparación de diluciones de *S. mutans* con Estevia, Agua e Hipoclorito de Sodio

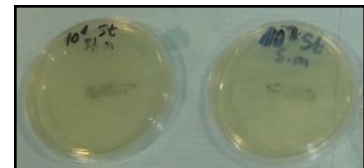
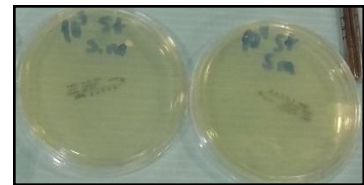
Con una micropipeta estéril se extrajo 1 ml. de solución madre y se depositó en el tubo de ensayo estéril rotulado, como 1Sm 1:1 100%. Se repitió el mismo procedimiento hasta colocar 1 ml en los 6 tubos de ensayo restantes, rotulados como 1Sm 1:1 75%, 1Sm 1:1 50%, 1Sm 1:1 25%, 1Sm 1:1 10%, 1Sm H<sub>2</sub>O 1:1 y 1Sm NaOCl 1:1. Acto seguido se agregó 1 ml de estevia al 10% al tubo rotulado como 1Sm 1:1 10% para luego mezclar la dilución en la vibradora. Se repitió el mismo procedimiento con las diluciones restantes de menor a mayor concentración de estevia. (**Figura 2**) Mediante la utilización de una micropipeta estéril se depositó 1 ml de hipoclorito de sodio en el tubo de ensayo rotulado como 1Sm 1:1 NaOCl. Se repitió el mismo procedimiento colocando con una micropipeta estéril 1 ml de agua

destilada en el tubo de ensayo rotulado como 1Sm 1:1 H2O. Ambas diluciones se mezclaron en la vibradora por 5 sg.



*Figura 2 Secuencia de obtención de diluciones a partir de la solución madre.*

Todas las placas deben estar previamente secadas y rotuladas con el tipo de bacteria y la concentración de estevia a inocular.



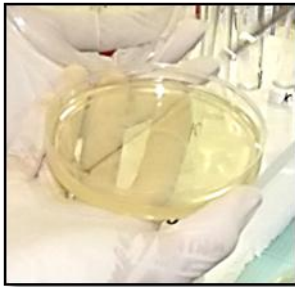
*Figura 3: Medios de cultivo TYCSB rotulados.*

### **Siembra de Diluciones de *S. mutans* en Medio de cultivo TYCSB**

Posteriormente se extrajo con una asa bacteriológica estéril 0.1 ml de dilución de cada tubo de ensayo, partiendo por el tubo 1Sm 1:1 10%, % y se depositó en el centro del medio de cultivo TYCSB rotulado con el mismo nombre. Se repitió el mismo procedimiento con las otras cuatro diluciones de estevia. (respetando el

siguiente orden de concentración: Estevia 25%, 50%, 75% y 100%) y con las diluciones de agua e hipoclorito de sodio.

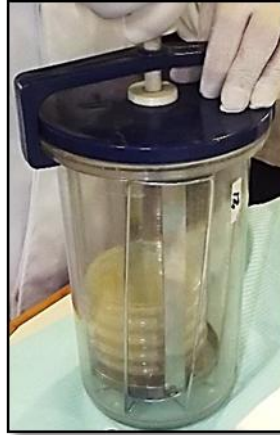
El asa bacteriológica es un instrumento de laboratorio que consta de una base y un filamento que termina en un aro de 5 mm o bien en punta. Se emplea para transportar o arrastrar pequeños volúmenes de microorganismos en suspensión desde la solución de trabajo también llamada “solución madre” al medio de cultivo (sólido o líquido). La cantidad de inóculo que se traslada está determinada por el diámetro del aro del filamento, que se encuentra calibrado y normalmente oscila entre 0,1 y 0,01 ml.



Una vez depositada la dilución en el centro de la placa, se procede a sembrar las bacterias por todo el medio de cultivo, esparciendo la gota en todas direcciones, tal como se muestra en la **figura 4**.

*Figura 4: Siembra en medio de cultivo TYSCB*

Las 7 placas inoculadas se cultivaron por 48 horas a 37°C en un ambiente de Anaerobiosis. Este ambiente se logró mediante una campana Gaspack y una pastilla efervescente liberadora de CO<sub>2</sub> (**Figura 5**).



*Figura 5: Campana de Gaspack*

Transcurridos los 2 días se procedió a realizar el conteo de UFC de los 7 medios de cultivo inoculados. Este procedimiento se realizó con la ayuda de una Lupa Spencer. **(Figura 6)**

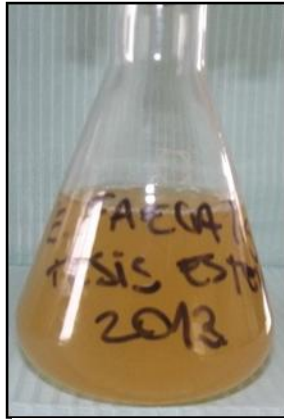
El procedimiento anteriormente señalado se repitió hasta alcanzar el tamaño muestral especificado en la **Materiales y Métodos, III.6.1 Selección y tamaño de la muestra.**



*Figura 6: Lupa Spencer*

### **Preparación de la solución madre *Enterococcus faecalis*.**

Las cepas Bacterianas obtenidas del ISP fueron cultivadas en 100 ml de Brain Heart Infusion Agar a 37° C por 2 días en un ambiente de aerobiosis. (**Figura 7**)



*Figura 7: Solución madre de E. faecalis.*

### **Preparación de diluciones de *E. faecalis* con Estevia, Agua e Hipoclorito de Sodio**

Con una micropipeta estéril se extrajo 1 ml. de solución madre y se depositó en el tubo de ensayo estéril rotulado, como 1Ef 1:1 100%. Se repitió el mismo procedimiento hasta colocar 1 ml en los 6 tubos de ensayo restantes, rotulados como 1Ef 1:1 75%, 1Ef 1:1 50%, 1Ef 1:1 25%, 1Ef 1:1 10%, 1Ef H<sub>2</sub>O 1:1 y 1Ef NaOCl 1:1. Acto seguido se agregó 1 ml de estevia al 10% al tubo rotulado como 1Ef 1:1 10% para luego mezclar la dilución en la vibradora. Se repitió el mismo procedimiento con las diluciones restantes de menor a mayor concentración de estevia. (**Figura 8**)

Mediante la utilización de una micropipeta estéril se depositó 1 ml de hipoclorito de sodio en el tubo de ensayo rotulado como 1Ef 1:1 NaOCl. Se repitió el mismo procedimiento colocando con una micropipeta estéril 1 ml de agua destilada en el tubo de ensayo rotulado como 1Ef 1:1 H<sub>2</sub>O



Figura 8: Secuencia de obtención de diluciones

Todas las placas deben estar previamente secadas y rotuladas con el tipo de bacteria y su concentración (**Figura 9**)

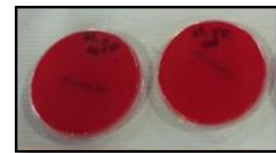
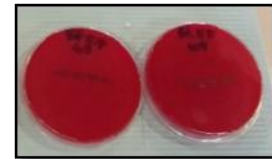


Figura 9: Medios de cultivo rotulados

### Siembra de Diluciones de *E. faecalis* en Medio de cultivo Agar Sangre

Posteriormente se extrajo con una asa bacteriológica estéril 0.1 ml de dilución de cada tubo de ensayo, partiendo por el tubo 1Ef 1:1 10%, % y se depositó en el centro del medio de cultivo Agar sangre rotulado con el mismo nombre Se repitió el mismo procedimiento con las otras cuatro diluciones de estevia, (respetando el siguiente orden de concentración: Estevia 25%, 50%, 75% y 100%) y con las diluciones de agua e hipoclorito de sodio, utilizando dos asas bacteriológicas estériles.



*Figura 10: Siembra de E. faecalis en medio de cultivo Agar Sangre*

Una vez depositada la dilución en el centro de la placa, se procede a sembrar las bacterias por todo el medio de cultivo, esparciendo la gota en todas direcciones, tal como se muestra en la **figura 10**.



*Figura 11: Medios de cultivo inoculados en horno*

Las 7 placas inoculadas se cultivaron por 48 Hrs. A 37° en un ambiente de aerobiosis. (**Figura 11**)

Transcurridas las 48 horas se procedió a realizar el conteo de UFC de los 7 medios de cultivo inoculados. Este procedimiento se realizó con la ayuda de una Lupa Spencer. (**Figura 12**)

El procedimiento anteriormente señalado se repitió hasta alcanzar el tamaño muestral especificado en la **Materiales y Métodos, III.6.1 Selección y tamaño de la muestra.**



*Figura 12: Lupa Spencer*

### ANEXO 3

Tubo	Tratamiento	Bacteria	UFC
1.1	Estevia 100%	S. mutans	836
1.2	Estevia 75%	S. mutans	1116
1.3	Estevia 50%	S. mutans	620
1.4	Estevia 25%	S. mutans	464
1.5	Estevia 10%	S. mutans	304
1.6	H2O	S. mutans	112
1.7	NaOCl	S. mutans	0
2.1	Estevia 100%	S. mutans	712
2.2	Estevia 75%	S. mutans	780
2.3	Estevia 50%	S. mutans	756
2.4	Estevia 25%	S. mutans	380
2.5	Estevia 10%	S. mutans	80
2.6	H2O	S. mutans	2
2.7	NaOCl	S. mutans	0
3.1	Estevia 100%	S. mutans	900
3.2	Estevia 75%	S. mutans	912
3.3	Estevia 50%	S. mutans	848
3.4	Estevia 25%	S. mutans	276
3.5	Estevia 10%	S. mutans	444
3.6	H2O	S. mutans	18
3.7	NaOCl	S. mutans	1
4.1	Estevia 100%	S. mutans	1392
4.2	Estevia 75%	S. mutans	976
4.3	Estevia 50%	S. mutans	2252
4.4	Estevia 25%	S. mutans	2464
4.5	Estevia 10%	S. mutans	436
4.6	H2O	S. mutans	44
4.7	NaOCl	S. mutans	0
5.1	Estevia 100%	S. mutans	1020
5.2	Estevia 75%	S. mutans	1832
5.3	Estevia 50%	S. mutans	2184
5.4	Estevia 25%	S. mutans	1376
5.5	Estevia 10%	S. mutans	212

5.6	H2O	S. mutans	41
5.7	NaOCl	S. mutans	0
6.1	Estevia 100%	S. mutans	1920
6.2	Estevia 75%	S. mutans	2832
6.3	Estevia 50%	S. mutans	3272
6.4	Estevia 25%	S. mutans	1208
6.5	Estevia 10%	S. mutans	1092
6.6	H2O	S. mutans	19
6.7	NaOCl	S. mutans	0
7.1	Estevia 100%	S. mutans	1496
7.2	Estevia 75%	S. mutans	1384
7.3	Estevia 50%	S. mutans	1944
7.4	Estevia 25%	S. mutans	2456
7.5	Estevia 10%	S. mutans	2584
7.6	H2O	S. mutans	3
7.7	NaOCl	S. mutans	0
8.1	Estevia 100%	S. mutans	3128
8.2	Estevia 75%	S. mutans	2352
8.3	Estevia 50%	S. mutans	5096
8.4	Estevia 25%	S. mutans	3136
8.5	Estevia 10%	S. mutans	832
8.6	H2O	S. mutans	34
8.7	NaOCl	S. mutans	0
9.1	Estevia 100%	S. mutans	2096
9.2	Estevia 75%	S. mutans	2824
9.3	Estevia 50%	S. mutans	4360
9.4	Estevia 25%	S. mutans	2320
9.5	Estevia 10%	S. mutans	1880
9.6	H2O	S. mutans	35
9.7	NaOCl	S. mutans	0
10.1	Estevia 100%	S. mutans	4008
10.2	Estevia 75%	S. mutans	2256
10.3	Estevia 50%	S. mutans	1856
10.4	Estevia 25%	S. mutans	2872
10.5	Estevia 10%	S. mutans	1512
10.6	H2O	S. mutans	33
10.7	NaOCl	S. mutans	0
1.1	Estevia	E. faecalis	1792

	100%		
1.2	Estevia 75%	E. faecalis	2464
1.3	Estevia 50%	E. faecalis	2024
1.4	Estevia 25%	E. faecalis	2264
1.5	Estevia 10%	E. faecalis	1312
1.6	H2O	E. faecalis	2240
1.7	NaOCl	E. faecalis	0
2.1	Estevia 100%	E. faecalis	1432
2.2	Estevia 75%	E. faecalis	1248
2.3	Estevia 50%	E. faecalis	816
2.4	Estevia 25%	E. faecalis	624
2.5	Estevia 10%	E. faecalis	1512
2.6	H2O	E. faecalis	1848
2.7	NaOCl	E. faecalis	0
3.1	Estevia 100%	E. faecalis	1096
3.2	Estevia 75%	E. faecalis	1968
3.3	Estevia 50%	E. faecalis	116
3.4	Estevia 25%	E. faecalis	1928
3.5	Estevia 10%	E. faecalis	1728
3.6	H2O	E. faecalis	1840
3.7	NaOCl	E. faecalis	0
4.1	Estevia 100%	E. faecalis	1696
4.2	Estevia 75%	E. faecalis	1568
4.3	Estevia 50%	E. faecalis	1896
4.4	Estevia 25%	E. faecalis	2416
4.5	Estevia 10%	E. faecalis	1480
4.6	H2O	E. faecalis	1976
4.7	NaOCl	E. faecalis	0
5.1	Estevia 100%	E. faecalis	1736
5.2	Estevia 75%	E. faecalis	1776
5.3	Estevia 50%	E. faecalis	1704
5.4	Estevia 25%	E. faecalis	1776
5.5	Estevia 10%	E. faecalis	1752
5.6	H2O	E. faecalis	x
5.7	NaOCl	E. faecalis	0
6.1	Estevia 100%	E. faecalis	2016
6.2	Estevia 75%	E. faecalis	1600
6.3	Estevia 50%	E. faecalis	1856

6.4	Estevia 25%	E. faecalis	1880
6.5	Estevia 10%	E. faecalis	1624
6.6	H2O	E. faecalis	1952
6.7	NaOCl	E. faecalis	0
7.1	Estevia 100%	E. faecalis	1848
7.2	Estevia 75%	E. faecalis	1944
7.3	Estevia 50%	E. faecalis	2488
7.4	Estevia 25%	E. faecalis	1704
7.5	Estevia 10%	E. faecalis	3096
7.6	H2O	E. faecalis	1224
7.7	NaOCl	E. faecalis	0
8.1	Estevia 100%	E. faecalis	1664
8.2	Estevia 75%	E. faecalis	1368
8.3	Estevia 50%	E. faecalis	1912
8.4	Estevia 25%	E. faecalis	2416
8.5	Estevia 10%	E. faecalis	1088
8.6	H2O	E. faecalis	1846
8.7	NaOCl	E. faecalis	0
9.1	Estevia 100%	E. faecalis	2848
9.2	Estevia 75%	E. faecalis	2112
9.3	Estevia 50%	E. faecalis	1568
9.4	Estevia 25%	E. faecalis	1952
9.5	Estevia 10%	E. faecalis	2112
9.6	H2O	E. faecalis	1844
9.7	NaOCl	E. faecalis	0
10.1	Estevia 100%	E. faecalis	1664
10.2	Estevia 75%	E. faecalis	1328
10.3	Estevia 50%	E. faecalis	2016
10.4	Estevia 25%	E. faecalis	1904
10.5	Estevia 10%	E. faecalis	2200
10.6	H2O	E. faecalis	1847
10.7	NaOCl	E. faecalis	0

**Tabla I:** Base de datos