



**UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE REHABILITACIÓN MAXILOBUCAL**

**POTENCIAL CARIOGÉNICO DE ENDULZANTES LÍQUIDOS
COMERCIALIZADOS EN CHILE. *IN VITRO***

Memoria presentada a la Escuela de Odontología de la
Universidad de Talca como parte de los requisitos exigidos
para la obtención del título de Cirujano Dentista.

**ESTUDIANTE: CAROLINA FERNANDA FIELD DONOSO
PROFESOR GUÍA: DR. RODRIGO A. GIACAMAN SARAH
PROFESORA CO-GUÍA: TM. NATALIA GARCÍA MANRIQUEZ
PROFESOR INFORMANTE: DRA. CONSTANZA FERNÁNDEZ**

TALCA-CHILE

2019

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2020

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis padres, por darme siempre darme su apoyo y permitirme creer en mí para lograr todo lo que me proponga, perseguir mis sueños e impulsarme a ser siempre una mejor persona.

Gracias a todos aquellos que formaron parte de estos hermosos años universitarios, en especial a aquellos que hoy puedo llamar “ mis amigos”, con los cuales reímos, lloramos, nos caímos y volvimos a parar, sin ustedes esto habria sido mucho mas difícil.

Quiero agradecer a Natalia, que fue mucho más que una guía, gracias por acompañarme en este arduo trabajo, sin tí no lo habría logrado.

Quiero agradecer al Dr. Rodrigo Giacaman por su confianza y apoyo, por permitirme ser parte de su equipo e impulsarme a soñar en grande.

Al resto del equipo de Cariología por permitirme ser una más de ustedes y conocer el trabajo de laboratorio que sin saberlo fue mi lugar de paz entre tanto caos.

Al GOP por entregarme mis mejores recuerdos de la Odontología, por permitirme soñar y ser parte de su hermosa labor, pero más importante por dejarme su sello, el cual llevaré siempre con mucho orgullo y amor.

Finalmente gracias a Dios por traerme hasta este lugar y acompañarme día a día.

I. INDICE

| | |
|---|-----------|
| II. RESUMEN..... | 4 |
| II.1 INGLÉS | 4 |
| II.2 ESPAÑOL | 5 |
| III. INTRODUCCIÓN..... | 6 |
| IV. MATERIALES Y MÉTODOS | 9 |
| IV.1 DISEÑO EXPERIMENTAL | 9 |
| IV.2 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS..... | 9 |
| IV.3 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES..... | 10 |
| IV.4 REACTIVACIÓN <i>S. MUTANS</i> | 11 |
| IV.5 EXPOSICIÓN DE LOS BIOFILMS | 11 |
| IV.6 ACIDOGENICIDAD DEL BIOFILM | 11 |
| IV.7 ANÁLISIS DEL BIOFILM | 12 |
| IV.8 DESMINERALIZACIÓN DEL ESMALTE | 13 |
| V. RESULTADOS..... | 14 |
| V.1 ACIDOGENICIDAD | 14 |
| V.2 DESMINERALIZACIÓN | 15 |
| V.3 BIOMASA..... | 16 |
| V.4 MICROORGANISMOS VIABLES..... | 17 |
| VI. DISCUSIÓN..... | 18 |
| VII. BIBLIOGRAFÍA..... | 21 |

II. RESUMEN

II.1 Inglés

Artificial sweeteners in different formats have been developed as sugar substitutes. Our group previously demonstrated that solid commercial sweeteners retain a cariogenic potential, but no information is available on the caries potential of the liquid sweeteners widely available in the market. Furthermore, the effect of these compounds has been tested in their pure, rather than the commercial form. The goal of this study, therefore, was to analyze the cariogenic potential of liquid sweeteners commercialized in Chile.

An in vitro study with a biological model of caries on enamel slabs with *Streptococcus mutans* UA159 biofilms was used. Six liquid sweeteners commercialized in Chile were analyzed: Saccharin, Sucralose, Tagatose, Fructose, “Balanced” Stevia and Pure Stevia. After biofilm formation, the slabs/biofilms were exposed for 5 days, 3 times per day for 5 min to the treatments, in similar quantities, with the corresponding positive and negative controls. Media pH was monitored twice per day. At the end of the experiment, the following outcomes were assessed: acidogenicity, demineralization and from the biofilms biomass and viable cells was analyzed. The entire experiment was repeated three times, each in triplicate (n=9). For the statistical analysis, ANOVA and Tukey with a level of significance of 95% were used. Results indicated that the different sweeteners induced an overall reduction of about 35% on acidogenicity and over the enamel demineralization, when compared to 10% sucrose, used as the caries-positive control ($p<0.05$). No significant differences we observed on biomass and viable cells among all the sweeteners.

In conclusion, liquid sweeteners marketed in Chile are less cariogenic than sucrose, but they retain the ability to induce demineralization and should be recommended with caution.

Key words: sweeteners, dental caries, biofilm.

II.2 Español

Se han desarrollado endulzantes artificiales en diferentes formatos como sustitutos del azúcar. Nuestro grupo demostró previamente que los endulzantes en tabletas disponibles en el mercado conservan un potencial cariogénico, pero no existe información respecto al efecto de estos en caries dental. Además, la actividad de estos compuestos ha sido probada en su forma pura y no en su forma comercial, por lo que el objetivo de este estudio fue analizar el potencial cariogénico de los endulzantes líquidos comercializados en Chile. En un modelo biológico de caries con biofilms monoespecie de *Streptococcus mutans* UA159 cultivados sobre bloques de esmalte, se analizaron 6 endulzantes líquidos comercializados en Chile: Sacarina, Sucralosa, Tagatosa, Fructosa, Stevia Balanceada y Stevia Pura. Posterior a la formación del biofilm, los bloques con sus biofilms fueron expuestos a los endulzantes durante 5 minutos, 3 veces al día por 5 días, con los correspondientes controles. Se evaluó acidogenicidad, desmineralización y desde los biofilms se analizó biomasa y células viables. El experimento fue repetido tres veces, cada uno en triplicado (n=9). Los datos se analizaron mediante ANOVA y Turkey, con un nivel de significancia del 95%. Los diferentes endulzantes indujeron una reducción global de alrededor del 35% en la acidogenicidad y desmineralización del esmalte, en comparación con el control positivo ($p < 0,05$). No se observaron diferencias significativas en la biomasa y células viables entre los endulzantes. Los endulzantes líquidos comercializados en Chile parecen ser menos cariogénicos que la sacarosa, pero conservan la capacidad de inducir desmineralización y debiesen ser recomendados con cautela.

Palabras Claves: endulzantes, caries dental, biofilm.

III. INTRODUCCIÓN

La caries dental sigue siendo la enfermedad crónica no transmisible más prevalente a nivel global, su prevalencia ha aumentado durante los últimos 25 años; en el año 2015 su prevalencia superaba el 40% de la población mundial y en Latinoamérica Andina era de un 54,9% (1) y por tanto su estudio y nuevas estrategias de prevención y tratamiento siguen siendo relevantes y un tema prioritario en materias de salud pública.

La enfermedad de caries se define como *una disbiosis ecológica dependiente de azúcar, causada por patobiontes* (2). En presencia de una dieta, balanceada y baja en azúcares, las bacterias del biofilm son capaces de metabolizar los carbohidratos y producir ácidos, principalmente ácido láctico (3). Cuando el consumo de azúcares es frecuente, se crea un desequilibrio en la microbiota oral (4), denominado disbiosis, provocando una alteración en el biofilm, privilegiando a las bacterias acidúricas y acidogénicas(5), lo que conlleva un aumento de la acidez, bajando el pH a nivel del punto crítico para la desmineralización del esmalte (pH 5.5)(6).

Por otra parte, la obesidad y el sobrepeso se han convertido en un serio problema de salud, debido al estilo de vida al que está sometida la población (7). Los índices de sobrepeso y obesidad han aumentado considerablemente durante los últimos 35 años, con un tercio de la población mundial clasificada como obesa o con sobrepeso (8). En Chile, según la Encuesta Nacional del Salud 2016-2017, el 71% de la población presenta sobrepeso u obesidad.

En ese contexto, los endulzantes han surgido como una forma de reemplazar el consumo de sacarosa en productos bebestibles (9). Según el estudio de mercado de Nielsen Scantrack realizada el 2019, el 89% de los consumidores de endulzantes prefiere el formato líquido y de estos el 51% opta por stevia, un 20% por sucralosa, 19% por sacarina y un 10% por otros. La Sacarina es 300 veces más dulce que la sacarosa, es excretada por medio de la orina y puede traspasar la placenta e interferir con la lactancia, por lo que no se recomienda en mujeres embarazadas o lactantes (10). La Sucralosa es entre 500 a 700 veces más dulce que

el azúcar, no aporta energía, es muy soluble en agua y estable bajo condiciones normales (7, 11). La Stevia es un endulzante natural extraído de las hojas de la *Stevia rebaudiana bertonii*, no se absorbe y no tiene valor energético en kilocalorías. Es de 100 a 300 veces más dulce que la sacarosa.(12). La Tagatosa, por su parte, es un monosacárido natural, no calórico que posee un dulzor equivalente al 92% de la sacarosa, aunque solo aporta 0,12Kcal/gr. Presenta propiedades prebióticas y se ha utilizado para el tratamiento de enfermedades como diabetes y obesidad, ya que disminuye el nivel de glucosa en la sangre (13-15). La fructosa es un monosacárido derivado de la hidrólisis la sacarosa, ampliamente indicado como reemplazante del azúcar en pacientes diabéticos debido a su menor aporte calórico. No obstante, la fructosa ha sido reportada como más acidogénica que la sucralosa (16, 17). Estos endulzantes, a diferencia de los azúcares, son poco metabolizados por la microbiota de la cavidad bucal, lo que repercute en una menor producción de ácidos, utilizando diferentes vías de metabolización que no llegan a la producción de estos (18). Los endulzantes o sustitutos de sacarosa, se pueden encontrar en formato sólido y líquido. En el campo odontológico, sólo existen estudios de endulzantes sólidos. Al ser líquidos presentan una menor adherencia a la superficie dentaria y menor dificultad para su remoción, lo que sería un factor positivo en cuanto al potencial de cariogenicidad que presentarían estos tipos de endulzantes, pero esta especulación no ha sido probada experimentalmente.

Diversos estudios han evaluado el potencial cariogénico de los endulzantes, tanto naturales como artificiales, describiéndolos como no cariogénicos(19). En un estudio *in vitro* de cariogenicidad de endulzantes en formato sólido, llevado a cabo por nuestro equipo de investigación en Cariología, se reportó que Sacarina, Stevia y Sucralosa presentaban una acidogenicidad significativamente menor a sacarosa y a fructosa. Todos los endulzantes presentaron menor desmineralización y producción de polisacáridos extracelulares insolubles en comparación con sacarosa, exceptuando la fructosa, que se comportó de manera similar a la sacarosa (16).

Existe una gran variedad de endulzantes líquidos comercializados en Chile, estos se componen de agua, el sustituto y conservantes, como se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Endulzantes líquidos utilizados y sus ingredientes

| Endulzante líquido | Marca | Ingredientes (por 100 mL) |
|--------------------|-------------|--|
| Sucralosa | Natura list | Agua purificada, Sucralosa (1,84g), ácido benzoico y metilparabeno. |
| Sacarina | Tottus | Agua purificada, endulcorantes (ciclamato sódico (12g), Sacarina sódica(3,0g)), ácido benzoico y metilparabeno |
| Fructosa | Daily | Agua purificada, Fructosa (15g), Sucralosa (3,2g), citrato de potasio, ácido cítrico, sorbato de potasio |
| Tagatosa | Tagatesse | Agua, tagatosa (20g), Sucralosa (2,5g), ácido cítrico, sorbato de potasio. |
| Stevia Balanceada | Naturalist | Agua purificada, Stevia (extracto de stevia rebaudiana 2,4g), Sucralosa (2,3g) ácido cítrico citrato de sodio, benzoato de sodio |
| Stevia Pura | Del Alba | Agua purificada, Stevia (2,0g), ácido cítrico, sorbato de potasio |

Si bien existen estudios que evalúan el potencial cariogénico de los diferentes sustitutos que se utilizan hoy en día, estos son más bien del sustituto en sí y no del producto comercializado (20-24). Por consiguiente, no se sabe cuál es el real nivel de desmineralización, la relevancia en la enfermedad de caries y si realmente son menos cariogénicos que los comercializados en formato sólido o que la sacarosa. Dado que no existen estudios que evalúen la cariogenicidad entre endulzantes líquidos, el propósito del presente estudio fue determinar el potencial cariogénico de algunos endulzantes líquidos representativos de los disponibles en el mercado chileno; Sacarina, Sucralosa, Tagatosa, Stevia y Fructosa, en un modelo de caries con un biofilm de *S. mutans*, *in vitro*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1 Diseño Experimental

Este estudio evaluó *in vitro* la cariogenicidad provocada por endulzantes líquidos en bloques de esmalte dental bovino. Para esto, se utilizó un modelo de caries monoespecie, con biofilms de *S. mutans*, previamente validado (25), pero con modificaciones. Este modelo ha sido utilizado extensamente en la Unidad de Cariología de la Universidad de Talca (26, 27).

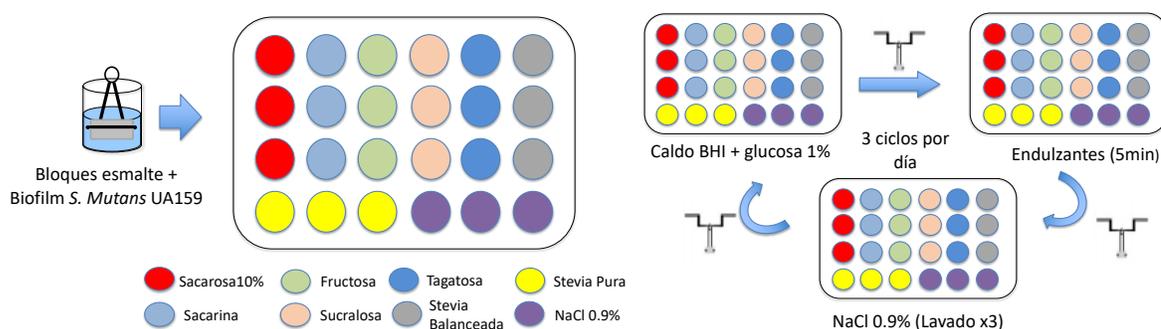


Figura 1. Esquema del diseño experimental. Se utilizaron bloques de esmalte bovino como sustrato para la formación de biofilms de *S. mutans* UA159, siendo conservados en caldo cerebro-corazón (BH) por 5 días, a 37°C y CO₂ al 10%, en un ambiente anaeróbico y expuestos durante 5 minutos, 3 veces al día a los tratamientos correspondientes (Sacarina, Sucralosa, Fructosa, Tagatosa, Stevia balanceada y Stevia pura)

IV.2 Obtención de las muestras

Para este procedimiento, fueron utilizados 200 dientes incisivos de bovinos, los cuales previamente fueron almacenados en un depósito de NaOCl al 5%, para posteriormente ser limpiados y seleccionados visualmente eliminando dientes con defectos o fracturas de esmalte. Los dientes seleccionados fueron posicionados en placas de resina acrílica y fijados con cera. Posteriormente en la cortadora eléctrica (LECO VC50 Diamond Saw, Michigan, EE.UU) con un disco diamantado se seccionó el diente para separar corona-raíz. Luego, utilizando discos diamantados en pieza de mano se obtuvieron 74 bloques de esmalte cuyas dimensiones fueron de 4x7x2 mm. Se alisó y pulió la cara del bloque relacionada a la superficie del esmalte, mientras que la otra cara sólo fue alisada. Se utilizó una máquina

pulidora y rectificadora (SS200, Leco, St. Joseph, MI, EE.UU.) con discos de lija de distintos grosores para pulir la cara superficial del esmalte, desde el grano más grueso hasta el más fino en el siguiente orden de grano: 400, 600, 800 y 1200, para posteriormente realizar un pulido final con discos de pulido (Soflex, 3M, Saint Paul, MN, EE.UU). Sobre la superficie de esmalte se realizaron 3 indentaciones separadas 100 μm entre sí, con una presión de 5 gr durante 10 segundos, utilizando un microindentador (402 MVD, Wolpert Wilson Instruments, Illinois, EE.UU) para medir la microdureza superficial Knoop (DS). Luego de obtener los datos, se determinó el promedio de DS, para posteriormente seleccionar solo aquellos bloques que no se alejaron más del 10% del promedio. Los bloques seleccionados fueron asignados aleatoriamente a uno de los 8 grupos experimentales en triplicado y fueron suspendidos verticalmente dentro de un pocillo de placas de cultivo de 24 pozos, mediante un armazón metálico para posteriormente ser esterilizados.

IV.3 Preparación de las soluciones

Se seleccionaron 5 endulzantes líquidos: Sucralosa, Sacarina, Stevia, Tagatosa y Fructosa. Para determinar la marca de endulzante a utilizar se incluyeron aquellos que tuvieran la menor cantidad de excipientes, seleccionando finalmente:

Tabla 2. Endulzantes utilizados y su pH en solución acuosa.

| Endulzante líquido | Marca | pH solución en 200 ml agua |
|--------------------|-------------|----------------------------|
| Sucralosa | Natura list | 5,38 |
| Sacarina | Tottus | 6,08 |
| Fructosa | Daily | 5,35 |
| Tagatosa | Tagatesse | 5,13 |
| Stevia Balanceada | Naturalist | 4,55 |
| Stevia Pura | Del Alba | 5,06 |

Para determinar el promedio de gotas de endulzante utilizadas por la población en 200 mL, se utilizó el programa G*Power 3(28) para determinar el tamaño muestral a encuestar. Se realizó una encuesta a 70 personas de rangos de edad 18-65 años, el rango de consumo en gotas varió de 5 a 45 gotas. Los encuestados relataron consumir: Sucralosa, Stevia, Sacarina

y Tagatosa. Finalmente, el promedio de gotas utilizadas por los participantes para endulzar una tasa de té de 200 mL de agua, fue de 13 gotas. Esta concentración fue la que se utilizó en el modelo experimental.

IV.4 Reactivación de *S. mutans*

Cepas de trabajo de 3^o generación de *S. mutans* UA159 fueron retiradas del freezer a -80°C y descongeladas gradualmente para posteriormente ser sembrada en una placa de agar BH e incubadas durante 24 horas a 37°C con 10% CO₂. Posteriormente, previo a la verificación de la pureza de la cepa, se seleccionaron 3-5 UFC y se traspasaron a 10 ml de caldo BH suplementado con sacarosa al 1%, para luego ser incubadas por 24 horas a 37°C con 10% CO₂, previo a verificación de pureza del caldo por medio de tinción de Gram. Se centrifugó el cultivo durante 5 min a 1500 g para eliminar el sobrenadante. Finalmente, para obtener el stock bacteriano, se tomaron 100 µL de la suspensión y se inocularon a 50 mL de caldo BH suplementado con sacarosa al 1%.

IV.5 Exposición de los biofilms

La división aleatoria de los bloques fue realizada en los grupos experimentales, donde luego fueron transferidos a una nueva placa, en la cual se aplicaron los tratamientos. Los biofilms sobre los bloques fueron inmersos en los tratamientos durante 5 minutos, 3 veces al día en horarios predeterminados (9:00, 13:00, 17:00). Luego de la aplicación, los biofilms fueron lavados con NaCl 0,9% y recolocados en la placa original con caldo de cultivo BHI, el cual fue cambiado dos veces al día, posterior de la primera exposición y después de la última exposición diaria. El experimento se extendió por 5 días, tiempo suficiente para la formación de lesiones sobre el esmalte (29) (Figura 1)

IV.6 Acidogenicidad del biofilm

Para la determinación de la acidogenicidad de biofilm, se midió el pH del caldo de cultivo dentro de los pocillos con un electrodo (9157BNMD, Thermo Scientific, Beverly, EEUU) acoplado a un pH metro digital portátil (Orion Star A211, Thermo Scientific). Esto se realizó 2 veces al día en cada cambio de medio y durante todo el experimento.

IV.7 Análisis del biofilm

Luego de 5 días, los biofilms fueron lavados con NaCl 0,9% tres veces transferidos a tubos Eppendorf con 1,0 mL de NaCl 0,9%. Los biofilms y los bloques fueron sonicados por 30 s a 7 W, separando el biofilm de los bloques de esmalte. Los bloques fueron separados y guardados para determinar el porcentaje de pérdida de dureza de superficial (%PDS). La suspensión remanente en el tubo con la totalidad del biofilm fue utilizada para la determinación de: microorganismos viables, biomasa, proteínas totales solubles y polisacáridos intra y extracelulares, como se describe brevemente a continuación:

IV.7.1.1 *Peso Seco*

Se transfirió 200 μ L de suspensión del biofilm a un tubo Eppendorf previamente pesado, se le adicionó 600 μ L de etanol al 100%, se refrigeró a -20°C por 15 minutos y se centrifugó a 10.000 g, a 4°C por 15 minutos (Thermo scientific, Heraeus Megafuge 16R, Massachusetts, EE.UU). Se descartó el sobrenadante para luego agregar 200 μ L de etanol al 75% y centrifugar nuevamente a 5.000 g, 4°C por 15 minutos. Por último, se descartó el sobrenadante y se dejó cada tubo con la tapa abierta hasta evaporar todos los componentes líquidos. Posteriormente se volvieron a pesar los tubos. Al peso final se le restó el peso inicial y se obtuvo el peso seco del biofilm extraído de los bloques, el cual fue expresado como mg/mL de suspensión de biofilm de *S. mutans* (30).

IV.7.1.2 *Microorganismos Viables*

Desde la suspensión inicial de biofilm en NaCl 0.9% se diluyeron de forma seriada 100 μ L, realizando un total de 12 diluciones (v/v) en NaCl 0.9%. De cada una de las diluciones fueron sembrados 10 μ L de suspensión en agar BHI en duplicado, para luego incubarlos por 24 horas a 37°C y 10% de CO_2 . Se consideró aquellas colonias desarrolladas en la dilución más alta que permitieran ser contadas, posteriormente, los datos fueron corregidos por el factor de dilución y normalizadas por el peso seco, siendo expresadas como UFC/mg de peso seco de biofilm.

IV.8 Desmineralización del esmalte

El grado de desmineralización de esmalte producido por los diferentes endulzantes, se evaluó mediante el test de microdureza superficial Knoop. La dureza superficial de los bloques de esmalte fue nuevamente medida utilizando el microidentador (402 MVD, Wolpert Wilson Instruments, Illinois, EE.UU) a través de tres indentaciones realizadas al final del experimento, separadas por 100 μm de distancia de las indentaciones iniciales. Los valores de las tres indentaciones iniciales y finales a los tratamientos se promediaron y el %PDS fue calculado $[(\text{promedio de dureza inicial} - \text{dureza promedio después del experimento}) \times 100] / \text{dureza inicial}$].

IV.9 Análisis estadístico

Luego de realizar la prueba de normalidad, los resultados de las pruebas fueron comparados mediante Anova, seguido de análisis pareado con el test de Tukey, utilizando el software SPSS versión 20.0 (IBM Corporation, New York, USA). Las diferencias se consideraron significativos si el valor p era inferior a 0,05.

V. RESULTADOS

V.1 Acidogenicidad

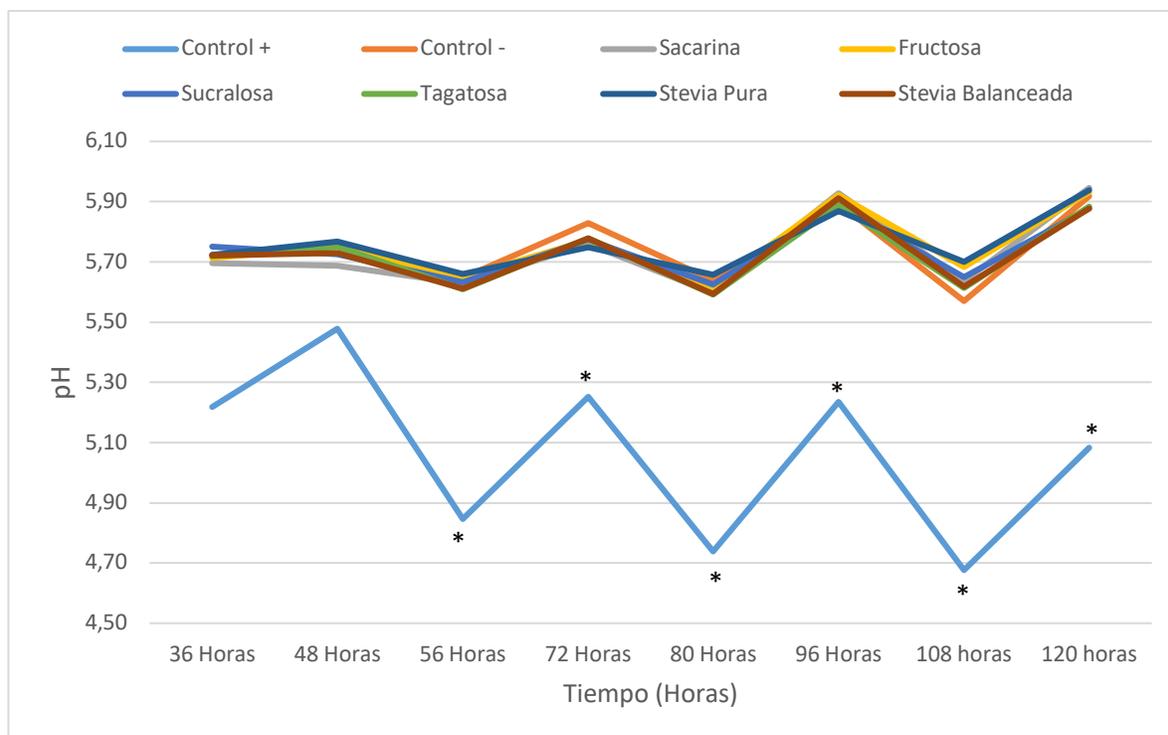


Figura 2: Acidogenicidad de medios de cultivo de biofilms de *S. mutans* al ser sometido a los diferentes endulzantes líquidos. La figura muestra valores promedio de pH del medio de cultivo (n=3) de acuerdo a los grupos evaluados. En la parte superior están señalados los diferentes tratamientos. (*) indica diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,0001$)

En la Figura 2 se puede observar la acidogenicidad de los biofilms. Durante el experimento se observan alzas y caídas de pH cíclicas, emulando la situación bucal. El pH de todos los tratamientos se mantiene sobre 5,5. A las 108 horas se registraron los valores de pH más bajos, pero aún así este no sobrepasa el pH crítico, a diferencia de lo que ocurre con el control positivo (sacarosa 10%), el cual presenta una acidogenicidad bajo pH 5,5, destacando la hora 108 donde presenta un pH 4,6. Se encontraron diferencias significativas entre los endulzantes y el control positivo desde las 56 horas ($p < 0,0001$).

V.2 Desmineralización

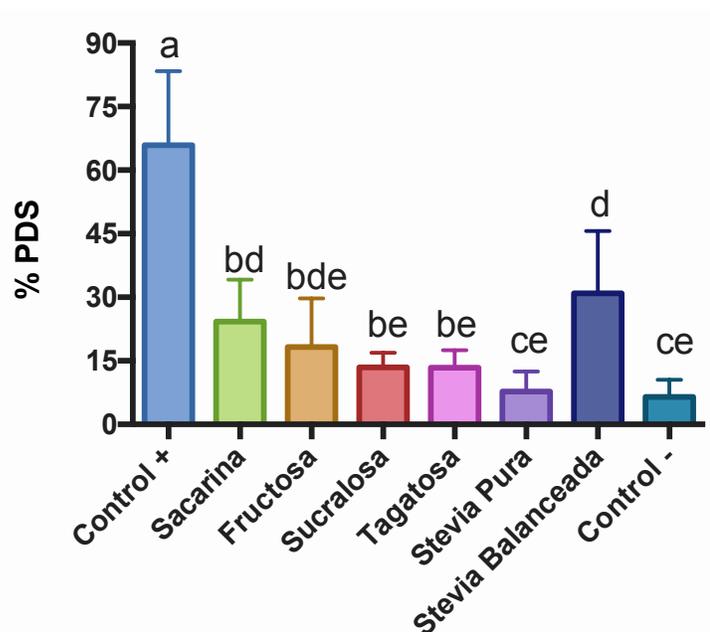


Figura 3: Pérdida de dureza superficial (%PDS) en esmalte post tratamiento. Las barras representan el promedio de %PDS del bloque de esmalte (n=9) las barras de error indican la desviación estándar. Las letras diferentes demuestran diferencias significativas entre grupos ($p < 0.0001$).

En relación con la desmineralización del esmalte (Figura 3), los endulzantes indujeron una menor demineralización que el control positivo (Sacarosa 10%) ($p < 0.0001$), la que fue similar al control negativo (NaCl al 0,9%). Observamos diferencias entre Stevia Balanceada y Sucralosa, Tagatosa y Stevia pura ($p < 0,05$). Stevia Pura mostró el valor más bajo de desmineralización, sin diferencias con el control negativo, sugiriendo que es no cariogénica.

V.3 Biomasa

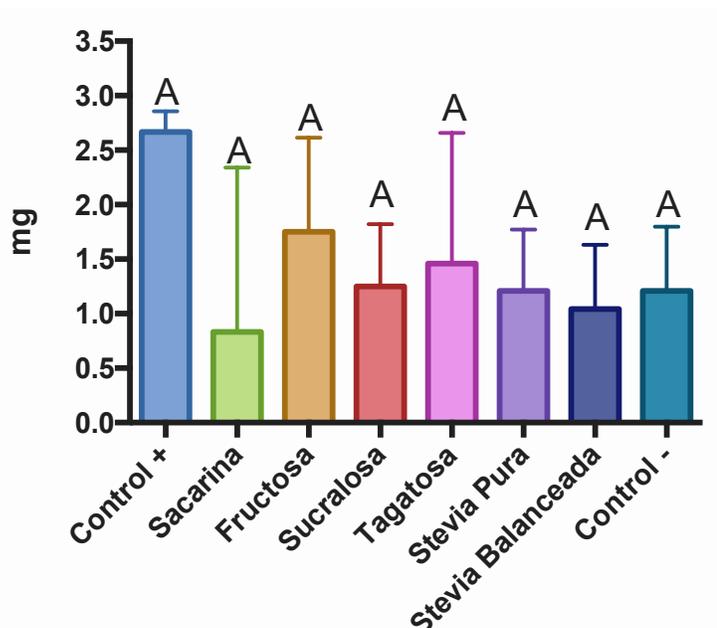


Figura 4: Biomasa inducida por los endulzantes evaluados. Las barras representan el promedio de Biomasa obtenida por medio del peso seco del biofilm de cada tratamiento (n=3) en esmalte. Las barras de error indican la desviación estándar. Las letras diferentes muestran diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$).

A pesar de que los resultados de biomasa (Figura 4) no arrojaron diferencias significativas entre los grupos ($p > 0,05$), los biofilms expuestos a sacarina, mostraron una tendencia hacia una menor cantidad biomasa respecto a los demás endulzantes, con valores inferiores al control negativo (NaCl al 0,9%). Por otro lado, Fructosa presenta una tendencia a una mayor formación de biofilm, a diferencia del resto de los endulzantes y del control negativo.

V.4 Microorganismos Viables

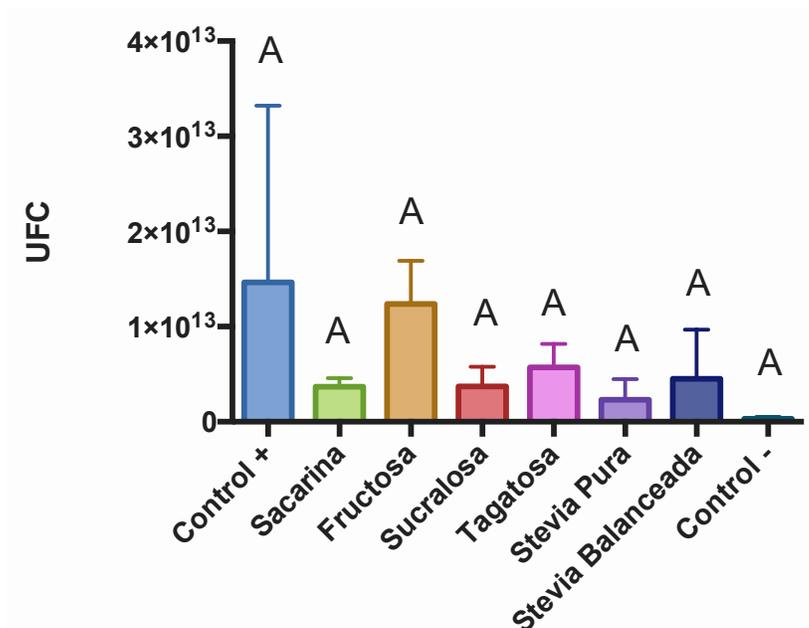


Figura 5: Microorganismos viables de los biofilms de *S. mutans*. La cantidad de bacterias producidas por los biofilms de *S. mutans* expuestos a los endulzantes fueron contadas y expresadas en UFC. Las barras representan el promedio de colonias de *S. mutans* obtenidas por cada tratamiento (n=3) en esmalte. Las barras de error indican la desviación estándar. Las letras diferentes representan diferencias significativas entre los grupos (p<0.05).

No se observó una diferencia significativa entre la cantidad de colonias de *S. mutans* halladas entre los controles positivo y negativo (p>0,05), no obstante, hubo una tendencia hacia un mayor recuento por parte del control positivo (sacarosa 10%). Tampoco se observaron diferencias significativas entre los endulzantes (p>0,05), pero se registraron menores recuentos en Sacarina, Sucralosa y Stevia pura, siendo estos mayores que el control negativo (NaCl 0,9%)

VI. DISCUSIÓN

En este estudio los endulzantes resultaron ser menos cariogénicos que la sacarosa, principal azúcar asociada con la formación de caries dental (4, 31). Stevia y Sucralosa inhibieron la producción de ácidos por parte de *S. mutans*, lo que explicaría la baja desmineralización evidenciada. Estos resultados son consistentes con estudios previos (23, 24). De igual forma, los endulzantes utilizados parecen reducir el número de bacterias que se adhieren a la superficie dental, ya que inhiben la síntesis de polisacáridos extracelulares (23, 24). En estudios previos en donde se utilizó una mezcla de sacarosa y tagatosa se evidenció un efecto inhibitorio en la producción de polisacáridos insolubles y de ácidos en comparación con sólo sacarosa (20, 21). Además, estos endulzantes generan un ambiente que dificulta la formación de la película adquirida, afectando la agregación bacteriana de los colonizadores primarios para la formación del biofilm, ya que interfieren con la actividad de las glucosiltransferasas (20, 21, 32).

En comparación con lo reportado previamente sobre el potencial cariogénico de endulzantes comercializados en formato de pastilla (16), el presente estudio ha evidenciado hallazgos similares. Los endulzantes líquidos resultaron ser menos acidogénicos que la sacarosa, tal como había sido planteado anteriormente (33). Sacarina, Stevia y Sucralosa presentaron menores caídas de pH en comparación con sacarosa (Figura 1). En el estudio previo con endulzantes sólidos, la Fructosa en pastillas presentó una caída de pH mayor en comparación a la registrada en este estudio por parte de la Fructosa en formato líquido. Esto se puede deber a que en el estudio de endulzantes sólidos el formato comercializado que se utilizó contenía sólo Fructosa, mientras que la utilizada en la presente investigación corresponde a una mezcla entre fructosa y sucralosa, por lo que sucralosa compensaría la baja de pH, además de la desmineralización producida, esto asociado a la capacidad de la sucralosa de no contribuir con una baja del pH (23).

Similar a lo reportado anteriormente (16), se mostró que frente a la desmineralización producida por los endulzantes en comparación con sacarosa, todos estos produjeron una desmineralización significativamente. Se puede apreciar una tendencia por parte de Stevia

pura de producir una menor desmineralización, asociado principalmente a la capacidad de esta sustancia de inhibir la producción de ácidos y dificultar la agregación bacteriana para la formación del biofilm (24). Cabe destacar que estos resultados ocurren con un pH de la solución menor a los otros endulzantes (Tabla 2), pero que no se ve reflejado en la acidogenicidad del medio de cultivo, considerando que el pH de Stevia pura siempre fue mayor a 5.6, por lo que se hace aún más interesante el bajo nivel de cariogenicidad de este endulzante en particular.

A pesar de que previamente se reportó una reducción en la formación de colonias bacterianas por parte de Sacarina y Stevia, lo que se coincide con lo encontrado en el presente estudio, esta reducción en comparación con los otros grupos no fue significativa, probablemente debido a razones técnicas en el manejo de los cultivos bacterianos. Se debe refinar la metodología para lograr resultados más precisos y con claras diferencias entre los controles. Frente a la exposición a sacarosa, se observa un aumento en la actividad metabólica bacteriana (34), lo que se traduce en un aumento de la biomasa (22). En este estudio, sacarosa mostró volúmenes mayores de biomasa que el resto de los grupos (Figura 4), aunque estas diferencias no fueron significativas, probablemente debido a la amplia variación de los valores obtenidos. Al igual que en el estudio de los endulzantes sólidos, sacarina presentó un menor volumen de biomasa, a pesar de que no se pudieron detectar diferencias significativas, desde el punto de vista estadístico, con el resto de los grupos ni de los controles.

Es importante considerar el pH inicial de las soluciones (Tabla 2) a las cuales se expusieron los biofilms. Todas excepto Sacarina presentaban pH bajo 5,5, siendo este denominado como pH crítico para la desmineralización del esmalte (6). A pesar del bajo pH de las soluciones, los niveles de acidogenicidad del medio y de desmineralización de los bloques no se condicionan con la acidez de los endulzantes. Esto podría deberse a que a pesar de la baja de pH, *S. mutans* no es capaz de metabolizar estas sustancias, por ende no puede formar ácidos y lograr mantener el pH ácido en el tiempo (35). Por consiguiente, si *S. mutans* no es capaz de metabolizar estos productos de forma eficiente para poder desarrollar sus factores de virulencia, es de esperar que no se vea afectada ni la acidogenicidad del medio de cultivo ni la desmineralización de la superficie de esmalte, aunque si es importante evaluar

cual sería la repercusión a largo plazo del consumo de estas sustancias con pH ácidos, tanto en la cariogenicidad, como en el potencial de generar desgaste dental erosivo u otro trastorno no carioso. Este tema es de interés, pero no ha sido investigado.

Al evaluar los resultados en su conjunto, los endulzantes presentaron un potencial cariogénico inferior al de la sacarosa, por lo que serían menos cariogénicos. Los mecanismos detrás de esta observación se asocian a una probable incapacidad de *S. mutans* de metabolizar estas sustancias. Si estos resultados son confirmados por estudios clínicos, se podrían incorporar a programas de promoción de salud general y bucal como suplementos alimenticios seguros. En particular Stevia pura y Tagatosa pueden ser promovidos como endulzantes de elección frente a sacarina, sucralosa, los cuales han sido asociados con efectos no deseables tanto en la vida cotidiana como durante el embarazo y la lactancia (36). Adicionalmente, sería interesante conocer los detalles que podrían generar a largo plazo el uso de estas sustancias a nivel de esmalte no asociado a caries, sino a lesiones no cariosas erosivas, vinculado al bajo pH de los excipientes utilizados en estos productos.

En conclusión, los endulzantes líquidos comercializados en Chile parecen ser menos cariogénicos que la sacarosa, pero conservan una cierta capacidad de inducir desmineralización y debiesen ser recomendados con cautela. Se sugieren otras investigaciones para confirmar estos hallazgos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabe E, Fleming TD, Reynolds AE, Vos T, et al. Global, Regional, and National Prevalence, Incidence, and Disability-Adjusted Life Years for Oral Conditions for 195 Countries, 1990-2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors. *J Dent Res.* 2017;96(4):380-7.
2. Simon-Soro A, Mira A. Solving the etiology of dental caries. *Trends Microbiol.* 2015;23(2):76-82.
3. Marsh PD. Sugar, fluoride, pH and microbial homeostasis in dental plaque. *Proc Finn Dent Soc.* 1991;87(4):515-25.
4. Díaz-Garrido N, Lozano C, Giacaman RA. Frequency of sucrose exposure on the cariogenicity of a biofilm-caries model. *Eur J Dent.* 2016;10(3):345-50.
5. Kreth J, Giacaman RA, Raghavan R, Merritt J. The road less traveled - defining molecular commensalism with *Streptococcus sanguinis*. *Mol Oral Microbiol.* 2017;32(3):181-96.
6. Bowen WH. The Stephan Curve revisited. *Odontology.* 2013;101(1):2-8.
7. Durán S, Córdón K, Rodríguez M. Non-nutritive sweeteners risks, appetite and weight gain. *Revista chilena de nutrición* 2013;40(3).
8. Chooi YC, Ding C, Magkos F. The epidemiology of obesity. *Metabolism.* 2019;92:6-10.
9. Duran Aguero S, Blanco Batten E, Rodriguez Noel Mdel P, Cordon Arrivillaga K, Salazar de Ariza J, Record Cornwall J, et al. [Association between non-nutritive sweeteners and obesity risk among university students in Latin America]. *Rev Med Chil.* 2015;143(3):367-73.
10. Carocho M, Morales P, Ferreira I. Sweeteners as food additives in the XXI century: A review of what is known, and what is to come. *Food Chem Toxicol.* 2017;107(Pt A):302-17.
11. Durán S, Quijada M, Silva L, Almonacid N, Berlanga M, Rodríguez M. Daily consumption levels of non-nutritive sweeteners in school age children from the valparaiso region. *Revista Chilena de Nutrición.* 2011 38(4):444-9.
12. Goyal SK, Samsher, Goyal RK. Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. *Int J Food Sci Nutr.* 2010;61(1):1-10.
13. Roy S, Chikkerur J, Roy SC, Dhali A, Kolte AP, Sridhar M, et al. Tagatose as a Potential Nutraceutical: Production, Properties, Biological Roles, and Applications. *J Food Sci.* 2018;83(11):2699-709.
14. Fujimaru T, Park JH, Lim J. Sensory characteristics and relative sweetness of tagatose and other sweeteners. *J Food Sci.* 2012;77(9):S323-8.
15. Jayamuthunagai J, Gautam P, Srisowmeya G, Chakravarthy M. Biocatalytic production of D-tagatose: A potential rare sugar with versatile applications. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017;57(16):3430-7.
16. Giacaman RA, Campos P, Munoz-Sandoval C, Castro RJ. Cariogenic potential of commercial sweeteners in an experimental biofilm caries model on enamel. *Arch Oral Biol.* 2013;58(9):1116-22.
17. Lagerlof F, Dawes R, Dawes C. The effects of different concentrations of sucrose, fructose, and glucose on pH changes by *Streptococcus mitior* in an artificial mouth. *J Dent Res.* 1985;64(3):405-10.

18. Núñez P, García Bacallao L. Biochemistry of dental caries. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. 2010;9(n.2):156-66.
19. Matsukubo T, Takazoe I. Sucrose substitutes and their role in caries prevention. *Int Dent J*. 2006;56(3):119-30.
20. Sawada D, Ogawa T, Miyake M, Hasui Y, Yamaguchi F, Izumori K, et al. Potent inhibitory effects of D-tagatose on the acid production and water-insoluble glucan synthesis of *Streptococcus mutans* GS5 in the presence of sucrose. *Acta Med Okayama*. 2015;69(2):105-11.
21. Hasibul K, Nakayama-Imaohji H, Hashimoto M, Yamasaki H, Ogawa T, Waki J, et al. DTagatose inhibits the growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Mol Med Rep*. 2018;17(1):843-51.
22. Cai JN, Jung JE, Dang MH, Kim MA, Yi HK, Jeon JG. Functional Relationship between Sucrose and a Cariogenic Biofilm Formation. *PLoS One*. 2016;11(6):e0157184.
23. Durso SC, Vieira LM, Cruz JN, Azevedo CS, Rodrigues PH, Simionato MR. Sucrose substitutes affect the cariogenic potential of *Streptococcus mutans* biofilms. *Caries Res*. 2014;48(3):214-22.
24. Kishta, Derani M, Neiva GF, Boynton JR, Kim YE, Fontana M. The antimicrobial potential of stevia in an in vitro microbial caries model. *Am J Dent*. 2016;29(2):87-92.
25. Ccahuana-Vásquez RA, Cury JA. *S. mutans* biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. *Braz Oral Res*. 2010;24(2):135-41.
26. Muñoz-Sandoval C, Muñoz-Cifuentes MJ, Giacaman RA, Ccahuana-Vasquez RA, Cury JA. Effect of bovine milk on *Streptococcus mutans* biofilm cariogenic properties and enamel and dentin demineralization. *Pediatr Dent*. 2012;34(7):e197-201.
27. Giacaman RA, Campos P, Muñoz-Sandoval C, Castro RJ. Cariogenic potential of commercial sweeteners in an experimental biofilm caries model on enamel. *Arch Oral Biol*. 2013;58(9):1116-22.
28. Faul F, Erdfelder, E., Lang, A.-G., & Buchner, A. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences | SpringerLink. *Behavior Research Methods*. 2007;39(2):175-91.
29. Ccahuana-Vasquez RA, Cury JA. *S. mutans* biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. *Braz Oral Res*. 2010;24(2):135-41.
30. Koo H, Hayacibara MF, Schobel BD, Cury JA, Rosalen PL, Park YK, et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52(5):782-9.
31. Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. *J Dent Res*. 2006;85(10):878-87.
32. Lu Y, Levin GV. Removal and prevention of dental plaque with d-tagatose. *Int J Cosmet Sci*. 2002;24(4):225-34.
33. Lohner S, Toews I, Meerpohl JJ. Health outcomes of non-nutritive sweeteners: analysis of the research landscape. *Nutr J*. 2017;16(1):55.
34. Koo H, Xiao J, Klein MI. Extracellular polysaccharides matrix--an often forgotten virulence factor in oral biofilm research. *Int J Oral Sci*. 2009;1(4):229-34.
35. Lemos JA, Abranches J, Burne RA. Responses of cariogenic streptococci to environmental stresses. *Curr Issues Mol Biol*. 2005;7(1):95-107.
36. Olivier-Van Stichelen S, Rother KI, Hanover JA. Maternal Exposure to Non-nutritive Sweeteners Impacts Progeny's Metabolism and Microbiome. *Front Microbiol*. 2019;10:1360.