Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Odontología
Escuela Profesional de Odontología

Perfil fitoquímico y efecto antibacteriano *in vitro* del extracto de la *Stevia rebaudiana* sobre el *Streptococcus mutans*

TESIS

Para optar el Título Profesional de Cirujana Dentista

AUTOR

Diana Elisabeth Estela ARANA PARES

ASESOR

Dr. Donald RAMOS PERFECTO

Lima, Perú

2026



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Arana D. Perfil fitoquímico y efecto antibacteriano *in vitro* del extracto de la *Stevia rebaudiana* sobre el *Streptococcus mutans* [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Odontología, Escuela Profesional de Odontología; 2026.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Diana Elisabeth Estela Arana Pares
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	71455381
URL de ORCID	0000-0002-2885-0475
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Donald Ramos Perfecto
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	10712181
URL de ORCID	0000-0001-5870-3962
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Manuel Antonio Mattos Vela
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07463598
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Elba Estefanía Martínez Cadillo
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08621492
Datos de investigación	
Línea de investigación	No aplica
Grupo de investigación	No aplica

Agencia de financiamiento	Sin financiamiento.
Ubicación geográfica de la investigación	País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Centro poblado: - Urbanización: - Manzana y lote: - Calle: Latitud: Longitud: Se requieren coordenadas, no colocar enlaces. Puedes obtener las **coordenadas GD** de sitios como https://www.google.com.pe/maps/ https://www.coordenadas-gps.com/ https://www.mapsdirections.info/
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2025
URL de disciplinas OCDE	Odontología, Cirugía oral, Medicina oral https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.02.14

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú. Decana de América
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
ESCUELA PROFESIONAL

A C T A DE SUSTENTACIÓN PRESENCIAL N.º 020/FO-EPO/2026

Los Docentes que suscriben, reunidos el 03 de junio de 2026 en la ciudad de Lima, siendo las 15:00 horas, por encargo de la Señora Decana de la Facultad, con el objeto de constituir el Jurado de Sustentación para optar el Título Profesional de Cirujana Dentista de la Bachiller:

DIANA ELISABETH ESTELA ARANA PARES

CERTIFICAN:

Que, luego de la Sustentación de la Tesis **«PERFIL FITOQUÍMICO Y EFECTO ANTIBACTERIANO *IN VITRO* DEL EXTRACTO DE LA *STEVIA REBAUDIANA* SOBRE EL *STREPTOCOCCUS MUTANS*»** y habiendo absuelto las preguntas formuladas, demostró un grado de aprovechamiento:

.....sobresaliente.....

(escala)

Siendo calificada con un promedio de: .....dieciocho..... .....18.....
(en letras) (en números)

En tal virtud, firmamos en la Ciudad Universitaria, a los tres días del mes de junio del año dos mil veintiséis.

PRESIDENTE DEL JURADO

Dr. Manuel Antonio Mattos Vela

MIEMBRO SECRETARIO

Blga. Elba Estefanía Martínez Cadillo

MIEMBRO VOCAL (ASESOR)

Dr. Donald Ramos Perfecto

Escala de calificación: Grado de Aprovechamiento:
Sobresaliente (18-20), Bueno (15-17), Regular (12-14), Desaprobado (11 o menos)
Criterios: Originalidad, Exposición, Dominio del Tema, Respuestas.

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE
SAN MARCOS
Universidad del Perú, Decana de América

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, **Donald Ramos Perfecto** en mi condición de asesor acreditado con el DICTAMEN N.º 00044-FO-EPO-2026 de la tesis, cuyo título es "PERFIL FITOQUÍMICO Y EFECTO ANTIBACTERIANO *IN VITRO* DEL EXTRACTO DE LA *STEVIA REBAUDIANA* SOBRE EL *STREPTOCOCCUS MUTANS*", presentado por la Bachiller Diana Elisabeth Estela Arana Pares para optar Título Profesional de Cirujana Dentista, CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante la plataforma PIDS, el documento evaluado cuenta con el 7% de similitud, nivel PERMITIDO para continuar con los trámites correspondientes y para su publicación en el repositorio institucional.

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del título profesional de Cirujana Dentista.

Lima, 2 de julio del 2026

Firma del Asesor:

Nombres y Apellidos del asesor: Donald Ramos Perfecto

DNI: 10712181

Jurado de sustentación:

Presidente:
Dr. Manuel Antonio Mattos Vela

Miembro:
Blga. Elba Estefanía Martínez Cadillo

Asesor de Tesis:
Dr. Donald Ramos Perfecto

A mis padres, por su apoyo incondicional, sus sacrificios y por enseñarme a nunca dejar de creer en mí. Este logro también es suyo.

A mis maestros, que con su ejemplo y vocación inspiran en mí la voluntad de superarme cada día.

Y a todas las personas que acompañaron este camino con apoyo, cariño y esperanza.

Este trabajo refleja las huellas y enseñanzas que dejaron en mi vida.

Agradecimientos:

A mi asesor de tesis, Dr. Donald Ramos Perfecto, por su invaluable guía, paciencia y rigurosidad metodológica a lo largo de este proceso. Su dirección intelectual y sus valiosas observaciones fueron fundamentales para estructurar y culminar con éxito esta investigación.

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por haberme brindado el espacio, las herramientas y los recursos necesarios para consolidar mi formación profesional. Asimismo, extiendo mi gratitud a los docentes de la facultad de Odontología, quienes compartieron su conocimiento con verdadera vocación y excelencia.

A mis padres, por ser el pilar fundamental de mi vida. Si bien este trabajo lleva mi nombre, la realidad es que representa el esfuerzo diario, el respaldo constante y los sacrificios que hicieron para que yo pudiera concentrarme en mis estudios. Gracias por darme la estabilidad necesaria para culminar esta meta académica.

A mis compañeros de la carrera, con quienes compartí intensas jornadas de estudio, debates académicos y un apoyo mutuo que hizo este camino universitario mucho más enriquecedor y memorable.

Finalmente, expreso mi especial gratitud al Dr. Nelson Bautista Cruz por su valioso apoyo y orientación docente, así como a todas las personas e instituciones que, de manera directa o indirecta, colaboraron con el desarrollo de este proyecto, facilitando la recolección de datos y enriqueciendo el análisis de esta investigación.

Índice de contenido

I.	Introducción ……...	11
II.	Problema de Investigación……..	13
	2.1 Área problema……	13
	2.2 Delimitación del problema……	14
	2.3 Formulación del problema……	15
	2.4 Objetivos…….……	15
	2.5 Justificación……	16
	2.6 Limitaciones……	17
	2.7 Factibilidad……...	18
III.	Marco teórico……	18
	3.1 Antecedentes……	18
	3.2 Bases teóricas……	22
	3.3 Definición de términos……	35
	3.4 Hipótesis……	37
	3.5 Operacionalización de variables…….……..	37
IV.	Metodología…….	39
	4.1 Tipo de investigación……	39
	4.2 Población y muestra……	40
	4.3 Procedimientos y técnica……	45
	4.4 Procesamiento y análisis de datos……	49
V.	Resultados……	51
VI.	Discusión ……..	59
VII.	Conclusiones …….	61
VIII.	Recomendaciones …….	66
IX.	Bibliografía …….	67
X.	Anexos ……...	77
	10.1 Matriz de consistencia…….	77
	10.2 Cálculo muestral …….	79
	10.3 Instrumentos de recolección de datos……..	82
	10.4 Pruebas intermedias ……	83
	10.5 Solicitud de autorización y correspondencia institucional ……	84

	10.6 Constancia de Determinación Taxonómica N.° 173 ……..	87
	10.7 Constancia de aprobación N°073-CEI-FO-2025 ……	88
	10.8 Fotografías de la ejecución de la investigación ……..	89

Índice de tablas

Tabla 1	Variabilidad de la composición de 10 fenotipos de la *S. Reubadiana*	26
Tabla 2	Operacionalización de las variables	38
Tabla 3	Metodología utilizada en la determinación de componentes fitoquímicos principales	47
Tabla 4	Perfil fitoquímico cualitativo del extracto hidroalcohólico de *S. rebaudiana* al 80%	51
Tabla 5	Halos de inhibición del extracto hidroalcohólico de *S. rebaudiana* al 5 %, 10 %, 15 %, control positivo y control negativo, sobre el *S. mutans*	54
Tabla 6	Efecto antibacteriano *in vitro* de tres concentraciones de extracto hidroalcohólico de hoja de *S. rebaudiana* sobre *S. mutans* ATCC 25175	57

Índice de gráficos

Gráfico 1	Diseño experimental de la metodología	44
Gráfico 2	Gráfico de cajas (Boxplot) según la prueba de Kruskal–Wallis para muestras independientes	57

I. INTRODUCCIÓN

La caries dental continúa siendo una de las enfermedades crónicas más prevalentes y persistentes en el mundo, afectando a individuos de todas las edades y estratos sociales. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), más del 90 % de la población mundial ha presentado caries dental en algún momento de su vida, lo que la convierte en un problema de salud pública global y la segunda enfermedad con mayor presencia a nivel mundial. (1) Esta misma prevalencia varía entre países y regiones, con tasas más altas en áreas con acceso limitado a atención dental y educación en higiene oral, el 45% de la población mundial sufre de caries no tratadas, siendo estas regiones las más afectadas. (2) En países en desarrollo, la caries dental está aumentando debido a la urbanización y la adopción de dietas altas en azúcares refinados. (3) En contraste, en países desarrollados, las tasas de caries disminuyen debido a políticas de salud pública, programas de fluoración del agua y mejores prácticas de higiene bucal, aunque persisten desigualdades en ciertos grupos. (4) En el Perú, su alta prevalencia refleja deficiencias en la educación preventiva y el acceso limitado a servicios odontológicos, haciendo urgente el desarrollo de estrategias innovadoras orientadas al control microbiano y la promoción de la salud bucal. (5)

El *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) es el principal agente etiológico implicado en la formación de biopelículas cariogénicas. Este microorganismo acidogénico y acidúrico metaboliza carbohidratos fermentables, produce ácidos orgánicos y promueve la desmineralización del esmalte dental. Tradicionalmente, los productos de higiene oral han incorporado compuestos como el maltitol y el sorbitol, alcoholes de azúcar empleados como edulcorantes y humectantes, que además exhiben efecto antibacteriano moderado al inhibir parcialmente el crecimiento de *S. mutans* y reducir la formación de biopelículas. (6) Diversos estudios recientes —como los de Jeong et al. (2024) y Staszczyk et al. (2020)— confirman que estos polioles alteran la capacidad adhesiva y el metabolismo de bacterias orales, contribuyendo a disminuir la producción de ácido y el riesgo de caries. (7, 8) No obstante, al ser compuestos semiprocesados, su origen no es completamente natural y su producción implica etapas industriales que limitan su uso dentro de un enfoque de odontología sostenible. (9)

En este contexto, la *Stevia rebaudiana* (*S. rebaudiana*) emerge como una alternativa de origen vegetal con potencial tanto edulcorante como antibacteriano. (10) Su extracto contiene metabolitos secundarios —flavonoides,

taninos, compuestos fenólicos y glucósidos— que han mostrado propiedades biológicas capaces de interferir con el crecimiento de microorganismos cariogénicos. (11) El interés científico actual se centra en determinar si estos compuestos naturales podrían reemplazar parcial o totalmente el papel del maltitol y sorbitol, no solo como saborizantes sino como agentes con efecto antibacteriano frente a *S. mutans*. (12)

Por tanto, la investigación desarrollada tiene como propósito evaluar el perfil fitoquímico y el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *S. rebaudiana* sobre *S. mutans*, aportando evidencia científica que sustente su potencial uso como posible alternativa de uso en el cuidado de higiene oral. (13)

II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

2.1 ÁREA PROBLEMA

El estudio se desarrolló en el ámbito de la microbiología bucal y la fitoterapia aplicada a la odontología, específicamente en la línea de investigación que evalúa el potencial antimicrobiano de extractos vegetales frente a microorganismos orales patógenos. En los últimos años, la odontología ha mostrado un creciente interés por alternativas naturales que combinen eficacia clínica, seguridad biológica y sostenibilidad ambiental, buscando reducir el uso de compuestos semiprocesados o sintéticos presentes en productos de higiene oral. (14)

En este contexto, el control de *S. mutans* representa un punto crítico en la prevención de la caries dental. Este microorganismo es capaz de adherirse al esmalte, formar biopelículas resistentes y generar ácidos que desmineralizan los tejidos dentarios. Los enfoques tradicionales para su control han incluido agentes como la clorhexidina, el fluoruro y alcoholes de azúcar como el maltitol y el sorbitol, que además de su función edulcorante, exhiben efectos antibacterianos leves al reducir la síntesis de polisacáridos extracelulares y la adhesión bacteriana. (15) Sin embargo, estos compuestos —aunque seguros— provienen de procesos industriales complejos que los clasifican como semiprocesados, lo cual limita su compatibilidad con la tendencia actual hacia formulaciones de origen natural, más económicas y ambientalmente sostenibles. Además, su producción demanda etapas de refinamiento químico y consumo energético elevado, lo que incrementa su costo y reduce su compatibilidad con un enfoque de odontología verde y biocompatible. En este contexto, la búsqueda de alternativas fitoterapéuticas reutilizables y de bajo impacto ambiental, como los extractos vegetales, adquiere creciente relevancia. (16)

A partir de ello surge la necesidad de explorar extractos botánicos que puedan ofrecer efectos comparables o superiores sin depender de procesos de refinamiento industrial. (17) Entre las especies con mayor potencial destaca la *S. rebaudiana*, planta originaria de América del Sur reconocida por su elevado poder edulcorante y por la presencia de compuestos bioactivos como los esteviósidos, rebaudiósidos, flavonoides y taninos, los cuales han demostrado capacidad inhibitoria frente a microorganismos orales. (18) Así, este estudio se

ubica en la intersección entre la investigación fitoquímica, la microbiología experimental y la odontología preventiva, con el propósito de aportar evidencia científica sobre el uso de la *S. rebaudiana* como agente antibacteriano natural potencialmente aplicable en formulaciones de colutorios o pastas dentales. (19, 20)

2.2 DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

La *S. rebaudiana*, conocida por su uso como edulcorante natural sin calorías, contiene compuestos bioactivos con capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias como *S. mutans*, una de las principales especies implicadas en la formación de caries dental. A diferencia de edulcorantes fermentables como el sorbitol o el maltitol —presentes en algunos productos dentales de uso diario como los dentífricos—, la *S. rebaudiana* no genera ácidos en la cavidad bucal, lo que la convierte en una opción más segura para la integridad del esmalte dental. Su incorporación en productos de higiene bucal ha cobrado relevancia como alternativa natural frente a agentes convencionales que, si bien eficaces, suelen ser compuestos semisintéticos, parcialmente fermentables por bacterias orales, con potencial efecto disruptivo sobre el microbiota bucal o generar rechazo en pacientes que prefieren ingredientes de origen natural.

El efecto antibacteriano se refiere a la capacidad de una sustancia para inhibir o destruir bacterias, evitando su crecimiento y proliferación. En el ámbito de la salud bucal, esta propiedad es fundamental para prevenir enfermedades como la caries dental y la gingivitis, que son causadas principalmente por bacterias orales como *S. mutans* y *Porphyromonas gingivalis*. Diversos productos, como colutorios, dentífricos y otros tratamientos tópicos, han sido desarrollados para combatir estas bacterias. Ingredientes como el cloruro de cetilpiridinio, la clorhexidina y, más recientemente, extractos naturales como la *S. rebaudiana*, han mostrado eficacia en reducir las poblaciones bacterianas orales. La acción antibacteriana de estos compuestos ayuda a mantener el equilibrio de la microbiota oral, reduciendo la formación de placa dental y, en consecuencia, el riesgo de enfermedades dentales. Sin embargo, su efecto depende de factores como la concentración, el tiempo de uso y la compatibilidad con la microbiota oral natural. (20)

Es por ello que la utilización de fitoquímicos se ha potenciado en los últimos años, entre ellos, la *S. rebaudiana*, originaria de Paraguay, en América del sur. Debido

a esto, se lleva a cabo una continua investigación.

Sin embargo, aunque diversos estudios han demostrado la actividad antimicrobiana del extracto de *S. rebaudiana* sobre una variedad de microorganismos, su efecto específico frente a cepas clínicas o estandarizadas de *S. mutans* sigue siendo heterogéneo y dependiente del método de extracción, la concentración del extracto y el origen geográfico de la planta. (21) Por ello, es necesario realizar investigaciones *in vitro* bajo condiciones controladas de laboratorio que permitan evaluar de manera precisa su efecto antimicrobiano, especialmente considerando hojas recolectadas en zonas locales que podrían presentar variaciones en su composición fitoquímica, esto implica la concentración de sus compuestos bioactivos, como los esteviósidos, rebaudiósidos, flavonoides, etc., que son los responsables del efecto antimicrobiano.

2.3 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cuál es el perfil fitoquímico y el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto de *S. rebaudiana* sobre *S. mutans*? (Anexo N°1)

2.4 OBJETIVOS

2.4.1 Objetivo general

Determinar el perfil fitoquímico y el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto de *S. rebaudiana* sobre *S. mutans*.

2.4.2 Objetivos específicos

- Identificar los compuestos fitoquímicos presentes en el extracto de *S. rebaudiana* mediante la marcha fitoquímica.
- Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto de *S. rebaudiana* al 5 %, 10 % y 15 % sobre *S. mutans*.
- Comparar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto de *S. rebaudiana* a diferentes concentraciones, al 5 %, 10 % y 15 % sobre *S. mutans*.

2.5 JUSTIFICACIÓN

Justificación teórica

La *S. rebaudiana* es una planta reconocida por sus propiedades antimicrobianas y su uso tradicional en la regulación de la glucosa. Diversos estudios han demostrado que los compuestos bioactivos extraídos de esta planta —como los esteviósidos— presentan efecto inhibitorio frente a patógenos orales, particularmente *S. mutans*, bacteria clave en el desarrollo de la caries dental. (22) Por ello, esta investigación busca validar y profundizar en su efecto antibacteriano *in vitro*, contribuyendo al conocimiento científico sobre alternativas naturales en salud oral. En este contexto, es importante considerar que, aunque colutorios comerciales suelen emplear compuestos como xilitol o sorbitol —derivados de fuentes naturales— su producción industrial los clasifica como sustancias semisintéticas. (23, 24) Frente a ello, el uso directo de extractos vegetales como *S. rebaudiana* representa una opción más natural, cuya eficacia merece ser explorada desde un enfoque científico riguroso. (25)

Justificación práctica

La presente investigación se centra en evaluar el efecto antibacteriano de *S. rebaudiana* como una alternativa fitoterapéutica frente a *S. mutans*. Este enfoque responde a la necesidad de identificar compuestos vegetales con eficacia comprobada en la prevención de enfermedades orales. Los resultados obtenidos podrían sentar las bases para el desarrollo de productos odontológicos innovadores, como colutorios formulados con extractos naturales, dirigidos a un uso seguro, cotidiano y con menor riesgo de efectos adversos. Además, se promovería el aprovechamiento de recursos locales y la transferencia de conocimiento hacia la industria de la salud bucal. (26)

Justificación social

Desde una perspectiva social, esta investigación responde a la alta prevalencia de caries dental en la población adulta de Lima, proponiendo alternativas que

contribuyan a mejorar la salud bucal colectiva. El uso de productos naturales con propiedades antibacterianas puede fortalecer las estrategias preventivas existentes, especialmente en contextos con limitado acceso a tratamientos especializados. A su vez, fomenta una mayor conciencia sobre el uso responsable de recursos vegetales, impulsando el empoderamiento de comunidades mediante el uso de plantas con potencial terapéutico local. Esto apoya una visión de salud más integral, accesible, culturalmente pertinente y ambientalmente sostenible. (27)

2.6 LIMITACIONES

Dado que esta investigación se desarrolló bajo un diseño experimental *in vitro*, los resultados obtenidos no pueden extrapolarse directamente a condiciones clínicas reales, donde influyen factores como la saliva, el pH bucal, la microbiota oral y el comportamiento del paciente. Además, el estudio se centró exclusivamente en la cepa *S. mutans*, por lo que no se evaluó el efecto de *S. rebaudiana* sobre otras bacterias implicadas en enfermedades orales. Otra limitación es que el efecto antibacteriano puede variar según la técnica utilizada y el lote vegetal, lo que afecta la reproducibilidad entre laboratorios, aun cuando se empleen concentraciones establecidas previamente en el laboratorio. Finalmente, al tratarse de un modelo controlado, no se consideraron posibles interacciones con otros componentes presentes en productos comerciales de uso bucal.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 ANTECEDENTES

Sultana y cols. (2025) evaluaron la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos y metanólicos de la *S. rebaudiana* frente a cinco bacterias patógenas S*taphylococcus aureus (S. aureus), Serratia marcescens, Salmonella typhimurium, Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*). Las hojas frescas fueron secadas a 45 °C, pulverizadas y sometidas a maceración fría empleando 25 g de polvo y 150 mL de metanol o etanol por 24 h; luego los extractos fueron filtrados y concentrados para su uso. La actividad antimicrobiana se evaluó mediante difusión en agar con 100 µL de extracto y mediante determinación de MIC/MBC utilizando diluciones de 0,0625–2 mg/mL. Los halos obtenidos variaron entre 8 y 18 mm, siendo los extractos metanólicos los más activos, especialmente contra *S. aureus* con 18 mm. La MIC común para todas las bacterias fue 1 mg/mL y la MBC, 2 mg/mL. El ensayo de muerte en el tiempo mostró reducción progresiva de la densidad bacteriana, confirmando efecto bactericida. El estudio concluyó que los extractos de *S. rebaudiana*, especialmente los metanólicos, poseen un marcado potencial como agentes antimicrobianos naturales frente a bacterias Gram positivas y negativas. (28)

Aleksanyan y cols. (2025) evaluaron el efecto antimicrobiano de extractos acuosos y etanólicos de *Mentha piperita* y *S. rebaudiana* frente a bacterias ácido lácticas, levaduras, hongos filamentosos y patógenos clínicos. Los extractos se elaboraron con 100 g de *M. piperita* en agua o etanol al 96 % y con 10 g de *S. rebaudiana* en agua. La actividad se midió por difusión en agar con pozos de 6 mm tras 24 h de incubación a 37 °C. Los resultados mostraron actividad variable según solvente y microorganismo, con un halo de 16 mm frente a *Salmonella typhimurium*, inhibición total de *S. cerevisiae* y reducción de *Candida albicans* de 2×10^{6} a 5×10^{5} UFC/mL en el producto fermentado. Además, *S. rebaudiana* presentó halos de hasta 28 ± 1,15 mm contra *S. aureus* en extractos etanólicos (E:W 50:50), mientras que frente a *P. aeruginosa* los halos fueron menores (6,27 ± 1,15 mm) en extractos acuosos, evidenciando mayor actividad contra cocos Gram positivos. Estos hallazgos respaldan su potencial como agentes antimicrobianos naturales. (29)

Ye y cols. (2025) analizaron el extracto etanólico de *S. rebaudiana* obtenido

mediante Soxhlet, empleando 100 g de hojas secas y 300 ml de etanol, con el objetivo de caracterizar sus compuestos bioactivos y evaluar su efecto biológico. El extracto fue sometido a análisis LC–ESI-MS/MS y HPLC, identificándose cinco glicósidos de esteviol como componentes principales: esteviolbiósido, rebaudiósido B, rebaudiósido A, rebaudiósido C y estevióside, con tiempos de retención entre 1:69 y 13:57 min. Para evaluar la actividad biológica, se emplearon las líneas celulares SGC-7901 (cáncer gástrico) y CCL-241 (intestino normal), tratadas con concentraciones de 0–100 µg/ml. Mediante el ensayo MTT, se evidenció una citotoxicidad dependiente de la dosis, con un IC_{50} de 25,5 µg/ml en células cancerosas y 96.7 µg/ml en células normales. Asimismo, el extracto redujo significativamente la formación de colonias ($p<0,01$), indujo apoptosis confirmada por tinciones AO/EB, DAPI y Annexin V, y se asoció a la inhibición de la vía PI3K/AKT/mTOR, destacando el estevióside por su alta afinidad molecular con dicho complejo. Estos hallazgos confirman que los glicósidos de esteviol constituyen los principales responsables de la bioactividad del extracto etanólico de *S. rebaudiana*, aunque su enfoque celular difiere del análisis antibacteriano *in vitro* planteado en el presente estudio. (30)

Iawsipo y cols. (2024) evaluaron el potencial uso como conservante natural de residuos de hojas de *S. rebaudiana*, utilizando tres métodos de extracción: etanol (RE), etanol/agua al 50 % (REW) y agua caliente (RW). Se aplicaron pruebas de efecto antibacteriana (zonas de inhibición, CIM y CBM) y antioxidante, junto con análisis de contenido fenólico y flavonoides. Estadísticamente, se emplearon correlaciones entre compuestos fenólicos y la actividad biológica observada. El extracto REW mostró mayor eficacia contra el *Staphylococcus aureus*, una bacteria Gram positiva al igual que el *S. mutans*, a pesar que esta última bacteria mencionada no se incluyó en el estudio, se presentó una zona de inhibición de 25,58 ± 2,54 mm y CIM de 0,0125 mg/spot. Se concluye que los residuos de *S. rebaudiana* conservan compuestos bioactivos útiles como conservantes naturales. (31)

Chakma y cols. (2023) evaluaron el efecto de extractos de hojas de *S. rebaudiana*, reportando la presencia de actividad antioxidante y, principalmente, un marcado efecto antibacteriano frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas. Los extractos mostraron capacidad inhibitoria significativa, destacando el extracto hidroalcohólico al 80 %, que presentó los mayores diámetros de inhibición, con valores de 16,2 mm frente a *Staphylococcus*

aureus, 14,8 mm frente a *Enterococcus faecalis*, 13,5 mm frente a *Escherichia coli* y 12,1 mm frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Estos resultados evidencian que *S. rebaudiana* posee compuestos bioactivos con efecto antibacteriano relevante, respaldando su potencial como agente natural frente a microorganismos de importancia clínica. (32)

Mendoza *y* cols*.* (2021) compararon el efecto *in vitro* de dos edulcorantes comerciales a base de *S. rebaudiana* ("Stevia Vía" y "Stevita") en concentraciones de 25 mcg y 50 mcg sobre el crecimiento de *S. mutans* ATCC 35668. Las cepas se cultivaron en agar Mueller Hinton e incubaron en condiciones de microaerofilia con CO_2 a 35 °C durante 24 y 48 horas. Se colocaron 100 µl de las disoluciones en pocillos de 6 mm, y se midieron los halos de inhibición con un calibrador Vernier. El análisis estadístico se realizó con la prueba t de Student ($p < 0.05$). Los resultados mostraron que el edulcorante "Stevia Vía" generó halos de inhibición de 11,6 mm y 12 mm a 25 mcg y 50 mcg, respectivamente, con una CMI de 25 mcg y p = 0,01. En cambio, "Stevita" produjo halos de solo 6 mm en ambas concentraciones, lo que sugiere que "Stevia Vía" tuvo un mayor efecto inhibidor sobre *S. mutans*. La mayor actividad inhibitoria observada en "Stevia Vía" podría atribuirse a diferencias en la formulación comercial y en la concentración efectiva de los glicósidos de esteviol, compuestos responsables de la actividad anticariogénica, lo que explicaría su mayor capacidad para inhibir el crecimiento de *S. mutans* en comparación con "Stevita", lo que no se indica en el artículo. (34)

Sultana y cols. (2020) evaluaron la actividad antioxidante y antimicrobiana de tres fracciones obtenidas del extracto metanólico al 70 % de hojas de *S. rebaudiana*, fraccionado mediante el método de Kupchan en n-hexano (HSR), diclorometano (DSR) y acetato de etilo (ESR). La actividad antioxidante fue determinada por el método DPPH•, observándose valores de IC_{50} de 11,59 µg/mL para HSR y 10,38 µg/mL para ESR, frente al ácido ascórbico (IC_{50} = 6,05 µg/mL). El efecto antibacteriano se evaluó por difusión en disco a 500 µg/disco, registrándose ha,5 mm para DSR y 10,2–16,8 mm para ESR frente a bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus* spp.) y Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp.). No se evidenció actividad antifúngica. El análisis fitoquímico realizado fue de tipo cualitativo y permitió identificar la presencia de alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos y triterpenoides en las fracciones evaluadas; sin embargo, el estudio no reportó

valores cuantitativos ni estableció la predominancia de alguno de estos compuestos, limitándose únicamente a señalar su presencia o ausencia según las pruebas realizadas. (35)

Brañez *y* cols. (2018) trabajaron en determinar el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de *S. rebaudiana* frente a *Streptococcus sanguinis* y *Actinomyces viscosus*. Se utilizaron pruebas de sensibilidad en placa de agar con discos (de 6 mm de diámetro, cargados con 10 µL de extracto), estandarizado las cepas bacterianas a una escala de 0,5 de Mc Farland y aplicando diversas concentraciones del extracto (15, 30, 50, 60 y 120 mg/ml). Los resultados mostraron halos de inhibición para ambas bacterias (*Streptococcus sanguinis* promedios entre 6.8 y 8.3 mm, y para *Actinomyces viscosus* promedios entre 7,2 y 9,65 mm), con una diferencia estadísticamente significativa ($p<0,05$) entre las concentraciones para *A. viscosus* según la prueba de Kruskal-Wallis. Sin embargo, la conclusión principal fue que el extracto de *S. rebaudiana* no presentó un efecto antibacteriano significativo sobre *S. sanguinis*, pero sí mostró efecto contra *A. viscosus* en concentraciones de 30 y 50 mg/ml. (36)

Miranda y Luz (2017) evaluaron *in vitro* la actividad antimicrobiana de extractos de hojas de *S. rebaudiana* obtenidos con hexano, tetracloruro de carbono, etanol y agua frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa)*. La actividad antibacteriana se determinó mediante la técnica de difusión en agar por pozos, y la concentración mínima inhibitoria (CMI) se estableció por el método de dilución en agar. El extracto acuoso mostró un 84,44 % de inhibición frente a *Staphylococcus epidermidis* (cepa 965) respecto al control positivo. El extracto en hexano presentó las CMI más bajas, con valores de 0,011 mg/mL frente a *S. aureus* (cepa 921) y 1,06 mg/mL frente a *Pseudomonas aeruginosa*, evidenciando mayor potencia antibacteriana que los extractos etanólicos y acuosos. En contraste, no se observó efecto antibacteriano frente a *P. aeruginosa* en las cepas RO3 y RO4. Estos hallazgos indican que los compuestos no polares de *S. rebaudiana* requieren menores concentraciones para inhibir el crecimiento bacteriano. (37)

Howlader y cols. (2016) evaluaron las propiedades bioquímicas y fitoquímicas de las hojas secas de *S. rebaudiana*. Se elaboraron cuatro extractos secos (A,

B, C y D) mediante diferentes métodos de extracción, junto con una muestra comercial de *S. rebaudiana* en polvo. Se analizaron los azúcares totales solubles y los azúcares reductores, encontrándose que el extracto C presentó la mayor concentración de azúcares solubles (477 mg/g), mientras que el extracto D mostró el mayor contenido de azúcares reductores (82 mg/g); sin embargo, la muestra comercial superó a todos los extractos con 754 mg/g y 98 mg/g, respectivamente. El análisis fitoquímico cualitativo evidenció la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas, fenoles, esteroides y glucósidos cardíacos, observándose una alta presencia (+++) de compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, esteroides y glucósidos cardíacos en los extractos metanólico y etanólico, mientras que los alcaloides y, principalmente, las saponinas mostraron menor intensidad o presencia traza (+) en el extracto acuoso. Asimismo, la mayor cantidad de compuestos fenólicos totales (92 mg) se obtuvo en el extracto metanólico B, evidenciando que el metanol fue el solvente más eficiente para su extracción. En conclusión, *S. rebaudiana* demostró ser una fuente rica en azúcares no calóricos y compuestos bioactivos con potencial antioxidante y antimicrobiano. (38)

3.2 BASES TEÓRICAS

3.2.1 *Stevia rebaudiana*

Stevia rebaudiana bertoni es una especie perteneciente al Reino *Plantae*, División *Magnoliophyta*, Clase *Magnoliopsida*, Orden *Asterales* y Familia *Asteraceae*, uno de los grupos botánicos más amplios y diversos. Dentro de esta familia, se ubica en el Género *Stevia*, que incluye numerosas especies originarias de Sudamérica. La clasificación taxonómica de *S. rebaudiana* refleja sus características morfológicas propias de las compuestas, como sus inflorescencias en capítulos y su hábito herbáceo perenne, lo que permite su adecuada identificación y diferenciación dentro del género. (39)

La *S. rebaudiana*, originaria de Paraguay en Sudamérica, ha mostrado una variedad de efectos biológicos y beneficios para la salud, aunque su uso es más común en Sudamérica y algunas áreas de Asia. Este edulcorante natural es aproximadamente 300 veces más dulce que la sacarosa y se le atribuyen propiedades destacadas como antioxidante, antimicrobiano, y antidiabético (incluyendo efectos antihiperglucémicos, insulinotrópicos y

glucagonostáticos), así como antiplaquetario, anticariogénico y antitumoral. (40)

El esteviósido tiene un potencial edulcorante comparable al de los edulcorantes artificiales comercializados y consumidos en diversos alimentos y bebidas, siendo aproximadamente 300 veces más dulce que la sacarosa. El rebaudiósido A es conocido por ser aún más dulce (hasta 450 veces más dulce que la sacarosa) y puede ser refinado hasta una pureza de más del 97%. Las hojas, así como el extracto puro de esteviósido, pueden usarse en su forma natural o preparadas, y son termoestables a temperaturas de hasta 200°C. (41)

3.2.2 Actividades biológicas de la *Stevia rebaudiana*

El extracto de *S. rebaudiana* contiene potentes componentes antibacterianos y antifúngicos como los steviósidos, los rebaudiósidos A, los ácidos clorogénicos, los flavonoides y los triterpenos. (19) Aunque diversos estudios han demostrado su efecto inhibitorio sobre bacterias y hongos, el mecanismo de acción no se encuentra completamente dilucidado; sin embargo, se ha propuesto que podrían actuar mediante la alteración de la permeabilidad de la membrana celular, la inhibición de enzimas esenciales del metabolismo microbiano, la interferencia en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, así como por estrés oxidativo inducido, lo que en conjunto conduciría a la inhibición del crecimiento microbiano o a la muerte celular (42)

Actividad antibacteriana: La *S. rebaudiana* es conocida por su capacidad para combatir diversos microorganismos. Ha demostrado ser eficaz contra varias bacterias, incluyendo aquellas responsables de la caries dental y la formación de placa, como las siguientes: *S. mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus sanguinis*, *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. Este amplio espectro de acción se atribuye a la presencia de compuestos bioactivos como los steviósidos, rebaudiósidos A, ácidos clorogénicos, flavonoides y triterpenos, que actúan interrumpiendo los procesos vitales de estos patógenos. (43, 44)

Actividad anticariogénica: Esta propiedad está directamente ligada a su efecto antimicrobiano en la cavidad oral. A diferencia del azúcar, la *S.*

rebaudiana tiene un bajo potencial acidogénico, lo que significa que no es fermentada por las bacterias orales para producir ácidos que dañan el esmalte dental. (45)

Actividad antioxidante: Los extractos de *S. rebaudiana* son una fuente significativa de antioxidantes, compuestos esenciales para proteger las células del cuerpo del daño oxidativo, esta propiedad se atribuye por la presencia de compuestos de fenólicos y flavonoides en su composición. El daño es causado por los radicales libres, moléculas inestables que pueden contribuir al envejecimiento y al desarrollo de enfermedades crónicas. La *S. rebaudiana* ayuda a neutralizar estos radicales libres, lo que la convierte en un aliado valioso para la salud celular y un potencial agente para la conservación de alimentos, al prevenir la oxidación de sus componentes. (46)

Actividad anticancerígena: Los derivados de la *S. rebaudiana* poseen acciones antitumorales que han sido demostradas en diversos tipos de cáncer, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* en animales. Un estudio reciente se propuso a revisar de forma concisa la literatura existente sobre las acciones de los derivados de la *S. rebaudiana*. Dada la proyección de un aumento del 47% en casos de cáncer para 2040 respecto a 2020. Donde estos efectos se atribuyeron a mecanismos como la inducción de apoptosis y la detención de la proliferación celular en diversos tipos de tumores. Se requiere más investigación clínica en humanos para confirmar su eficacia y seguridad como terapia o coadyuvante en el tratamiento del cáncer. (47)

Actividad antiinflamatoria: La propiedad antiinflamatoria del esteviósido fue evaluada al inhibir la activación de NF-κB y la señalización de la proteína quinasa activada por mitógenos, así como la liberación de citocinas proinflamatorias. El esteviósido puede reducir la inflamación y mediar la inmunomodulación mediante la inhibición de citocinas proinflamatorias a nivel de la expresión génica. (48)

3.2.3 Propiedades antifúngicas

La *S. rebaudiana* ha demostrado actividad antifúngica en estudios experimentales, atribuida principalmente a la presencia de glucósidos de esteviol, flavonoides, ácidos fenólicos y triterpenoides. Estos compuestos ejercen su acción mediante la alteración de la permeabilidad de la membrana celular fúngica, la inhibición de enzimas metabólicas esenciales y la interferencia en la producción de ácidos orgánicos, lo que compromete la integridad estructural del biofilm y reduce la viabilidad microbiana. Dichos efectos han sido reportados frente a *Candida albicans*, *Epidermophyton* spp., *Trichophyton mentagrophytes*, *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus flavus*, evaluados mediante ensayos de crecimiento planctónico en distintos intervalos de tiempo. La disminución del metabolismo fúngico y de la capacidad de adhesión contribuye a una reducción de la patogenicidad. Aunque estos hallazgos respaldan el potencial de *S. rebaudiana* como fuente de agentes antifúngicos naturales y conservantes biológicos, se requieren estudios experimentales y clínicos adicionales para confirmar su eficacia y seguridad terapéutica. (43, 49)

3.2.4 Composición de la *Stevia rebaudiana*

La *S. rebaudiana* contiene diversos compuestos bioactivos responsables de su sabor dulce y de su potencial funcional. Entre los glucósidos principales destacan el estevióside y el rebaudiósido A, acompañados por otros como el rebaudiósido B, C, D, el dulcósido A y el esteviol. Además, esta planta posee otros metabolitos secundarios de interés, como flavonoides, taninos, fenoles, saponinas y aceites esenciales, que contribuyen a su actividad antioxidante y antimicrobiana. A nivel nutricional, contiene entre 80 % y 85 % de agua, así como fibra, proteínas, aminoácidos, lípidos, vitamina C, minerales como hierro, potasio, magnesio, fósforo, cromo y oligoelementos. Tras su consumo, puede dejar un retrogusto amargo, asociado a la presencia de taninos y compuestos volátiles. (50)

En ese marco, la siguiente tabla (Tabla N°1) presenta los resultados obtenidos en la caracterización bioquímica de diez genotipos de *S. rebaudiana*, analizados mediante HPLC (cromatografía líquida de alta resolución). Se incluyen los valores porcentuales de fenoles totales,

flavonoides totales, ácidos fenólicos, taninos totales y actividad antioxidante DPPH• (2,2-difenil-1-picril hidrazilo, radical libre utilizado para medir capacidad antioxidante), expresados sobre materia seca. Estos datos permiten apreciar la variabilidad química entre los genotipos evaluados y evidencian el potencial diferencial de cada uno según su perfil de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante. (51)

Tabla N°1. Variabilidad de la composición de 10 fenotipos de la *S. rebaudiana*

Genotipo	Fenoles totales (%)	Flavonoides totales (%)	Ácido fenólico (%)	Taninos totales (%)	Actividad antioxidante (DPPH+) (%)
1	2,23 %	1,02 %	0,23 %	0,16 %	2,4 %
2	1,61 %	1,29 %	0,12 %	0,11 %	4,82 %
3	2,63 %	0,66 %	0,19 %	0,15 %	2,11 %
4	2,63 %	0,65 %	0,34 %	0,18 %	3,69 %
5	2,87 %	0,59 %	0,41 %	0,18 %	2,79 %
6	1,49 %	1,3 %	0,17 %	0,15 %	3,25 %
7	1,59 %	1,25 %	0,16 %	0,14 %	4,07 %
8	2,53 %	0,73 %	0,34 %	0,18 %	2,06 %
9	2,46 %	0,98 %	0,27 %	0,18 %	2,23 %
10	1,58 %	1,24 %	0,16 %	0,14 %	4,58 %
Promedio	2,15 %	0,97 %	0,24 %	0,16 %	3,31 %

Fuente: *Stevia rebaudiana Bertoni*, a source of high-potency natural sweetener—Biochemical and genetic characterization. (50)

3.2.5 Micronutrientes de la *Stevia rebaudiana*

Las hojas de *S. rebaudiana* tienen un valor nutricional positivo y una cantidad significativa de capacidad antioxidante total, fenoles totales y flavonoides totales. Los micronutrientes/1000 g que incluyen minerales; hierro (Fe), potasio (K), fósforo (P), magnesio (Mg), sodio (Na), calcio (Ca), manganeso (Mn) y selenio (Se). (52)

3.2.6 Polifenoles de la *Stevia rebaudiana*

Los polifenoles de extractos vegetales están generando interés por sus aplicaciones, presentan mayor inhibición contra bacterias (CMI: 1,67–3,33 mg/mL) que contra hongos (CMI: 6,67–13,3 mg/mL) y mostraron un fuerte efecto inhibidor sobre las enzimas digestivas, comparable al EGCG (galato de epigalocatequina, polifenol con actividad antimicrobiana y capacidad inhibitoria de enzimas digestivas, utilizado como compuesto de referencia para comparar la eficacia inhibitoria de extractos vegetales). Estos compuestos podrían ser útiles en cosméticos y alimentos, pero se necesitan más estudios para comprender sus mecanismos antiinflamatorios, biodisponibilidad y metabolismo. Los extractos orgánicos podrían ofrecer mejor bioactividad que los acuosos. (53)

3.2.7 *Streptococcus mutans*

Los *S. mutans, Streptococcus sobrinus, Lactobacillus acidophilus, Actinomyces viscosus* y *Bifidobacterium dentium* son bacterias patógenas relevantes que, entre las 200 especies bacterianas aisladas de los biofilms dentales, son comúnmente responsables de la aparición de caries dental. El ácido láctico producido principalmente por *Lactobacillus acidophilus* a partir de la fermentación de carbohidratos, junto con *S. mutans* es responsable de la desmineralización del esmalte dental, lo que desencadena la formación de caries. *Lactobacillus acidophilus* está frecuentemente relacionado con las caries en humanos debido a su capacidad para sobrevivir en ambientes ácidos. Esta bacteria es también una de las principales en la flora de la cavidad oral, involucrada en la formación de caries, especialmente en la dentina. Además, la cantidad de bacterias del género *Lactobacillus* en la saliva se ha utilizado como un indicador para predecir la actividad de la caries en una persona. (54–56)

3.2.7.1 Factores de virulencia

Los factores de virulencia de *S. mutans* son características y mecanismos que la bacteria utiliza para adherirse, colonizar y persistir en los tejidos del huésped. A través de enzimas, adhesinas y componentes de la biopelícula, estas estructuras le permiten sobrevivir en el ambiente oral, resistir

defensas externas y contribuir de manera directa al desarrollo de la caries dental y otras infecciones relacionadas.

Capacidad acidofílica de *S. mutans*

Una de las características cruciales de *S. mutans* es su capacidad acidofílica, que le permite resistir ambientes con pH bajo, un rasgo esencial que favorece su supervivencia en la cavidad oral tras la fermentación de carbohidratos. Esta propiedad está mediada por mecanismos que expulsan protones (H^+) fuera de la célula, manteniendo el pH interno relativamente estable pese a la acidez del entorno generado por su propio metabolismo. Esta tolerancia a la acidez confiere a *S. mutans* una ventaja competitiva sobre otros microorganismos de la placa, facilitando su persistencia y dominancia en nichos donde otros no sobreviven. Su acidofilia contribuye de manera significativa al proceso de desmineralización dental y al desarrollo de caries, ya que permite que la bacteria continúe metabolizando y produciendo ácido incluso en condiciones ambientales perjudiciales. (57)

Capacidad acidogénica de *S. mutans*

La acidogenicidad es una de las principales propiedades virulentas de *S. mutans*, definida como su habilidad para fermentar rápidamente los azúcares dietarios, especialmente sacarosa, glucosa y fructosa, y convertirlos en ácidos orgánicos como el ácido láctico. Este proceso genera una reducción significativa del pH local en el biofilm dental, creando un ambiente propicio para la desmineralización del esmalte dental. La producción sostenida de ácido por *S. mutans* no solo inicia el deterioro del tejido dental, sino que también favorece un entorno hostil para bacterias menos tolerantes a la acidez, desplazándolas y permitiendo que *S. mutans* prolifere aún más dentro de la biopelícula cariogénica. Esta capacidad acidogénica es un factor determinante en la progresión de la caries dental. (57)

Capacidad acidúrica de *S. mutans*

Además de producir ácido, *S. mutans* posee una destacada capacidad acidúrica, que es la habilidad de tolerar y crecer en medios de baja pH, incluso donde otros microorganismos fallan. Esta tolerancia se logra mediante respuestas adaptativas al estrés ácido que incluyen alteraciones en la composición de la membrana, sistemas de expulsión de protones y

activación de procesos que mantienen la homeostasis interna. La aciduricidad permite que *S. mutans* no solo sobreviva, sino que permanezca metabólicamente activo en entornos hostiles con pH bajo, como los que crea él mismo durante la fermentación de carbohidratos. Esta propiedad es esencial para su persistencia en las lesiones de caries y explica por qué puede dominar la biopelícula dental incluso en condiciones muy ácidas. (57)

Glucosiltransferasas (GTFs)

Las glucosiltransferasas codificadas por los genes gtfB, gtfC y gtfD son esenciales para la virulencia de *S. mutans*, ya que permiten sintetizar glucanos a partir de sacarosa, conformando la matriz polisacárida extracelular que estructura la biopelícula dental. Esta matriz favorece la adhesión a la superficie dentaria, facilita la agregación bacteriana y protege al microorganismo frente a condiciones adversas del ambiente oral. Estudios recientes han demostrado que variantes naturales con recombinaciones en gtfB–gtfC presentan menor actividad enzimática y reducida formación de biopelícula, lo que confirma la relación directa entre la funcionalidad de las GTFs y la capacidad patógena. Asimismo, investigaciones donde se eliminó experimentalmente el gen gtfB (*knock-out*) evidenciaron una disminución significativa en la adhesión del microorganismo y en la producción de exopolisacáridos (EPS), lo que compromete estructuralmente la biopelícula y reduce su estabilidad. (58)

Proteínas antígenos (PA)

Las proteínas antígeno de *S. mutans*, también conocidas como PA o antígenos I/II, son adhesinas de superficie que permiten la unión específica de la bacteria a componentes de la película salival, especialmente a las glicoproteínas gp340 y DMBT-1. Gracias a esta interacción, *S. mutans* logra adherirse firmemente al esmalte, iniciar la colonización y establecer la biopelícula incluso antes de producir glucanos. Además, estas proteínas participan en la agregación bacteriana y en la modulación de la respuesta inmune local, lo que las convierte en un factor de virulencia esencial en las etapas iniciales de la caries dental. (59, 60)

Proteínas de unión a colágeno (CBPs)

Las proteínas de unión a colágeno, como Cnm y Cbm, funcionan como

adhesinas de superficie que permiten a ciertas cepas de *S. mutans* adherirse a tejidos ricos en colágeno, como la dentina expuesta, el tejido pulpar e incluso las válvulas cardíacas, ampliando su capacidad de colonización más allá de la superficie dental y otorgándole un potencial invasivo clínicamente relevante. Estudios recientes han demostrado que cepas Cnm-positivas conservan su capacidad de unión al colágeno incluso tras la inactivación bacteriana, asociándose con mayor mortalidad en modelos animales, lo que confirma a Cnm como un importante factor de virulencia vinculado no solo a la caries dental, sino también a posibles manifestaciones sistémicas. La persistente detección del gen cnm en población humana refuerza su valor como marcador de riesgo biológico. (61)

Interacción entre GTFs y CBPs

La virulencia de *S. mutans* no depende de un solo mecanismo, sino de la interacción de múltiples factores que actúan en distintas etapas de colonización. Las GTFs permiten la producción de glucanos que consolidan la biopelícula, mientras que las adhesinas como Cnm o Cbm facilitan la adherencia inicial a superficies incluso antes de que los glucanos estén formados. Se ha observado que la eliminación de gtfC afecta menos la adhesión inicial que la eliminación de gtfB, lo que indica que cada factor cumple un rol específico dentro del proceso patogénico. En conjunto, la producción de glucanos y la presencia de adhesinas no dependientes de sacarosa permiten un establecimiento más eficiente del biofilm y una mayor persistencia frente a la limpieza mecánica o agentes antimicrobianos. (62)

3.2.7.2 Mecanismos de diseminación y colonización

La cepa de *S. mutans* puede ingresar al torrente sanguíneo durante procedimientos dentales como extracciones, profilaxis o incluso mediante cepillados rutinarios. La bacteria puede adherirse a diversos tejidos en el organismo, utilizando estructuras específicas como las CBPs y GTFs, que le permiten evadir la respuesta del sistema inmunitario y establecer infecciones en sitios distantes de la cavidad oral . La aptitud de *S. mutans* para persistir en la circulación y adherirse a diferentes tejidos profundiza

su papel en patologías sistémicas, entre ellas las infecciones de válvula cardíaca, lesiones en vasos cerebrales, y daño en tejidos renales. (59, 63)

3.2.7.3 Implicaciones sistémicas y patologías asociadas

En el ámbito de las enfermedades cardiovasculares, la presencia de cepas que contienen la proteína Cnm como *S. mutans* han sido vinculadas con la aparición y progresión de endocarditis infecciosa. La capacidad de estas cepas para adherirse a las válvulas del corazón y formar vegetaciones se atribuye a su interacción con componentes del tejido del huésped, como el colágeno. Dichas cepas también contribuyen a la formación de placas ateroscleróticas, estimulando procesos inflamatorios que facilitan la progresión de las enfermedades cardiovasculares. (59, 64)

En relación con las patologías cerebrales, cepas con Cnm han demostrado aumentar la tendencia a microhemorragias cerebrales, particularmente en individuos hipertensos o envejecidos. La adhesión de *S. mutans* a las paredes de los vasos cerebrales y la alteración de la integridad de la barrera hematoencefálica facilitan eventos hemorrágicos, incrementando el riesgo de accidente cerebrovascular. (59, 65)

Asimismo, *S. mutans* está implicado en la nefropatía por IgA, donde la presencia de inmunocomplejos y depósitos en los riñones genera daño renal progresivo. La capacidad de la bacteria de inducir reacciones inflamatorias y de formar depósitos inmunes en órganos distantes, principalmente en riñones, relaciona su papel con enfermedades autoinmunes y glomerulonefritis. (59, 66)

La infección por *S. mutans* también puede exacerbar condiciones inflamatorias intestinales, como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, mediante mecanismos que involucran la inducción de citoquinas proinflamatorias, incluyendo IFN-γ y otros mediadores inmunitarios. La participación de *S. mutans* en la patogenia de estas enfermedades gastrointestinales confirma su potencial para influir en comunidades microbianas y procesos inflamatorios en órganos internos. (59, 67)

Finalmente, existe evidencia que sugiere un papel de *S. mutans* en la promoción de la invasividad tumoral en carcinomas orales, en donde la bacteria puede aumentar la permeabilidad vascular y facilitar la diseminación de células cancerosas, además de activar vías inflamatorias

como la producción de IL-6, promoviendo así la progresión tumoral. (59, 68)

3.2.7.4 Factores de evasión inmunitaria y patogenia

Las estructuras superficiales de *S. mutans*, como las PA y CBPs, le confieren resistencia frente a la respuesta inmune del huésped. La capacidad de estas proteínas para mediar adherencias en tejidos profundos, evadir la fagocitosis y resistir ataques inmunitarios, facilita la persistencia de la bacteria en diferentes ambientes del organismo. La interacción con componentes del sistema inmune, como las inmunoglobulinas, además mantiene la bacteria en estado de reservorio que puede ser reactivado en condiciones fisiopatológicas, favoreciendo la diseminación y la cronificación de las infecciones sistémicas. (59, 69, 70)

3.2.8 Mecanismos de acción de los compuestos naturales contra *Streptococcus mutans*

Diversas investigaciones han identificado que los compuestos naturales, como la curcumina, eugenol, resveratrol y otros, actúan sobre *S. mutans* utilizando distintos mecanismos. La curcumina, por ejemplo, ha mostrado la capacidad de reducir la adherencia de *S. mutans* a las superficies dentales humanas, interfiriendo con las proteínas de matriz extracelular y quizás alterando la biogénesis de la superficie celular, lo que limita la formación de biopelículas y la colonización bacteriana . Además, estudios han demostrado que el curcuminoide puede afectar la expresión de genes relacionados con el metabolismo y la respuesta al estrés en *S. mutans*, como la regulación de vías antioxidantes y la resistencia a condiciones ácidas, contribuyendo así a disminuir su virulencia. (69, 71)

Por otro lado, el eugenol, un compuesto presente en el aceite de clavo, ha sido evidenciado por su efecto inhibidor en la formación de biofilms de *S. mutans*. La interacción sinérgica del eugenol con otros agentes antimicrobianos puede potenciar su eficacia, además de que puede actuar sobre la membrana celular bacteriana, causando pérdida de integridad y muerte celular. La combinación de eugenol con otros compuestos naturales hace que su efecto antimicrobiano sea más potente y menos

propenso al desarrollo de resistencia bacteriana. (72,73)

El resveratrol, otra sustancia vegetal, ha sido evaluado por su capacidad para inhibir tanto la producción de ácidos por *S. mutans* como la formación de biofilms. Estos efectos contribuyen a disminuir la capacidad de la bacteria para inducir caries, además de que puede interferir en la expresión de genes relacionados con la adhesión y la biogénesis de la matriz extracelular, reforzando su potencial como agente preventivo. (74,75)

3.2.9 Componentes naturales, y su impacto en la adhesión bacteriana y formación de biopelículas

Uno de los aspectos críticos en la patogenicidad de *S. mutans* es su capacidad para adherirse a las superficies dentales y formar biopelículas, una etapa esencial en el desarrollo de caries. Los compuestos naturales han demostrado ser efectivos en impedir estas fases, principalmente mediante la inhibición de las proteínas de adhesión y la alteración de la matriz de exopolímeros que mantiene la estructura de la biopelícula. Por ejemplo, la curcumina bloquea la adherencia a superficies de dentina y la unión a proteínas extracelulares, limitando así la colonización inicial del microorganismo. (76)

La capacidad de estos compuestos para reducir la expresión de genes relacionados con la biogénesis de la superficie celular y la regulación de respuestas al estrés oxidativo también contribuye a la disminución de la estabilidad de la biopelícula y, en consecuencia, a la mayor eficiencia en la eliminación de estas comunidades microbianas en el contexto clínico. (77)

3.2.10 Ventajas de los compuestos naturales frente a los antimicrobianos tradicionales

Una de las principales ventajas de los compuestos naturales es su menor tendencia a generar resistencia bacteriana en comparación con los antibióticos convencionales, además de presentar una mejor tolerancia y menor toxicidad cuando se usan en concentraciones adecuadas. La biocompatibilidad y la capacidad de actuar sobre múltiples mecanismos en *S. mutans*, como inhibir la adherencia, sabotear la formación de

biopelículas y disminuir la acidez, aportan un perfil favorable para su uso en terapias preventivas y curativas en odontología. (78)

El empleo de agentes naturales también puede potenciar terapias combinadas, incrementando la eficacia sin aumentar la toxicidad y minimizando los efectos adversos asociados a tratamientos farmacológicos tradicionales. La integración de estas sustancias en protocolos de higiene bucal, en formulaciones tópicas o en técnicas de fototerapia, representa un avance significativo para el manejo de la caries y las enfermedades periodontales. (79)

3.2.11 Bacterias Gram positivas y la *Stevia rebaudiana*

La *S. rebaudiana* tiene un mayor efecto antibacteriano contra *B. subtilis, S. aureus* y *Micrococcus luteus*, con halos de inhibición que varían entre 8,67 y 35,3 mm. Este efecto se atribuye principalmente a la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides y glucósidos diterpénicos (esteviósido y rebaudiósido A), los cuales pueden actuar de manera individual o sinérgica con el extracto de *S. reubadiana*. La mayor susceptibilidad de estas bacterias se relaciona con las características estructurales propias de las Gram positivas, especialmente la composición de su pared celular rica en peptidoglicano y la ausencia de una membrana externa, lo que facilita la interacción y penetración de dichos compuestos bioactivos. (80)

3.2.12 Análisis fitoquímicos de la *Stevia rebaudiana*

La eficacia de los extractos de plantas depende de su composición fitoquímica, la matriz de la planta y la técnica de extracción utilizada. El proceso de extracción es crucial, ya que diferentes métodos pueden influir significativamente en la actividad biológica de los extractos. Se pueden emplear técnicas convencionales como Soxhlet y maceración en frío, o métodos no convencionales como la extracción con fluidos supercríticos y ultrasonido. Aunque las altas temperaturas favorecen la liberación de metabolitos, pueden degradar compuestos sensibles al calor. A pesar de las ventajas tecnológicas, los métodos convencionales siguen siendo preferidos por su bajo costo y simplicidad. Cabe resaltar que la *S. rebaudiana* es rica en glucósidos de esteviol (como esteviósido y rebaudiósido A), así como en compuestos fenólicos y flavonoides

(incluyendo kaempferol y quercetina), alcaloides, taninos, saponinas, triterpenos, clorofilas, carotenoides, ácidos grasos, vitaminas (como niacina, tiamina y ácido ascórbico), aminoácidos esenciales, fibra y proteínas. (81)

3.2.13 Mecanismo de acción antibacteriano de *Stevia rebaudiana* frente a *Streptococcus mutans*

Los compuestos bioactivos de *S. rebaudiana*, como el esteviósido y el rebaudiósido A, ejercen una acción antibacteriana directa sobre *S. mutans*, una de las principales bacterias causantes de caries. Su mecanismo principal radica en interferir con la síntesis de exopolisacáridos (EPS), componentes cruciales para la formación y estabilidad de las biopelículas dentales. Al reducir esta síntesis, la *S. rebaudiana* impide que *S. mutans* forme una biopelícula robusta, su principal defensa y medio de adhesión. Además, se ha observado que estos compuestos disminuyen la expresión de genes clave (como gtfB y gbpB) involucrados en la producción de glucanos y la adhesión bacteriana, respectivamente. Así, la *S. rebaudiana* ataca directamente la capacidad de adhesión y la estructura de la biopelícula del microorganismo, su principal estrategia de supervivencia y patogenicidad. (82)

Esta inhibición de la formación de biopelículas y la reducción en la producción de EPS posicionan a *S. rebaudiana* como una prometedora alternativa natural para la prevención de la caries dental. Sin embargo, es crucial considerar que su eficacia antibacteriana puede variar significativamente según la concentración del extracto y el método de preparación empleado. Estos hallazgos validan el potencial de la *S. reubadiana* como agente antibacteriano natural, aunque se necesitan más investigaciones para determinar las concentraciones y métodos de aplicación óptimos en el ámbito clínico. (83)

3.3 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

Efecto antibacteriano: Es la capacidad de una sustancia para inhibir el crecimiento, la reproducción o eliminar bacterias. Puede lograrse mediante mecanismos como la alteración de la membrana celular, la inhibición de la síntesis de proteínas o la interrupción del metabolismo bacteriano. Se

evalúa comúnmente en estudios *in vitro* mediante pruebas como la medición de halos de inhibición. (84)

Microbiota bucal: Conjunto de microorganismos que habitan naturalmente en la boca, regulando la salud oral. Su equilibrio puede alterarse por dieta, higiene o antibióticos, favoreciendo enfermedades como caries o periodontitis. (85)

Glucósidos de esteviol: Compuestos dulces no cariogénicos de S. *rebaudiana* (como estevióside y rebaudiósido A) con acción antibacteriana. Inhiben biofilm de *S. mutans*, reducen adhesión y no generan ácidos como la sacarosa. (86)

Exopolisacáridos (EPS): Son polímeros secretados por bacterias que forman la matriz del biofilm, facilitando su adhesión, retención de nutrientes y resistencia antimicrobiana. Su síntesis está estrechamente relacionada con la formación de caries. (87)

Halo de inhibición: Zona clara que aparece alrededor de un agente antimicrobiano colocado sobre un medio de cultivo inoculado con bacterias. Su tamaño (en milímetros) indica el grado de sensibilidad del microorganismo al compuesto que se está estudiando. Cuanto mayor sea el halo, mayor será la inhibición del crecimiento bacteriano. Este método permite comparar el efecto de distintos extractos o sustancias. (88)

Medio de cultivo Müeller-Hinton: Es el medio de referencia estandarizado para pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Posee una composición equilibrada que favorece el crecimiento bacteriano sin interferir con la acción de los antimicrobianos. Su consistencia uniforme y bajo contenido de inhibidores lo hacen ideal para medir halos de inhibición con exactitud. (89)

Vehículo del extracto: Es la sustancia que disuelve o transporta el principio activo de un extracto vegetal (como agua, etanol o soluciones hidroalcohólicas). En estudios *in vitro*, se evalúa como control negativo para descartar que el efecto provenga del solvente. (90)

Extracción hidroalcohólica: Método común para obtener compuestos bioactivos de plantas usando una mezcla de agua y alcohol (etanol). Esta combinación permite extraer tanto compuestos polares como no polares, mejorando el rendimiento y concentración del extracto. En el caso de S. *rebaudiana*, este tipo de extracción facilita la obtención de glucósidos de esteviol con propiedades antimicrobianas. La proporción y tiempo de extracción influyen en la calidad del extracto final. (91)

Ensayo de difusión en agar (método de pozos): Técnica microbiológica que consiste en inocular un medio de cultivo con una bacteria y colocar el agente de prueba en un pozo (orificio) en el agar con un instrumento llamado sacabocado, que secciona una parte del cultivo de manera exacta, la medida de sus diámetros varían de 3 mm, 5 mm, 6 mm, 8 mm a más, sin embargo, el de 6 mm es el más usado. Tras la incubación, se mide el halo de inhibición incluido el diámetro del sacabocado para determinar el efecto antibacteriano. Es un método muy útil y reproducible para comparar distintos tratamientos. (92)

3.4 HIPÓTESIS

Hipótesis nula (H0): El extracto de *S. rebaudiana* no presenta compuestos fitoquímicos bioactivos y no tiene efecto antibacteriano a diferentes concentraciones sobre *S. mutans.*

Hipótesis Alternativa (H1): El extracto de *S. rebaudiana* presenta compuestos fitoquímicos bioactivos y tiene efecto antibacteriano a diferentes concentraciones sobre *S. mutans.*

3.5 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variables independientes

- Extracto de *S. rebaudiana*

Covariable

- Perfil fitoquímico

Variable dependiente

- Efecto antibacteriano sobre *S. mutans* (Tabla N°2)

Tabla N°2: Operacionalización de las variables

Variables	Conceptualización de variables	Dimensión	Indicador	Escala	Valor
Independiente: Extracto de *S. reubadiana*	Sustancia natural extraída de la planta *S. rebaudiana*, conocida por sus propiedades edulcorantes y potenciales efectos antibacterianos.	Concentración del extracto	Porcentaje de las concentraciones del extracto	Ordinal	• 5 % • 10 % • 15 %
Covariable: Perfil fitoquímico	Conjunto de compuestos químicos presentes en el extracto hidroalcohólico al 80 % de *S. rebaudiana* con potencial actividad biológica.	Presencia de metabolitos secundarios bioactivos	Presencia de alcaloides, compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, esteroides, glucósidos cardíacos, saponinas.	Ordinal	• **(–)** Ausente • **(+)** Presencia débil • **(++)** Presencia moderada • **(+++)** Presencia fuerte • **(++++)** Presencia muy fuerte
Dependiente: Efecto antibacteriano sobre el *S. mutans*	Capacidad del extracto para inhibir el crecimiento de *S. mutans*, evaluada por la presencia de halos de inhibición.	Inhibición del crecimiento bacteriano	Diámetros del halo de inhibición (mm) por Escala de Duraffourd	Ordinal	• **≤ 5 mm S. E. (-)** No se observa inhibición • **5 – 10 mm E. L. (+)** Inhibición débil o límite. • **11 – 20 mm E. M. (++):** Inhibición clara y efectiva. • **≥ 21 mm E.F. (+++):** Actividad inhibitoria fuerte. (31)

IV- METODOLOGÍA

4.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

La investigación es cuantitativa, prospectiva y experimental (*in vitro*).

- Según el enfoque metodológico de la investigación: **Cuantitativo**.
  Porque recolecta y analiza datos numéricos obtenidos a través de mediciones precisas, como el diámetro de los halos de inhibición, con el objetivo de verificar hipótesis mediante procedimientos estadísticos objetivos y replicables.
- Según el tiempo de ocurrencia de los hechos y el registro de datos: **Prospectiva**.
  El estudio es prospectivo, ya que los datos se recolectan en tiempo real y a futuro desde el inicio del experimento, sin recurrir a registros o datos pasados, permitiendo observar directamente el comportamiento bacteriano posterior a la exposición a los extractos evaluados.
- Según la manipulación de variables y el control de condiciones externas: **Experimental (*in vitro*)**.
  Porque se realiza bajo condiciones controladas en un entorno de laboratorio (*in vitro*), donde se manipula intencionalmente la variable independiente (extracto de *S. rebaudiana*) con el propósito de observar su efecto sobre la variable dependiente (crecimiento de *S. mutans*), lo que permite establecer relaciones causales directas entre ambas variables. (93)

4.1.1 Diseño de investigación

Diseño completamente aleatorizado de un solo factor (concentración del extracto de *S. rebaudiana*), con tres niveles de tratamiento: 5 %, 10 % y 15 %.

- Variable Independiente: Extracto de *S. rebaudiana* al 5 %, 10 % y 15 %.
- Covariable: Perfil fitoquímico
- Variable Dependiente: Efecto antibacteriano sobre *S. mutans* (medido por diámetro del halo de inhibición, en milímetros)

4.1.2 Comparación

Se evaluó y comparó el efecto antibacteriano entre las tres concentraciones del

extracto para determinar cuál presenta mayor efecto.

4.1.3 Unidad de análisis

La unidad de análisis corresponde a cada placa Petri, ya que en ella se aplican todos los procedimientos de forma simultánea, las tres concentraciones del extracto de *S. rebaudiana* (5 %, 10 % y 15 %), un control positivo y un control negativo; y se registran los halos de inhibición generados por cada uno. Estas mediciones permiten la comparación entre procedimientos dentro de cada placa bajo un enfoque de medidas repetidas.

4.2. POBLACIÓN Y MUESTRA

4.2.1. Población de estudio

Cepas estándar de *S. mutans* ATCC 25175, utilizadas para ensayos *in vitro* en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima – 2025.

4.2.2. Tamaño de muestra

Número total de placas o cultivos de *S. mutans* ATCC 25175 distribuidos equitativamente entre los tres grupos experimentales (5 %, 10 % y 15 %).

El tamaño muestral será determinado mediante cálculo estadístico para la comparación de tres medias correspondientes a tres grupos independientes de estudio: grupo control negativo, grupo control positivo y grupo experimental. Se considerará un nivel de confianza del 95 % y un poder estadístico del 80 %, para variables cuantitativas. (Anexo N°2)

Algoritmo:

$$n = \frac{(Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2 * (S_1^2 + S_2^2)}{(X_1 - X_2)^2}$$

Donde:

n: El tamaño de cada grupo de estudio, define la cantidad de individuos o unidades que conformarán cada grupo involucrado en la investigación.

Alfa (α): La probabilidad de cometer un error de Tipo I (representa el riesgo de un falso positivo; en otras palabras, rechazar la hipótesis nula cuando es verdadera).

Nivel de Confianza (1−α/2): Es la probabilidad de no cometer un Error Tipo I. Se interpreta como la certeza de que si una hipótesis nula es rechazada, esa decisión es correcta.

Beta (β): La probabilidad de cometer un error de Tipo II (indica el riesgo de un falso negativo, es decir, no detectar un efecto o diferencia real que sí existe; expresado de otra manera, aceptar la hipótesis nula cuando es falsa).

Poder Estadístico (1−β): Es la probabilidad de detectar un efecto real cuando este existe, lo que equivale a rechazar correctamente una hipótesis nula falsa. El poder del 80 % (β=0.20) es un estándar frecuente.

Z: Nivel de confianza, el valor estándar de la distribución normal que se asocia a cada tipo de error.

Valores Z tipificados (Z 1−α/2, Z 1−β): Son los valores correspondientes en la distribución normal estándar para los niveles de error y poder definidos.

$S1^2$: varianza del grupo 1, es decir, la medida que cuantifica la dispersión de los valores obtenidos en el grupo experimental respecto a su media.

$S2^2$: varianza del grupo 2, es decir, la medida que cuantifica la dispersión de los valores obtenidos en el grupo control positivo respecto a su media.

X1−X2: diferencia mínima esperada entre medias, también llamada “d”.

Resultados

- Tamaño de muestra entre el grupo 1 y 2, siendo grupo 1 el grupo experimental y el grupo 2, el control positivo: **n= 9.88**
- Tamaño de muestra entre el grupo 2 y 3, siendo grupo 2, el control positivo y el grupo 3, el control negativo: **n= 0.26**
- Tamaño de muestra entre el grupo 1 y 3, siendo grupo 1, el experimental y el grupo 3, el control negativo: **n= 0.16**

Por lo tanto: El tamaño de muestra por cada grupo es **10**.

4.2.3. Tipo de muestreo

Cada placa Petri constituirá una unidad experimental que recibirá los cinco productos de manera simultánea (3 concentraciones diferentes del grupo experimental, 1 grupo control positivo y 1 grupo control negativo), bajo un diseño factorial completamente al azar con medidas repetidas, lo que se registrará en una ficha técnica. (Anexo N°3)

4.2.4. Criterios de inclusión

- Muestras microbiológicas estandarizadas de *S. mutans* obtenidas de cultivos de cepas ATCC 25175.
- Cultivos en medio de agar BHI bajo condiciones de laboratorio.
- Extractos de *S. rebaudiana* al 5 %, 10 % y 15 %.
- Placas correctamente selladas, rotuladas y conservadas durante el procedimiento.
- Ensayos realizados en condiciones estériles, controladas y repetibles.

4.2.5. Criterios de exclusión

- Placas contaminadas o dañadas.
- Ensayos con extractos mal preparados o vencidos.
- Muestras que no cumplan las condiciones de cultivo (temperatura, tiempo de incubación, esterilidad).
- Mediciones que no permitan lectura clara del halo de inhibición.

4.2.6. Validez interna y externa

- Validez interna

La validez interna se garantiza al mantener controlado el ambiente de laboratorio, utilizar la misma cepa bacteriana y condiciones de cultivo, así como estandarizar el procedimiento de aplicación de extracto y medición del halo de inhibición. Además, se empleará un diseño experimental con repetición por concentración para reducir sesgos.

- Validez externa

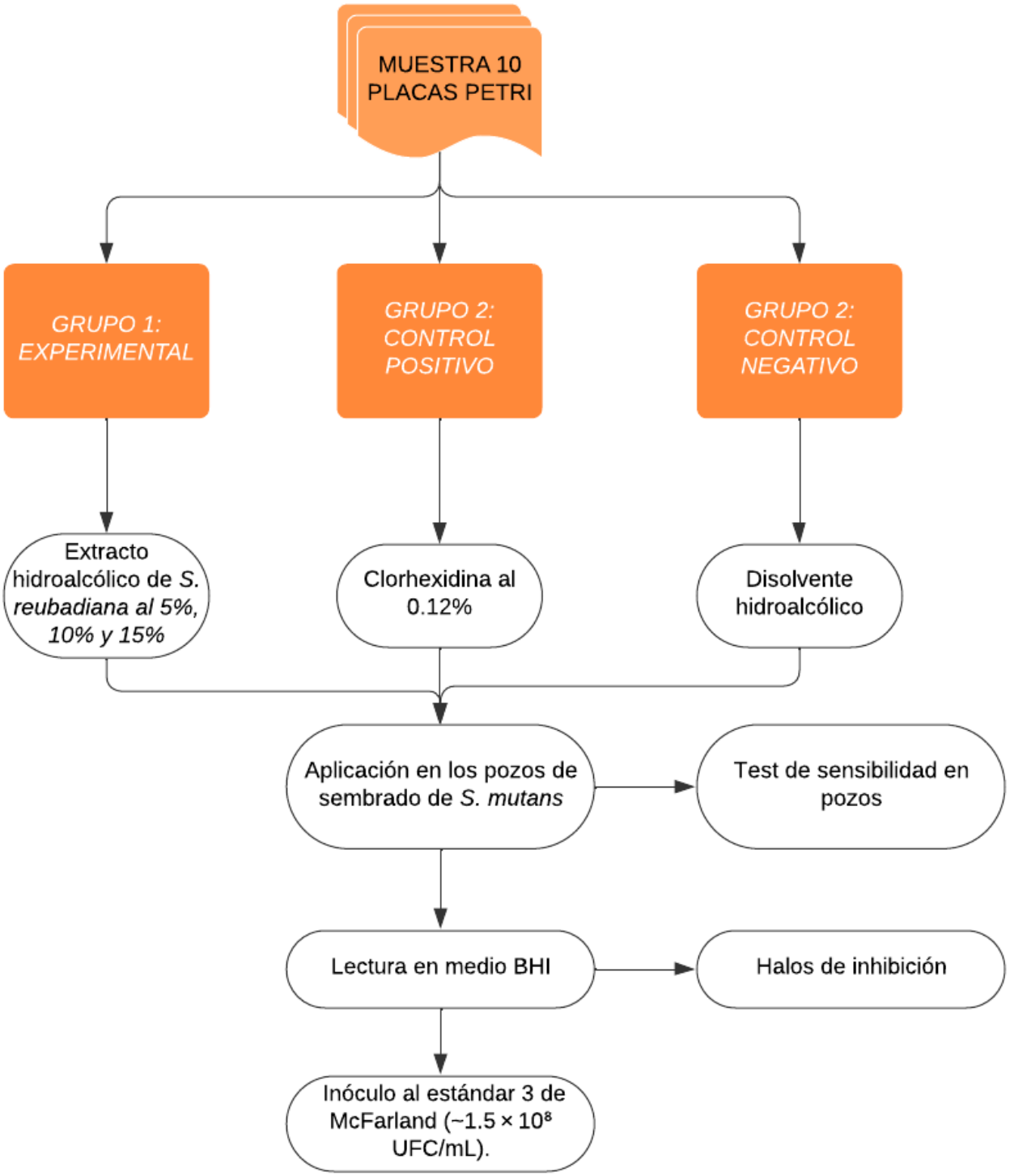
Los resultados pueden compararse con estudios previos realizados en diferentes contextos (nacionales e internacionales), ya que se usan métodos ampliamente replicables como el ensayo de difusión en agar. Esto permite extrapolar los hallazgos a otras cepas de *S. mutans* bajo condiciones similares.

4.2.7. Asignación de unidades experimentales

Las unidades experimentales (placas con cultivos de *S. mutans*) serán asignadas aleatoriamente a los diferentes productos (extracto de *S. rebaudiana* al 5 %, 10 %, 15 %), al grupo control positivo y negativo. (Anexo N°4) La aleatorización reducirá el sesgo y favorecerá la comparabilidad entre grupos. (Gráfico N°1)

4.2.8. Diseño experimental

Gráfico N°1. Diseño experimental de la metodología



4.3. PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICA

4.3.1. Autorización del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia

Se gestionaron los trámites administrativos correspondientes mediante una solicitud dirigida al jefe del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con el fin de obtener la autorización para la realización de la presente investigación. (Anexo N°5).

4.3.2. Preparación del extracto de *S. rebaudiana*

Selección: La elaboración del extracto se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, las hojas de *S. rebaudiana* fueron recolectadas en la Universidad Nacional Agraria La Molina, donde se encontraban plantas procedentes de Villa El Salvador (Lima, Perú). Para garantizar la adecuada identificación taxonómica del material vegetal, una muestra representativa fue enviada al Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, donde fue verificada y registrada antes de su procesamiento experimental, y también se otorgó la Constancia de Determinación Taxonómica N.° 173 (Anexo N°6), la cual avaló la clasificación de la planta como *"Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni"*.

Lavado, secado y pulverización: Se utilizaron 50 g de hojas de la planta *S. rebaudiana,* se limpiaron con un pañuelo húmedo en el haz y envés, colocadas sobre papel Kraft, y rociadas con alcohol al 70°, dejándolas durante 1 día en un ambiente seco y ventilado, al terminar el proceso se volvió a pesar el contenido y se obtuvo un resultado de 15 g. Posteriormente, se secaron al horno a 40 °C durante 8 días y luego se trituraron con un mortero de porcelana hasta obtener un polvo fino.

Preparación y maceración: Para la obtención del extracto hidroalcohólico al 80 % de *S. rebaudiana*, se utilizaron 15 g de hojas previamente secadas y trituradas. El solvente **hidroalcohólico** se preparó a partir de alcohol etílico al 96 %, empleando la fórmula de dilución C1V1=C2V2 para obtener un volumen final de 300 mL al 80 %. En este cálculo, C1 correspondió al 96 %, C2 al 80 % y V2 a 300 mL, obteniéndose un volumen requerido de 250 mL de alcohol al 96 %. Posteriormente, se añadieron 50 mL de agua destilada para completar el volumen y alcanzar la concentración deseada del 80 %.

Una vez preparado el solvente hidroalcohólico, se colocaron los 15 g de hojas secas de *S. rebaudiana* en un frasco y se añadieron 300 mL de la solución al 80 %, estableciendo una relación planta/solvente de 1:20, adecuada para la obtención de metabolitos solubles en medios hidroalcohólicos. La mezcla fue sometida a un proceso de

maceración con agitación durante siete días, manteniéndose en un ambiente oscuro y realizando agitación intermitente tres veces al día para favorecer la extracción de los compuestos bioactivos.

Filtrado, secado y almacenamiento: Transcurrido el periodo de maceración, la solución fue filtrada mediante papel filtro Whatman N.° 1 para eliminar residuos sólidos. Finalmente, el extracto concentrado fue transferido a una placa Petri de 10 cm de diámetro y conservado a 40 °C hasta obtener un residuo seco completamente libre de solventes, asegurando que el material final correspondiera exclusivamente a los componentes sólidos extraídos de la planta.

El extracto seco obtenido fue almacenado en la placa Petri con su tapa y conservado a 24 °C hasta su utilización en los análisis fitoquímicos y en los ensayos antibacterianos.

Una vez obtenido el extracto concentrado, se prepararon las tres soluciones experimentales (5 %, 10 % y 15 %), diluidas con dimetilsulfóxido estéril según correspondió. (94)

4.3.3. Perfil fitoquímico

Antes de evaluar el efecto antibacteriano, fue necesario caracterizar los compuestos bioactivos del extracto vegetal. Las plantas contienen metabolitos primarios, como carbohidratos, lípidos y proteínas, esenciales para su estructura y metabolismo, pero sin relevancia directa en la acción antibacteriana. Por ello, el análisis se centró en los metabolitos secundarios, responsables de la mayoría de las propiedades biológicas. Para identificarlos, se realizó la determinación cualitativa del extracto hidroalcohólico al 80 % de *S. rebaudiana* mediante la marcha fitoquímica con protocolos estandarizados. A continuación, se presenta la tabla que describe el reactivo utilizado, el procedimiento aplicado y el resultado observado en cada prueba fitoquímica; la interpretación final de cada metabolito será desarrollada en la sección de Resultados. (Tabla N°3)

Tabla N°3. Metodología utilizada en la determinación de componentes fitoquímicos principales

Grupo	Descripción de procedimiento
Alcaloides	1 mL del extracto puro en proporción 1mg/ 1mL se le agregó 2 mL del reactivo de Dragendorff (solución de yoduro de bismuto potásico)
Flavonoides	1 mL del extracto puro en proporción 1 mg/ 1 mL se le agregó 2 mL del reactivo de $AlCl_3$ (tricloruro de aluminio)
Saponinas	1 mL del extracto puro en proporción 1 mg/ 1 mL se le agregó 3 mL de agua destilada, y se agitó constantemente durante 20 segundos
Taninos	1 mL del extracto puro en proporción 1 mg/ 1 mL se le agregó 3 mL del reactivo de $FeCl_3$ (cloruro férrico)
Terpenoides	suspender 1 mg de extracto seco en 0,5 mL de cloroformo, y añadir 5 gotas de ácido sulfúrico
Fenoles	1 mL del extracto puro en proporción 1 mg/ 1 mL se le agregó 2 mL del reactivo de Folin–Ciocalteu (sales de tungsteno y molibdeno)

El extracto obtuvo fue sometido a pruebas específicas con reactivos que generan reacciones de precipitación o cambios de color, permitiendo reconocer la presencia de distintas familias de metabolitos. Se evaluaron los siguientes grupos químicos: alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos y terpenoides, los principales grupos evaluados en una marcha fitoquímica porque constituyen los metabolitos secundarios

con mayor relevancia biológica, farmacológica y antimicrobiana en las plantas. Estos compuestos son responsables de la mayoría de actividades bioactivas, incluyendo efectos antibacterianos, antioxidantes, antiinflamatorios y citotóxicos, y presentan estructuras químicas características que permiten su identificación mediante reacciones cualitativas específicas. Por ello, su detección es esencial para caracterizar el potencial terapéutico de un extracto vegetal y constituye el estándar internacional en análisis fitoquímico preliminar. (38)

Este procedimiento permitió establecer el perfil fitoquímico del extracto en estudio, el cual fue correlacionado posteriormente con su efecto antibacteriano *in vitro* sobre *S. mutans*. (38,95)

4.3.4. Procedimiento experimental del efecto antibacteriano *in vitro*

Para cada repetición del experimento se utilizaron dos placas Petri. En la primera placa se realizaron tres pocillos equidistantes, correspondientes a las tres concentraciones del extracto de *S. rebaudiana* evaluadas (5 %, 10 % y 15 %). En una segunda placa independiente se realizaron dos pocillos, destinados a los controles: control positivo (clorhexidina al 0.12 %) y control negativo (dimetilsulfóxido). Este procedimiento se repitió diez veces, empleando una placa para los extractos y otra para los controles en cada repetición. (96)

La preparación de los cultivos bacterianos se realizó utilizando cepas puras de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, reactivadas en caldo BHI (Brain Heart Infusion) mediante incubación a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente, el cultivo se ajustó al estándar 3 × 10^8 UFC/mL de McFarland, con el fin de asegurar una concentración homogénea del inóculo. Este ajuste se realizó tras estudios piloto previos, en los que se evaluaron los estándares 1,5, 2 y 2,5 de McFarland sin evidenciar crecimiento bacteriano adecuado, observándose desarrollo óptimo recién al emplear el estándar 3, lo que permitió garantizar la viabilidad y reproducibilidad del ensayo experimental. Inmediatamente después, se sembró en el medio BHI, el cual permite una adecuada visualización del crecimiento bacteriano, por lo que se empleó la técnica de siembra en vertido, el medio de cultivo BHI se vertió cuidadosamente sobre la base de la placa que contenía el cultivo con la cepa, permitiendo que se distribuya de manera uniforme con unos movimientos circulares ligeros. Posteriormente, se dejó solidificar por completo durante 15 minutos, asegurando que la superficie quede firme y apta para la siembra. Luego de ese tiempo transcurrido, se realizaron los pocillos con un sacabocado estéril de 0,9 mm de diámetro y en ellos se colocaron 30 µL de cada una de las soluciones respectivas. Inmediatamente después, las placas sembradas fueron selladas con cinta

parafilm, y se incubaron a una temperatura controlada de 37 °C durante un período de 24 horas. (97)

La humedad relativa se controló mediante el uso de placas cerradas para evitar desecación del medio. El tiempo de incubación se registró con precisión desde el momento en que la última placa se colocó en la incubadora. (98)

4.3.5. Lectura de resultados

Transcurridas las 24 horas, se procedió a la medición del halo de inhibición antibacteriana en milímetros utilizando un calibrador Vernier. Cada halo se midió en dos direcciones perpendiculares y se tomó el promedio de ambas para mayor precisión y confiabilidad en los datos. (99)

4.3.6. Instrumento de recolección de datos

Los resultados obtenidos se registraron en una ficha técnica diseñada específicamente para el estudio, donde se anotaron el código de la placa, el tratamiento aplicado en cada pocillo, el valor del halo de inhibición en milímetros. (100)

4.4. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS

Se procedió al procesamiento automatizado utilizando el software estadístico SPSS versión 25, el cual permitió realizar tanto el análisis descriptivo como el inferencial de los datos, según los objetivos específicos del estudio. El análisis estadístico se desarrolló con un nivel de significancia del 5 % ($p < 0.05$) y un nivel de confianza del 95 %, con el fin de asegurar la validez de los resultados obtenidos y su aplicabilidad en contextos similares. Para el análisis descriptivo de los valores de halo de inhibición se calcularon medidas de tendencia central como la media y medidas de dispersión como la desviación estándar para cada grupo de tratamiento.

Posteriormente, se verificó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Dado que los valores p obtenidos menores de 0,05, se determinó que los datos no cumplían con el supuesto de normalidad, por lo que correspondió emplear estadística no paramétrica. En consecuencia, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar los diámetros de los halos de inhibición entre los diferentes grupos de tratamiento, al ser la prueba adecuada para distribuciones no normales y para comparar más de dos grupos independientes.

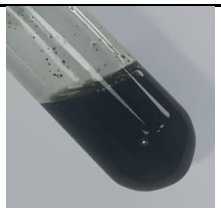
4.4.1. Aspectos éticos

Este estudio fue evaluado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos con la CONSTANCIA DE APROBACIÓN N°073-CEI-FO-2025 (Anexo N°7), garantizando que se cumplieran los principios éticos establecidos para investigaciones científicas. Dado que se trató de un estudio *in vitro*, no se utilizaron muestras biológicas humanas ni se involucró directamente a personas como sujetos de estudio. Sin embargo, se tomaron en cuenta las normas de bioseguridad para el manejo de microorganismos y materiales de laboratorio, conforme a los lineamientos de la institución y de la normativa nacional vigente en investigaciones microbiológicas. (101)

Todos los procedimientos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la UNMSM, bajo condiciones controladas, con materiales esterilizados y manipulación adecuada de *S. mutans*, con el objetivo de asegurar la integridad de los resultados, el respeto por las buenas prácticas científicas y la seguridad del equipo investigador, lo cual quedó registrado en fotografías (Anexo N°8). Asimismo, se elaboró una solicitud formal para obtener la autorización correspondiente por parte del jefe del laboratorio, adjuntando el proyecto, donde está incluido el protocolo de investigación y el cronograma de trabajo.

V. RESULTADOS

Tabla N°4. Perfil fitoquímico cualitativo del extracto hidroalcohólico de *S. rebaudiana* al 80%

Metabolito evaluado	Reactivo utilizado	Fotografía de la reacción	Reacción observada	Resultado (+ / ++ / +++ / ++++)
Alcaloides	Dragendorff		Precipitado turbio de color naranja/ rojizo	+++
Flavonoides	Tricloruro de aluminio		Color amarillo turbio	+++
Saponinas	Agua destilada		Espuma en la superficie	++++
Taninos	Cloruro férrico		Color verde oscuro/ verde azulado	++++
Terpenoides	Ácido sulfúrico		Anillo marrón-rojizo en la interfaz	++++
Fenoles	Folin–Ciocalteu		Coloración azul	+++

5.1. Descripción e interpretación de los resultados de la marcha fitoquímica

Los resultados obtenidos fueron registrados en una ficha técnica y luego codificados en función de la intensidad de la reacción observada, siguiendo una escala ordinal cualitativa: (–) Ausente, (+) Presencia débil, (++) Presencia moderada, (+++) Presencia fuerte y (++++) Presencia muy fuerte. (Tabla N°4)

5.1.1. Alcaloides

El uso del reactivo de Dragendorff en el extracto de *S. rebaudiana* resultó en la aparición de precipitados de color naranja, lo que indica la presencia de alcaloides en la muestra. Este fenómeno se debe a la reacción entre los alcaloides y los complejos de yoduro-bismutato presentes en el reactivo, que forman sales insolubles que se manifiestan como precipitados de color característico. La formación de estos precipitados es un indicador clave en la identificación de compuestos nitrogenados, como los alcaloides, que son detectables mediante este reactivo. (102)

5.1.2. Flavonoides

La coloración amarilla obtenida en la reacción con tricloruro de aluminio se explica por la formación de un complejo estable entre el $AlCl_3$ y los grupos hidroxilo fenólicos presentes en los flavonoides del extracto de *S. rebaudiana*. Este ión aluminio se combina con los oxígenos del anillo benzénico, generando un complejo flavonoide Al^{3+} que presenta absorción en la región visible, manifestándose como un tono amarillo característico. Esta reacción es específica para estructuras con grupos –OH libres, por lo que su positividad confirma la presencia de flavonoides en el extracto. (103)

5.1.3. Saponinas

La espuma persistente observada en la prueba se explica por la estructura química de las saponinas, formadas por un aglicón triterpénico o esteroidal unido a uno o varios azúcares. Esta configuración les confiere un carácter tensioactivo natural, ya que el núcleo lipofílico (aglicón) interactúa con fases

hidrofóbicas mientras los azúcares hidrofílicos se orientan hacia el agua. Al agitar el extracto de *S. rebaudiana*, las saponinas se organizan espontáneamente formando micelas y monocapas que estabilizan las burbujas de aire, impidiendo que colapsen. Por ello, la presencia de espuma estable por más de 10 minutos constituye un indicador bioquímico confiable de saponinas en el extracto. (38)

5.1.4. Taninos

En la prueba con cloruro férrico, el extracto hidroalcohólico de *S. rebaudiana* desarrolló una coloración verde azulado oscuro, lo que indicó la presencia de taninos. Este resultado se explica porque el ión férrico (Fe^{3+}) tiene alta afinidad por los grupos hidroxilo fenólicos de los taninos, formando complejos Fe^{3+} tanino. En el caso de los taninos condensados, estos complejos generan una tonalidad verde característica debido a su menor grado de hidrólisis y a la estructura polimérica de sus flavanoles. La formación de este color específico demuestra que el extracto contiene taninos condensados, ya que su estructura aromática rica en grupos –OH permite la coordinación con Fe^{3+} y la aparición del cambio colorimétrico. (104)

5.1.5. **Terpenoides**:

En la prueba de Salkowski aplicada al extracto de *S. rebaudiana*, la aparición de una coloración marrón-rojiza en la interfaz entre el extracto disuelto en cloroformo y el ácido sulfúrico concentrado confirmó un resultado positivo para terpenoides. Este color se genera porque el ácido sulfúrico actúa como un agente fuertemente deshidratante y protonante, reaccionando con los dobles enlaces presentes en el esqueleto isoprenoide de los terpenoides. Al protonarse estas estructuras, se forman carbocationes conjugados que absorben luz en el rango visible, manifestándose como la tonalidad marrón-rojiza característica. Por ello, este cambio de color constituye un indicador bioquímico específico de la presencia de terpenoides. (105)

5.1.6. Fenoles

El empleo del reactivo de Folin–Ciocalteu en el extracto de *S. rebaudiana* produjo una coloración azul intenso, lo que confirma la presencia de compuestos fenólicos en la muestra. Esta reacción se origina por la reducción de los complejos fosfomolibdato-fosfotungstato del reactivo por los grupos hidroxilo fenólicos presentes en el extracto, dando lugar a la formación de óxidos de molibdeno y tungsteno de color azul. La intensidad de esta coloración es proporcional a la cantidad de fenoles totales presentes, constituyendo un método ampliamente aceptado para la identificación y estimación de compuestos fenólicos, los cuales se asocian con la actividad antioxidante del extracto vegetal. (106)

5.2. Halos de inhibición de los grupos experimentales y los grupos de control

Tabla N°5. Halos de inhibición del extracto hidroalcohólico de *S. rebaudiana* al 5 %, 10 %, 15 %, control positivo y control negativo, sobre *S. mutans*

Halo de inhibición (mm)	Extracto al 5%	Extracto al 10%	Extracto al 15%	Control positivo (clorhexidina al 0,12%)	Control negativo (dimetilsulfóxido)
Media	0,00	0,00	15,20	16	0,00
Desviación estándar	0,00	0,00	0,79	1,25	0,00
Valor máximo	0,00	0,00	16	19	0,00
Valor mínimo	0,00	0,00	14	15	0,00

Halos de inhibición del extracto hidroalcohólico de *S. rebaudiana* al 5 % sobre *S. mutans*

En el análisis estadístico realizado para evaluar la zona de inhibición del extracto hidroalcohólico de *S. rebaudiana f*rente a *S. mutans*, se observó que la concentración al 5% no generó ningún halo de inhibición, registrando un promedio de 0 mm en las diez mediciones realizadas. Esta ausencia total

de efecto antibacteriano contrasta de manera marcada con los valores obtenidos en otra concentración evaluada, las cuales sí mostraron halos de inhibición medibles (Tabla N°5).

En conjunto, estos hallazgos demuestran que el extracto etanólico al 5% no exhibe actividad inhibitoria frente a *S. mutans* (Tabla N°5).

Halos de inhibición del extracto hidroalcohólico de *S. rebaudiana* al 10 % sobre *S. mutans*

En el análisis estadístico realizado para evaluar la zona de inhibición del extracto hidroalcohólico de *S. rebaudiana f*rente a *S. mutans*, se observó que la concentración al 10% no generó ningún halo de inhibición, registrando un promedio de 0 mm en las diez mediciones realizadas. Esta ausencia total de efecto antibacteriano contrasta de manera marcada con los valores obtenidos en otra concentración evaluada, las cuales sí mostraron halos de inhibición medibles (Tabla N°5).

Halos de inhibición del extracto hidroalcohólico de *S. rebaudiana* al 15 % sobre *S. mutans*

El análisis descriptivo del halo de inhibición correspondiente al extracto hidroalcohólico de *S. rebaudiana* al 15% mostró un comportamiento homogéneo y concentrado alrededor de valores altos, lo que indica un efecto antibacteriano consistente frente a *S. mutans*. Se registraron 10 mediciones válidas (n = 10) y ninguna pérdida. La media del halo de inhibición registrada fue de 15,20 mm.

La variabilidad fue baja: la desviación estándar fue de 0,79 mm y el rango de solo 2 mm, con valores mínimos y máximos de 14 mm y 16 mm, respectivamente (Tabla N°5).

Halos de inhibición del control positivo (clorhexidina al 0,12%)

El análisis descriptivo del halo de inhibición correspondiente al control positivo, representado por clorhexidina al 0,12%, evidenció un

comportamiento altamente efectivo y consistente frente a *S. mutans.* Se registraron 10 mediciones válidas (n = 10) sin pérdidas. La media se registró con 16,00 mm, lo que refleja una distribución centrada y estable alrededor de este valor. Esta concordancia entre ambas medidas indica que no hubo asimetrías importantes en los datos y sugiere una respuesta antibacteriana uniforme dentro del grupo. En cuanto a la variabilidad, la desviación estándar fue de 1,25 mm, mostrando una dispersión moderada en los halos obtenidos. Se registraron valores mínimos de 15 mm y máximos de 19 mm (Tabla N°5).

Halos de inhibición del control negativo (dimetilsulfóxido)

El análisis descriptivo del halo de inhibición correspondiente al dimetilsulfóxido (DMSO), que es el control negativo, mostró ausencia total de efecto antibacteriano frente a *S. mutans*. Se registraron 10 mediciones válidas (N = 10) sin pérdidas. La media fue de 0,00 mm, y la desviación estándar de 0,00, lo que indica que no existió variabilidad entre las mediciones. El rango fue 0, con valores mínimos y máximos iguales a 0 mm, demostrando que en todas las repeticiones el DMSO no produjo ningún halo de inhibición (Tabla N°5).

Tabla N°6. Efecto antibacteriano *in vitro* de tres concentraciones de extracto hidroalcohólico de hoja de *S. rebaudiana* sobre *S. mutans* ATCC 25175

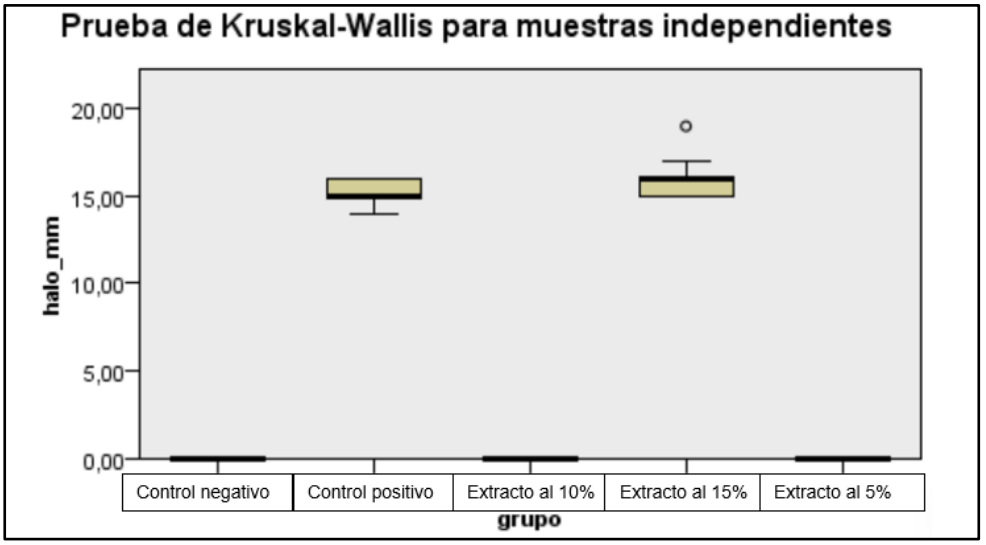
		Diámetro (mm)		
Tratamientos	**n**	**Media (mm)**	**Desviación estándar**	**p***
S. rebaudiana al 5%	10	0,00 [a]	0,00	< 0,001
S. rebaudiana al 10%	10	0,00 [a]	0,00	
S. rebaudiana al 15%	10	15,20 [b]	0,79	
Clorhexidina 0,12%	10	16 [b]	1,25	
Dimetilsulfóxido (DMSO)	10	0,00 [a]	0,00	

p prueba Kruskal Wallis*

Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa

Fuente: Datos propios obtenidos de medición.

Gráfico N°2. Gráfico de cajas (Boxplot) según la prueba de Kruskal–Wallis para muestras independientes



Para relacionar la variable del extracto de *S. rebaudiana* al 5 %, 10 % y 15 % y el efecto antibacteriano sobre *S. mutans* se utilizó la prueba de Kruskal–Wallis, la cual mostró un valor de significancia $p < 0,001$, menor que el nivel de significancia establecido ($\alpha = 0,05$). Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula, que afirmaba que la distribución del diámetro del halo de inhibición (halo_mm) es la misma entre los diferentes grupos evaluados (Tabla 6). Este resultado indica que existen diferencias estadísticamente significativas en los halos de inhibición entre al menos uno de los grupos de concentración del extracto de *S. rebaudiana* y los controles, en el grupo de concentración al 15% con el valor de 0,79.. Asimismo, el boxplot evidencia que los grupos correspondientes a los extractos al 5 % y 10 %, así como el control negativo, presentan valores de cero, mientras que el extracto al 15 % y el control positivo muestran valores claramente superiores, concordantes con las diferencias observadas en la prueba estadística (Tabla N°6, Gráfico N°2).

VI. DISCUSIÓN

Del estudio realizado, en primer lugar se evidenció que el extracto de *S. rebaudiana* presentó un perfil fitoquímico caracterizado por la presencia de metabolitos secundarios como compuestos fenólicos y flavonoides. La presencia de estos compuestos sugiere la disponibilidad de sustancias bioactivas con capacidad de influir en el crecimiento bacteriano; sin embargo, su acción parecería depender de la cantidad presente en el extracto, ya que una menor disponibilidad de estos metabolitos podría limitar la expresión de su efecto biológico, mientras que su presencia en una concentración mayor, como la evaluada en el estudio, favorece la manifestación de la actividad inhibitoria frente a *S. mutans*. En relación con el efecto antibacteriano, se demostró que el extracto presentó actividad frente a *S. mutans* únicamente en su concentración más elevada, ya que el extracto al 15 % generó halos de inhibición mayores y estadísticamente consistentes. La ausencia de efecto observable en las concentraciones del 5 % y 10 % puede atribuirse a una menor disponibilidad de metabolitos bioactivos, cuya cantidad resultaría insuficiente para ejercer una acción inhibitoria efectiva sobre el crecimiento bacteriano. Asimismo, la respuesta observada en el control positivo (clorhexidina al 0,12 %) y la ausencia total de inhibición en el control negativo validan el comportamiento esperado de ambos controles, confirmando la confiabilidad del diseño experimental y la adecuada interpretación del efecto antibacteriano del extracto evaluado. En conjunto, los resultados sugieren que la presencia de un perfil fitoquímico con mayor disponibilidad de metabolitos activos se relaciona con la capacidad inhibitoria observada frente a *S. mutans*, destacando la importancia de la concentración del extracto en la manifestación de su efecto antibacteriano.(28–38).

En el estudio, se observó que el extracto hidroalcohólico de *S. rebaudiana* al 15 % generó inhibición significativa frente a *S. mutans*, respaldada por la identificación de metabolitos secundarios como flavonoides, taninos, compuestos fenólicos y saponinas en la marcha fitoquímica, todos asociados a efectos antibacterianos. En comparación, Sultana y cols. (2025) (28) demostraron que los extractos metanólicos y etanólicos de *S. rebaudiana* presentan una actividad antimicrobiana más marcada, con halos de inhibición entre 8 y 18 mm y una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 1 mg/mL. La principal diferencia radica en el tipo de extracto y la evaluación de múltiples

especies bacterianas, incluyendo Gram positivas y negativas, mientras que la investigación actual se centró exclusivamente en *S. mutans*. Aun así, ambos estudios coinciden en que la composición fitoquímica de *S. rebaudiana* determina su capacidad antibacteriana, aunque las variaciones en solvente, concentración y metodología de extracción modulan la magnitud del efecto, reforzando la relevancia biológica de la planta frente a microorganismos orales.

Al comparar los resultados obtenidos con lo reportado por Aleksanyan y cols. (2025) (29), se observa una coincidencia en cuanto al rol determinante de los compuestos bioactivos presentes en *S. rebaudiana* sobre su capacidad antimicrobiana. Dichos autores demostraron que tanto los extractos acuosos como etanólicos exhibían actividad inhibitoria frente a diversas especies, incluidas levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y hongos como *Candida albicans*, observándose una mayor eficacia cuando los extractos se incorporaban a matrices lácteas fermentadas. Esta relación entre contenido fitoquímico y actividad biológica es consistente con el perfil fitoquímico identificado en la presente investigación, donde se confirmó la presencia de flavonoides, taninos, compuestos fenólicos y saponinas, metabolitos ampliamente asociados a mecanismos de inhibición microbiana. Aunque Aleksanyan y cols. evaluaron un espectro más amplio de microorganismos y una aplicación tecnológica distinta, ambos estudios coinciden en que la concentración del extracto y la naturaleza del solvente modulan el efecto antimicrobiano. Esta convergencia respalda la interpretación de que la inhibición observada sobre *S. mutans* en el estudio actual se encuentra directamente relacionada con la composición fitoquímica del extracto hidroalcohólico empleado.

En relación con los hallazgos de Ye y cols. (2025) (30), se observa una coincidencia fundamental en cuanto a la relevancia del perfil fitoquímico de *S. rebaudiana* para explicar su actividad biológica. Estos autores caracterizaron extractos etanólicos mediante técnicas avanzadas como LC–ESI-MS/MS y HPLC, identificando glicósidos de esteviol —como

Stevioside y *Rebaudioside A*— que constituyen metabolitos clave en la planta. Aunque su estudio se centró en líneas celulares y no en actividad antimicrobiana, los resultados mostraron efectos biológicos dependientes de la concentración, lo que coincide con el comportamiento observado en el análisis antibacteriano del presente trabajo, donde solo el extracto más

concentrado mostró inhibición significativa frente a *S. mutans*. Asimismo, ambos estudios comparten la premisa de que la eficacia del extracto está directamente asociada a la composición química obtenida mediante solventes orgánicos, destacándose la importancia del método de extracción para maximizar la presencia de metabolitos bioactivos. De esta manera, aun cuando el enfoque experimental difiere, la evidencia reportada por Ye y cols. respalda la interpretación de que la actividad antibacteriana observada en el extracto hidroalcohólico empleado se sustenta en su perfil fitoquímico.

En concordancia con lo reportado por Iawsipo y cols. (2024) (31), quienes demostraron que los extractos con mayor contenido de compuestos fenólicos y flavonoides, particularmente aquellos obtenidos mediante mezclas hidroalcohólicas etanol/agua, generaban halos de inhibición significativamente superiores, nuestros resultados mostraron un comportamiento similar. En el presente estudio, únicamente el extracto concentrado al 15 % produjo un halo inhibidor relevante frente a *S. mutans*, lo cual coincide con la evidencia de que un perfil fitoquímico más rico en metabolitos activos potencia el efecto antibacteriano. Esta correspondencia no solo se explica por la composición química del extracto, sino también por la metodología empleada: utilizamos un extracto hidroalcohólico al 80 % obtenido mediante maceración prolongada con agitación diaria, procedimiento que favorece la solubilización de compuestos polares y semipolares, del mismo modo que en el estudio de referencia. Además, ambos trabajos aplicaron el método de difusión en agar y la medición directa del halo de inhibición, lo que fortalece la comparación experimental y respalda la consistencia de los resultados obtenidos.

Los resultados obtenidos en el estudio guardan relación con lo reportado por Chakma y cols. (2023) (32), quienes demostraron que la eficacia biológica de *S. rebaudiana* depende directamente de la técnica de extracción y del contenido fitoquímico resultante, particularmente de fenoles y flavonoides. En su investigación, los extractos obtenidos mediante método *shaker* —especialmente el hidroalcohólico al 80 %— alcanzaron los mayores niveles de flavonoides (34,14–70,41 mg QE/g) y las zonas de inhibición más amplias, evidenciando que la solubilización de metabolitos polares y semipolares incrementa el efecto antibacteriano. Esta tendencia coincide con el comportamiento observado en el análisis *in vitro* del presente estudio, donde únicamente la concentración más elevada mostró inhibición significativa

frente a *S. mutans*, lo que refuerza la asociación entre concentración de compuestos bioactivos y eficacia antimicrobiana.

En el estudio, el extracto hidroalcohólico de *S. rebaudiana* generó halos de inhibición frente a *S. mutans* que aumentaron con la concentración, alcanzando valores similares a los reportados por Mendoza y cols. (2021) (33), quienes evaluaron edulcorantes comerciales basados en *S. rebaudiana* y observaron halos de 11–12 mm frente a *S. mutans*. La comparación indica que los edulcorantes comerciales contienen formulaciones estabilizadas y posiblemente purificadas, lo que podría incrementar la disponibilidad de metabolitos activos, mientras que el extracto hidroalcohólico del presente estudio depende estrictamente de su eficiencia extractiva y del perfil fitoquímico obtenido. Aun con estas diferencias, ambos trabajos coinciden en confirmar el efecto inhibidor de *S. rebaudiana* sobre *S. mutans*, aunque Mendoza y cols. identificaron variaciones significativas entre marcas comerciales, lo que sugiere que la composición química influye directamente en la magnitud del halo de inhibición, fenómeno también observado en la marcha fitoquímica de la investigación desarrollada.

En el estudio, los halos de inhibición frente a *S. mutans* fueron menores en comparación con los reportados por Sultana y cols. (2020) (34), quienes evaluaron fracciones purificadas de *S. rebaudiana* mediante partición de Kupchan. Este procedimiento permitió aislar compuestos específicos de la planta, lo que se tradujo en una mayor actividad antimicrobiana, con halos de inhibición más amplios y IC_{50} más bajos que los observados en la investigación actual. En contraste, el extracto hidroalcohólico empleado no fue fraccionado, dispersando los compuestos activos dentro de la matriz vegetal y disminuyendo la concentración de metabolitos bioactivos disponibles para inhibir el crecimiento bacteriano. A pesar de estas diferencias metodológicas, ambos estudios coinciden en la presencia de flavonoides, taninos, saponinas y alcaloides, relacionados con el efecto antimicrobiano. Esta comparación resalta que la concentración y pureza de los compuestos son determinantes en la magnitud del efecto antibacteriano, siendo más pronunciada en las fracciones purificadas debido a la mayor disponibilidad de metabolitos activos.

Los resultados obtenidos en el estudio actual indican que el extracto hidroalcohólico al 80 % de *S. rebaudiana* mostró halos de inhibición con un promedio de 14 mm frente a *S. mutans*, indicando una sensibilidad intermedia de la bacteria a los compuestos fenólicos y flavonoides presentes en el

extracto. Al compararlo con Brañez y cols. (2018) (35), quienes evaluaron *Actinomyces viscosus* y *Streptococcus sanguinis* con discos impregnados de 10 µL de extracto a concentraciones de 15 a 120 mg/ml, se observa que los halos de *Streptococcus sanguinis* fueron menores (6,8–8,3 mm) y solo *Actinomyces viscosus* mostró una inhibición significativa (7,2–9,65 mm). Esta confrontación evidencia que *S. mutans* en el estudio actual es más sensible que *Streptococcus sanguinis*, a pesar de que las concentraciones usadas por Brañez y cols. fueron más altas. La diferencia podría explicarse por la técnica de pozos estandarizados y por la mayor difusión del extracto hidroalcohólico al 80 %, que facilita la solubilización de los compuestos fenólicos. Así, mientras Brañez y cols. reporta actividad limitada frente a *Streptococcus sanguinis*, los resultados de este estudio muestran que la metodología y el tipo de extracto pueden incrementar la eficacia antibacteriana frente a especies distintas, reforzando que la actividad de *S. rebaudiana* depende tanto del microorganismo como de las condiciones experimentales.

En este estudio, el extracto hidroalcohólico de *S. rebaudiana* mostró actividad antibacteriana frente a *S. mutans*, con halos de inhibición de 14 mm, atribuible a la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides solubles en hidroalcohol. Al contrastarlo con los hallazgos de Miranda y Luz (2017) (36), quienes evaluaron extractos obtenidos con disolventes de distinta polaridad y reportaron que el extracto en hexano presentó el mayor efecto antibacteriano, se observa que la menor actividad registrada en este estudio puede explicarse porque los extractos hidroalcohólicos no extraen eficientemente los compuestos no polares responsables de la actividad en hexano. No obstante, ambos estudios coinciden en que *S. rebaudiana* posee actividad inhibitoria, aunque con magnitudes distintas según el tipo de solvente empleado. Esta comparación resalta la importancia del método de extracción para interpretar correctamente la eficacia antibacteriana de los extractos vegetales.

En el estudio, el extracto hidroalcohólico de *S. rebaudiana* mostró la presencia de compuestos bioactivos, tal como se evidenció en la marcha fitoquímica, lo que se traduce en efecto antibacteriano frente a *S. mutans* con halos de inhibición de 16 mm. Al contrastar estos hallazgos con los reportados por Howlader y cols. (2016) (37), se observa que sus extractos obtenidos con distintos solventes, especialmente metanol, presentaron mayores concentraciones de metabolitos, lo que explica la mayor potencia antibacteriana registrada en su estudio. Además, Howlader y cols. confirmó

que la cantidad de metabolitos solubles depende estrictamente del solvente empleado, proporcionando un contexto para interpretar la magnitud de los halos obtenidos en la investigación actual. En conjunto, ambos estudios coinciden en la riqueza fitoquímica de *S. rebaudiana*, pero difieren en el rendimiento cuantitativo de los compuestos bioactivos, lo que influye directamente en el efecto inhibitorio frente a *S. mutans*.

VII. CONCLUSIONES

- El extracto hidroalcohólico de *S. rebaudiana* presenta un perfil fitoquímico rico en metabolitos secundarios bioactivos. Se evidenció presencia de alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos, terpenoides y flavonoides lo que respalda el potencial antibacteriano del extracto.
- El extracto de *S. rebaudiana* mostró efecto antibacteriano frente a *S. mutans* únicamente en la concentración del 15 %, lo que demuestra que el efecto antibacteriano depende directamente del incremento en la concentración del extracto, un efecto antibacteriano consistente, parecida al de la clorhexidina al 0,12 %.
- El efecto antibacteriano del extracto de *S. rebaudiana* se evidenció únicamente a partir de la concentración del 15 %, mientras que las concentraciones del 5 % y 10 % no generaron halos de inhibición, lo que sugiere la existencia de una concentración umbral a partir de la cual el extracto comienza a ejercer actividad antibacteriana.

VIII. RECOMENDACIONES

- **Evaluar concentraciones superiores al 15 %.**
  Dado que el extracto al 15 % fue el único con efecto antibacteriano, se recomienda estudiar concentraciones mayores para determinar el nivel de máxima eficacia y establecer un posible umbral terapéutico.

- **Incorporar análisis cuantitativo de metabolitos secundarios.**
  La marcha fitoquímica permitió identificar compuestos, pero no cuantificarlos. Se sugiere emplear técnicas instrumentales como HPLC, espectrofotometría UV-Vis o GC–MS para correlacionar la cantidad de flavonoides, taninos y terpenoides con la magnitud del efecto antibacteriano.

- **Aplicar métodos microbiológicos complementarios.**
  Se recomienda incluir pruebas como concentración mínima inhibitoria, curvas de muerte bacteriana y ensayos sobre biopelículas para profundizar en la evaluación del efecto sobre *S. mutans*.

- **Evaluar distintos solventes de extracción.**
  Se sugiere estudiar extractos obtenidos con otros disolventes, ya que la solubilidad de los compuestos activos puede variar y modificar su actividad antibacteriana.

- **Desarrollar estudios posteriores *in vivo*.**
  Aunque los resultados *in vitro* muestran un efecto antibacteriano relevante, estos no pueden extrapolarse directamente a la cavidad oral; por ello, se recomienda realizar estudios en condiciones que simulen el entorno bucal, incluyendo evaluaciones en saliva artificial, ensayos con biopelículas dentales y estudios clínicos en humanos.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Guerra-López W, Fernández-Cobo L, Cubero-González R, López-Martín D. Caries dental y factores asociados en población de 5-12 años. Rev médica electrón [Internet]. 2023 [citado 14 mar 2025];45(5):753-67. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1684-18242023000500753

2. Vista de Streptococcus mutans, principal cariogénico de la cavidad bucal [Internet]. 2025 [citado 23 de nov de 2025]. Disponible en: https://revprogaleno.sld.cu/index.php/progaleno/article/view/233/222

3. Listl S, Bärnighausen T. Oral health as a marker of social progress. J Dent Res [Internet]. 2025 [citado 24 nov 2025];104(8):820-7. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1177/00220345251324120

4. Luan Y, Sardana D, Jivraj A, Liu D, Abeyweera N, Zhao Y, et al. Universal coverage for oral health care in 27 low-income countries: a scoping review. Glob Health Res Policy [Internet]. 2024 [citado 10 sep de 2025];9(1):34. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1186/s41256-024-00376-9

5. Echevarria-Goche A, Solis-Sánchez G, Tuesta-Orbe LV, Andamayo-Flores C, Vidal-Anzardo M. National priorities for oral health research, Peru 2022-2026: process, experiences and perspectives. Rev Peru Med Exp Salud Publica [Internet]. 2023 [citado 28 jul de 2024];40(3):354-63. Disponible en: http://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2023.403.12082

6. Montalvo Otivo JM, Flores Miranda C, Mancilla Condor JL, Carbajal Cuadros LN, Leon Gomez R. Efecto del manitol y sorbitol en la conservación in vitro de Solanum tuberosum L. Revista Alfa [Internet]. 2025 [citado 27 de dic de 2025];9(25):90-104. Disponible en: http://dx.doi.org/10.33996/revistaalfa.v9i25.334

7. Jeong GJ, Khan F, Tabassum N, Kim YM. Alteration of oral microbial biofilms by sweeteners. Biofilm [Internet]. 2024 [citado 12 jun de 2025];7(100171):100171. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.bioflm.2023.100171

8. Staszczyk M, Jurczak A, Magacz M, Kościelniak D, Gregorczyk-Maga I, Jamka-Kasprzyk M, et al. Effect of polyols and selected dental materials on the ability to create a cariogenic biofilm-on children caries-associated Streptococcus mutans isolates. Int J Environ Res Public Health [Internet]. 2020 [citado 25 may de 2024];17(10):3720. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/ijerph17103720

9. Liang P, Cao M, Li J, Wang Q, Dai Z. Expanding sugar alcohol industry: Microbial production of sugar alcohols and associated chemocatalytic derivatives. Biotechnol Adv [Internet]. 2023 [citado 10 may de 2025];64(108105):108105. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108105

10. Lima M, Jiménez D, Porras C, Maurat A, Álvarez D. Efectos de azúcares totales sustitutos de sacarosa en la salud bucal. Revisión bibliográfica. Revista Eugenio Espejo [Internet]. 2022 [citado 23 jul de 2025];16(2):101-13. Disponible en: https://www.redalyc.org/journal/5728/572870672017/html/

11. Ahmed MI, Ali Hamad S, Abdulsalam M. Phytochemical analysis and antibacterial activity of Stevia Rebaudiana Bertoni leaves extract against Streptococcus sanguis (A primary inhabitant of dental plaque): In vitro study. Dent 3000 [Internet]. 2025 [citado 6 dic de 2025];13(1). Disponible en: http://dx.doi.org/10.5195/d3000.2025.784

12. Velasquez D, Sebastian LJ. Efecto antibacteriano del extracto acuoso de hoja de stevia rebaudiana y erythroxylum coca solos y en combinación sobre streptococcus mutans ATCC 25175, Trujillo 2019 [Internet]. Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote; 2022 [citado 23 jul de 2025]. Disponible en: https://repositorio.uladech.edu.pe/handle/20.500.13032/30270

13. Vargas-Santivañez S, Ladera-Castañeda M, Briceño-Vergel G, Yarasca-Berrocal E, Hernández-Vergara C, Huamani-Echaccaya J, et al. Factors associated with oral health knowledge, attitudes, and practices among legal guardians of preschool children in the Peruvian capital. BMC Public Health [Internet]. 2025 [citado 17 dic de 2025];25(1):1030. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1186/s12889-025-22099-3

14. Hickl J, Argyropoulou A, Al-Ahmad A, Hellwig E, Skaltsounis AL, Wittmer A, et al. Unleashing nature's defense: potent antimicrobial power of plant extracts against oral pathogens and Streptococcus mutans biofilms. Front Oral Health [Internet]. 2024 [citado 12 dic de 2025];5:1469174. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3389/froh.2024.1469174

15. Zhou Y, Smith RL, Qi X. Chemocatalytic production of sorbitol from cellulose *via* sustainable chemistry – a tutorial review. Green Chem [Internet]. 2024 [citado 30 jul 2025];26(1):202-43. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1039/D3GC04082H

16. Ikäläinen H, Guzman C, Saari M, Söderling E, Loimaranta V. Real-time acid production and extracellular matrix formation in mature biofilms of three Streptococcus mutans strains with special reference to xylitol. Biofilm [Internet]. 2024 [citado 14 dic de 2025];8(100219):100219. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.bioflm.2024.100219

17. Han W, Jiao Y, Mi S, Han S, Xu J, Li S, et al. Stevioside reduces inflammation in periodontitis by changing the oral bacterial composition and inhibiting P. gingivalis in mice. BMC Oral Health [Internet]. 2023 [citado 10 ago de 2025];23(1):550. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1186/s12903-023-03229-y

18. Chan A, Ellepola K, Truong T, Balan P, Koo H, Seneviratne CJ. Inhibitory effects of xylitol and sorbitol on Streptococcus mutans and Candida albicans biofilms are repressed by the presence of sucrose. Arch Oral Biol [Internet]. 2020 [citado 11 nov de 2025];119:104886. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104886

19. Soto-Calvo B, Mendaza-Lainez E, Varela-Rojas I. Desarrollo de un enjuague bucal natural a partir de extractos de zingiberáceas orgánicas disponibles en Costa Rica. Rev Tecnol Marcha [Internet]. 2020 [citado 23 jul de 2025];33(3):98-104. Disponible en: http://dx.doi.org/10.18845/tm.v33i3.4468

20. Escobar E, Piedrahita M, Gregory RL. Growth and viability of Streptococcus mutans in sucrose with different concentrations of Stevia rebaudiana Bertoni. Clin Oral Investig [Internet]. 2020 [citado 20 sep de 2025];24(9):3237-42. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/s00784-020-03197-5

21. Ahmed MI, Mazin H. Phytochemical screening and antibacterial effect of Stevia rebaudiana (Bertoni) alcoholic leaves extract on streptococcus oralis (dental plaque's primary colonizer) [Internet]. 2025 [citado 13 de dic de 2025]. Disponible en: https://www.jrmds.in/articles/phytochemical-screening-and-antibacterial-effect-of-stevia-rebaudiana-bertoni-alcoholic-leaves-extract-on-streptococcus-.pdf

22. Arumugam B, Subramaniam A, Alagaraj P. Stevia as a natural sweetener: A review. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem [Internet]. 2020 [citado 23 nov de 2025];18(2):94-103. Disponible en: http://dx.doi.org/10.2174/1871525718666200207105436

23. Umai D, Kayalvizhi R, Kumar V, Jacob S. Xylitol: Bioproduction and Applications-A Review. Front Sustain [Internet]. 2022 [citado 15 de feb de 2025];3. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3389/frsus.2022.826190

24. Kidangathazhe A, Amponsah T, Maji A, Adams S, Chettoor M, Wang X, et al. Synthetic vs. non-synthetic sweeteners: their differential effects on gut microbiome diversity and function. Front Microbiol [Internet]. 2025 [citado 15 de dic de 2025];16:1531131. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2025.1531131

25. AlKanderi S, AlFreeh M, Bhardwaj RG, Karched M. Sugar substitute Stevia inhibits biofilm formation, exopolysaccharide production, and downregulates the expression of streptococcal genes involved in exopolysaccharide synthesis. Dent J [Internet]. 2023 [citado 23 nov de 2025];11(12):267. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/dj11120267

26. Tzimas K, Antoniadou M, Varzakas T, Voidarou CC. Plant-derived compounds: A promising tool for dental caries prevention. Curr Issues Mol Biol [Internet]. 2024 [citado 26 may de 2025;]46(6):5257-90. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/cimb46060315

27. Ortiz Magdaleno M. Salud bucal en América Latina: Desafíos por afrontar [Internet]. Vol. 6, Revista Latinoamericana de Difusión Científica. Zenodo; 2024. p. 142-56. Disponible en: http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.12692675

28. Sultana R, Rahman MM, Nayema J, Bethe MI, Kabbo SA, Shornil MAAB, et al. Antibacterial potential of Stevia rebaudiana extract (methanol and ethanol) against clinically important pathogens [Internet]. Authorea Inc. Authorea Inc.; 2025 [citado 28 nov de 2025]. Disponible en: http://dx.doi.org/10.22541/au.175129935.50749745/v1

29. Aleksanyan T, Poghosyan V, Harutyunyan R, Semerjyan I, Hovhannisyan L, Haertlé T, et al. Effects of *Mentha piperita* L. and *Stevia* rebaudiana extracts on the growth of lactic acid bacteria and their potential for functional food development. Functional Food Science - Online ISSN: 2767-3146 [Internet]. 2025 [citado 4 de sep de 2025];5(9):436-49. Disponible en: http://dx.doi.org/10.31989/ffs.v5i9.1694

30. Ye Q, Wu Y, Kuang D, Ye H. Phytochemical analysis and molecular mechanisms of anticancer activity of Stevia rebaudiana extract in gastric cancer cells: In silico docking and functional assays on apoptosis and cell migration. مجلة الكويت للعلوم [Internet]. 2025 [citado 13 nov de 2025];52(3):100420. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.kjs.2025.100420

31. Iawsipo P, Somana J, Patthamawan P, Kaewmahatthai T, Roy S. Exploring Stevia leaf residue extracts: Antibacterial and antioxidant potential as natural food preservatives. Trends Sci [Internet]. 2024 [citado 10 de jul de 2025];21(9):8113. Disponible en: http://dx.doi.org/10.48048/tis.2024.8113

32. Chakma A, Afrin F, Rasul MG, Maeda H, Yuan C, Shah AKMA. Effects of extraction techniques on antioxidant and antibacterial activity of stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) leaf extracts. Food Chem Adv [Internet]. 2023 [citado 15 dic de 2025];3(100494):100494. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.focha.2023.100494

33. Devi R, Rajeshkumar S, Ezhilarasan DR, Lakshmi T. Ficus Benghalensis and Stevia formulation based mouthwash and its Anti- cariogenic activity in vitro comparative study. J Complement Med Res [Internet]. 2022 [citado 25 nov 2025];13(3):7. Disponible en: http://dx.doi.org/10.5455/jcmr.2022.13.03.02

34. Mendoza TD, Lupuche RM. Efecto de la Stevia rebaudiana en el crecimiento del Streptococcus mutans. Kiru [Internet]. 2021 [citado 30 de nov de 2025];18(3). Disponible

en: http://dx.doi.org/10.24265/kiru.2021.v18n3.03

35. Sultana C, Azad MAK, Rahman MM, Muhit MA, Rahman SMA. Phytochemical and Biological Investigation of Stevia rebaudiana (Bert.) Leaves Grown in Bangladesh. Dhaka Univ J Pharm Sci [Internet]. 2020 [citado 10 de sep de 2025];19(2):191-7. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3329/dujps.v19i2.50636

36. Brañez Reyes K, Ramos-Perfecto D, Castro Luna A, Piscoche Botello C, Dávila Paredes D, Ruiz Macedo JC. Efecto antibacteriano in vitro del extracto de Stevia rebaudiana sobre Streptococcus sanguinis y Actinomyces viscosus, bacterias iniciadoras en la formación de biopelícula dental. Odontol Sanmarquina [Internet]. 2018 [citado 21 may de 2024];21(1):21. Disponible en: http://dx.doi.org/10.15381/os.v21i1.14428

37. Mariana MA, Maricruz OA, Marta LS, Ivonne PX, Sandra LCH. Antibacterial activity of extracts of Stevia rebaudiana Bertoni against Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis and Pseudomonas aeruginosa. Journal of Medicinal Plants Research [Internet]. 2017 [citado 3 sep de 2017];11(25):414-8. Disponible en: http://dx.doi.org/10.5897/JMPR2017.6373

38. Howlader MMS, Ahmed SR, Kubra K, Bhuiyan MKH. Biochemical and phytochemical evaluation of Stevia rebaudiana. Asian J Med Biol Res [Internet]. 2016 [citado 15 jul de 2025];2(1):121-30. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3329/ajmbr.v2i1.27577

39. Wang L, Chang T, Zhu T, Hu W, Wang X, Dong C, et al. Stevia rebaudiana Bertoni as a sweet herbal medicine: traditional uses, potential applications, and future development. Front Pharmacol [Internet]. 2025 [citado 4 dic de 2025];16(1638147):1638147. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2025.1638147

40. Salehi B, López MD, Martínez-López S, Victoriano M, Sharifi-Rad J, Martorell M, et al. Stevia rebaudiana Bertoni bioactive effects: From in vivo to clinical trials towards future therapeutic approaches. Phytother Res [Internet]. 2019 [citado 14 dic de 2025];33(11):2904-17. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1002/ptr.6478

41. Henz SL, Nied MM. Influência da Stevia rebaudiana na saúde bucal – revisão de literatura. Rev Fac Odontol P Alegre [Internet]. 2019 [citado 28 dic de 2025];60(2):83-90. Disponible en: http://dx.doi.org/10.22456/2177-0018.90958

42. Latarissa I, Barliana M, Lestari K. A Comprehensive Review of Stevia rebaudiana Bertoni effects on Human Health and Its Mechanism. J Adv Pharm Educ Res [Internet]. 2020 [citado 26 jul de 2025]; Disponible en: https://japer.in/storage/models/article/bsdpkHUSQGpIN2hGvoga87upaYMm2LbZM0l43IKD9J9DlqAfdfCmjqCWqvGW/a-comprehensive-review-of-stevia-rebaudiana-bertoni-effects-on-human-health-and-its-mechanism.pdf

43. Guo M, Yang K, Zhou Z, Chen Y, Zhou Z, Chen P, et al. Inhibitory effects of Stevioside on Streptococcus mutans and Candida albicans dual-species biofilm. Front Microbiol [Internet]. 2023 [citado 5 sep de 2025];14:1128668. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2023.1128668

44. Deviyanti S. Cariogenic Antibacterial Potential of Stevia rebaudiana Bertoni Leaves Extract Against Lactobacillus acidophilus. En: Nusantara Science and Technology Proceedings [Internet]. Galaxy Science; 2022 [citado 15 de nov 2025]. Disponible en: http://dx.doi.org/10.11594/nstp.2022.2514

45. Pairazamán-García J, Ríos-Caro T. In vitro inhibitory effect of Stevia Rebaudiana ethanolic extract on the cariogenic virulence factors of Streptococcus mutans ATCC

25175. Agroindustrial Sci [Internet]. 2020 [citado 30 jul de 2025];10(1):95-102. Disponible en: http://dx.doi.org/10.17268/agroind.sci.2020.01.13

46. Papaefthimiou M, Kontou PI, Bagos PG, Braliou GG. Integration of antioxidant activity assays data of Stevia leaf extracts: A systematic review and meta-analysis. Antioxidants (Basel) [Internet]. 2024 [citado 4 jul de 2025];13(6):692. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/antiox13060692

47. Iatridis N, Kougioumtzi A, Vlataki K, Papadaki S, Magklara A. Anti-cancer properties of Stevia rebaudiana; More than a sweetener. Molecules [Internet]. 2022 [citado 17 may de 2025];27(4):1362. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/molecules27041362

48. Shinde MR, Winnier J. Health Benefits and Application of Stevia rebaudiana Bertoni in Dentistry. J Drug Deliv Ther [Internet]. 2020 [citado 15 ago de 2025];10(4-s):271-4. Disponible en: http://dx.doi.org/10.22270/jddt.v10i4-s.4285

49. Siddaiah SB, Sinha S, Archana BR. Microbiological Evaluation of Herbal Extracts against Candida albicans in Early Childhood Caries Patients: An In Vitro Study. Int J Clin Pediatr Dent [Internet]. 2024 [citado 11 ene de 2025];17(1):26-30. Disponible en: http://dx.doi.org/10.5005/jp-journals-10005-2733

50. Ibrahem ES, Ragheb EM, Yousef FM, Abdel-Azizand MF, Alghamdi BA. Nutritional value, cytotoxic and antimicrobial activities of Stevia rebaudiana leaf extracts. J Biochem Technol [Internet]. 2020 [citado 27 jul de 2025]; Disponible en: https://jbiochemtech.com/storage/models/article/fpWMeT2GyQXqCcTYTxpx2N017moDtPVy3RiE0Oey8kadEETSvSVZ32UIMfUn/nutritional-value-cytotoxic-and-antimicrobial-activities-of-stevia-rebaudiana-leaves-extracts.pdf

51. Dyduch-Siemińska M, Najda A, Gawroński J, Balant S, Świca K, Żaba A. Stevia rebaudiana Bertoni, a source of high-potency natural sweetener-biochemical and genetic characterization. Molecules [Internet]. 2020 [citado 11 de feb de 2025];25(4):767. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/molecules25040767

52. Borgo J, Laurella LC, Martini F, Catalán CAN, Sülsen VP. Stevia genus: Phytochemistry and biological activities update. Molecules [Internet]. 2021 [citado 6 de may de 2021;26(9):2733. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/molecules26092733

53. Myint KZ, Zhou Z, Shi Q, Chen J, Dong X, Xia Y. Stevia polyphenols, their antimicrobial and anti-inflammatory properties, and inhibitory effect on digestive enzymes. Molecules [Internet]. 2023 [citado 13 nov de 2025];28(22):7572. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/molecules28227572

54. Zhang J, Wang Q, Duan Z. Preventive effects of probiotics on dental caries in vitro and in vivo. BMC Oral Health [Internet]. 2024 [citado 8 ago de 2025];24(1):915. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1186/s12903-024-04703-x

55. Spatafora G, Li Y, He X, Cowan A, Tanner ACR. The evolving microbiome of dental caries. Microorganisms [Internet]. 2024 [citado 7 may de 2025];12(1):121. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms12010121

56. Beattie RE. Probiotics for oral health: a critical evaluation of bacterial strains. Front Microbiol [Internet]. 2024 [citado 24 jun de 2025];15:1430810. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2024.1430810

57. Fitri DK, Tuygunov N, Wan Harun WHA, Purwasena IA, Cahyanto A, Zakaria MN. Key virulence genes associated with Streptococcus mutans biofilm formation: a systematic

review. Front Oral Health [Internet]. 2025 [citado 26 dic de 2025];6(1654428):1654428. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3389/froh.2025.1654428

58. Xu M, Wang X, Gong T, Yang Z, Zhang D, Ma Q, et al. Glucosyltransferase activity-based screening identifies tannic acid as an inhibitor of Streptococcus mutans biofilm. Front Microbiol [Internet]. 2025 [citado 27 nov de 2025];16:1555497. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2025.1555497

59. Fang Y, Chen X, Chu CH, Yu OY, He J, Li M. Roles of Streptococcus mutans in human health: beyond dental caries. Front Microbiol [Internet]. 2024 [citado 19 dic de 2025];15:1503657. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2024.1503657

60. Setoguchi D, Nagata E, Oho T. A novel mannose-containing sialoprotein adhesin involved in the binding of Candida albicans cells to DMBT1. Mol Oral Microbiol [Internet]. 2022 [citado 14 ago de 2025];37(4):154-63. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1111/omi.12374

61. Gao Z, Chen X, Wang C, Song J, Xu J, Liu X, et al. New strategies and mechanisms for targeting Streptococcus mutans biofilm formation to prevent dental caries: A review. Microbiol Res [Internet]. 2023 [citado 14 nov de 2025];278(127526):127526. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2023.127526

62. Lin Y, Chen J, Zhou X, Li Y. Inhibition of Streptococcus mutans biofilm formation by strategies targeting the metabolism of exopolysaccharides. Crit Rev Microbiol [Internet]. 2021 [citado 16 sep de 2025];47(5):667-77. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1080/1040841X.2021.1915959

63. Yu L, Maishi N, Akahori E, Hasebe A, Takeda R, Matsuda AY, et al. The oral bacterium Streptococcus mutans promotes tumor metastasis by inducing vascular inflammation. Cancer Sci [Internet]. 2022 [citado 14 dic de 2025];113(11):3980-94. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1111/cas.15538

64. Sato A, Arai S, Sumi K, Fukamachi H, Miyake S, Ozawa M, et al. Metagenomic analysis of bacterial microflora in dental and atherosclerotic plaques of patients with internal carotid artery stenosis. Clin Med Insights Cardiol [Internet]. 2024 [citado 6 mar de 2025];18:11795468231225852. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1177/11795468231225852

65. Hosoki S, Saito S, Tonomura S, Ishiyama H, Yoshimoto T, Ikeda S, et al. Oral carriage of Streptococcus mutans harboring the cnm gene relates to an increased incidence of cerebral microbleeds. Stroke [Internet]. 2020 [citado 14 dic de 2025];51(12):3632-9. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1161/STROKEAHA.120.029607

66. Misaki T, Naka S, Nagasawa Y, Matsuoka D, Ito S, Nomura R, et al. Simultaneous presence of Campylobacter rectus and cnm-positive Streptococcus mutans in the oral cavity is associated with renal dysfunction in IgA nephropathy patients: 5-year follow-up analysis. Nephron [Internet]. 2023 [citado 15 dic de 2025];147(3-4):134-43. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1159/000525511

67. Wang A, Zhai Z, Ding Y, Wei J, Wei Z, Cao H. The oral-gut microbiome axis in inflammatory bowel disease: from inside to insight. Front Immunol [Internet]. 2024 [citado 26 jul de 2025];15:1430001. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2024.1430001

68. Tsai MS, Chen YY, Chen WC, Chen MF. Streptococcus mutans promotes tumor progression in oral squamous cell carcinoma. J Cancer [Internet]. 2022 [citado 21 nov de 2025];13(12):3358-67. Disponible en: http://dx.doi.org/10.7150/jca.73310

69. Kashi M, Varseh M, Hariri Y, Chegini Z, Shariati A. Natural compounds: new therapeutic approach for inhibition of Streptococcus mutans and dental caries. Front Pharmacol [Internet]. 2025 [citado 1 dic de 2025];16:1548117. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2025.1548117

70. Moon J, Seo K, Kwon JS. Novel two-stage expansion of Streptococcus mutans biofilm supports EPS-targeted prevention strategies for early childhood caries. NPJ Biofilms Microbiomes [Internet]. 2025 [citado 24 nov de 2025];11(1):65. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/s41522-025-00699-6

71. Ke L, Wang J, Liu Y, Sun Z, Li Y, Xiao X. Identification of the antibacterial action mechanism of curcumin on Streptococcus mutans through transcriptome profiling. Arch Oral Biol [Internet]. 2023 [citado 20 may de 2025];149(105655):105655. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2023.105655

72. Jafri H, Banerjee G, Khan MSA, Ahmad I, Abulreesh HH, Althubiani AS. Synergistic interaction of eugenol and antimicrobial drugs in eradication of single and mixed biofilms of Candida albicans and Streptococcus mutans. AMB Express [Internet]. 2020 [citado 19 nov de 2025];10(1):185. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1186/s13568-020-01123-2

73. Hertiani T, Utami D, Pratiwi ST, Haniastuti T. Eugenol and thymol as potential inhibitors for polymicrobial oral biofilms: An in vitro study. J Int Oral Health [Internet]. 2021 [citado 24 nov 2025];13(1):45. Disponible en: http://dx.doi.org/10.4103/jioh.jioh_247_20

74. Li J, Wu T, Peng W, Zhu Y. Effects of resveratrol on cariogenic virulence properties of Streptococcus mutans. BMC Microbiol [Internet]. 2020 [citado 17 nov de 2025];20(1):99. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1186/s12866-020-01761-3

75. Wu J, Jiang X, Yang Q, Zhang Y, Wang C, Huang R. Inhibition of Streptococcus mutans Biofilm Formation by the Joint Action of Oxyresveratrol and Lactobacillus casei. Appl Environ Microbiol [Internet]. 2022 [citado 10 nov de 2025];88(9):e0243621. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1128/aem.02436-21

76. Kamarehei F, Mehdiabadi M, Naderi F. Antibacterial effects of natural compounds on biofilm formation of Streptococcus mutans. Clin Exp Dent Res [Internet]. 2022 [citado 22 dic de 2025];8(6):1426-33. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1002/cre2.673

77. Yan L, Zhang S, Zhou X, Tian S. Anti-biofilm and bacteriostatic effects of three flavonoid compounds on Streptococcus mutans. Biofouling [Internet]. 2023 [citado 15 sep de 2025];39(3):245-56. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1080/08927014.2023.2209012

78. Castellanos JS, Betancourt DE, Díaz-Báez D, Baldión PA. Effect of flavonoids from grape seed and cranberry extracts on the microbiological activity of Streptococcus mutans: a systematic review of in vitro studies. BMC Oral Health [Internet]. 2024 [citado 5 jul de 2025];24(1):662. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1186/s12903-024-04263-0

79. Hwang HR, Lee ES, Kang SM, Chung KH, Kim BI. Effect of antimicrobial photodynamic therapy with Chlorella and Curcuma extract on Streptococcus mutans biofilms. Photodiagnosis Photodyn Ther [Internet]. 2021 [citado 12 nov de 2025];35(102411):102411. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102411

80. Cho YD, Kim KH, Lee YM, Ku Y, Seol YJ. Oral microbiome and host health: Review on current advances in genome-wide analysis. Appl Sci (Basel) [Internet]. 2021 [citado 29 may de 2025];11(9):4050. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/app11094050

81. El-Nassag DE, Ghamry HI, Elhassaneen Y. Stevia (Stevia rebaudiana) leaves: chemical

composition, bioactive compounds, antioxidant activities. En: Journal of Studies and Searches of Specific Education [Internet]. 2019 [citado 23 nov 2025]. Disponible en: http://dx.doi.org/

82. Pratiwi RD, Kuswandari S, Utomo RB. Antibacterial effect of ethanol extract of moringa oleifera seeds against enterococcus faecalis atcc 29212. ODONTO Dent J [Internet]. 2023 [citado 29 dic de 2025];10(2):180. Disponible en: http://dx.doi.org/10.30659/odj.10.2.180-187

83. Augustinho do Nascimento C, Kim RR, Ferrari CR, de Souza BM, Braga AS, Magalhães AC. Effect of sweetener containing Stevia on the development of dental caries in enamel and dentin under a microcosm biofilm model. J Dent [Internet]. 2021 [citado 8 nov de 2024];115(103835):103835. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2021.103835

84. Belay WY, Getachew M, Tegegne BA, Teffera ZH, Dagne A, Zeleke TK, et al. Mechanism of antibacterial resistance, strategies and next-generation antimicrobials to contain antimicrobial resistance: a review. Front Pharmacol [Internet]. 2024 [citado 16 ago de 2025];15:1444781. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2024.1444781

85. AlHarbi SG, Almushayt AS, Bamashmous S, Abujamel TS, Bamashmous NO. The oral microbiome of children in health and disease-a literature review. Front Oral Health [Internet]. 2024 [citado 22 dic de 2024];5:1477004. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3389/froh.2024.1477004

86. Liu W, Wei Y, Xiang R, Dong B, Yang X. Lactic acid bacteria exopolysaccharides unveiling multifaceted insights from structure to application in foods and health promotion. Foods [Internet]. 2025 [citado 27 nov de 2025];14(5):823. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/foods14050823

87. Lv C, Wang Z, Li Z, Shi X, Xiao M, Xu Y. Formation, architecture, and persistence of oral biofilms: recent scientific discoveries and new strategies for their regulation. Front Microbiol [Internet]. 2025 [citado 9 sep de 2025];16(1602962):1602962. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2025.1602962

88. Freitas TSM de, Garcia VADS, Filgueiras CT, Velasco JI, Fakhouri FM. Production of edible films based on pea starch with incorporation of active compounds obtained from the purple araçá (Psidium myrtoides). Polymers (Basel) [Internet]. 2021 [citado 16 sep de 2024];13(18):3134. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/polym13183134

89. Yıldız SS, Şahin S, Tavukcu E, Mumcuoğlu İ, Hekimoğlu CH, Güreser AS, et al. Usage of 150 mm Mueller - Hinton Agar for the EUCAST rapid antimicrobial susceptibility test (RAST) directly from positive blood culture bottles. Acta Microbiol Immunol Hung [Internet]. 2025 [citado 27 nov de 2025];72(1):43-8. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1556/030.2025.02538

90. Maželienė Ž, Kirvaitienė J, Kaklauskienė K, Volskienė R, Aleksandravičienė A. Antifungal and antibacterial activity of aqueous and ethanolic extracts of different Rosa rugosa parts. Microbiol Res (Pavia) [Internet]. 2025 [citado 18 sep de 2025];16(1):26. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/microbiolres16010026

91. Celaya L, Ferreyra D, Kolb E, Kolb Koslobsky N. Extraction of Stevioside and Rebaudioside A from Stevia rebaudiana by percolation with ethanol-water solvents. Rev Cienc Tecnol [Internet]. 2022 [citado 31 oct de 2025];38(38):55-62. Disponible en: http://dx.doi.org/10.36995/j.recyt.2022.38.007

92. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A

review. J Pharm Anal [Internet]. 2016 [citado 16 abril de 2024];6(2):71-9. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005

93. Assefa A, Belay S, Kloos H. Evaluation of *in-vitro* antibacterial activity of extracts of *Calpurina aurea* , *Vernonia amygdalina* and *Rumex nepalensis* in Goba district, southeastern Ethiopia. Egypt J Basic Appl Sci [Internet]. 2024 [citado 31 nov de 2025];11(1):69-83. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1080/2314808x.2024.2312785

94. Raghu A, Velayudhannair K. Phytochemical analysis and antibacterial potential of Stevia rebaudiana (Bertoni, 1899) leaf extracts against Aeromonas species: Influence of extraction methods and solvents in aquaculture applications. J Pure Appl Microbiol [Internet]. 2023 [citado 1 dic de 2024];17(4):2352-66. Disponible en: http://dx.doi.org/10.22207/JPAM.17.4.31

95. Figueroa JCR, De las Nieves Rodríguez M, Peña C, Estrada JAE. CARACTERIZACIÓN EDÁFICA, CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN Stevia pilosa y S. tomentosa. 2017 [citado 1 dic de 2024] [citado 27 de julio de 2025]; Disponible en: http://dx.doi.org/

96. Stachurska X, Mizielińska M, Ordon M, Nawrotek P. The use of plant extracts and bacteriophages as an alternative therapy approach in combatting bacterial infections: the study of lytic phages and Stevia rebaudiana. J Vet Res [Internet]. 2023 [citado 18 dic de 2024];67(4):545-57. Disponible en: http://dx.doi.org/10.2478/jvetres-2023-0059

97. Gonzalez-Pastor R, Carrera-Pacheco SE, Zúñiga-Miranda J, Rodríguez-Pólit C, Mayorga-Ramos A, Guamán LP, et al. Current landscape of methods to evaluate antimicrobial activity of natural extracts. Molecules [Internet]. 2023 [citado 20 feb de 2024];28(3):1068. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/molecules28031068

98. Papaefthimiou M, Kontou PI, Bagos PG, Braliou GG. Antioxidant activity of leaf extracts from Stevia rebaudiana Bertoni exerts attenuating effect on diseased experimental rats: A systematic review and meta-analysis. Nutrients [Internet]. 2023 [citado 26 jul de 2024];15(15). Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/nu15153325

99. Kadeřábková N, Mahmood AJS, Mavridou DAI. Antibiotic susceptibility testing using minimum inhibitory concentration (MIC) assays. NPJ Antimicrob Resist [Internet]. 2024 [citado 7 dic de 2025];2(1):37. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/s44259-024-00051-6

100. Dangani A, Abdullahi M, Abdulsalam SS. Phytochemical screening and in-vitro antimicrobial activity of extracts from Citrullus lanatus rind. En: International Physical Science Conference 2023 [Internet]. 2023 [citado 12 nov de 2024]. Disponible en: http://dx.doi.org/

101. Bag A, Kumar V, Adhikari A, Mandal B, Dhar S, Das BK. Impact of repeated in-vitro bacterial culture on virulence and antibiotic resistance characteristics: a study of Gram-positive and Gram-negative fish pathogens. Front Microbiol [Internet]. 2025 [citado 21 ago de 2025];16:1601681. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2025.1601681

102. Vargas Mamani JJ. El reactivo de Dragendorff:: origen, historia e importancia. Revista Médica Basadrina [Internet]. 2024 [citado 30 dic de 2024];18(1):52-7. Disponible en: http://dx.doi.org/10.33326/26176068.2024.1.2104

103. Purizac Lachira JJ, Cordova Ramos JS, Olivera Montenegro L. Compuestos bioactivos y actividad antioxidante de hojas de verdolaga (Portulaca oleracea L.) peruana de extractos obtenidos por agitación magnética y ultrasonido. Manglar [Internet]. 2024 [citado 18 dic

de 2025];21(4):413-20. Disponible en: http://dx.doi.org/10.57188/manglar.2024.045

104. García-Granados RU, Cruz-Sosa F, Alarcón-Aguilar FJ, Nieto-Trujillo A, Gallegos-Martínez. ME. ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE Thalassia testudinum BANKS EX KÖNING ET SIMS DE LA LOCALIDAD DE CHAMPOTÓN, CAMPECHE, MÉXICO, DURANTE EL CICLO ANUAL 2016-2017. polibotanica [Internet]. 2019 [citado 1 ago de 2024];0(48). Disponible en: http://dx.doi.org/10.18387/polibotanica.48.12

105. Godlewska K, Pacyga P, Szumny A, Szymczycha-Madeja A, Wełna M, Michalak I. Methods for Rapid Screening of Biologically Active Compounds Present in Plant-Based Extracts. Molecules [Internet]. 2022 [citado 20 oct de 2024];27(20):7094. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/molecules27207094

106. Cruz J, Figueroa R. CARACTERIZACIÓN EDÁFICA, CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN Stevia pilosa y S. tomentosa [Internet]. 2025 [citado 28 dic de 2025]. Disponible en: http://colposdigital.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/handle/10521/2938/Romero_Figueroa_JC_DC_Edafologia_2017.pdf;jsessionid=B93C9221C920BE26BEEFDDF887A01C5B?sequence=1

X. ANEXOS

X.1. Anexo N°1: Matriz de consistencia

FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS NULA:	VARIABLES	INDICADORES	TIPO DE INVESTIGACIÓN
¿Cuál es el perfil fitoquímico y el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto de *S. rebaudiana* sobre el *S. mutans*?	Determinar el perfil fitoquímico y el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto de *S. rebaudiana* sobre el *S. mutans*.	El extracto de *S. rebaudiana* no presenta compuestos fitoquímicos bioactivos y no tiene efecto antibacteriano a diferentes concentraciones sobre el *S. mutans.*	**Variables independientes:** Extracto de *S. rebaudiana* **Covariable:** Perfil fitoquímico **Variable dependiente:** Efecto antibacteriano sobre el *S. mutans*	Porcentaje de las concentraciones del extracto Presencia de alcaloides, compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, esteroides, glucósidos cardíacos, saponinas. Diámetros del halo de inhibición (mm) por Escala de Duraffourd	La investigación es experimental, cuantitativa y prospectiva.
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	**HIPÓTESIS ALTERNATIVA:**			
	− Identificar los compuestos fitoquímicos presentes en el extracto de *S. rebaudiana* mediante la marcha fitoquímica.	El extracto de *S. rebaudiana* presenta compuestos fitoquímicos bioactivos y tiene efecto antibacteriano a diferentes			

	- Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto de *S. rebaudiana* al 5 % sobre el *S. mutans*. - Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto de *S. rebaudiana* al 10 % sobre el *S. mutans*. - Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto de *S. rebaudiana* al 15 % sobre el *S. mutans*. - Comparar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto de *S. rebaudiana* a diferentes concentraciones, al 5 %, 10 % y 15 % sobre el *S. mutans*.	concentraciones sobre el *S. mutans.*			

X.2. Anexo N°2: Cálculo muestral

Cálculos del tamaño de muestra y fórmulas estadísticas aplicadas por grupo experimental y controles.

Tesis: Perfil fitoquímico y efecto antibacteriano *in vitro* de la *S. rebaudiana* sobre el *S. mutans*.

A. Cálculo del tamaño de muestra entre el grupo 1 (grupo experimental) y grupo 2 (el grupo control positivo)

Alfa (Máximo error tipo I)	α =	0,05
1-α/2= Nivel de confianza a dos colas	1- α/2=	0,97
Z 1-α/2= valor tipificado	Z 1-α/2=	1,96
Beta (máximo error tipo II)	β=	0,20
= Poder estadístico	1- β=	0,80
Z1-β= Valor tipificado	Z1-β=	0,84
Varianza del grupo 1	$S1^2$	$(1,76)^2$
Varianza del grupo 2	$S2^2$	$(2,74)^2$
Media poblacional esperada del grupo 1 (grupo experimental): promedio que se espera medir en el grupo tratado	X1	12,10 mm
Media poblacional esperada del grupo 2 (grupo de control positivo): promedio que se espera medir en el grupo tratado	X2	15,00 mm
Diferencia propuesta	d=X1 – X2	-2,9 mm
Tamaño de cada grupo	n=	**9,88**

$n= (1,96 + 0,84)^2 \times [(1,76)^2 + (2,74)^2] /(12,10- 15,00)^2$

n= 7,85 x (3,09 + 7,50)/ 8,41

n= 7,85 x (10,59)/ 8,41 = 9,88

n= 9,88

B. Cálculo del tamaño de muestra entre el grupo 2 (grupo control positivo) y grupo 3 (el grupo control negativo)

Alfa (Máximo error tipo I)	α =	0,050
1-α/2= Nivel de confianza a dos colas	1- α/2=	0,97
Z 1-α/2= valor tipificado	Z 1-α/2=	1,96
Beta (máximo error tipo II)	β=	0,20
= Poder estadístico	1- β=	0,80
Z1-β= Valor tipificado	Z1-β=	0,84
Varianza del grupo 2	$S1^2$	$(2,74)^2$
Varianza del grupo 3	$S2^2$	$(0,0)^2$
Media poblacional esperada del grupo 2 (grupo control positivo): promedio que se espera medir en el grupo tratado	X1	15,00 mm
Media poblacional esperada del grupo 3 (grupo de control negativo): promedio que se espera medir en el grupo tratado	X2	00,0 mm
Diferencia propuesta	d= X1 –X2	15 mm
Tamaño de cada grupo	n=	**0,26**

n= (1,96 + 0,84)2 x [(2,74)2 +(0,0)2] /(15,00- 0,00)2

n= 7,85 x (7,50)/ 225 = 0,26

n= 0,26

Título: Cálculo del tamaño de muestra entre el grupo 1 (grupo experimental) y grupo 3 (el grupo control negativo)

Alfa (Máximo error tipo I)	α =	0,05
1-α/2= Nivel de confianza a dos colas	1- α/2=	0,97
Z 1-α/2= valor tipificado	Z 1-α/2=	1,96
Beta (máximo error tipo II)	β=	0,20
= Poder estadístico	1- β=	0,80
Z1-β= Valor tipificado	Z1-β=	0,842
Varianza del grupo 1	$S1^2$	$(1,76)^2$
Varianza del grupo 3	$S2^2$	$(0,0)^2$
Media poblacional esperada del grupo 1 (grupo experimental): promedio que se espera medir en el grupo tratado	X1	12,14 mm
Media poblacional esperada del grupo 3 (grupo de control negativo): promedio que se espera medir en el grupo tratado	X2	00,0 mm
Diferencia propuesta	d= X1 –X2	12,14 mm
Tamaño de cada grupo	n=	**0,164**

n= (1,96 + 0,84)2 x [(1,76)2 +(0,0)2] /(12,14- 0,00)2

n= 7,85 x (3,09)/147,37= 0,164

n= 0,164

X.3. Anexo N°3: Instrumentos de recolección de datos

Ficha técnica de recolección de datos: medición del halo de inhibición

Registro de los valores obtenidos en milímetros (mm) del halo de inhibición formado por las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *S. rebaudiana*, así como de los controles positivo y negativo.

	Diámetro de halo de inhibición (mm)				
	Extracto hidroalcohólico al 80%			Control positivo	Control negativo
	5 %	10 %	15 %	Clorhexidina al 0.12 % (Colgate Periogard®)	Dimetilsulfóxido (DMSO)
Repetición 1	0	0	16	15	0
Repetición 2	0	0	14	16	0
Repetición 3	0	0	14	17	0
Repetición 4	0	0	16	15	0
Repetición 5	0	0	16	16	0
Repetición 6	0	0	15	16	0
Repetición 7	0	0	15	15	0
Repetición 8	0	0	16	15	0
Repetición 9	0	0	15	19	0
Repetición 10	0	0	15	16	0
Promedio	0	0	15.2	16	0

X.4. Anexo N°4: Pruebas intermedias

A. Resultados de las pruebas de normalidad (Shapiro–Wilk)

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Halo del extracto hidroalcohólico al 5%	.	10	.	.	10	.
Halo del extracto hidroalcohólico al 10%	.	10	.	.	10	.
Halo del extracto hidroalcohólico al 15%	0,24	10	0,09	0,82	10	0,02
Halo del control positivo	0,30	10	0,01	0,77	10	0,00
Halo del control negativo	.	10	.	.	10	.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Interpretación estadística: En la prueba de normalidad Shapiro–Wilk, los grupos que tienen información válida mostraron los siguientes resultados:

- Halo del extracto al 15%: p = 0,025
- Halo del control positivo: p = 0,007

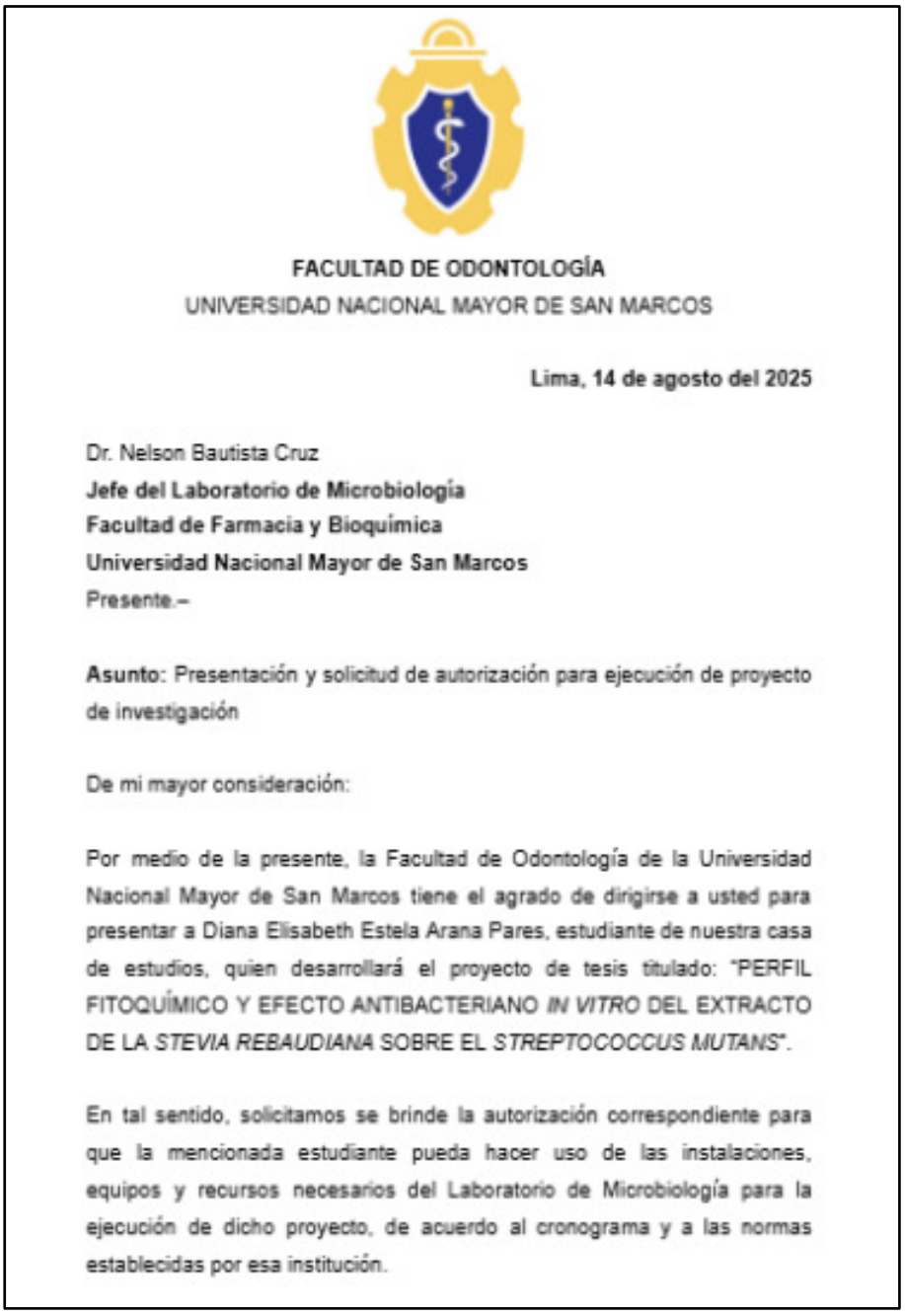
En ambos casos, el valor de significancia (p < 0,05) indica que los datos no siguen una distribución normal.

Los grupos “Halo del extracto hidroalcohólico al 5%”, “Halo del extracto hidroalcohólico al 10%” y “Halo del control negativo” aparecen sin valores en la tabla debido a que presentan datos constantes (todos ceros), y SPSS no puede calcular normalidad cuando no existe variabilidad.

Los datos correspondientes al extracto de *S. rebaudiana* al 15% y al control positivo no cumplen con el supuesto de normalidad (p < 0,05). Dado que los grupos con variabilidad presentan distribución no normal, el análisis inferencial debe realizarse utilizando estadística no paramétrica, específicamente, Kruskal–Wallis para comparación global entre grupos.

X.5. Anexo N°5. Solicitud de autorización y correspondencia institucional.

Tesis: Perfil fitoquímico y efecto antibacteriano *in vitro* de la *S. rebaudiana* sobre el *S. mutans*.



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Lima, 14 de agosto del 2025

Dr. Nelson Bautista Cruz
Jefe del Laboratorio de Microbiología
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Presente.–

Asunto: Presentación y solicitud de autorización para ejecución de proyecto de investigación

De mi mayor consideración:

Por medio de la presente, la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos tiene el agrado de dirigirse a usted para presentar a Diana Elisabeth Estela Arana Pares, estudiante de nuestra casa de estudios, quien desarrollará el proyecto de tesis titulado: "PERFIL FITOQUÍMICO Y EFECTO ANTIBACTERIANO *IN VITRO* DEL EXTRACTO DE LA *STEVIA REBAUDIANA* SOBRE EL *STREPTOCOCCUS MUTANS*".

En tal sentido, solicitamos se brinde la autorización correspondiente para que la mencionada estudiante pueda hacer uso de las instalaciones, equipos y recursos necesarios del Laboratorio de Microbiología para la ejecución de dicho proyecto, de acuerdo al cronograma y a las normas establecidas por esa institución.

Este proyecto cuenta se desarrollará cumpliendo estrictamente las medidas de bioseguridad y las disposiciones internas del lugar donde se llevará a cabo.

Agradecemos de antemano las facilidades que puedan brindar y reiteramos nuestra disposición para coordinar cualquier aspecto que sea necesario.

Sin otro particular, me despido de usted con las seguridades de mi especial consideración y estima.

Atentamente,



Diana Arana Pares
Estudiante de pregrado
Facultad de Odontología
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú. DECANA DE AMÉRICA
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
Departamento Académico de Microbiología y Parasitología Básica y Aplicada

Lima, 15 de agosto del 2025

CARTA DE AUTORIZACIÓN PARA EL USO DEL LABORATORIO

Por medio de la presente, el que suscribe, MSc. Nelson Bautista Cruz, docente del Departamento Académico de Microbiología y Parasitología Básica y Aplicada de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, autoriza a la Srta. Diana Elisabeth Estela Arana Pares, estudiante de pregrado de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con código 20050036, a realizar el desarrollo de proyecto de investigación titulado: "PERFIL FITOQUÍMICO Y EFECTO ANTIBACTERIANO *IN VITRO* DEL EXTRACTO DE LA *STEVIA REBAUDIANA* SOBRE EL *STREPTOCOCCUS MUTANS*" en las instalaciones de este laboratorio, bajo mi supervisión conforme a las normas y disposiciones internas.

Esta autorización se otorga para fines estrictamente académicos y de investigación, bajo el cumplimiento de las medidas de bioseguridad establecidas en el laboratorio.

Atentamente,

UNMSM

MSc. Nelson Bautista Cruz
Docente investigador
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

X.6. Anexo N°6. Constancia de Determinación Taxonómica N.° 173.

Tesis: Perfil fitoquímico y efecto antibacteriano *in vitro* de la *S. rebaudiana* sobre el *S. mutans*.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
MUSEO DE HISTORIA NATURAL

"Año de la Recuperación y Consolidación de la Economía Peruana"

CONSTANCIA N° 173-USM-MHN-2025

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (fértil) recibida de **Diana Elisabeth Estela Arana Pares,** estudiante de pregrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos ha sido estudiada y clasificada como: *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación APG IV (2016).

ORDEN : Asterales Link

FAMILIA : Asteraceae Bercht. & J. Presl

GÉNERO : *Stevia* Cav.

ESPECIE : *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni

Nombre vulgar: "Stevia"

Procedencia: Vivero de Villa El Salvador, Lima

Determinado por: Dr. Asunción Cano.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 5 de junio de 2025

MUSEO DE HISTORIA NATURAL - UNMSM - JEFE

Dra. Joaquina Albán Castillo

JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

Av. Arenales 1256, Jesús María, Lima, Perú
Código postal Lima 15072

Celular: +51 932 040 566
Lunes a Viernes 8:00 - 15:45

e-mail: herbariousm@unmsm.edu.pe
https://museohn.unmsm.edu.pe/herbario.html

X.7. Anexo N°7. Constancia de aprobación N°073-CEI-FO-2025.

Tesis: Perfil fitoquímico y efecto antibacteriano *in vitro* de la *S. rebaudiana* sobre el *S. mutans*.

Facultad de Odontología
Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Comité de Ética Institucional

"Año de la recuperación y consolidación de la economía peruana"

CONSTANCIA DE APROBACIÓN N°073-CEI-FO-2025

El Comité de Ética Institucional de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos ha **APROBADO** el proyecto de investigación, de tipo Exento de revisión sin riesgo, titulado **"PERFIL FITOQUÍMICO Y EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO DE LA STEVIA REBAUDIANA SOBRE EL STREPTOCOCCUS MUTANS", (Exp. N°161-2025)** a cargo de la investigadora principal **DIANA ELISABETH ESTELA ARANA PARES,** según consta en el Acta N°018-FO-CEI-2025 de fecha 26 de agosto del presente año.

La presente aprobación del Comité de Ética Institucional de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos tiene una vigencia de tres años, del 26 de agosto de 2025 al 26 de agosto de 2028 bajo los siguientes considerandos:

- El proyecto de investigación se encuentra registrado y almacenado en los archivos digitales del comité.
- Los datos obtenidos de la investigación deberán ser rigurosamente resguardados y almacenados por un periodo mínimo de tres años pudiendo ser solicitados por este comité en cualquier momento.
- El comité se reserva el derecho de solicitar en cualquier momento un informe del avance del proceso de ejecución del proyecto de investigación
- Cualquier modificación al proyecto presentado deberá ser informado al Comité.
- Al finalizar la ejecución el investigador responsable debe enviar una copia del informe final a este comité.
- El Comité de Ética está a disposición para posteriores esclarecimientos o dudas.

Ciudad Universitaria, 27 de agosto de 2025

UNMSM

Dra. MARÍA DEL PILAR GAMARRA CONTRERAS
Presidenta del Comité de Ética Institucional
Facultad de Odontología

X.8. Anexo N° 8. Fotografías de la ejecución de la investigación

Foto N°1. Secado de hojas de la *S. rebaudiana* sobre papel kraft.

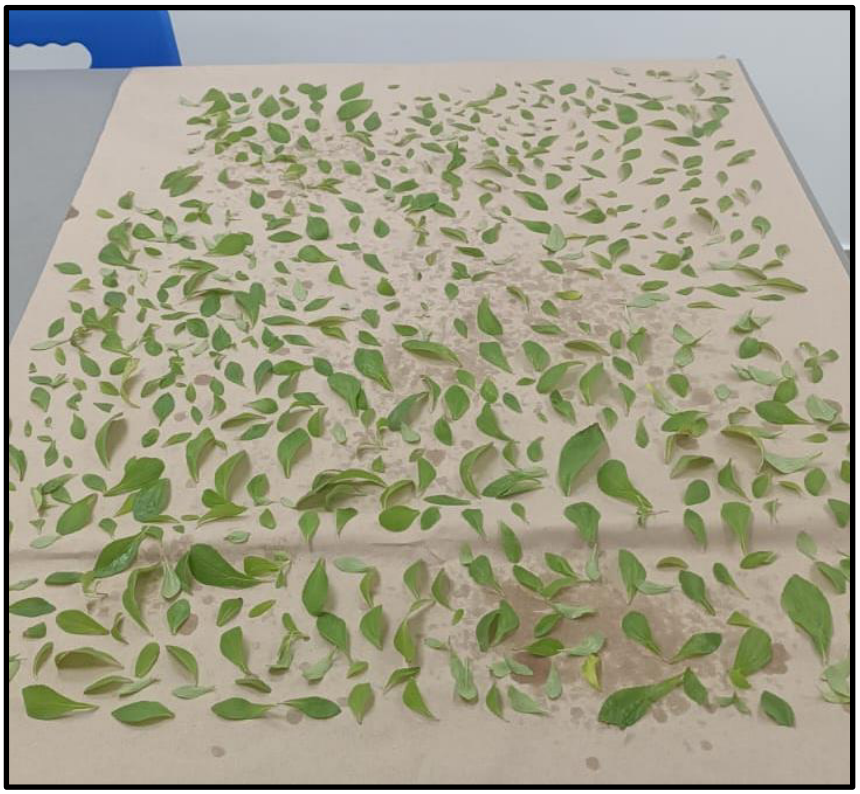


Foto N°2. Filtrado de extracto hidroalcohólico con papel Whatman N°1 en un beaker



Foto N°3. Activación de cepas *S. mutans* ATCC 25175 en cámara de flujo laminar.

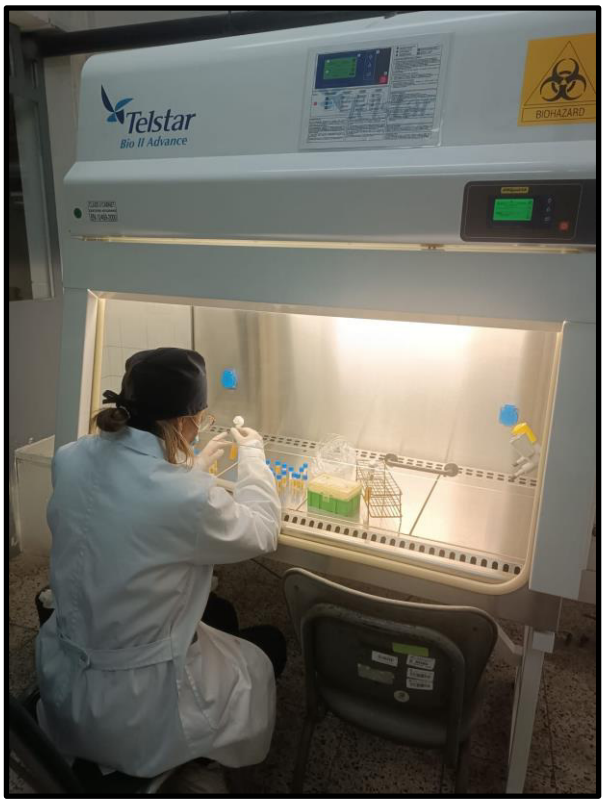


Foto N°4. Preparación de cultivo BHI para esterilizar en autoclave.

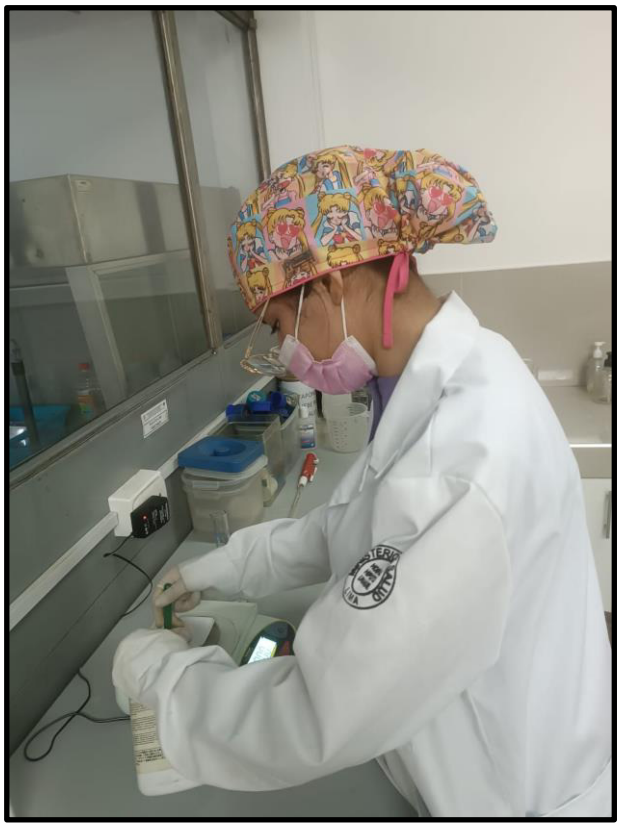


Foto N°5. Sembrado de las cepas sobre los cultivos con los pozos con el extracto a las diferentes concentraciones.

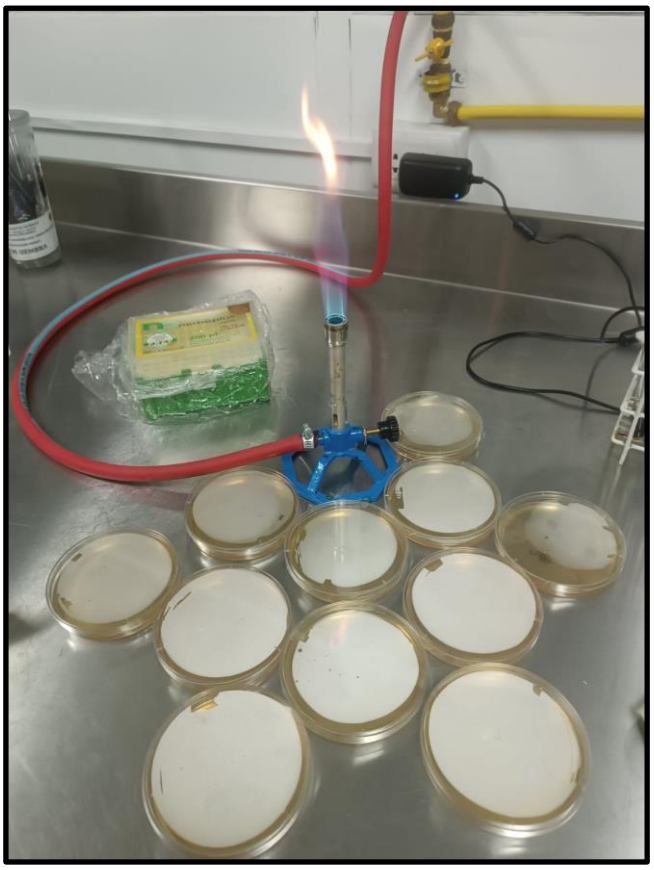


Foto N°6. Incubación a 37 C° de los medios de cultivo sembrados.



Foto N°7. Halos de inhibición del extracto de *S. rebaudiana* a las concentraciones de 5%, 10% y 15% sobre el *S. mutans.*

