



Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* sobre los factores de virulencia cariogénicos de *Streptococcus mutans* ATCC 25175

In vitro inhibitory effect of *Stevia Rebaudiana* ethanolic extract on the cariogenic virulence factors of *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Juan Pairazamán-García^{1,*} ; Teresa Ríos-Caro² 

¹ Universidad Nacional de Trujillo. Escuela de Postgrado, Doctorado en Estomatología. Av. Juan Pablo II s/n, Trujillo, Perú.

² Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de Estomatología, Departamento de Estomatología. Jr. Salaverry N° 545, Trujillo, Perú.

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue determinar el efecto *in vitro* del extracto etanólico de *Stevia Rebaudiana* sobre los factores de virulencia cariogénicos de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Se evaluó el efecto del extracto etanólico 70° de *Stevia Rebaudiana* a diferentes concentraciones. El efecto sobre el potencial acidogénico se determinó evaluando cambio de pH pre y post-incubación. El efecto sobre la formación de polisacáridos insolubles se determinó utilizando método fenol-ácido sulfúrico. Los datos fueron evaluados mediante análisis de varianza y análisis *post hoc* con prueba Tukey. La significancia fue considerada si $p < 0,05$. Las seis concentraciones presentaron efecto inhibitorio sobre ambos factores de virulencia. Del potencial acidogénico, la concentración 1,07% presentó menor efecto que las concentraciones 25%, 50% y 75%; la de 5% menor efecto que las de 50% y 75%; la de 10% menor efecto que la de 75%. Con relación a la formación de polisacáridos insolubles: las concentraciones 1,07%, 5%, 10% y 25% presentaron menor efecto que las de 50% y 75%. Se concluye que el extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* posee efecto inhibitorio *in vitro* sobre el potencial acidogénico y la formación de polisacáridos extracelulares insolubles en agua de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Palabras clave: caries dental; extractos vegetales; *Streptococcus mutans*; *Stevia*.

ABSTRACT

The objective of the research was to determine the *in vitro* effect of *Stevia Rebaudiana* ethanolic extract on the cariogenic virulence factors of *Streptococcus mutans* ATCC 25175. The effect of *Stevia Rebaudiana* 70° ethanolic extract at different concentrations was evaluated. The effect on the acidogenic potential was determined by evaluating pre-incubation and post-incubation pH change. The effect on the formation of insoluble polysaccharides was determined using the phenol-sulfuric acid method. The data were evaluated by analysis of variance and *post-hoc* analysis with Tukey test. The significance was considered if $p < 0.05$. The six concentrations showed an inhibitory effect on both virulence factors. In relation to the acidogenic potential: 1.07 % concentration had less effect than 25%, 50% and 75% concentrations; 5% had less effect than 50% and 75%; 10% had less effect than 75%. In relation to the formation of insoluble polysaccharides: 1.07%, 5%, 10% and 25% concentrations had less effect than 50% and 75%. It is concluded that the *Stevia rebaudiana* ethanolic extract has an inhibitory effect *in vitro* on the acidic potential and the formation of water-insoluble extracellular polysaccharides of *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Keywords: dental caries; plant extracts; *Streptococcus mutans*; *Stevia*.

1. Introducción

La OMS manifiesta que la caries dental es una enfermedad que tiene implicancia en la salud pública. En el Perú tiene una prevalencia de más del 90%; sin embargo, hasta la actualidad

no se le ha podido controlar debidamente (Henostroza, 2007; Pranay *et al.*, 2010). Esta situación hace que la investigación para su control sea permanente, ensayándose diferentes métodos, incluyéndose entre ellos el uso de las propiedades de algunos fitoquímicos.

Recibido 28 febrero 2020

Aceptado 10 abril 2020

*Autor correspondiente: jpglb14@hotmail.com (J. Pairazamán)

DOI: <http://dx.doi.org/10.17268/agroind.sci.2020.01.13>

Streptococcus mutans (*S. mutans*) es el principal microorganismo que contribuye a la caries dental. Se encuentra como flora normal en la cavidad bucal y es dominante en la placa de pacientes con múltiples lesiones de caries activas (Loesche, 1986). Dentro de los factores de virulencia cariogénicos de *S. mutans* se incluyen su habilidad para adherirse y formar biofilms en la superficie del diente; metabolizar carbohidratos y generar ácidos (acidogenicidad); y sobrevivir en medios con bajo pH (aciduricidad) y otros factores de stress (Lemos *et al.*, 2007; Ban *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2012). La mayoría de matrices de biofilms contienen polisacáridos extracelulares (EPS), y el biofilm dental no es la excepción; hasta el 40% de peso seco de la placa dental está compuesto por polisacáridos, los cuales son mayormente glucanos. *S. mutans* utiliza efectivamente la sacarosa de la dieta, para rápidamente sintetizar EPS; los glucanos insolubles (un tipo de EPS) son esenciales para la adherencia de los microorganismos a las superficies de los dientes y *S. mutans* los forma a través de la acción de la glucosiltransferasa (Gtfs) (Lemos *et al.*, 2007; Ban *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2012; Koo *et al.*, 2010). Los glucanos sintetizados *in situ* proveen sitios de unión para la colonización y acumulación de *S. mutans* sobre la superficie dentaria y para unirse entre sí a través de interacciones con varias proteínas de membrana asociadas a glucanos y glucanos superficiales. Los EPS también contribuyen a la integridad física y a la estabilidad de la matriz del biofilm (Koo *et al.*, 2010).

A partir del metabolismo de la sacarosa de la dieta, *S. mutans* también produce ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico, el cual es fundamental en su virulencia, debido a que es el ácido más potente que interviene en la desmineralización de la superficie del diente (Khan *et al.*, 2012; Koo *et al.*, 2010). Cuando la dieta rica en sacarosa es consumida frecuentemente, *S. mutans* continúa sintetizando EPS y metabolizando el azúcar para formar ácidos orgánicos. La persistencia de este ambiente acidúrico conduce a la selección y dominio de organismos altamente tolerantes a ácidos y acidogénicos, como *S. mutans*. El entorno de bajo pH en la matriz del biofilm da lugar a la disolución del esmalte, iniciándose así la patogénesis de la caries (Koo *et al.*, 2010).

La mencionada participación de *S. mutans* en la patogénesis de la caries dental, ha dado lugar a la elaboración y ejecución de muchas medidas

para la prevención, control y/o eliminación de este microorganismo.

Aunque los compuestos fluorados han sido usados para inhibir la formación de la placa, ellos son citotóxicos si son usados a concentraciones mayores de 80 ppm. Muchos agentes antiplaca han sido estudiados, pero debido a que la caries dental sigue siendo la principal causa de pérdida de dientes, se evidencia que estos agentes no han sido efectivos en su control (Da-Hong *et al.*, 2011). Debido a muchas limitaciones del uso de agentes antibacterianos para el control de la enfermedad caries dental, las biomoléculas antimicrobianas de origen natural se han estudiado como una terapia adyuvante, obteniéndose resultados prometedores.

Stevia rebaudiana Bertoni (*Stevia rB*), una de las 407 especies del género *Stevia*, pertenece a la familia Asteraceae (Mohammadi-Sichani *et al.*, 2012). La propiedad más importante de *Stevia rB* se encuentra en sus hojas, se trata del edulcorante natural llamado estevósido. Además de ser un edulcorante no calórico conocido en muchas partes del mundo, es hipoglucemiante, antioxidante y antihipertensivo. Otra ventaja es que ninguna actividad tóxica o genotóxica se ha encontrado de los extractos obtenidos de hojas de *Stevia rB* (Thomas *et al.*, 2010; Gamboa *et al.*, 2012; Contreras 2013; Paredes *et al.*, 2016; Momtazi-Borojeni *et al.*, 2017; Amchra *et al.*, 2018; Samuel *et al.*, 2018; Salehi *et al.*, 2019). El cultivo de este fitoquímico en el Perú ha sido introducido hace ya una década mediante numerosos proyectos. Muchas regiones del Perú presentan condiciones ideales en altitud, clima, suelo y situación geográfica. Actualmente está incluida en el portafolio de pequeñas extensiones de Cajamarca, en la ceja de la selva, Amazonas, San Martín, Ucayali, Apurímac y Arequipa (Linares *et al.*, 2008).

A nivel mundial se han realizado estudios con relación a la efectividad de *Stevia rB* en el control de la caries dental (Korte *et al.*, 2019), obteniendo resultados favorables (Slavutzky, 2010; Mehta *et al.*, 2016; Abdul Razak *et al.*, 2017; Vandana *et al.*, 2017; Cocco *et al.*, 2019; Ganapathi *et al.*, 2019; Siraj *et al.*, 2019). Existen estudios (Pérez, 2013; Becerra, 2016; Cáceres, 2017), que han encontrado efecto antibacteriano de *Stevia rB* natural de Perú contra *S. mutans*, pero poco se sabe acerca de los mecanismos subyacentes a este proceso y que estarían cumpliendo con la función antimicrobiana y anticariogénica específica, con

relación al efecto sobre los factores de virulencia de *S. mutans*. Así, el objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto *in vitro* del extracto etanólico de *Stevia rB* sobre los factores de virulencia cariogénicos de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

2. Material y métodos

2.1 Material de la planta y extracción

Las hojas de *Stevia rB* fueron recolectadas de la localidad de Timaruca, San Ignacio (1050 m.s.n.m.), región de Cajamarca (Pérez, 2013). La identificación y verificación taxonómica de la planta fue realizado en el Herbarium Truxillensis de la Universidad Nacional de Trujillo (UNT). En el laboratorio de Farmacognosia de la UNT, se seleccionó y lavó el material vegetal con agua destilada, seguido de su desinfección con hipoclorito de sodio al 0,5%, volviendo a enjuagar la planta con agua destilada estéril, para retirar los residuos de hipoclorito (Acosta, 2002). Las hojas de *Stevia rB* fueron sometidas a secado, primero a temperatura ambiente por 24 horas, y luego a 40 °C, en estufa por cinco días. Una vez secadas las hojas, éstas se pulverizaron con ayuda de un mortero. El material obtenido fue tamizado hasta el N° 0,7; almacenándose el polvo obtenido de *Stevia rB*, en frascos de vidrio de color ámbar de boca ancha (Miranda, 2002).

Para la preparación del extracto etanólico se utilizó la metodología propuesta por Miranda, 2002. Se pesó 20 g del polvo de *Stevia rB* y se humectaron por separado con 20 ml de etanol de 70° G.L.; luego se mezclaron con cantidad suficiente de arena lavada. Se colocó en el extractor del equipo de soxhlet y se extrajo con 150 ml de etanol de 70° Gay Lussac a una temperatura de 60 a 80 °C durante cuatro horas. La solución resultante fue llevada a sequedad en una cámara de secado al vacío a una presión reducida y a una temperatura de 40 °C; luego se pesó el residuo seco y se guardó en refrigeración a 2 °C en un frasco de vidrio de color ámbar estéril. Del residuo seco, se preparó las concentraciones de 1,07%, 5%, 10%, 25%, 50% y 75% disueltas en etanol de 70° Gay Lussac.

2.2 Método microbiológico

Se utilizó un cultivo liofilizado de la cepa de *S. mutans* ATCC 25175, Genlab. La cepa de *S. mutans* se cultivó en tubos de ensayo cerrados herméticamente conteniendo el medio agar Soya tripticasa, se incubó bajo condiciones de microanaerobiosis a 37 °C con el fin de obtener

colonias jóvenes. Luego de 24 horas la cepa de *S. mutans* se diluyó en caldo de tioglicolato hasta obtener una turbidez semejante al tubo N.° 0,5 de la escala de Mac Farland, obteniendo un inóculo estandarizado.

2.3 Efecto sobre el potencial acidogénico (acidogenicidad)

Se utilizó el método propuesto por Matsumoto *et al.* (1999) y Da-Hong *et al.* (2011). Se utilizaron tubos con tapa rosca de 20 mL, a los que se le añadió 4,75 mL del caldo de rojo fenol que contenía de glucosa 1% y 1,25 mL de cada una de las concentraciones del extracto etanólico de *Stevia rB* a 70°. A continuación, los tubos fueron inoculados con 0,25 mL del inóculo de *S. mutans*, incubándose a 37 °C durante 24 h en microanaerobiosis. El pH de los cultivos se midió antes de la incubación y post-incubación usando un pH-metro marca Metrohm®. Ocho repeticiones fueron realizadas para cada concentración del extracto de prueba. Se utilizó como control negativo, cultivos que no contenían el extracto de *Stevia rB*; como control del vehículo, se utilizó cultivos que contenían etanol a 70°; como control positivo se utilizaron cultivos que contenían NaF al 1%.

2.4 Efecto sobre la formación de polisacáridos insolubles en agua

Se basó en métodos descritos previamente por Xiao *et al.* (2007) y Yano *et al.* (2012). 0,25 ml del inóculo de *S. mutans* fue incubado en microanaerobiosis a 37 °C por 72 horas en medio BHI conteniendo 5% de sacarosa con o sin los extractos de *Stevia rB*, después de lo cual los EPS insolubles en agua fueron sedimentados y las bacterias fueron recuperadas por centrifugación. El remanente celular sedimentado fue luego resuspendido en 1M de Na(OH) y centrifugado para remover las células bacterianas. Se obtuvo el sobrenadante y los polisacáridos insolubles en agua fueron recuperados por precipitación con etanol. La cantidad total de EPS insolubles en agua se midió indirectamente con espectrofotómetro (Genesys 20), en longitud de onda de 490 nm., utilizando previamente el método de fenol-ácido sulfúrico (Du Bois *et al.*, 1956). Ocho repeticiones fueron realizadas para cada concentración del extracto de prueba. El control negativo lo conformó la mezcla que no contenía el extracto etanólico de *Stevia rB*, y el control del vehículo contuvo etanol a 70° en lugar del extracto de *Stevia rB*.

2.5 Análisis estadístico

Los datos registrados de las réplicas de cada uno de los tratamientos, conformados por seis concentraciones del extracto etanólico de 70° de *Stevia rB* y los controles, fueron procesados empleando IBM SPSS Statistics 24 y presentados en tablas con medias y desviaciones estándar. El efecto de las concentraciones fue evaluado empleando el análisis de varianza y el análisis post hoc mediante la prueba de Tukey, previa evaluación del requisito de varianzas homogéneas. La significancia fue considerada si $p < 0,05$.

3. Resultados y discusión

Los resultados registrados en la [Tabla 1](#), muestran que el extracto etanólico 70° de *Stevia rB*, en las concentraciones estudiadas, presentó diferentes valores para el cambio de pH (potencial acidogénico) para cada concentración. Al aplicar el análisis de varianza, se determinó que existe diferencia entre los grupos de estudio ($p = 0,000$). El extracto de *Stevia rB*, en las seis concentraciones estudiadas, tuvo un efecto inhibitorio sobre el potencial acidogénico de *S. mutans* ATCC 25175.

Tabla 1

Efecto *in vitro* del extracto etanólico de 70° de *Stevia rebaudiana* sobre el potencial acidogénico de *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Tratamiento	Efecto		Test de Tukey
	Media	Desviación Estandar	
1,07%	0,740	0,153	e
5%	0,646	0,177	de
10%	0,568	0,230	cde
25%	0,432	0,189	bcd
50%	0,356	0,077	bc
75%	0,284	0,166	b
Control (-)	2,268	0,180	f
Control (+)	-0,081	0,069	a
Control vehículo	0,369	0,139	bc

Prueba de Tukey. Valores seguidos por letras distintas difieren entre sí ($p < 0,05$).

En las concentraciones por debajo de la Concentración Mínima Bactericida (CMB), que son las de 1,07% y 5% ([Pérez, 2013](#)), este efecto inhibitorio se podría deber a que el extracto etanólico de *Stevia rB* además de producir un efecto inhibitorio en el crecimiento de *S. mutans* ([Vitery et al., 2010](#); [Mohammadi-](#)

[Sichani et al., 2012](#); [Gamboa et al., 2012](#); [Pérez, 2013](#); [Ajagannanavar et al., 2014](#); [Kianbakht et al., 2015](#); [Chakravarthy et al., 2016](#); [Becerra, 2016](#)), también podría disminuir la producción glucolítica ácida de la bacteria ([Giacaman et al., 2013](#)), lo que se podría deber a la presencia del glucósido diterpeno “estevisido” ([Zanela et al., 1997](#); [Brambilla et al., 2014](#)) y del glucósido “Rebaudiósido A” ([Brambilla et al., 2014](#); [Alcidi et al., 2015](#)), que se encuentran como componentes en *Stevia rB*. Además, la mayoría de los componentes activos contra la acidogénesis de *S. mutans* ATCC 25175 son moderadamente polares, los que se extraerían mucho mejor con el uso del etanol como solvente para la preparación del extracto, como lo menciona [Xiao et al. \(2006\)](#).

En las concentraciones bactericidas, al 10%, 25%, 50% y 75% ([Pérez, 2013](#)), el efecto inhibitorio sobre el potencial acidogénico se puede deber a que *S. mutans* es eliminado antes de permitirle formar ácidos en gran cantidad. El efecto bactericida del extracto de hojas de *Stevia rB* se puede deber a la presencia de metabolitos activos como los terpenos ([Mohammadi-Sichani et al., 2012](#); [Giuffré et al., 2013](#)), flavonoides ([Tadhani et al., 2006](#); [Mohammadi-Sichani et al., 2012](#); [Wölwer-Rieck, 2012](#); [Ajagannanavar et al., 2014](#); [Siddique et al., 2014](#); [Sunitha et al., 2015](#); [Mehta et al., 2016](#)), polifenoles ([Kujur et al., 2010](#); [Shruti, et al., 2015](#)), taninos ([Kujur et al., 2010](#); [Siddique et al., 2014](#); [Shruti, et al., 2015](#); [Chakravarthy et al., 2016](#)) y alcaloides ([Kujur et al., 2010](#); [Siddique et al., 2014](#); [Shruti, et al., 2015](#); [Mehta et al., 2016](#)). Sin embargo, un análisis fitoquímico más avanzado es necesario, para la identificación, estudio, aislamiento y purificación, con la finalidad de identificar el principal componente funcional del extracto de *Stevia rB* Peruana.

Al aplicar la prueba de Tukey, los resultados de la [Tabla 1](#) también muestran que el efecto inhibitorio sobre el potencial acidogénico tuvo similitudes entre ellas. La igualdad en el efecto inhibitorio entre las concentraciones de 1,07% y 5% se puede deber a que ambas son consideradas concentraciones bacteriostáticas ([Pérez, 2013](#)). Sin embargo, se encontró que no existe diferencia en el efecto inhibitorio entre las concentraciones bacteriostáticas de 1,07% y 5%, al ser comparadas con la concentración de 10%, la cual es la CMB según [Pérez, 2013](#). Esto se puede deber, a que en el presente estudio se utilizó como medio de cultivo el caldo rojo fenol

glucosado, en el cual posiblemente el *S. mutans* adquiera propiedades diferentes y se fortalezca (Loesche, 1986; Banas, 2004) permitiéndole sobrevivir por un mayor tiempo a la concentración de 10%, para claudicar a las concentraciones más altas.

El mejor efecto inhibitorio de la concentración de 75% sobre las concentraciones de 1,07%, 5% y 10%, se sustentaría a que la concentración de 75% es la más alta y es bactericida (Pérez, 2013).

El efecto inhibitorio del potencial acidogénico de *S. mutans*, de las concentraciones de 10%, 25% y 50% es similar y estaría relacionado a que todas son consideradas concentraciones bactericidas (Pérez, 2013), y por lo tanto eliminarían a la bacteria, no pudiendo ésta producir una disminución progresiva del pH.

Se coincidiría parcialmente con el estudio de Rezaei-Soufi *et al.* (2016), quienes encontraron que el extracto etanólico de hojas de *Stevia rB* en una concentración del 20% (cerca a 25%), no produjo ninguna lesión de caries en los dientes premolares evaluados.

Khan *et al.* (2012) mencionan que, desde el punto de vista ecológico, no es ideal matar a la bacteria, sino controlarla. Por lo expuesto, con las concentraciones bacteriostáticas de 1,07% y 5% (Pérez, 2013), se podrían obtener buenos resultados inhibitorios. Lamentablemente no se encontró estudios con los cuales contrastar los resultados del efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Stevia rB* Peruana sobre el potencial acidogénico de *S. mutans*; ya que el presente, es el primer estudio relacionado al tema.

Los resultados registrados en la Tabla 2, muestran que el extracto etanólico 70° de *Stevia rB*, en las concentraciones estudiadas, presentó valores diferentes para la formación de EPS insolubles en agua (absorbancia a 490 nm.) para cada concentración. Al aplicar el análisis de varianza, se determinó que existe diferencia entre los grupos de estudio ($p = 0,000$). El extracto de *Stevia rB*, en las seis concentraciones estudiadas, tuvo un efecto inhibitorio sobre la formación de EPS insolubles en agua de *S. mutans* ATCC 25175.

En las concentraciones sub-CMB (1,07% y 5%), según Pérez (2013), un posible mecanismo de acción sería el efecto inhibitorio que tendría el extracto de *Stevia rB* sobre la enzima glucosiltransferasa (GTFasa) de *S. mutans*, la cual forma los glucanos, que representan el mayor porcentaje de EPS, como lo menciona

Bowen *et al.* (2011). Los polifenoles y flavonoides, presentan una actividad antiGTFasa (Ren *et al.*, 2016). Matsumoto *et al.* (2003); Gregoire *et al.* (2007); Riihinen *et al.* (2011), mencionan que las hojas de té Oolong, los arándanos y las bayas, respectivamente, presentan polifenoles poliméricos (también presentes en el extracto etanólico de *Stevia rB*), los que poseen una fuerte actividad antiGTFasa. También, Xu *et al.* (2012) y Veloz *et al.* (2016), encontraron que los polifenoles inhiben la expresión de los genes de las glucosiltransferasas.

Tabla 2

Efecto *in vitro* del extracto etanólico de 70° de *Stevia rebaudiana* sobre la formación de polisacáridos extracelulares insolubles en agua de *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Tratamiento	Efecto		Test de Tukey
	Media (Absorbancia)	Desviación estándar	
1,07%	0,322	0,017	b
5%	0,308	0,014	b
10%	0,302	0,018	b
25%	0,286	0,024	b
50%	0,205	0,053	a
75%	0,181	0,059	a
Control (-)	0,501	0,086	c
Control vehículo	0,468	0,071	c

Prueba de Tukey. Valores seguidos por letras distintas difieren entre sí ($p < 0,05$).

Los resultados registrados en la Tabla 2 también muestran que el efecto inhibitorio sobre la formación de EPS insolubles en agua fue similar entre las concentraciones 1,07%, 5%, 10% y 25%; y entre las concentraciones de 50% y 75%. Las concentraciones de 1,07%, 5%, 10% y 25% presentaron un menor efecto inhibitorio que las concentraciones de 50% y 75%.

Los resultados muestran que en concentraciones sub-CMB, 1,07% y 5% según Pérez (2013), hay un efecto inhibitorio sobre la formación de EPS insolubles en agua menor que las que se presentó con las concentraciones bactericidas altas (50% y 75%). Sin embargo, no existió diferencia entre las concentraciones 1,07%, 5%, 10% y 25%, siendo aún las concentraciones de 10% y 25% bactericidas según Pérez (2013); esto se puede deber a que, en medios o caldos con sacarosa, como el utilizado en el presente estudio, los EPS que se sintetizan pueden proporcionar una protección a los efectos bactericidas (Loesche, 1986; Banas, 2004).

Tabla 3

Valores de pH en el ensayo sobre el potencial acidogénico de *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Repetición	Concentración del extracto de 70°																										
	1,07% PH			5% PH			10% PH			25% PH			50% PH			75% PH			Control negativo PH		Control positivo PH		Control vehículo PH				
	Pre	Post	Efecto	Pre	Post	Efecto	Pre	Post	Efecto	Pre	Post	Efecto	Pre	Post	Efecto	Pre	Post	Efecto	Pre	Post	Efecto	Pre	Post	Efecto			
Promedio de Repeticiones	7,06	6,32	0,74	6,93	6,29	0,65	6,71	6,15	0,57	6,51	6,06	0,45	6,24	5,89	0,35	6,05	5,77	0,28	5,78	3,51	2,27	6,18	6,26	-0,08	6,49	6,12	0,37

A su vez, los resultados similares en el efecto inhibitorio de las concentraciones de 1,07%, 5%, 10% y 25%, se puede deber también a que estas concentraciones tendrían valores de pH post incubación que están cerca al pH óptimo de 6,5, para la actividad de la enzima GTFasa (Duarte *et al.*, 2006), como se encontró en el ensayo del potencial acidogénico (Tabla 3), y estarían cerca al rango que va hasta un pH 6,8, el cual fue determinado como un pH óptimo para la formación de EPS insolubles en la placa dental humana según el estudio de Pinheiro *et al.* (1989), lo que determinaría que el control de la formación de polisacáridos sea un poco limitado, en comparación con las concentraciones de 50% y 75%.

4. Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación demostraron que el extracto etanólico 70° de *Stevia rebaudiana Bertoni* en todas las concentraciones evaluadas presenta efecto inhibitorio *in vitro* sobre los factores de virulencia cariogénicos de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Teniendo en cuenta los datos encontrados, es importante indagar si las concentraciones menores a 1,07% del extracto etanólico 70° de *Stevia rebaudiana Bertoni*, aún mantiene el efecto inhibitorio sobre los factores de virulencia cariogénicos de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Por otro lado, se recomienda realizar estudios para determinar la composición de fitoquímicos e identificar y cuantificar los componentes activos de *Stevia rebaudiana Bertoni* Peruana sobre *Streptococcus mutans*.

ORCID

J. Pairazamán-García  <https://orcid.org/0000-0001-8922-8009>

T. Ríos-Caro  <https://orcid.org/0000-0002-2069-8675>

Referencias bibliográficas

Abdul Razak, F.; Baharuddin, B.A.; Akbar, E.F.M.; Norizan, A.H.; Ibrahim, N.F.; Musa, M.Y. 2017. Alternative sweeteners influence the biomass of oral biofilm. Arch Oral Biol 80: 180-184.

Acosta, L. 2002. Desinfección de plantas medicinales - principios básicos. Disponible en: <http://www.herbotecnica.com.ar/c-public-004.html>

Ajagannanavar, S.L.; Shamarao, S.; Battur, H.; Tikare, S.; Al-Kheraif, A.A.; Al Sayed, M.S.A.E. 2014. Effect of aqueous and alcoholic Stevia (*Stevia rebaudiana*) extracts against *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus* in comparison to chlorhexidine: An *in vitro* study. J Int Soc Prev Community Dent 4: S116-S121.

Alcidi, B.; Cantile, T.; Coda, M.; Pollio, A.; Ingenito, A.; Ferrazzano, G. 2015. In-vivo evaluation of acidogenic proprieties of Stevia rebaudiana extracts on human saliva: a pilot study. En Poster sessions British Society of Paediatric Dentistry Poster Prize Session, PZ01. 2015 BSPD, IAPD and John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd, 25 (Suppl. 1): 1-251.

Amchra, F.Z.; Al Faiz, C.; Chaouqi, S.; Khiraoui, A.; Benhmimou, A.; Guedira T. 2018. Effect of Stevia rebaudiana, sucrose and aspartame on human health: A comprehensive review. Journal of Medicinal Plant Studies 6: 102-108.

Ban, S.H.; Kwon, Y.R.; Pandit, S.; Lee, Y.S.; Yi, H.K.; Jeon, J.G. 2010. Effects of a bio-assay guided fraction from Polygonum cuspidatum root on the viability, acid production and glucosyltransferase of mutans streptococci. Fitoterapia 81: 30-34.

Banas, J.A. 2004. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. Front Biosci 9: 1267-1277.

Becerra, Q.L. 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. Tesis Bachiller. Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo. Perú. 98 pp.

Bowen, W.H.; Koo, H. 2011. Biology of *Streptococcus mutans*-Derived Glucosyltransferases: Role in Extracellular Matrix Formation of Cariogenic Biofilms. Caries Res 45: 69-86.

Brambilla, E.; Cagetti, M.G.; Ionescu, A.; Campus, G.; Lingström, P. 2014. An *in vitro* and *in vivo* Comparison of the Effect of Stevia rebaudiana Extracts on Different Caries-Related Variables: A Randomized Controlled Trial Pilot Study. Caries Res 48: 19-23.

Cáceres, L. 2017. Efecto antimicrobiano *in vitro* del extracto de Stevia rebaudiana sobre el *Streptococcus mutans*, Puno-2017. Tesis Bachiller. Universidad Nacional del Altiplano, Puno. Perú. 51 pp.

Chakravarthy, Y.; Hussain A. 2016. Antimicrobial efficacy of Stevia rebaudiana on *Streptococcus mutans* using three different solvents – an *in vitro* comparative study. Ijprjournal 6: 152-157.

Cocco, F.; Cagetti, M.G.; Livesu, R.; Camoni, N.; Pinna, R.; Lingström, P.; Campus, G. 2019. Effect of a Daily Dose of Snacks Containing Maltitol or Stevia rebaudiana as Sweeteners in High Caries Risk Schoolchildren. A Double-blind RCT Study. Oral Health Prev Dent 17: 515-522.

Contreras S. 2013. Anticariogenic properties and effects on periodontal structures of Stevia rebaudiana Bertoni. Narrative review. J Oral Res 2: 158-166.

Da-Hong, L.; Bo-Ra, S.; Ha-Yeon, K.; Gi-Chun, G.; Hyeon-Hee, Y.; Hyung-Keun, Yu.; Hyung-Keun, You.; Tong Ho, K.; Yong-Ouk, Y. 2011. Inhibitory effect of *Aralia continentalis* on the cariogenic properties of *Streptococcus mutans*. Journal of Ethnopharmacology 137: 979-984.

Du Bois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Anal. Chem 28: 350-356.

Duarte, S.; Gregoire, S.; Singh, A.P.; Vorsa, N.; Schaich, K.; Bowen, W.H.; Koo H. 2006. Inhibitory effects of cranberry polyphenols on formation and acidogenicity of *Streptococcus mutans* biofilms. FEMS Microbiol Lett 257: 50-56.

Gambo, F.; Chaves, M. 2012. Antimicrobial potential of extracts from Stevia rebaudiana leaves against bacteria of importance in dental caries. Acta Odontol. Latinoam 25: 171-175.

- Ganapathi, A.; Prabakar, J. 2019. Comparing the antibacterial efficacy of 0.2% chlorhexidine mouthwash and 1% stevia extract on oral microflora - An in vivo study. *Drug Invention Today* 12: 2637-2641.
- Giaccaman, R.A.; Campos, P.; Munoz-Sandoval, C.; Castro, R.J. 2013. Cariogenic potential of commercial sweeteners in an experimental biofilm caries model on enamel. *Arch Oral Biol* 58: 1116-1122.
- Giuffré, L., Romaniuk, R., Ciarlo, E. 2013. Stevia, ka'a he'e, wild sweet herb from South America - An overview. *Emir. J. Food Agric* 25: 746-750.
- Gregoire, S.; Singh, A.; Vorsa, N.; Koo, H. 2007. Influence of cranberry phenolics on glucan synthesis by glucosyltransferases and *Streptococcus mutans* acidogenicity. *J. Appl. Microbiol* 103: 1960-1968.
- Henostroza, H.G. 2007. *Caries Dental. Principios y procedimientos para el diagnóstico*. 1ra Edición. Editorial Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima-Perú. 172 pp.
- Khan, R.; Adil, M.; Danisuddina, M.; Vermab, P.K.; Khana, A.U. 2012. *In vitro* and in vivo inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm by *Trachyspermum ammi* seeds: An approach of alternative medicine. *Phytotherapy* 19: 747-755.
- Kianbakht, C.; Biria, M. 2015. Comparison of anti-microbial effects of *Stevia Rebaudiana* extract and Xylitol on dental biofilm - an *in vitro* study. En *International Association for Dental Research. 11th Annual Meeting of Iranian Division of IAD, Iran, 23-24 Dec, 2015*.
- Koo, H.; Xiao, J.; Klein, M.I.; Jeon, J.G. 2010. Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* Glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilm. *J. Bacteriol* 192: 3024-3032.
- Korte, A.; Angelopoulou, M.V.; Maroulakos, G. 2019. Assessing the Effect of Low Calorie Soda Beverages on Primary Tooth Enamel: An *In Vitro* Study. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry* 43: 190-195.
- Kujur, R.S.; Singh, V.; Ram, M.; Yadaba, H.; Singh, K.K.; Kumari, S. 2010. Antidiabetic activity and phytochemical screening of crude extract of *Stevia rebaudiana* in alloxan-induced diabetic rats. *Pharmacognosy Research* 2: 258-263.
- Lemos, J.A.; Abranches, J.; Burne, R.A. 2007. Responses of cariogenic streptococci to environmental stresses. *Curr Issues Mol Biol* 7: 95-108.
- Linares, R.; Manrique, R.; Nuñez, E.; Carmona, J. 2008. Adaptabilidad biológica para la introducción de la *Stevia (Stevia rebaudiana B)* en seis zonas agroecológicas andinas de San Ignacio y Chota Cajamarca: Universidad Nacional de Cajamarca; 2008. Disponible en: <http://agricultura-ecologica.servidor-alicante.com/documentos-agricultura-ecologica/Agricultura-Ecologica-Manual-tecnico-de-produccion-de-Stevia.pdf>
- Loesche, W. 1986. Role of *Streptococcus mutans* in Human Dental Decay. *Microbiological Reviews* 50: 353-380.
- Matsumoto, M.; Minami, T.; Sasaki, H.; Sobue, S.; Hamada, S.; Ooshima T. 1999. Inhibitory effects of oolong tea extract on caries-inducing properties of *mutans streptococci*. *Caries Res* 33: 441-445.
- Matsumoto, M.; Hamada, S.; Ooshima, T. 2003. Molecular analysis of the inhibitory effects of oolong tea polyphenols on glucanbinding domain of recombinant glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* MT8148. *FEMS Microbiol Lett* 228: 73-80.
- Mehta, R.; Kumar, R.; Sakhare, D.; Sharma, A. 2016. Herbal Formulation Against Dental Caries Causing Microorganisms Using Extracts of *Stevia Rebaudiana* Leaves (A Natural Sweetener). *The Natural Products Journal* 6: 126-133.
- Miranda, M. 2002. *Métodos de Análisis de Drogas y Extractos*. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad Habana de Cuba. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/125194922/METODOS-D>
- Mohammadi-Sichani, M.; Karbasizadeh, V.; Aghai, F.; Mohammad, M. 2012. Effect of different extracts of *Stevia rebaudiana* leaves on *Streptococcus mutans* growth. *Iran: Journal of Medicinal Plants Research* 6: 4731-4734.
- Momtazi-Borojeni, A.A.; Esmaeili, S.A.; Abdollahi, E.; Sahebkar, A. 2017. A review on the pharmacology and toxicology of steviol glycosides extracted from *Stevia rebaudiana*. *Current Pharmaceutical Design* 23: 1616-1622.
- Paredes, A.E.; Naranjo, M.C. 2016. La *stevia rebaudiana* como coadyuvante en la prevención y el control de la caries dental: una revisión de la literatura. *Acta Odontol Col* 6: 45-60.
- Pérez, G. 2013. Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *Stevia Rebaudiana* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Tesis de bachiller, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo. Perú. 70 pp.
- Pinheiro, C.E.; Poletto, M.; Pinheiro, C.F.; Negrato, M. 1989. Fatores que influenciam «*in vitro*» a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis da placa dentária humana. *Rev.odontol.Univ.São Paulo* 3: 258-261.
- Pranay, J.; Ram, K. 2010. Dental caries - A Multifactorial Disease. *Journal of Pharmacy Research* 3: 1232-1236.
- Ren, Z.; Chen, L.; Li, J.; Li, Y. 2016. Inhibition of *Streptococcus mutans* polysaccharide synthesis by molecules targeting glucosyltransferase activity. *Journal of Oral Microbiology* 8: 3402.
- Rezaei-Soufi, L.; Raedi, S.; Alikhani, M.Y.; Vahdatinia, F.; Farazyani, A.; Hosseini, S.M. 2016. Comparison the effect of *stevia* extract with glucose and fructose on dental enamel caries formation. *JCPS* 9: 685-689.
- Riihinen, K.; Ryyanen, A.; Toivanen, M.; Kononen, E.; Torronen, R.; Tikkanen-Kaukanen, C. 2011. Antiaggregation potential of berry fractions against pairs of *Streptococcus mutans* with *fusobacterium nucleatum* or *actinomyces naeslundii*. *Phytother Res. PTR* 25: 81-87.
- Salehi, B.; López, M.D.; Martínez-López, S.; Victoriano, M.; Sharifi-Rad, J.; Martorell, M.; F Rodrigues, C.; Martins, N. 2019. *Stevia rebaudiana* Bertoni bioactive effects: From in vivo to clinical trials towards future therapeutic approaches. *Phytother Res* 33: 1-14.
- Samuel, P.; Ayoob, K.T.; Magnuson, B.A.; Wölwer-Rieck, U.; Jeppesen, P.B.; Rogers, P.J.; Rowland, I.; Mathews, R. 2018. *Stevia Leaf to Stevia Sweetener: Exploring Its Science, Benefits, and Future Potential*. *J Nutr* 148: 1186S-1205S.
- Shruti, S.; Archana, M. 2015. Comparative phytochemical analysis and in vivo immunomodulatory activity of various extracts of *Stevia rebaudiana* leaves in experimental animal model. *Frontiers in Life Science* 8: 55-63.
- Siddique, A.B.; Rahman, S.M.M.; Hossain, M.A.; Rashid, M.A. 2014. Phytochemical screening and comparative antimicrobial potential of different extracts of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Asian Pac J Trop Dis* 4: 275-280.
- Siraj, E.S.; Pushpanjali, K.; Manoranjitha, B.S. 2019. Efficacy of stevioside sweetener on pH of plaque among young adults. *Dent Res J* 16: 104-109.
- Slavutzky, S. M. B. 2010. *Stevia* and sucrose effect on plaque formation. *Journal of Consumer Protection and Food Safety* 5: 213-216.
- Sunitha, V.; Irene, J.; Reginald, A. 2015. Biochemical and Phytochemical Activity of *Stevia Rebaudiana* by Using Ethanol Extract. *World J Pharm Sci* 3: 2077-2080.
- Tadhani, M.; Subhash, R. 2006. Preliminary studies on *Stevia rebaudiana* leaves: Proximal composition, mineral analysis and phytochemical screening. *J.Med.Sci* May-June 6:321-326.
- Thomas, J.; Glade, M. 2010. *Stevia: It's Not Just About Calories*. Montclair, Nueva Jersey, EE.UU.: The Open Obesity Journal 2: 101-109.
- Vandana, K.; Reddy, V.C.; Sudhir, K.M.; Kumar, K.; Raju, S.H.; Babu, J.N. 2017. Effectiveness of *stevia* as a mouthrinse among 12-15-year-old schoolchildren in Nellore district, Andhra Pradesh - A randomized controlled trial. *J Indian Soc Periodontol* 21: 37-43.
- Veloz, J.J.; Saavedra, N.; Alvear, M.; Zambrano, T.; Barrientos, L.; Salazar, L.A. 2016. Polyphenol-Rich Extract from Propolis Reduces the Expression and Activity of *Streptococcus mutans* Glucosyltransferases at Subinhibitory Concentrations. *Biomed Res Int* ID: 4302706.
- Vitery, G.; Vargas, S.; Gamboa, F.; Chavarría, N.; Gómez, R. 2010. Actividad inhibitoria de *Stevia rebaudiana* sobre *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus mutans*. *Rev Nal Odo*. 6: 57-64.

- Wölwer-Rieck, U. 2012. The leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: a review. *J Agric Food Chem.* 60: 886-895.
- Xiao, J.; Liu, Y.; Zuo, Y.L.; Li, J.Y.; Ye, L.; Zhou, X.D. 2006. Effects of *Nidus Vespae* extract and chemical fractions on the growth and acidogenicity of oral microorganisms. *Arch Oral Biol.* 51: 804-813.
- Xiao, J.; Zhou, X.D.; Feng, J.; Hao, Y.Q.; Li, J.Y. 2007. Activity of *Nidus Vespae* extract and chemical fractions against *Streptococcus mutans* biofilms. *Applied Microbiology* 45: 547-552.
- Xu, X.; Zhou, X.D.; Wu, C.D. 2012. Tea catechin epigallocatechin gallate inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation by suppressing gtf genes. *Arch Oral Biol.* 57: 678-683.
- Yano, A.; Kikuchi, S.; Takahashi, T.; Kohama, K.; Yoshida, Y. 2012. Inhibitory effects of the phenolic fraction from the pomace of *Vitis coignetiae* on biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Archives of oral biology.* 57: 711-719.
- Zanela, N.; Bijella, M.; Machado, M.; da Silva, S. 1997. Influência de bochechos com soluções de digluconato de clorexidina a 0,2%, fluoreto de sódio a 0,05% pH 3,4 e esteviosoído 0,1%, na inibição da placa dentária "in vivo", em crianças. *Rev FOB.* 5: 71-78.

