

# CRECIMIENTO IN VITRO DE STREPTOCOCCUS MUTANS Y LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS EN MEDIOS QUE CONTENGAN EDULCORANTES ARTIFICIALES

## IN-VITRO GROWTH OF STREPTOCOCCUS MUTANS AND LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS AMID CONTAINING ARTIFICIAL SWEETENERS

Roberto Carlos Pérez Salazar<sup>1</sup>; Milagros Carrasco Loyola<sup>2</sup>

### RESUMEN

**Objetivo:** observar el crecimiento in vitro de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus* en una solución con edulcorantes xylitol, aspartame, sucralosa y sacarina sódica en concentraciones de 5% y compararlo con dos grupos control, uno sin edulcorante y otro con sacarosa.

**Material y Método:** se emplearon 30 tubos con *Streptococcus mutans* y 30 con *Lactobacillus acidophilus*, los cuales fueron divididos en seis grupos de cinco tubos cada uno: xylitol, aspartame, sacarina sódica y sucralosa (grupos de edulcorantes) y sacarosa y sin endulzante (grupo control). Las cepas de ambos microorganismos se cultivaron en agar y se mantuvieron en incubadora durante dos días. Las colonias se sometieron a pruebas de pureza; los edulcorantes fueron descontaminados y la solución empleada fue esterilizada. En 5ml de la solución se colocó cada edulcorante al 5% y 100 µl de suspensión de uno de los microorganismos. Los tubos fueron colocados en la incubadora durante 48 horas. El crecimiento de las bacterias fue medido en un espectrofotómetro calibrado.

**Resultados:** *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus* con presencia de xylitol presentaron mayores promedios de transmitancia, similares a los valores encontrados en 'sin edulcorantes' en el grupo control para ambos microorganismos. Los valores de transmitancia más bajos fueron para el aspartame con ambas bacterias. Se encontró diferencia entre el grupo con edulcorante y el control y al interior de cada grupo para ambos microorganismos ( $p < 0,05$ ).

**Conclusiones:** el Xylitol y la sacarina sódica reducen significativamente el crecimiento in vitro del *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*, mientras que la sacarosa, la sucralosa y el aspartame lo estimulan.

**Palabras clave:** sacarina, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*

### ABSTRACT

**Objective:** To observe the in vitro growth of *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus mutans* in a solution with xylitol sweetener, aspartame, sucralose and saccharin sodium in concentrations of 5% and compare it with two control groups, one unsweetened and another with sucrose.

**Materials and Method:** We used 30 tubes with *Streptococcus mutans* and 30 with *Lactobacillus acidophilus*, which were divided into 5 groups of 6 tubes each group: xylitol, aspartame, sodium saccharin and sucralose (groups of sweeteners) and sucrose and without sweetener (group control). The strains of microorganisms were cultivated both in agar and were kept in an incubator for 2 days. The colonies were tested for purity; sweeteners were decontaminated and the solution was sterilized. Five per cent of each sweetener and 100 µl suspension of one of the microorganisms were placed in 5ml of the solution. The tubes were placed in the incubator for 48 hours. The growth of bacteria was measured in a calibrated spectrophotometer.

**Results:** *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus mutans* with presence of Xylitol had higher transmittance average, similar to the values found in 'without sweeteners' in the control group for both microorganisms. The lowest transmittance values were for aspartame with both bacteria (tively). Difference was found between the group with sweetener and control, and within each group for both microorganisms ( $p < 0.05$ ).

**Conclusions:** Xylitol and saccharin sodium significantly reduce the in vitro growth of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus* while sucrose, sucralose and aspartame stimulate it.

**Keywords:** Saccharin, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*.

<sup>1</sup>Cirujano Dentista

<sup>2</sup>Docente de la Facultad de Odontología USMP

Correspondencia:

CD Pérez Salazar, Roberto Carlos

Milagros Carrasco Loyola

Correo electrónico: [milagrosbcarrasco@yahoo.com](mailto:milagrosbcarrasco@yahoo.com)

### INTRODUCCIÓN

Los *Streptococcus* son cocos grampositivos agrupados en pares o cadenas, no esporulados e inmóviles que presentan un metabolismo fermentativo. Son, además, anaerobios facultativos con requerimientos nutricionales complejos; constituyen el grupo más numeroso en la cavidad bucal.<sup>1</sup> En los cultivos representan del 20 al 30% del total de bacterias. Su primer hábitat es la superficie dentaria del hombre pero también puede ser identificado en las fauces. Su presencia en la placa bacteriana se ve favorecida por el

alto nivel de sacarosa en la dieta. La incidencia de *Streptococcus mutans* en la etiología de la caries dental ha sido demostrada por la producción de lesiones cariosas después de su introducción en la cavidad bucal de animales libres de gérmenes. Los estudios epidemiológicos han demostrado una relación directa entre el número de *Streptococcus mutans* y la presencia de la caries dental.<sup>2</sup>

Los *Lactobacillus* son microorganismos no esporulados e inmóviles; son gram positivos pero pueden tornarse gramnegativos en cultivos

envejecidos; son grandes productores de ácido láctico y se encuentran entre las bacterias más acidófilas que se conocen, son capaces de producir ácidos en un pH muy bajo. Su poca afinidad por las superficies dentarias hace que no se les relacione con lesiones de caries de esmalte; no obstante, son los primeros implicados en el avance de las caries de dentina. Actúan principalmente como “invasores secundarios” que aprovechan las condiciones ácidas y la retentividad existente en la lesión cariosa y dependen fundamentalmente de la acción anterior de los *Streptococcus mutans*. El *Lactobacillus acidophilus* es asociado con una frecuente ingesta de carbohidratos<sup>3</sup>.

Los edulcorantes son sustancias químicas de intenso sabor dulce que se utilizan para reemplazar el azúcar en diversos productos alimenticios dentro de los cuales encontramos: xylitol, sorbitol, aspartame, sacarina sódica, sucralosa, entre otros. Se ha demostrado que algunos sustitutos pueden actuar como agentes terapéuticos contra la caries dental<sup>4</sup>.

El aspartame es conocido comercialmente como nutrasweet; es un derivado dipéptido sintético sin valor calórico. Es un edulcorante intenso con un grado de dulzura 100 a 200 veces mayor que el de la sacarosa; es por ello que se utiliza en pequeñas cantidades.

La sucralosa es el único edulcorante de bajas calorías que se fabrica a partir del azúcar. Se lo usa en todo el mundo como ingrediente en alimentos procesados y bebidas de bajas calorías, y como edulcorante de mesa de venta libre en supermercados y tiendas. Es unas 600 veces más dulce que el azúcar.

La sacarina fue sintetizada en 1878, utilizándose como edulcorante desde principios del siglo XX. Proviene del puerin de los cerdos o del alquitrán de hulla, una sustancia que se deriva del carbón mineral. Es varios cientos de veces más dulce que la sacarosa. La forma más utilizada es la sal sódica, ya que la forma ácida es muy poco soluble en agua. Tiene un regusto amargo, sobre todo cuando se utiliza a concentraciones altas. Se usa como edulcorante no calórico, y en medicina cuando está contraindicada la toma de azúcar. Se emplea en la elaboración de bebidas refrescantes, en yogures edulcorados y en productos dietéticos para diabéticos.

El sorbitol ha sido utilizado desde hace mucho tiempo como edulcorante en numerosas golosinas y hasta en pastas dentales. También se utiliza en productos para diabéticos y en medicamentos libres de azúcar. Existen ciertos tipos de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus* que pueden fermentar el sorbitol. Debido al bajo grado de dulzura del sorbitol y su fermentación por parte del *Streptococcus Mutans*, se recomienda la adición de otro endulzante calórico

que mejora significativamente las propiedades organolépticas de los productos con sorbitol: el xylitol. Se ha reportado que la mezcla de estos edulcorantes aumenta el potencial del xylitol en inhibir el crecimiento del *Streptococcus mutans*. También existen evidencias de que ambos juntos disminuyen la incidencia de caries al compararlos con grupos que utilizan únicamente sorbitol.

El xylitol ha demostrado ser un sustituto de azúcar efectivo en la prevención de la caries dental. Es un carbohidrato natural clasificado químicamente como un alcohol de azúcar. Los primeros pasos en el metabolismo del xylitol no requieren de insulina, es por ello que en muchos países se utiliza el xylitol en la dieta de pacientes diabéticos. El xylitol provee aproximadamente la misma cantidad de calorías que la sacarosa. En la prevención de la caries, el xylitol posee tres mecanismos:

- Salivales. Debido a que es dulce, el xylitol estimula la secreción de saliva; por ello, la saliva estimulada contiene todos los mecanismos de defensa inherentes además de una capacidad buffer aumentada. También se ha descrito que bajo la utilización de xylitol, aumentan las amilasas y peroxidasas salivales. Estas enzimas contribuyen al sistema de defensa de la cavidad bucal.
- Microbiológicos. Los microorganismos cariogénicos no metabolizan el xylitol; por el contrario, se ha demostrado que puede inhibir el crecimiento de colonias de *S. mutans* y otros microorganismos acidogénicos.
- Bioinorgánicos. Todos los alcoholes de azúcar forman complejos débiles o quelantes con los iones de calcio. Estos complejos son tan inestables que los polioles no pueden llamarse agentes desmineralizadores bajo las condiciones normales de la cavidad bucal.

Estudios en sujetos han demostrado que el incremento de concentraciones de xylitol resulta en menor conteo de *Streptococcus mutans* en la saliva.<sup>5,6</sup> El consumo de xylitol en la dieta diaria y su uso en gomas reduce altamente la proporción de placa en la cavidad oral, al aumentar el nivel salival proporcionando una eficaz autólisis de microorganismos presentes en la placa y la caries como *Streptococcus* y *Lactobacillus* y la reducción de caries en un 80%.<sup>7</sup> Otros estudios han evaluado el efecto del xylitol y el sorbitol complementados con flúor en el proceso de caries dental observándose que interfieren en la reducción de la solubilidad del esmalte y, en consecuencia, en los bajos índices de actividad cariogénica en boca.<sup>8</sup>

Cuando se compara el crecimiento de cepas de *Streptococcus mutans* en un medio enriquecido con sorbitol, sacarina sódica y aspartame, se encuentra

poco crecimiento del microorganismo en presencia de sorbitol y de sacarina sódica, a diferencia del aspartame donde hay mayor crecimiento<sup>9</sup>.

Sin embargo, en otro estudio in vitro en el que se realizó una siembra de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus* se encuentra que el grupo de dientes con aspartame como sustrato no muestra caries durante todo el experimento, a diferencia del grupo que utilizó la sacarosa, en el que se evidencia caries desde la tercera semana<sup>10</sup>.

Otro estudio encontró que el xylitol, sacarina y sorbitol son edulcorantes que inhiben el crecimiento de *Streptococcus* y *Lactobacillus*, mientras que el aspartame y sucralosa son edulcorantes que estimulan el crecimiento de microorganismos<sup>11</sup>.

El objetivo de esta investigación fue observar el crecimiento in vitro de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus* en un medio con edulcorantes xylitol, aspartame, sucralosa y sacarina sódica en concentraciones de 5% y compararlo con dos grupos control, uno sin edulcorante y otro con sacarosa, con el fin de verificar el potencial cariogénico de dichos edulcorantes.

En estos tiempos el consumo de edulcorantes artificiales se ha incrementado sustancialmente, tanto en productos dietéticos o bajos en calorías como en aquellos dirigidos a personas que sufren enfermedades que condicionan a una intolerancia a la glucosa como en la diabetes o la a obesidad, y que deben usar edulcorantes artificiales como suplementos endulzantes en los alimentos. Los edulcorantes artificiales también son usados en productos farmacéuticos que necesitan un efecto dulce como es el caso de los jarabes pediátricos. Se hace necesaria entonces una investigación del efecto que tienen estos en el proceso cariogénico.

## MATERIAL Y MÉTODO

El estudio fue de tipo experimental. Se emplearon 30 tubos con *Streptococcus mutans* y 30 con *Lactobacillus acidophilus*, los cuales fueron divididas en seis grupos de cinco tubos cada grupo: xylitol, aspartame, sacarina sódica y sucralosa (grupos de edulcorantes) y sacarosa y sin endulzante (grupo control).

Las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC y *Lactobacillus acidophilus* ATCC, se cultivaron en Agar ROGOSA ATCC y se mantuvieron en incubadora durante dos días. Posteriormente se sometieron las colonias a pruebas de pureza: gram,

insulina, lactosa, rafinosa y sorbitos. Los edulcorantes fueron descontaminados pasándolos por filtros de 0,4 micras (ref. HVLPO 1300). Se creó un medio que fuera ideal para reproducir las colonias que contenía proteosa – preptona 1g, kcal 1,25g, cisteína Hcl 0,1g, extracto de levadura 0,5g y fue esterilizado en autoclave por 20 minutos a 120°C y a 15 libras de presión. Se procedió a colocar 5 ml de medio, cada edulcorante al 5% en cada tubo y se sembraron 100 µl de suspensión de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*, formando dos grupos de control, uno sin edulcorante y otro con sacarosa. Finalmente se colocaron los tubos en la incubadora automática de CO<sub>2</sub> durante 48 horas.

Para medir el crecimiento de las bacterias en los tubos se utilizó un espectrofotómetro (Fig.1) que fue calibrado con un tubo de agua pura, para que los valores de la transmitancia total (crecimiento nulo) y nula (crecimiento total) fueran 100 y 0, respectivamente, y poder obtener la transmitancia de cada tubo. Finalmente se obtuvieron los promedios de transmitancia para cada edulcorante y microorganismo.

Para el procesamiento de datos se utilizó un procesador Pentium 4 y programas estadísticos como Excel y SPSS versión 13.0. Se utilizó la prueba Kruskal-Wallis para determinar si existe diferencia entre los tratamientos con y sin edulcorante para cada microorganismo y entre los edulcorantes, y la prueba Mann-Whiney para observar si existen diferencias entre los tratamientos sin edulcorante con un nivel de significancia del 5%.

## RESULTADOS

*Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus* con presencia de xylitol presentaron mayores promedios de transmitancia ( $96,8 \pm 0,1$  y  $97,4 \pm 0,1$ , respectivamente), algo similar a los valores encontrados en 'sin edulcorantes' en el grupo control para ambos microorganismos ( $97,5 \pm 0,1$  y  $97,5 \pm 0,1$ , respectivamente). Valores similares se presentaron con la sacarina ( $96,4 \pm 0,3$  y  $96,7 \pm 0,1$ ).

Los valores de transmitancia más bajos fueron para el aspartame para ambas bacterias ( $83,3 \pm 0,1$  y  $83,9 \pm 0,1$ , respectivamente).

Se encontró diferencia entre el grupo con edulcorante y el control para ambos microorganismos ( $p < 0,05$ ). Similarmente, se encontró diferencia dentro de ambos grupos, con edulcorante y el control, para ambos microorganismos ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 1: promedio de tramitancia de Streptococcus mutans y Lactobacillus acidophilus en los grupos edulcorante y control**

Grupos	Streptococcus Mutans		Lactobacillus Acidophilus		
	Media	SD	Media	SD	
Grupo edulcorante	Aspartame	83,3	0,1	83,9	0,1
	Sucralosa	87,0	0,2	85,0	0,1
	Sacarina	96,4	0,3	96,7	0,1
	Xylitol	96,8	0,1	97,4	0,1
Grupo control	Sacarosa	87,9	0,1	89,2	0,1
	Sin endulzante	97,5	0,1	97,5	0,1

## DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio indicaron que los edulcorantes efectivos para la reducción del crecimiento in vitro de Streptococcus Mutans y Lactobacillus Acidophilus son xylitol y sacarina sódica, y los menos efectivos son aspartame, sucralosa. Con respecto al crecimiento de estos organismos con xylitol, se encontraron investigaciones in vivo que reportan resultados similares<sup>6,7</sup> así como in vitro.<sup>11</sup> Sin embargo, otro estudio refiere que el crecimiento in vitro del Streptococcus mutans no es afectado por la presencia de xylitol en muestras de placa y saliva<sup>5</sup>. La reducción del crecimiento bacteriano encontrado en esta investigación es explicado porque muchas bacterias que inducen la formación de caries en la cavidad oral son incapaces de metabolizar el xylitol, pero pueden acumular en el interior celular el metabolismo xylitol 5 fosfato, sin que pueda degradarlo, impidiendo la glicólisis normal y causando la muerte celular.<sup>12</sup>

En esta investigación se comprobó que el xylitol además de disminuir el crecimiento in vitro del

Streptococcus Mutans también inhibe el crecimiento del Lactobacillus Acidophilus en concentraciones de 5%. Con la sacarina sódica se encontró que hubo poco crecimiento del Streptococcus mutans y un alto crecimiento con aspartame que coincide con otro estudio in vitro que emplearon concentraciones similares.<sup>9,11</sup> Contrariamente, una investigación realizada en dientes reporta que la sacarosa es altamente cariogénica en relación al aspartame,<sup>10</sup> diferencia que podría explicarse a que en nuestro estudio el crecimiento in vitro se efectuó en tubos. La sucralosa estimuló el crecimiento de Streptococcus y Lactobacillus en nuestro estudio y coincide con los resultados reportados por otro estudio similar.<sup>11</sup>

Se concluye que los edulcorantes utilizados en este trabajo que reducen significativamente el crecimiento in vitro del Streptococcus mutans y Lactobacillus acidophilus fueron el xylitol y la sacarina sódica. Así mismo que la sacarosa, la sucralosa y el aspartame son edulcorantes que estimulan el crecimiento del Streptococcus mutans y Lactobacillus acidophilus, representando el mayor potencial cariogénico.

## ANEXOS



**Figura 1.-** Cepas ATCC de Streptococcus mutans y Lactobacillus Acidophilus en Agar Rogosa.



**Figura 2.-** Se procede a esterilizar el medio en autoclave



**Figura 3.-** Pipetas que fueron utilizadas para depositar los medios y cada uno de los edulcorantes



**Figura 7.-** Se calibró el espectrofotómetro con agua pura



**Figura 4.-** Se utilizó una multipipetapara cargar las suspensiones de Streptococcus mutans y Lactobacillus Acidophilus



**Figura 5.-** Tubos conteniendo los medios, edulcorantes y microorganismos fueron llevados a una incubadora de CO2 por 48 horas



**Figura 6.-** Se utilizó un Espectrofotómetro para la lectura de tramitancia

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Negroni M. Microbiología estomatológica. Buenos Aires: Médica Panamericana SA; 1999.
2. Gisbert E, Rivero A, Cantillo E. Relación entre el grado de infección por Streptococcus mutans y la posterior actividad cariogénica. Rev. Cubana Estomatol, 2000; 37(3): 157-61.
4. Becks H, Jensen A, Millare C. Rampant dental caries: prevention and prognosis, a five clinical survey. JADA, 1989; 49(2):1189-90.
5. Brown P. Caries. Valparaíso: Universidad de Viña del Mar; 1999.
6. Wennerholm K, Arends J, Birkhed D, Ruben J, Emilson C, Dijkman A. Effect of xylitol and sorbitol in chewing gums on mutans streptococci, plaque PH and mineral loss of enamel. PubMed, 1994; 28(1):48-54.
7. Haresaku S, Hanioka T, Tsuitsui A, Yamamoto M, Chou T, Gunjishima Y. Long term effect of xylitol gum use on mutans streptococci in adults. PubMed, 2007; 41(3):198-203.
8. Loesche J. The effect of chewing xylitol gum on the plaque and saliva levels of streptococcus mutans. JADA, 1994; 108:587-92.
9. Peterson L. Caries preventive effect of dentifrices containing various types and concentrations of fluorides and sugar alcohols. Caries Res, 1991; 25(1): 74-90.
10. Cárdenas E, Delgado J. Comparación del crecimiento in vitro de S Mutans con edulcorantes. Universitas odontológicas, 1998; 17(35): 43-44.
11. Escandon A. Estudio comparativo de la producción de caries entre la sacarosa y el apartame. Tesis de Bachillerato en Odontología. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 1996.
12. Delgado J, Castañeda S, Álvarez S, Martínez C. Comparación del crecimiento de S. mutans y L. Acidophilus con edulcorantes. Rev Federación Odontológica Colombiana, 1999; 196(57).
13. Kalfas S. Sorbitol adaptation of dental plaque in people and normal salivary-secretion rates. J Dent Restorative, 1990; 69(2):442-46.

Presentado:

02-05-2008

Aceptado para su publicación:

18-07-2008