

Valoración in vitro de la actividad antimicótica del extracto de SteviaRebaudiana contra la cándida Albicans, sucre 2011-2012

Gladys Chilaca & Cintia Cava

G. Chilaca & C. Cava

Universidad Mayor, Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca, Facultad de Ciencias Químico Farmacéuticas y Bioquímicas, Calle Dalence Nº 51, Sucre- Bolivia.

M. Ramos, J. Pizarro, M. Mojica, N. Pereira, M Solis (eds). Tópicos Selectos de Química -©ECORFAN-Bolivia. Sucre, Bolivia, 2014.

Abstract

In the last couple of years, Stevia has been very popular, mostly consumed as leaf teas, syrups and honey, but now as a product "processed". However, on the other hand, is also raised in the literature, the use as an antimycotic.

This paper aims to determine the antifungal activity of Stevia rebaudiana extracts at different concentrations against *Candida albicans*.

The way to determine if it really have antifungal activity , was performing the art of disk diffusion , for it extracts rebaudiana Stevia 10% , 20% and 30 % concentration , then embed filter paper disc was obtained , prepared above , and placing on the sowing performed with *Candida albicans* strains on the culture medium and Sabouraud dextrose agar to observe whether there halo formation and comparing inhibition halos formed with ketoconazole .

The work is considered to *Candida albicans* is sensitive to stevia extract at 30% as a halo of inhibition of 20 mm average compared with the inhibition halo formed with the antifungal ketoconazole which was 26 mm in average diameter were formed.

9 Introducción

La Stevia era usada desde hace mucho tiempo por los indios guaraníes y es conocida también como hierba dulce, Ka-á he-é o Caá-jhe-é, y ofrece una gran cantidad de beneficios para nuestra salud, es una planta a la que se le concede propiedades antiácida, antibacteriana bucal, antidiabética, cardiotónica, digestiva, diurética, edulcorante, hipoglucemiante, hipotensora, mejoradora del metabolismo y vasodilatadora.

El sabor dulce de la planta se debe a un glucósido llamado steviosido. La Stevia en su forma natural es 15 veces más dulce que el azúcar de mesa (sacarosa). Y el extracto en polvo es de 100 a 300 veces más dulce que el azúcar.

Estudios denotan su actividad antibiótica, especialmente contra las bacterias *E. Coli*, *Staphilococosaureus*, *Saccharomycescerevisiae*, *Proteusvulgaris*, *Pseudomonaeruginosa* y *Corynebacteriumdifteriae*, así como también contra el hongo *Cándida albicans* productor frecuente de vaginitis en la mujer.

La *Cándida albicans* puede asumir patogeneidad provocando la candidiasis; en ese caso se presenta como una afección vaginal (vaginitis), de la cavidad oral, del intestino o de la piel.

Sobre las bases de estas consideraciones se plantea el siguiente Problema de Investigación: ¿Cuál será la actividad antimicótica del extracto de *Steviarebaudiana* frente a la *Cándida albicans*?

Se estableció como Objeto de Estudio: El extracto de *Steviarebaudiana* como antimicótico frente a la *Cándida albicans*. Y el Campo de Acción: Actividad inhibitoria de la *Cándida albicans* con la *Steviarebaudiana*.

Lo antes mencionado está Justificado con: La candidiasis constituye un grupo de infecciones causada por un hongo oportunista, del género *Cándida*, de los cuales *Cándida albicans* es la más frecuente. Representa un 25% de las micosis.

Estos hongos están siempre presentes en la piel y en la mucosa del tracto digestivo, genitourinario y respiratorio de la mayoría de las personas, pero se encuentran controlados por otros microorganismos no patógenos. Cuando se produce un desequilibrio, el aumento desmedido de la población de hongos produce esta u otras micosis.

Cuando el hongo de la *Cándida* se produce, es muy importante buscar un tratamiento para eliminar esta infección por hongos que puede ser vaginal, oral o genital, en general tiene un buen pronóstico, sin embargo, a veces es difícil de tratar. Los antibióticos terapéuticos reducen y debilitan a las bacterias amistosas y permiten a la *Cándida* florecer y reaparecer con el tiempo.

La hierba conocida con el nombre de *Stevia*, ofrece una gran cantidad de beneficios para nuestra salud siendo muy importante para el tratamiento natural contra la *Cándida albicans*. No es un diagnóstico aceptado por la comunidad médica convencional.

El presente trabajo busca ampliar los conocimientos de forma integral acerca de las propiedades medicinales de la *stevia*, en especial comprobar la acción antimicótica contra la *Cándida albicans*.

De acuerdo al problema planteado se hizo necesario dar una dirección a la investigación para lo cual se determinó los siguientes objetivos, como:

Objetivo General

Valorar la actividad antimicótica, in vitro, del extracto de *Steviarebaudiana* contra la *Cándida albicans*.

Objetivos Específicos

- Obtener el extracto de *Steviarebaudiana* a diferentes concentraciones.
- Cultivar y aislar las colonias de la *Cándida albicans*.
- Comparar la sensibilidad de la propiedad antimicótica del extracto de *Steviarebaudiana* con otro antimicótico (Ketoconazol), contra la *Cándida albicans*.

Como respuesta al problema se planteó la siguiente Idea A Defender: El extracto de *Steviarebaudiana* tiene propiedades antimicótica frente a la *Cándida albicans*.

9.1 Marco contextual

Bolivia

Bolivia es un Estado Plurinacional independiente y democrático. Su moneda oficial es el boliviano. Los idiomas oficiales son el castellano (el más hablado), el quechua, el aymara y el tupí guaraní. El territorio boliviano se divide en 9 departamentos y 112 provincias. Bolivia cuenta con aproximadamente 10.270.300 habitantes, con una superficie de 1.098.581 Km².

Bolivia se localiza en el centro de América del Sur, sin salida al mar, y limita con Brasil, Paraguay, Argentina, Perú y Chile. En su territorio se reconocen tres regiones muy diferenciadas.

El clima y la vegetación de Bolivia varían en función del relieve desde las plantas espinosas y cactus de las llanuras orientales, donde predomina el clima tropical cálido y seco que se extiende por la fría región andina con clima de montaña, donde habitan la llama y la alpaca (cuya lana es muy apreciada), pasando por las ya mencionadas selva amazónica y los bosques tropicales de los jaguares.

Bolivia posee importantes recursos minerales (plata, tungsteno, estaño y zinc), de hidrocarburos y agrarios. ⁽¹²⁾

Las ciudades más pobladas de Bolivia, que superan los dos millones de habitantes, son: La Paz, sede de gobierno, con su ciudad-suburbio El Alto, y Santa Cruz de la Sierra.

Pertenece a varias organizaciones internacionales, como la ONU (Organización de las Naciones Unidas) y la OEA (Organización de Estados Americanos).

Situación de la salud en Bolivia

Bolivia es un país en vías de desarrollo, actualmente la situación de la salud es crítica, cuyas características relacionan el proceso salud enfermedad de las comunidades y que es necesario establecer relaciones, que determinen la vulnerabilidad de una población, los que constituyen riesgos particulares frente a la atención en salud.

Según el mapa de pobreza el 70% de los hogares son pobres 32% indigencia, 33% pobreza moderada y el 5% de marginalidad. El 13% de hogares se encuentra en el umbral de la pobreza con un mínimo de satisfacción de necesidades básicas y el 17% de hogares satisfacen sus necesidades básicas; por cuanto dicho porcentaje no pueden satisfacer sus necesidades de educación, vivienda más aun preservar la salud física, mental y acceder a una comunidad sustentable (mejor calidad de vida).

Tabla 9 Datos Estadísticos de Salud en Bolivia. Información Consolidada Semana 1 a Semana 4 Gestión 2012

Enfermedad/Daño	Sospechosos	Confirmados	Fallecidos
Cólera	0	0	0
Dengue Clásico	2615	169	1
Dengue Hemorrágico	10	0	0
Hanta Virus	1	0	0
Fiebre Hemorrágica Boliviana	8	2	2
Leptospirosis	1	0	0
Meningitis meningocócica	1	0	0
Mordedura Serpiente	18	0	0
Parálisis flácida aguda	1	0	0
Pers. expuestas virus rábico	459	0	0
Rabia Canina	42	23	0
Sarampión/Rubéola	6	0	0
Tosferina	2	0	0

Chuquisaca

El Departamento de Chuquisaca es una de las nueve divisiones territoriales de Bolivia, con 51.524 km². Su capital es Sucre, antiguamente llamada La Plata o Charcas.

El departamento tiene una población Total: 531,522 Hombres: 260,604 Mujeres: 270,918 Área Urbana: 218,126 Área Rural: 313,396 (según el censo 2001).

El departamento de Chuquisaca está ubicado al sur del Estado Plurinacional de Bolivia. Limita al norte con los departamentos de Potosí, Cochabamba y Santa Cruz; al sur con el departamento de Tarija; al oeste con el departamento de Santa Cruz y la República de Paraguay y al oeste en el departamento de Potosí.

Situación de la Salud en Chuquisaca

La pirámide poblacional muestra un patrón expansivo (base ancha y cima estrecha) que refleja una alta natalidad y alta mortalidad. La estructura poblacional en este departamento muestra un predominio de población joven, donde cerca de la mitad de los habitantes tienen menos de 15 años (42%).

El parto atendido en servicio de salud es bajo se ha mantenido estacionario en los últimos años, con una cobertura de 53% en el año 2005. Ello significa que 5 de cada 10 partos no llegan a ser atendidos en establecimientos de salud, lo que conlleva riesgos para la vida de las mujeres y niños/as.

La cobertura de vacunación, representada por la cobertura de la tercera dosis de Pentavalente en niños/as menores de un año, mantiene altos índices, aunque hasta el 2005 ha tenido un ligero descenso, pues ese año fueron vacunados nueve de cada 10 niños de esa edad. ⁽¹⁴⁾

Según datos del Sistema Nacional de Información en Salud (SNIS), 2 de cada 5 niños/as menores de 5 años tiene algún grado de desnutrición.

A pesar de las intervenciones realizadas por el Ministerio de Salud para controlar la enfermedad de Chagas, este departamento se mantiene en riesgo, ya que en el 2005 el 4,1% de las viviendas tenía presencia de vinchucas, insecto transmisor de esta enfermedad. De igual manera, este departamento es considerado de mediano riesgo para la Malaria, con una incidencia parasitaria anual en el 2005 de 4,5 x 1000 (el índice nacional fue de 5,5 por mil).

El departamento de Chuquisaca cuenta con 356 establecimientos de salud, 6 de 3er nivel, 10 de segundo y 340 de primer nivel. ⁽¹⁵⁾

Sucre

La ciudad de Sucre está dividida en 8 distritos, 4 urbanos y 3 rurales. Al año 2010 el Municipio de Sucre reporta una población de 306.754 Habitantes. Aproximadamente el 90 % de la población del municipio vive en el área urbana de la ciudad y el 10 % en el área rural con una tendencia de crecimiento proporcional del área urbana debido a la inmigración interna.

Su arquitectura colonial y sus museos son una señal de su historia y cultura, tradiciones que han perdurado a través del tiempo. Sucre es la ciudad en que se dio el Primer Grito Libertario de América, el 25 de mayo de 1809, y donde se firmó el Acta de la Independencia del dominio español, el 6 de agosto de 1825.

Años después, se la designa Capital de Bolivia. Sucre es también llamada la ciudad de los 4 nombres, correspondiendo cada uno de ellos a un período de su vida. ⁽¹¹⁾

Características de la salud en Sucre

Actualmente en la ciudad de Sucre existen muchos centros de atención médica que brindan servicios de salud en todos los niveles, de estos centros hospitalarios son varios los que prestan atención de salud por especialidades. Entre los centros hospitalarios tenemos:

- Hospital de la Mujer o Gineco- Obstétrico
- Instituto Gastroenterológico Boliviano Japonés
- Hospital Santa Bárbara
- Instituto Psiquiátrico Gregorio Pacheco
- Hospital San Pedro Claver (Lajastambo)
- Hospital Jaime Mendoza (C.N.S)
- Clínica Caja CORDES
- Hospital Caja Petrolera de Salud
- Centro Médico Poconas (Ginecología, Obstetricia)
- Hospital Cristo de Las Américas
- Hospital Universitario UNI II AntonBoel V. ⁽¹¹⁾

Micosis en Bolivia y Sucre

Las micosis afecta al bienestar físico, mental y emocional. Hoy en día la Cándida puede ser una de las primeras causas de enfermedad en Bolivia porque crea una escalera de caracol de salud descendente.

La micosis, enfermedad prevenible y curable, amenazan la existencia de la comunidad Yuqui, debido a la falta de atención médica en su territorio, ubicado en el trópico de Cochabamba, estos indígenas enfrentan los efectos de la enfermedad que los van diezmando, poniendo en riesgo su existencia como raza. ⁽¹³⁾

La candidiasis bucal es muy frecuente en personas de la tercera edad alcanzando un 61.3 % Según un estudio realizado en la ciudad de Sucre, en el Hospital Jaime Mendoza en el 2009. ⁽³⁾

En un estudio realizado, en la ciudad de Sucre, a mujeres en gestación se evidencio que el 20 % presentaba infección por candidiasis vulvo-vaginal. ⁽¹⁾

Producción de Stevia en Bolivia y Chuquisaca

La Stevia ingresa al país aproximadamente el año 1992, no prospera por falta de capacitación y programas de asistencia técnica, mercado y políticas de apoyo gubernamental.

El Ministerio de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural de Bolivia, con la colaboración de la Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA), entre el 1996 y 1997, realizó en dos fases el estudio sobre Posibilidades del Desarrollo Agroindustrial de la Steviarebaudiana Bertoni, mediante el envío de dos expertos a corto plazo, uno en la parte agrícola y otro en la parte industrial, habiéndose obtenido resultados exitosos. Después de recorrer el país y observar las experiencias existentes en el cultivo de stevia los expertos concluyeron que en Bolivia existen regiones donde este cultivo puede desarrollar de manera favorable.

La producción de stevia en Bolivia es una actividad nueva. Sin embargo; teniendo en cuenta el potencial de recursos naturales con que cuenta el país y la existencia de condiciones medioambientales favorables para el cultivo, producción e industrialización de stevia, este cultivo puede constituirse en una importante agroindustria para Bolivia, con efectos multiplicadores de carácter socioeconómico y ambiental muy beneficiosos para el país y en especial para los pequeños productores.

Dentro de este contexto el pleno desarrollo agroindustrial de la stevia en Bolivia contribuirá de forma muy eficiente, eficaz y efectiva para que el país sea reconocido nacional e internacionalmente por su competencia y referencia en la producción, consumo interno y exportación de productos derivados de la stevia en calidad de un producto natural y beneficioso para la salud humana, lo que conducirá al país a tener la costumbre y hábito de generar sus propios conocimientos y tecnologías de forma ventajosa para su economía, evitando así la dependencia externa.⁽¹⁹⁾

Actualmente, la producción está muy dispersa en pequeñas superficies por lo que se hace difícil el acopio de la hoja, peor la cuantificación de la producción nacional. Las estimaciones sugieren que en Bolivia no existen más de 120 hectáreas, las mismas que están distribuidas en todo el territorio nacional, desde Pando hasta Tarija y desde Puerto Suarez hasta los Yungas de La Paz, en pequeñas superficies.

En los últimos años, sin embargo, existen empresas que están apostando en la implementación de variedades mejoradas importadas de otros países.

Asimismo, los rendimientos promedios que se obtienen, están entre los 1500 kilos a 2500 kilos de hoja seca por hectárea/año.⁽²⁵⁾

La producción de stevia en Bolivia no llega a cubrir ni el 5 por ciento de la demanda nacional, según datos del Centro de Investigación y Producción de Stevia (CIPE), que lleva más de 14 años en la actividad.

El precio por kilo de hoja seca de stevia incrementó en los últimos años de 1,5 dólares, al precio actual de \$us 10 por kilo.

En cuanto a la rentabilidad, con la variedad criolla se obtiene un precio entre 2 y 2,5 dólares el kilo, con la variedad M1C1 (Morita Criolla), esta *variedad* es mucha más dulce q la criolla, se obtiene de 5 a 7 dólares. Es decir, que si produce mil kilos es posible ganar hasta 7 mil dólares, con los precios actuales se puede tener ingresos de hasta 10.000 \$us por hectárea.

Con la variedad M1C1 (Morita Criolla), ahora no será difícil dedicarse a la producción de stevia. Antes sólo se vendían plantines y cada uno cuesta hasta 2 bolivianos. Si uno quería comprar 100 mil plantines, que es lo recomendable para sembrar una hectárea, tenía que invertir 200 mil bolivianos. Ahora la inversión es de solamente 7.000 bolivianos usando semilla.⁽⁶⁾

El Centro de Investigación y Producción de stevia (CIPE). Logró resultados especialmente en Santa Cruz, pero también empezó a llegar con fuerza a La Paz y Cochabamba.

En Chuquisaca promueve proyectos experimentales. El cultivo de la stevia es muy promisorio para Chuquisaca, porque una persona puede obtener entre 10 mil y 15 mil dólares por hectárea cultivada.

En Chuquisaca, el CIPE ya hizo pruebas en Río Chico, Cachimayu, Nucchu, Yamparáez, Zudáñez, Tomina, Sopachuy, Padilla, Serrano, Tarabuco y Monteagudo. Los proyectos de ensayo fueron financiados por organismos internacionales, que están predispuestas a seguir incentivando emprendimientos en el cultivo de stevia.⁽⁵⁾

Los municipios de Padilla, en la región de Chuquisaca Centro, y Yotala, en Chuquisaca Norte, fueron las localidades identificadas para implementar Centros Pilotos de producción de stevia en el Departamento.

9.2 Marco teórico

Nombre Steviarebaudiana

Nombre científico: Steviarebaudiana Bertoni = Eupatoriumrebaudianum Bertoni.

Familia: Compuestas (Asteráceas).

Nombres populares: caájeé, kaáheé, estévia, CaáHeé - Yerba Dulce

Descripción

Hierba vivaz de 40 hasta 80 cm de altura, tallo anual subleñoso de color parduzco, sin ramificaciones durante el primer año, abundantes ramificaciones a partir del segundo, raíz pivotante poco profunda; hojas cortamente pecioladas, casi sésiles, ovales o lanceoladas, bordes aserrados, tomentosas, las distales agrupadas en número de tres o cuatro, color verde intenso en el envés y verde azulado y lustroso en el haz; flores hermafroditas, pequeñas, corola de color blanco, distribuidas en panículas terminales. Florece durante primavera y otoño.

Hábitat

Oriunda de Paraguay, naturalizada en Brasil y Argentina (Misiones), en donde se encuentran abundantes eco tipos. Se la cultiva en Japón, China, Corea, Taiwán, Tailandia, Indonesia y Filipinas. En América es cultivada principalmente en Paraguay y Brasil, también en la Argentina y Bolivia.⁽¹⁰⁾

Parte utilizada

Hojas, de las cuales se extraen distintos componentes de propiedades edulcorantes, siendo los más importantes el steviósido y el rebaudiósido A, que en plantas no mejoradas alcanzan entre un 6 a 8% y 2 a 3% respectivamente. El contenido y la proporción de componentes activos es variable según la variedad, fase de desarrollo, estado de crecimiento, etc.

Requerimientos para su cultivo

Clima: En Paraguay, Brasil y Argentina crece espontánea en áreas con clima subtropical, subhúmedo, con precipitaciones entre 1.200 y 1.800 mm³ distribuidos durante todo el año.

Temperatura: Temperaturas promedios superiores a 20° C. Es muy poco resistente a la falta de agua. La temperatura apropiada para su cultivo es entre 15 y 30° C, sin riesgo de heladas posteriores al momento de brotación. La temperatura mínima para la germinación es 20° C.

Suelo: Se la encuentra espontánea en diferentes tipos de suelos: de fertilidad escasa, ácidos, desde arenosos a húmidos y con alta humedad. Crece muy bien en suelos arenosos húmidos con un pH de 6,5 a 7,5, no salinos. Si bien crece en suelos arcillosos, éstos deben ser de buen drenaje; no son convenientes los suelos con excesos de humedad ni los de alto contenido de materia orgánica, principalmente por problemas fúngicos.

Cultivo

Multiplicación: puede realizarse en forma sexual o asexual.

- **Por semillas.-** Por ser una especie de polinización cruzada (auto incompatible) se produce una gran variabilidad tanto en aspectos morfológicos como en el contenido de steviósido en las plantas hijas, pero es un método válido en producciones pequeñas.⁽²⁰⁾

El poder germinativo de la semilla es generalmente bajo, rondando entre el 10 y 40% al ser cosechada, siendo su longevidad no mayor a los 8 meses.

La conservación debe realizarse en condiciones de baja humedad y temperatura, en oscuridad y preferentemente en envases herméticos.

Para retirar semillas se deben elegir plantas vigorosas, seleccionadas por su producción y comportamiento agronómico.

Es conveniente iniciar el cultivo en vivero y producir plantines, esto facilita el riego y desmalezado, así como otros cuidados que fueren necesarios. Posteriormente los plantines serán llevados al terreno definitivo, generalmente durante el otoño.

- **Retosños y matas.-** Se pueden separar hijuelos durante la primavera temprana. Estos pueden ser llevados al terreno definitivo directamente. El número de hijuelos por planta es poco numeroso, por lo que es útil para cultivos de pequeñas superficies y la selección y multiplicación de plantas madres. Conviene hacer una selección y clasificación de los hijuelos, descartando enfermos, defectuosos y muy pequeños.
- **Estacas.-** Es útil para cultivos de escala comercial. De plantas adultas se separan estacas de tallos que contengan al menos 2 ó 3 nudos, que se hacen enraizar en vivero durante el otoño e invierno distanciadas unos 10-15 cm entre sí, una vez enraizadas y durante la primavera se las llevará al terreno definitivo.
- **Micropropagación.-** La obtención de plantines por este método es el más conveniente para la obtención de clones de alta producción.⁽²⁰⁾

Implantación

En la elección del terreno de cultivo deberán tenerse en cuenta ciertos aspectos, como:

- Lotes que no sean de excesiva fertilidad, elevado contenido de materia orgánica en el suelo determina, que las plantas se vayan en vicio y problemas de enfermedades.
- Suelos con buen drenaje.
- Hacer una adecuada rotación de cultivos. Frutilla y tomate, por ejemplo, no son antecesores adecuados pues son atacados por los mismos patógenos. La cama de siembra y plantación deberá ser realizada en forma esmerada, en el primer caso pues se trata de semillas de tamaño muy pequeño y en el segundo porque sus raíces exploran no más allá de los 15 cm de profundidad.

La plantación definitiva podrá ser realizada ubicando los plantines entre 0,60 a 0,85 m entre líneas y 0,16 a 0,25 m entre plantas de la línea. De todos modos, se estimará una densidad de plantación de entre 55.000 y 85.000 plantas/hectáreas, ya que las distancias del cultivo convendrá adecuarlas, en cierta medida, a la maquinaria disponible en cada establecimiento.

Los momentos más adecuados para realizar la plantación es durante la mañana temprana y el atardecer, cuando las temperaturas no son tan elevadas, también son convenientes los días nublados y húmedos. Días posteriores a una lluvia son ideales o, en caso contrario, deberá realizarse un riego previo a la plantación, asimismo, con posterioridad a la plantación deberá hacerse otro.

Cuidados Culturales

Los principales cuidados consisten en el mantenimiento de un cultivo limpio por medio de métodos químicos, y mecánicos y manuales, principalmente.

Los herbicidas más comúnmente utilizados son trifluralina en pre-plantación; linurón y algún graminicida posteriormente, dependiendo de las malezas presentes y del grado de infestación; ello se complementa con carpidas mecánicas entre líneas y manuales entre plantas. Durante el invierno, previo a la brotación y de ser necesario, podrá efectuarse un corte para uniformar la altura del cultivo y favorecer una brotación uniforme.

Cosecha

La primera cosecha se realiza hacia el final de la primavera y la segunda en otoño temprano. Bajo condiciones de clima adecuado pueden llegar a realizarse tres cortes al año. Luego del corte se seca y enfarda para su envío a la planta de extracción.

Los rindes son crecientes durante los primeros tres años de cultivo, recudiéndose a partir del cuarto, momento en el cual se estima conveniente cambiarlo de potrero.

El rendimiento en steviósido de la materia seca obtenida es variable, dependiendo tanto de factores genéticos como ambientales, incluyendo en esto último tanto las condiciones de clima y suelo, las circunstancias meteorológicas durante la estación de crecimiento y el manejo del cultivo. Así se pueden encontrar en la bibliografía rendimientos de un 7% hasta un 20%.⁽²⁰⁾

Propiedades

Algunas de las propiedades de las hojas de Stevia son las siguientes:

- Al no contener azúcar (sacarosa), no contiene calorías.
- No es fermentable, por lo tanto no actúa como fuente de alimento para las levaduras.
- No es tóxico; es extensivamente usado sin efectos adversos.
- Contiene vitamina A, B2, B6, C; asimismo; proteínas, fibra dietética, hierro, fósforo, calcio, potasio, aluminio, sodio, manganeso, selenio, silicio, magnesio, zinc, cobalto, cromo, caroteno, aminoácidos, carbohidratos, enzimas, ácidos orgánicos, polisacáridos, hormonas vegetales, glucósidos, microelementos, etc., antibióticos encontrados en la stevia; stivisina, rebaudianina, glycimna.
- Las hojas de "stevia" han sido utilizadas por su sabor por los indígenas desde antes de la llegada de los españoles, de ellas se servían para endulzar alimentos y medicamentos o las masticaban por su dulzor. Actualmente se la encuentra en el comercio bajo diversas presentaciones, algunas de las cuales son: Yervas mate compuestas, lo que evita el uso de azúcar en la infusión; como simple en herboristerías y dietéticas, y extractos. ⁽²¹⁾

Usos

- Útil para endulzar café, té, mate, jugos de frutas, refrescos, pastelería, dulces, pasta dental, helados, goma de mascar, etc.
- Se lo utiliza en la elaboración de productos dietéticos como cacao, galletitas, dulces, etc. en reemplazo de los endulzantes sintéticos, con el consiguiente beneficio para la salud.
- Resalta los sabores, usado con sales, ácidos orgánicos, aminoácidos, estos pueden ser mezclados para crear efecto sinérgico.
- Realza el aroma de las infusiones o alimentos donde se añada.
- Popularmente se confeccionan saquitos de yerba dulce para la elaboración de té digestivos. Una vez fría la bolsita suelen colocarla sobre los párpados o arrugas como elastizante de la piel.
- Culinariamente la stevia es picada y agregada sobre la verdura en cocción, cereales y ensaladas.
- También está siendo utilizada en cosméticos para la piel, para el tratamiento de la piel con manchas y granos (con este fin podemos encontrarla en Europa). ⁽²¹⁾

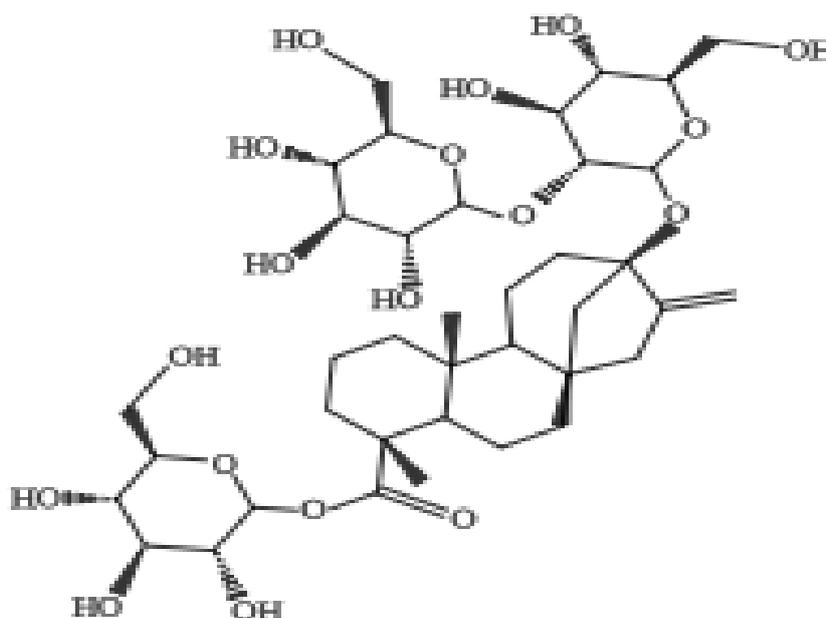
Beneficios para la salud

- Ideal para los diabéticos por no contener hidratos de carbono. En algunos países incluso se utiliza como tratamiento para mejorar la diabetes ya que parece regular los niveles de insulina. Actúa directamente, restaurando las células Beta del páncreas para que estas produzcan su propia insulina. Baja los niveles de glucosa en la sangre.
- La stevia disminuye también el deseo, apetencia o ansiedad por la comida por tomar dulces y grasas, por su acción en el conducto del hipotálamo y el estómago.
- Previene e inhibe la reproducción de bacterias y organismos infecciosos.
- Retarda la formación de placa dento-bacteriana: anti-caries (previene la caries).por eso se usa también para hacer enjuagues bucales y como componente de la pasta de dientes. Se pueden añadir una gotitas a las pasta de diente.
- También se ha reportado actividad antimicrobiana, no solo a nivel de la placa, sino frente a *Cándida albicans*, *E. Coli*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Corynebacterium difteriae*. Mejora la resistencia frente a resfriados y gripes. Por vía externa los extractos acuosos de yerba dulce han demostrado resultados preliminares beneficiosos en casos de seborrea, dermatitis, eczemas e incluso algunos casos de psoriasis. Cuando se aplica como una mascarilla facial produce un estiramiento y una suavidad efectiva de la piel, tensa las arrugas y ayuda en la cura de varios problemas de la piel.
- La stevia es un hipotensor suave.
- Es suavemente diurético. Mejora las funciones gastrointestinales.
- Puede ayudar en la desintoxicación del tabaco y del alcohol, ya que el té de stevia reduce el deseo hacia estos dos tóxicos.
- Por su parte los indígenas del Paraguay suelen atribuirle a sus hojas propiedades anticonceptivas.⁽²⁴⁾

Características edulcorantes del steviósido

La designación de steviósido, principio edulcorante de la especie, se debe a los investigadores franceses Bridel y Lavielle que en 1931 cristalizaron el principio edulcorante y determinaron que es 300 veces más dulce que el azúcar, y que no posee efectos tóxicos al realizar pruebas de laboratorio con animales.

Asimismo, se demostró que el steviósido es el edulcorante natural no nitrogenado más dulce que se encuentra en la naturaleza. El steviósido es un glucósido diterpeno de Masa molecular 804,80 y fórmula $C_{38}H_{60}O_{18}$. La estructura química fue dilucidada por Mosettig E. en 1963, siendo la aglucona el steviol. La estructura se muestra en la figura 9

Figura 9 Formula general de los glucósidos de SteviaRebaudiana

Durante la década de 1970, investigadores japoneses de las Universidades de Hiroshima y Hokkaido identificaron otros principios edulcorantes en las hojas de Stevia: Rebaudiósidos A, B, C, D y E, Dulcósidos A y B (Tabla 2) y otros de menor importancia. El rebaudiósido A es el que presenta el mayor grado de dulzor (aproximadamente 350-400 veces más dulce que el azúcar) y, es por ello que, se procura seleccionar individuos con altos contenidos de este componente.⁽¹⁸⁾

Tabla 9.1 Steviol glucósidos presentes en la Steviarebaudiana

Nombre	R 1	R 2
Steviol glucósidos más comunes		
Steviósido	-G	-G (2,1)G
Rebaudiósido A	-G	-G --(2,1)G (3,1)G
Rebaudiósido C (dulcósido B)	-G	-G --(2,1)R (3,1)G
Dulcósido A	-G	-G (2,1)R
Steviol glucósidos presentes a nivel de trazas		
Rebaudiósido D	-G (2,1)G	-G --(2,1)G (3,1)G
Rebaudiósido E	-G (2,1)G	-G (2,1)G
Estructura del esqueleto		
Steviol	-H	-OH

Se encuentra aprobado como aditivo por el Código Alimentario Nacional de Argentina, Brasil y Paraguay. Esta especie se encuentra monografía da en la 7° edición de la Farmacopea Nacional Argentina. Luego de algunos cabildeos fue aprobado por la FDA norteamericana como aditivo alimentario, aunque no se encuentra en el listado GRASS de hierbas seguras para consumo humano. Japón desde hace varios años lo emplea en la industria de alimentos de bajas calorías con singular éxito.

Propiedades físico-químicas del steviósido

- **Resistencia al calor:** presenta estabilidad a las temperaturas habituales en el procesado de alimentos. Los cristales en estado de pureza funden a 238° C.

- **Alteración del color:** no se observa oscurecimiento, aún en las condiciones más rigurosas de procesado de alimentos.
- **Solubilidad:** es altamente soluble en agua, alcohol etílico y metílico e insoluble en éter.
- **Resistencia al pH:** es suficientemente estable entre pH 3 a 9.
- **Contenido de calorías:** no es metabolizado por el organismo, por lo tanto se convierte en no calórico, y es adecuado para usos dietéticos.
- **Capacidad osmótica:** presenta buenas propiedades osmóticas para la preparación de dulces.
- **Fermentabilidad:** no es fermentable, ni atacado por las bacterias orales. No es hidrolizable por *Aspergillus niger*, ni por el fermento seco de levaduras. Se hidroliza con ácido sulfúrico diluido y por diastazas.
- **No se oscurece,** no ocurren reacciones de oscurecimiento cuando son mezclados con aminoácidos o proteínas.
- **Otras propiedades:** Dentro de la medicina popular paraguaya se utiliza como hipoglucemiante, digestivo, cardiotónico, diurético, antiácido, etc.⁽²⁴⁾

Propiedades edulcorantes

La mayor parte de los autores coinciden en que el steviósido es 300 veces más dulce que la sacarosa y el rebaudiósido A, 400. Pero debido a las extraordinarias características de potenciar su dulzura por la acción de diversas sustancias comunes en la formulación de alimentos, tales como cloruro de sodio, leche, ácidos, etc., se puede fijar como valores razonables de poder edulcorante para la mezcla natural de glucósidos, un rango de 100 a 400, dependiendo de cada alimento.

Conjuntamente con el sabor dulce, el steviósido presenta un sabor secundario, persistente, definido como sabor a regaliz-mentol, detectable a altas concentraciones. Este sabor secundario es evidente en el extracto natural. El rebaudiósido A posee un sabor dulce más puro.

Este sabor no deseado se puede enmascarar con la utilización de combinaciones de otras sustancias edulcorantes. Los mejores resultados se obtienen con sacarosa y glucosa. Con el fin de suavizar la persistencia del sabor dulce, se obtienen buenos resultados con el agregado de fructuosa, glucosa, péptidos, aminoácidos, ácidos cítrico, acético, láctico, málico y tartárico.

Con respecto a la velocidad de percepción del sabor del steviósido, se observó que la curva de intensidad percibida en función del tiempo, tiene una gran similitud con la correspondiente a la sacarosa en lo que respecta a la ubicación del máximo, pero presenta una diferencia en la duración o persistencia del sabor, siendo menor, aunque la similitud es superior a la de cualquier otro edulcorante.⁽²²⁾

Inocuidad del steviósido

La primera prueba de inocuidad del steviósido es la utilización de las hojas de Stevia por los indígenas guaraníes durante varios siglos, y por los habitantes de Paraguay, hasta la actualidad, sin observarse efectos colaterales. Ya aislados los principios activos de la Stevia, comenzaron los ensayos de laboratorio con el fin de detectar posibles efectos toxicológicos.

En 1931, observaron que tras la administración subcutánea del mismo en cobayos, no se producían afecciones hemolíticas ni otros efectos tóxicos.

En 1968, informaron que suministrando una solución de steviósido a ratas, se observaba una reducción del 20 al 30 % de la fertilidad. Posteriormente, demostraron que dicho efecto no se debía al steviósido sino al dihidroesteviol, compuesto inexistente en las hojas de Stevia y producido durante la extracción o purificación defectuosas.

En Japón, previo a la utilización masiva del steviósido, se realizaron rigurosos ensayos que probaron su inocuidad. El Ministerio de Salud de Japón, coordinó un amplio estudio en el cual nueve grupos científicos estudiaron en forma independiente la acción del steviósido. Por unanimidad se concluyó que el steviósido, con un 90 % de pureza, no poseía actividad mutagénica o teratogénica, coincidiendo, además, con otros estudios realizados anteriormente.

Informe Nutricional

Calorías: 0

Grasas saturadas: 0

Azúcares: 0

Colesterol: 0 ⁽¹⁹⁾

Fitonutrientes presentes en la Steviarebaudiana

ALUMINUM Hoja 72 ppm

ASCORBIC-ACID Hoja 110 ppm

ASH Hoja 63,000 ppm

AUSTROINULIN Planta

BETA-CAROTENE Hoja 75 ppm

CALCIUM Hoja 5,440 ppm

CHROMIUM Hoja 39 ppm

COBALT Hoja 25 ppm

DULCOSIDES Planta

FAT Hoja 19,000 ppm

FIBER Hoja 152,000 ppm

IRON Hoja 39 ppm

KILOCALORIES Hoja 2,540 /kg

MAGNESIUM Hoja 3,490 ppm

MANGANESE Hoja 147 ppm

NIACIN Hoja

PHOSPHORUS Hoja 3,180 ppm

POTASSIUM Hoja 17,800 ppm

PROTEIN Hoja 112,000 ppm

REBAUDIOSIDES Planta

RIBOFLAVIN Hoja

SELENIUM Hoja

SILICON Hoja 132 ppm

SODIUM Hoja 892 ppm

STEVIOL Planta

STEVIOSIDE Planta

THIAMIN Hoja

TIN Hoja 15 ppm

WATER Hoja 823,000 ppm

ZINC Hoja (8)

Proceso de Extracción

Figura 9.1 Diagrama de Flujo del Proceso



Trituración

Se realiza en forma manual, reduciendo las hojas secas a un tamaño de partículas adecuado para que haya mayor superficie de contacto. Triturar 500 g de hojas secas de stevia.

Extracción

En un recipiente colocar 5 litros de agua y añadir los 500 g de hojas de stevia triturada y llevar a ebullición a 92°C de temperatura por 15 minutos.

Filtración

Filtrar en un tamiz malla N° 60 y luego pasar el extracto por un tamiz malla N° 400. Pesar el residuo sólido.

Clarificación

Añadir al extracto 75 g de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ agitar y dejar reposar hasta que se separe en dos fases.

Filtración y Centrifugación

El sobrenadante filtrar en un tamiz malla N° 400 y el precipitado centrifugar por 10 minutos a 5000 rpm. Todo el líquido clarificado obtenido hacer burbujear con CO₂ por 5 minutos para eliminar los residuos del Ca (OH)₂ en forma de Ca₂CO₃, dejar reposar y filtrar al vacío con papel filtro. Se obtuvo un volumen de extracto de 2700 mL con una concentración de 3,8° Brix.

Concentración

El extracto que contienen los glucósidos continúa con el proceso de concentración con la ayuda de un rotavapor al vacío a una temperatura de 70°C. Se mide las concentraciones con la ayuda de un refractómetro, hasta alcanzar las concentraciones deseadas. ⁽¹⁸⁾

Cándida

El Género Cándida comprende más de 150 especies, cuya principal característica es la ausencia de forma sexual, con excepción de algunas especies micóticas. Son clasificadas como levaduras, las cuales corresponden a hongos con un modo de desarrollo predominantemente unicelular. Solamente una docena de las especies pertenecientes al Género Cándida poseen la facultad de adaptarse a una temperatura de 37°C. y pueden ser ocasionalmente patógenas para el hombre, estas son entre otras: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kefyr* (*pseudotropicalis*), *C. krusei*, *C. guillermondi*, *C. parakrusei*, *C. zeylanoides*, *C. stellatoidea* y *C. brumptii*.

Cándida albicans

Reino: Hongo

Filium: Ascomycota

Subfilium: Ascomycotina

Clase: Ascomycetes

Orden: Saccharomycetales

Familia: Saccharomycetacea

Genero: Candida

Especie: albicans ⁽⁷⁾

Sinonimia y binomios obsoletos

- *Oidiumalbicans* C.P. Robin, (1853)
- *Saccharomyces albicans* (C.P. Robin) Reess, (1877)
- *Dematiumalbicans* (C.P. Robin) Laurent{?}, (1889)
- *Moniliaalbicans* (C.P. Robin) Zopf, (1890)

- *Parasaccharomyces albicans* (C.P. Robin) Mello & L.G. Fern., (1918)
- *Myceloblastanonalbicans* (C.P. Robin) M. Ota, Japanese Journal of Dermatology and Urology 27: 170 (1927)
- *Mycotorula albicans* (C.P. Robin) Langeron & Talice, Annls Parasit. hum. comp. 10: 44 (1932)
- *Syringospora albicans* (C.P. Robin) C.W. Dodge, (1935)
- *Procandida albicans* (C.P. Robin) E.K. Novák & Zsolt, Acta bot. hung. 7: 133 (1961).⁽⁹⁾

Descripción micológica

Hongo dimorfo que forma largas pseudohifas, hifas y blastoconidios (células gemantes subesféricas de 3-8 x 2-7 µm). Asimilan y fermentan azúcares. Presentan numerosas clamidosporas unicelulares, redondas u ovaladas, con gruesa pared refringente (8-16 µm de diámetro), situadas al final de las hifas, pseudohifas o laterales sobre blastoconidios ovalados. Colonias de crecimientos rápidos, circulares, lisos, blancos o cremosos, pastosos y blandos, de bordes precisos, centro ligeramente prominente.

Suele presentarse como una célula oval levaduriforme de 2 a 4 micras, con paredes finas; sin embargo, en tejidos infectados también se han identificado formas filamentosas de longitud variable, con extremos redondos de 3 a 5 micras de diámetro y pseudohifas, que son células alargadas de levadura que permanecen unidas entre sí.

Las levaduras o blastosporas son microorganismos eucarióticos, las cuales se reproducen asexualmente por un proceso específico de división celular conocido como gemación. Este proceso de división implica la producción de nuevo material celular proveniente de la superficie de la blastospora.

Cuando el brote o yema ha crecido y se encuentra en su tamaño óptimo, se suscita la división celular y se forma un tabique o septo entre las dos células. La forma filamentosa del hongo (hifa), es una estructura microscópica tubular, la cual contiene múltiples unidades celulares divididas por septos y puede surgir a partir de blastosporas o de hifas existentes. Esta crece continuamente por extensión apical.⁽¹⁷⁾

La apariencia microscópica de todas las especies de *Cándida* es similar; todas las levaduras son Gram positivas, pero en algunas ocasiones la forma de las blastosporas puede variar de ovoide a elongada o esférica. Microscópicamente, *Cándida albicans* presenta dimorfismo, el cual es una transformación de la forma ovoide de las blastosporas (levaduras) gemantes a hifas.

La composición química de *Cándida albicans* está representada por 20-40% de proteínas y 30-50% de polisacáridos, mientras que la proporción de lípidos es variable²⁰. La fracción lipídica va a depender de la cepa, edad del cultivo, condiciones ambientales y del origen de la fuente de carbono. La pared celular de *Cándida albicans* está compuesta principalmente por los polisacáridos Manán, Glucán y Quitina. Aunque la síntesis de los componentes de la pared celular está dinámicamente influenciada por las condiciones de crecimiento y por los estadios metabólicos. El polisacárido manán representa aproximadamente entre 15,2% y 22,9% del peso seco y poco más de 40% de los polisacáridos de la pared celular del hongo.

El D-Glucán β -1-3 y el D-Glucán β -1-6 constituyen entre 47% y 60% del peso seco de la pared celular. Otros componentes han sido reportados, tales como proteínas en cantidades que oscilan entre 6% y 25%, lípidos entre 1% y 7% y Quitina entre 0,6% y 9% del peso de la pared celular.

El número de capas y su morfología varían; esta variación está relacionada con varios factores tales como: la etapa de crecimiento celular, la forma de crecimiento (como levadura o como tubo germinal), la capa seleccionada para su estudio, el medio de cultivo empleado para el crecimiento celular y los procedimientos de fijación. La mayoría de los investigadores han descrito cinco capas dentro de la pared celular, las cuales son (de adentro hacia afuera): Manoproteínas, β -Glucán-Quitina, β -Glucán, Manoproteínas y una capa de fibrillas.⁽¹⁴⁾

La membrana citoplasmática es una estructura que reviste gran importancia, ya que los antimicóticos actúan a nivel de la misma, además de contener las enzimas responsables de la síntesis de la pared celular. Esta presenta una doble capa compuesta por lípidos y posee invaginaciones, que se observan como surcos de 200 a 300 nanómetros de longitud, por 35 a 40 nanómetros de espesor.

Además de los lípidos, la membrana citoplasmática está compuesta por grandes cantidades de proteínas y carbohidratos en menor proporción. En el citoplasma, al igual que otras células eucarióticas, *Cándida albicans* presenta: ribosomas, mitocondrias con doble capa, gránulos de glucógeno y vacuolas que, contienen en algunas ocasiones cuerpos lipídicos y gránulos de polifosfato. El núcleo es típico de una célula eucariótica, con membrana nuclear limitante, uno o varios nucleolos, ADN y ARN y varios cromosomas.

El metabolismo de *Cándida albicans* se ha relacionado de una forma directa o indirecta con la patogenicidad, la morfología o con los efectos de los antimicóticos. El metabolismo de los carbohidratos juega un papel importante en la morfogénesis, en tanto que el metabolismo de aminoácidos y lípidos tiene poca importancia para el crecimiento de este microorganismo.⁽⁴⁾

Epidemiología

La incidencia de infecciones invasoras causadas por *Cándida* ha aumentado en forma importante en las últimas décadas como consecuencia del aumento de poblaciones de mayor riesgo, ya sea por su condición de inmuno-supresión, o por la utilización de procedimientos diagnósticos y/o terapéuticos invasores. Sin embargo, el compromiso osteoarticular por *Cándida*, secundario a la invasión del torrente sanguíneo por el hongo, es una localización infrecuente.

Se sabe que el 60 % de las infecciones por *cándida* son de origen endógeno, en 27 % son debidas a catéteres y sondas y el 13 % provienen de fuentes exógenas como alimentos, ventiladores, pisos, respiradores, además, es importante el contacto con el personal médico y paramédico.

Esto se debe en gran parte a avances de la medicina, con la incorporación de nuevas modalidades terapéuticas. Algunas de ellas, como tratamientos antimicrobianos de amplio espectro, uso de nutrición parenteral, uso de catéteres intravenosos e intubación endotraqueal entre otros, son considerados factores de riesgo para esta infección. Con mayor frecuencia ocurren en pacientes que tienen condiciones de base tales como ser neonatos, prematuros, patología oncológica en quimioterapia, terapia inmunosupresora, ser sometidos a gran cirugía y estar afectados por enfermedades severas que requieren atención en una unidad de cuidados intensivos (UCI).⁽⁷⁾

Anatomía Patológica y Patogenia

Cándida albicans presenta una serie de factores de virulencia que facilitan la colonización y la infección del hospedador. Entre ellos cabe mencionar el dimorfismo o capacidad del hongo para desarrollar un crecimiento levaduriforme y filamentoso, el cual favorece la evasión de los mecanismos defensivos del hospedador. También existen otros tipos de factores de virulencia, tales como:

1. **Adhesinas:** que permiten la unión de la célula fúngica a los receptores del hospedador o a materiales plásticos utilizados en medicina, como las prótesis y los catéteres.
2. **Proteinasas y fosfolipasas:** Las cuales corresponden a enzimas que favorecen la diseminación por los tejidos del hospedador.
3. **Tigmotropismo:** que permite encontrar discontinuidades entre las células y penetrar en los tejidos.
4. **Producción de toxinas** y sustancias inmunosupresoras.

Cabe señalar que la pared celular de Cándida albicans es esencial para su patogenicidad desde el momento en que esta, es requerida para su crecimiento. Además la pared celular le proporciona rigidez y protección a esta especie.

La adherencia de este hongo es superior a la de otras especies de Cándida y es aumentada por la existencia de una lesión epitelial por los carbohidratos y por la disminución de la flora bacteriana saprofita.

Estos factores de virulencia están controlados por diferentes genes que se expresan en un número determinado y momento concreto y que determinan el fenotipo y virulencia de cada aislamiento, entre los genes asociados a la virulencia se encuentra el gen de la hexosaminidasa (HEX1), también se encuentran genes de proteínas asparticas (SAP1, SAP2, SAP3, SAP4) y un gen que confiere capacidad de producir tubos germinales y aumentar la adhesión.

Algunas descripciones más frecuentes de candidiasis en anatomía patológica son:

- **Candidiasis cutáneas:** Se produce una dermatitis crónica en la que el hongo se extiende hasta el estrato corneo del epitelio.
- **Candidiasis sistémicas:** Cándida albicans forma micro abscesos en los que se aprecian grandes cantidades de hifas y levaduras. ⁽¹⁶⁾

Clínica

Debido al incremento de infecciones por Cándida albicans, actualmente se describe un número importante de manifestaciones clínicas, de los cuales solo se mencionaran algunos debido a la extensa manifestación sistémica que presenta esta especie.

Tegumentaria: La candidiasis pseudomembranosa aguda, Algorra o “muguet” es la forma más común, se caracteriza por la presencia de una pseudomembrana blanca cremosa formada por la levadura y células epiteliales.

En la clínica este hongo puede cursar de forma asintomático o presentar cuadros de disgeusia, que es una alteración en la percepción del sabor de los alimentos y bebidas. También puede provocar cuadros de ardor o quemazón. El lugar que se encuentra afectado por esta especie es en la mucosa bucal, labios y paladar.

Vaginitis: La infección por *Cándida albicans* es causa frecuente de vaginitis en mujeres, sean o no inmunodeficientes, este hongo afecta la piel del tejido vaginal. Las típicas señales de infección en este cuadro clínico son: un flujo vaginal abundante de color blanco o amarillento con consistencia de queso crema, también puede causar picazón, comezón y ardor.

Candidiasis del sistema nervioso central: La meningitis por *Cándida albicans* se observa siempre en pacientes inmunodeprimidos, en particular en el SIDA, y es secundaria a un foco de infección en otro órgano. Los síntomas de meningitis por *Cándida albicans* no difieren de la de otros microorganismos.

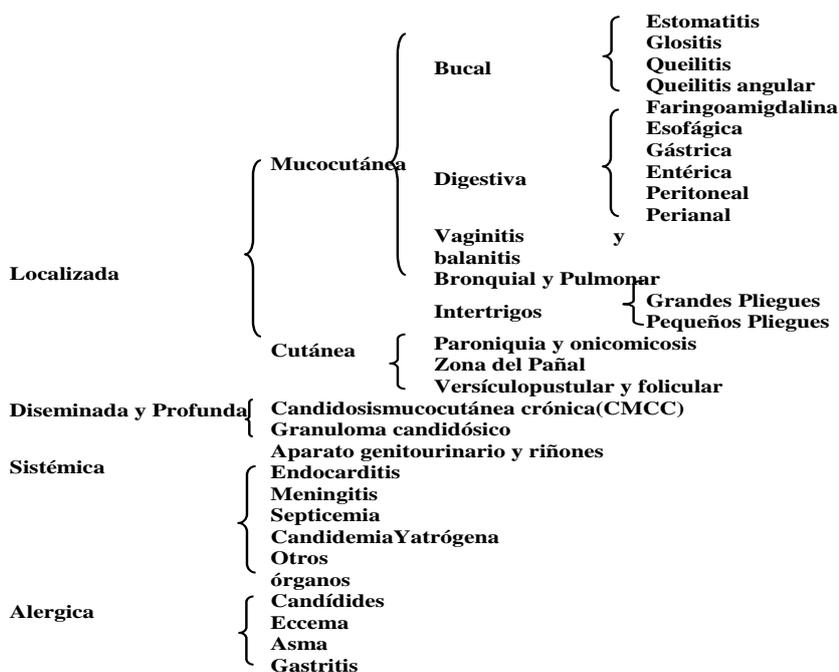
Balanitis: Corresponde a una infección de la mucosa del glande y de la cara interna del prepucio por *Cándida albicans*.

Intertrigo candidiasico: Corresponde a una infección de la piel de los grandes pliegues cutáneos por *Cándida albicans*. En este tipo de cuadro clínico las personas que se encuentran más afectadas son las personas obesas que están encamadas y/o bajo tratamiento antibiótico.

Paroniquia candidiasica o panadizo crónico: Se manifiesta como una infección del borde proximal de la uña por *Cándida albicans*.

Candidiasis cardiaca: La infección cardiaca más frecuente es la endocarditis. El 41% de ellas son producidas por especies de *Cándidas* diferentes de *Cándida albicans*.⁽⁴⁾

Figura 9.2 Clasificación de candidosis



9.3 Diagnóstico

Debido a la presencia normal de este agente en el organismo, el diagnóstico debe estructurarse conjuntamente con las manifestaciones clínicas y la respuesta al tratamiento. El cultivo, por sí solo, únicamente nos informa de la existencia de levaduras, pero no diferencia la colonización de la infección. Por tanto, la observación de levaduras en el examen directo es imprescindible para establecer el diagnóstico de certeza.

La toma de muestras se lleva a cabo de diferentes maneras: frotis directo con torunda estéril, enjuague bucal con solución salina (para cuantificación), impregnación con un cuadrado de espuma estéril (para cuantificación), biopsia.

El examen directo con solución salina y azul de lacto fenol puede ser útil para el diagnóstico rápido de la candidiasis oral pseudomembranosa, pero las técnicas de cultivo suelen ser más sensibles, ya que la microscopía directa precisa de la existencia de un número significativo de levaduras. La tinción de Gram mejora mucho la observación en fresco, pues pueden distinguirse más fácilmente las células levaduriformes. Buen rendimiento ofrece también la tinción con fluorocromos (rojo Congo, blanco de calcoflúor). La presencia de pseudohifas o hifas y células inflamatorias en un frotis se valora más que la de blastosporas en relación con una posible infección. La presencia de hifas o pseudohifas sugiere infección por *Cándida albicans*.

El examen histológico es esencial para el diagnóstico de candidiasis hiperplásica, y muy útil en la esofagitis. Debido a la proliferación de levaduras en los tejidos, las muestras de biopsias deben procesarse rápidamente. Para la detección de levaduras en estas muestras, la tinción con hematoxilina-eosina no es muy sensible.

Por lo que debe utilizarse otra técnica como la del ácido peryódico de Schiff (PAS), que pone de manifiesto la presencia de hifas y blastosporas que se ramifican en las capas superficiales del epitelio.⁽⁷⁾

El cultivo es imprescindible para establecer la etiología y efectuar pruebas de sensibilidad a los antifúngicos, así como para llevar a cabo estudios de tipificación molecular. Un cultivo positivo sólo demuestra la presencia de levaduras, pero no de infección, sobre todo en ausencia de clínica sugestiva. El agar glucosado de Sabouraud con antibióticos es un buen medio para el cultivo primario de muestras orofaríngeas, pero dada la similar morfología colonial que exhiben las distintas especies de levaduras es deseable el empleo de un medio capaz de diferenciar las especies más frecuentes y detectar cultivos mixtos, como es el CHRO Magar *Cándida*, donde se identifican muy bien *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*.

La producción de tubos germinativos y de clamidosporas, son pruebas muy rentables para identificar a *Cándida albicans*. La producción de tubos germinativos es además una prueba sencilla y rápida (2-4 horas) que puede obviar otras más lentas. La producción de clamidosporas en medio de agar harina de maíz, agar de Wolin-Bevis, agar arroz o agar patata-zanahoria, es más rentable para la confirmación de *Cándida albicans* cuando la prueba del tubo germinativo es negativa o se presta a confusión, pero requiere más tiempo.

Actualmente, existen técnicas de aglutinación que ofrecen una buena alternativa diagnóstica por su rapidez (5 minutos), sensibilidad y especificidad.

Así, el test Bichro-Latex *Albicans* utiliza partículas de látex recubiertas con anticuerpos monoclonales que reaccionan con antígenos de *Cándida albicans*, y el llamado test Krusei color va

dirigido a la identificación de *C. krusei*; el test CandidaCheck posibilita identificar las especies más frecuentes en clínica y detectar los serotipos A y B de *Cándida albicans*.

El estudio de la actividad enzimática sobre sustratos concretos se ha aplicado desde hace unos años a la identificación rápida de levaduras, sobre todo de *Cándida albicans*. Existen métodos rápidos con sustratos fluorogénicos y cromogénicos, con una sensibilidad y especificidad similar a la prueba del tubo germinativo y más rápido que ésta, pero menos específicos que la asimilación de compuestos de carbono. ⁽⁷⁾

Tratamiento

El tratamiento podrá ser tópico o sistémico, según la forma clínica de que se trate, entre los tratamientos tópicos tenemos a la Nistatina, Ketoconazol, Miconazol, Clotrimazol, Sulconazol, Bifonazol, Isoconazol y entre los sistémicos están la Anfotericina B, Ketoconazol, Fluconazol e Itraconazol. ⁽¹⁶⁾

Nistatina y anfotericina B

La nistatina en forma tópica es efectiva contra la *Cándida albicans*. Cuando se administra por vía oral es mínima, siendo su acción limitada al intestino.

La duración del tratamiento es de 7- 10 días y este debe mantenerse como mínimo 2 días después de desaparecer las lesiones.

La anfotericina B es efectiva en las micosis profundas. En aquellos casos de infección micótica en pacientes portadores de prótesis.

Fluconazol

El fluconazol es miembro de la familia de agentes antifúngicostriazólicos; es un inhibidor potente y específico de la síntesis de esteroides en los hongos.

El fluconazol, administrado tanto por vía oral como intravenosa, es activo en una variedad de infecciones fúngicas en animales.

Las propiedades farmacodinámicas de fluconazol son similares luego de la administración por vía oral o intravenosa.

Esta indicado en Candidiasis orofaríngea, esofágica, infecciones por *Cándida* del tracto urinario, peritonitis, y formas sistémicas de candidiasis.

Pacientes inmunocompetentes, pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), trasplante de órganos o con otras causas de inmunodepresión.

Ketoconazol

Es una droga fungistática, que puede ser fungicida, según su concentración. Inhibe la biosíntesis de ergosterol u otros esteroides, lesionando la membrana de la pared celular del hongo y alterando su permeabilidad; inhibe la biosíntesis de triglicéridos y fosfolípidos de los hongos y la actividad enzimática oxidativa y peroxidativa.

En candidiasis por *Cándida albicans*, inhibe la transformación de los blastosporos en su forma micelial invasora.

Debe administrarse con alimentos para reducir las náuseas y vómitos, facilitando su absorción.

Miconazol

Es un fungistático, Actúa por inhibición de la biosíntesis del ergosterol o de otros esteroides, lo que lesiona la membrana de la pared celular fúngica y altera su permeabilidad; como consecuencia, puede producirse la pérdida de orgánulos intracelulares esenciales.

En *Cándida albicans* inhibe la transformación de las blastosporas en la forma inicial invasora.

Es un fármaco de segunda elección, para el tratamiento de la candidiasis mucocutánea crónica.

Otros productos útiles, son los azoles tópicos para el tratamiento de candidiasis superficial son, clotrimazol o econazol.

9.4 Marco operativo

Tipo de investigación

El tipo de investigación que se realizó según la finalidad fue Descriptivo porque se recogieron los datos sobre la base teórica, se expone, se resume y se analiza la información de manera cuidadosa. Según la Secuencia Temporal fue Transversal porque se realizó en un solo momento dado. Según el Control de asignación a los factores de estudio fue Experimental o Exploratoria porque la investigación se efectuó sobre un tema poco estudiado además que se controlaron ciertas situaciones. Según el inicio del estudio en relación a la cronología de los hechos fue Prospectivo porque los hechos se observan y se registran.

Fijación de límites

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Instituto Experimental de Biología ubicado en la calle Dalence N° 207. En el Laboratorio de Microbiología y Virología Clínica.

El tiempo de estudio de la investigación se realizó entre los meses de septiembre del 2011 finalizando en abril del 2012. El universo de estudio está constituido por las cepas de hongos del género *Cándida albicans*. La recolección de las muestras se realizó en el Hospital Gineco-Ostétrico en pacientes que acudieron a consulta externa de ginecología.

Recolección de la información

La recolección de la información se obtuvo de manera directa con la identificación de la actividad antimicótica de la *Steviarebaudiana* contra la *Cándida albicans*, como fuentes primarias y como fuentes secundarias fue la revisión bibliográfica, es decir, libros, revistas, manuales, folletos e internet y toda información acerca de la actividad antimicótica de la *Steviarebaudiana* contra la *Cándida albicans*.

Métodos y técnicas

Métodos

Para el desarrollo del trabajo investigativo, se utilizaron los siguientes métodos:

- **Científico.-** Con su utilización se obtuvo informaciones lógicas y concretas, mediante el uso de conceptos propios de la ciencia con argumentos comprobados.
- **Deductivo.-** Este método se lo utilizó en el desarrollo de los antecedentes generales de este proyecto.
- **Inductivo.-** Con la aplicación del método inductivo se logró generalizar los datos obtenidos.
- **Experimental.-** Se empleó para realizar la parte operacional de la investigación.
- **Observacional.-** Se la utilizó en la investigación de campo para constatar la acción antimicótica de la stevia.
- **Estadístico.-** Se lo empleó para tabular la información obtenida de los resultados y elaborar los gráficos respectivos.

Técnicas

Obtención del Extracto de SteviaRebaudiana

Materia Prima

- Hojas de SteviaRebaudiana.

La materia prima se obtuvo de un cultivo realizado en la ciudad de Santa Cruz, cosechado a fines de diciembre, secado durante el mes de enero y enviada para la investigación. Mantenido en lugar fresco y seco.

Reactivos

- Ca(OH)_2
- CO_2

Materiales y Equipos

- Balanza
- Fuente de Plástico
- Probeta
- Recipiente de Aluminio

- Cocina
- Termómetro
- Tamiz malla N° 60
- Tamiz malla N°400
- Matraz Erlenmeyer
- Centrifugadora
- Matraz kitasato
- Embudo buchner
- Papel filtro
- Bomba de vacio
- Rota vapor
- Refractómetro

Procedimiento

- **Trituración.**-Se realizó en forma manual, reduciendo las hojas secas a un tamaño de partículas adecuadas, para que haya mayor superficie de contacto. Se trituro 500 g de hojas secas de Stevia.
- **Extracción.**-En un recipiente se colocó 5 litros de agua y se añadió los 500 g de hojas de stevia triturada y se llevó a ebullición a 92°C de temperatura por 15 minutos.
- **Filtración.**-Se filtró en un tamiz malla N° 60 y luego se pasó el extracto por un tamiz malla N° 400.
- **Clarificación.**-Al extracto se añadió 75 g de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ se agitó y se dejó reposar hasta que se separe en dos fases.
- **Filtración y Centrifugación.**-El sobrenadante se filtró en un tamiz malla N° 400 y el precipitado se centrifugó por 10 minutos a 5000 rpm. Todo el líquido clarificado obtenido se hace burbujear con CO_2 por 5 minutos para eliminar los residuos del $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en forma de Ca_2CO_3 , se dejó reposar y se filtró al vacío con papel filtro. Se obtuvo un volumen de extracto de 3700mL con una concentración de 4%.

- **Concentración.**-El extracto continúa con el proceso de concentración con la ayuda de un rotavapor al vacío a una temperatura de 70°C. Medir las concentraciones con un refractómetro. Se obtiene los extractos al 10%, 20% y 30%.

Conformación de los disco

Materiales y Equipos

- Papel filtro
- Perforadora
- Papel madera
- Horno Pasteur

Procedimiento

Doblar en cuatro el papel filtro, con una perforadora limpia se procedió a formar los discos con un diámetro de 6 mm, los cuales se colocaron en un sobre de papel madera, se llevo a esterilizar y quedaron listos para su uso.

Preparación de medio de cultivo: Sabouraud Glucosado Agar

Medio utilizado para el aislamiento, identificación y conservación de hongos patógenos y saprófitos. También es útil para el cultivo de levaduras.

Fundamento

Medio de cultivo recomendado para el aislamiento y desarrollo de hongos, particularmente los asociados con infecciones cutáneas. En el medio de cultivo, la Pluripeptona y la glucosa, son los nutrientes para el desarrollo de microorganismos. El alto contenido de glucosa, la presencia de Cloranfenicol y el pH ácido, favorecen el crecimiento de hongos por sobre el de bacterias. Además, al medio de cultivo, pueden agregarse otros agentes selectivos de crecimiento.

Tabla 9.2 Formula en gramos por litro para el Medio de cultivo recomendado para el aislamiento y desarrollo de hongos

Fórmula (en gramos por litro)	
Pluripeptona	10.0
Glucosa	40.0
Cloranfenicol	0.05
Agar	15.0

- **Características del medio.**- Medio preparado: ámbar claro, ligeramente opalescente sin ningún precipitado.
- **Almacenamiento.**- Medio deshidratado: a 10-35°C. Medio preparado: a 2-8°C.

Materiales y Equipos

- Balanza
- Espátula
- Probeta
- Matraz Erlenmeyer
- Hornilla
- Auto clave
- Tubos de ensayo
- Cajas Petri

Procedimiento

Suspender 65 g del polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar hasta uniformar. Calentar agitando frecuentemente y hervir 1 minuto hasta disolver. Esterilizar 15 minutos a 118-121°C. Mantener en lugar fresco, pues la exposición al calor hidroliza los componentes. Distribuir en placas o en tubos de ensayo. pH final: 5.6 ± 0.2 .

Toma de muestra de flujo vaginal

Con un hisopo estéril, se realizó la obtención de muestra tomada del fondo del saco y/o endocervix.

Aislamiento y Cultivo de la muestra**Materiales y Equipos**

- Hisopo
- Tubo de Ensayo con medio de cultivo
- Estufa

Procedimiento

Se realizó la siembra, por agotamiento, con el hisopo utilizado en la toma de muestra, en el medio de cultivo Sabouraud Glucosado Agar en tubo de pico de flauta anteriormente preparado. Se incubó a 37°C de 24 a 72 horas.

Consideramos la presencia de colonias blanco-amarillentas, cremosas, brillantes, redondeadas, para realizar la prueba de identificación.

Identificación de las Cepas de Candidaalbicans

Prueba del Tubo Germinativo

Fundamento

La formación del Tubo Germinativo se basa en la búsqueda del crecimiento de filamentos finos o tubo germinativos que crece en una célula viva.

Materiales y Equipos

- Asa Bacteriológica
- Mechero
- Tubo de ensayo
- Pipeta
- Estufa
- Porta objeto
- Cubre objeto
- Microscopio

Procedimiento

En un tubo de ensayo se colocó 0.5 mL de suero humano, con un asa bacteriológica se recogió de 1 a 3 colonias, cultivada anteriormente en Sabouraud Glucosado Agar en tubo de pico de flauta, una vez realizada la suspensión, se incubó a 37°C durante 3 horas. Transcurrido el tiempo requerido, con 2 gotas de la suspensión se llevó a la observación microscópica, con objetivo de 10x y 40x.

Las lecturas fueron positivas con la presencia de tubos germinativos, es decir, células con apéndices en uno de sus extremos.

Técnica de Difusión de Disco

Preparación del inóculo

Para estandarizar la densidad del inóculo se utiliza el Sulfato de bario que equivale a 0.5 en la escala nefelométrica de McFarland.

Preparar este estándar mezclando 99.5 mL de ácido sulfúrico (0.18M) y 0.5 mL de cloruro de bario (0.048M). Para confirmar la densidad puede utilizarse un espectrofotómetro en el que una absorbancia a 625 nm debería ser igual a 0.08-0.10 para 0.5 McFarland.

Para trabajar debe alicuotar 4 a 6 ml en tubos de tapa rosca, que luego deben ser guardados a T° ambiente y en lugar obscuro. El sulfato de bario debe ser reemplazado mensualmente, salvo que la verificación de densidad todavía sea óptima.

El inóculo se preparó escogiendo 3 a 5 colonias aisladas a partir de una de un cultivo realizado anteriormente. Agitar el inóculo hasta obtener una solución homogénea hasta alcanzar la turbidez de 0.5 McFarland (1.2×10^8 UFC/mL) ajustar este aspecto si es necesario con solución salina hasta conseguir la turbidez deseada.

Siembra

Con un hisopo estéril previamente humedecido con el inóculo proceder a sembrar sobre la superficie de una caja Petri con Sabouraud Glucosado Agar, teniendo la precaución de no resembrar sobre aquellas superficies ya inoculadas (hacer rotar la caja sobre 60°) dejar reposar de 3 a 5 minutos para luego colocar los discos embebidos con el extracto de Stevia.

Colocado de discos

Se utilizan los discos que se prepararon con anterioridad y esterilizados. En una caja Petri estéril se dispuso los discos de papel filtro y el extracto de Stevia para embeber los discos. Colocar 1 disco en cada caja de Petri. Completada esta labor dejar reposar la caja Petri durante 15 minutos para luego recién voltearla y depositarla en la estufa de incubación a 37°C por 24 horas.

Lectura

Con una regla se midieron los halos de inhibición que se hayan producido (debe medir el diámetro teniendo la precaución de poner una superficie negra para que sirva de contraste).

Compare las lecturas con los halos de inhibición que se hayan producido con el Ketoconazol e intérprete.

Se realizó esta técnica para las diferentes concentraciones (10%, 20% y 30%) del extracto de Stevia y para el Ketoconazol.

Procesamiento de la información

La revisión de la información está en base a la información obtenida en la experimentación realizada, se clasificó en escalas cualitativas y cuantitativas de acuerdo a lo que nos interesa determinar en el estudio, el recuento se realizó manualmente para luego transformar resultados obtenidos con la ayuda del programa Excel.

La presentación estará a través de cuadros y gráficos estadísticos representativos.

Análisis de la información

Después de haber concluido el procesamiento de la información, se procedió a analizar los resultados obtenidos, dirigido a nuestro problema de investigación al cual se quiere dar respuesta.

9.5 Resultados

Se obtuvieron los siguientes resultados

Los diámetros de los Halos de inhibición formados, por disco embebidos con el extracto de Steviarebaudiana al 10%, sobre la siembra de *Cándida albicans* de las 10 muestras, estuvieron entre 10 y 15 mm con un promedio de 12 mm.

Los diámetros de los Halos de inhibición formados, por disco embebidos con el extracto de Steviarebaudiana al 20%, sobre la siembra de *Cándida albicans* de las 10 muestras, estuvieron entre 12 y 18 mm con un promedio de 16 mm.

Los diámetros de los Halos de inhibición formados, por disco embebidos con el extracto de Steviarebaudiana al 30%, sobre la siembra de *Cándida albicans* de las 10 muestras estuvieron entre 16 y 23 mm con un promedio de 20mm.

Los diámetros de los Halos de inhibición formados, por disco embebidos con el Ketoconazol sobre la siembra de *Cándida albicans* de las 10 muestras estuvieron entre 23 y 28 mm con un promedio de 26 mm.

Tabla 9.3 Diámetros de los Halos de inhibición formados, por disco embebidos con el extracto de Steviarebaudiana al 10%, sobre la siembra de *Cándida albicans*

Nº Muestra	Diámetro del Halo
1	15 mm
2	10 mm
3	12 mm
4	15 mm
5	10 mm
6	11 mm
7	10 mm
8	14 mm
9	15 mm
10	10 mm
Promedio	12 mm

Tabla 9.4 Diámetros de los Halos de inhibición formados, por disco embebidos con el extracto de Steviarebaudiana al 20%, sobre la siembra de *Cándida albicans*

Nº Muestra	Diámetro del Halo
1	18 mm
2	14 mm
3	17 mm
4	17 mm
5	18 mm
6	13 mm
7	12 mm
8	16 mm
9	17 mm
10	17 mm
Promedio	16 mm

Tabla 9.5 Diámetros de los Halos de inhibición formados, por disco embebidos con el extracto de Steviarebaudiana al 30%, sobre la siembra de Cándida albicans

Nº Muestra	Diámetro del Halo
1	23 mm
2	19 mm
3	21 mm
4	22 mm
5	21 mm
6	18 mm
7	16 mm
8	18 mm
9	21 mm
10	20 mm
Promedio	20 mm

Tabla 9.6 Diámetros de los halos de inhibición formados, por disco embebidos con el ketoconazol, sobre la siembra de cándida albicans

Nº Muestra	Diámetro del Halo
1	28 mm
2	25 mm
3	28 mm
4	30 mm
5	28 mm
6	23 mm
7	24 mm
8	26 mm
9	26 mm
10	25 mm
Promedio	26 mm

Tabla 9.7 Promedio del diámetros de los halos de inhibición formados, por disco embebidos con el extracto de steviarebaudianaal 10%, 20%, 30% y ketoconazol, sobre la siembra de cándida albicans

	Promedio Diámetro del Halo
Extracto al 10 %	12 mm
Extracto al 20 %	16 mm
Extracto al 30 %	20 mm
Ketoconazol	26mm

9.6 Análisis y discusión

El análisis y discusión de los resultados obtenidos sobre la actividad antimicótica del extracto de stevia sobre la Cándida albicansse puntualizan a continuación sobre los datos obtenidos:

- En las pruebas realizadas se comprobó la actividad antimicótica del extracto de stevia sobre la Cándida albicans tomando en cuenta los diámetros de los Halos de inhibición formados, por disco embebidos con el extracto deSteviaa las diferentes concentraciones.

- Se considera que la *Cándida albicans* es sensible al extracto de Stevia al 30% ya que se formó un halo de inhibición promedio de 20 mm comparado con el halo de inhibición formado con el antimicótico Ketoconazol que fue de 26 mm de diámetro promedio.

9.7 Conclusiones

El análisis de los resultados del presente trabajo investigativo permite llegar a las siguientes conclusiones:

- El extracto de *Stevia rebaudiana* si tiene actividad antimicótica frente a la *Cándida albicans*, demostrándose por la formación del halo de inhibición alrededor de los discos embebidos con extracto de *Stevia rebaudiana* a las diferentes concentraciones, sobre la siembra de *Cándida albicans*.
- Se evidencio que a mayor concentración del extracto de *Stevia rebaudiana* mayor es el diámetro del halo de inhibición formado.
- Se determinó que el tamaño del halo de inhibición va en forma creciente gradual según va aumentando la concentración del extracto de stevia.
- Se obtuvieron los extracto de *Stevia rebaudiana* al 10%, 20% y 30% de concentración.
- Se Cultivaron y aislaron las colonias de la *Cándida albicans*.
- Se comparó la sensibilidad de la propiedad antimicótica del extracto de *Stevia rebaudiana* con el Ketoconazol contra la *Cándida albicans*, donde se confirma la sensibilidad de la *Cándida albicans* frente al Ketoconazol por la formación del halo de inhibición que fue similar al halo de inhibición formado por extracto de *Stevia rebaudiana* al 30%.

9.8 Recomendaciones

De manera general, a continuación se proporcionan las siguientes recomendaciones:

- Se recomienda efectuar estudios sobre la forma farmacéutica más apropiada para la aplicación de la stevia sobre candidiasis.
- Se sugiere realizar pruebas para comprobar su actividad antimicrobiana contra las siguientes bacterias: *E. Coli*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Corynebacterium difteriae* que son mencionadas en la bibliografía.
- Realizar una buena publicidad y promoción, a fin de lograr difundir las bondades en la salud, de la stevia.
- Que se realicen investigaciones para verificar si las demás acciones terapéuticas de la stevia, mencionadas en la literatura, son verdaderas

9.9 Agradecimiento

Los investigadores agradecen a la Facultad de Ciencias Químico Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor, Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca por el apoyo brindado en el desarrollo del presente trabajo

9.10 Referencias

- (1) Andrade Padilla María Bernarda; Identificación de las especies del genero cándida en gestantes con candidiasis vulvo-vaginal que acuden al Hospital Gineco-Obstétrico Dr. Jaime Sánchez Porcel; Sucre 2011.
- (2) Arenas Roberto; Micología, Medica Ilustrada; Segunda Edición, 2003.
- (3) Atalaya Colque Reina, Morales Ávila Mary Luz; Prevalencia de Candidiasis bucal en pacientes de la tercera edad que asisten a consulta médica al Hospital Jaime Mendosa, Sucre enero – agosto 2009.
- (4) Casanova Josep M.; Candidiasis; Hospital Universitario Arnau de Vilanova de Lleida. <http://web.udl.es/usuaris/dermatol/ProtocolosWeb/Infecciones/InfeccionesMicoticas/Candidiasis.htm>
- (5) Correo Del Sur / Sucrejueves, 10 de noviembre de 2011 Anuncian la llegada de financiadores para cultivar estevia.
- (6) Correo Del Sur / Sucre; martes, 15 de noviembre de 2011 Producción de estevia no cubre ni el 5% de la demanda.
- (7) Díaz Francisco Javier; Fundamentos Básicos de Medicina, Micología de las Infecciones Humanas; Edición 2007.
- (8) edellwaisylastevia.blogcindario.com/2009/04/00001-tod-sobre-la-stevia.html
- (9) es.wikipedia.org/wiki/Candida_albicans
- (10) es.wikipedia.org/wiki/Stevia
- (11) Honorable Alcaldía Municipal de Sucre. www.sucre.gob.bo/pdm-2010
- (12) Instituto Nacional de Estadística
- (13) La Patria, Noticias de Bolivia, Periódico de Circulación Nacional. Martes 11 de octubre de 2011, La tuberculosis y la micosis diezman a la comunidad Yuqui.
- (14) Ministerio de Salud y Deportes, Sistema Nacional de Información en Salud y Vigilancia Epidemiológica SNIS. Obtenido en: <http://www.sns.gob.bo/snis/default.aspx>
- (15) RED Procosi www.procosi.org/index.php?mc=103&nc=&next_p=1&cod=8&cod_reg=9
- (16) Romero Cabello Raúl; Microbiología y Parasitología Humana; Bases Etiológicas de las Enfermedad Infecciosas y Parasitarias; Tercera Edición 2007.

- (17) Síntesis del Informe Técnico, Desarrollo Agroindustrial de la SteviaRebaudiana Bertoni en Los Yungas de La Paz.
- (18) Soto Alicia Ester; Revista de Ciencias Agrarias y Tecnología de los Alimentos Vol. 20-2002; Trabajo de Investigación; Extracción de los Principios Edulcorantes de la SteviaRebaudiana.
- (19) www.alimentacion-sana.com.ar/portal%20nuevo/compresano/plantillas/stevia02.htm
- (20) www.detodounpocotv.com/yerbas/caahee.htm
- (21) www.end-stevia.com/recetas.asp
- (22) www.monografias.com/trabajos13/estevios/estevios.shtml
- (23) www.monografias.com/trabajos82/creacion-empresa-endulzante-planta-stevia/creacion-empresa-endulzante-planta-stevia2.shtml
- (24) www.stevia.com.mx/
- (25) www.stevalifebolivia.com