



---

UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES  
CHIMBOTE

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA**

**EFECTO ANTIBACTERIANO DE CUATRO**  
**CONCENTRACIONES DE EXTRACTO ACUOSO DE**  
**HOJA DE *Stevia rebaudiana* SOBRE *Streptococcus mutans***  
**ATCC 25175, Trujillo 2019**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR EL**  
**GRADO ACADÉMICO DE BACHILLER EN**  
**ESTOMATOLOGÍA**

AUTOR

**DIAZ VELASQUEZ, LUIS JOSE SEBASTIAN**  
**ORCID: 0000-0002-8463-8583**

ASESOR

**HONORES SOLANO, TAMMY MARGARITA**  
**ORCID: 0000-0003-0723-3491**

**TRUJILLO – PERÚ**  
**2019**

**1. Título de la tesis**

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DE CUATRO CONCENTRACIONES  
DE EXTRACTO ACUOSO DE HOJA DE *Stevia rebaudiana* SOBRE  
*Streptococcus mutans* ATCC 25175, Trujillo 2019**

## **2. Equipo de trabajo**

### **AUTOR**

Díaz Velásquez, Luis José Sebastian

ORCID: 0000-0002-8463-8583

Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, Estudiante Pregrado, Trujillo, Perú.

### **ASESOR**

Honores Solano, Tammy Margarita

ORCID: 0000-0003-0723-3491

Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, Facultad de Ciencias de la Salud,  
Escuela Profesional de Odontología, Trujillo, Perú.

### **JURADO**

Pairazamán García, Juan Luis

ORCID: 0000-0001-8922-8009

Morón Cabrera, Edwar Richard

ORCID: 0000-0002-4666-8810

Velásquez Veneros, Cynthia Karina

ORCID: 0000-0001-5756-7137

### **3. Hoja de firma del jurado y asesor**

---

Mgtr. Pairazamán García, Juan Luis

**Presidente**

---

Mgtr. Morón Cabrera, Edwar Richard

**Miembro**

---

Mgtr. Velásquez Veneros, Cynthia Karina

**Miembro**

---

Mgtr. Honores Solano, Tammy Margarita

**Asesor**

#### **4. Agradecimiento**

Empezar agradeciendo a Dios por la vida y las oportunidades que me da día a día, sin él nada de esto y más podría lograrlo.

Agradezco a mi Madre por el tiempo, esfuerzo y dedicación que me brindó y a mi familia por el enorme apoyo que me dieron para llevar a cabo el siguiente trabajo.

Agradezco a mis docentes asesores Tammy Honores y Cesar Vásquez, por su paciencia, sabiduría, tiempo y esfuerzo que me brindaron durante todos estos años, con la finalidad de ayudarme a conseguir mi meta.

## **Dedicatoria**

Este trabajo lo dedico primero a Dios por la fuerza, sabiduría y paciencia que me brindó.

A mis padres, Leli Velásquez Viloche y José Díaz Rodríguez por el ejemplo brindado y ayudarme a ser la clase de persona que soy, todos mis logros son gracias a ellos y por motivarme a soñar, ponerme metas y cumplirlas.

A mis abuelos, Leli Viloche, Rosa Rodríguez, Víctor Díaz y Wilberto Velásquez por tomar una parte de su tiempo y ayudarme a ser mejor cada día, ayudándome a no rendirme y a seguir adelante.

A mi hermano Mikael D. y primos Aron D., Dante D., Mathias V., Piero C. para que sepan que todo de la mano de Dios más esfuerzo y dedicación se puede lograr, nunca se rindan, sigan adelante “Más que vencedores”.

## 5. Resumen

La investigación tuvo como objetivo comparar el efecto antibacteriano de cuatro concentraciones de extracto acuoso de hoja de *Stevia rebaudiana*, sobre *Streptococcus mutans*, ATCC 25175. El diseño de la investigación fue experimental, prospectivo y analítico. Se recolectó 2 kg de *Stevia rebaudiana* y se elaboró el extracto a las concentraciones de 5%, 10%, 15% y 20%. *Streptococcus mutans* ATCC 25175, fue sembrado en placas Petri, realizándose 10 repeticiones por grupo de estudio (5%, 10%, 15% y 20%) de *Stevia rebaudiana*. Para medir los halos de inhibición se tomó en cuenta la totalidad de los 40 sensidiscos con el tratamiento desarrollado en la placa Petri con un vernier certificado bajo la norma ISO 9001. Para comparar el efecto antibacteriano de los grupos de estudio se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis ( $p = 0.05$ ) y para la comparación múltiple se utilizó el test de Duncan. Los halos de inhibición promedio obtenidos fueron de 6.99 mm, 7.36 mm, 8.87 mm y 9.17 mm respectivamente para cada concentración (5%, 10%, 15% y 20%). Se llega a la conclusión que el extracto acuoso de hoja de *Stevia rebaudiana* al 20% presenta un mayor efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en comparación de las otras tres concentraciones (5%, 10% y 15%).

**Palabras clave:** Antibacteriano, Clorhexidina, *Stevia rebaudiana*, *Streptococcus mutans*.

## Abstract

The research aimed to compare the antibacterial effect of four compounds of aqueous *Stevia rebaudiana* leaf extract on *Streptococcus mutans*, ATCC 25175. The research design was experimental, prospective and analytical. 2 kg of *Stevia rebaudiana* was collected and the extract was made to the particles of 5%, 10%, 15% and 20%. *Streptococcus mutans* ATCC 25175, seeded in Petri dishes, performing 10 repetitions per study group (5%, 10%, 15% and 20%) of *Stevia rebaudiana*. To measure the inhibition halos, all 40 sensidisks will be taken into account with the treatment developed on the Petri dish with a vernier certified under ISO 9001. To compare the antibacterial effect of the study groups, the non-parametric test will be considered. Kruskal Wallis ( $p = 0.05$ ) and for the multiple comparison the Duncan test was analyzed. The average inhibition halos were 6.99 mm, 7.36 mm, 8.87 mm and 9.17 mm respectively for each concentration (5%, 10%, 15% and 20%). It is concluded that the 20% aqueous *Stevia rebaudiana* leaf extract has a greater antibacterial effect on *Streptococcus mutans* ATCC 25175 compared to the other three concentrations (5%, 10% and 15%).

**Key words:** Antibacterial, Chlorhexidine, *Stevia rebaudiana*, *Streptococcus mutans*.

## 6. Contenido

1. Título de la tesis .....	ii
2. Equipo de trabajo .....	iii
3. Hoja de firma del jurado y asesor .....	iv
4. Hoja de agradecimiento y/o Dedicatoria.....	v
5. Resumen y abstract .....	vii
6. Contenido.....	ix
7. Índice de gráficos, tablas y cuadros .....	x
<b>I. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>II. Revisión de literatura.....</b>	<b>3</b>
<b>III. Hipótesis.....</b>	<b>20</b>
<b>IV. Metodología.....</b>	<b>20</b>
4.1. Diseño de la investigación .....	20
4.2. Población y muestra.....	21
4.3. Definición y operacionalización de variables e indicadores.....	23
4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos .....	24
4.5. Plan de análisis.....	28
4.6. Matriz de consistencia. ....	29
4.7. Principios éticos.....	30
<b>V. Resultados.....</b>	<b>31</b>
5.1 Resultados.....	31
5.2. Análisis de Resultados.....	34
<b>VI. Conclusiones.....</b>	<b>37</b>
Aspectos complementarios.....	38
Referencias Bibliográficas.....	39
Anexos.....	48

## 7. Índice tablas

<b>Tabla 1:</b> Efecto antibacteriano in vitro de cuatro concentraciones de extracto acuoso de hoja de <i>Stevia rebaudiana</i> sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	31
---	----

<b>Tabla 2:</b> Test de Duncan, efecto antibacteriano in vitro de cuatro concentraciones de extracto acuoso de hoja de <i>Stevia rebaudiana</i> sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	33
---	----

## Índice de gráficos

<b>Gráfico 1:</b> Efecto antibacteriano in vitro de cuatro concentraciones de extracto acuoso de hoja de <i>Stevia rebaudiana</i> sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	32
---	----

## I. Introducción

Entre las afecciones bucales más frecuentes en el ser humano se encuentra la caries dental como una enfermedad infecciosa y transmisible, la cual está relacionada con malos hábitos de higiene dietética, mal oclusiones y flora oral patógena. Entre los microorganismos asociados a esta infección se encuentran bacterias del tipo *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* y/ o *Actinomyces*. Los primeros colonizadores del biofilm dental favorecen el aumento de la acidificación, produciendo la destrucción progresiva del diente que, sin una terapia adecuada, podría acarrear la pérdida total de la corona dentaria.<sup>1</sup>

*Streptococcus mutans* se encuentra en la cavidad oral tras la erupción de los dientes temporales; es una de las primeras bacterias en adherirse y multiplicarse en la superficie dental.<sup>1</sup> Posee características especiales de adherencia que involucra dos fases, la reversible que es la interacción inicial entre el organismo y las superficies dentales recubiertas con saliva y la irreversible por la presencia de glucano insoluble, sintetizado de la sacarosa producto de la acción enzimática de la glucosiltransferasa.<sup>2</sup>

*Stevia rebaudiana* es una planta originaria de Sudamérica, sus hojas son una fuente natural de edulcorante con glucósidos a los cuales llamaron esteviósidos y rebaudiósidos con 0% de calorías y más dulce que la sacarosa, además disminuye los niveles de glucosa en la sangre hasta en un 35% y tiene una alta demanda internacional por parte de Japón, China, Corea, Taiwán, Israel, Paraguay, Uruguay y Brasil.<sup>3</sup>

La importancia de la investigación radica en identificar el potencial antibacteriano de *Stevia rebaudiana* lo que permitiría una diversificación e industrialización de la planta con fines odontológicos. Por lo expuesto, se planteó el siguiente problema de investigación: ¿Cuál es el efecto antibacteriano de cuatro concentraciones de extracto acuoso de hoja de *Stevia rebaudiana* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, Trujillo 2019?

Respondiendo al problema planteado se procedió a trabajar con la siguiente hipótesis: El extracto acuoso de hoja de *Stevia rebaudiana* al 20% posee mayor efecto antibacteriano que las concentraciones al 5%, 10% y 15%, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Para lograr la contrastación de la hipótesis se propuso como objetivo general: Comparar el efecto antibacteriano de cuatro concentraciones de extracto acuoso de hoja de *Stevia rebaudiana* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, Trujillo 2019. El diseño de la investigación fue experimental, prospectivo y analítico. Los resultados mostraron que la concentración de *Stevia rebaudiana* al 20% presentó un mayor halo de inhibición, lo que demuestra un mayor efecto antibacteriano en relación a las otras concentraciones en estudio (5%, 10% y 15%) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Se llegó a la conclusión que el extracto acuoso de hoja de *Stevia rebaudiana* al 20% presenta un mayor efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en comparación de las otras tres concentraciones (5%, 10% y 15%).

## II. Revisión de la literatura

### 2.1. Antecedentes

Cáceres N.<sup>4</sup> (Puno, 2017). Efecto Antimicrobiano In Vitro Del Extracto De *Stevia rebaudiana* Sobre *Streptococcus mutans*. Determinó el efecto antimicrobiano in vitro del extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* sobre *Streptococcus mutans*; para ello utilizaron 36 placas Petri donde se aplicó muestras de *Streptococcus mutans* para luego colocar extracto de *Stevia rebaudiana* en concentraciones al 25%, 50% y 100%. El método que usó el investigador fue el propuesto por INS de Kyrby – Bauer para determinar la concentración mínima inhibitoria del extracto de *Stevia rebaudiana*. Los resultados obtenidos fueron que el extracto de *Stevia rebaudiana* tiene efecto antimicrobiano sobre el *Streptococcus mutans* en la concentración al 25% con un promedio del halo de inhibición de 10.47 mm; al 50% de 12.46 mm y al 100% de 13.49 mm de lo que se constituye en mejor efecto antimicrobiano. Se concluye que el extracto de las hojas secas de *Stevia rebaudiana* obtenido por el método de destilación agua-vapor tiene efecto antimicrobiano in vitro sobre los cultivos de la bacteria *Streptococcus mutans*.

Guevara E.<sup>5</sup> (Ecuador, 2017) Análisis Del Efecto Inhibitorio De *Stevia* En Diferentes Concentraciones Sobre *Streptococcus mutans*, Estudio In Vitro. Demostró la proliferación del *Streptococcus mutans*, in vitro, mediante el extracto hidroalcohólico de *Stevia*, para lo cual utilizó la técnica microbiológica de difusión de discos. El diseño de investigación utilizado fue el experimental, estableciendo controles: positivo Clorhexidina al 0.12% y control negativo suero fisiológico, realizando 15 repeticiones por extracto en concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100%. Los resultados obtenidos fueron que el extracto de *Stevia* al 25% y 50% no produjeron halos de inhibición, mientras que al 75% produjo una media de 6,47 mm y al 100% produjo una media de 9,33 mm de halos de inhibición. El autor concluye que el extracto de *Stevia* no tiene efecto inhibitorio sobre *Streptococcus mutans* en ninguna de las concentraciones por lo que sugiere no usar el extracto de *Stevia* como agente microbiano ante esta bacteria.

Acosta S., et al.<sup>6</sup> (Venezuela, 2017) Efecto de glucosa y de *Stevia rebaudiana* sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* en medio de cultivo axénico. Estudio que tuvo por objetivo comparar los efectos de la glucosa y *Stevia rebaudiana* sobre el aumento del *Streptococcus mutans* y la concentración del pH extracelular en un medio axénico. Se conformó tres grupos de cultivos de *Streptococcus mutans* en caldo BHI donde al grupo 1 se añadió 8ml de edulcorante comercial de extracto de hoja de *Stevia rebaudiana*, al grupo 2 se añadió glucosa 8ml y el último grupo siendo el de control no se añadió suplemento. Los

resultados evidenciaron que al grupo que se añadió glucosa hubo un mayor crecimiento de *Streptococcus mutans*, a diferencia con el grupo 1 donde se añadió un edulcorante comercial a base de *Stevia* donde hubo menor crecimiento y que a su vez presentó menor pH.; en conclusión, la *Stevia rebaudiana* inhibe el crecimiento del *Streptococcus mutans* reduciendo el nivel de pH, impidiendo que se produzca la desmineralización del esmalte dental.

Massón M., et al.<sup>7</sup> (Ecuador, 2016) Comparación De La Efectividad Antibacteriana de *Stevia rebaudiana* sobre *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*. Su objetivo fue comparar la efectividad antibacteriana de la *Stevia rebaudiana* sobre *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*. Trabajaron con 15 placas Petri con Agar Muller Hilton adicionado 5% de sangre de cordero, una vez activadas las cepas se dio paso al sembrado y cultivo por 48 horas. Para evaluar cada una de las concentraciones de *Stevia rebaudiana* se utilizaron discos de fieltro mojados correspondientemente y se colocaron en cada placa Petri, tras los tiempos definidos para el crecimiento, la evaluación realizada por el autor se llevó a cabo con la medición de halos de inhibición. La fórmula comercial de *Stevia* logró inhibir el crecimiento del *Streptococcus sanguis* en un promedio de 9,5 mm en sus halos de inhibición, y sobre *Streptococcus mutans* con halos en promedio de 11,3 mm. En conclusión, *Stevia rebaudiana* tiene un efecto inhibidor de crecimiento sobre las cepas de los microorganismos evaluados.

Becerra L.<sup>8</sup> (Trujillo, 2016) Efecto antibacteriano in vitro de un enjuague bucal a diferentes concentraciones a base de extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Determinó la actividad antibacteriana in vitro de un enjuague bucal a base de extracto etanólico de hojas de *Stevia rebaudiana* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Los extractos se obtuvieron a partir de hojas frescas de *Stevia rebaudiana*, para luego ser agregado con solventes en la elaboración de un enjuague bucal a seis concentraciones en etanol de 70° y seis concentraciones en etanol de 30°. La concentración inhibitoria mínima se obtuvo por el método de dilución en caldo. Los resultados que obtuvieron permitieron seleccionar a la CMI en 1.07mg/ml en el enjuague a base de extracto de *Stevia rebaudiana* en etanol de 70° y la concentración de 2.14mg/ml, en etanol de 30° ( $p>0.05$ ). Mientras la CMB en 75mg/ml en el enjuague bucal trabajado en etanol de 70° y siendo estadísticamente nulo en etanol de 30° ( $p<0.01$ ). En conclusión, el enjuague bucal a base de extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* posee efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans*.

Pérez S.<sup>9</sup> (Trujillo, 2013) Efecto Antibacteriano In Vitro Del Extracto Etanólico De *Stevia rebaudiana* Sobre *Streptococcus mutans*. Determinó la actividad antibacteriana de extractos etanólicos de hojas de *Stevia rebaudiana* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Los extractos se extrajeron de hojas frescas, seis concentraciones en etanol

de 70° y seis concentraciones en etanol de 30°. Para obtener la concentración inhibidora mínima se usó el método de dilución en caldo y agar, y para el efecto bactericida se aplicó la técnica de difusión de discos de Kirby y Bauer. Se realizaron tres ensayos utilizando las 12 concentraciones del extracto con el objetivo de determinar la CMI y 12 concentraciones para determinar la CMB, permitieron seleccionar a la CMI en 1,07 mg/ml en el extracto en etanol 70° y la concentración de 4,28 mg/ml, en el extracto en etanol de 30° y a la CMB en 10 mg/ml en el extracto en etanol de 70° y la concentración de 42,8 mg/ml en el extracto en etanol de 30°. El estudio concluye que el extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* posee efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Vitery G., et al.<sup>10</sup> (Colombia, 2010) Actividad Inhibitoria de la *Stevia rebaudiana* sobre el *Lactobacillus acidophilus* y el *Streptococcus mutans*. Demostraron la actividad inhibitoria de *Stevia rebaudiana* sobre *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus mutans*. Se realizó una investigación de carácter experimental, en donde a través de un estudio in vitro se comparó el efecto, en diferentes concentraciones, de extractos de *Stevia rebaudiana*, obtenidos con solventes como agua, metanol, etanol, acetato de etilo y hexano, sobre el crecimiento de cepas de *S. mutans* y *L. acidophilus* referenciadas por la American Type Culture Colección (ATCC), utilizando la técnica de difusión en Agar Mueller Hinton, como controles positivos Clorhexidina, Vancomicina

y Penicilina, y como controles negativos cada uno de los solventes. Se obtuvieron los siguientes resultados de inhibición con *Streptococcus mutans*, el extracto acuoso y el extracto metanólico en concentración mínima de 400 mg/mL produjeron un efecto inhibitorio con halo de 9 mm y 11,5 mm respectivamente. Con el extracto de acetato de etilo, la concentración mínima que requirió fue de 200 mg/ml. y formó un halo de inhibición de 11,5 mm en promedio. El extracto hexanólico se obtuvo mejores resultados con una concentración de 50mg/mL, con un halo de inhibición de 14,5 mm de diámetro. Los controles positivos en los que se utilizó una dilución de 7 sensidiscos de Vancomicina de 30 ug en un mL, generó un halo de 16,5 mm de diámetro en promedio, la clorhexidina al 0,2% mostró un halo de 15 mm de diámetro, la penicilina (disco de 10 mg) no generó ninguna actividad. Se concluye que existe una actividad antibacteriana de *Stevia Rebaudiana* contra del *S. mutans* y *L. acidophilus* y el posible potencial anticariogénico de este endulzante natural.

## 2.1. Marco teórico

### 2.2.1 Caries Dental

Se define como una enfermedad que para su formación involucran diversos elementos donde interactúan la superficie dental, la placa dental y los azúcares presentes en la dieta; esta interacción produce ácidos que, con el tiempo de presencia en el diente, dan como resultado la desmineralización del esmalte.<sup>11</sup>

Ciertamente la caries dental inicia en el tejido duro del diente, pero si ésta se deja sin tratamiento podría ingresar, a través de los conductos radiculares, hacia el tejido blando, teniendo como resultado una reacción inflamatoria y destructiva que posiblemente comprometan a los componentes del aparato estomatognático.<sup>12</sup>

En el año 1987, la OMS incorpora al concepto de caries como un proceso localizado que se inicia luego de la etapa de erupción dental, comenzando por la destrucción del esmalte y dentina del diente y si no es tratada oportunamente podría afectar el estado de salud general y la calidad de vida de las personas sin distinción de edades.<sup>13</sup>

### 2.2.1.1 Etiología

Existen factores etiológicos básicos que influyen en el proceso de la caries, como lo plantea Wewbrun, quien además de la dieta, huésped y microorganismos agrega al tiempo como un cuarto factor, que al interactuar de manera prolongada podría provocar la enfermedad, la cual se manifiesta a través de la lesión cariosa como un síntoma clínico. Otros factores son los moduladores, los cuales influyen directamente en la aparición y desarrollo de las lesiones cariosas, siendo estos: edad, salud general, fluoruros, escolaridad, nivel social y económico, índice de caries pasada, grupo epidemiológico y variables de comportamiento.<sup>13</sup> La interacción de ambos grupos de factores dan como resultado la presencia de caries dental.<sup>13</sup>

El factor huésped se encuentra en relación a dientes y saliva, características que se detallan a continuación:

Diente: Constituye la zona donde se manifiesta la dolencia, teniendo elementos causales por ácidos, esmalte susceptible de destruir o por conformación anatómica.<sup>14</sup>

Saliva: considerando a esta como un medio constante y expuesto a presencia de microorganismos bucales y carbohidratos retenidos.<sup>14</sup>

El factor microbiano en la cavidad bucal está constituido por el biofilm, microorganismos y factores de virulencia.<sup>15</sup> El biofilm o placa bacteriana, viene a ser una masa integrada por la agrupación de bacterias que se adhieren a las superficies generalmente húmedas y con materia orgánica, conocido también como biopelícula<sup>15</sup>, que para el caso de la cavidad bucal, se ubica sobre la superficie de la estructura del diente siendo el volumen y composición de acuerdo a los microorganismos presentes; iniciando de este modo la colonización bacteriana.<sup>14</sup> Se observa como una masa blanda dispersa en dientes, encías y otras superficies.<sup>16</sup>

Una de las bacterias que se encuentran en el biofilm es *Streptococcus mutans*, bacteria Gram positiva que por su capacidad de producción de glucano se adhiere a la superficie del diente atribuyéndole como el principal promotor de la caries dental.<sup>17</sup>

Los factores de virulencia, se expresan como la medida cuantitativa de la patogenicidad teniendo como indicador el número de microorganismos necesarios

como causante de enfermedad, en otras palabras, es el grado de patogenicidad.<sup>15</sup>

El factor sustrato o dieta, referido al tipo y proporción de todo tipo de alimentos que se ingiere diariamente. Estos componentes entran en contacto con los dientes y tejidos, a su vez, alimentan a los microorganismos presentes en la cavidad bucal. Se considera a los carbohidratos y grasas como agentes etiológicos esenciales en el origen de las caries dentales.<sup>18</sup>

### 2.2.2 *Streptococcus mutans*

El microorganismo que se encuentra con mayor frecuencia en la cavidad oral, además el principal causante de caries es el género *Streptococcus* y dentro de éste, la especie *Streptococcus mutans*. Los principales factores biológicos que han sido utilizados como indicadores de caries dental, los últimos 20 años son: el *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus*.<sup>19</sup>

*Streptococcus mutans* es una especie de bacterias cocáceas, Gram positivo, aerobio facultativo, agrupadas en cadena. Para su desarrollo “in vitro” necesita de medios enriquecidos y un ambiente con baja tensión de oxígeno.<sup>20</sup> De igual manera esta bacteria a base de la sacarosa empieza a producir sacarosa por

la acción de dos enzimas, la glucosiltransferasa (GTF) y la fructosiltransferasa (FTF); siendo la GTF capaz de sintetizar glucano a partir de la glucosa; la FTF, fructano a partir de la fructosa. Asimismo, el *Streptococcus mutans* integra la flora oral microbiana, permitiendo encontrarlo en pacientes con y sin caries.<sup>21</sup>

*Streptococcus mutans* es un integrante del grupo de microorganismos normales que se encuentran en la boca desde la erupción de las piezas dentarias, convirtiéndose en patógeno al aumentar su proporción relativa,<sup>22</sup> diseminándose en las superficies dentarias a través de cantidades suficientes en la saliva venciendo la resistencia a la colonización que opone la microbiota bucal normal.<sup>23</sup> Asimismo, el índice de caries está muy relacionada con este microorganismo y, en consecuencia, puede ser un factor de riesgo para la aparición de nuevas lesiones cariosas.<sup>24</sup>

Los factores de virulencia de este microorganismo son:

- Acidogénesis, se define como el mecanismo enzimático que presenta el *Streptococcus mutans* para transportar el azúcar a la célula, produciendo ácidos.<sup>25</sup>

- Acidofilia: permitiendo el crecimiento del *streptococcus mutans* inhibiendo a los microorganismos comensales.<sup>25</sup>
- Aciduricidad: capacidad de producción de ácido en un ecosistema con pH bajo.<sup>26</sup>

### 2.2.3 La Clorhexidina como agente para el control de la placa

La Clorhexidina es una molécula bicatiónica simétrica, que por sus características químicas se le reconoce con el nombre de paraclorofenilbiguanida.<sup>27</sup>

El uso de clorhexidina en tratamientos periodontales es muy común y se considera el agente más efectivo, observando una disminución de la formación de biofilm, alterando el desarrollo bacteriano. La presentación de la clorhexidina puede ser en digluconato, acetato e hidrocloreuro siendo la de mayor uso comercial el digluconato en concentrados del 12 o 20%.<sup>27</sup>

Tiene como mecanismo de acción su fuerte adhesión a la membrana celular bacteriana, a bajas concentraciones permite la filtración de componentes intracelulares incluido el potasio (efecto bacteriostático) lo que a diferencia de concentraciones más altas da como resultado la precipitación del citoplasma bacteriano y muerte celular (efecto bactericida).<sup>28</sup>

El extenso espectro de actividad antimicrobiana de la Clorhexidina abarca un gran rango de organismos Gram+ y Gram-, así como en hongos; siendo el de mayor sensibilidad los Gram+.<sup>29</sup>

Al menos un treinta por ciento del principio activo de la clorhexidina se queda en la cavidad oral después del enjuague, liberándose lentamente en los fluidos orales.<sup>30</sup>

#### 2.2.4 *Stevia rebaudiana*

Se describe a la Stevia como una planta tropical de la familia de las asteráceas<sup>31</sup>, arbusto leñoso que puede alcanzar los 80 cm de altura en su máximo desarrollo. El género Stevia comprende al menos 110 especies.<sup>32</sup>

Tiene el nombre científico de *Stevia rebaudiana Bertoni*<sup>32</sup> en honor al botánico suizo Moisés Santiago Bertoni (1857-1929) quien la descubrió en 1887, describiéndola y clasificándola en 1889; su lugar de origen es Paraguay.<sup>32</sup>

*Stevia* tiene más de doscientas especies identificadas, el sabor dulce de las hojas de *Stevia* se atribuye a los compuestos glicósidos que posee; siendo la *Stevia rebaudiana Bertoni* quien contiene compuestos más dulces por la presencia de glicósidos de esteviol.<sup>33</sup>

*Stevia rebaudiana bertonii* también conocida como ‘hierba dulce’, es la base para la producción de un edulcorante natural no clórico que lleva por nombre esteviósido, sobrepasando por su poder al endulzar hasta 300 veces más que la sacarosa; en cuanto al sabor tiene un alto grado de similitud al azúcar a diferencia de otros edulcorantes naturales, diferenciándose por no tener un sabor metálico y no ser cariogénico.<sup>34</sup>

El esteviósido, por las características que posee, puede ser recomendado en diabéticos, toda vez que está probado que no altera los niveles de glucosa en la sangre por lo que no aporta calorías al ser metabolizado, es antiácido y cardiotónico; asimismo no es fermentado por las bacterias orales por lo que no hay producción de caries.<sup>35</sup>

Con respecto al grado de toxicidad de la *Stevia*, se estableció que la dosis de *Stevia* por vía oral que se requiere para la mortalidad a 50% de los sujetos (ratones), es de 15 g/kg de peso corporal, lo que equivale para el ser humano adulto que pesa sesenta kilogramos aproximadamente debe ingerir novecientos gramos de esteviósidos, lo que significa ingerir cerca de 225 kilogramos de azúcar de caña.<sup>36</sup>

#### 2.2.4.1. Composición

La presencia de glucósidos de esteviol aislados identificados como esteviósido, esteviolbiónido, rebaudiósido A,B,C,D,E,F y dulcósido, que de acuerdo a la especie, condiciones de cultivo y tamaño de la hoja, se encuentran en mayor o menor porcentaje alcanzando hasta el 15% de su composición; siendo los componentes responsables de hacer dulce a las hojas de *Stevia*.<sup>37</sup>

#### 2.2.4.2 Ventajas y Usos

Existen estudios que aprueban el uso de *Stevia rebaudiana* para diabéticos, es hipotensora, usos en el cuidado del rostro, para problemas de acidez estomacal, sirve también disminuyendo el nivel de pH ácido de la

sangre y orina, ayuda en el control de la masa corporal ya que su porcentaje en calorías es de 0%, a diferencia de los daños ocasionados por el azúcar y los demás edulcorantes artificiales.<sup>31</sup> Además, su capacidad de solubilidad en agua, sin nutrientes, sin calorías, es estable a los 200°C, no se fermenta, no crea biofilm y es anticaries.<sup>35</sup>

El uso de la *Stevia* en Paraguay es de manera natural como antibacteriano, inhibiendo el crecimiento de bacterias, principalmente las bacterias o microorganismos que producen las caries y los problemas en las encías; entre sus otros usos es para aliviar la garganta irritada, gingivitis o encías sangrantes, uno de los signos más comunes de la diabetes.<sup>36</sup>

Existen evidencias del uso de la *Stevia* para reemplazar edulcorantes en comidas y bebidas en general. Últimamente viene siendo agregado a bebidas de bajo contenido calórico, productos medicinales y de higiene bucal, teniendo como ejemplo a China que la utiliza en la formulación de pastas dentales.<sup>38</sup>

#### 2.2.4.3 Efectos

El grado de interés en la prevención de caries y promocionar la salud oral es una principal causa para el uso de edulcorantes con bajo efecto cariogénico.<sup>39</sup> El efecto cariogénico de la *Stevia* radica en que no produce aumento en la acidez superficial del diente.<sup>40</sup>

Su principal efecto del esteviósido trae como beneficio la sustitución de la sacarosa en el alimento por una sustancia no cariogénica,<sup>41</sup> así como, el efecto sobre las enzimas responsables de la descomposición de azúcares.<sup>42</sup>

#### 2.2.4.4 Análisis fitoquímico

Las hojas de *Stevia rebaudiana* contienen esteroides o triterpenoides, glicósidos cardíacos, saponinas, taninos y compuestos reductores.<sup>43</sup>

En la India los cultivos de hojas de *Stevia rebaudiana*, contienen compuestos reductores, esteroides y triterpenos, glicósidos cardíacos, saponinas y taninos.<sup>43</sup>

Una posible interferencia en la prueba de taninos es la reducción del hierro (III) del FeCl<sub>3</sub>, sin embargo, se ha reportado presencia de compuestos fenólicos.<sup>43</sup>

### **III. Hipótesis**

El extracto acuoso de hoja de *Stevia rebaudiana* al 20% posee mayor efecto antibacteriano que las otras tres concentraciones (5%, 10% y 15%), sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

### **IV. Metodología**

#### **4.1. Diseño de la investigación**

Según la manipulación del investigador es experimental a partir del cual se analiza el efecto antibacteriano producido por el extracto de *Stevia rebaudiana* como variable independiente sobre la variable dependiente *Streptococcus mutans*.<sup>44</sup>

Según la planificación es prospectivo, porque los resultados se van a recoger luego de realizada la prueba.<sup>44</sup>

Según el número de variables de estudio es analítico, porque cuenta con dos variables.<sup>44</sup>

## **4.2. Población y muestra**

### **4.2.1 Población:**

Cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

### **4.2.2 Criterios de selección**

#### **a) Criterios de inclusión:**

Placas Petri sembradas con Cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 27175. (código de identificación según American Type Culture Collection)

#### **b) Criterios de exclusión**

Placas Petri con signos de contaminación.

#### 4.2.3 Muestra: Tamaño de muestra:

Para determinar el tamaño de la muestra, se empleó la siguiente formula:

$$n = 2 \left( Z_{\frac{\alpha}{2}} + Z_{\beta} \right)^2 (DE)^2 / d^2$$

Dónde:

n: tamaño de muestra para el grupo de estudio.

$\alpha$ : probabilidad de cometer error tipo I.

$\beta$ : probabilidad de cometer error tipo II.

Z: valor estándar de la distribución normal asociada a un tipo de error.

DE: desviación estándar.

d: diferencia entre promedios para rechazar igualdad de medias.

Requerimientos:

De una confianza al 95% ( $\alpha=0.05$ ,  $Z=1.96$ ), y una potencia en la prueba del 80% ( $\beta=0.20$ ,  $Z=0.84$ ), para  $(DE/d=0.80)^1$ .

$$n = 2(1.96 + 0.84)^2(0.8)^2$$

$$n = 10$$

Se realizó 10 repeticiones por cada grupo experimental, utilizando dos placas Petri para cada grupo de estudio con cinco repeticiones.

### 4.3. Definición y operacionalización de variables e indicadores

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicador	Valor final	Tipo De Variable	Escala De Medición
DEPENDIENTE Efecto antibacteriano sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	Antibacteriano es que sirve para combatir las infecciones causadas por bacterias. <i>Streptococcus mutans</i> bacteria que pertenece a la especie de bacterias cocáceas, Gram positivo, aerobio facultativo, agrupadas en cadena. Para su desarrollo “in vitro” necesita de medios enriquecidos y un ambiente con baja tensión de oxígeno. <sup>23</sup>	Halo de inhibición	Diámetro de halos de inhibición de <i>Streptococcus mutans</i> .	mm	Cuantitativa	De Razón
INDEPENDIENTE Extracto acuoso de hoja de <i>Stevia rebaudiana</i>	Se describe a la Stevia como una planta tropical de la familia de las asteráceas <sup>34</sup> , arbusto leñoso que puede alcanzar los 80 cm de altura en su máximo desarrollo. El género Stevia comprende al menos 110 especies. <sup>34</sup>  <i>Stevia rebaudiana bertonii</i> , o ‘hierba dulce’, es la principal productora de un edulcorante natural no calórico llamado esteviósido, cuyo poder es hasta 300 veces mayor que el de la sacarosa o azúcar de caña; es lo más parecido al azúcar entre todos los edulcorantes naturales, distinguiéndose de los edulcorantes artificiales por no tener sabor metálico y no ser cancerígeno. <sup>35</sup>	Cuatro concentraciones de hoja de <i>Stevia rebaudiana</i>	Rótulo	<input type="checkbox"/> 5% de concentración <input type="checkbox"/> 10% de concentración <input type="checkbox"/> 15% de concentración <input type="checkbox"/> 20% de concentración	Cualitativo	Ordinal

#### **4.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos:**

**4.4.1 Técnica:** La presente investigación utilizó la técnica de observación.

**4.4.2 Instrumento:** Para medir el efecto antibacteriano se utilizó un vernier digital calibrado con ISO 9001 (anexo 1). Se midió con el vernier digital los halos de inhibición y se colocaron los datos en la ficha de observación (anexo 2).

#### **4.4.3 Obtención del extracto acuoso de *Stevia rebaudiana***

##### **a. Recolección e identificación taxonómica**

2 kg de hojas de *Stevia*, se recolectaron, del distrito de Rioja provincia de Rioja, región San Martín, durante el mes de abril. Un ejemplar completo de la planta se llevó al Herbarium Truxillense de la Universidad Nacional de Trujillo para su identificación y posterior verificación taxonómica. (anexo 3)

##### **b. Selección de la muestra vegetal**

Una vez recolectadas las hojas, se seleccionaron las que estén en buenas condiciones, que no tengan ataques de hongos, ni estén decoloradas y marchitadas.

##### **c. Preparación de la muestra vegetal:** <sup>45,46</sup>

**Lavado y desinfección:** Se lavaron cada una de las hojas con agua destilada y luego se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0.5%.

**Secado:** Las hojas se llevaron a secar a una estufa de circulación de aire por convección forzada (40 °C) por 48 horas.

**Pulverización:** Las hojas una vez secadas, fueron pulverizadas con ayuda de un mortero.

**Tamizaje:** Luego las hojas pulverizadas, se pasaron a través del tamiz de malla N° 20, para obtener partículas de tamaño homogéneo.

**Almacenamiento:** El polvo de las hojas pulverizadas y tamizadas se guardaron en frascos de vidrio de color ámbar de boca ancha, hasta su posterior utilización.

**d. Preparación del extracto acuoso de *Stevia rebaudiana***<sup>45,46</sup>

Se pesó en una balanza analítica marca “Radwag” con exactitud 50 g de polvo de las hojas. Luego se colocaron, en un balón de vidrio de dos litros de capacidad y se añadirán 500 mL de agua destilada. Se mezcló bien, y se llevó a reflujo por dos horas. Transcurrido el tiempo, se enfrió y se filtró el extracto acuoso al vacío, con papel de filtro Whatman N° 1. Posteriormente, el extracto acuoso se concentró en un rotavapor hasta obtener extracto blando. Luego se llevó a secar a la estufa de circulación de aire a 40 °C hasta obtener el extracto seco. A partir del extracto seco se preparó las concentraciones de 5% (50mg/mL), 10% (100 mg/mL), 15 % (150 mg/mL) y 20% (200mg/mL), disueltos en agua. Finalmente, los extractos acuosos se guardaron en frascos de vidrio de color ámbar y en refrigeración 4 - 8 °C hasta su posterior utilización.

#### 4.4.4. Método microbiológico

##### a. Obtención de la bacteria

La cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en un cultivo liofilizado se obtuvo del laboratorio microbiológico GenLab del Perú S.A.C. (anexo 4)

##### b. Preparación del inóculo

En tubos de ensayo cerrados herméticamente conteniendo el medio agar Soya tripticasa se cultivaron las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Se incubaron bajo condiciones de microanaerobiosis a 37 °C con el fin de obtener colonias jóvenes, luego de 24 horas cada cepa se diluyó con 10 ml de suero fisiológico en tubos de ensayo de 12 cm, en el primer tubo 1 ml de muestra diluidos en 9 ml de suero fisiológico para obtener la escala  $10^1$ . El segundo tubo de ensayo se echó 1 ml de la solución de la escala  $10^1$  con 9 ml de suero fisiológico obteniendo una escala de  $10^2$  con la cual se trabajó. El inóculo de *Streptococcus mutans*, fue preparado en tubos de ensayo, suspendiendo las colonias puras aisladas en 0.5 ml de suero fisiológico hasta obtener una turbidez de 0.5 de Mac Farland, que corresponde a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  alfa unidades formadoras de colonias de *Streptococcus mutans* por 1ml (UFC/ml).<sup>23</sup>

#### **4.4.5. Fase Experimental**

##### **a. Inoculación de la suspensión bacteriana**

Haciendo uso del asa de Kolle, se procedió a sembrar *Streptococcus mutans*, a cada placa con agar Soya tripticasa totalmente estériles. Transcurrido la inoculación de la suspensión bacteriana, después de 10 minutos se procedió a realizar los pocillos en la placa Petri, para luego introducir el disco de antibiograma (técnica Kirby – Bauer) sin contenido y estéril para aplicar con una pipeta el tratamiento con *Stevia rebaudiana* a concentraciones al 5%, 10%, 15%, 20%, Clorhexidina 0.12% (control positivo) y agua destilada (control negativo), en un volumen de 10 ul, para cada uno de los cinco sensidiscos para cada dos placas (100 mm), luego se incubó la totalidad de las muestras con temperatura de 36° C por 24 horas determinadas en medio anaerobio.

##### **4.4.6. Métodos para la medición de los halos de inhibición.**

Para medir los halos de inhibición se tomó en cuenta la totalidad de los 40 sensidiscos con el tratamiento desarrollado en la placa Petri. Se procedió con la medición del diámetro del halo de inhibición en milímetros con un vernier certificado bajo la norma ISO 9001. Se sumaron las medidas del halo de inhibición de los cinco sensidiscos por cada dos placas por concentración para obtener los promedios respectivos.

#### **4.5. Plan de análisis**

Para el análisis estadístico se realizó con el programa estadístico SPSS v. 22, y Microsoft Excel, considerando el procedimiento que a continuación se indica:

Para la presente investigación, en el análisis de los datos se aplicó la estadística descriptiva e inferencial.

Para la verificación de la distribución normal se utilizó la prueba de Shapiro- Wilk; como la distribución es libre, se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis ( $p = 0.05$ ), para la comparación múltiple se utilizó el test de Duncan, para dar respuesta a cada objetivo.

#### 4.6 Matriz de consistencia

Título	Problema	Objetivo	Hipótesis	Metodología	Universo
<p>Efecto antibacteriano de cuatro concentraciones de extracto acuoso de hoja de <i>Stevia rebaudiana</i> sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, Trujillo 2019.</p>	<p>¿Cuál es el efecto antibacteriano de cuatro concentraciones de extracto acuoso de hoja de <i>Stevia rebaudiana</i> sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, Trujillo 2019?</p>	<p><b>Objetivo general:</b> Comparar el efecto antibacteriano de cuatro concentraciones de extracto acuoso de hoja de <i>Stevia rebaudiana</i> sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, Trujillo 2019.</p> <p><b>Objetivos específicos:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Evaluar el efecto antibacteriano al 5% de extracto acuoso de hoja de <i>Stevia rebaudiana</i> sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, Trujillo 2019.</li> <li>• Evaluar el efecto antibacteriano al 10% de extracto acuoso de hoja de <i>Stevia rebaudiana</i> sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, Trujillo 2019.</li> <li>• Evaluar el efecto antibacteriano al 15% de extracto acuoso de hoja de <i>Stevia rebaudiana</i> sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, Trujillo 2019.</li> <li>• Evaluar el efecto antibacteriano al 20% de extracto acuoso de hoja de <i>Stevia rebaudiana</i> sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, Trujillo 2019.</li> </ul>	<p>El extracto acuoso de hoja de <i>Stevia rebaudiana</i> al 20% posee mayor efecto antibacteriano que las otras tres concentraciones (5%, 10% y 15%), sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.</p>	<p>Tipo: Cuantitativo Nivel: Explicativo Diseño: Experimental</p>	<p>Cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175</p> <p>Muestra: 10 repeticiones para cada grupo de estudio, utilizando dos placas Petri para cada extracto con cinco repeticiones.</p>

## 4.7 Principios éticos

Este estudio de investigación se fundamentó en los principios de cuidado del medio ambiente y la biodiversidad, justicia e integridad científica del Código de Ética de la Universidad Católica Los Ángeles De Chimbote.<sup>47</sup> Además al finalizar el estudio las placas Petri con cultivos utilizados fueron expuestas a 121 °C y 1 Bar de presión, fueron inactivadas en autoclave a fin de desechar el material biológico contaminado aplicando las normas de manejo de desechos hospitalarios.<sup>48</sup>

Los residuos microbiológicos y patológicos fueron eliminados de forma tal que se asegure su descontaminación en autoclave (residuos microbiológicos) o incineración (residuos patológicos). Esto significa una bolsa primaria de color negro, se llenó solo hasta  $\frac{3}{4}$  partes de su capacidad y anudada y sobre ésta una bolsa color amarillo con logo y pre impreso de residuos especiales, se marcaron el tipo de residuos que contuvo, el laboratorio o área de generación y la fecha. Estas bolsas cerradas anudadas, fueron almacenadas temporalmente en las áreas sucias en contenedores de color amarillo con logo de Residuo Biológico.<sup>49</sup>

## V. Resultados

### 5.1 Resultados

**Tabla 1**

**Efecto antibacteriano in vitro de cuatro concentraciones de extracto acuoso de hoja de *Stevia rebaudiana* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.**

Tratamientos	N	Diámetro (mm)		Sig. (p)*
		Media	Desviación típica	
<i>Stevia</i> 5%	10	6.99	1.57	0.000
<i>Stevia</i> 10%	10	7.36	2.21	
<i>Stevia</i> 15%	10	8.87	3.01	
<i>Stevia</i> 20%	10	9.17	2.85	
Clorhexidina 0.12%	10	26.04	0.30	
Agua Destilada	10	0.0	0.0	

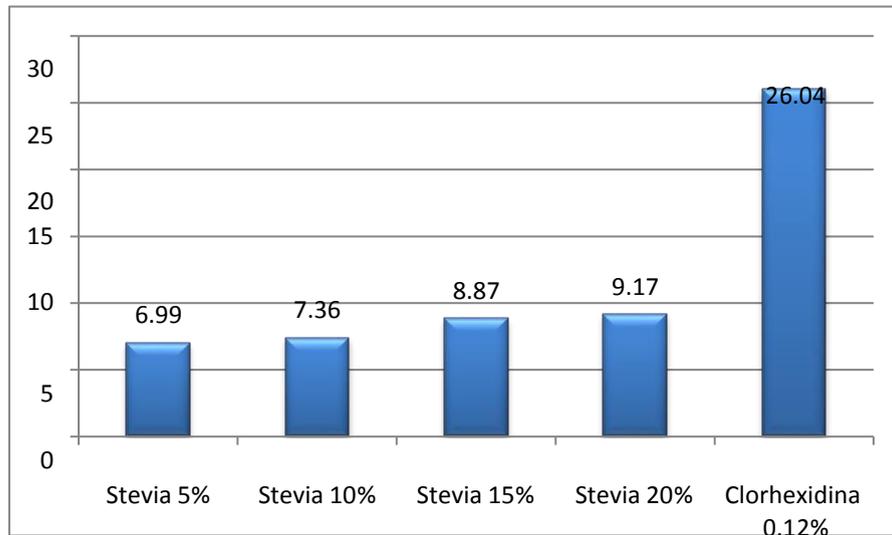
*Fuente: Datos propios obtenidos de medición.*

*p\*:* prueba KRUSKAL WALLIS, nivel de significancia estadística ( $p < 0.05$ )

**Interpretación:** De la tabla 1, aplicado la prueba no paramétrica KRUSKAL WALLIS, se obtuvo ( $p = 0.003 < 0.05$ ), de lo cual podemos indicar que sí existe una diferencia estadística entre los grupos de estudio y clorhexidina 0.12%. El promedio de los halos de inhibición de la concentración al 20% es de 9.17 mm y el del control positivo es 26.04 mm.

**Gráfico 1**

**Efecto antibacteriano in vitro de cuatro concentraciones de extracto acuoso de hoja de *Stevia rebaudiana* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.**



*Fuente: Datos obtenidos de la tabla 1*

**Interpretación:**

Las concentraciones de *Stevia rebaudiana* al 5% y 10% obtuvieron un halo de inhibición de 6.99 mm y 7.36 mm respectivamente, considerándose nulos en la escala de Duraffourd.<sup>50</sup>

Las concentraciones de *Stevia rebaudiana* al 15% y 20% obtuvieron un halo de inhibición de 8.87 mm y 9.17 mm respectivamente, considerándose con una sensibilidad límite en la escala de Duraffourd.<sup>50</sup>

Existe una diferencia estadística entre los grupos de estudio y clorhexidina 0.12%.

**Tabla 2**

**Test de Duncan, efecto antibacteriano in vitro de cuatro concentraciones de extracto acuoso de hoja de *Stevia rebaudiana* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.**

**TEST DUNCAN**

<i>Temperatura</i>	<i>N</i>	<i>Subconjunto para alfa =0.05 - (Test Duncan)</i>			
		<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
<i>Agua Destilada</i>	10	0.00			
<i>Stevia 5%</i>	10		6.99		
<i>Stevia 10%</i>	10		7.36	7.36	
<i>Stevia 15%</i>	10		8.87	8.87	
<i>Stevia 20%</i>	10			9.17	
<i>Clorhexidina 0.12%</i>	10				26.04
<b>Sig.</b>		1.000	0.053	0.063	1.000

**Interpretación:**

Comparando los tratamientos del extracto acuoso de hoja de *Stevia* al 5% y 20%, podemos indicar que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos evaluados.

Comparando los tratamientos del extracto acuoso de hoja de *Stevia* al 5% y 10%, de lo cual podemos indicar que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos evaluados.

Comparando los tratamientos del extracto acuoso de hoja de *Stevia* al 15% y 20%, de lo cual podemos indicar que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos evaluados.

Según la escala de Duraffourd<sup>50</sup> el efecto antibacteriano de las concentraciones al 5% y 10% es nulo, debido a que el halo de inhibición que presentan es menor a 8 mm.

## 5.2 Análisis de los resultados

A partir del conocimiento de la capacidad de *Streptococcus mutans* en la producción de glucano y su adherencia a la superficie del diente induciendo a la formación de caries dental<sup>17</sup>, la investigación propuso el siguiente objetivo general: Comparar el efecto antibacteriano de cuatro concentraciones de extracto acuoso de hoja de *Stevia rebaudiana* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, Trujillo 2019.

Los resultados comparativos entre las concentraciones de 5%, 10% y 15% de extracto acuoso de hoja de *Stevia rebaudiana* sobre *Streptococcus mutans* no muestran una diferencia significativa entre ellos, pero sí se evidencia halos inhibitorios en cada una de las concentraciones independientemente. Sin embargo, al comparar las concentraciones de 5% y 20% se encontró una diferencia significativa, donde la concentración al 20% es la que muestra un mayor efecto inhibitorio sobre *Streptococcus mutans*; por lo que se puede determinar que el efecto inhibitorio se ve condicionado por el grado de concentración del extracto de *Stevia rebaudiana* y por los componentes de la planta.

Similar resultado obtuvo Cáceres<sup>4</sup> en otras proporciones, reportando que al 100% de concentración de *Stevia rebaudiana* existe efecto antibacteriano, por otro lado, Massón<sup>7</sup> determinó un mejor rendimiento con variación 107% en relación con la fórmula extracto acuoso sobre *Streptococcus mutans*, llegando a la misma conclusión.

A diferencia de los resultados mostrados en el estudio de Guevara<sup>5</sup> en que se aplica el extracto hidroalcohólico de *Stevia rebaudiana* en concentraciones al 25%, 50% ,75% y 100% sobre *Streptococcus mutans*; no se produjeron halos de inhibición al 25% y 50% mientras que al 75% se mostró una media de 6.47mm y al 100% produjo una media de 9.33 mm de halos de inhibición; el autor sugiere no hacer uso del extracto de *Stevia* como agente antimicrobiano sobre *Streptococcus mutans*; lo que no sucede con la concentración de extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* con efecto inhibitorio sobre *Streptococcus mutans* evidenciado en los resultados de la presente investigación.

Asimismo, la escala de Duraffourd, define que cuando el diámetro de los halos es inferior a 8mm, se determina como efecto nulo; lo que sucede en los resultados hallados en las concentraciones de *Stevia* al 5% y 10%; por lo tanto, estas concentraciones no reportan efecto inhibitorio para *Streptococcus mutans*.<sup>50</sup> Comparando con los diámetros de los halos de las concentraciones al 15% y 20% considerados con una sensibilidad límite.

El efecto anticariogénico de *Stevia*, radica en que no produce aumento de la acidez superficial del diente.<sup>40</sup> Su principal efecto del esteviósido trae como beneficio la sustitución de la sacarosa en el alimento por una sustancia no cariogénica,<sup>41</sup> este componente además ayuda a inhibir a las bacterias ya que cambia el nivel de pH, según Acosta S.<sup>6</sup>

Al comparar los halos de inhibición obtenidos con el control positivo, presentaron una diferencia significativa, siendo mayor el producido por la clorhexidina 0.12%. Esto se debería a que el mecanismo de acción de la clorhexidina se da mediante su adhesión a la membrana celular bacteriana, permitiendo aún en bajas concentraciones la filtración de componentes intracelulares incluido el potasio (efecto bacteriostático) lo que a diferencia de concentraciones más altas da como resultado la precipitación del citoplasma bacteriano y muerte celular (efecto bactericida).<sup>28</sup> Caso contrario sucede con *Stevia rebaudiana* que actúa cambiando el nivel de pH del medio para lograr la inhibición.<sup>6</sup>

## VI. Conclusiones

1. El extracto acuoso de hoja de *Stevia rebaudiana* al 20% presenta un mayor efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en comparación de las otras tres concentraciones (5%, 10% y 15%).
2. Las concentraciones de extracto acuoso de hoja de *Stevia rebaudiana* al 5% y 10%, presentaron un efecto antibacteriano nulo frente a *Streptococcus mutans*.
3. El extracto acuoso de hoja de *Stevia rebaudiana* al 15% presentó efecto antibacteriano frente a *Streptococcus mutans*.

## Aspectos complementarios

1. Realizar trabajos de investigación, in vitro, para la elaboración de enjuagatorios bucales, dentífricos que contengan extracto de *Stevia rebaudiana*.
2. Motivar la investigación científica que permita el análisis de plantas medicinales y su mecanismo de acción sobre microorganismos que causan caries dental u otras enfermedades bucales.
3. A partir de los resultados de investigaciones científicas promover la industrialización de productos naturales como alternativa para la salud bucal

## Referencias bibliográficas

1. Narvaez, J. Prevalencia de caries dental según el índice ceod en niños y niñas de 4 a 6 años de edad que están bajo cuidado de sus padres vs. Niños y niñas que ha sufrido algún tipo de desintegración familiar en la Escuela Fiscal Mixta Mentor Gamboa Collantes. [Tesis]. Ecuador: Universidad central del Ecuador; 2011.
2. Slade H, Hamada S. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Rev. PubMed Central (PMC) [Internet]. 2019 [citado 5 abril 2018]; 44(2):331–384. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC373181/>
3. Álvarez, J. Stevia Rebaudiana Bertoni. [Tesis] Universidad EAFIT. Departamento De Negocios Internacionales. Secretaria De Agricultura y Desarrollo Rural De Antioquia, Medellín; 2004:71.
4. Cáceres N. Efecto Antimicrobiano In Vitro Del Extracto De Stevia Rebaudiana Sobre el *Streptococcus Mutans*. [Tesis]. Perú: Universidad Nacional Del Altiplano; 2017.

5. Guevara Frias E. Análisis Del Efecto Inhibitorio De Stevia En Diferentes Concentraciones Sobre Streptococcus Mutans, Estudio In Vitro [Tesis]. Ecuador: Universidad Central Del Ecuador; 2017.
6. Acosta A., Pérez M., Ramos N., Pérez L. Efecto de glucosa y de Stevia rebaudiana sobre el crecimiento de Streptococcus mutans en medio de cultivo axénico [Tesis]. Venezuela: Universidad de Carabobo; 2017.
7. Massón M, Armas A. Comparación de la efectividad antibacteriana de la Stevia Rebaudiana sobre Streptococcus Mutans y Streptococcus Sanguinis. KIRU [Internet]. 2016 [citado 6 abril 2018];13(2):127-132. Disponible en: <https://www.aulavirtualusmp.pe/ojs/index.php/Rev-Kiru0/article/view/997>
8. Becerra L. Efecto antibacteriano in vitro de un enjuague bucal a diferentes concentraciones a base de extracto etanolico de Stevia rebaudiana sobre el crecimiento de Streptococcus mutans ATCC 25175. [Tesis]. Trujillo, Perú. Universidad Nacional de Trujillo; 2016.
9. Pérez S. Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de Stevia rebaudiana sobre Streptococcus mutans ATCC 25175 [Tesis]. Perú: Universidad Nacional de Trujillo; 2013.

10. Vitery G, Escribano S, Gamboa F, Chavarria N, Gómez R. Actividad Inhibitoria De La Stevia Rebaudiana Sobre El Lactobacillus Acidophilus Y El Streptococcus Mutans. Rev. Nacional de Odontología [Internet]. 2010 [citado 7 Abril 2018]; 6(10). Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/267098167\\_actividad\\_inhibitoria\\_de\\_la\\_stevia\\_rebaudiana\\_sobre\\_el\\_lactobacillus\\_acidophilus\\_y\\_el\\_streptococcus\\_mutans\\_inhibitory\\_activity\\_of\\_stevia\\_rebaudiana\\_upon\\_lactobacillus\\_acidophilus\\_and\\_the\\_streptococcus](https://www.researchgate.net/publication/267098167_actividad_inhibitoria_de_la_stevia_rebaudiana_sobre_el_lactobacillus_acidophilus_y_el_streptococcus_mutans_inhibitory_activity_of_stevia_rebaudiana_upon_lactobacillus_acidophilus_and_the_streptococcus)
11. Federación Dental Internacional (FDI). El desafío de las enfermedades bucodentales --- Una llamada a la acción global. Atlas de Salud Bucodental [Internet]. 2015 [citado 7 abril 2018]; 1(2). Ginebra. Disponible en: [http://www.fdiworldental.org/media/84768/book\\_spreads\\_oh2\\_spanish.pdf](http://www.fdiworldental.org/media/84768/book_spreads_oh2_spanish.pdf)
12. Miguelañez B, Pastor M, Sarría B. Estado actual de la etiología de la caries dental [Internet]. Universidad Rey Juan Carlos. 2007 [citado 7 abril 2018]. Disponible en: [http://biopat.cs.urjc.es/conganat/files/2006-2007\\_G13.pdf](http://biopat.cs.urjc.es/conganat/files/2006-2007_G13.pdf)
13. Cuadrado D., Gómez J.; Cariología: el manejo contemporáneo de la caries dental. Universidad Nacional Autónoma de México. 2014; 1(1): 5-97.
14. Mattos Vela M., Melgar Hermoza R.; Riesgo de caries dental. Rev Estomatol Herediana [Internet]. 2004 [citado 7 abril 2018];14(2): 101 - 106. Disponible en: <http://revistas.upch.edu.pe/>

15. Cárdenas-Perea M.E., Cruz y López O.R., Gándara-Ramírez J.L., Pérez Hernández M.A.; Factores de virulencia bacteriana: la “inteligencia” de las bacterias. *Elementos* 94. 2014; 1(1) 35-43.
16. Carrasco Castro M., Castillo Aguirre M.J.; Características clínicas-radiográficas de molares permanentes aplicados carioestáticos hace tres años. Universidad de Cuenca, Ecuador 2002.
17. Finn S. *Odontología Pediátrica*. Caracas, 2004: (2) 117-32.
18. García G. *Factores e indicadores de riesgo de caries dental*. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2007
19. De Almeida N. *Epidemiología sin números*. Washington,DC. OPS; 1992. 26
20. Loesche W. Role of *Streptococcus mutans* in Human Dental Decay. *Microbiol Rev.* [Internet] 1986 [citado 7 de abril 2018]; 50(4):353-380. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC373078/>
21. Gutiérrez P. *Fundamentos de Ciencias básicas aplicadas a la odontología*. Bogotá: pontificia Universidad Javeriana; 2006; 1 (1)

22. Ojeda J., Oviedo E., Salas L. Streptococcus mutans and dental caries. Rev. CES odontología [Internet]. 2013 [citado 8 de abril 2018]; 26(1): 44-56. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/ceso/v26n1/v26n1a05.pdf>
23. Huerta,J. Principios de Microbiología Bucal. Universidad de Chile. 1975.; 23-33.
24. Graciano C, Martínez B, Ceballos S. Streptococcus mutans y caries dental en América Latina. Revisión sistemática de la literatura. Revista Nacional de Odontología [Internet]. 2012 [citado 8 de abril 2018]; 8 (14). Disponible en: <https://revistas.ucc.edu.co/index.php/od/article/view/282>
25. Negroni N. Microbiología estomatológica fundamentos y guía práctica. Buenos aires: panamericana. 2009; 1 (2).
26. Gonzalez SA, Gonzalez NB; Gonzalez NE. Salud dental: relación entre la caries dental y el consumo de alimentos. ISNN. 2013; 28(4):64-71
27. Bascones,A. Periodoncia Clpinica e Implantología Oral. Madrid; Ediciones; Avances Médico-Dentales. 2001; 455-71
28. Greenstain G, Berman C, Joffin R. Chlorhexidine- an adjunct to periodontal therapy. J Periodontol 1986; 57:370-7.

29. Hennesey T. Some bacterial properties of chlorhexidine. J Periodont Res 8. 1973; 61-7.
30. Sotero N, Arreguin S, García A, Fernández L, López M, Morales C, et al. Evaluación de dos extractos de *Stevia rebaudiana* Bertoni sobre enterobacterias resistentes a antibióticos. Rev Mex Cienc Farm. [Internet] 2017 [citado 8 de abril 2018]; 48 (3): 75-80. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57956616009>
31. Geuns J. Effect of stevioside and esteviol on the developing broiler embryos. J Agric Food Chem. 2003;51(17):5162-5167
32. Rajbhandari C, Roberts S. The flavonoids of *Stevia nepetifolia* J Nat Prod 1983; 47:559–560.
33. Herrera G. El cultivo de *Stevia* (*Stevia rebaudiana*) Bertoni en condiciones agroambientales de Nayarit México. Inifap.2012. 14-16
34. Brandle J, Starratt A, Gijzen M. *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties. Can J Plant Sci. 1998; 78:527-36
35. Schwebel R. *Stevia*, el edulcorante natural sudamericano con cero calorías. [Internet] 2005 [Citado 8 de abril 2018]. Disponible en: <http://www.geocities.com/schwebelrene/>.

36. Gilabert, J.; Encinas, De la stevia al E-960: un dulce camino. Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad Complutense de Madrid. Reduca (Recursos Educativos). Serie Congresos Alumno. 2014; 6: 305-311.
37. Brandle J. Stevia, Nature's natural low-calorie sweetener. [Internet] 2005 [Citado 10 de Abril 2018] Disponible en: [http://res2.agr.ca/London/faq/stevia\\_e.htm](http://res2.agr.ca/London/faq/stevia_e.htm).
38. Akashi A, Yokoyama S. Dried-Leaf Extracts of Stevia. Toxicological Tests. Shokuin Kogyo. 1975. 18(20):34-43
39. Barriocanal L, Palacios M, Benitez G, Benitez S, Jimenez J, Jimenez N, et al. Apparent lack of pharmacological effect of esteviol glucosides used as sweeteners in humans. A pilot study of repeated exposures in some normotensive and hypotensive individuals and in type 1 and Types 2 diabetics. Regul Toxicol Pharmacol. 2008; 51(1):37-41
40. De Paula C, Simanca M, Pastrana Y, Carmona A, Lombana G. Condiciones de utilización del esteviósido en la elaboración de mermelada de guayaba dulce. Revista de la Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos. [Internet] 2010. [Citado 10 de abril 2018]. 21:1-12. Disponible en: <https://hortintl.cals.ncsu.edu/es/articles/condiciones-de-utilizaci-n-del-estevi-sido-en-la-elaboraci-n-de-mermelada-de-guayaba-dulce->

41. Matsukubo T, Takazoe I. Sucrose substitutes and their role in caries prevention. *Int Dent J*. 2006; 56(3):119-30
42. Goodson C. Effect of a Truvia Rebiana on the pH of Dental Plaque. Abstract presented at the International Association for Dental Research General Sessions, Barcelona, Julio. 2010
43. Tadhani M., Subhash R. Preliminary studies on Stevia rebaudiana leaves: proximal composition, mineral analysis and phytochemical screening. *Journal of Medical Sciences*. 2006; 6(3) : 321 -326
44. Domínguez J. Manual de Metodología de la Investigación Científica (MIMI). Universidad Católica Los Angeles de Chimbote.2015.
45. Contreras S. Anticariogenic properties and effects on periodontal structures of Stevia rebaudiana Bertoni. Narrative review. *J Oral Res*. 2013; 2(3): 158-166
46. Miranda, M. Métodos de Análisis de Drogas y Extractos. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad Habana de Cuba.2002.
47. Código de ética para la investigación. ULADECH. Versión 001 [Internet]. [citado 20 Junio 2019]. Disponible en: <http://repositorio.uladech.edu.pe/bitstream/handle/123456789/7455/codigo-de-etica-paralainvestigacionv001.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

48. Fica, A, Ruíz G, Yunes Alí. Normas de manejo de desechos hospitalarios. Rev. Medwave [Internet] 2008 [citado 02 diciembre 2019];3(3)
49. Procedimiento para el manejo de eliminación de residuos biológicos. Universidad católica pontificia de Chile. 2013; 1-7  
Disponibile en:<http://postgrado.bio.uc.cl/wp-content/uploads/2015/06/manejo-y-eliminacion-de-residuos-biologicos.pdf>
50. Durafflourd C, Hervicourt L, Lapraz J. Cuadernos de Fitoterapia Clínica. 1º edición. París: Masson SA; 1983

# ANEXOS

# Anexo 1

Confiabilidad del instrumento Vernier digital (ISO 9001 de calidad)



## Anexo 2

### FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Efecto Antibacteriano de Cuatro Concentraciones de Extracto Acuoso de Hoja de *Stevia rebaudiana* Sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, Trujillo 2019

REPETICIONES	HALOS DE INHIBICIÓN EN mm					
	Extracto acuoso de las hojas de <i>Stevia rebaudiana</i>				Control Positivo	Control Negativo
	5%	10%	15%	20%	Clorhexidina 0.12%	Agua Destilada
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
TOTAL						
PROMEDIO						

## Anexo 3

### CONSTANCIA DE TAXONOMÍA



#### Herbarium Truxillense (HUT)

Universidad Nacional de Trujillo  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Jr. San Martín 392, Trujillo - Perú



Constancia N° 009 – 2019- HUT

EL DIRECTOR DEL HERBARIUM TRUXILLENSE (HUT) DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

Da Constancia de la determinación taxonómica de un (01) espécimen vegetal.

- Clase: Magnoliopsida
- Subclase: Asteridae
- Superorden: Spermatophyta
- Orden: Asterales
- Familia: Asteraceae
- Género: *Stevia*
- Especie: *Stevia rebaudiana*
- Nombre vulgar: "estevia"

Muestra alcanzada a este despacho por LUIS JOSÉ SEBASTIAN DÍAZ VELÁSQUEZ, identificado con DNI 70257312, con domicilio legal en Trujillo, Urubamba #170, El Molino, estudiante de la Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Odontología de la Universidad Católica los angeles de Chimbote, cuya determinación taxonómica servirá para la realización de un proyecto de tesis titulada: EFECTO ANTIBACTERIANO DE CUATRO CONCENTRACIONES DE EXTRACTO ACUOSO DE HOJA DE *Stevia rebaudiana* SOBRE *Streptococcus mutans* Atcc 25175, Trujillo 2019.

Se expide la presente Constancia a solicitud de la parte interesada para los fines que hubiera lugar.

Trujillo, 03 de Junio del 2019

Dr. JOSÉ MOSTAZERO LEÓN  
Director del Herbario HUT

cc. Herbario HUT

E-mail: herbariumhut@untru.edu.pe

Anexo 4

CONSTANCIA DE COMPRA DE BACTERIA

**del Perú SAC**  
Tecnologías para la Vida

**RAZON SOCIAL: GEN LAB DEL PERU S.A.C.**

Jr. Cápac Yupanqui N° 2434 Lince, Lima, Lima - PERU (Alt.Cdra. 8 Av. 2 de Mayo San Isidro)  
Av. Las Flores de Primavera N° 849 Urb. Las Flores San Juan de Lurigancho, Lima, Lima  
Central Telf.: 203-7500 Telefax:(51-1) 203-7501  
e-mail: ventas@genlabperu.com web: www.genlabperu.com

Fecha	Comprobante de Pago N°
9/04/2019	F002000161

Sr(es): **UNIVERSIDAD CATOLICA LOS ANGELES DE CHIMBOTE**  
**JR. TUMBES NRD. 247 CENTRO COMERCIAL Y FINANCIERO**  
**CHIMBOTE SANTA ANCAESH**

Punto de Llegada: **Urb. Wichanzao Mz. I Lt. 25 - Trujillo**

Punto de Partida: **AV. LAS FLORES DE PRIMAVERA # 847 - LIMA 36**

**R.U.C. 20501262260**

**GUIA DE REMISION REMITENTE**

**0002- N° 0031423**

R.U.C.: **20319956043**

Cod. Cliente: **1513** Ped N°: 02181

Orden de Compra: **1513**

Numero de Pedido: **GL - 19 / 034348**

Tipo de Movimiento: **GL - 19 / 034348**

Fecha de Traslado: **9/04/2019**

Empresa de Transporte
Sr(es):
R.U.C.:

Unidad de Transporte y Conductor
Marca y Placa :
N° Licencia de Conducir :

**MOTIVO DEL TRASLADO**

Ventas  Compras  Consignación  Ventas con Entrega a Terceros  Ventas Sujeta a Confirmación por el Proveedor  Traslado entre Establecimientos de la misma Empresa  Devolución  Otros

COD.	CANT.	UNIT.	DESCRIPCION
H05666-A	1		KWIK-STIK Streptococcus mutans derived from ATCC® 25175™ LQTE: 266-26-10 / Vendimiento: 29/02/2020

PEPEGRAF. S.A. R.U.C. 20372614290 SERIE 0002 DEL 30951 al 31950 SUNAT N° 13815388023 E.L.: 23-01-2019

BIENES TRANSPORTADOS :

Una vez recepcionada la mercadería no habrá lugar a devoluciones.

Firma y Sello

A.C. 76

p. GEN LAB DEL PERÚ S.A.C.

o. GEN LAB DEL PERÚ S.A.C.

RECIBI CONFORME

CONSTANCIA DE COMPRA DE BACTERIA


**Genlab del Perú S.A.C**  
 Pac Yupanqui N° 2434  
 Lince - Lima - Perú  
 Central Telefónica  
 (51-1) 203-7500, (51-1) 203-7501  
 Email : ventas@genlabperu.com  
 Web Site : www.genlabperu.com

**RUC N°: 20501262260**  
**FACTURA ELECTRONICA**  
**F002-000161**

Page 1 of 1

**Fecha emisión :** 18/03/2019  
**Fecha Vcto :** 18/03/2019  
**Orden Compra:** GL / 19-034348  
**Cliente:** UNIVERSIDAD CATOLICA LOS ANGELES DE CHIMBOTE  
**Guia de Remisión :**  
**N° Pedido :** 021861  
**Dirección:** JR. TUMBES NRO. 247 CENTRO COMERCIAL Y FINANCIERO  
 CHIMBOTE - SANTA - ANCASH - Peru  
**Tipo Movimiento :** ANTICIPOS  
**RUC :** 20319956043  
**Lugar de destino :**

Código	Descripción	Cant	U/M	Precio Unit.	Dcto	Sub-Total
H05666-A	KWK-STIK Streptococcus mutans derived from ATCC® 25175™	1	UND	305.93	0.00	305.93

TRESCIENTOS SESENTA Y UNO CON 00/100 SOLES

Anticipo		0.00
Op. Gravada	S/	305.93
IGV 18%		55.07
<b>Importe Total</b>	<b>S/</b>	<b>361.00</b>



Representacion Impresa de la Factura Electrónica  
 Consulte : <http://cpe.genlabperu.com>

**Observaciones de SUNAT :**  
 La Factura numero F002-000161, ha sido aceptada

Despues de Vencido el plazo de cancelacion, se recargará el interes legal correspondiente.  
**Sirvanse Realizar el Deposito Respectivo a las Siguietes Ctas Bancarias:**  
 BCP Soles 193-1440607-0-84 BBVA Soles 0011-0139-0100024183-34

## Anexo 5

### Constancia de colaboración de **MARILÚ ROXANA SOTO VÁSQUEZ** Dra. En farmacia y bioquímica en la ejecución del proyecto de investigación

#### CONSTANCIA

Yo, **Marilú Roxana Soto Vásquez**, Docente de la Cátedra de Farmacognosia del Departamento Académico de Farmacotecnia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, con código UNT 5727.

Dejo constancia de haber colaborado en la preparación de la muestra vegetal y las concentraciones, de los extractos acuosos de las hojas de *Stevia rebaudiana*, en el laboratorio de farmacognosia de la facultad de farmacia y bioquímica de la universidad de Trujillo, al alumno **Luis José Sebastian Díaz Velásquez**, identificada con DNI 70257312 con domicilio legal en Urubamba 170 Sector El Molino – Trujillo, estudiante de la Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Odontología de la Universidad Católica los Ángeles de Chimbote, en la ejecución de la tesis titulada: "Efecto Antibacteriano de Cuatro Concentraciones de Extraco Acuoso de Hoja de *Stevia rebaudiana* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, Trujillo 2019".

Se expide esta constancia, a solicitud del interesado, para los fines que estime pertinentes.

Trujillo 14 de junio del 2019



  
Dra. **Marilú Roxana Soto Vásquez**  
Docente Investigadora de la Facultad de Farmacia y Bioquímica  
Laboratorio de Farmacognosia  
Universidad Nacional de Trujillo

## Anexo 6

Constancia de colaboración de **JAIME ENRIQUE AGREDA GAITÁN**, Biólogo – Microbiólogo en la ejecución del proyecto de investigación.

### CONSTANCIA

Yo, **JAIME ENRIQUE AGREDA GAITÁN**, Biólogo\_Microbiólogo Docente de la Escuela de Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo, con registro CBP N° 4979.

Mediante la presente dejo constancia de haber colaborado con el alumno **DÍAZ VELÁSQUEZ LUIS JOSE SEBASTIAN**, identificado con DNI 47024744, con domicilio legal en sector el Molino, Urubamba #170, Trujillo, estudiante de la Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela profesional de Odontología de la Universidad Católica los Ángeles de Chimbote, en la ejecución de la tesis titulada **EFFECTO ANTIBACTERIANO DE CUATRO CONCENTRACIONES DE EXTRACTO ACUOSO DE HOJA DE *Stevia rebaudiana* SOBRE *Streptococcus mutans* ATCC 25175**, Trujillo 2019

Trujillo 15 de junio del 2019



Jaime Enrique Agreda Gaitán

Docente De la Escuela de Microbiología y Parasitología

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad Nacional de Trujillo

## Anexo 7

### BASE DE DATOS

Efecto Antibacteriano de Cuatro Concentraciones de Extracto Acuoso de Hoja de *Stevia rebaudiana* Sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, Trujillo 2019, determinado mediante el diámetro (mm) de los halos de inhibición del crecimiento, método Kirby Bauer.

REPETICIONES	HALOS DE INHIBICIÓN EN mm					Control negativo Agua Destilada
	Extracto acuoso de las hojas de <i>Stevia rebaudiana</i>				control positivo	
	5 %	10 %	15 %	20 %	clorhexidina 0.12%	
1	6.11	11.03	5.73	11.24	25.6	0
2	8.2	10.29	8.7	6.25	26.3	0
3	6.36	5.76	6.39	12.14	25.7	0
4	10.6	5.71	12.41	6.14	25.8	0
5	6.32	6.73	6.13	6.84	26.1	0
6	6.09	6.08	13.03	11.73	26.4	0
7	6.20	6.70	6.22	6.40	26	0
8	8.34	6.03	13.25	11.94	25.9	0
9	5.66	5.19	9.25	12.23	26.1	0
10	5.97	10.12	7.56	6.83	26.5	0
TOTAL	69.85	73.64	88.59	91.74	260.4	0
PROMEDIO	6.99	7.36	8.86	9.17	26.04	0

## Anexo 8

Prueba de normalidad, efecto antibacteriano in vitro de cuatro concentraciones de extracto acuoso de hoja de *Stevia rebaudiana* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Repeticiones	Tratamientos - Halos de inhibición (mm)					
	Stevia 5%	Stevia 10%	Stevia 15%	Stevia 20%	Clorhexidina 0.12%	Agua Destilada
1	6.11	11.03	5.73	11.24	25.6	0
2	8.2	10.29	8.7	6.25	26.3	0
3	6.36	5.76	6.39	12.14	25.7	0
4	10.6	5.71	12.41	6.14	25.8	0
5	6.32	6.73	6.13	6.84	26.1	0
6	6.09	6.08	13.03	11.73	26.4	0
7	6.2	6.7	6.22	6.4	26	0
8	8.34	6.03	13.25	11.94	25.9	0
9	5.66	5.19	9.25	12.23	26.1	0
10	5.97	10.12	7.56	6.83	26.5	0
<b>Promedio</b>	6.99	7.36	8.87	9.17	26.04	0.00
<b>p</b>	0.005	0.012	0.054	0.004	0.875	*
<b>Prueba de Normalidad (Shapiro-Wilk)</b>	No Normalidad	No Normalidad	Normalidad	No Normalidad	Normalidad	

*Fuente: Datos propios obtenidos de medición.*

(\*) Agua destilada es un constante y se ha desestimado

**Interpretación:** Al tener menos de 50 datos por cada grupo, es recomendable usar la prueba de normalidad del Shapiro- Wilk, para evaluar la distribución normal de los datos, de donde se puede observar que existe la prevalencia de grupos de datos con una significancia menor a 0.05 ( $p < 0.05$ ) es decir los datos no presentan una distribución normal, mientras que dos grupos de tratamientos si presentan una distribución normal. Con lo cual podemos concluir, en general los tratamientos presentan una distribución no normal.

## Anexo 9

### PROCESAMIENTO DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS de *Stevia rebaudiana* REALIZADO EN LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNT

#### SELECCIÓN, LAVADO Y DESINFECCIÓN



Se lavaron las hojas de *Stevia rebaudiana* y se desinfectaron con Hipoclorito de Sodio al 0,5%

#### SECADO, PULVERIZACIÓN



Secado en estufa de circulación de aire por convección forzada (40 °C) por 48 horas de hojas de *Stevia rebaudiana*. Pulverización, Tamizado y se pesó 50gr. de *Stevia rebaudiana*.

### **PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE *Stevia rebaudiana***



Se colocó, en un balón de vidrio de 2 litros de capacidad y se añadió 500 mL de agua destilada. Se mezclará bien, y se llevará a reflujo por 2 horas. Transcurrido el tiempo, se enfrió y se filtró el extracto acuoso al vacío, con papel de filtro Whatman N° 1. Posteriormente, el extracto acuoso se concentró en un rotavapor hasta obtener extracto blando. Luego se llevó a secar a la estufa de circulación de aire a 40 °C hasta obtener el extracto seco, seguido se llevó a separar las concentraciones respectivas de hoja de *Stevia rebaudiana*.

### **Concentraciones:**

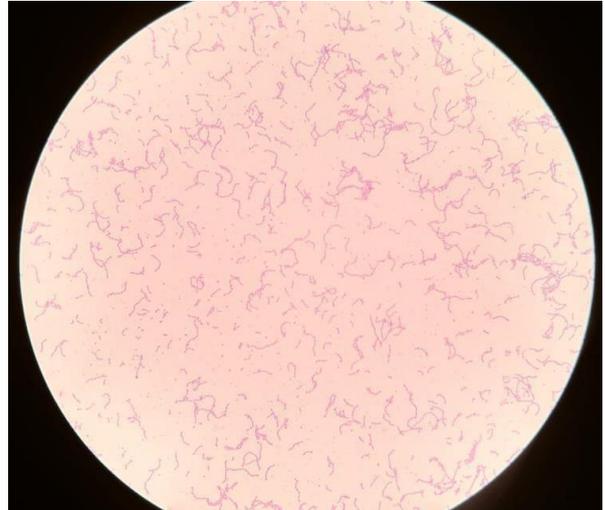
*Stevia rebaudiana*, las concentraciones de 5% (50 mg/mL), 10% (100 mg/mL), 15% (150 mg/mL), 20% (200 mg/mL) disueltas en agua.

### **PREPARACIÓN DEL INÓCULO *Streptococcus mutans***



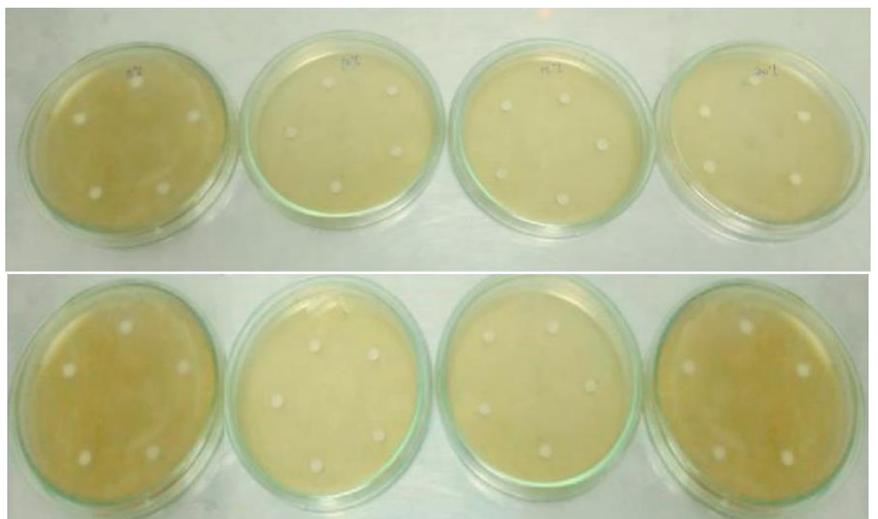
El inóculo de *Streptococcus mutans*, se preparó en tubos de ensayo, suspendiendo las colonias puras aisladas en 0.5 ml de suero fisiológico hasta obtener una turbidez de 0.5 de Mac Farland, que corresponde a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  alfa unidades formadoras de colonias de *Streptococcus mutans* por 1ml (UFC/ml).<sup>12</sup>

## INOCULACIÓN DE LA SUSPENSIÓN BACTERIANA



Haciendo uso del asa de Kolle, se procedió a sembrar *Streptococcus mutans*, a cada placa con agar Soya tripticasa totalmente estériles. Transcurrido la inoculación de la suspensión bacteriana, después de 10 minutos se procedió a realizar los pocillos en la placa Petri, para luego introducir el disco de antibiograma.

## PREPARACION DE LOS DISCOS ANTIBIOGRAMA ESTÉRILES



Se introdujo el disco de antibiograma (técnica Kirby – Bauer) sin contenido y estéril para aplicar con una pipeta el tratamiento con *Stevia rebaudiana* a concentraciones al 5%, 10%, 15% y 20%, en un volumen de 10 ul, para cada uno de los 5 sensidiscos por dos placas (100mm), luego se incubó la totalidad de las muestras con temperatura de 36 °C por 24 horas determinadas en medio anaerobio.

### **LECTURA DE RESULTADOS**

Se midieron los diámetros de los halos de Inhibición de *Stevia rebaudiana*.

