

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



DOCTORADO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE EN

ODONTOLOGÍA

“Relación entre la infusión de Stevia rebaudiana Bertoni (Ka'a He'é) y la concentración de alfa-amilasa salival”

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE
DOCTOR EN ODONTOLOGÍA

Tesista: Od. Jorge O. Ponce

Director: Dr. Rolando P. A. Juárez

Codirector: Dra. Silvia M. Mazza

2022

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su apoyo, su dedicación, amistad y paciencia han contribuido, de manera directa o indirecta a la elaboración de esta tesis doctoral.

A mi familia por el apoyo incondicional, a mis amigos y seres queridos.

A mi Director Dr. Juárez Rolando Pablo, a mi Codirectora Dra. Mazza Silvia por su desinteresada ayuda y valiosa contribución.

Al Magister Celia Armando por su colaboración en los procedimientos de laboratorio.

A la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional del Nordeste. A cada uno de los Docentes que han estado a cargo de los distintos módulos de la carrera del Doctorado, que de una u otra manera han contribuido a mi formación. A Todos muchas gracias.

INDICE

	Ítem	Página
RESUMEN		1
ABSTRACT		11
CAPÍTULO I		
EL PROBLEMA EN ESTUDIO		
1.1. INTRODUCCIÓN		20
1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA		23
1.2.1. Situación problemática		23
1.2.2. Preguntas de investigación		24
1.3. JUSTIFICACIÓN		24
1.4. OBJETIVOS		25
1.4.1. Objetivo General		25
1.4.2. Objetivos Específicos		25
I. 5. BIBLIOGRAFÍA		26
CAPÍTULO II		
MARCO TEÓRICO		
II. 1. ESTADO DEL ARTE		29
11.1.1. Caries dental, efecto anticariogénico		29
II. 1.2. Propiedades de la estevia		31
II.1.3. Alfa-amilasa salival		33
11.2. HIPÓTESIS		36
11.3. MARCO METODOLÓGICO		36
11.3.1. Validez externa		36
11.3.2. Validez interna		37
11.3.2.1. Obtención de saliva		37
11.3.2.2. Medición de alfa-amilasa salival		39
11.4. BIBLIOGRAFÍA		40
CAPITULO III		
MATERIALES Y MÉTODOS		
III. 1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN		45
III. 1.1. Enfoque de la investigación		46
111.1.2. Diseño		46
III. 1.3. Población y muestra		46
Criterios de inclusión		47
Criterios de exclusión		47
III.2. METODOLOGÍA		48

<u>ítem</u>	<u>Página</u>
III. 2.1. Preparación de las bebidas e ingesta	48
111.2.1.1. Grupo 1: Infusión de estevia	28
111.2.1.2. Grupo 2: Jugo artificial de naranja	48
111.2.1.3. Grupo 3: Agua corriente	48
m.2.1.4. Ingesta de bebidas	49
m.2.2. Extracción de saliva y determinación de alfa amilasa salival	49
m.2.2.1. Técnica de recolección de saliva (no estimulada)	50
m.2.2.2. Pruebas de Laboratorio	50
m.2.3. Variables estudiadas	52
m.2.3.1. Variable independiente	53
m.2.3.2. Variables dependientes	53
111.2.3.3. Variable interviniente	54
m.2.4. Análisis estadísticos	54
m.3. BIBLIOGRAFÍA	57
 CAPÍTULO IV	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
IV. 1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	59
IV. 1.1. Edad	59
IV. 1.2. Análisis por grupo experimental	60
IV.2. ASOCIACIONES ENTRE VARIABLES	62
IV.2.1. Asociaciones entre el contenido de alfa-amilasa salival y la edad	62
IV.2.2. Asociaciones entre los contenidos de alfa-amilasa salival en los diferentes momentos	63
IV.2.3. Resultados del análisis conjunto	64
IV.3. CONTENIDOS DE ALFA-AMILASA SALIVAL BASAL, A LOS 60 Y 120 MINUTOS	66
IV. 3.1. En general	66
IV.3.2. Por grupo experimental	68
IVA. MODELIZACIÓN DE LA EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO DE ALFA-AMILASA SALIVAL EN EL TIEMPO	73
IV.4.1. Análisis general	73
IVA. 1.1. Verificación de supuestos	73
IVA. 1.2. Modelo de regresión	74
IV.4.2. Relación con el grupo experimental	76
IV.4.2.1. Verificación de supuestos	77
IV.4.2.2. Modelos de regresión	79
IV. 5. EFECTO DEL GRUPO EXPERIMENTAL	82
IV. 5.1. Análisis de la Variancia	82
IV.5.1.1. Verificación de supuestos	82
IV.5.1.2. Resultados del Análisis de la Variancia	83
IV.5.2. Pruebas de Independencia	85
IV.6. BIBLIOGRAFÍA	87

	Ítem	Página
CAPÍTULO V		
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		
V.1. CONCLUSIONES		90
V.2. RECOMENDACIONES		94

RESUMEN

Dentro de los componentes de la saliva, la a-amilasa salival (AAs) ha sido estudiada, en grupos de individuos que poseen una condición específica, como caries, asma, diabetes, con el fin de encontrar su relación tanto con enfermedades orales como enfermedades sistémicas.

Se conoce desde hace tiempo la relación estrecha y directa entre el consumo de azúcares y la presencia de caries, también que dicha relación se debe al efecto que la presencia de azúcares libres en la boca tiene sobre el desarrollo de las bacterias causantes de la caries.

La AAs cumple un papel importante en la digestión del almidón, el glucógeno y otros polisacáridos, por lo que su inhibición se considera una estrategia para el tratamiento de trastornos en la absorción de hidratos de carbono, tales como la diabetes y la obesidad, así como las enfermedades relacionadas con la placa bacteriana, caries dental y enfermedad periodontal.

El papel potencial de vegetales inhibidores de la a-amilasa ha sido revisado por varios autores, pero no se ha descripto dicha actividad para *Stevia rebaudiana* (Bertoni).

El objetivo de esta tesis ha sido determinar la relación entre el consumo de una infusión de estevia (*S. rebaudiana*, Bertoni) y la concentración de AAs. Con los objetivos específicos de: 1) relacionar los contenidos de a-amilasa salival con la edad de los sujetos; 2) evaluar la asociación entre los contenidos de AAs en los diferentes momentos de medición; 3) analizar los contenidos de AAs basal y después de 60 y 120 minutos posteriores al consumo de líquidos; 4) comparar los contenidos de AAs entre los sujetos que consumieron infusión de estevia, jugo artificial de naranja y agua.

Las hipótesis de investigación que se plantearon son: 1) los contenidos de aamilasa salival se encuentran relacionados con la edad de los sujetos; 2) existe asociación entre los contenidos de a-amilasa salival en los diferentes momentos de medición; 3) los contenidos de a-amilasa salival basal difieren de los valores obtenidos después de 60 y 120 minutos posteriores a la ingestión de líquidos; 4) los contenidos de a-amilasa salival presentan variaciones entre los sujetos que consumieron infusión de estevia, jugo artificial de naranja y agua.

El enfoque de la investigación fue de tipo cuantitativo, con un diseño experimental transversal, de ensayo controlado. La población estuvo constituida por estudiantes de las Clínicas Integradas de la Facultad de Odontología dependiente de la Universidad Nacional del Nordeste, en los meses abril-noviembre del año 2019.

Los sujetos experimentales fueron incluidos considerando criterios de inclusión y de exclusión, además se seleccionaron mediante un muestreo aleatorio simple del 20% de la población, los estudiantes que pasarían a integrar la muestra, asignando a cada uno de los grupos experimentales siguientes: Grupo 1, ingesta de infusión de estevia ($m = 20$); Grupo 2, ingesta de bebida artificial sabor naranja ($n_2 = 20$); Grupo 3, ingesta de agua ($m = 20$). Los grupos 2 y 3 son considerados controles (grupo 2, control con edulcorantes artificiales y grupo 3, blanco).

La infusión de Stevia se preparó haciendo hervir en 250 ml de agua por 10 minutos 2.0 g de hojas secas de estevia trituradas, dejando luego reposar por otros 10 minutos. Para la preparación de jugo artificial de naranja se utilizaron jugos en polvo de la marca comercial BC La Campagnola®, siguiendo las instrucciones del envase. A los integrantes del tercer grupo se les suministró 250 ml de agua corriente de red.

A los sujetos de todos los grupos experimentales se les realizaron extracciones de saliva y determinaciones de AAs en tres momentos, siguiendo los tiempos de las pruebas funcionales de absorción intestinal modificada:

- a. Toma inicial de una muestra de saliva, con ayuno de al menos 3 horas antes.
- b. Toma de muestra de saliva luego de ingerir la bebida correspondiente a su grupo experimental y un reposo de 60 minutos.
- c. Toma de muestra de saliva luego de ingerir la bebida correspondiente a su grupo experimental y un reposo de 120 minutos.

Se solicitó a los participantes que se abstuvieran de cepillarse los dientes y hacer ejercicio al menos una hora antes de la recolección. Se advirtió no beber bebidas alcohólicas 18 horas antes de las muestras matutinas. Durante el día de estudio, se aconsejó evitar el consumo de cafeína y mateína, las situaciones estresantes y las emociones. Los días de recolección y medición fueron entre semana con horarios de clases normales, se evitaron los días de exámenes o con exigencias académicas no habituales.

Todas las muestras de saliva se recogieron en un rango horario comprendido entre las 07:00 am y las 10:00 am.

El método de recolección de saliva fue no estimulado mediante salivación pasiva, se instruyó a los sujetos para que se enjuaguen bien la boca antes del ensayo de recolección y que vacíen la boca de saliva, se les indicó luego que se sentaran cómodamente con los ojos abiertos, la cabeza inclinada ligeramente hacia adelante y que descansen durante 5 minutos. Las muestras fueron recolectadas en sesiones por cada individuo, en horario prefijado, utilizando un recipiente de propileno desechable, estéril y con tapa a rosca de 15 mi de capacidad, donde los individuos experimentales depositaron la saliva, luego de acumularla por un período de dos minutos en la boca.

En el laboratorio, cada muestra fue depositada en tubos milimetrados estériles de 15 mi, rotulados con el grupo de estudio, la edad y género del sujeto, y fueron procesadas de manera inmediata. Antes de las determinaciones, las muestras de saliva se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 m.

La actividad de AAs se determinó mediante un kit comercial (Amilasa 405 ®, Wiener lab, Rosario, Argentina), que se basa en la hidrólisis del sustrato 2-cloro-pnitrofenil-a-D-maltriosido por la alfa amilasa presente en la muestra para producir 2- cloro-p-nitrofenol el cual se determinó espectrofotométricamente a 405 nm, empleando un Espectrómetro marca Spectrum.

Los valores se expresan en unidades amilolíticas. Amilasa 405 línea líquida AA, es un método cinético a 405 nm para la determinación de amilasa en suero, plasma u orina y saliva, sustrato CNPG3.

Se siguieron las especificaciones del kit comercial (Amilasa 405 ®) para el procedimiento de medición y la concentración de AAs se expresó en unidades por litro (U/L). Las determinaciones se realizaron en el Laboratorio de Investigaciones Científicas de la Facultad de Odontología de la UNNE.

Se anotaron en la ficha de historia clínica y posteriormente se volcaron a una base de datos las siguientes variables: la variable experimental o independiente estuvo constituida por el grupo experimental (ingesta de infusión de estevia, jugo artificial de naranja o agua corriente); las variables respuesta o dependientes fueron los contenidos de AAs basal (previo al consumo de bebidas), a la primera hora y a la segunda hora; estas variables fueron categorizadas en tres rangos, teniendo en cuenta los valores del primer (Qi) y tercer (Cb) cuartil, en valores bajos de AAs (< Qi), medios de AAs (entre Qi y Cb) y altos (> Cb). Se consignó, además, la edad como variable interviniente por considerarla un factor que podría influir sobre la variable respuesta.

A fin de estudiar el comportamiento general de los datos, se realizó un análisis exploratorio, de manera gráfica mediante gráficos de caja y de densidad de puntos, y analítica a través del cálculo de medidas descriptivas de posición y de dispersión.

Las asociaciones entre las variables AAs y edad y las correlaciones entre los valores de AAs basal, en la primera y en la segunda hora, se estudiaron mediante el coeficiente de Correlación de Pearson (r) con un nivel de significancia $a = 0,05$.

A fin de visualizar gráficamente las relaciones entre variables se emplearon gráficos de dispersión y matriz de diagramas de dispersión.

Con el objetivo de visualizar el comportamiento de los sujetos y las variables en sus diferentes momentos, se realizó un análisis de Componentes Principales y posteriormente se graficaron los individuos y las variables sobre las dos primeras componentes mediante un gráfico Biplot.

Con la finalidad de estudiar la curva de AAs a través del tiempo, se realizaron Análisis de Regresión entre los momentos de extracción de saliva y el contenido de AAs en cada uno de los grupos experimentales.

A los efectos de comprobar si existe efecto del grupo experimental sobre los valores de AAs, se realizaron Análisis de la Variancia y posteriores Pruebas de F, con un nivel de significancia $\alpha = 0,05$.

Con el fin de determinar si las frecuencias con que se presentaron las categorías de AAs en los tres momentos de medición se encuentran vinculadas con el grupo experimental, se realizaron pruebas de Independencia mediante el estadístico Chi-Cuadrado, con un nivel de significación $\alpha = 0,05$.

Los análisis estadísticos fueron realizados mediante el Software InfoStat versión 2020.

Las edades de los sujetos integrantes de la muestra oscilaron entre un mínimo de 20 y un máximo de 33 años, con un promedio de 22,32 años, con una desviación estándar de 1,94 años y un coeficiente de variabilidad de 8,67%, lo que indica baja variabilidad.

Se ha comprobado que no existen diferencias entre las edades de los sujetos asignados a los 3 grupos, confirmando la validez interna de la muestra en relación con la homogeneidad de los sujetos asignados a cada grupo experimental.

Los coeficientes de Correlación de Pearson entre los contenidos de a-amilasa salival y la edad de los sujetos se encontraban en valores muy bajos y no resultaron significativos. Esto ha permitido establecer que las concentraciones de a-amilasa salival basal, a la primera y segunda hora después de la ingesta de líquidos no se encuentran asociada con la edad de los sujetos.

Las asociaciones entre los contenidos de a-amilasa salival en los diferentes momentos de medición presentaron asociaciones estrechas y resultaron estadísticamente significativas. Estas asociaciones resultaron todas directas o positivas, lo cual indica que al aumentar el contenido de a-amilasa salival basal también lo hacen los contenidos de a-amilasa salival a los 60 y a los 120 minutos. La fuerza de la asociación es mayor entre el contenido de a-amilasa salival basal y a los 60 minutos, seguido del contenido de a-amilasa salival a los 60 minutos con el de los 120 minutos y, finalmente, la asociación menos estrecha se presenta entre el contenido de a-amilasa salival basal y a los 120 minutos, no obstante continúa siendo estadísticamente significativa.

Al analizar todas las variables estudiadas en conjunto se ha podido representar los sujetos y las variables en dos dimensiones conservando el 90,8% de la información. Los sujetos estudiados se ubican separándose sobre el eje horizontal, fundamentalmente por los contenidos de a-amilasa salival de primera hora y segunda hora, ubicando próximos, con perfiles similares, a los sujetos que ingirieron infusión de estevia y agua corriente, mientras que los que ingirieron jugo artificial de naranja se encuentran mayormente concentrados en el otro extremo del gráfico.

Los contenidos de a-amilasa salival basal oscilaron entre un mínimo de 8.414 U/L y un máximo de 50.896 U/L, con un promedio de 39.034,55 U/L. Las observaciones presentaron alta variabilidad, con un rango de 42.482 U/L, una desviación estándar de 11.767,74 U/L y un coeficiente de variabilidad de 30,15%.

Los contenidos de a-amilasa salival primera hora oscilaron entre un mínimo de 8.337 U/L y un máximo de 53.340 U/L, con un promedio de 38.303,05 U/L. La

variabilidad de las observaciones es alta, con un rango de 45.003 U/L, una desviación estándar de 13.010,05 U/L y un coeficiente de variabilidad de 33,97%.

Los contenidos de a-amilasa salival segunda hora oscilaron entre un mínimo de 7.341 U/L y un máximo de 50.653 U/L, con un promedio de 32.630,07 U/L. La variabilidad de las observaciones es alta, con un rango de 43.312 U/L, una desviación estándar de 11.832,88 U/L y un coeficiente de variabilidad de 36,26%.

Todos estos valores se encuentran por debajo de los rangos descriptos como normales por otros autores.

El análisis en el tiempo de los contenidos de a-amilasa salival indica que los contenidos descienden en el tiempo y de manera más brusca entre la primer y segunda hora luego de la ingesta de líquidos.

Se han podido establecer Modelos de Regresión Lineal entre los contenidos de a-amilasa salival y los minutos transcurridos luego de la ingesta de líquidos.

Cuando se consideraron los 60 sujetos de la muestra en su conjunto se ajustó un modelo lineal de la forma:

$$y = 43.060,37 - 3.202,24 x$$

Ambos coeficientes resultaron estadísticamente significativos, lo que indica que en el tiempo cero el contenido de a-amilasa salival tiene un valor no nulo, y que el contenido de a-amilasa salival disminuye en el tiempo.

Cuando se estudiaron las funciones que vinculan los contenidos de a-amilasa salival y los minutos transcurridos desde la ingesta de líquidos por grupo experimental, se pudieron ajustar los modelos lineales siguientes:

Grupo experimental	Modelo de Regresión Lineal
Grupo 1	$y = 40.782,48 - 3.202,24 x$
Ingesta de infusión de estevia	
Grupo 2	$y = 40.782,48 - 2.786,03 x$
Ingesta de jugo artificial de naranja	
Grupo 3	$y = 44.241,92 - 3.579,43 x$
Ingesta de agua corriente	

En los sujetos con ingesta de infusión de estevia y de agua corriente ambos coeficientes resultan significativos, lo que indica en el tiempo cero los contenidos de a-amilasa salival en los sujetos de estos grupos tienen valores no nulos, y el contenido de a-amilasa salival disminuye en el tiempo.

En los sujetos con ingesta de jugo artificial de naranja, por el contrario, se observó significancia sólo en la ordenada al origen, lo que indica que en el momento inicial los contenidos de a-amilasa salival en los sujetos de este grupo tienen valores no nulos, pero el coeficiente de regresión no resultó estadísticamente significativo, lo que implica que la recta de regresión tiene pendiente nula, por lo que las variaciones en los contenidos de a-amilasa salival en el tiempo no resultaron significativas.

Al comparar los contenidos de a-amilasa salival basal entre los sujetos que consumieron infusión de estevia, jugo artificial de naranja y agua, no se encontró efecto significativo de los grupos experimentales sobre esta variable, lo que permite establecer que la asignación de los sujetos experimentales a los distintos grupos ha sido aleatoria, de manera que se asegura la validez interna de la investigación.

Tampoco se ha podido comprobar el efecto estadísticamente significativo del grupo experimental para los contenidos de a-amilasa salival primera y segunda hora, lo que indica que los promedios de a-amilasa salival no se diferencian entre los individuos que ingirieron infusión de estevia, jugo artificial de naranja o agua corriente.

Al analizar las frecuencias con que se presentaron niveles bajos, medios o altos de a-amilasa salival se ha podido comprobar que las frecuencias con que se presentan valores de a-amilasa salival basal bajos, medios o altos no se encuentran relacionadas con los grupos experimentales, lo que confirma la correcta aleatorización en la asignación de los sujetos a los grupos experimentales, reafirmando la validez Interna de la muestra.

Se ha podido demostrar que las frecuencias con que se presentan niveles de a-amilasa salival primera hora bajos, medios o altos se encuentran relacionadas con los grupos experimentales. Las diferencias se perciben principalmente en los sujetos que Ingirieron jugo de naranja artificial y agua corriente donde se observan mayores frecuencias de valores intermedios y menores frecuencias de valores altos, a lo que se agrega en el grupo que consumió agua corriente muy baja frecuencia de valores bajos, mientras que el grupo que consumió infusión de estevia mantuvo valores medios de a-amilasa salival en todos los momentos de medición.

Se demostró que las frecuencias con que se presentan niveles de a-amilasa salival segunda hora, categorizados como bajos, medios o altos no se encuentran asociadas de manera estadísticamente significativa con los grupos experimentales.

Se ha podido establecer, entonces, que la ingesta de jugo artificial de naranja o agua corriente influye sobre las frecuencias de valores bajos, intermedios o altos de a-amilasa salival a los 60 minutos del momento del consumo, mientras que los sujetos que consumieron infusión de estevia mantuvieron un nivel medio de a-amilasa salival en el tiempo, lo que estaría indicando un comportamiento diferente respecto de los sujetos considerados controles.

Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren la disminución pronunciada de los contenidos de a-amilasa salival en el tiempo, especialmente a los 60 minutos de la ingesta de líquidos, no obstante, la bibliografía existente establece que los perfiles diurnos de a-amilasa salival son relativamente robustos contra las influencias momentáneas por lo que se debería continuar las investigaciones en esta línea a

fin de establecer patrones de comportamiento del a-amilasa salival luego de la ingesta.

La evolución del a-amilasa salival en el tiempo exhibe gráficas descendentes luego de la ingesta de líquidos, las que presentan diferentes parámetros según el tipo de líquido ingerido, esta línea de trabajo está poco estudiada por lo que sería importante profundizar estos estudios y analizar el efecto de diferentes factores sobre la curva de a-amilasa salival post ingesta.

Si bien no se encontró efecto significativo sobre los contenidos de a-amilasa salival en relación con el tipo de líquido ingerido, la bibliografía consultada indica que productos naturales pueden producir una inhibición débil de la a-amilasa, lo que sugiere que se requiere una potencia umbral para la inhibición de las enzimas digestivas que se traduzca en efectos *in vivo*, y quizás ese umbral no haya sido alcanzado por baja presencia de compuestos activos en la infusión de estevia empleada, por lo que se sugiere continuar con esta línea de investigación empleando diferentes concentraciones de estevia.

Al analizar los resultados de esta tesis atendiendo los antecedentes referidos a los diferentes compuestos que pueden tener efecto inhibitorio sobre a-amilasa, se considera necesario realizar estudios más profundos de la composición de *Stevia rebaudiana* (Bertoni), las cantidades ingeridas y el análisis de las curvas de a-amilasa salival con mayores frecuencias de determinación, a los efectos de comprender la interacción entre el consumo de infusión de estevia y la evolución de los contenidos de a-amilasa en saliva, debido a que si este vegetal demuestra *in vivo* su actividad inhibitoria de la a-amilasa salival podría constituirse en un importante aliado en la lucha contra la obesidad y la diabetes.

Por otro lado, diversos estudios han demostrado el efecto de extractos de estevia en la mejora del pH y la capacidad amortiguadora de la saliva, y la reducción de los organismos cariogénicos en la saliva, efecto directamente relacionado con la concentración de los extractos, por lo que al analizar los resultados de esta tesis

teniendo en cuenta la actividad demostrada de los extractos de estevia sobre los factores que contribuyen a la formación de caries, se abren nuevos interrogantes respecto de las posibilidades de este vegetal, no solo como sustituto natural de los azúcares, sino también como protector de la salud bucal.

ABSTRACT

Within the components of saliva, salivary α -amylase (sAA) has been studied, in groups of individuals who have a specific condition, such as caries, asthma, diabetes, to find its relationship with both oral diseases and systemic diseases.

It has long been known the close and direct relationship between the consumption of sugars and the presence of caries, also that this relationship is because that the presence of free sugars in the mouth has on the development of bacteria that cause caries.

The sAA play an important role in the digestion of starch, glycogen, and other polysaccharides, so its inhibition is considered a strategy for the treatment of disorders in carbohydrate absorption, such as diabetes and obesity, as well as diseases related to bacterial plaque, dental caries and periodontal disease.

The potential role of α -amylase inhibitor plants has been reviewed by several authors, but no such activity has been described for *Stevia rebaudiana* (Bertoni).

The objective of this thesis has been to determine the relationship between the consumption of an infusion of stevia (*S. rebaudiana*, Bertoni) and the concentration of sAA. With the specific objectives of: 1) relating the contents of salivary α -amylase with the age of the subjects; 2) evaluate the association between the contents of salivary α -amylase at different times of measurement; 3) analyze the contents of salivary α -amylase baseline and after 60 and 120 minutes after fluid consumption;

4) compare the contents of salivary a-amylase among subjects who consumed stevia infusión, artificial orange juice and water.

The research hypotheses that were proposed are: 1) the contents of salivary a-amylase are related to the age of the subjects; 2) there is an association between the contents of salivary a-amylase at different times of measurement; 3) the contents of basal salivary a-amylase differ from the values obtained after 60 and 120 minutes after the ingestion of liquids; 4) the contents of salivary a-amylase present variations between the subjects who consumed infusión of stevia, artificial orange juice and water.

The research approach was quantitative, with a cross-sectional, controlled trial experimental design. The population was constituted by students of the Integrated Clinics of the Faculty of Dentistry dependent on the National University of the Northeast, in the months April-November of the year 2019.

The experimental subjects were included considering inclusión and exclusión criteria and the students who would join the sample were selected by means of a simple random sampling of 20% of the population, assigning to each of the following experimental groups: Group 1, stevia infusión intake ($m = 20$); Group 2, intake of orange-flavored artificial drink ($n_2 = 20$); Group 3, water intake ($m = 20$). Groups 2 and 3 are considered Controls (group 2, control with artificial sweeteners and group 3, white).

The Stevia infusión was prepared by boiling 2.0 g of crushed dry stevia leaves in 250 ml of water for 10 minutes, then letting stand for another 10 minutes. For the preparation of artificial orange juice, powdered juices of the BC La Campagnola® trademark were used, following the instructions on the package. The members of the third group were given 250 ml of mains running water.

Subjects from all experimental groups underwent saliva extractions and determinations of sAA at three times, following the times of modified intestinal absorption functional tests: a. Initial collection of a saliva sample, fasting at least 3

hours before. b. Saliva sampling after ingesting the drink corresponding to the experimental group and a rest of 60 minutes. c. Saliva sampling after ingesting the drink corresponding to the experimental group and a rest of 120 minutes.

Participants were asked to refrain from brushing their teeth and exercising at least one hour before collection. Caution was advised not to drink alcoholic beverages 18 hours before morning samples. During the study day, it was advised to avoid caffeine and mateine consumption, stressful situations, and emotions. The days of collection and measurement were during the week with normal class schedules, exam days were avoided or with unusual academic demands. All saliva samples were collected in a time range between 07:00 am and 10:00 am.

The saliva collection method was not stimulated by passive salivation, subjects were instructed to rinse their mouths thoroughly before the collection trial and empty their mouths of saliva and were then instructed to sit comfortably with their eyes open, their heads tilted slightly forward, and to rest for 5 minutes. The samples were collected in sessions by everyone, at a predetermined time, using a sterile disposable propylene container with a screw cap of 15 ml capacity, where the experimental individuals deposited the saliva, after accumulating it for a period of two minutes in the mouth.

In the laboratory, each sample was deposited in sterile millimeter tubes of 15 ml, labeled with the study group, the age and gender of the subject, and were processed immediately. Prior to determinations, saliva samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 m.

The activity of sAA was determined by a commercial kit (Amylase 405, Wiener lab, Rosario, Argentina), which is based on the hydrolysis of the substrate 2-chloro-pnitrophenyl-a-D-maltrioside by the alpha amylase present in the sample to produce 2-chloro-p-nitrophenol which was determined spectrophotometrically at 405 ® nm, using a Spectrum Spectrometer.

Valúes are expressed in amylolytic units. Amylase 405 liquid line AA is a kinetic method at 405 nm for the determination of amylase in serum, plasma or uríne and saliva, substrate CNPG3. The specifications of the commercial kit (Amylase 405 ®) were followed for the measurement procedure and the concentration of sAA was expressed in units per liter (U/L). The determinations were made in the Scientific Research Laboratory of the Faculty of Dentistry of the UNNE.

The following variables were recorded in the clinical history file and subsequently turned to a database: the experimental or independent variable was constituted by the experimental group (intake of stevia infusión, artificial orange juice or plain water); the response or dependent variables were the contents of sAA baseline (prior to consumption of beverages), at the first hour and at the second hour; these variables were categorized into three ranges, taking into account the valúes of the first (Q1) and third (Q3) quartile, in low valúes of sAA (< Q1), means of sAA (between Q1 and Q3) and high (> Q3). In addition, age was recorded as the intervening variable because it was considered a factor that could influence the response variable.

To study the general behavior of the data, an exploratory analysis was carried out, graphically using box and point density graphs, and analytical through the calculation of descriptive measures of position and dispersión. The associations between the variables sAA and age and the correlations between the valúes of sAA baseline, in the first and second hour, were studied using the Pearson correlation coefficient (r) with a level of significance $\alpha = 0.05$. To graphically visualize the relationships between variables, scatter plots and scatter plot matrix were used. To visualize the behavior of the subjects and the variables at different times, a Principal Components analysis was carried out and subsequently the individuáis and variables were plotted on the first two components using a Biplot graph. To study the curve of sAA over time, Regression analysis was performed between the moments of saliva extraction and the contení of sAA in each of the experimental groups. To check if there is an effect of the experimental group on the valúes of sAA, Analysis of Variance and subsequent F Tests were performed, with a level of

significance $\alpha = 0.05$. To determine if the frequencies with which the categories of SAA were presented in the three moments of measurement are linked to the experimental group, Independence tests were performed using Chi-Square statistics, with a level of significance $\alpha = 0.05$. Statistical analyses were performed using InfoStat Software versión 2020.

The ages of the subjects in the sample ranged from a minimum of 20 to a maximum of 33 years, with an average of 22.32 years, with a standard deviation of 1.94 years and a coefficient of variability of 8.67%, indicating low variability. It has been found that there are no differences between the ages of the subjects assigned to the 3 groups, confirming the internal validity of the sample in relation to the homogeneity of the subjects assigned to each experimental group.

Pearson's Correlation coefficients between salivary a-amylase contents and the age of the subjects were at very low values and were not significant. This has allowed to establish that the levels of basal salivary a-amylase, at the first and second hour after fluid intake are not associated with the age of the subjects. The associations between the contents of salivary a-amylase at different measurement moments showed close associations and were statistically significant. These associations were all direct or positive, which indicates that as the basal salivary amylase content increases, so do the salivary amylase contents at 60 and 120 minutes. The strength of the association is greater between the content of basal salivary a-amylase and at 60 minutes, followed by the content of salivary a-amylase at 60 minutes with that of 120 minutes and, finally, the least close association occurs between the content of basal salivary a-amylase and at 120 minutes, however it continues to be statistically significant.

By analyzing all the variables studied together, it has been possible to represent the subjects and the variables in two dimensions, preserving 90.8% of the information. The subjects studied are located separating on the horizontal axis, mainly by the contents of salivary a-amylase of first hour and second hour, placing close, with similar profiles, to the subjects who ingested infusion of stevia and

running water, while those who ingested artificial orange juice are mostly concentrated at the other end of the graph.

Basal salivary a-amylase contents ranged from a minimum of 8,414 U/L to a maximum of 50,896 U/L, with an average of 39,034.55 U/L. The observations showed high variability, with a range of 42,482 U/L, a standard deviation of 11,767.74 U/L and a coefficient of variability of 30.15%.

The contents of salivary a-amylase first hour ranged from a minimum of 8,337 U/L to a maximum of 53,340 U/L, with an average of 38,303.05 U/L. The variability of the observations is high, with a range of 45,003 U/L, a standard deviation of 13,010.05 U/L and a coefficient of variability of 33.97%. Second hour salivary a-amylase levels ranged from a low of 7,341 U/L to a high of 50,653 U/L, with an average of 32,630.07 U/L. The variability of the observations is high, with a range of 43,312 U/L, a standard deviation of 11,832.88 U/L and a coefficient of variability of 36.26%. All these values are below the ranges described as normal by other authors.

The analysis over time of salivary a-amylase levels indicates that the contents decrease over time and more sharply between the first and second hour after fluid intake. It has been possible to establish Linear Regression Models between salivary amylase content and the minutes elapsed after fluid intake. When the 60 subjects of the sample were considered, a linear model of the shape was fitted:

$$y = 43.060,37 - 3.202,24 x$$

Both coefficients were statistically significant, indicating that at time zero the content of salivary amylase has a non-zero value, and that the content of salivary amylase decreases over time. When the functions linking salivary amylase contents and minutes elapsed since fluid intake by experimental group were studied, the following linear models could be adjusted:

Experimental group	Lineal Regression Models
Group 1 Stevia infusion intake	$y = 40.782,48 - 3.202,24 x$
Group 2 Artificial orange juice intake	$y = 40.782,48 - 2.786,03 x$
Group 3 Water intake	$y = 44.241,92 - 3.579,43 x$

In subjects with infusion of stevia and water intake both coefficients are significant, indicating at zero time the contents of salivary α -amylase in subjects of these groups have non-zero values, and the content of salivary α -amylase decreases over time.

In subjects with intake of artificial orange juice, on the contrary, significance was observed only in the ordinate to the origin, indicating that at the initial moment the levels of salivary α -amylase in the subjects of this group have non-zero values, but the regression coefficient was not statistically significant, implying that the regression line has zero slope, therefore, variations in salivary α -amylase levels over time were not significant.

When comparing the contents of basal salivary α -amylase between subjects who consumed infusion of stevia, artificial orange juice and water, no significant effect of the experimental groups on this variable was found, which allows to establish that the assignment of the experimental subjects to the different groups has been random, so that the internal validity of the research is ensured.

Nor has it been possible to verify statistically significant effect of the experimental group for the contents of salivary α -amylase first and second hour, which indicates that the means of salivary α -amylase do not differ between individuals who ingested infusion of stevia, artificial orange juice or plain water.

When analyzing the frequencies with levels of salivary α -amylase were presented, it has been possible to verify that the frequencies with which values of

low, médium, or high basal salivary a-amylase are presented are not related to the experimental groups, which confirms the correct randomization in the assignment of the subjects to the experimental groups, reaffirming the internal validity of the sample.

It has been shown that the frequencies with which levels of salivary a-amylase first hour are low, médium, or high are related to the experimental groups. The differences are mainly perceived in the subjects who ingested artificial orange juice and water, where higher frequencies of intermedíate valúes and lower frequencies of high valúes are observed, to which is added in the group that consumed water with very low frequency of low valúes. In the other hand, the group that consumed stevia infusión maintained mean valúes of salivary amylase at all times of measurement.

It was demonstrated that the frequencies with which levels of salivary amylase second hour, categorized as low, médium, or high are not statistically significantly associated with the experimental groups.

It has been established, then, that the intake of artificial orange juice or plain water influences the frequencies of low, intermedíate, or high valúes of salivary amylase at 60 minutes from the time of consumption, while subjects who consumed stevia infusión maintained an average level of salivary a-amylase over time, which would be indicating a different behaviorwith respectto subjects considered Controls.

The results obtained in this thesis suggest the pronounced decrease in the contents of salivary a-amylase over time, especially at 60 minutes of fluid intake, however, the existing literature establishes that the diurnal profiles of salivary a-amylase are relatively robust against momentary influences so research should continué in this line in order to establish patterns of behavior of salivary (-amylase after intake.

The evolution of salivary amylase over time exhibits descending graphs after fluid intake, which present different parameters according to the type of liquid

ingested, this line of work is little studied so it would be important to deepen these studies and analyze the effect of different factors on the curve of salivary a-amylase post intake.

Although no significant effect was found on salivary a-amylase contents in relation to the type of liquid ingested, the literature consulted indicates that natural products may produce a weak inhibition of a-amylase, suggesting that a threshold potency is required for the inhibition of digestive enzymes that translates into in vivo effects. And perhaps this threshold has not been reached due to the low presence of active compounds in the infusion of stevia used, so it is suggested to continue with this line of research using different concentrations of stevia.

When analyzing the results of this thesis taking into account the background referred to the different compounds that may have inhibitory effect on a-amylase, it is considered necessary to perform deeper studies of the composition of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), the amounts ingested and the analysis of the curves of salivary a-amylase with higher frequencies of determination, in order to understand the interaction between the consumption of stevia infusion and the evolution of the levels of a-amylase in saliva, because if this vegetable demonstrates in vivo its inhibitory activity of salivary a-amylase could become an important ally in the fight against obesity and diabetes.

On the other hand, several studies have shown the effect of stevia extracts in improving the pH and buffering capacity of saliva, and the reduction of cariogenic organisms in saliva, effect directly related to the concentration of extracts, so when analyzing the results of this thesis taking into account the demonstrated activity of stevia extracts on factors that contribute to the formation of caries, New questions are opened regarding the possibilities of this vegetable, not only as a natural substitute for sugars, but also as a protector of oral health.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA DE ESTUDIO

En este Capítulo se hace una breve introducción al tema objeto de estudio, se presenta el problema que dio origen a la investigación, su justificación y los objetivos planteados.

1.1. INTRODUCCIÓN

La saliva es un producto biológico, de composición compleja, importante para el mantenimiento de la homeostasis en la cavidad oral, desempeña funciones sustanciales en el mantenimiento de la salud bucal y general del individuo, entre ellas: lubricación, acción antimicrobiana, capacidad amortiguadora del pH de la cavidad bucal y la placa dental, remineralización y protección contra la desmineralización, masticación, formación del bolo alimenticio, deglución, digestión, gusto y fonación (García Triana *et al.*, 2012).

Debido a sus propiedades y características, podría utilizarse como fluido diagnóstico, ya que muchos componentes presentes en el plasma sanguíneo se encuentran también en la saliva. Tiene gran relevancia en la correlación fisiológica y patológica constituyente del ser humano, es posible medir, cuantificar y monitorear una amplia cantidad de componentes salivales y ofrece claras ventajas frente a los análisis rutinarios en sangre por ser un método no invasivo, simple, incruento, bien tolerado por los pacientes y de bajo costo (Silva Neto *et al.*, 2020).

Si bien todavía no es utilizada de manera rutinaria como indicador de salud o enfermedad, está tomando impulso como fluido relevante para diagnóstico clínico y forense, hay algunos avances en relación con el uso de biomarcadores de enfermedades bucales como caries dental, enfermedades periodontales y cáncer

bucal, ya que contiene una gran cantidad de analitos afectados por una gama fisiológica y patológica de condiciones y factores estresantes (Barembaum & Azcurra, 2019; Pereira de Lima *et al.*, 2020), como así también en el diagnóstico con motivo de la pandemia de COVID 19.

La saliva está constituida por un 99% de agua, y una variedad de moléculas orgánicas e inorgánicas, si bien las proteínas son los compuestos fundamentales para las funciones que desempeña la saliva en el mantenimiento de la salud bucal. Se han podido identificar y caracterizar entre 2000 y 2600 proteínas y péptidos diferentes, con una alta proporción de glucoproteínas como las mucinas, proteínas ricas en prolina e inmunoglobulinas, aglutininas, lactoferrina, cistatinas y lisozima, además de péptidos de potente acción antimicrobiana y de protección a los tejidos. Son multifuncionales debido a su secuencia de aminoácidos, y desempeñan un papel importante en la colonización y metabolismo de las bacterias que conducen a la formación de la placa bacteriana (Barembaum & Azcurra, 2019).

La a-amilasa salival (AAs), es la proteína de la saliva que se encuentra en mayor concentración. Es producida localmente en las glándulas salivales y su secreción es controlada por el sistema nervioso autónomo. Una concentración elevada en saliva refleja un aumento en la actividad del sistema nervioso simpático, pudiendo actuar como biomarcador sensible a cambios en el organismo relacionados con el estrés (Lamby Tovar *et al.*, 2013). Debido a su alta concentración y su carácter multifuncional puede ser utilizada como biomarcador (Jiménez *et al.*, 2010).

La AAs posee actividad enzimática y juega un papel importante en la dinámica oral de los azúcares ya que cataliza los enlaces a-1,4-glucosídicos de los almidones y los carbohidratos produciendo la conversión de almidón en maltosa y maltotriosa, productos de reacción que son más difusibles que las grandes moléculas de almidón, son ácidos génicos y tienen un potencial intraoral de desmineralización próximo al de la sacarosa y la glucosa. Además, juega un papel importante facilitando el metabolismo de los carbohidratos y la adherencia bacteriana en la superficie de los dientes y, con ello, la iniciación de la caries (Boehlke *et al.*, 2015).

Lo Pipara *et al.* (2008) demostraron que ciertos flavonoides naturales actúan como inhibidores del α -amilasa humana, lo que los convierte en candidatos prometedores para controlar la digestión del almidón y la glucemia posprandial.

El continuo aumento de las tasas de obesidad, diabetes y otras comorbilidades relacionadas, junto con las políticas públicas globales que exigen reducciones en el consumo de azúcar como un medio para combatir estos problemas, orienta la búsqueda de su reemplazo por otros edulcorantes naturales o artificiales.

Stevia rebaudiana (Bertoni), comúnmente conocida como estevia o kaá heé, es una planta herbácea originaria del suroeste de Brasil y Paraguay, donde se ha utilizado por sus propiedades endulzantes durante cientos de años, se cultiva comercialmente en Brasil, Paraguay, América Central, Tailandia, Corea, China e India. Es bastante popular para el tratamiento de diferentes enfermedades en todo el mundo, ya que se le adjudican propiedades terapéuticas contra la diabetes, hipertensión y obesidad, de ayuda al control de peso, la saciedad y el hambre. Por su contenido en compuestos fenólicos, se ha descripto también su acción como antioxidante y anticancerígeno; asimismo se ha demostrado que posee propiedades antibacterianas, anticonceptivas y diuréticas (Salvador Reyes *et al.*, 2014).

La planta de estevia presenta en sus hojas diversos glucósidos de esteviol (Esteviósido 5-10%, Rebaudósido A 2-4%, Rebaudósido C 1-2%, Dulcósido 0,5-1%, y otros Rebaudósidos en cantidades ínfimas), compuestos químicos que producen un sabor dulce, pero sin valor calórico y son de 150 a 300 veces más dulces que la sacarosa (solución al 0,4%), solubles en agua, etanol y metanol, por los que son los principales ingredientes o precursores de muchos sustitutos del azúcar o edulcorantes etiquetados bajo el nombre genérico de “stevia” y ha tenido impulso en los últimos tiempos como una alternativa al azúcar de mesa y a los edulcorantes artificiales (Hossain *et al.*, 2017).

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.2.1. Situación Problemática

La caries dental es una enfermedad infecciosa producida por bacterias productoras de ácido. Al igual que la mayoría de las enfermedades crónicas más frecuentes en la actualidad, es multifactorial y está muy relacionada con estilos de vida, fundamentalmente hábitos de alimentación e higiene oral insuficiente, el alto consumo de azúcares y la colonización bacteriana (Collazo Ortega, 2021). Debido a que el consumo de azúcares tiene un impacto negativo en la salud, el reemplazo de la sacarosa con un sustituto natural resultaría en beneficio para la salud general y bucal.

Entre los sustitutos del azúcar, la stevia está ganando interés entre consumidores y fabricantes de alimentos, por ser un endulzante de origen vegetal, que no aporta calorías y posee un sabor dulce 50-350 veces superior al azúcar, lo que la convierte en una excelente opción para uso en bebidas y alimentos con bajo contenido de azúcar y calorías. Se trata de un producto natural y saludable, que no se metaboliza en el cuerpo humano y, por tanto, no eleva el nivel de glucosa en sangre, presenta propiedades antimicrobianas (comprobadas *in vitro* e *in vivo*), se usa ampliamente como edulcorante en bebidas y para enmascarar el sabor amargo de ciertas hierbas medicinales en países como Brasil, Japón y Paraguay (Hossain *et al.*, 2017). La Organización Mundial de la Salud establece en un informe la ausencia de genotoxicidad *in vitro* o *in vivo* y no evidencia de actividad cancerígena (Sales *et al.*, 2012).

Debido al papel que desempeña la AAs facilitando el metabolismo de los carbohidratos y la adherencia bacteriana en la superficie de los dientes y, con ello, la iniciación de la caries, se ha estudiado la relación de su concentración con enfermedades vinculadas al consumo de azúcares, como caries y diabetes y resulta de interés conocer mecanismos que reduzcan su contenido en saliva o inhiban su acción. La AAs juega un papel importante en la digestión del almidón (principal fuente de glucosa exógena en la dieta humana) por lo que retrasar la digestión de

los alimentos con almidón mediante la inhibición de la a-amilasa en el tracto digestivo es también una potencial opción de manejo/terapéutica para la diabetes tipo II (Sun *et al.*, 2019).

Por otro lado, se conoce que la acción anti-cariogénica de hojas, frutos y otros productos vegetales como las fresas o frutillas (*Fragaria vesca*, L), las hojas de yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl), el té y el café, entre otros, se debe a la inhibición de la actividad de AAs por componentes polifenólicos (taninos endógenos), fenólicos o melanoidinas presentes en su composición, compuestos a los cuales se les atribuye la capacidad de acoplarse con proteínas de manera inespecífica (Sosa *et al.*, 2002; Mendoza Meza & Medina Valdés, 2015; Mesa Rodríguez *et al.*, 2017; Pallepati *et al.*, 2018; Coceo *et al.*, 2019, Sun *et al.*, 2019), por lo que en esta tesis se propuso determinar la posible asociación del consumo de estevia con la concentración de AAs.

1.2.2. Preguntas de Investigación

¿Existe relación entre la ingestión de infusión de estevia y la concentración de a-amilasa salival?

I. 3. JUSTIFICACIÓN

Dentro de los componentes de la saliva, la AAs ha sido estudiada, en grupos de individuos que poseen una condición específica, como caries, asma, diabetes, con el fin de encontrar su relación tanto con enfermedades orales como enfermedades sistémicas.

Se conoce desde hace tiempo la relación estrecha y directa entre el consumo de azúcares y la presencia de caries, también que dicha relación se debe al efecto que la presencia de azúcares libres en la boca tiene sobre el desarrollo de las bacterias causantes de la caries.

La AAs cumple un papel importante en la digestión del almidón, el glucógeno y otros polisacáridos, por lo que su inhibición se considera una estrategia para el tratamiento de trastornos en la absorción de hidratos de carbono, tales como la diabetes y la obesidad, así como las enfermedades relacionadas con la placa bacteriana, caries dental y enfermedad periodontal.

El papel potencial de vegetales inhibidores de la a-amilasa ha sido revisado por varios autores, pero no se ha descripto dicha actividad para *S. rebaudiana* (Bertoni).

La relevancia de los resultados de esta tesis radica en determinar si el consumo de infusión de estevia se puede asociar con alteraciones en la concentración de AAs.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. Objetivo General

Determinar la relación entre el consumo de una infusión de estevia (*Stevia rebaudiana*, Bertoni) y la concentración de a-amilasa salival.

1.4.2. Objetivos Específicos

Relacionar los contenidos de a-amilasa salival con la edad de los sujetos.

Evaluar la asociación entre los contenidos de a-amilasa salival en los diferentes momentos de medición.

Analizar los contenidos de a-amilasa salival basal y después de 60 y 120 minutos posteriores al consumo de líquidos.

Comparar los contenidos de aamilasa salival entre los sujetos que consumieron infusión de estevia, jugo artificial de naranja y agua.

1.5. BIBLIOGRAFÍA

1. Barembaum, S.R.; Azcurra, A.I. (2019). La saliva: una potencial herramienta en la Odontología. *Rev Fac Odont.* 29 (2): 8-21.
2. Boehlke, C.; Zierau, O.; Hannig, C. (2015). Salivary amylase - the enzyme of unspecialized euryphagous animáis. *Acta Oral Biol.* 60 (8): 1162-1173. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.05.008>
3. Coceo, F.; Cagetti, M.G.; Livesu, R.; Camoni, N.; Pinna, R.; Lingstróm, P.; Campus, G. (2019). Effect of a Daily Dose of Snacks Containing Maltitol or Stevia rebaudiana as Sweeteners in High Caries Risk Schoolchildren. A Double-blind RCT Study. *Oral Health Prev Dent.* 17 (6): 515-522. doi: 10.3290/j.ohpd.a43329. PMID: 31641701.
4. Collazo Ortega, T. (2021). Bioquímica de la caries dental. Segundo Congreso Virtual de Ciencias Básicas Biomédicas en Granma. Manzanillo.
5. García Triana, B.E.; Delfín Soto, O.; Lavandera Espina, A.M.; Saldaña Bernabeu, A. (2012). Principales proteínas salivales: estructura, función y mecanismos de acción. *Revista Habanera de Ciencias Médicas.* 11 (4): 450-456. Recuperado en 24 de septiembre de 2022, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2012000400004&lng=es&tlng=es.
6. Hossain, M.F.; Islam, M.T.; Islam, M.A.; Akhtar.S. (2017). Cultivation and uses of stevia (Stevia rebaudiana Bertoni): a review. *Afr J Food Agrie Nut Dev.* 17 (4): 12745-12757. DOI: 10.18697/ajfand.80.16595
7. Jiménez, T.; Cabrera, G.; Álvarez, E.; Gómez, F. (2010). Evaluación del contenido de esteviósido y rebaudiósido A en una población de Stevia rebaudiana Bertoni (kaá heé) cultivada comercialmente. Estudio preliminar. *Mem Inst Investig Cieñe Salud.* 8 (1): 47-53.

8. LambyTovar, C.P.; Gómez González, O.L.; Jaramillo Gómez, L.M. (2013). La a-amilasa salival: relación con la caries dental y la salud en general. *Universitas Odontológica*. 32 (69): 93-101.
9. Lo Pipara, E; Scheib, H; Frei, N; Williamson, G; Grigorov, M; Chou, CJ. (2008). Flavonoids for Controlling Starch Digestión: Structural Requirements for Inhibiting Human r-Amylase. *J. Med. Chem.* 51: 3555-3561.
10. Mendoza Meza, D.L.; Medina Valdés, R. (2015). Inhibición in vitro de las enzimas alfa-amilasa y lipasa pancreática por fracciones fenólicas de extractos etanólicos de hojas de Yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl). *Avances en Química*. 10 (1): 33-40.
11. Mesa Rodríguez, N.Y.; Medrano Montero, J.; Martínez Pérez, M.L.; Grave de Peralta, M.; Cabrera Hechavarria, Y. 2017. Efecto anticariogénico del café. *Correo Científico Médico de Holguín (CCM)*. 3: 888-898. ISSN 1560-4381.
12. Pallepati, A.; Yavagal, P.; Veeresh, D.J. (2017). Effect of Consuming Tea with Stevia on Salivary pH - An In Vivo Randomised Controlled Trial. *Oral Health PrevDent*. 15 (4): 315-319. doi: 10.3290/j.ohpd.a38572. PMID: 28681047.
13. Pereira de Lima, M.; Venâncio Fernandes Dantas, R.; Mendes, J.L.; da Costa Neto, R.E.; Almeida de Lima Júnior, J.; Ximenes de Souza, S.L. (2020). Biomarcadores salivares no diagnóstico e no monitoramento de patologías oráis e sistémicas. *Revista Cubana de Estomatología*. 57 (1): 1-15.
14. Sales, P.M.; Souza, P.M.; Simeoni, L.A.; Silveira, D. (2012). a-Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *JPharmPharm Sci*. 15 (1): 141-83. doi: 10.18433/j35s3k. PMID: 22365095.
15. Salvador-Reyes, R.; Sotelo-Herrera, M.; Paucar-Menacho, L. (2014). Study of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) as a natural sweetener and its use in benefit of the health. *Scientia Agropecuaria*. 5 (3): 157-163. <https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2014.03.06>
16. Silva Neto, J.M. de A.; Farias, D.N. da S.; Souza, J.B.R. de; Batista, A.R.C.; Santos, J.K.B. dos; Trujillo, A.M.; Tenorio Neto, J.F. (2020). A saliva como sendo um meio de diagnósticos: uma revisão de literatura. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, (41), e2506. <https://doi.org/10.25248/reas.e2506.2020>

17. Sosa, M.; Pernía, T.; Araujo, L.; Méndez de C., G.; Buitrago, D.; Pérez, J. (2002). Determinación del efecto inhibitorio de los polifenoles presentes en la fresa (*Fragaria vesca* L.) sobre la enzima alfa amilasa. *Rev Fac Farm.* 43: 47-49.
18. Sun, L; Warren, FJ; Gidley, MJ. 2019. Natural products for glycaemic control: Polyphenols as inhibitors of alpha-amylase, Trends in Food Science & Technology, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.009>.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

En este Capítulo se presenta el estado de avance en el conocimiento en relación con el problema en estudio, que permite explicitar el encuadre teórico utilizado para su abordaje.

II.I. ESTADO DEL ARTE

II.1.1. Caries dental, efecto anticariogénico

La caries dental constituye una de las enfermedades crónicas y transmisibles que con mayor frecuencia afecta a los seres humanos, por lo que es objeto de estudio de numerosos investigadores con el propósito de lograr su prevención y tratamiento. Es una enfermedad infecciosa causada por bacterias productoras de ácido. Al igual que la mayoría de las enfermedades crónicas más frecuentes en la actualidad, es multifactorial y está muy relacionada con estilos de vida, fundamentalmente hábitos de alimentación e higiene oral insuficiente, el alto consumo de azúcares y la colonización bacteriana (Collazo Ortega, 2021).

Constituye un proceso patológico complejo, de origen infeccioso y transmisible que afecta las estructuras dentarias y se caracteriza por un desequilibrio bioquímico que, de no ser revertido, conduce a cavitación y a alteraciones del complejo dentinopulpar. Datos de la Organización Mundial de la Salud indican que la prevalencia de caries a nivel mundial es de 60-90% en escolares y casi el 100% en adultos. Su origen es multifactorial e incluye factores infecciosos bacterianos y post eruptivos. Su incidencia, tanto en niños como en adultos está relacionada con hábitos de higiene bucal deficiente, aunque también se involucran factores hereditarios, dieta, enfermedades concomitantes y estados carenciales, por lo que se debe realizar una

buenas previsiones a través de la educación para la salud, insistiendo fundamentalmente en el correcto cepillado de los dientes y encías (Cerrato *et al.*, 2019).

La destrucción de los tejidos duros de las piezas dentarias producida por la caries dental es causada por la actividad bacteriana capaz de provocar la formación de la placa dental bacteriana, una película apenas visible de color blanquecino-amarillento producida por la acumulación de restos de alimentos, bacterias (estreptococo y actinomyces) y gérmenes (Kolenbrander, 2000).

La comprensión etiológica actual de la enfermedad ha enfatizado el papel fundamental de los azúcares en la caries. No obstante, no se debe subestimar un tema clave, que los humanos consumen una dieta mixta compuesta por multitud de sustancias, por lo que el papel de la dieta en la caries no debe limitarse únicamente a la presencia de azúcares fermentables, mono o polisacáridos, y analizar la contribución de otros componentes alimentarios, principalmente como factores potencialmente protectores (Giacaman. 2017).

Las investigaciones actuales se centran en la elaboración de una nueva metodología contra las enfermedades orales, y fundamentalmente contra la caries dental, que se basa en la identificación y caracterización de compuestos activos naturales que reducen la inflamación, tienen actividad anti-caries, reducen la patogenicidad de la microflora cariogénica y/o remineralizan los tejidos duros dentales.

Todo el proceso cariogénico se puede inhibir a través de productos específicos y para ello se utilizaron diversas especies vegetales. Varios alimentos que contienen componentes naturales (especialmente polifenoles) manifiestan propiedades anti-adhesivas contra *Streptococcus mutans* (Gutiérrez, 2002).

Entre ellos el café, el té y el vino, contienen compuestos fenólicos como: ácidos clorogénico y cafeíco con propiedades antioxidantes, efectos quelantes y

modulación de la actividad de varios sistemas enzimáticos ¹. En el café se ha observado, además de la inhibición de la formación del biofilm de *S. mutans*, actividad antimicrobiana pues no permite que baje el pH en la placa dental inducido por la presencia de la glucosa en la dieta (Hans *et al.*, 2016).

II.1.2. Propiedades de la estevia

La estevia (*Stevia rebaudiana*, Bertoni) ha demostrado, también, diversas cualidades en relación con la prevención de caries.

Usha *et al.* (2017) demostraron que el extracto de estevia en concentración del 0,5% mejoró el pH y la capacidad de amortiguación de la saliva en pacientes de alto riesgo de caries, también redujo los organismos cariogénicos en la saliva, por lo que consideran que se puede utilizar como enjuague bucal para pacientes con riesgo de caries de moderado a alto.

Vilaseca Velázquez (2012) evaluó la actividad antibacteriana de dos infusiones (estevia al 10% y cola de caballo al 10%) y tres antisépticos químicos (clorhexidina al 0,12%, triclosan al 0,05% y cloruro de cetilpiridinio al 0,05%) en 150 adultos y reportó que todas las infusiones de estevia al 10% y cola de caballo al 10% resultaron tener similares propiedades antisépticas que los compuestos químicos, constituyéndose en opciones como métodos antisépticos para el control de la flora microbiana bucal.

Fengyang *et al.* (2012) descubrieron que uno de los compuestos presentes en las hojas de estevia, denominado esteviósido, ejerce efecto antiinflamatorio al inhibir la activación de NF-κB (factor nuclear kappa B) y la señalización de la proteína quinasa activada por mitógenos y la liberación de citocinas proinflamatorias.

¹ International Coffee Organizaron. World coffee trade (1963 - 2013): A review of the markets, challenges and opportunities facing the sector. 112th. London, United Kingdom: International Coffee Council; (2014). Disponible en: <http://www.ico.org/news/icc-III-5-rle-world-coffee-outlook.pdf>

Contreras (2013) establece que tanto el esteviósido como el rebaudiósido A, los glicósidos más importantes de estevia no poseen actividad cariogénica. Estudios *in vitro* han demostrado que extractos de estevia presentan actividad antibacteriana sobre *S. mutans*, *S. sobrinus* y *Lactobacillus acidophilus*, disminuyen la producción de ácidos bacterianos atribuyéndosele un bajo potencial acido génico y un menor efecto de desmineralización del esmalte en comparación con otros edulcorantes.

Dentro de las medidas preventivas para la caries dental se ha propuesto el remplazo de los azúcares energéticos dentro de la dieta por carbohidratos no energéticos, dentro de los cuales se pueden encontrar los derivados de estevia. Además de su efecto no energético, Vitery Sapuyes *et al.* (2010) comprobaron su actividad antibacteriana contra *S. mutans* y *L. acidophilus* y el posible potencial anticariogénico de este endulzante natural.

Las propiedades anticariogénicas de estevia han sido demostradas también por Díaz Mendoza & Mendoza Lupuche (2021), quienes compararon *in vitro* el efecto de edulcorantes a base de estevia en el crecimiento del *S. mutans*, y demostraron su efecto inhibidor sobre las cepas estudiadas de éste patógeno.

Pairazamán García (2021) evaluó el efecto *in vitro* de extracto etanólico de estevia sobre los factores de virulencia cariogénicos de *S. mutans*, el efecto sobre el potencial acido génico se determinó evaluando cambios de pH entre pre y post incubación, y el efecto sobre la formación de polisacáridos insolubles empleando el método fenol ácido-sulfúrico, concluyendo que el extracto etanólico de estevia posee efecto inhibitorio *in vitro* sobre el potencial acido génico y la formación de polisacáridos extracelulares insolubles en agua de la cepa de *S. mutans* estudiada.

Massón Palacios & Armas Vega (2016) compararon la eficacia del endulzante natural estevia, preparado como extracto acuoso, en fórmula industrial y en fórmula comercial, sobre el crecimiento de *S. mutans*, y *S. sanguinis* y encontraron que las tres formas de preparación de estevia presentan efecto de inhibición sobre ambas especies de *Streptococcus*, pero la fórmula industrial presenta efecto superior a las otras.

II.1.3. Alfa-amilasa salival

La a-amilasa salival (AAs) es un importante componente liberado por las glándulas salivales, regulado por el sistema nervioso autónomo. Es una enzima que se caracteriza por una alta variabilidad interindividual tanto en la actividad basal como en su respuesta al estrés. Esta variabilidad podría deberse a una serie de factores fisiológicos, psicosociales y ambientales. La variabilidad en la concentración o actividad de la a-amilasa permite detectar anomalías en los órganos que la producen, por lo que constituye un importante biomarcador (García Triana *et al.*, 2012).

Al-Maumar *et al.* (2019) demostraron que AAs es un indicador de estrés agudo, que permite diferenciar entre ansiedad y miedo dental. Santos *et al.* (2021) demostraron asociaciones entre el contenido de AAs y el estrés. Ali & Nater (2020) aportaron evidencia de que la AAs puede servir como un biomarcador factible de la disfunción del sistema nervioso central en la salud y la enfermedad.

Shah *et al.* (2022) encontraron aumento considerable de los contenidos de amilasa salival en pacientes con diabetes en comparación con individuos sanos, y consideran que la amilasa salival se puede utilizar como biomarcador para el diagnóstico de la diabetes y también para su seguimiento.

Al-Aki *et al.* (2022) determinaron asociaciones inversas significativas de los contenidos de AAs con el índice de masa corporal y la masa grasa. Parsaie *et al.* (2022) estudiaron el efecto de la actividad de AAs, el índice de masa corporal, los hábitos dietéticos y la higiene oral en las caries tempranas de la niñez. Midieron el nivel de actividad de AAs en saliva no estimulada en niños, con y sin caries y demostraron que existe relación entre la actividad de AAs y la presencia o no de caries dental.

La percepción del sabor dulce relacionada con el almidón juega un papel importante como parte de los mecanismos de detección de nutrientes de la dieta en la cavidad oral. Tarragon *et al.* (2018) consideran que AAs influye en la percepción

del sabor y la textura, características relevantes en la adquisición del gusto por los alimentos y, con el tiempo, la preferencia por los alimentos y demostraron que la actividad basal de AAs se asocia inversamente con la preferencia conductual subjetiva por alimentos ricos en azúcar, como así también con marcadores antropométricos de riesgo cardiovascular, por lo que sería un candidato interesante a considerar entre los factores fisiológicos que modulan el comportamiento alimentario.

Kusuma Aji *et al.* (2019) estudiaron la liberación de azúcares de los alimentos con almidón que provocan dulzura a través de la percepción del sabor dulce relacionado con el almidón, la actividad de la AAs, la liberación oral de azúcares reductores y la leptina salival. Los resultados demostraron que una masticación oral de 2 minutos de goma de mascar con almidón produjo una concentración oral de maltosa por encima del umbral de sabor dulce y reveló que la cantidad total de azúcares reductores equivalentes de maltosa producidos se correlacionó positivamente con la actividad de AAs.

La AAs es la enzima que facilita la digestión del almidón con la consiguiente generación de ácidos, por lo que podría desempeñar un papel activo en la dinámica de la cañes. Es por ello por lo que se piensa que los inhibidores de AAs podrían reducir la actividad cariogénica de almidones, limitando el desarrollo bacteriano, lo que sugiere posibles aplicaciones nutricionales o tecnológicas con AAs para el manejo moderno de caries. La inhibición de la a-amilasa se considera una estrategia para el tratamiento de trastornos en la absorción de carbohidratos, como la diabetes y la obesidad, así como la caries dental y las enfermedades periodontales.

Visvanathan *et al.* (2020), demostraron la inhibición de la actividad de la a-amilasa humana por polifenoles utilizando maltoheptapásido como sustrato con cuantificación cromatográfica directa del producto, en comparación con hidrólisis de amilosis y amilopectina estimadas utilizando ácido 3,5-dinitrosalicílico.

Diversos compuestos presentes en vegetales podrían presentar actividad inhibitoria sobre la AAs.

La oleuropeína que se encuentra en las aceitunas y las hojas de olivo, modula algunos biomarcadores de riesgo de diabetes *in vivo*, un posible mecanismo puede ser atenuar la digestión y absorción del azúcar. Keriml *et al.* (2019) demostraron que la Inhibición combinada de la actividad de la sacarosa y del transporte de glucosa observada *in vitro* fue suficiente para modificar la digestión de dosis bajas de sacarosa en voluntarios sanos, pero la inhibición de la AAs fue débil y no fue suficiente para modificar el azúcar en la sangre cuando se consume con un alimento rico en almidón, lo que sugiere que se requiere una potencia umbral para la inhibición de las enzimas digestivas con el fin de traducirse en efectos *in vivo*.

Kumar *et al.* (2019) estudiaron los efectos hipoglucémicos de dos grosellas (*Ribes* sp), determinaron su efecto sobre la Inhibición de las enzimas digestivas de carbohidratos (a-amilasa, a-glucosidasa), la absorción Intestinal de azúcar y el transporte a través de las células CaCo -2 (Células de Adenocarcinoma de colon humano que son capaces de expresar elementos de diferenciación característicos de las células intestinales maduras). Encontraron que las antocianinas presentes en las grosellas negras parecen regular la hiperglucemla postprandial principalmente, pero no únicamente, mediante la inhibición de la a-glucosidasa, mientras que otros compuestos fenólicos modulan la a-amilasa salival, la absorción de glucosa y los transportadores de azúcar.

Sales *et al.* (2012) consideran que las plantas constituyen una fuente importante de componentes químicos con potencial para la inhibición de la a-amilasa y se pueden utilizar como fuentes de alimentos terapéuticos o funcionales. Han realizado una revisión sobre extractos crudos y compuestos aislados de origen vegetal probados para la actividad Inhibidora de la a-amilasa y encontraron que los flavonoides y los compuestos fenólicos demostraron actividades inhibitorias.

Celaya *et al.* (2020) caracterizaron infusiones de tres variedades de estevia y determinaron que las infusiones de hojas presentan elevados contenidos de compuestos fenólicos y que en general, Infusiones de estevia con mayores contenidos de glicósidos de esteviol totales proporcionan también mayores contenidos de compuestos fenólicos antioxidantes.

II.2. HIPÓTESIS

Los contenidos de a-amilasa salival se encuentran relacionados con la edad de los sujetos.

Existe asociación entre los contenidos de a-amilasa salival en los diferentes momentos de medición.

Los contenidos de a-amilasa salival basal difieren de los valores obtenidos después de 60 y 120 minutos posteriores a la ingestión de líquidos.

Los contenidos de a-amilasa salival presentan variaciones entre los sujetos que consumieron infusión de estevia, jugo artificial de naranja y agua.

II. 3 MARCO METODOLÓGICO

II.3.1. Validez externa

En una investigación científica, la validez externa del estudio, es decir el rigor en la extrapolación y generalización de los resultados observados en la muestra hacia la población objeto de estudio, se obtiene a partir de la representatividad de la muestra. Esta representatividad depende, por un lado, de que la muestra haya sido seleccionada al azar, es decir, que todos los sujetos de la población hayan tenido la misma posibilidad de ser seleccionados para participar en la muestra y por ende ser incluidos en el estudio; y, por otro lado, que el número de sujetos seleccionados representen numéricamente a la población que le dio origen respecto de la distribución de la variable en estudio. A partir de esta representatividad, el análisis de una muestra permite realizar inferencias, extrapolar o generalizar conclusiones a la población objeto con un alto grado de certeza (Otzen & Manterola, 2017).

El muestreo tiene por objetivo estudiar las relaciones existentes entre la distribución de una variable en la población objeto y en la muestra a estudio. Para ello es fundamental, entre otras cosas, definir los criterios de inclusión (características clínicas, demográficas, temporales y geográficas de los sujetos que componen la población en estudio) y de exclusión (características de los sujetos que pueden interferir con la calidad de los datos o la interpretación de los resultados) (Perelman *et al.*, 2019).

II.3.2. Validez interna

El Diseño de Investigación se refiere al plan o estrategia concebida para obtener la información que se necesita con la finalidad de responder a las preguntas de investigación. Existen diferentes tipos de Diseños de Investigación, que se adecúan a distintas circunstancias y fundamentalmente dependen del alcance que se pretende de la investigación. Cuando se buscan relacionar variables o incluso indagar en una relación de causa-efecto, los diseños más adecuados son los de tipo Experimental, donde el investigador manipula algunos factores (causas o variables independientes), es decir modifica intencionalmente su condición y observa su efecto sobre otros factores (efectos o variables dependientes). La validez interna de un trabajo experimental se sustenta en la validez y confiabilidad de la medición del efecto de las variables independientes sobre las dependientes (Hernández Sampieri *et al.*, 2014).

II.3.2.1. Obtención desaliva

En relación con la medición del contenido de AAs en la saliva, el primer problema a resolver es una adecuada forma de obtención de saliva para realizar las determinaciones. Navazesh & Christensen (1982) consideran que medidas precisas de la tasa de flujo salival y su composición son esenciales para muchos protocolos

clínicos, experimentales y de diagnóstico. La saliva se puede recolectar en condiciones no estimuladas (de reposo) o estimuladas. El flujo salival puede ser estimulado por una variedad de agentes gustativos, masticatorios o farmacológicos. Por el contrario, la saliva no estimulada se define como la saliva recolectada sin una fuente aparente de estimulación, que se puede recolectar como saliva entera (secreciones de las glándulas mayores y menores) o de glándulas individuales (saliva de las glándulas parótidas, submandibulares y sublinguales). Aunque encontraron que las tasas de flujo en reposo y estimuladas estaban relacionadas, sus resultados sugieren que los métodos de reposo diferenciarán mejor las tasas de flujo salival individuales porque las medidas son menos variables y representan las condiciones fisiológicas habituales dentro de la cavidad bucal.

Existen diferentes métodos para recolectar saliva, pero los cuatro más comunes son (Navazesh, 1993):

- 1) Drenaje: se permite que la saliva gotee del labio inferior hacia un tubo de ensayo equipado con un embudo y el sujeto expectora en el tubo de ensayo al final del período de recolección.
- 2) Saliva escupida: se permite que la saliva se acumule en el piso de la boca y el sujeto la escupe en un tubo de ensayo cada 60 segundos.
- 3) Succión: la saliva se aspira continuamente desde el piso de la boca a un tubo de ensayo mediante un eyector de saliva o un aspirador.
- 4) Hisopo (absorbente): La saliva se recoge (absorbe) mediante un hisopo, un rollo de algodón o una esponja de gasa colocados en la boca en los orificios de las glándulas principales y se retira para volver a pesar al final del período de recolección.

En un estudio comparativo se encontró que los métodos de succión e hisopo introdujeron cierto grado de estimulación y variabilidad y, por lo tanto, no se recomiendan para la recolección de saliva no estimulada, el drenaje y la saliva

escupida proporcionan tipos similares de información sobre la saliva no estimulada y son reproducibles y confiables (Navazesh, 1993).

Bhattari *et al.* (2018) afirman que el método de salivación (babeo) pasivo se considera una alternativa prometedora para minimizar posibles fuentes de error (exceso de mucina y/o bacterias, presencia de materiales absorbentes). Además, se pueden recolectar grandes volúmenes de saliva en poco tiempo utilizando el método de babeo pasivo (Granger *et al.*, 2012).

Por esta razón, la recolección de saliva completa mediante salivación pasiva es el método de referencia en la toma de muestra de fluido oral para análisis biológicos. Evita las secreciones localizadas de glándulas salivales específicas, proporcionando un espécimen más consistente. Al no estar comprometida por los materiales absorbentes utilizados en otros métodos en la saliva pueden analizarse todas las moléculas de interés.

IL3.2.2. Medición de alfa-amilasa salival

La enzima amilasa, producida en el páncreas y en las glándulas salivales, escinde los enlaces a 1-4 glucosídicos de los polisacáridos (almidón y glucógeno). En la actualidad existen kits comerciales para la determinación de a-amilasa en saliva que brindan resultados confiables que se basan en que el sustrato, almidón tamponado, se incuba con la muestra, produciéndose la hidrólisis enzimática, que se detiene por el agregado de reactivo de iodo, que al mismo tiempo produce color con el remanente de almidón no hidrolizado. La disminución de color respecto de un sustrato color (sin muestra) es la medida de la actividad enzimática, que se expresa en Unidades Amilolíticas /decilitro (UA/dl).

La a-amilasa hidroliza el sustrato definido 2-cloro-p-nitrofenil-a-D-maltotriósido (CNP-G3) para liberar 2-cloro-p-nitrofenol (CNP), formándose 2-cloro-nitrofenil-a-D-maltósido (CNP-G2), maltotriosa (G3) y glucosa. El CNP absorbe a 405 nm y la

velocidad de aparición del color es directamente proporcional a la actividad enzimática (Young, 2001).

II.4. BIBLIOGRAFIA

1. Al-Aki, N.; Thompson, R.I.; Arredouani, A. (2022). Elevated levels of salivary α- amylase activity in saliva associated with reduced odds of obesity in adult Qatari citizens: A cross-sectional study. *PLOS ONE* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264692>
2. Ali, N.; Nater, U.M. (2020). Salivary Alpha-Amylase as a Biomarker of Stress in Behavioral Medicine. *Int.J. Behav. Med.* 27, 337-342. <https://doi.org/10.1007/s12529-019-09843-x>
3. Al-Maummar, M.; Al-Thabit, H.O.; Pañi, S. (2019) The impact of dental treatment and age on salivary cortisol and alpha-amylase levels of patients with varying degrees of dental anxiety. *BMC Oral Health.* 19:211. <https://doi.org/10.1186/s12903-019-0901-7>
4. Bhattacharai KR, Kim HR, Chae HJ. Compliance with Saliva Collection Protocol in Healthy Volunteers: Strategies for Managing Risk and Errors. *Int J Med Sci.* 2018 May 22; 15(8):823-831. doi: 10.7150/ijms.25146
5. Celaya, L.; Taiariol, D.; Valle, S.; Koslobsky, N.K. (2020). Glicósidos de esteviol y compuestos fenólicos en infusiones de Stevia rebaudiana dependiendo de la variedad. *RECyT.* 22(33):76-84.
6. Cerrato, M.; Canales, D.; Guevara, B.; Chirinos, S.; Ramírez, R.; Espinal, T. (2019). Frecuencia de caries dentales en pacientes de la clínica odontológica de la Universidad Tecnológica Centroamericana. *Innovare: Revista De Ciencia Y tecnología,* 8(1), 18-26. <https://doi.org/10.5377/innovare.v8i1.8104>
7. Collazo Ortega. T. (2021). Bioquímica de la caries dental. Segundo Congreso Virtual en Ciencias Básicas Biomédicas en Granma. Manzanillo. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8854-6435>

8. Contreras, S. 2013. Anticariogenic properties and effects on periodontal structures of Stevia rebaudiana Bertoni. Narrative review. *J Oral Res.* 2(3): 158-166.
9. Díaz Mendoza. T.; Mendoza Lupuche, R. (2021). Efecto de la Stevia rebaudiana en el Streptococcus mutans. *KIRU.* 2021 Jul-Set; 18(3): 147-152. <https://doi.Org/10.24265/kiru.2021 ,v18n3.03>
10. Fengyang, L.; Yunhe, F.; Bo, L.; Zhicheng, L.; Depeng, L.; Dejie, L.; Wen, Z.; Yongguo, C.; Naisheng, Z.; Xichen, Z.; Zhengtao, Y. (2012). Stevioside suppressed inflammatory cytokine secretion by downregulation of NF- κ B and MAPK signaling pathways in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *Inflammation.* 35(5): 1669-75. doi: 10.1007/s10753-012-9483-0. PMID: 22644339.
11. García Triana, B.E.; Soto, O.D.; Lavandero Espina, A.M.; Saldaba Bernabeu, A. (2012). Principales proteínas salivales: estructura, función y mecanismos de acción. *Revista Habanera de Ciencias Médicas.* 11(4):450-456.
12. Giacamán, RA. (2017). Azúcares y más allá. El papel de los azúcares y otros nutrientes y su impacto potencial en la caries. *Enfermedades bucales,* doi: 10.1111 /odi. 12778.
13. Granger DA, Johnson SB, Szanton SL, Out D, Schumann LL. Incorporating salivary biomarkers into nursing research: an overview and review of best practices. *Biol Res Nurs.* 2012 Oct; 14(4): 347-56. doi: 10.1177/1099800412443892
14. Gutiérrez, M.A. (2002). Café, antioxidantes y protección a la salud. *MEDISAN.* 6(4):72-81. Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/san/vol7_4_02/san11402.htm.
15. Hans, R.; Thomas, S.; Garla, B.; Dagli, R.J.; Hans, M.K. (2016). Effect of Various Sugary Beverages on Salivary pH, Flow Rate, and Oral Clearance Rate amongst Adults. *Scientifica.* Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/scientifica/2016/5027283/>.
16. Hernández Sampieri, R.; Fernández Collado, C.; Baptista Lucio, M.P. (2014). *Metodología de la Investigación.* Me Graw Hill/ Interamericana Editores. ISBN: 978-1-4562-2396-0.

17. Kerimi, A.; Nyambe-Silavwe, H.; Pyner, A.; Oladele, O.; Gauer, J.S.; Stevens, Y.; Williamson, G. (2019). Nutritional implications of olives and sugar: attenuation of postprandial glucose spikes in healthy volunteers by inhibition of sucrose hydrolysis and glucose transport by oleuropein. *European Journal of Nutrition*. 58:1315-1330. <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1662-9>
18. Kolenbrander, P.E. (2000). Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol*. 54: 413-437. Disponible en: <http://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.micro.54.1.413>.
19. Kumar Barik, S.; Russell, W.R.; Moar, K.M.; Cruickshank, M.; Scobbie, L.; Duncan, G.; Hoggard, N. (2019). The anthocyanins in black currants regulate postprandial hyperglycaemia primarily by inhibiting α -glucosidase while other phenolics modulate salivary α -amylase, glucose uptake and sugar transporters. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.108325>
20. Kusuma Aji, G.; Warren, F.J.; Roura, E. (2019). Salivary α -Amylase Activity and Starch-Related Sweet Taste Perception in Humans. *Chemical Senses*. 44: 249-256 doi:10.1093/chemse/bjz010
21. Massón Palacios, M.; Armas-Vega, A. (2016). Comparación de la efectividad antibacteriana de la Stevia rebaudiana sobre *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*. *KIRU*. 13(2):127-132.
22. Navazesh, M. (1993). *Methods for Collecting Saliva*. 694(*none*), 72-77. doi:10.1111/j.1749-6632.1993.tb18343.x
23. Navazesh, M.; Christensen, C.M. (1982). A Comparison of Whole Mouth Resting and Stimulated Salivary Measurement Procedures. *Journal of Dental Research*, 61(10), 1158-1162. doi:10.1177/00220345820610100901.
24. Otzen, T.; Manterola, C. (2017). Técnicas de Muestreo sobre una Población a Estudio. *Int. J. Morphol.* 35(1):227-232.
25. Pairazamán García, J.L. (2021). Efecto in vitro de los extractos etanólicos de *Stevia rebaudiana* sobre los factores de virulencia cariogénicos de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Tesis para optar al grado académico de Doctor en Estomatología. Universidad Nacional de Tujillo. Perú. Disponible en:

- <https://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/17907/Pairazam%c3%a1n%20Garc%c3%ada%2c%20Juan%20Luis.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
26. Parsaie, Z.; Rezaie, P.; Azimi, N.; Mohammadi, N. (2022). Relationship between Salivary Alpha-Amylase Enzyme Activity, Anthropometric Indices, Dietary Habits, and Early Childhood Dental Caries. International Journal of Dentistry. Article ID 2617197, <https://doi.org/10.1155/2022/2617197>
27. Sales, P.M. de; Souza, P.M. de; Simeoni, L.A.; Olivera Magalháes, P. de; Silveira, D. (2012). *a*-Amilase Inhibitors: A Review of Row Material and Isolate Compounds from Plant Source. *J Pharm Pharmaceut Sci.* 15(1): 141-183.
28. Santos, S.V.M.; Silva, L.A.; Terra, F.S.; Souza, A.V.; Espindola, F.S.; Marziale, M.H.P.; Teixeira, R.R.; Robazzi, M.L.C.C. (2021). Asociación de la alfa amilasa salival con la ansiedad y el estrés en profesionales de enfermería. *Rev. Latino-Am. Enfermagem.* 29: e3468. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1518-8345.4859.3468>
29. Shah V.S.; Pareikh, D.; Manjunatha, B.S. (2021). Salivary alpha-amylase- biomarker for monitoring type ii diabetes. *J Oral Maxillofac Pathol.* 25:441-5. DOI: 10.4103/jomfp.jomfp_84_21
30. Tarragon, E.; Stein, J.; Meyer, J. (2018). Basal Levels of Salivary Alpha- Amylase Are Associated with Preference for Foods High in Sugar and Anthropometric Markers of Cardiovascular Risk. *Behav. Sci.* 8, 94; doi:10.3390/bs8100094
31. Usha, C.; Ramarao, S.; John, B.M.; Babu, M.E. (2017). Anticariogenicity of Stevia rebaudiana Extract when used as a Mouthwash in High Caries Risk Patients: Randomized Controlled Clinical Trial. *World J. Dent.* 8(5):1-6.
32. Vilaseca-Velázquez, C. 2012. Determinación de la sustantividad antiséptica de las infusiones de Stevia rebaudiana bertoni y Equisetum arvense para la reducción de la carga microbiana bucal, en personas mayores de 18 años, ensayo clínico controlado, facultad de odontología, sucre octubre a diciembre de 2010. Tesis presentada para obtener el Grado Académico de Magíster en Microbiología. Universidad Andina Simón Bolívar. Disponible en: <http://repositorio.uasb.edu.bo/handle/54000/769>

33. Visvanathan, R.; Houghton, M.J.; Williamson, G. (2020). Maltoheptaoside hydrolysis with chromatographic detection and starch hydrolysis with reducing sugar analysis: comparison of assays allows assessment of the roles of direct α -amylase inhibition and starch complexation, *Food Chemistry*, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128423>
34. Vitery Sapuyes, G.R.; Escribano Vargas, S.; Gamboa Jaimes, F.O.; Nathaly Chavarria Bolaños, N.; Gómez Scarpetta, R. A. 2010. Actividad inhibitoria de la Stevia rebaudiana sobre el *Lactobacillus acidophilus* y el *Streptococcus mutans*. *Revista Nacional de Odontología*. 6 (10): 57-64.
35. Young, D.S. (2001). Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. AACC Press, 4th ed.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

En este Capítulo se describe el diseño de investigación utilizado, la población objeto de estudio, la selección y conformación de los grupos experimentales y las variables estudiadas. Se especifican también los métodos empleados para el tratamiento de los grupos experimentales, las determinaciones de a-amilasa salival (AAs) y el análisis de los datos.

En todo momento se respetaron las normas éticas internacionales para las investigaciones biomédicas con sujetos humanos. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de cada sujeto después de que los objetivos y la metodología del estudio le fueron explicados. El consentimiento informado se adecúa al modelo establecido por Resol. N° 128/11 CD FOUNNE (Consejo Directivo, Facultad de Odontología de la Universidad Nacional del Nordeste).

El estudio se realizó en el marco del proyecto mayor “Perfil diurno de la concentración de cortisol y alfa-amilasa salival en jóvenes sanos con un enfoque en las variaciones individuales” (18J001, Secretaría General de Ciencia y Técnica, Universidad Nacional del Nordeste). El protocolo del estudio ha sido evaluado por el Comité de Bioética de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional del Nordeste, quien ha emitido un dictamen favorable y ha sido aprobado por dictamen N° 121-2018.

III. 1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

III.1.1. Enfoque de la investigación

El enfoque de la investigación fue de tipo cuantitativo. El proceso de investigación estuvo constituido por un conjunto de fases organizadas *a priori* y de manera secuencial para comprobar ciertas suposiciones, siguiendo lo que se conoce como Método Científico. Además, se registraron datos empíricos y se emplearon técnicas estadísticas para su análisis (Hernández Sampieri & Mendoza Torrres, 2018).

III.1.2. Diseño

El diseño utilizado fue experimental transversal, de ensayo controlado. Fundamentalmente porque el investigador manipuló la variable experimental (independiente) administrando a los participantes las diferentes bebidas y registró los valores de las variables respuesta (dependientes) (Hernández Sampieri *et al.*, 2014).

III.1.3. Población y muestra

La población estuvo intergada por estudiantes de las Clínicas Integradas de la Facultad de Odontología dependiente de la Universidad Nacional del Nordeste, en los meses abril-noviembre del año 2019.

Dentro de dicha población los sujetos experimentales fueron incluidos considerando los siguientes criterios:

Criterios de inclusión

Se incluyeron en la población objeto, individuos con buen estado de salud bucal y general, que accedieron a formar parte del estudio y firmaron el consentimiento informado.

Criterios de exclusión

Fueron excluidos de la población objeto individuos con enfermedades sistémicas y/o bucales, que estuvieran recibiendo medicaciones sistémicas o locales, como así también fumadores, alcohólicos y los que se encontraban bajo tratamiento odontológico.

Una vez identificada la población, se seleccionaron, mediante un muestreo aleatorio del 20% de la población, los estudiantes que pasarían a integrar la muestra y para cada uno de ellos se habilitó una ficha en la que se registró la historia clínica y los datos correspondientes a cada una de las variables en estudio. La muestra estuvo conformada por 60 sujetos adultos jóvenes.

Utilizando un muestreo al azar simple los sujetos fueron seleccionados y asignados a cada uno de los grupos experimentales siguientes (Hernández & Carpió, 2019):

Grupo 1. Ingesta de infusión de estevia ($m = 20$).

Grupo 2. Ingesta de bebida artificial sabor naranja ($n_2 = 20$).

Grupo 3. Ingesta de agua ($n_3 = 20$).

Los grupos 2 y 3 son considerados controles (grupo 2, control con edulcorantes artificiales y grupo 3, blanco).

III.2. METODOLOGÍA

III.2.1. Preparación de las bebidas e ingesta

III.2.1.1. Grupo 1: Infusión de estevia

Se obtuvieron hojas secas de Stevia rebaudiana (Bertoni), variedad criolla, a partir de plantas madre con alta concentración de glucósidos ubicadas en la Estación Experimental Agropecuaria Bella Vista - Corrientes, del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Celaya *et al.*, 2020).

La infusión de Stevia se preparó haciendo hervir en 250 ml de agua por 10 minutos 2.0 g de hojas secas de estevia trituradas, dejando luego reposar por otros 10 minutos.

III.2.1.2. Grupo 2: Jugo artificial de naranja

Para la preparación de jugo artificial de naranja se utilizaron jugos en polvo de la marca comercial BC La Campagnola®, cuyo marbete indica que 250 ml de la bebida preparada contiene 1,58 g de carbohidratos y los edulcorantes empleados son aspartamo y acesulfame K. Siguiendo las instrucciones del envase, se diluyó un sobre de 10 g en un litro de agua.

III.2.1.3. Grupo 3: Agua corriente

A los integrantes de este grupo se les suministró 250 ml de agua corriente de red.

III.2.1.4. Ingesta de las bebidas

Según el grupo experimental que les correspondiera, se le dio a beber a cada sujeto experimental una taza (250 ml) de infusión de estevia, jugo artificial de naranja o agua corriente.

III.2.2. Extracción de saliva y determinación de alfa-amilasa

salival

A los sujetos de todos los grupos experimentales se les realizaron extracciones de saliva y determinaciones de AAs en tres momentos, siguiendo los tiempos de las pruebas funcionales de absorción intestinal modificada (García Luna & López Gallardo, 2007):

- a. Toma inicial de una muestra de saliva, con ayuno de al menos 3 horas antes.
- b. Toma de muestra de saliva luego de ingerir la infusión de estevia (grupo 1), jugo artificial de naranja (grupo 2) o agua (grupo 3), y un reposo de 60 minutos.
- c. Toma de muestra de saliva luego de ingerir la infusión de estevia (grupo 1), jugo artificial de naranja (grupo 2) o agua (grupo 3), y un reposo de 120 minutos.

Se solicitó a los participantes que se abstuvieran de cepillarse los dientes y hacer ejercicio al menos una hora antes de la recolección. Se advirtió no beber bebidas alcohólicas 18 horas antes de las muestras matutinas. Durante el día de estudio, se aconsejó evitar el consumo de cafeína y mateína, las situaciones estresantes y las emociones. Los días de recolección y medición fueron entre semana con horarios de clases normales, se evitaron los días de exámenes o con exigencias académicas no habituales.

Todas las muestras de saliva se recogieron en un rango horario comprendido entre las 07:00 am y las 10:00 am.

III.2.2.1. Técnica de recolección de saliva (no estimulada)

En esta tesis se empleó el método de recolección de saliva no estimulado mediante salivación pasiva, se instruyó a los sujetos para que se enjuaguen bien la boca antes del ensayo de recolección y que vacíen la boca de saliva, se les indicó luego que se sentaran cómodamente con los ojos abiertos, la cabeza inclinada ligeramente hacia adelante y que descansen durante 5 minutos (Mahvash Navazesh, 1993). Las muestras fueron recolectadas en sesiones por cada individuo, en horario prefijado, utilizando un recipiente de propileno desechable, estéril y con tapa a rosca de 15 ml de capacidad, donde los individuos experimentales depositaron la saliva, luego de acumularla por un período de dos minutos en la boca.

En el laboratorio, cada muestra fue depositada en tubos milimetrados estériles de 15 ml, rotulados con el grupo de estudio, la edad y género del sujeto, y fueron procesadas de manera inmediata. Antes de las determinaciones, las muestras de saliva se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 m.

II 1.2.2. Pruebas de Laboratorio

La actividad de AAs se determinó mediante un kit comercial (Amilasa 405 ®, Wiener lab, Rosario, Argentina), que se basa en la hidrólisis del sustrato 2-cloro-pnitrofenil-a-D-maltosido por el alfa amilasa presente en la muestra para producir 2- cloro-p-nitrofenol el cual se determinó espectrofotométricamente a 405 nm, empleando un Espectrómetro marca Spectrum.

Los valores se expresan en unidades amilolíticas. Amilasa 405 línea líquida AA, es un método cinético a 405 nm para la determinación de amilasa en suero, plasma u orina y saliva, sustrato CNPG3.

Se siguieron las especificaciones del kit comercial (Amilasa 405 ®) para el procedimiento de medición:

Reactivos

Reactivo A: solución conteniendo CNP-G3 2,25 mmol/l, cloruro de calcio 5 mmol/l, cloruro de sodio 70 mmol/l, tiocianato de potasio 900 mmol/l y buffer MES pH 6, 100 mmol/l. Listo para usar. Estable en refrigerador (2-10 °C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

Condiciones de reacción

- Longitud de onda: 405 nm
- Temperatura de reacción: 25, 30 ó 37°C
- Tiempo de reacción: 2 minutos

Procedimiento

Se siguieron las instrucciones del producto para una temperatura de reacción de 25-30 °C, que son las siguientes:

En una cubeta mantenida a 25-30 °C, colocar:

Reactivo A	2 ml
Pre incubar	3-4 minutos
Luego agregar	Muestra 100 ul

Mezclar inmediatamente y leer absorbancia luego de 1 y 2 minutos. Determinar la diferencia entre la segunda y la primera lectura. Utilizar este valor para los cálculos.

Cálculo de los valores

Amilasa (U/L) = AA/min x factor*

Temperatura	Reactivos A	Muestra	Factor
25-30o C	2 ml	100 ul	1.628
	1 ml	50 ul	1.628

*los factores están calculados de acuerdo con la siguiente fórmula general:

$$\text{Factor} = \frac{VT}{VM \times b \times s_{CNP} \times 10^3} r$$

Donde:

VT: volumen total

VM: volumen de muestra

b: paso óptico

s_{CNP} : coeficiente de absorbividad milimolar del CNP

10^3 : factor de conversión (absorbividad milimolar a micromolar)

La unidad internacional (UI) es la cantidad de enzima que convierte 1 micromol de sustrato por minuto, en condiciones estándar. La concentración se expresa en unidades por litro (U/L).

Las determinaciones se realizaron en el Laboratorio de Investigaciones Científicas de la Facultad de Odontología de la UNNE.

III.2.3. Variables estudiadas

Se anotaron en la ficha de historia clínica y posteriormente se volcaron a una base de datos las siguientes variables:

III.2.3.1. Variable independiente

La variable experimental o independiente estuvo constituida por el grupo experimental:

Grupo experimental:

Grupo 1: Ingesta de infusión de estevia.

Grupo 2: Ingesta de jugo artificial de naranja.

Grupo 3. Ingesta de agua.

III.2.3.2. Variables dependientes

Las variables respuesta o dependientes fueron tres y corresponden a los contenidos de AAs en los tres momentos de medición:

AAs basal: contenido de AAs previa al consumo de bebidas. Variable cuantitativa expresada en U/L.

AAs 1H: contenido de AAs a los 60 minutos del consumo de bebidas. Variable cuantitativa expresada en U/L.

AAs 2H: contenido de AAs a los 120 minutos del consumo de bebidas. Variable cuantitativa expresada en U/L.

Estas variables fueron categorizadas en tres rangos, teniendo en cuenta los valores del primer (Q1) y tercer (Q3) cuartil, en valores bajos de AAs (< Q1), medios de AAs (entre Q1 y Q3) y altos (> Q3).

III.2.3.3. Variable interviniente

Se consignaron, además, una variable interviniente por considerarla un factor que podría influir sobre la variable respuesta.

Edad: se registró la edad de los pacientes en años.

III.2.4. Análisis estadísticos

En primer lugar, a fin de estudiar el comportamiento general de los datos, se realizó un análisis exploratorio, de manera gráfica mediante gráficos de caja y de densidad de puntos, y analítica a través del cálculo de medidas descriptivas de posición y de dispersión.

Cuando se dispone de información sobre una variable medida en los individuos de una muestra, es posible calcular algunos valores, denominados estimadores o estadísticos, que permiten describir el comportamiento de dicha variable. Los estadísticos de posición se refieren a la ubicación de los datos sobre el campo de variación de la variable, los más utilizados son: los valores mínimo y máximo, la media aritmética, la mediana, la moda y los cuartiles 1 y 3. Los estimadores de variación o variabilidad hacen referencia a la forma en que se distribuyen los datos, es decir su mayor o menor heterogeneidad, los más empleados son: desviación estándar, variancia, coeficiente de variación y rango (Perelman *et al.*, 2019).

Los gráficos de caja (Boxplot), tienen por objeto reflejar la forma de las distribuciones de las variables en estudio, dando en un mismo elemento gráfico información acerca de la mediana, la media, los cuantiles 0,05, 0,25, 0,75 y 0,95 y mostrando la presencia, si los hubiere, de valores extremos. Los gráficos de densidad de puntos permiten ver de manera directa donde están los casos efectivamente observados, son muy útiles para visualizar la distribución de las observaciones, especialmente si su número es pequeño (Di Rienzo *et al.*, 2020).

En segundo lugar, se estudiaron las asociaciones entre las variables AAs y edad y las correlaciones entre los valores de AAs basal, en la primera y en la segunda hora, mediante el coeficiente de Correlación de Pearson (r) con un nivel de significancia $\alpha = 0,05$. A fin de visualizar gráficamente las relaciones entre variables se emplearon gráficos de dispersión y matriz de diagramas de dispersión. Los gráficos de dispersión muestran un conjunto de puntos ordenados en el plano por sus coordenadas x e y , se utilizan cuando se quiere visualizar la variación conjunta de dos variables cuantitativas. La matriz de diagramas de dispersión permite producir en un mismo gráfico un conjunto de gráficos de dispersión y es útil para visualizar las relaciones entre un conjunto de variables (Di Rienzo *et al.*, 2020).

Este coeficiente es una medida de la magnitud de la asociación lineal entre dos variables que no depende de las unidades de medida de las variables originales, se define como el cociente entre la variación conjunta de ambas variables y las variaciones individuales de cada una de ellas, asume valores en el intervalo $[-1; 1]$, el signo indica la dirección de la asociación (valores negativos se producen cuando la tendencia promedio indica que si un valor en el par observado es más grande que su media, el otro valor es más pequeño que su media) y el valor numérico establece la intensidad de la asociación, cuanto más cercano a 1 o -1, mayor es dicha intensidad (Perelman *et al.*, 2019).

Con el objetivo de visualizar el comportamiento de los sujetos y las variables en sus diferentes momentos, se realizó un análisis de Componentes Principales y posteriormente se graficaron los individuos y las variables sobre las dos primeras componentes mediante un gráfico Biplot. El análisis de Componentes Principales y los gráficos conocidos como Biplot son técnicas generalmente utilizadas para reducción de dimensión, que permiten examinar todos los datos en un espacio de menor dimensión que el espacio original de las variables. Con el análisis de Componentes Principales se construyen ejes artificiales (componentes principales) que permiten obtener gráficos de dispersión de observaciones y/o variables con propiedades óptimas para la interpretación de la variabilidad y co-variabilidad subyacente. Los biplot permiten visualizar observaciones y variables en un mismo

espacio, así es posible identificar asociaciones entre observaciones, entre variables y entre variables y observaciones (Cuadras, 2010; Di Rienzo *et al.*, 2020).

Con la finalidad de estudiar la curva de AAs a través del tiempo, se realizaron Análisis de Regresión entre los momentos de extracción de saliva y el contenido de AAs en cada uno de los grupos experimentales. El Análisis de Regresión permite estudiar la relación funcional entre una variable respuesta Y (variable dependiente) y una o más variables regresoras x (variables independientes o predictoras). Mediante la regresión se estudia cómo los cambios en la/s variable/s predictor/a/s afectan a la variable respuesta, mediante el ajuste de un modelo para la relación funcional entre ambas (Perelman *et al.*, 2019).

A los efectos de comprobar si existe efecto del grupo experimental sobre los valores de AAs, se realizaron Análisis de la Variancia y posteriores Pruebas de F, con un nivel de significancia $\alpha = 0,05$. Estas herramientas permiten probar la hipótesis sobre la igualdad de las medias de la variable aleatoria entre grupos o, expresado de otra manera, la existencia de efecto grupo. Se asume que se dispone de muestras independientes, cada una desde una población o distribución. La prueba puede ser vista como una herramienta para la comparación de medias en seis poblaciones (Perelman *et al.*, 2019).

Con el fin de determinar si las frecuencias con que se presentaron las categorías de AAs en los tres momentos de medición se encuentran vinculadas con el grupo experimental, se realizaron pruebas de Independencia mediante el estadístico Chi-Cuadrado, a través de la construcción de tablas de contingencia, (formas tabulares de presentar datos categorizados) útiles para el análisis simultáneo de dos o más variables categorizadas, esto es variables en las cuales la escala de medida consiste en un conjunto de categorías, las que permitieron probar las hipótesis referidas a la independencia entre las variables que definen las filas y las columnas de la tabla y comprobar la ocurrencia de frecuencias esperadas bajo esa hipótesis de Independencia mediante el cálculo del estadístico Chi-Cuadrado y los valores p de las pruebas de hipótesis respectivas (Di Rienzo *et al.*, 2020).

Los análisis estadísticos fueron realizados mediante el Software InfoStat versión 2020 (Di Rienzo *etal.*, 2020).

III. 3. BIBLIOGRAFÍA

1. Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., González L., Tablada M., Robledo C.W. (2020). InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
2. Hernández Sampieri, R.; Fernández Collado, C.; Baptista Lucio, M.P. (2014). Metodología de la Investigación. Me Graw Hill/ Interamericana Editores. ISBN: 978-1-4562-2396-0.
3. Hernández Sampieri, R.; Mendoza Torres, C.P. (2018). Metodología de la Investigación. Las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta. Me Graw Hill Interamericana Editores. México. ISBN: 978-1-4562-6096-5.
4. Hernández, C.E.; Carpió, N. (2019). Introducción a los tipos de muestreo. Alerta. 2 (1): 75-79. DOI <https://doi.org/10.5377/alerta.v2i1.7535>
5. Navazesh, M. (1993). *Methods for Collecting Saliva*. 694(none), 72-77. doi:10.1111/j.1749-6632.1993.tb18343.x
6. Perelman, S.B.; Garibaldi, L.A.; Tognetti, P.M. (2019). Experimentación y Modelos Estadísticos. Ed. Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires. 475 pp.
7. Celaya, L.; Taiariol, D.; Valle, S.; Kolb Koslobsky, N. (2020). Glicósidos de esteviol y compuestos fenólicos en infusiones de *Stevia rebaudiana* dependiendo de la variedad. RECyT. 33 (1): 76-84.
8. García Luna, P.P.; López Gallardo, G. (2007). Evaluación de la absorción y metabolismo intestinal. Nutr. Hosp. 22 (Suppl 2): 05-13. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112007000500002&lng=es.
- 9.

10. Cuadras, CM. 2010. *Métodos de Análisis Multivariante*. CMC Editions.
Manacor 30. 08023 Barcelona, España. 278 pp.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este Capítulo se presentan los resultados obtenidos, los que son discutidos a la luz de los antecedentes.

IV. 1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

IV.1.1. Edad

En la Figura 4.1 se presenta un gráfico de densidad de puntos de las edades de los sujetos que integraron la muestra.

34-

30-

-§ 27-
ID

23-

19.

Figura 4.1. Gráfico de densidad de puntos de las edades de los sujetos de la muestra

Las edades de los sujetos integrantes de la muestra oscilaron entre un mínimo de 20 y un máximo de 33 años, con un promedio de 22,32 años, el 50% de los

sujetos presentó edades inferiores a 22 años, el 25% inferiores a 21 años y el 75% inferiores a 23 años. La variabilidad de los datos es baja, con un rango de 13 años, una desviación estándar de 1,94 años y un coeficiente de variabilidad de 8,67%. Se observa una leve asimetría positiva, lo que se evidencia por el valor de su coeficiente igual a 2,81 y por la presencia de algunos valores desplazados hacia arriba y un valor extremo como se puede observar en el gráfico de densidad de puntos de la Figura 4.1, tal como lo indican Di Rienzo *et al.* (2020).

IV.1.2. Análisis por grupo experimental

En la Tabla 4.1. se presentan las medidas descriptivas y en la Figura 4.2. los gráficos de densidad de puntos de la edad por grupo experimental.

Tabla 4.1. Medidas descriptivas de la edad por grupo experimental (Me: promedio aritmético, DE: desviación estándar, CV coeficiente de variación, Mín: mínimo, Máx: máximo, Md: mediana, Q1: cuartil 1, Q3: cuartil 3, As: asimetría)

Grupo	Me	DE	CV	Mín	Máx	Md	Q1	Q3	As
1	21,75	1,33	6,13	20	24	21	21	23	0,51
2	22,40	1,35	6,04	20	24	23	21	23	-0,40
3	22,80	2,73	11,96	20	33	23	21	23	2,90

34-1

30-

23-

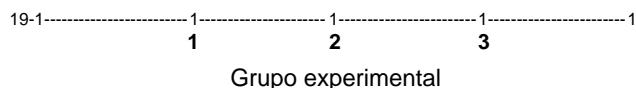


Figura 4.2. Gráfico de densidad de puntos de la edad por grupo experimental

Se observan algunas diferencias entre los grupos, que fundamentalmente se presentan en el Grupo 3, que muestra variaciones en algunas medidas de posición y de dispersión, como así también asimetría más marcada que los otros dos, pero el Análisis de la Variancia entre grupos y la posterior prueba de F arrojó un estadístico $F = 1,53$ con un p -valor = 0,2261, lo que indica que no existen diferencias entre las edades de los sujetos asignados a los 3 grupos, confirmando la validez interna de la muestra en relación con la homogeneidad de los sujetos asignados a cada grupo experimental, de acuerdo con lo establecido por Flernández Sampieri & Mendoza Torres (2018).

IV.2. ASOCIACIONES ENTRE VARIABLES

IV.2.1. Asociación entre el contenido de alfa-amilasa salival y la edad

En la Tabla 4.2 se presentan los Coeficientes de Correlación de Pearson entre los contenidos de AAs en los diferentes momentos de medición y la edad de los sujetos.

Tabla 4.2. Coeficientes de Correlación de Pearson entre los contenidos de AAs en los diferentes momentos de medición y la edad de los sujetos

Variable (1)	Variable (2)	Coeficiente r	p-valor	
Edad	Basal	-0,14	0,2763	NS
Edad	Primera Hora	-0,01	0,9359	NS
Edad	Segunda Hora	0,06	0,6423	NS

NS indica sin significancia estadística ($p > 0,05$)

Como se puede observar, las asociaciones de los contenidos de AAs en cualquiera de los momentos de medición con la edad son muy débiles (Coeficientes r entre 0,01 y 0,14) y resultan estadísticamente no significativos, lo que indica que no existe relación entre la edad del sujeto y los contenidos de AAs, aunque estos resultados pueden estar influenciados por el bajo rango que presentaron las edades de los sujetos, según las interpretaciones de las medidas descriptivas indicadas por Perelman *et al.* (2019).

Estos resultados pueden interpretarse teniendo en cuenta lo reportado por Rohleder & Nater (2009), que las concentraciones báseales de AAs son muy bajas hasta indetectables en niños recién nacidos y continuamente se van incrementando hasta alcanzar los valores de un adulto cuando el niño llega a los tres años de vida y a partir de ahí se puede suponer que se estabilizan los valores y no existen variaciones en los contenidos de AAs en relación con la edad.

IV.2.2. Asociaciones entre los contenidos de alfa-amilasa salival en los diferentes momentos

En la Figura 4.3. se presenta la matriz de diagramas de dispersión que muestra las asociaciones entre los contenidos de a-amilasa salival en los diferentes momentos y en la Tabla 4.3 los Coeficientes de Correlación de Pearson entre los contenidos de AAs en los diferentes momentos de medición.

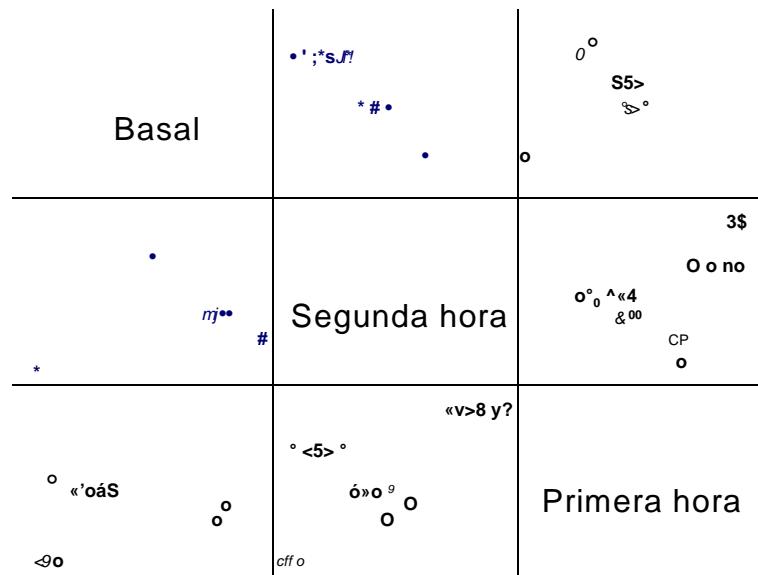


Figura 4.3. Matriz de diagramas de dispersión entre los contenidos de a-amilasa salival en los diferentes momentos

Las nubes de puntos que relacionan los contenidos de AAs basal, primera hora y segunda hora forman elipses con pendiente positiva y diámetro menor angosto, lo que indica una asociación estrecha entre dichas variables, según lo que establecen Perelman *et al.* (2019).

Tabla 4.3. Coeficientes de Correlación de Pearson entre los contenidos de AAs en los diferentes momentos de medición

Variable (1)	Variable (2)	Coeficiente r	p-valor	
Basal	Primera hora	0,83	<0,0001	*
Basal	Segunda hora	0,56	<0,0001	*
Primera hora	Segunda hora	0,72	<0,0001	*

* Indica significancia estadística ($p < 0,05$)

Como se puede observar en la tabla precedente los contenidos de AAs en los diferentes momentos se encuentran asociados de manera significativa. Estas asociaciones son todas directas o positivas, lo cual indica que al aumentar el contenido de AAs basal también lo hacen los contenidos de AAs a los 60 y a los 120 minutos. La fuerza de la asociación es mayor entre el contenido de AAs basal y a los 60 minutos, seguido de el contenido de AAs a los 60 minutos con el de los 120 minutos y, finalmente, la asociación menos estrecha se presenta entre el contenido de AAs basal y a los 120 minutos.

Estas asociaciones de los contenidos de AAs durante las dos primeras horas luego de la ingesta de líquidos, que resultaron significativas pero con valores de r descendentes a medida que se alejan los momentos de registro, estarían indicando una disminución de la correlación entre los contenidos de AAs en el tiempo, se podrían interpretar como la variación normal diaria de las concentraciones de esta enzima de acuerdo con los resultados de Araya *et al.* (2015), quienes encontraron un patrón ascendente de la actividad de AAs durante el día, o bien, contrariamente a lo reportado por estos autores se podría deber a variaciones de dichos contenidos luego de la ingesta de líquidos.

IV.2.3. Resultados del análisis conjunto

Con la finalidad de obtener una visión general del comportamiento de las variables estudiadas, se realizó un Análisis de Componentes Principales y un gráfico Biplot que se presenta en la Figura 4.4, donde se pueden observar conjuntamente los sujetos y las variables estudiadas.

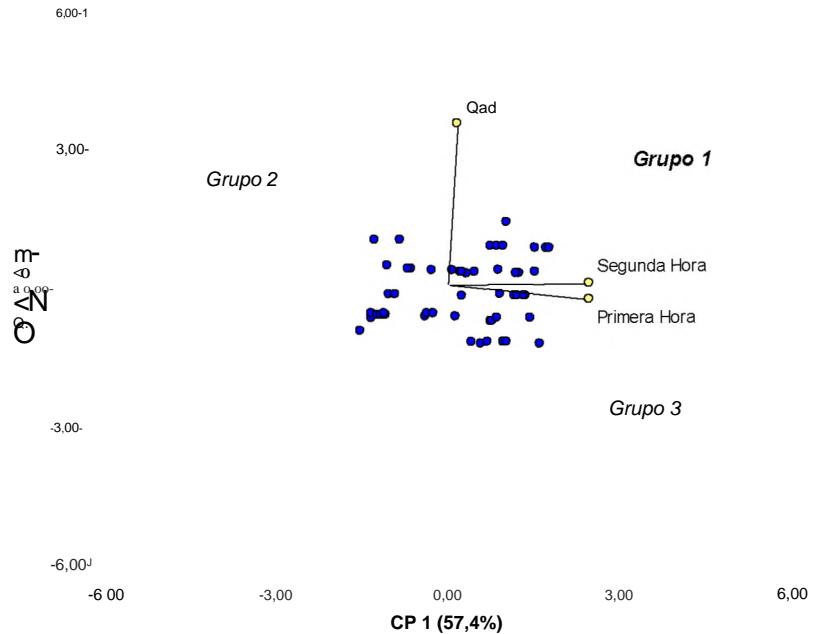


Figura 4.4. Biplot resultante del Análisis de Componentes Principales

El Análisis de Componentes Principales logra reducir la dimensión de los datos manteniendo el 90,8% de la información (57,4% en la componente 1 y el 33,4% en la componente 2). Se observa una separación de las observaciones sobre la componente 1 (eje horizontal), fundamentalmente por los contenidos de AAs de primera hora y segunda hora. En la nube de puntos los sujetos correspondientes al Grupo 1 se ubican arriba y a la derecha y los del Grupo 3, ambos asociados a mayores contenidos de AAs segunda hora y primera hora, mientras que los del Grupo 2 se encuentran mayormente concentrados a la izquierda del gráfico. La segunda componente viene dada principalmente por la edad de los sujetos, pero no guarda relación con los grupos experimentales.

IV.3. CONTENIDOS DE ALFA-AMILASA SALIVAL BASAL, A LOS 60 Y 120 MINUTOS

IV.3.1. En general

En este punto se presentan los valores de AAs en la totalidad de los sujetos de la muestra ($n = 60$). En la Tabla 4.4 se observan las medidas descriptivas y en la Figura 4.5 los gráficos de caja de las variables a-amilasa salival basal, a los 60 minutos y a los 120 minutos.

Tabla 4.4. Medidas descriptivas de los contenidos de a-amilasa salival basal, a los 60 minutos (primera hora) y 120 minutos (segunda hora) (Me: promedio aritmético, DE: desviación estándar, CV coeficiente de variación, Mín: mínimo, Máx: máximo, Md: mediana, Q1: cuartil 1, Q3: cuartil 3, As: asimetría)

Variable	Me	DE	CV	Mín	Máx	Md	Q1	Q3	As
AAs basal	39.034,55	11.767,74	30,15	8.414	50.896	43.735,0	36.320	46.421	-1,69
AAs primera hora	38.303,05	13.010,05	33,97	8.337	53.340	43.702,0	28.958	48.224	-1,09
AAs segunda hora	32.630,07	11.832,88	36,26	7.341	50.653	34.460,5	23.875	42.089	-0,55

Nota: los valores están expresados en U/L

Los contenidos de AAs basal oscilaron entre un mínimo de 8.414 U/L (Mín) y un máximo de 50.896 U/L (Máx), con un promedio de 39.034,55 U/L (Me), el 50% de los sujetos presentó valores inferiores a 43.735 U/L (Md), el 25% inferiores a 36.320 U/L (Q1) y el 75% inferiores a 46.421 U/L (Q3). La variabilidad de los datos es alta, con un rango de 42.482 U/L (Máx-Mín), una desviación estándar de 11.767,74 U/L (DE) y un coeficiente de variabilidad de 30,15% (CV). Se observa una asimetría negativa, lo que se evidencia por el valor de su coeficiente igual a -1,69 y por la presencia de mayor concentración en valores altos y algunas observaciones desplazadas hacia valores bajos.

Los contenidos de AAs primera hora oscilaron entre un mínimo de 8.337 U/L (Mín) y un máximo de 53.340 U/L (Máx), con un promedio de 38.303,05 U/L (Me), el 50% de los sujetos presentó valores inferiores a 43.702 U/L (Md), el 25% inferiores a 28.958 U/L (Q1) y el 75% inferiores a 48.224 U/L (Q3). La variabilidad de los datos es alta, con un rango de 45.003 U/L (Máx-Mín), una desviación

estándar de 13.010,05 U/L (DE) y un coeficiente de variabilidad de 33,97% (CV). Se observa una asimetría negativa, lo que se evidencia por el valor de su coeficiente igual a -1,09 y por la presencia de mayor concentración en valores altos y algunas observaciones desplazadas hacia valores bajos.

Los contenidos de AAs segunda hora oscilaron entre un mínimo de 7.341 U/L (Mín) y un máximo de 50.653 U/L (Máx), con un promedio de 32.630,07 U/L (Me), el 50% de los sujetos presentó valores inferiores a 34.460,50 U/L (Md), el 25% inferiores a 23.875 U/L (Q1) y el 75% inferiores a 42.089 U/L (Q3). La variabilidad de los datos es alta, con un rango de 43.312 U/L (Máx-Mín), una desviación estándar de 11.832,88 U/L (DE) y un coeficiente de variabilidad de 36,26% (CV). Se observa una leve asimetría negativa, lo que se evidencia por el valor de su coeficiente igual a -0,55 y por la presencia de algunas observaciones desplazadas hacia valores bajos.

Estos valores se encuentran por debajo de los rangos descriptos como normales por otros autores (Martínez Pintor *et al.*, 2014; Nater & Rohler, 2009).

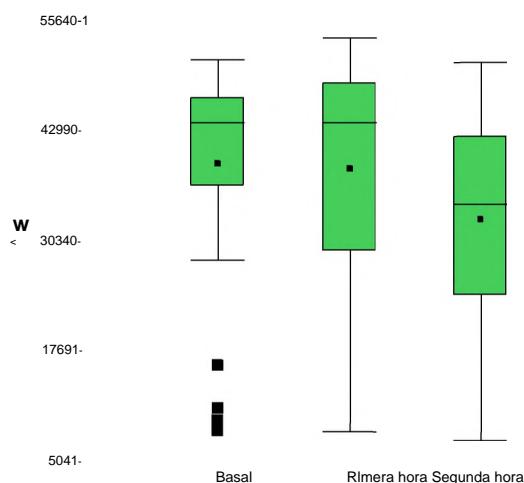


Figura 4.5. Gráficos de caja del contenido de a-amilasa salival por momentos de medición

Como se deduce de las medidas descriptivas presentadas y de los gráficos de caja precedentes, los valores de AAs van descendiendo luego de la ingesta de líquidos, variación que es más marcada entre la primera y la segunda hora.

IV.3.2. Por grupo experimental

En este punto se presentan el análisis exploratorio de los contenidos de AAs por grupo experimental.

En la Tabla 4.5 se presentan las medidas descriptivas y en la Figura 4.6 los gráficos de caja de las variables a-amilasa salival basal, a los 60 minutos y a los 120 minutos.

Tabla 4.5. Medidas descriptivas de los contenidos de a-amilasa salival basal, a los 60 minutos (primera hora) y 120 minutos (segunda hora) (Me: promedio aritmético, DE: desviación estándar, CV coeficiente de variación, Mín: mínimo, Máx: máximo, Md: mediana, Q1: cuartil 1, Q3: cuartil 3, As: asimetría)

Grupo	Aas	Me	DE	CV	Mín	Máx	Md	Q1	Q3	As
1	Basal	39.883,95	11.797,80	29,58	8.964	48.352	44.705,5	36.470	47.256	-1,95
	Primera hora	39.737,15	13.869,49	34,90	8.427	53.340	45.603,0	28.135	50.230	-1,19
	Segunda hora	33.401,40	13.704,01	41,03	7.341	50.653	34.460,5	22.941	43.499	-0,64
2	Basal	37.882,45	11.957,62	31,57	9.335	47.241	42.174,5	35.320	44.175	-1,78
	Primera hora	35.438,45	15.041,46	42,44	8.352	51.717	42.661,5	23.126	47.429	-0,67
	Segunda hora	32.310,40	11.407,42	35,31	9.092	48.510	33.608,5	23.244	40.168	-0,62
3	Basal	39.337,25	12.066,07	30,67	8.414	50.896	44.459,0	30.003	46.234	-1,67
	Primera hora	39.733,55	9.697,25	24,41	8.337	49.541	43.024,0	36.451	45.954	-1,94
	Segunda hora	32.178,40	10.766,24	33,46	8.900	48.525	33.098,0	26.499	41.328	-0,53

Nota: los valores están expresados en U/L

Grupo 1

Los contenidos de AAs basal oscilaron entre un mínimo de 8.964 U/L (Mín) y un máximo de 48.352 U/L (Máx), con un promedio de 39.883,95 U/L (Me), el 50% de los sujetos presentó valores inferiores a 44.705,5 U/L (Md), el 25% inferiores a 36.470 U/L (Q1) y el 75% inferiores a 47.256 U/L (Q3). La variabilidad de los datos es alta, con un rango de 39.388 U/L (Máx-Mín), una desviación estándar de 11.797,80 U/L (DE) y un coeficiente de variabilidad de 29,58% (CV). Se observa

una asimetría negativa, lo que se evidencia por el valor de su coeficiente igual a -1,95 y por la presencia de mayor concentración en valores altos y algunas observaciones desplazadas hacia valores bajos.

Los contenidos de AAs primera hora oscilaron entre un mínimo de 8.427 U/L (Mín) y un máximo de 53.340 U/L (Máx), con un promedio de 39.737,15 U/L (Me), el 50% de los sujetos presentó valores inferiores a 45.603 U/L (Md), el 25% inferiores a 28.135 U/L (Q1) y el 75% inferiores a 50.230 U/L (Q3). La variabilidad de los datos es alta, con un rango de 44.913 U/L (Máx-Mín), una desviación estándar de 13.869,49 U/L (DE) y un coeficiente de variabilidad de 34,90% (CV). Se observa una asimetría negativa, lo que se evidencia por el valor de su coeficiente igual a -1,19 y por la presencia de mayor concentración en valores altos y algunas observaciones desplazadas hacia valores bajos.

Los contenidos de AAs segunda hora oscilaron entre un mínimo de 7.341 U/L (Mín) y un máximo de 50.653 U/L (Máx), con un promedio de 33.401,40 U/L (Me), el 50% de los sujetos presentó valores inferiores a 34.460,50 U/L (Md), el 25% inferiores a 22.941 U/L (Q1) y el 75% inferiores a 43.499 U/L (Q3). La variabilidad de los datos es alta, con un rango de 43.312 U/L (Máx-Mín), una desviación estándar de 13.704,01 U/L (DE) y un coeficiente de variabilidad de 41,03% (CV). Se observa una leve asimetría negativa, lo que se evidencia por el valor de su coeficiente igual a -0,64 y por la presencia algunas observaciones desplazadas hacia valore bajos.

Grupo 2

Los contenidos de AAs basal oscilaron entre un mínimo de 9.335 U/L (Mín) y un máximo de 47.241 U/L (Máx), con un promedio de 37.882,45 U/L (Me), el 50% de los sujetos presentó valores inferiores a 42.174,5 U/L (Md), el 25% inferiores a 35.320 U/L (Q1) y el 75% inferiores a 44.175 U/L (Q3). La variabilidad de los datos es alta, con un rango de 37,906 U/L (Máx-Mín), una desviación estándar de

11.957,62 U/L (DE) y un coeficiente de variabilidad de 31,57% (CV). Se observa una asimetría negativa, lo que se evidencia por el valor de su coeficiente igual a -1,78 y por la presencia de mayor concentración en valores altos y algunas observaciones desplazadas hacia valores bajos.

Los contenidos de AAs primera hora oscilaron entre un mínimo de 8.352 U/L (Mín) y un máximo de 51.717 U/L (Máx), con un promedio de 35.438,45 U/L (Me), el 50% de los sujetos presentó valores inferiores a 42.661,5 U/L (Md), el 25% inferiores a 23.126 U/L (Q1) y el 75% inferiores a 47.429 U/L (Q3). La variabilidad de los datos es alta, con un rango de 43.365 U/L (Máx-Mín), una desviación estándar de 15.041,46 U/L (DE) y un coeficiente de variabilidad de 42,44% (CV). Se observa una asimetría negativa, lo que se evidencia por el valor de su coeficiente igual a -0,67 y por la presencia de mayor concentración en valores altos y algunas observaciones desplazadas hacia valores bajos.

Los contenidos de AAs segunda hora oscilaron entre un mínimo de 9.092 U/L (Mín) y un máximo de 48.510 U/L (Máx), con un promedio de 32.310,40 U/L (Me), el 50% de los sujetos presentó valores inferiores a 33.608,50 U/L (Md), el 25% inferiores a 23.244 U/L (Q1) y el 75% inferiores a 40.168 U/L (Q3). La variabilidad de los datos es alta, con un rango de 39.418 U/L (Máx-Mín), una desviación estándar de 11.407,42 (DE) y un coeficiente de variabilidad de 35,31% (CV). Se observa una leve asimetría negativa, lo que se evidencia por el valor de su coeficiente igual a -0,62 y por la presencia algunas observaciones desplazadas hacia valores bajos.

Grupo 3

Los contenidos de AAs basal oscilaron entre un mínimo de 8.414 U/L (Mín) y un máximo de 50.896 U/L (Máx), con un promedio de 39.337,25 U/L (Me), el 50% de los sujetos presentó valores inferiores a 44.459,0 (Md), el 25% inferiores a 30.003 U/L (Q1) y el 75% inferiores a 46.234 U/L (Q3). La variabilidad de los datos es alta,

con un rango de 42.482 U/L (Máx-Mín), una desviación estándar de 12.066,07 U/L (DE) y un coeficiente de variabilidad de 30,67% (CV). Se observa una asimetría negativa, lo que se evidencia por el valor de su coeficiente igual a -1,67 y por la presencia de mayor concentración en valores altos y algunas observaciones desplazadas hacia valores bajos.

Los contenidos de AAs primera hora oscilaron entre un mínimo de 8.337 U/L (Mín) y un máximo de 49.541 U/L (Máx), con un promedio de 39.733,55 U/L (Me), el 50% de los sujetos presentó valores inferiores a 43.024 U/L (Md), el 25% inferiores a 36.451 U/L (Q1) y el 75% inferiores a 45.954 U/L (Q3). La variabilidad de los datos es alta, con un rango de 41.204 U/L (Máx-Mín), una desviación estándar de 9.697,25 U/L (DE) y un coeficiente de variabilidad de 24,41% (CV). Se observa una asimetría negativa, lo que se evidencia por el valor de su coeficiente igual a -1,94 y por la presencia de mayor concentración en valores altos y algunas observaciones desplazadas hacia valores bajos.

Los contenidos de AAs segunda hora oscilaron entre un mínimo de 8.900 U/L (Mín) y un máximo de 48.525 U/L (Máx), con un promedio de 32.178,40 U/L (Me), el 50% de los sujetos presentó valores inferiores a 33.098 U/L (Md), el 25% inferiores a 26.499 U/L (Q1) y el 75% inferiores a 41.328 (Q3). La variabilidad de los datos es alta, con un rango de 39.625 U/L (Máx-Mín), una desviación estándar de 10.766,24 U/L (DE) y un coeficiente de variabilidad de 33,46% (CV). Se observa una leve asimetría negativa, lo que se evidencia por el valor de su coeficiente igual a -0,53 y por la presencia algunas observaciones desplazadas hacia valores bajos.

55590-

-I-r IIIt

42986-

^ 30383-

17779-

51754

2

3

Grupo experimental

i hora Q Segunda hora

Figura 4.6. Gráficos de caja del contenido de a-amilasa salival por momentos de medición para cada grupo experimental

Coincidiendo con las medidas descriptivas ya comentadas, los gráficos de caja indican que los contenidos de AAs en los tres momentos y para todos los grupos experimentales presentan distribuciones asimétricas negativas, con mayores concentraciones en valores altos. Con menores variabilidades en la AAs basal para los grupos experimentales 1 y 2 y mayores en el grupo 3, y una situación inversa para la AAs primera hora, de acuerdo con las interpretaciones indicadas por Di Rienzo *et al.* (2019).

IV.4. MODELIZACIÓN DE LA EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO DE ALFA-AMILASA SALIVAL EN EL TIEMPO

Observada la variación expresada por las medidas descriptivas y los gráficos precedentes, se buscó la relación funcional entre los contenidos de AAs y el tiempo posterior a la ingesta de líquidos, mediante un Análisis de Regresión.

Para poder realizar la modelización de la relación de los contenidos de AAs en el tiempo, en primer lugar, se efectuó la verificación de los supuestos del Análisis de Regresión y luego se definieron los estimadores de los parámetros de los Modelos de Regresión y se probó su significancia.

IV.4.1. Análisis general

En este ítem se presenta el estudio de la evolución en el tiempo del contenido de AAs considerando a los 60 sujetos de la muestra en su conjunto, mediante un Análisis de Regresión, para lo cual previamente se analizó el cumplimiento de los supuestos de éste análisis.

IVA. 1.1. Verificación de supuestos

En primer lugar, se verificó la normalidad de los datos mediante el gráfico Q-Qplot, que se presenta en la Figura 4.7.

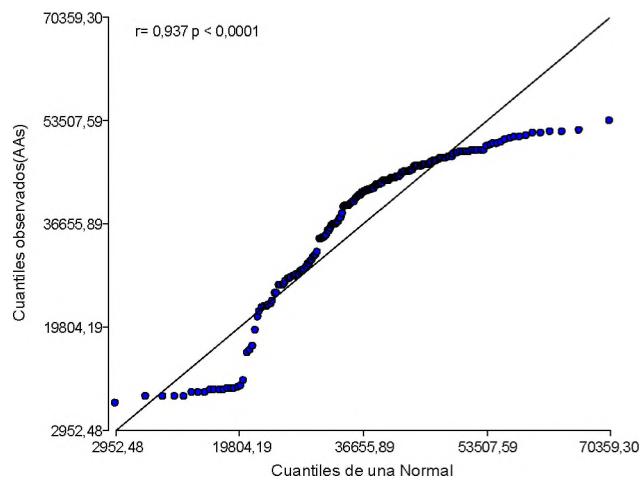


Figura 4.7. Gráfico Q-Qplot de los contenidos de a-amilasa salival

Si bien los puntos observados parecen alejarse de la recta que representa a los cuantiles de la distribución normal, sobre todo en los extremos, el coeficiente de

Correlación de Pearson indica asociación significativa entre los valores observados y los esperados lo que implica un ajuste adecuado según lo establecido por Di Rienzo *et al.* (2019).

La homogeneidad de variancias se verificó mediante el gráfico de valores observados y valores predichos que se presenta en la Figura 4.8.

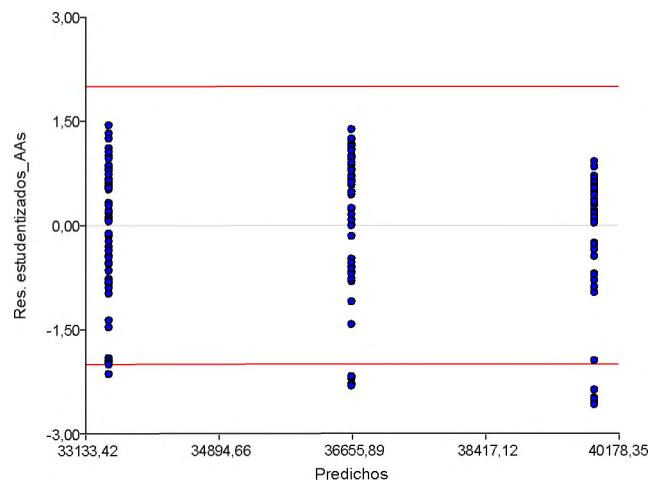


Figura 4.8. Gráfico de residuales vs predichos del contenido de a-amilasa salival en el tiempo

Los residuales forman una banda prácticamente horizontal en relación con los valores predichos y no se observa ningún patrón que haga pensar que las varianzas no son homogéneas en el tiempo, según lo indicado por Di Rienzo *et al.* (2019).

IVA. 1.2. Modelo de Regresión

En la Figura 4.9 se pueden observar las variaciones en el tiempo de los contenidos de AAs.

34071.



Figura 4.9. Evolución del contenido de a-amilasa salival en el tiempo

Como se observa en el gráfico precedente y coincidiendo con las medidas descriptivas ya vistas en el punto anterior, los contenidos de AAs descienden en el tiempo y de manera más brusca entre la primer y segunda hora luego de la ingesta de líquidos.

La forma de la gráfica sugería un modelo no lineal, no obstante los modelos probados (Polinomio de 2do grado, Logístico, Gompertz y Weibull) no resultaron significativos, por lo que siguiendo el criterio de simplicidad que indica la elección de los modelos con menor cantidad de parámetros se optó por un modelo lineal, según recomendaciones de Perelman *et al.* (2019).

En la Tabla 4.6 se presenta el Modelo de Regresión y la prueba de significancia.

Tabla 4.6. Modelo de Regresión y prueba de significancia de los coeficientes

Coeficiente	Estimador	EE	LI (95%)	LS (95%)	T	p-valor
bo	43.060,37	2.413,51	38.297,61	47.823,14	17,84	<0,0001 *
bi	-3.202,24	1.117,24	-5.406,97	-997,51	-2,87	0,0047 *

* Indica significancia estadística ($p < 0,05$)

Ambos coeficientes resultan significativos, lo que indica que la recta de regresión no pasa por el origen de coordenadas ($b_0 = 43.060,37$) es decir en el tiempo cero el contenido de AAs tiene un valor no nulo, y el coeficiente de regresión (b_1) presenta signo negativo, lo que indica que el contenido de AAs disminuye en el tiempo, en este caso disminuye 3.202,24 unidades por cada 60 minutos, de acuerdo con las interpretaciones de los coeficientes de regresión señaladas por Perelman *et al.* (2019).

Estos resultados pueden ser interpretados como semejantes a los de Urs *et al.* (2007), quienes encontraron que la actividad de a-amilasa salival muestra un patrón de perfil diurno distinto con una disminución pronunciada dentro de los 60 minutos posteriores al despertar y un aumento constante de la actividad durante el transcurso del día. En el caso de los sujetos estudiados en esta tesis la disminución pronunciada se observó a los 60 minutos de la ingesta de líquidos. Pero a la vez son contrarios a lo reportado por estos mismos autores quienes establecen que los perfiles diurnos de a-amilasa salival son relativamente robustos contra las influencias momentáneas ya que evidentemente la ingesta de líquidos modifica los contenidos de AAs.

IV.4.2. Relación con el grupo experimental

En este punto se presenta el estudio de la evolución en el tiempo del contenido de a-amilasas salival para los sujetos de cada uno de los grupos experimentales.

En la Figura 4.10 se pueden observar las variaciones en el tiempo de los contenidos de AAs por grupo experimental.

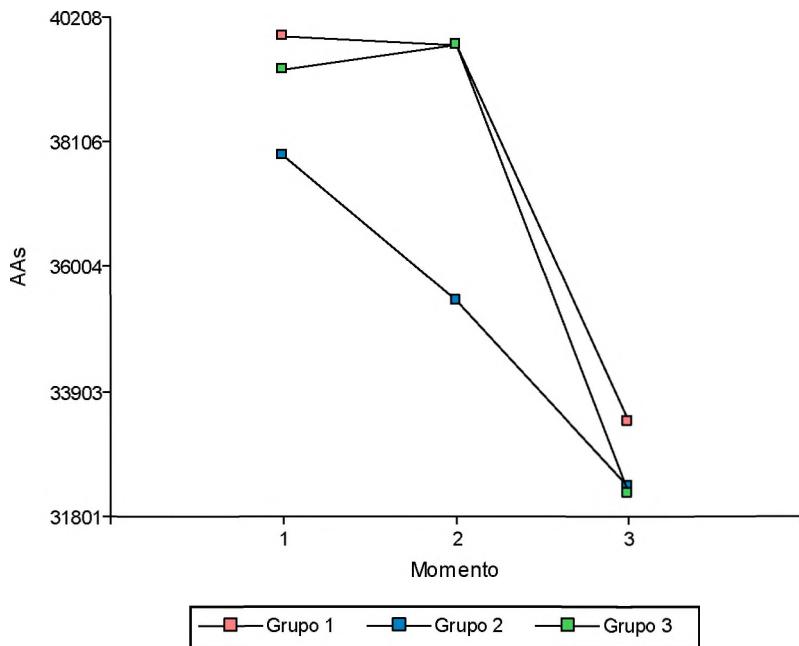


Figura 4.10. Evolución del contenido de a-amilasa salival en el tiempo por grupo experimental

Como se observa en el gráfico precedente, los contenidos de AAs descienden en el tiempo y de manera más brusca entre la primer y segunda hora luego de la ingesta de líquidos. Se puede observar también, que la variación de los contenidos en el grupo que ingirió infusión de estevia (Grupo 1) es similar a la del grupo que ingirió agua corriente (Grupo 3), mientras que los sujetos que consumieron jugo artificial de naranja (Grupo 2) muestran un descenso mucho más brusco de los contenidos de AAs ya en la primera hora luego de la ingesta.

IV.4.2.1. Verificación de supuestos

En primer lugar, se verificó la normalidad de los datos mediante los gráficos Q-Qplot, que se presentan en la Figura 4.11.

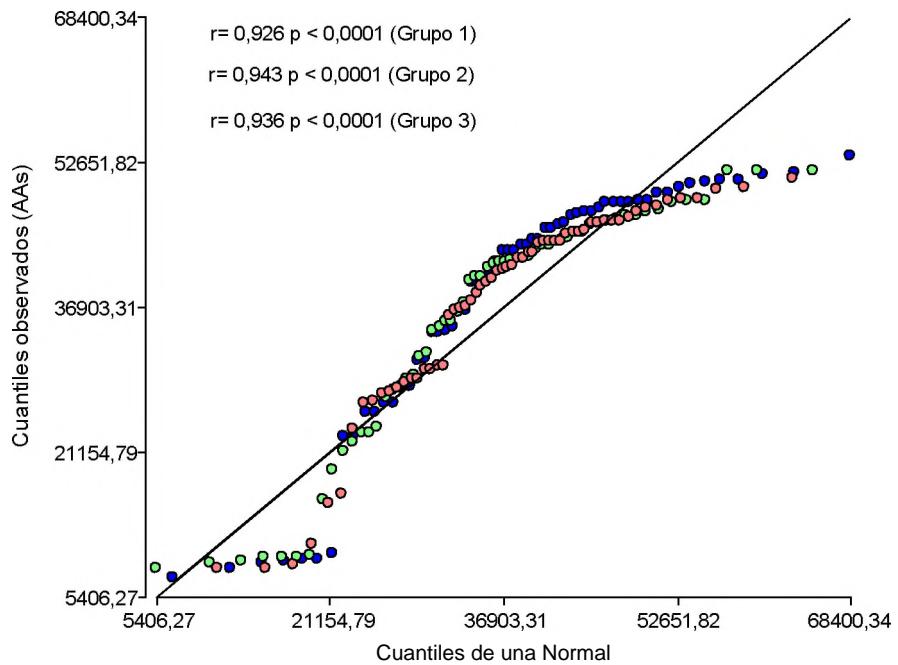


Figura 4.11. Gráfico Q-Qplot de los contenidos de a-amilasa salival

Si bien los puntos observados parecen alejarse de la recta que representa a los cuantiles de la distribución normal, sobre todo en los extremos, los tres coeficientes de Correlación de Pearson indican asociación significativa entre los valores observados y los esperados lo que implica un ajuste adecuado, según lo establecido por Di Rienzo *et al.* (2020).

La homogeneidad de variancias se verificó mediante los gráficos de valores observados y valores predichos que se presentan en la Figura 4.12.

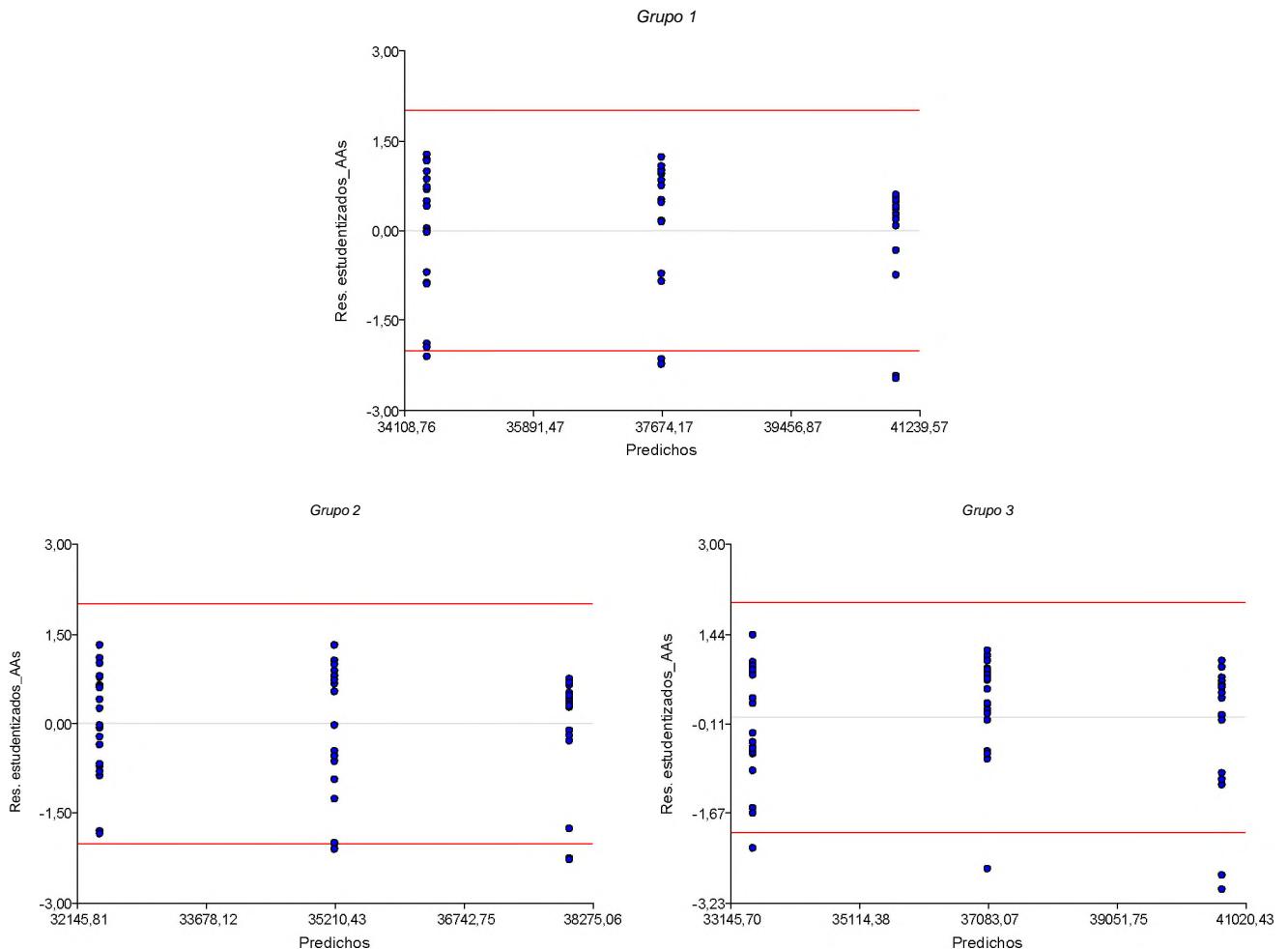


Figura 4.12. Gráfico de residuales vs predichos del contenido de α -amilasa salival en el tiempo por grupo experimental

En los tres gráficos los residuales forman una banda prácticamente horizontal en relación con los valores predichos y no se observa ningún patrón que indique que las varianzas no son homogéneas en el tiempo, de acuerdo con las interpretaciones sugeridas por Di Rienzo *et al.* (2019).

IV.4.2.2. Modelos de Regresión

En la Figura 4.13 se pueden observar los gráficos de dispersión con el ajuste de las rectas de regresión y las bandas de predicción y en la Tabla 4.7 se presentan

los Modelos de Regresión para cada grupo experimental y las pruebas de significancia.

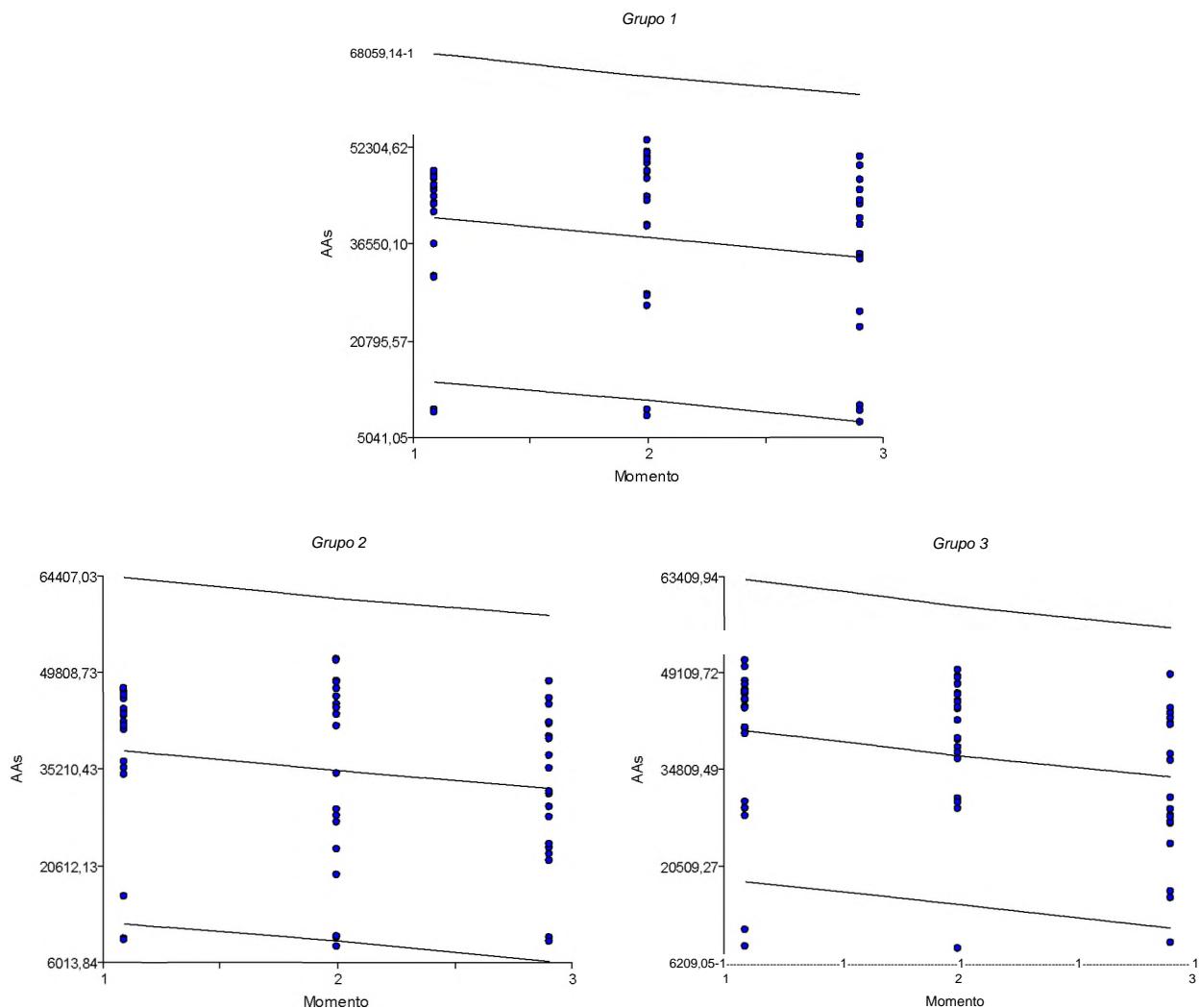


Figura 4.13. Gráficos de dispersión, ajuste de las rectas de regresión y las bandas de predicción

Las rectas de regresión presentan pendientes negativas, con lo que se modela la disminución de los contenidos de AAs en el tiempo. Las bandas de predicción representan los intervalos de confianza para las predicciones para los diferentes momentos de medición, según lo establecido por Perelman *et al.* (2019).

Tabla 4.7. Modelos de Regresión por grupo experimental y pruebas de significancia de los coeficientes

Grupo experimental	Coeficiente	Estimador	EE	LI (95%)	LS (95%)	T	p-valor
1	bo	43.060,37	2.413,51	38.297,61	47.823,14	17,84	<0,0001 *
	bi	-3.202,24	1.117,24	-5.406,97	-997,51	-2,87	0,0047 *
2	bo	40.782,48	4.368,96	32.037,05	49.527,91	9,33	<0,0001 *
	bi	-2.786,03	2.022,44	-6.834,37	1.262,32	-1,38	0,1736 NS
3	bo	44.241,92	3.743,27	36.748,96	51.734,88	11,82	<0,0001 *
	bi	-3.579,43	1.732,8	-7.047,99	-110,86	-2,07	0,0433 *

* Indica significancia estadística ($p < 0,05$)

NS indica sin significancia estadística ($p > 0,05$)

En los Grupos 1 (ingesta de infusión de estevia) y 3 (ingesta de agua corriente) los dos coeficientes resultan significativos, lo que indica que las rectas de regresión no pasan por el origen de coordenadas ($bo = 43.060,37$ en el Grupo 1 y $bo = 44.241,92$ en el Grupo 3) es decir en el tiempo cero los contenidos de a-amilasa salival en los sujetos de estos grupos tienen valores no nulos, y los coeficientes de regresión (bi) presentan signo negativo, lo que indica que el contenido de a-amilasa salival disminuye en el tiempo, en este caso disminuye 3.202,24 unidades por cada 60 minutos en el Grupo 1 y 3.579,43 unidades por cada minuto en el Grupo 3.

En el Grupo 2, por el contrario, se observó significancia en la ordenada al origen ($bo = 40.782,48$) lo que indica que en el momento inicial los contenidos de a-amilasa salival en los sujetos de estos grupos tienen valores no nulos, pero el coeficiente de regresión no resultó estadísticamente significativo ($bi = -2.786,03$) lo que indica que la recta de regresión tiene pendiente nula, por lo que, en los individuos que ingirieron jugo artificial de naranja las variaciones en los contenidos de a-amilasa salival en el tiempo no resultaron significativas.

IV.5. EFECTO DEL GRUPO EXPERIMENTAL

En este apartado se presentan los resultados de los análisis realizados con la finalidad de evaluar si existe efecto del grupo experimental sobre los contenidos de AAs en los tres momentos de medición.

IV.5.1. Análisis de la Variancia

En este punto se presentan los resultados del Análisis de la Variancia, previa comprobación de los supuestos de dicho análisis.

IV.5.1.1. Verificación de supuestos

El supuesto de normalidad ya ha sido verificado previo al Análisis de Regresión, por lo que a continuación se presenta la verificación del supuesto de homogeneidad de variancias, para lo que se realizaron los diagramas de residuos vs grupo experimental, que se presentan en la Figura 4.14.

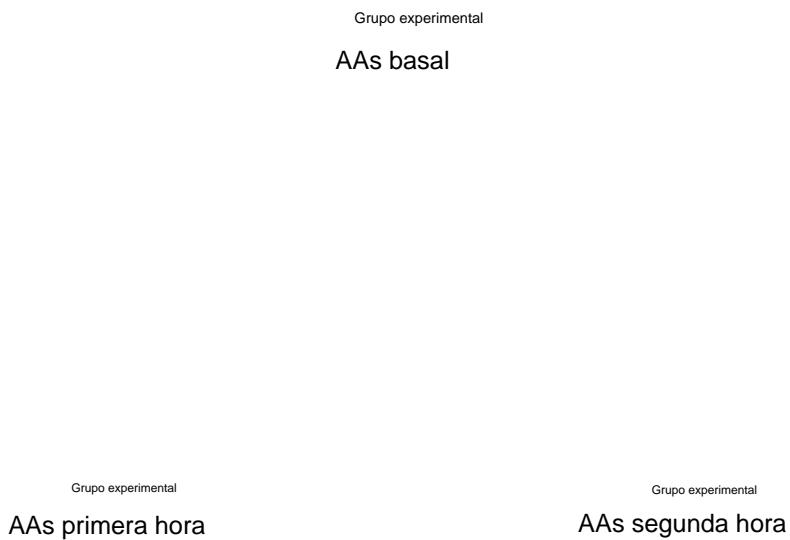


Figura 4.14. Gráficos de residuales por grupo experimental para las variables AAs basal, primera hora y segunda hora

Los residuales forman una banda prácticamente horizontal en relación con los grupos experimentales y no se observa ningún patrón que indique que las varianzas no son homogéneas en el tiempo, según lo establecido por Di Rienzo *et al.* (2020).

IV.5.1.2. Resultados del Análisis de la Variando y pruebas posteriores

En la Tabla 4.8 se presentan los resultados del Análisis de la Variancia, con los estadísticos F y sus correspondientes p-valores.

Tabla 4.8. Valores de los estadísticos F y sus correspondientes p-valores resultantes del

Análisis de la Variancia por grupo experimental

Variable	F	p-valor	
AAs basal	0,15	0,8609	NS
AAs primera hora	0,72	0,4910	NS
Aas segunda hora	0,06	0,9397	NS

NS indica sin significancia estadística ($p > 0,05$)

Ninguno de los estadísticos F resultó significativo, lo que indica que no existe efecto estadísticamente significativo de los grupos experimentales en los contenidos de AAs basal, primera hora y segunda hora.

La no significancia del efecto grupo en la AAs basal permite establecer que la asignación de los sujetos experimentales a los distintos grupos ha sido aleatoria, de manera que se asegura la validez interna de la investigación, de acuerdo con lo establecido por Hernández Sampieri & Mendoza Torres (2018).

El hecho de que no resulte significativa la prueba F para los contenidos de AAs primera hora y segunda hora indica que no se ha podido comprobar efecto de grupo experimental para estas variables, es decir los promedios de AAs no se diferencian entre los individuos que ingirieron infusión de estevia, jugo artificial de naranja o agua corriente, según la interpretación que señalan Perelman *et al.* (2019). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Lim *et al.* (2019) quienes demostraron que los patrones diurnos de AAs no se ven afectados por la ingesta de nutrientes, el sexo, la etnia asiática y el índice de masa corporal.

La explicación de esta falta de efecto significativo puede encontrarse analizando los resultados de Kerimi *et al.* (2018), quienes encontraron que el extracto de hojas de olivo produjo una inhibición débil de la a-amilasa, la que no fue suficiente para modificar los contenidos de azúcar en la sangre cuando se consumía un alimento rico en almidón, lo que sugiere que se requiere una potencia umbral para la inhibición de las enzimas digestivas que se traduzca en efectos *in vivo*, y quizás ese umbral no haya sido alcanzado por baja presencia de compuestos activos en la infusión de estevia empleada.

IV.5.2. Pruebas de Independencia

En las Tabla 4.9 a 4.11. se presentan las frecuencias con que se presentaron valores bajos, medios y altos de AAS basal, primera hora y segunda hora de acuerdo con el grupo experimental al que pertenecía el sujeto.

Tabla 4.9. Frecuencias con que se presentaron valores bajos, medios y altos de AAS basal de acuerdo con el grupo experimental

AAs basal	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Total
Bajo	4	6	5	15
Medio	9	11	10	30
Alto	7	3	5	15
Total	20	20	20	60

La Prueba de Independencia arrojó un estadístico $\chi^2 = 2,2$ con un p-valor = 0,6990 lo que indica que las frecuencias con que se presentan valores de AAs basal bajos, medios o altos no se encuentran relacionadas con los grupos experimentales.

Estos resultados nuevamente permiten confirmar la correcta aleatorización en la asignación de los sujetos a los grupos experimentales, reafirmando la validez interna de la muestra, de acuerdo con lo establecido por Hernández Sampieri & Mendoza Torres (2018).

Tabla 4.10. Frecuencias con que se presentaron valores bajos, medios y altos de AAS primera hora de acuerdo con el grupo experimental

AAs Primera hora	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Total
Bajo	6	7	2	15
Medio	6	9	15	30
Alto	8	4	3	15
Total	20	20	20	60

La Prueba de Independencia arrojó un estadístico $\chi^2 = 9,3$ con un p-valor = 0,0439 lo que indica que las frecuencias con que se presentan valores de AAs primera hora bajos, medios o altos se encuentran relacionadas con los grupos experimentales. Las diferencias se observan principalmente en los Grupos 2 (jugó de naranja artificial) y 3 (agua corriente) donde se observan mayores frecuencias de valores intermedios y menores frecuencias de valores altos y en el Grupo 3 (agua

corriente) con muy baja frecuencia de valores bajos, mientras que el Grupo 1 (infusión de estevia) mantuvo valores medios de AAs en todos los momentos de medición (Perelman *et al.*, 2019).

Tabla 4.11. Frecuencias con que se presentaron valores bajos, medios y altos de AAS segunda hora de acuerdo con el grupo experimental

AAs segunda hora	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Total
Bajo	5	6	4	15
Medio	8	10	12	30
Alto	7	4	4	15
Total	20	20	20	60

La Prueba de Independencia arrojó un estadístico $\chi^2 = 2,4$ con un p-valor = 0,6626 lo que indica que las frecuencias con que se presentan valores de AAs segunda hora, categorizados como bajos, medios o altos no se encuentran asociadas con los grupos experimentales, de acuerdo con lo establecido por Di Rienzo *et al.* (2020).

Los resultados de esta tesis permitieron establecer que la ingesta de jugo artificial de naranja o agua corriente influye sobre las frecuencias de valores bajos, intermedios o altos de AAs a los 60 minutos del momento del consumo, mientras que los sujetos que consumieron infusión de estevia mantuvieron un nivel medio de AAs en el tiempo, lo que estaría indicando un comportamiento diferente de los sujetos considerados controles.

Si bien se sabe que diferentes compuestos vegetales poseen actividad inhibitoria de AAs, esa relación varía con los diferentes compuestos. Barik *et al.* (2019) y Mendoza Meza & Medina Valdés (2015), reportaron que compuestos fenólicos específicos han mostrado efecto inhibitorio sobre el α -amilasa salival, coincidiendo con Sun *et al.* (2019), quienes han comprobado que los polifenoles producen la inhibición de α -amilasa, y han demostrado que el mecanismo se relaciona con las interacciones de unión entre la enzima y los polifenoles. Al analizar los resultados de esta tesis atendiendo estos antecedentes, se considera necesario realizar estudios más profundos de la composición de *Stevia rebaudiana* (Bertoni),

las cantidades ingeridas y el análisis de las curvas de a-amilasa salival con mayores frecuencias de determinación, a los efectos de comprender la interacción entre el consumo de infusión de estevia y la evolución de los contenidos de a-amilasa en saliva, debido a que si este vegetal demuestra *in vivo* su actividad inhibitoria de la AAs podría constituirse en un importante aliado en la lucha contra la obesidad y la diabetes, de acuerdo con lo establecido por Shah *et al.* (2022), quienes encontraron incrementos considerables en los contenidos de AAs en pacientes diabéticos comparados con individuos sanos.

Por otro lado, los resultados de Pairazamán García (2021), han demostrado, *in vitro*, que los extractos 70° etanólicos de *S. rebaudiana* (Bertoni) presentan efecto inhibitorio sobre los factores de virulencia cariogénica de *Streptococcus mutans* y que dicho efecto está directamente relacionado con la concentración de los extractos. También es necesario tener en cuenta lo reportado por Usha *et al.* (2017), quienes evaluaron el efecto anticariogénico del extracto al 0,5% de hojas de *S. rebaudiana* (Bertoni) usada como enjuague bucal en pacientes con alto riesgo de caries y encontraron que el uso del extracto de estevia mejoró el pH y la capacidad amortiguadora de la saliva, y redujo los organismos cariogénicos en la saliva. Al analizar los resultados de esta tesis teniendo en cuenta la actividad demostrada de los extractos de estevia sobre los factores que contribuyen a la formación de caries, se abren nuevos interrogantes respecto de las posibilidades de este vegetal, no solo como sustituto natural de los azúcares, sino también como protector de la salud bucal.

IV. 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Hernández Sampieri, R.; Mendoza Torres, C.P. (2018). Metodología de la Investigación. Las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta. Me Graw Hill Interamericana Editores. México. ISBN: 978-1-4562-6096-5.
2. Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., González L., Tablada M., Robledo C.W. (2020). InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia

InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL

<http://www.infostat.com.ar>

3. Perelman, S.B.; Garibaldi, L.A.; Tognetti, P.M. (2019). Experimentación y Modelos Estadísticos. Ed. Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires. 475 pp.
4. Martínez Pintor, F.; Fusté Escolano, A.; Ruiz Rodríguez, J.; Cuatrecasas Ardid, J.; Reig Gurlot, A. (2014). Niveles de a-Amilasa seriada salival en mujeres con fibromialgia. Cuadernos de Medicina Psicosomática y Psiquiatría de Enlace Revista Iberoamericana de Psicosomática. 110: 18-24.
5. Nater, U.M.; Rohleder, N. (2009). Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: Current State of research. Psychoneuroendocrinology. 34: 486-496.
6. Araya, S.; Cataldo, R.; Calderón, C.; Weisstaub, G.; Parada, J.; Flodgson, M.I.; Santos, J.L. (2014). Cortisol y amilasa salival en niñas: variación según la curva diurna, la ingesta de alimentos y la actividad física. Rev. Chil. Endocrinol. Diabetes. 8 (1): 8-13.
7. Sun, L.; Warren, F.J.; Gidley, M.J. 2019. Natural producís for glycaemic control: Polyphenols as inhibitors of alpha-amylase, Trends in Food Science & Technology, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.009>.
8. Asimina Kerimi, A.; Nyambe-Silavwe, H.; Pyner, A.; Oladele, E.; Gauer, J.S.; Stevens, Y.; Williamson, G. (2019). Nutritional implications of olives and sugar: attenuation of postprandial glucose spikes in healthy volunteers by inhibition of sucrose hydrolysis and glucose transport by oleuropein. European Journal of Nutrition. 58:1315-1330.
<https://doi.org/10.1007/s00394-018-1662-9>.
9. Barik, S.K.; Russell, W.R.; Moar, K.M.; Cruickshank, M.; Scobbie, L.; Duncan, G.; Floggard, N. (2019). The anthocyanins in black currants regulate postprandial hyperglycaemia primarily by inhibiting a-glucosidase while other phenolics modulate salivary a-amylase, glucose uptake and sugar transporters, The Journal of Nutritional Biochemistry. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.108325>.

10. Mendoza Meza, D.L.; Medina Valdés, R. (2015). Inhibición in vitro de las enzimas alfa-amilasa y lipasa pancreática por fracciones fenólicas de extractos etanólicos de hojas de Yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl). *Avances en Química*. 10 (1): 33-40.
11. Pairazamán García, J.L. 2021. Efecto *in vitro* del extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* sobre los factores de virulencia cariogénicos de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Tesis para optar al Grado Académico de Doctor en Estomatología. Universidad Nacional de Trujillo. Perú.
12. Sales, P.M. de; Souza, P.M. de; Simeoni, L.A.; Olivera Magalháes, P. de; Silveira, D. (2012). a- Amilase Inhibitors: A Review of Raw Material and Isolate Compounds from Plant Source. *J Pharm Pharmaceut Sci.* 15 (1): 141-183.
13. Shah, V.S.; Pareikh, D., Manjunatha, B.S. (2022). Salivary alpha-amylase- biomarker for monitoring type ii diabetes. *J. Oral Maxillofac. Pathol.* 25: 441-5.
14. Usha, C.; Ramarao, S.; John, B.M.; Babu, M.E. (2017). Anticariogenicity of *Stevia rebaudiana* Extract when used as a Mouthwash in High Caries Risk Patients: Randomized Controlled Clinical Trial. *World J. Dent.* 8 (5): 1-6.
15. Rohleder, N.; Nater, U.M. (2009). Determinants of salivary alpha-amylase in humans and methodological considerations. *Psychoneuroendocrinology.* 34 (4): 469-85.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

V.I. CONCLUSIONES

Las edades de los sujetos integrantes de la muestra oscilaron entre un mínimo de 20 y un máximo de 33 años, con un promedio de 22,32 años, con una desviación estándar de 1,94 años y un coeficiente de variabilidad de 8,67%, lo que indica baja variabilidad.

Se ha comprobado que no existen diferencias entre las edades de los sujetos asignados a los 3 grupos, confirmando la validez interna de la muestra en relación con la homogeneidad de los sujetos asignados a cada grupo experimental.

Los coeficientes de Correlación de Pearson entre los contenidos de a-amilasa salival y la edad de los sujetos se encontraban en valores muy bajos y no resultaron significativos. Esto ha permitido establecer que los contenidos de a-amilasa salival basal, a la primera y segunda hora después de la ingesta de líquidos no se encuentran asociados con la edad de los sujetos.

Las asociaciones entre los contenidos de a-amilasa salival en los diferentes momentos de medición presentaron asociaciones estrechas y resultaron estadísticamente significativas. Estas asociaciones resultaron todas directas o positivas, lo cual indica que al aumentar el contenido de a-amilasa salival basal también lo hacen los contenidos de a-amilasa salival a los 60 y a los 120 minutos. La fuerza de la asociación es mayor entre el contenido de a-amilasa salival basal y

a los 60 minutos, seguido del contenido de a-amilasa salival a los 60 minutos con el de los 120 minutos y, finalmente, la asociación menos estrecha se presenta entre el contenido de a-amilasa salival basal y a los 120 minutos, no obstante continúa siendo estadísticamente significativa.

Al analizar todas las variables estudiadas en conjunto se ha podido representar los sujetos y las variables en dos dimensiones conservando el 90,8% de la información. Los sujetos estudiados se ubican separándose sobre el eje horizontal, fundamentalmente por los contenidos de a-amilasa salival de primera hora y segunda hora, ubicando próximos, con perfiles similares, a los sujetos que ingirieron infusión de estevia y agua corriente, mientras que los que ingirieron jugo artificial de naranja se encuentran mayormente concentrados en el otro extremo del gráfico.

Los contenidos de a-amilasa salival basal oscilaron entre un mínimo de 8.414 U/L y un máximo de 50.896 U/L, con un promedio de 39.034,55 U/L. Las observaciones presentaron alta variabilidad, con un rango de 42.482 U/L, una desviación estándar de 11.767,74 U/L y un coeficiente de variabilidad de 30,15%.

Los contenidos de a-amilasa salival primera hora oscilaron entre un mínimo de 8.337 U/L y un máximo de 53.340 U/L, con un promedio de 38.303,05 U/L. La variabilidad de las observaciones es alta, con un rango de 45.003 U/L, una desviación estándar de 13.010,05 U/L y un coeficiente de variabilidad de 33,97%.

Los contenidos de a-amilasa salival segunda hora oscilaron entre un mínimo de 7.341 U/L y un máximo de 50.653 U/L, con un promedio de 32.630,07 U/L. La variabilidad de las observaciones es alta, con un rango de 43.312 U/L, una desviación estándar de 11.832,88 U/L y un coeficiente de variabilidad de 36,26%.

Todos estos valores se encuentran por debajo de los rangos descriptos como normales por otros autores.

El análisis en el tiempo de los contenidos de a-amilasa salival Indica que los contenidos descienden en el tiempo y de manera más brusca entre la primer y segunda hora luego de la Ingesta de líquidos.

Se han podido establecer Modelos de Regresión Lineal entre los contenidos de a-amilasa salival y los minutos transcurridos luego de la ingesta de líquidos.

Cuando se consideraron los 60 sujetos de la muestra en su conjunto se ajustó un modelo lineal de la forma:

$$y = 43.060,37 - 3.202,24 x$$

Ambos coeficientes resultaron estadísticamente significativos, lo que Indica que en el tiempo cero el contenido de a-amilasa salival tiene un valor no nulo, y que el contenido de a-amilasa salival disminuye en el tiempo.

Cuando se estudiaron las funciones que vinculan los contenidos de a-amilasa salival y los minutos transcurridos desde la ingesta de líquidos por grupo experimental, se pudieron ajustar los modelos lineales siguientes:

Grupo experimental	Modelo de Regresión Lineal
Grupo 1	$y = 40.782,48 - 3.202,24 x$
Ingesta de infusión de estevia	
Grupo 2	$y = 40.782,48 - 2.786,03 x$
Ingesta de jugo artificial de naranja	
Grupo 3	$y = 44.241,92 - 3.579,43 x$
Ingesta de agua corriente	

En los sujetos con Ingesta de infusión de estevia y de agua corriente ambos coeficientes resultan significativos, lo que indica en el tiempo cero los contenidos de a-amilasa salival en los sujetos de estos grupos tienen valores no nulos, y el contenido de a-amilasa salival disminuye en el tiempo.

En los sujetos con ingesta de jugo artificial de naranja, por el contrario, se observó significancia sólo en la ordenada al origen, lo que indica que en el momento inicial los c de a-amilasa salival en los sujetos de este grupo tienen valores no nulos,

pero el coeficiente de regresión no resultó estadísticamente significativo, lo que implica que la recta de regresión tiene pendiente nula, por lo que las variaciones en los contenidos de a-amilasa salival en el tiempo no resultaron significativas.

Al comparar los contenidos de a-amilasa salival basal entre los sujetos que consumieron infusión de estevia, jugo artificial de naranja y agua, no se encontró efecto significativo de los grupos experimentales sobre esta variable, lo que permite establecer que la asignación de los sujetos experimentales a los distintos grupos ha sido aleatoria, de manera que se asegura la validez interna de la investigación.

Tampoco se ha podido comprobar efecto estadísticamente significativo del grupo experimental para los contenidos de a-amilasa salival primera y segunda hora, lo que indica que los promedios de a-amilasa salival no se diferencian entre los individuos que ingirieron infusión de estevia, jugo artificial de naranja o agua corriente.

Al analizar las frecuencias con que se presentaron niveles bajos, medios o altos de a-amilasa salival se ha podido comprobar que las frecuencias con que se presentan valores de a-amilasa salival basal bajos, medios o altos no se encuentran relacionadas con los grupos experimentales, lo que confirma la correcta aleatorización en la asignación de los sujetos a los grupos experimentales, reafirmando la validez interna de la muestra.

Se ha podido demostrar que las frecuencias con que se presentan niveles de a-amilasa salival primera hora bajos, medios o altos se encuentran relacionadas con los grupos experimentales. Las diferencias se perciben principalmente en los sujetos que ingirieron jugo de naranja artificial y agua corriente donde se observan mayores frecuencias de valores intermedios y menores frecuencias de valores altos, a lo que se agrega en el grupo que consumió agua corriente muy baja frecuencia

de valores bajos, mientras que el grupo que consumió infusión de estevia mantuvo valores medios de a-amilasa salival en todos los momentos de medición.

Se demostró que las frecuencias con que se presentan niveles de a-amilasa salival segunda hora, categorizados como bajos, medios o altos no se encuentran asociadas de manera estadísticamente significativa con los grupos experimentales.

Se ha podido establecer, entonces, que la ingesta de jugo artificial de naranja o agua corriente influye sobre las frecuencias de valores bajos, intermedios o altos de a-amilasa salival a los 60 minutos del momento del consumo, mientras que los sujetos que consumieron infusión de estevia mantuvieron un nivel medio de a-amilasa salival en el tiempo, lo que estaría indicando un comportamiento diferente respecto de los sujetos considerados controles.

V.2. RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren la disminución pronunciada de los contenidos de a-amilasa salival en el tiempo, especialmente a los 60 minutos de la ingesta de líquidos, no obstante, la bibliografía existente establece que los perfiles diurnos de a-amilasa salival son relativamente robustos contra las influencias momentáneas por lo que se debería continuar las investigaciones en esta línea a fin de establecer patrones de comportamiento de la a-amilasa salival luego de la ingesta.

La evolución de la a-amilasa salival en el tiempo exhibe gráficas descendentes luego de la ingesta de líquidos, las que presentan diferentes parámetros según el tipo de líquido ingerido, esta línea de trabajo está poco estudiada por lo que sería

importante profundizar estos estudios y analizar el efecto de diferentes factores sobre la curva de a-amilasa salival post ingesta.

Si bien no se encontró efecto significativo sobre los contenidos de a-amilasa salival en relación con el tipo de líquido ingerido, la bibliografía consultada indica que productos naturales pueden producir una inhibición débil de la a-amilasa, lo que sugiere que se requiere una potencia umbral para la inhibición de las enzimas digestivas que se traduzca en efectos *in vivo*, y quizás ese umbral no haya sido alcanzado por baja presencia de compuestos activos en la infusión de estevia empleada, por lo que se sugiere continuar con esta línea de investigación empleando diferentes concentraciones de estevia.

Al analizar los resultados de esta tesis atendiendo los antecedentes referidos a los diferentes compuestos que pueden tener efecto inhibitorio sobre a-amilasa, se considera necesario realizar estudios más profundos de la composición de *Stevia rebaudiana* (Bertoni), las cantidades ingeridas y el análisis de las curvas de a-amilasa salival con mayores frecuencias de determinación, a los efectos de comprender la interacción entre el consumo de infusión de estevia y la evolución de los contenidos de a-amilasa en saliva, debido a que si este vegetal demuestra *in vivo* su actividad inhibitoria de la AAs podría constituirse en un importante aliado en la lucha contra la obesidad y la diabetes.

Por otro lado, diversos estudios han demostrado el efecto de extractos de estevia en la mejora del pH y la capacidad amortiguadora de la saliva, y la reducción de los organismos cariogénicos en la saliva, efecto directamente relacionado con la concentración de los extractos, por lo que al analizar los resultados de esta tesis teniendo en cuenta la actividad demostrada de los extractos de estevia sobre los factores que contribuyen a la formación de caries, se abren nuevos interrogantes

respecto de las posibilidades de este vegetal, no solo como sustituto natural de los azúcares, sino también como protector de la salud bucal.