

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



**Efecto de diferentes bebidas azucaradas sobre el crecimiento de
Streptococcus mutans y la respuesta en la reducción de azúcares**

Por

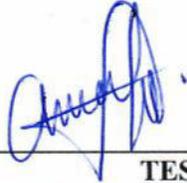
MCD. TALÍA RODRIGUEZ AMARAL

Como requisito parcial para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Odontopediatría

Marzo, 2025

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Odontopediatría

EFFECTO DE DIFERENTES BEBIDAS AZUCARADAS SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Streptococcus mutans* Y LA RESPUESTA EN LA REDUCCIÓN DE AZÚCARES



**TESISTA
TALÍA RODRIGUEZ AMARAL**

Comité de Tesis



**DIRECTOR DE TESIS
ERANDI ESCAMILLA GARCÍA**



**CODIRECTOR DE TESIS
MARCELA MONTES VILLARREAL**



**ASESOR METODOLÓGICO ESTADÍSTICO
JUAN CARLOS SEGOVIANO RAMÍREZ**



**ASESOR METODOLÓGICO
MARÍA TERESA GÓMEZ QUINTERO**

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que han posibilitado la realización de esta tesis de maestría, este trabajo no habría sido posible sin el apoyo y la contribución de individuos y organizaciones que han sido fundamentales en mi trayectoria académica.

En primer lugar, quiero agradecer a mis queridos padres, Cintia y Yeovany, por su inmenso apoyo, y ser los mayores promotores de mi sueños y pasiones; por su constante consejo, inquebrantable dedicación y sacrificio que han sido los pilares sobre los cuales he construido mi camino académico y profesional. La constante guía y apoyo han sido la luz que me ha guiado en los momentos más oscuros y desafiantes de esta travesía. Quiero agradecer a mi hermana, Amalia, por siempre hacerme reír y darme ánimos en este proceso.

También quiero agradecer a mi novio, David, por su constante apoyo, que desde el inicio de este camino ha estado a mi lado brindándome comprensión, respaldo y paciencia en los momentos de mayor desafío. Gracias por celebrar mis logros e impulsarme a mejorar en cada reto.

Quiero agradecer a mis abuelos por su sabiduría y apoyo que ha sido una fuente constante de inspiración y motivación en mi vida. Este logro también es de ustedes.

A mi directora de tesis, la Dra. Erandi Escamilla García, por su orientación experta, valiosos consejos y sugerencias que han sido fundamentales para dar forma a este trabajo y para mi crecimiento como investigadora, gracias por guiarme de principio a fin y tener paciencia en este proceso de aprendizaje constante. A mi codirectora de tesis, la Dra. Marcela Montes Villarreal por todo su apoyo; y al Dr. Juan Carlos Segoviano por ser mi asesor y resolver mis dudas en cuestión de Estadística.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnología (CONAHCyT), por la beca otorgada en el período de 2022-2024, CVU 1239720 apoyo de mis estudios de posgrado y realización de proyecto final de grado.

Al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAYCYT clave 329-CN-2022); y al Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) por permitirme el uso de las instalaciones, equipo y mobiliario durante el desarrollo de esta investigación, en especial el Laboratorio de Biotecnología Microbiana.

Al resto de mi familia y amigos, gracias por su cariño.

ÍNDICE

1. Introducción	13
2. Hipótesis	16
3. Objetivos	17
3.- Objetivo General	17
3.1.- Objetivos específicos	17
4. Antecedentes	18
4.1 La caries dental	18
4.2 Índice de caries infantil en el mundo	19
4.3 Factores predisponentes de caries dental	22
4.4 Desarrollo de la caries dental	23
4.5 Establecimiento del proceso cariogénico	24
4.6 Aspectos económico, social, cultural y de educación	30
4.7. Metabolismo bacteriano de biopelícula dental	31
4.8 Metabolismo de Streptococcus mutans	33
4.8.1 Curvas de Crecimiento.....	35
4.9 Azúcares Reductores	35
4.9.1 Azucares.....	37
4.9.2 Azúcar añadido y caries dental en niños	39
4.10 Azúcares añadidos y efectos generales de salud	41
5. Métodos	43
5.1 Descripción de procedimientos.	43
5.1.1 Conservación y Cultivo de Streptococcus mutans.....	43
5.1.2 Cinética de crecimiento.....	44
5.1.3 Concentración de azúcares reductores	45
5.2 Análisis estadístico.	49
6. Resultados	50
6.1 Curvas de Crecimiento de Streptococcus mutans UA130	50
6.2 pH	56
6.3 Azucares Reductores	58
7. Discusión	66
8. Conclusiones	73
9. Literatura Citada	74
10. Resumen Biográfico	84
Anexos	86

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de azúcares presentes en la dieta	37
Tabla 2. Bebidas Azucaradas de consumo frecuente en niños	47

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Porcentaje de niños entre edades 5 y 6 afectados por la caries dental en el período 2017-2018 Fuente: Petersen PE. Centro Colaborador de la Organización Mundial de la Salud (OMS), para el Programa e Investigación de Salud Oral Comunitaria, Universidad de Copenhague 2019 (World Health Organization, 2019)..... 21
- Figura 2.** Diagrama de Flujo que define la etiología de la desmineralización como una combinación de ácido, biomecánica y percolación de líquido intercrystalino (Roberts et al, 2022)..... 26
- Figura 3.** Esquema representativo de una superficie de esmalte recubierta de placa, la cual muestra las principales etapas de la fisiopatología del esmalte en relación con la desmineralización, la remineralización y la caries dental infecciosa (Roberts et al, 2022) . 26
- Figura 4.** Diagrama demostrativo de la lesión de mancha blanca en una sección 2D, se ve desde arriba como una decoloración blanca rodeada de esmalte intacto que revela la ubicación subsuperficial de un espacio desmineralizado de más de 400 µm de profundidad (Roberts et al, 2022) 29
- Figura 5.** Concepto de la caries de la Infancia temprana: influencia de salud oral en el niño, familia y comunidad. Fuente: Fisher-Owens SA, Gansky SA, Plarr LJ, Weintraub JA, Soobader MJ, Newacheck PW. Influences on children’s oral health: a conceptual model. Pediatrics. 2007; 120:e510-20 31
- Figura 6.** Ejemplo de cinéticas de crecimiento con Gráficas tomadas de artículo publicado por Baca-Castañón et al, (2015) 46
- Figura 7.** Cinéticas de crecimiento de *S. mutans* cultivada en caldo Trypticaseína de soya como control de referencia (♦), y en caldo TS suplementado con 1% de fuente de carbono como: glucosa al 1% (◆), jugo sabor mango (◆), refresco de cola (◆), jugo sin azúcares añadidos sabor manzana (◆), fórmula infantil (◆), leche saborizada de chocolate (◆) y yogurt bebible sabor fresa (◆)..... 51
- Figura 8.** Cinética de Crecimiento de *Streptococcus mutans UA130* en caldo de Trypticaseína de Soya (TS) como referencia de crecimiento habitual (◆), y en caldo TS suplementado con Glucosa 1% (◆). 52
- Figura 9.** Cinética de Crecimiento de cultivos de *Streptococcus mutans UA130* en caldo de Trypticaseína de Soya (TS) suplementado con 1% de bebida azucarada: jugo sabor mango (◆), refresco de cola (◆) y jugo sin azúcares añadidos sabor manzana (◆). 53
- Figura 10.** Cinética de Crecimiento de cultivos de *Streptococcus mutans UA130* en caldo de Trypticaseína de Soya (TS) suplementado con 1% de bebida láctea: fórmula infantil (◆), leche saborizada de chocolate (◆) y yogurt bebible sabor fresa (◆). 55

Figura 11. Variación de pH en el transcurso del crecimiento de *Streptococcus mutans* UA130 en caldo Trypticaseína de soya como control de referencia (♦), y en caldo TS suplementado con 1% de fuente de carbono como: glucosa al 1% (◆), jugo sabor mango (♣), refresco de cola (♠), jugo sin azúcares añadidos sabor manzana (♣), fórmula infantil (♣), leche saborizada de chocolate (♣) y yogurt bebible sabor fresa (♣). 56

Figura 12. Curva de Calibración de Reactivo DNS. Método de óxido-reducción propuesto por Miller (1959), basado en la capacidad de la glucosa para reducir el ácido 3,5-dinitrosalicílico incrementando la concentración de azúcares reductores..... 58

Figura 13. Metabolismo de Azúcares Reductores de *Streptococcus mutans* UA130 en caldo Trypticaseína de soya como control de referencia (♦), y en caldo TS suplementado con 1% de fuente de carbono como: glucosa al 1% (◆), jugo sabor mango (♣), refresco de cola (♠), jugo sin azúcares añadidos sabor manzana (♣), fórmula infantil (♣), leche saborizada de chocolate (♣) y yogurt bebible sabor fresa (♣)..... 60

Figura 14. Análisis estadístico del desarrollo de *Streptococcus mutans* UA130 en un caldo de tripticaseína de soya (TS) como cultivo de referencia (control positivo), en relación con cultivos adicionados de 1% de: glucosa, Jugo de mango, refresco de cola, jugo sin azúcares añadidos de manzana, fórmula infantil, yogurt bebible de fresa y leche saborizada de chocolate. Prueba de ANOVA y nivel de significancia de $p < 0.05$ 62

Figura 15. Análisis estadístico comparativo del pH del cultivo de *Streptococcus mutans* UA130 en un caldo de tripticaseína de soya (TS) como cultivo de referencia (control positivo), en relación con cultivos adicionados de 1% de: glucosa, Jugo de mango bebidas, refresco de cola, jugo sin azúcares añadidos de manzana, fórmula infantil, yogurt bebible de fresa y leche saborizada de chocolate. Prueba de ANOVA y nivel de significancia de $p < 0.05$ 63

Figura 16. Análisis estadístico de azúcares reductores para cada uno de los cultivos de *Streptococcus mutans* UA130 en un caldo de tripticaseína de soya (TS) como cultivo de referencia en relación con cultivos adicionados de distintas bebidas lácteas (a), bebidas azucaradas (b) y comparación con todas las fuentes de azúcar adicionadas en 1% (c). Prueba de ANOVA, coeficiente de correlación de Pearson y nivel de significancia de $p < 0.05$ 64

TESISTA: TALÍA RODRÍGUEZ AMARAL
DIRECTOR DE TESIS: ERANDI ESCAMILLA GARCÍA
CODIRECTOR DE TESIS: MARCELA MONTES VILLARREAL
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

EFEECTO DE DIFERENTES BEBIDAS AZUCARADAS SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Streptococcus mutans* Y LA RESPUESTA EN LA REDUCCIÓN DE AZÚCARES

RESUMEN

Palabras clave: *Streptococcus mutans*, crecimiento celular, bebidas azucaradas, azúcares reductores.

Introducción

El 50% de la población infantil entre las edades de 3 y 12 años desarrollan caries dental. La aparición de la caries está determinada por múltiples factores que incluyen: hábitos dietéticos, composición y cantidad de saliva, así como el pH y desequilibrios del microbiota oral. Considerando que el consumo de azúcares contenidos en productos comerciales, entre gran parte de la población infantil en México, es considerada una de las variables etiológicas modificables de la caries, la correcta orientación de hábitos alimenticios contribuye en la salud bucal. El objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento de *S. mutans* una bacteria etiológica de la caries dental, en presencia de diferentes bebidas comerciales azucaradas como fuente principal de carbono.

Metodología

Las condiciones de cultivo y crecimiento de la cepa *Streptococcus mutans* UA130 (ATCC 700611) fueron basadas en la ficha técnica de la *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, AD). En 100 mL de caldo Trypticaseína de Soya (TS) contenido en un matraz Erlenmeyer-200 mL, se inocularon 1.2×10^8 células/mL a una Densidad Óptica (DO) de 0.2-0.5 en la escala de McFarland (0.2) y una longitud de onda de 600 nm (Espectrofotómetro SmartSpec™ Plus; Bio-Rad). Transcurridos 5 minutos de incubación del inóculo a 24 h y 37 °C, se tomó una muestra (tiempo 0), de 3.5 mL repartidos en 500 mL para medir Absorbancia_{600nm} y concentración celular (células/mL); 1.5 mL para medir pH (PC820 Kit, Apera); y 1.5 mL para evaluar concentración de azúcares reductores (mg/mL) por el método del Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Se tomaron muestras cada hora por 8 horas. Se procedió igual para los cultivos de *S. mutans* con 1% de cada bebida azucarada prevista en el estudio: Refresco de cola (regular), Jugo de fruta sabor mango, formula láctea infantil etapa 3, yogurt bebible de fresa, Jugo de fruta sin azúcares añadidos sabor manzana y leche saborizada sabor chocolate. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Resultados y Discusión

El cultivo de *S. mutans* en caldo nutritivo de TS, se tomó como referencia de control para comparar con el resto de los cultivos con bebidas azucaradas. En el análisis estadístico de comparación de las cinéticas de crecimiento aplicando la prueba ANOVA de una vía; no se observaron diferencias significativas entre los cultivos experimentales y el cultivo control. En cuanto al pH se muestra una disminución en los cultivos adicionados de glucosa, bebidas lácteas y bebidas azucaradas. En general, se aprecia un pH promedio de 6.99 ± 0.17 a unos minutos después de la inoculación. El pH disminuyó en un lapso de 1h y durante las 4 h posteriores, alcanzando una estabilidad en 4.96 ± 0.26 .

S. mutans es una bacteria neutrófila que tolera pH en el rango de 5.5-8.5 para su óptimo crecimiento. Los resultados revelaron la ausencia de significancia estadística entre los grupos analizados y el grupo control (caldo-TS), dado que todos obtuvieron un valor de $p > 0.9999$. El cultivo de *S. mutans* en caldo TS es formulado comercialmente con 8.33% de D-Dextrosa (2.5 gr/L). Comparando estadísticamente los resultados de azúcares reductores, no se encontraron diferencias significativas en los grupos experimentales que incluían jugos o bebidas azucaradas. Sin embargo, en los ensayos experimentales con bebidas lácteas, se encontraron diferencias

significativas en el orden de la fórmula infantil ($p < 0.0001$), el yogurt bebible de fresa ($p = 0.0010$) y la leche saborizada de chocolate ($p = 0.0006$), respectivamente.

Conclusiones

S. mutans cuenta con un metabolismo rápido y en este estudio denota un rápido consumo de azúcares especialmente los contenidos en bebidas lácteas con que fue suplementado el caldo TS, evidenciando una fase de adaptación rápida y un crecimiento exponencial sostenido. La disminución del pH es proporcional al crecimiento bacteriano y depende del tipo de azúcar contenido y añadido al cultivo. Existe una relación con el azúcar que se encuentra en las bebidas lácteas, pues permite un crecimiento inmediato; mientras que en presencia de las otras bebidas azucaradas comerciales la bacteria requiere al menos 1h de adaptación. El mayor crecimiento de *S. mutans* en un menor tiempo, fue con la adición de fórmula infantil al caldo TS, seguido por el yogurt bebible y la leche sabor chocolate con un crecimiento semejante y ligeras diferencias en el tiempo de máxima proliferación. En este estudio se concluye que la proliferación de *S. mutans* es dependiente del tipo de azúcar y la formulación de la bebida comercial azucarada. Los hallazgos indican la continuidad de un estudio *in vitro* con piezas dentales en contacto con las bebidas azucaradas aquí evaluadas, para determinar el tiempo, mecanismo y grado de formación de caries en presencia de *S. mutans*.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnología (CONAHCyT), por la beca otorgada en apoyo a mis estudios de posgrado (2022-2024) y al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAYCYT clave 329-CN-2022) otorgado a E. E-G.

TESISTA: TALÍA RODRÍGUEZ AMARAL
DIRECTOR DE TESIS: ERANDI ESCAMILLA GARCÍA
CODIRECTOR DE TESIS: MARXELA MONTES VILLARREAL
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**EFFECTO DE DIFERENTES BEBIDAS AZUCARADAS SOBRE EL CRECIMIENTO
DE *Streptococcus mutans* Y LA RESPUESTA EN LA REDUCCIÓN DE AZÚCARES**

**EFFECT OF DIFFERENT SUGARY DRINKS ON THE GROWTH OF *Streptococcus
mutans* AND THE RESPONSE TO SUGAR REDUCTION**

ABSTRACT

Keywords: *Streptococcus mutans*, cell growth, sugary drinks, reducing sugars.

Introduction

Fifty percent of the child population between the ages of 3 and 12 years develops dental caries. The appearance of caries is determined by multiple factors including: dietary habits, composition and quantity of saliva, as well as pH and imbalances of the oral microbiota. Considering that the consumption of sugars contained in commercial products, among a large part of the child population in Mexico, is considered one of the modifiable etiological variables of caries, the correct orientation of dietary habits contributes to oral health. The objective of this work was to evaluate the growth of *S. mutans*, a bacterium that causes dental caries, in the presence of different commercial sugary drinks as the main carbon source.

Methodology

The culture and growth conditions of the strain *Streptococcus mutans* UA130 (ATCC 700611) were based on the technical data sheet of the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, AD). In 100 mL of Trypticasein Soy (TS) broth contained in a 200 mL Erlenmeyer flask, 1.2×10^8 cells/mL were inoculated at an Optical Density (OD) of 0.2-0.5 on the McFarland scale (0.2) and a wavelength of 600 nm (SmartSpec™ Plus Spectrophotometer; Bio-Rad). After 5 minutes of incubation of the inoculum at 24 h and 37 °C, a sample (time 0) of 3.5 mL was taken, divided into 500 μ L to measure absorbance 600 nm and cell concentration (cells/mL); 1.5 mL to measure pH (PC820 Kit, Apera); and 1.5 mL to evaluate the concentration of reducing sugars (mg/mL) by the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method. Samples were taken every hour for 8 hours. The same procedure was followed for the *S. mutans* cultures with 1% of each sugary drink planned in the study: cola soft drink (regular), mango-flavored fruit juice, stage 3 infant milk formula, strawberry drinkable yogurt, apple-flavored fruit juice without added sugars, and chocolate-flavored milk. All experiments were performed in triplicate.

Results and Discussion

The *S. mutans* culture in TS nutrient broth was used as a control reference to compare with the rest of the cultures with sugary drinks. In the statistical analysis of the comparison of the growth kinetics using the one-way ANOVA test, no significant differences were observed between the experimental cultures and the control culture. Regarding the pH, a decrease is shown in the cultures added with glucose, dairy drinks and sugary drinks. In general, an average pH of 6.99 ± 0.17 is observed a few minutes after inoculation. The pH decreased in a period of 1 h and during the following 4 h, reaching a stability at 4.96 ± 0.26 . *S. mutans* is a neutrophilic bacterium that tolerates pH in the range of 5.5-8.5 for optimal growth. The results revealed the absence of statistical significance between the analyzed groups and the control group (TS broth), since all obtained a value of $p > 0.9999$. The *S. mutans* culture in TS broth is commercially formulated with 8.33% D-Dextrose (2.5 gr/L). Statistically comparing the results of reducing sugars, no significant differences were found in the experimental groups that included juices or sugary drinks. However, in the experimental trials with dairy drinks, significant

differences were found in the order of infant formula ($p < 0.0001$), strawberry drinkable yogurt ($p = 0.0010$) and chocolate flavored milk ($p = 0.0006$), respectively.

Conclusions

S. mutans has a fast metabolism and in this study, it shows a rapid consumption of sugars, especially those contained in dairy drinks with which the TS broth was supplemented, evidencing a rapid adaptation phase and sustained exponential growth. The decrease in pH is proportional to bacterial growth and depends on the type of sugar contained and added to the culture. There is a relationship between the origin of the sugar contained in dairy drinks, since they allow immediate growth, while in the presence of other commercial sugary drinks the bacteria require at least 1 hour of adaptation. The greatest growth of *S. mutans* in a shorter time was with the addition of infant formula to the TS broth, followed by drinkable yogurt and chocolate-flavored milk with similar growth and slight differences in the time of maximum proliferation. In this study it is concluded that the proliferation of *S. mutans* is dependent on the type of sugar and the formulation of the commercial sugary drink. The findings indicate the continuation of an in vitro study with dental pieces in contact with the sugary drinks evaluated here, to determine the time, mechanism and degree of caries formation in the presence of *S. mutans*.

Acknowledgements

To the National Council of Humanities, Sciences and Technology (CONAHCyT), for the scholarship awarded in support of my postgraduate studies (2022-2024) and to the Scientific and Technological Research Support Program (PAYCYT key 329-CN-2022) awarded to E. E-G.

1. Introducción

El 50% de la población infantil entre las edades de 3 y 12 años desarrollan caries dental. La aparición de la caries está determinada por múltiples factores que incluyen: hábitos dietéticos, composición y cantidad de saliva, pH y desequilibrios del microbiota oral.

Por microbiota se entiende el conjunto de todos los microorganismos, que bajo condiciones fisiológicas o patológicas precisas y en un ambiente específico, viven y colonizan en simbiosis. Se refiere al ecosistema natural de la cavidad oral.

La caries dental es la enfermedad oral más común, que inicia tras el desarrollo de la placa dental. *Streptococcus mutans* es una bacteria anaerobia Gram positiva involucrada en el desarrollo de caries. Coloniza la superficie dental a través de la adhesión dependiente e independiente de la sacarosa utilizando glucoproteínas para adherirse. La sacarosa es una fuente esencial de polisacáridos extracelulares en la biopelícula de la placa dental cariogénica.

La caries dental es una enfermedad causada por el aumento de bacterias cariogénicas en un microbioma en disbiosis, relacionada directamente con el metabolismo de carbohidratos fermentables. Como resultado de ello, estas bacterias producen ácido láctico que disminuye considerablemente el pH del ambiente oral (pH de 3.8), lo cual propicia la desmineralización de las superficies dentales. Esta es considerada una enfermedad multifactorial, la cual puede aparecer cuando existe elevado consumo de azúcar, hábitos alimentarios no saludables en conjunto con disbiosis del microbioma.

La caries dental puede provocar abscesos y causar dolor de piezas dentales, lo que compromete la capacidad para comer, dormir y restringe la actividad normal de los pacientes pediátricos. Estas se producen después de la erupción y presentan un carácter dinámico de progresión, cuya evolución natural terminará en la destrucción total del diente. Es posible frenar dicha evolución si se implementan las medidas preventivas adecuadas.

Bajo esta problemática, se formula la siguiente pregunta: ¿Cómo impacta la cantidad y el tipo de azúcares contenidos en bebidas procesadas y de fórmula infantil, en el crecimiento de *Streptococcus mutans*?

Tomando en cuenta que el consumo de azúcares es una de las variables etiológicas modificables de la caries, la correcta orientación de hábitos alimenticios tendrá una buena contribución para la salud bucal. Esta investigación pretende lograr la educación de padres e hijos, crear conciencia en los cuidadores para poder disminuir el desarrollo de caries en la población infantil, lo cual evitaría tratamientos dentales radicales donde se produzca la pérdida del órgano dental y aumente la calidad de vida de nuestros pacientes.

El objetivo de este trabajo es Evaluar el efecto de azúcar contenida en bebidas comerciales y fórmula láctea, en el desarrollo de *Streptococcus mutans UA130*, cuando son adicionadas al caldo Tripticaseína de Soya.

Las condiciones de cultivo y crecimiento de la cepa *Streptococcus mutans UA130* (ATCC 700611) se desarrollaron según la ficha técnica de la *American Type Culture Collection* (ATCC, Rocville, AD). A partir de 100 mL de caldo Tripticaseína de Soya presente en un

matraz Erlenmeyer de 200 mL, se inocularon 1.2×10^8 células/mL a una Densidad Óptica (DO) de 0.2-0.5 en la escala de McFarland (0.2) y una longitud de onda de 600 nm (Espectrofotómetro SmartSpec™ Plus; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). El inóculo fue incubado 24 h a 37 °C. Transcurridos los primeros 5 minutos de incubación, se tomó una primera muestra denominada tiempo 0, de 3.5 mL de los cuales se repartieron 500 mL para medir la Absorbancia_{600nm} y su equivalente en concentración celular (células/mL); 1.5 mL para medir pH (PC820 Kit, Apera); y 1.5 mL para evaluar concentración de azúcares reductores (mg/mL). De manera subsecuente se tomaron muestras cada hora hasta cumplidas 8 horas de incubación. Este procedimiento fue aplicado para los cultivos de *S. mutans UA130* con el 1% de cada bebida azucarada prevista en este protocolo: (Refresco de cola (regular), Jugo de fruta sabor mango, formula láctea infantil etapa 3, yogurt bebible de fresa, Jugo de fruta sin azúcares añadidos sabor manzana y leche saborizada sabor chocolate).

2. Hipótesis

El tipo y cantidad de azúcar contenida en las bebidas procesadas y la fórmula infantil, afectan el desarrollo de *Streptococcus mutans UA130*.

3. Objetivos

3.- Objetivo General

Evaluar el efecto del azúcar contenida en bebidas comerciales y fórmula láctea, en el desarrollo de *Streptococcus mutans UA130*, cuando son adicionadas al caldo Tripticaseína de Soya.

3.1.- Objetivos específicos

1. Establecer el desarrollo de *S. mutans*, a través de cinéticas de crecimiento

- 2: Evaluar la variación de pH de *S. mutans*

- 3: Evaluar el catabolismo de azúcares reductores como fuente de energía de *S. mutans*

- 4: Comparar estadísticamente los parámetros de crecimiento, pH y azúcares reducidos de *S. mutans*

4. Antecedentes

4.1 La caries dental

El 50% de la población infantil entre las edades de 3 y 12 años desarrollan caries dental (INEGI, 2020). La aparición de la caries está determinada por múltiples factores que incluyen: hábitos dietéticos, composición y cantidad de saliva, pH y desequilibrios del microbiota oral.

El microbiota significa el conjunto de todos los microorganismos, que bajo condiciones fisiológicas o patológicas precisas y en un ambiente específico, viven y colonizan en simbiosis. En sí, se refiere al ecosistema natural de la cavidad oral.

La microbiota oral es heterogénea y compleja, la misma comprende más de 700 familias de microorganismos. Para un mejor entendimiento es importante diferenciar algunos términos: la “*eubiosis*” como indicador del equilibrio del sistema microbiano, “*disbiosis*” representa el desequilibrio en la proliferación de bacterias que tienden a ser patógenas. Por tanto, la disbiosis supone un riesgo para la salud bucal y la aparición de enfermedades sistémicas como la diabetes y enfermedades cardiovasculares.

La caries dental es la enfermedad oral más común, que se inicia tras el desarrollo de la placa dental. *Streptococcus mutans* es una bacteria Gram + y anaerobia, importante debido a su etiología en el desarrollo de la caries. Coloniza la superficie dental a través de la adhesión dependiente e independiente de la sacarosa utilizando glucoproteínas para adherirse. La

sacarosa es una fuente esencial de polisacáridos extracelulares en la biopelícula de la placa dental cariogénica. El mecanismo de adhesión dependiente de la sacarosa en *S. mutans*, involucra varias proteínas de unión a glucano, que incluyen glucosiltransferansas (GTF) y proteínas de unión a glucano no enzimáticas (GBP). Con ayuda de las proteínas, *S. mutans* favorece la agregación bacteriana, adhesión y producción de matriz extracelular para influir en la formación, estructura y cariogenicidad del biofilm de la placa dental (Guo, 2022).

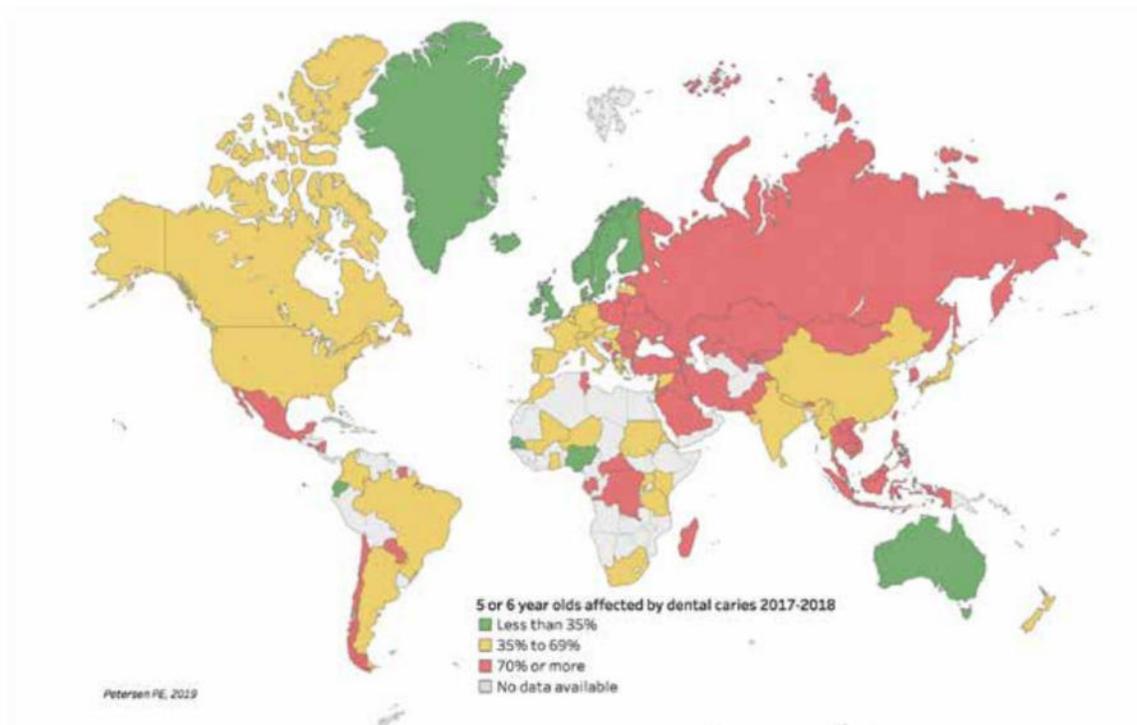
La caries dental es causada por el aumento de bacterias cariogénicas con un microbioma en disbiosis, relacionada directamente con el metabolismo de carbohidratos fermentables. Como resultado de ello, estas bacterias producen ácido láctico disminuyendo considerablemente el pH del ambiente oral (pH de 3.8), propiciando la desmineralización de las superficies dentales. Es considerada una enfermedad multifactorial donde la disbiosis del microbioma, los hábitos alimentarios y al consumo de azúcar favorecen su aparición. (Inchigolo et al, 2022).

4.2 Índice de caries infantil en el mundo

A nivel mundial, se estima que existen más de 3,500 millones de casos de enfermedades bucodentales, de las cuales, la mayoría son prevenibles. Durante las últimas tres décadas, la prevalencia de la caries dental, enfermedad periodontal y pérdida dental se ha mantenido sin cambios, siendo esta más elevada que la de cualquier otra enfermedad no transmisible (World Health Organization, 2021).

De acuerdo con la Global Burden of Disease Study (GBD, 2017), más de 530 millones de niños en todo el mundo tienen caries dental en su dentición primaria. La caries de la infancia temprana tiene una influencia significativa en los individuos, las familias y las sociedades, la misma está vinculada con otras enfermedades no transmisibles debido a factores de riesgo compartidos, como el alto consumo de azúcar y la obesidad (World Health Organization, 2019). Se ha observado también que las tasas tempranas de caries en la niñez se elevan en aquellos infantes en situaciones vulnerables como la falta de atención médica, educación y nutrición.

La dentición primaria, se completa sobre los 30 meses, y consta de 20 dientes. En muchos casos, estos dientes se mantendrán sanos, lo que contribuye a la salud y el bienestar del niño. Sin embargo, para un porcentaje de niños, estos dientes no se mantienen sanos, a veces los destruye la caries dental. Esta es una enfermedad global, no transmisible, prevenible, de interés médico, con importancia social y económica. La caries de la infancia temprana difiere de caries dental en niños mayores y adultos en su rápido desarrollo, la diversidad de los factores de riesgo y control. Como ocurre en la mayoría de las enfermedades no transmisibles, la etiología y prevención están fuertemente determinados por factores socio conductuales, económicos, ambientales y sociales (World Health Organization, 2019).



Source: Petersen PE. WHO Collaborating Centre for Community Oral Health Programme and Research, University of Copenhagen 2019.

Figura 1. Porcentaje de niños entre edades 5 y 6 afectados por la caries dental en el período 2017-2018 Fuente: Petersen PE. Centro Colaborador de la Organización Mundial de la Salud (OMS), para el Programa e Investigación de Salud Oral Comunitaria, Universidad de Copenhague 2019 (World Health Organization, 2019)

En la figura 1 se observan los porcentajes de los niños de 5 y 6 años que presentaban caries en el período de 2017 a 2018. En México, el 70% o más de estos pacientes presentaban caries dental en su dentadura primaria (Imagen recuperada de World Health Organization, 2019).

La caries dental al ser un proceso multifactorial es mediada por la presencia de una biopelícula que aloja bacterias cariogénicas, como lo es *Streptococcus mutans* cuyo metabolismo de carbohidratos da como resultados ácidos orgánicos; entre los que se encuentran el ácido láctico, propiónico, acético y fórmico (Ojeda, 2013), que favorecen la

disminución del pH de 7 a 4.2 en aproximadamente 24 horas; teniendo como consecuencia la desmineralización del esmalte.

El esmalte es un tejido duro debido a la presencia de Hidroxiapatita, siendo éste el mineral más abundante en dientes como en huesos (Ojeda, 2013). De acuerdo con los resultados del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales (SIVEPAB, 2019), diecisiete niños o adolescentes de cada veinte, en el rango de edad de 1 a 19 años, presentaron caries dental al acudir a consulta (Secretaría de Salud, 2019).

4.3 Factores predisponentes de caries dental

La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT, 2018), analizó a 9.7 millones de pacientes pediátricos de 0 a 4 años. Esta planteó que cerca del 83.3% (8 millones) de pacientes consumen bebidas no lácteas endulzadas, además el 63.3% (6.14 millones) consumen botanas, dulces y postres, el 48.6% consume cereales dulces (4.7 millones) y 35.6% (3.4 millones) consumen bebidas lácteas endulzadas en este grupo de edades. (Secretaría de Salud, 2018; Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2018; Instituto Nacional de Salud Pública, 2018).

El estado de Nuevo León (ubicado al Norte de la República Mexicana), es una referencia importante desde el punto de vista industrial, empresarial y económico del país. Según los resultados del censo de población y vivienda por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2020), el mismo cuenta con una población total de 5'784,442 habitantes, de los cuales más del 90% habita en área urbana (INEGI, 2020). Fueron registrados

1'472,351 de niños, que representan el 25% de la población de la entidad (Secretaría de Salud Nuevo León, 2016).

En una encuesta realizada por ENSANUT, el 50% de los menores de 5 años de ambos géneros, consumen un promedio diario de entre 1,177 y 2,218 calorías. El consumo de azúcares simples (fructosa, glucosa, entre otros) se encuentra al doble de la recomendación; siendo el décimo alimento con mayor porcentaje de consumo en los hogares de Nuevo León según el ENSANUT-NL 2015. Dicha encuesta también arrojó que los alimentos del grupo de los azúcares consumidos en mayor porcentaje en los hogares de la entidad son: refrescos, aguas de sabor, dulces, chocolates, jugos envasados y la gelatina o flan (Secretaría de Salud Nuevo León, 2016).

4.4 Desarrollo de la caries dental

Existen tres factores principales relacionados con el origen multifactorial de la caries dental, el huésped (higiene bucal, saliva, piezas dentales), la microflora (bacterias) y el sustrato (dieta), además del tiempo que pudiera ser considerado como el cuarto. Para la formación de la caries dental, es necesario que las condiciones de cada factor sean favorables, lo que significa un huésped susceptible, una flora oral cariogénica y un sustrato apropiado que deberá estar presente durante un período de tiempo determinado.

El paso más importante para la producción de la caries es la adhesión inicial de la bacteria a la superficie del diente. Para la colonización bacteriana, es necesaria la formación previa de

una película fina de proteínas salivales sobre la superficie dental, conocida como película adquirida (Nuñez, 2010).

La teoría de la proteólisis-quelación de Schatz y Martín, atribuye a la caries dental a 2 reacciones interrelacionadas, que ocurren al mismo tiempo: la destrucción microbiana de la matriz orgánica del diente mayormente proteínica, y la disolución de cristales de apatita por la acción de los agentes de quelación orgánicos (ácidos, aminoácidos, aminas, péptidos y glúcidos), algunos de los cuales se originan como producto de la descomposición de la matriz, otros están presentes en alimentos y la saliva (Nuñez, 2010).

4.5 Establecimiento del proceso cariogénico

Los factores de virulencia más involucrados en el desarrollo de la caries son:

- Acidogenicidad: capacidad de fermentar los azúcares de la dieta para originar principalmente ácido láctico como producto final del metabolismo
- Aciduridad: capacidad de producir un ácido en un medio con pH bajo
- Acidofilicidad: capacidad de resistir acidez del medio bombeando protones (H⁺) fuera de la célula
- Síntesis de glucanos y fructanos: a través de enzimas como glucosil y fructosiltransferasas (GTF y FTF), se producen los polímeros glucano y fructano, a partir de la sacarosa. Los glucanos insolubles ayudan a la bacteria a adherirse al diente y son utilizados como reserva de nutrientes

La desmineralización es el mecanismo fundamental para la pérdida del tejido calcificado, cuya etiología implica el ácido producido por las células clásticas o metabolismo microbiano de carbohidratos como la glucosa y sacarosa presentes en los alimentos- (Fig2).

El ácido que baña las piezas dentales disocia el componente mineral de la hidroxiapatita. Este proceso puede ser fisiológico, ambiental o patológico; es decir, las bacterias cariogénicas se nutren de la biopelícula (placa), lo cual va a mediar el proceso de la desmineralización a medida que se desarrolla.

El fluoruro forma parte de las sales del ácido fluorhídrico (HF), se encuentra de forma natural en el suelo y agua, y juega un papel importante en la fisiología del esmalte dental. Cuando hay aniones de fluoruro (F^-) en la cavidad oral, la saliva protegerá al esmalte mediante la formación de fluorapatita al entrar en contacto con el mismo. Las barras del esmalte (hidroxiapatita), tienen un mayor riesgo a desmineralizarse en contacto con los ácidos cariogénicos; propiciando cavitaciones en la superficie del esmalte. Los microorganismos patógenos presentes en la placa colonizan las superficies afectadas ($> 10 \mu m$ de profundidad), dando paso al desarrollo del agente etiológico *S. mutans*, para iniciar una lesión cariosa activa (Roberts et al, 2022).

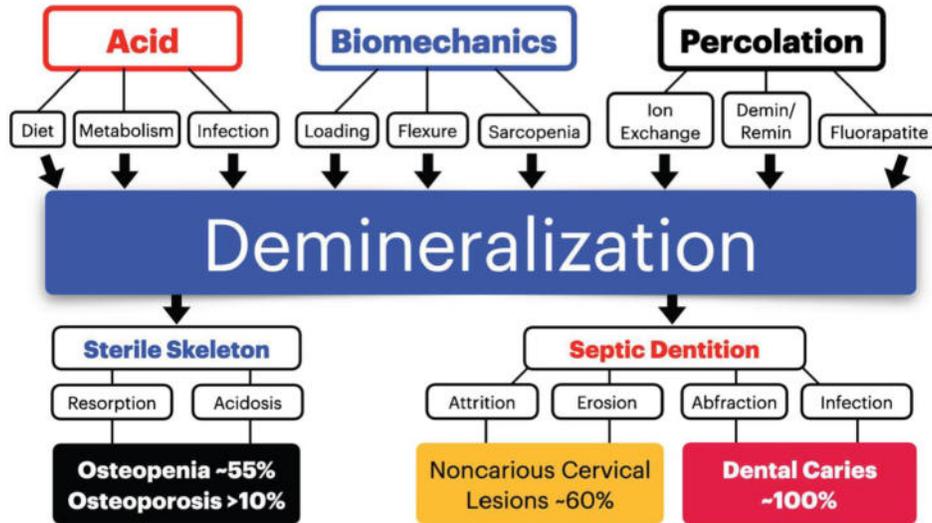


Figura 2. Diagrama de Flujo que define la etiología de la desmineralización como una combinación de ácido, biomecánica y percolación de líquido intercrystalino (Roberts et al, 2022).

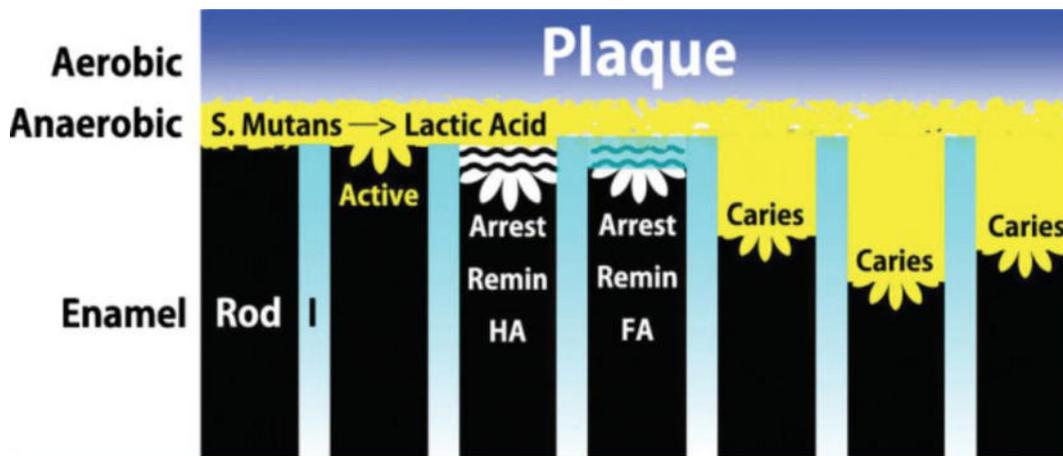


Figura 3. Esquema representativo de una superficie de esmalte recubierta de placa, la misma muestra las principales etapas de la fisiopatología del esmalte en relación con la desmineralización, la remineralización y la caries dental infecciosa (Roberts et al, 2022)

En la figura 3, se muestra la capa superficial aeróbica seguida por la capa interna anaeróbica adyacente a la superficie del esmalte. Las varillas de esmalte están separadas por una

sustancia entre varillas (I), que tiene una estructura cristalina más porosa que permite la percolación del fluoruro para producir fluorapatita (FA). Se supone que la concentración de FA (gradiente de color cian), entre los bastones, es mayor cerca de la superficie oral y disminuye con la profundidad. En condiciones anaeróbicas, *S. mutans* tiene la capacidad de producir ácido láctico que facilita la desmineralización activa. La caries progresiva desmineraliza preferentemente los bastones (prismas HA). Las varillas de esmalte negro representan las etapas de la fisiopatología de la caries (1) varilla intacta, (2) desmineralización de la superficie activa, (3) lesión detenida remineralizada con HA, (4) lesión detenida remineralizada con FA y (5–7) Infección cariosa activa (Roberts et al, 2022).

Las lesiones cariosas iniciales en esmalte son como infecciones en huesos no vitales. La lesión inicial en esmalte y cemento está respaldada por una biopelícula cargada de microbios que deben mantener una fuente extravascular de nutrición y eliminación de desechos, debido a la falta de acceso a la vascularización del huésped. Una vez que la infección invade tejido vital como la dentina, la morfología de la lesión puede ser lítica, esclerótica o una combinación de ambas. Aunque la caries dental puede estar asociada con factores mecánicos y químicos, es esencialmente una infección relacionada directamente con la higiene y la dieta (Roberts et al, 2022).

La epidemiología sugiere que *S. mutans* es la bacteria predominante y por tanto la más virulenta de la placa; su prevalencia tiene más impacto en el riesgo de caries que el consumo de azúcar y la mala higiene bucal. La caries dental es dependiente de la placa que comienza con una película proteica acelular, formada por la saliva que recubre todas las superficies orales mineralizadas. Las bacterias se adhieren a la película y forman una biopelícula que

aumenta de volumen para convertirse en placa dental con zona aeróbica superficial y una capa anaeróbica profunda en la superficie del esmalte. El aspecto más virulento del proceso de la enfermedad ocurre en el ambiente anaeróbico donde el metabolismo de *S. mutans* produce ácido láctico a través de la fermentación del azúcar de la dieta. La disminución en el pH del líquido de la placa ataca las varillas de esmalte, el cemento y la dentina expuesta. Como anaerobio facultativo, *S. mutans* produce trifosfato de adenosina (ATP) mediante respiración aeróbica si hay oxígeno presente, pero es capaz de cambiar a fermentación en ausencia de oxígeno. Si los carbohidratos fermentables se consumen regularmente, las bacterias cariogénicas pueden comprometer la estructura dental (Roberts et al, 2022).

Un ciclo complejo de desmineralización y remineralización relacionado con la dieta, da como resultado una lesión cariosa sub-superficial que se cubre con lo que parece ser una superficie de esmalte intacta. Estudios microscópicos de lesiones inducidas, han mostrado la existencia de caries en espacios llenos de placa entre 1-4 semanas de aparición. La caries intraesmalte es invisible hasta que las lesiones alcanzan una profundidad de ~400 μm . Cuando una lesión tiene una profundidad de 400 μm , el efecto de retrodispersión es suficiente para detectar de forma visible la lesión descalcificada como una mancha blanca, Fig 4 (Roberts et al, 2022).

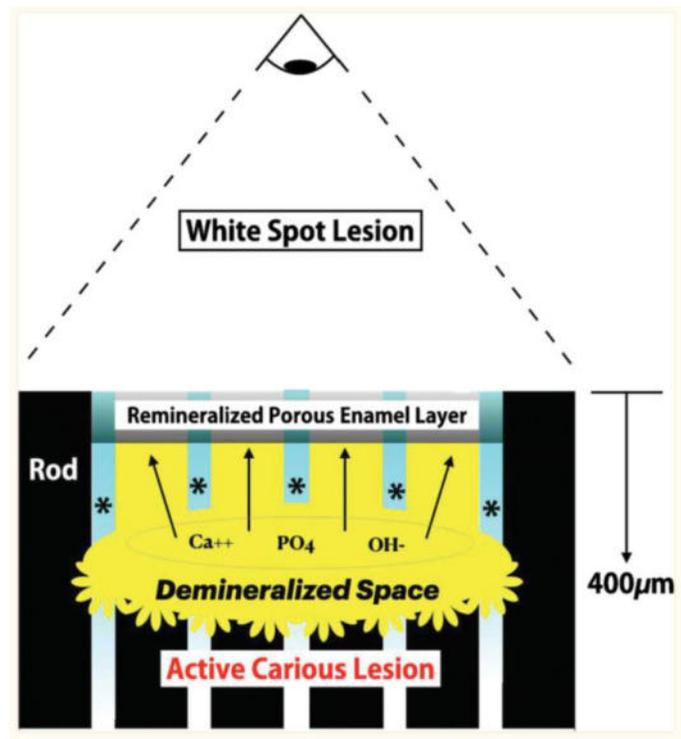


Figura 4. Diagrama demostrativo de la lesión de mancha blanca en una sección 2D, se ve desde arriba como una decoloración blanca rodeada de esmalte intacto que revela la ubicación subsuperficial de un espacio desmineralizado de más de 400 µm de profundidad (Roberts et al, 2022)

En la Figura 4, se plantea la siguiente hipótesis *la sustancia mineralizada entre varillas (asterisco), es menos susceptible a la desmineralización debido a la formación natural de ácidos grasos a través de la percolación intercrystalina*. A medida que el gradiente de fluorapatita disminuye con la profundidad, las lesiones cariosas activas progresan lateralmente y se unen para formar un espacio de desmineralización. La lesión es invisible hasta que alcanza una profundidad de ~400 µm cuando la difracción de la luz es adecuada para que el espacio desmineralizado se visualice como una mancha blanca translúcida. La evidencia sugiere que la capa de esmalte poroso remineralizado superficial es un producto del esmalte residual no destruido por la desmineralización superficial inicial que se

complementa con la remineralización a través del calcio (Ca^{++}), PO_4 y OH^- que se mueve hacia la superficie (flechas negras). La fuente de los iones para la remineralización es la destrucción de hidroxiapatita por la lesión cariosa activa en la base del espacio desmineralizado.

4.6 Aspectos económico, social, cultural y de educación

Casi todos los factores de riesgo de la caries dental son modificables. Pueden estar divididos en diferentes grupos: influencia familiar y comunitaria. Los factores más relevantes son: creencias familiares, comportamientos, alimentación infantil y la elección de alimentos complementarios como jugos, refrescos y bebidas en comidas; la capacidad, conocimiento y voluntad de comprar y proporcionar una dieta saludable para el niño. Al igual que con los factores etiológicos de la obesidad infantil, una apreciación del efecto del consumo excesivo y frecuente de azúcares (WHO, 2019).

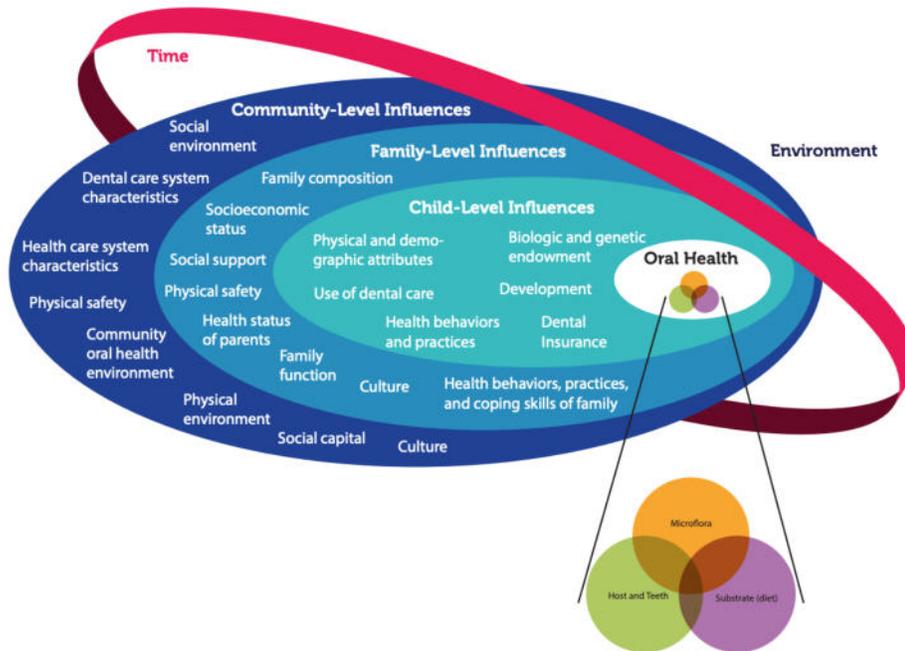


Figura 5. Concepto de la caries de la Infancia temprana: influencia de salud oral en el niño, familia y comunidad. Fuente: Fisher-Owens SA, Gansky SA, Plarr LJ, Weintraub JA, Soobader MJ, Newacheck PW. Influences on children’s oral health: a conceptual model. *Pediatrics*. 2007; 120:e510-20

4.7. Metabolismo bacteriano de biopelícula dental

Las bacterias presentes en la biopelícula dental usan como principal fuente de energía a los azúcares, mediante la ruta metabólica de la glucólisis; en la que los degradan y los usan como principal fuente de carbono fermentable. Es decir, ocurre una oxidación del azúcar para obtener energía y a su vez moléculas de piruvato o ácido pirúvico como parte de varias reacciones enzimáticas consecutivas. Los ácidos orgánicos son compuestos que la célula bacteriana secreta al exterior para evitar comprometer su supervivencia.

La remineralización representa un problema cuando sintetizan muchos ácidos, pues al entrar en contacto con las superficies minerales del diente y permanecer durante tiempo, reaccionan con la hidroxiapatita y se disuelven (Flores, 2017).

Si se sobrepasa la capacidad y protección sobre el daño en la superficie dental, se da el establecimiento de la caries dental, que, desde la perspectiva bioquímica, *es una enfermedad producida por la pérdida de balance en el metabolismo de la biopelícula.*

Los tejidos de la cavidad bucal se encuentran colonizados por más de diecinueve mil filotipos bacterianos, estas especies conforman un complejo dinámico de un sistema ecológico y simbiótico que se representa en un microbioma conformado por bacterias, arqueas, protozoarios y virus; mismos que contribuyen de manera directa o indirecta en el desarrollo normal del sistema de defensa del huésped. (Flores, 2017)

Los microorganismos de la biopelícula dental pueden contener alrededor de 20 especies rodeados por matriz extracelular de proteínas, ácidos nucleicos, y exopolisacáridos. La síntesis, concentración, carga, especificidad y naturaleza determinará la formación de la estructura tridimensional de la biopelícula; con variaciones en cuanto a grado de porosidad y densidad, lo que proporciona hábitos diversos que favorecen la biodiversidad. (Acosta, 2017)

Una matriz extracelular de exopolisacáridos producida por *S. mutans*, al encontrarse presente en dieta la sacarosa y el almidón, modula la formación de una biopelícula cariogénica, ya que el metabolismo de carbohidratos produce ácidos orgánicos disociados, que liberarán hidrogeniones próximos a la estructura dental. He aquí cuando se genera la ruptura del

balance mineral entre la biopelícula y el diente, provocando una pérdida de calcio y fosfato del esmalte.

4.8 Metabolismo de Streptococcus mutans

Streptococcus spp., es un género que representa la mayor población bacteriana de la cavidad oral. Su distribución varía según las especies como: *S. mutans* y *S. sanguis*, que normalmente suelen colonizar superficies dentales y protésicas. *S. salivarius* se encuentra presente en menor número en biopelícula. *S. mitior* localizada en toda la cavidad bucal, y *S. sanguis* aparece una vez que erupcionan los órganos dentales.

Los *Streptococcus* spp. pertenecen al *Phylum Firmicutes*, en la familia *Streptococcaceae*, bajo el orden de los *Lactobacillales*; presentan tres géneros dentro de la familia: *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Lactovum*. (Acosta, 2017)

Streptococcus mutans es una de las 79 especies de *Streptococcus* spp que se ha asociado a la etiopatogenia de la caries dental, aislado por primera vez por J. Clarke en 1924 a partir de lesiones cariosas. Su nombre se relaciona con su visualización como cocobacilo al ser aislado de un medio con pH ácido y como cocácea cuando se cultiva en un medio neutro o alcalino. Es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa, no móvil que se presenta en pares o en forma de cadena; usa a los carbohidratos fermentables como energía y carbono, tales como son la glucosa, sacarosa, lactosa, manitol e inulina, entre otros, produciendo ácidos láctico, propiónico, acético y fórmico. (Acosta, 2017)

Se ha demostrado que el ácido láctico en condiciones controladas *in vitro* modifica un medio de pH 7 a pH 4,2 en el transcurso de 24 horas. El metabolismo de los carbohidratos fermentables de *S. mutans*, ha sido relacionado con varios factores de virulencia, como son la actividad de exoenzimas bacterianas generadoras de exopolisacáridos, como con la glucosiltransferasas (GTFs), productora de glucanos insolubles y solubles; la fructosiltransferasa (FTFs), que libera fructosa, produciendo fructanos, principalmente inulina y glucosa. Estas contribuyen de forma determinante a la conformación de la matriz celular y modular a la coagregación de microorganismos. Los glucanos insolubles producidos por las GTFs son esenciales en la estructura tridimensional y microambiente de pH que se localiza en la biopelícula cariogénica.

Existen otras enzimas con actividad extracelular, como la invertasa (α -glucosidasa), que hidroliza enlaces entre sacarosa, pulanasa y endodextranasa extracelular, lo cual va a dar como resultado monosacáridos, disacáridos o trisacáridos disponibles para su transportación en el interior de la bacteria; mediado por fosfoenolpiruvato, transporte dependiente de una proteína de unión o sistema múltiple del metabolismo de azúcares.

La glucosa intracelular se incorpora a través de los ácidos generados liberados al medio extracelular por translocación de protones y bombeados al exterior de la bacteria por la, lo que provoca un gradiente transmembrana con la suficiente fuerza para transportar el ATPasa sintetasa ácido láctico fuera de la célula hacia la matriz extracelular. Al acumularse el ácido, se establece una disminución del pH del microambiente. Esta función de la H^+ /ATPasa es relacionada con la característica acidogénica de *S. mutans* y la desmineralización del esmalte (Acosta, 2017).

4.8.1 Curvas de Crecimiento

Las curvas de crecimiento proporcionan información valiosa acerca del comportamiento o de la cinética de crecimiento bacteriano y la fisiología celular. Permiten determinar la forma en la que las bacterias responden en condiciones de crecimiento variables incluyendo la variación de sustratos como fuente de carbono, así como definir los parámetros óptimos deseados para el crecimiento de una bacteria determinada. Este tipo de curvas progresan a través de cuatro etapas de crecimiento: retraso, exponencial, estacionario y muerte (Talaro et al, 2021) (Madigan, 2017).

Fase de retraso (lag) es el período de tiempo que tardará la bacteria en alcanzar un estado fisiológico capaz de crecimiento celular rápido y división. La fase exponencial es la etapa de crecimiento y división celular más rápida en la cual ocurre replicación del ADN, transcripción del ARN y la producción de proteínas se producen a un ritmo constante y rápido. En la fase estacionaria ocurre una ralentización y meseta del crecimiento bacteriano debido a la limitación de nutrientes o acumulación intermedia tóxica. La fase de muerte será la que la lisis celular produce por una limitación severa de nutrientes (Zhu et al, 2022).

4.9 Azúcares Reductores

Un **azúcar reductor** es un carbohidrato que contiene un grupo funcional aldehído (-CHO) o cetona (-C=O) libre, que puede ser oxidado a un ácido carboxílico, lo que le permite actuar como un agente reductor en reacciones químicas. Este grupo reactivo es capaz de donar electrones a otros compuestos, como en la reacción con un ion metálico, facilitando su reducción.

En los azúcares reductores, el carbono anomérico, que en la estructura cíclica está unido al oxígeno, está libre y puede abrirse para formar un grupo aldehído o cetona, que es el responsable de la actividad reductora (Berg et al, 2015).

Los azúcares, también conocidos como hidratos de carbono (macronutrientes esenciales), se encuentran naturalmente en frutas, verduras, productos lácteos y granos enteros. Dichos carbohidratos de la dieta se clasifican como monosacáridos (moléculas individuales del azúcar), disacáridos (dos moléculas enlazadas entre sí), y polisacáridos (que son cadenas largas de moléculas de azúcar). Los monosacáridos incluyen la glucosa, galactosa y fructosa, siendo todos azúcares reductores (Khalid, 2022).

Los azúcares reductores poseen su grupo carbonilo intacto y pueden reaccionar como reductores con otras moléculas.

Los azúcares que dan resultados positivos con las soluciones de Tollens, Benedict o Fehling se conocen como reductores, y todos los carbohidratos que contienen un grupo hemiacetal dan pruebas positivas. Los carbohidratos que solo contienen grupo acetal, no dan pruebas positivas con estas soluciones, por lo tanto, son azúcares no reductores.

Los azúcares reductores provocan una alteración en los grupos aminos de las proteínas mediante la reacción de glucosilación no enzimática o glicación, mejor conocida como la Reacción de Maillard. Esta se produce en varias etapas: las iniciales son reversibles y se producen en tiempos cortos, mientras que las posteriores son más lentas e irreversibles. Se

postula que tanto las etapas iniciales como las finales de la glucosilación están implicadas en los procesos de envejecimiento celular.

La glucosa es el azúcar reductor con mayor abundancia en el organismo. Su concentración en sangre está unida al mecanismo de regulación de individuos sanos, y en personas con diabetes, aumenta sustancialmente. Esto conlleva a que sea el azúcar reductor, generalmente considerado en las reacciones de glucosilación no enzimática de interés biológico.

4.9.1 Azúcares

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, los azúcares incluyen monosacáridos, disacáridos, polioles y azúcares libres, de los cuales, los últimos son identificados como todos los monosacáridos y disacáridos añadidos a alimentos por parte del fabricante, cocinero o consumidor. Así como los azúcares presentes naturalmente en la miel, jarabes y jugos de frutas. Las Guías Alimentarias para los estadounidenses ha propuesto otro grupo importante de este carbohidrato, los *azúcares añadidos*, que son todos los monosacáridos y disacáridos utilizados en alimentos y bebidas procesados y preparados no naturalmente. (Singh et al, 2015).

Tabla 1. Clasificación de azúcares presentes en la dieta

Clase	Principales Componentes
Monosacáridos	Glucosa, fructosa, galactosa
Disacáridos	Sacarosa, lactosa, maltosa, trehalosa

Polioles	Sorbitol, manitol, lactitol, xylitol, isomaltosa, maltitol
Azúcares Libres	Son todos los monosacáridos y disacáridos agregados a los alimentos por el fabricante, cocinero o consumidor. Azúcares presentes naturalmente en la miel, jarabes y jugos de frutas
Azúcares Añadidos	Todos los monosacáridos y disacáridos utilizados en alimentos y bebidas procesadas y preparadas; azúcares añadidos a los alimentos, pero que no son naturales, como los de las frutas y zumos.

Actualmente, numerosos estudios se centran en las bebidas azucaradas siendo el origen de efectos adversos en la salud humana. Las bebidas azucaradas son la principal fuente de azúcares añadidos, incluidos los refrescos carbonatados y no carbonatados, bebidas frutales y energéticas; un gran consumo por parte de la población.

El consumo de bebidas azucaradas está disminuyendo en muchos países desarrollados aunque los niveles de consumo siguen siendo altos. Caso contrario de los países en desarrollo, donde los niveles de consumo siguen al alza debido a una mayor disponibilidad ligada al desarrollo económico (Huang et al, 2023). Los datos de la Encuesta Nacional de Examen de Salud y Nutrición (NHANES), mostraron que en el período 2009-2010, el consumo de bebidas azucaradas contribuyó con el 8% y el 6,9% de la ingesta diaria de energía entre niños/adolescentes y adultos, respectivamente en Estados Unidos. En 2010, una encuesta mundial realizada por Nutrition and Chronic Diseases Expert Group (NutriCoDE) informó, que un total de 180,000 muertes asociadas a la adiposidad podrían atribuirse al consumo de bebidas azucaradas. Estos hallazgos promueven el desarrollo de políticas en todo el mundo

para limitar el consumo de azúcar, incluidos impuestos sobre el azúcar, leyes de etiquetado de alimentos y restricciones de publicidad y marketing (Huang et al, 2023). Se recomienda reducir el consumo de azúcares libres o añadidos a menos de 10% de la ingesta energética diaria total (Singh et al, 2015). De aquí, la implementación en México de sellos frontales en el etiquetado de alimentos y bebidas, esto como parte de la aprobación de la modificación de la NOM-051-SCFI/SSA1-2010, misma que entró en vigor el 01 de octubre de 2020.

Los sellos de advertencia en productos con excesivo contenido calórico, azúcar, sodio, grasas saturadas y grasas trans utilizados en el etiquetado se basan en el perfil de nutrientes de la Organización Panamericana de la Salud (OPS, 2020) para la clasificación de alimentos y bebidas con niveles excesivos de nutrientes críticos para la salud. Esta advertencia es una consecuencia al incremento en enfermedades no transmisibles como la hipertensión, diabetes, infartos, cánceres (Garza-Juárez et al 2023). Y desde el punto de vista odontológico, también es una advertencia en el desarrollo de la caries dental desde edades tempranas (Berger et al, 2021).

4.9.2 Azúcar añadido y caries dental en niños

El exceso de azúcares añadidos, en forma de bebidas azucaradas, causa la caries en pacientes pediátricos. Si bien la ingesta de azúcar agregada tiene sus raíces en factores socioculturales relacionados con el patrón de consumo; actualmente se encuentran disponibles algunas estrategias en este ámbito, pero falta mucho por hacer

- Determinantes sociodemográficos

1. **La edad.** Según datos recopilados de NHANES de 2011 y 2012, para niños menores de 18 años con datos completos acerca del consumo de azúcar añadido y caries dental; el consumo de azúcar añadido aumenta con la edad. La ingesta de azúcar añadido osciló entre 3,5 gramos por día para niños menores de 1 año y 102,1 gramos por día para niños de 18 años (Chi, 2019).
2. **La raza y origen étnico.** La ingesta de azúcar agregada fue mayor en niños blancos no hispanos menores de 18 años (80,3 gramos) en comparación con hispanos (65,4 gramos).
3. **El ingreso.** La relación entre los ingresos y el consumo de azúcar añadido es curvilínea, aumenta desde los hogares de menores ingresos y luego disminuye entre los niños de hogares con mayor ingreso económico (Chi, 2019).
4. **El estatus de seguro médico,** un indicador también relacionado con el ingreso. Investigaciones sugieren que la ingesta de azúcar añadido es mayor en niños sin seguro médico, más baja en niños con seguro público e intermedia en los niños con seguro privado.

- **Determinantes de Comportamiento**

Se pueden dividir en tres categorías.

1. **La fuente de azúcar agregando.** Bases de datos sugieren que las bebidas carbonatadas, energéticas y deportivas fueron la principal fuente (13% - 27%), seguida de postres a base de cereales (8,7%), bebidas de frutas (9,6%), cereales listos para el consumo (5,8%) y dulces (5,7%) en niños de 6 a 12 años (Tan et al, 2020;) (Huang et al, 2023). En otro estudio basado en datos de NHANES 2009-2012, las

bebidas endulzadas con azúcar (carbonatadas, frutales, deportivas y energéticas, sin incluir jugos 100% de frutas), fueron la fuente más común de azúcares agregados para niños de 2 años; dos tercios de la muestra consumían al menos una porción de bebida azucarada por día, y el 7,3% del total de calorías diarias provenían de bebidas azucaradas.

2. **Las creencias y prácticas de los padres.** Datos de encuestas previas revelan la creencia de los padres de que las bebidas de frutas naturales son saludables, ignorando el significado de los azúcares contenidos y añadidos adicionales a las bebidas y el impacto en la salud de sus hijos. Por otra parte, la mercadotecnia de las empresas de bebidas azucaradas y gaseosas, en conjunto con la actitud de los adultos, de que los refrescos son placenteros, buenos, convenientes y de buena relación calidad-precio; se asocian con una mayor ingesta.
3. **La demanda infantil.** La ingesta de bebidas azucaradas por los padres se asocia con la de sus hijos. Por el contrario, se ha encontrado que un alto control conductual por parte de los padres hacia los hijos se asocia con una menor ingesta de bebidas azucaradas. Sin embargo, la posible restricción de los dulces llevó a que el deseo se mantuviera elevado (Chi, 2019).

4.10 Azúcares añadidos y sus efectos en la salud

La evidencia emergente sugiere que la ingesta excesiva de azúcar en la dieta está asociada además de la obesidad, diabetes tipo II y las enfermedades cardiovasculares, con alteraciones del funcionamiento cerebral y conductual, conlleva desde una autorregulación deficiente de

la ingesta alimentaria, hasta el deterioro de capacidades cognitivas, observada en humanos desde la infancia temprana (Berger et al, 2021).

Incluso, estudios sugieren que el consumo materno de bebidas azucaradas elaboradas con jarabe de maíz de alta fructosa aumenta el contenido de fructosa en la leche materna durante la lactancia temprana, lo cual se asocia de manera inversa con el rendimiento cognitivo del niño a los dos años (Berger et al, 2021). Si bien estos datos sugieren que, la ingesta de azúcar durante la lactancia puede representar patrones de consumo persistentes desde el momento del embarazo.

El consumo de azúcar de forma crónica se ha identificado como un posible contribuyente a las condiciones de salud mental, como ansiedad, depresión y deterioro cognitivo en adolescentes y adultos, sin embargo, aunque son limitados, los datos actuales sugieren que las madres que consumen azúcar agregada durante el embarazo tienen hijos con puntajes más bajos en las pruebas de inteligencia; siendo más perjudicial el consumo durante el segundo trimestre (Berger et al, 2020).

La toma de decisiones, planificación, autorregulación, regulación emocional y la capacidad de atención, son mediadas y facilitadas por el cerebro ejecutivo. A pesar de la evidencia científica sobre la relación entre los factores nutricionales y la función ejecutiva cerebral, existe muy poca información acerca de los patrones de dieta y la capacidad cognitiva superior (Laugero et al, 2023). Estos hallazgos pueden sugerirse en las recomendaciones nutricionales para las madres durante el embarazo y lactancia, con el fin de diseñar intervenciones nutricionales para optimizar el desarrollo de las capacidades cognitivas en la infancia.

5. Métodos

5.1 Descripción de procedimientos.

5.1.1 Conservación y Cultivo de *Streptococcus mutans*

Las condiciones de cultivo y crecimiento de la cepa *Streptococcus mutans* UA130 (ATCC 700611) están basadas en la ficha técnica de la *American Type Culture Collection* (ATCC, Rocville, AD). La bacteria se conservó en una solución de 0.9% de Cloruro de Sodio y 30% de glicerol, para su criopreservación a -80°C (Ultracongelador Thermo Revco, Thermofisher).

Previo a cualquier ensayo, la bacteria es reactivada en caldo Tripticaseína de Soya (TS) en un lapso de 24 hr a 37 °C (Incubadora Lab-Line, Thermo Scientific, Marietta, OH). Posteriormente, se centrifuga 10 min, 4000 rpm a 24 °C para separar la biomasa, el sobrenadante es desechado y la biomasa se lava con solución salina estéril (0.9% de NaCl) para eliminar los residuos generados durante el crecimiento, por centrifugación a las mismas condiciones antes mencionadas. La biomasa de *S. mutans* se siembra sobre agar TS (30 g/L Difco) en cajas Petri y se incuba 48-72 h a 37 °C para propagar el crecimiento. La bacteria está lista para usarse en los ensayos, en donde un cultivo base con caldo Infusión Cerebro es cultivado (ICC-20 g/L, ambos de BD Bioxon, Becton-Dickinson &Co).

Todos los medios de cultivo, soluciones y material consumible para los ensayos son previamente esterilizados 15 min a 120 °C y 20 Lb de presión (All American, Hillsville, USA). El cultivo es efectuado en 100 mL de caldo contenido en un matraz Erlenmeyer de

200 mL, e inoculado a una Densidad Óptica (DO) de 0.2-0.5 en la escala de McFarland (0.2), a una longitud de onda de 600 nm (Espectrofotómetro SmartSpec™ Plus; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), sea $1.45 \times 10^8 \pm 0.05$ células/mL. El inóculo es incubado por 24 h a 37 °C. La manipulación de la bacteria, y medios de cultivo estériles se realiza dentro de una Cabina de Bioseguridad clase II (Tipo 2a, Labconco), la cual es previamente desinfectada con alcohol al 70% apoyado de una gasa estéril, y expuesta la luz ultravioleta (UV) por 15 minutos. Al momento de exponer la luz UV se expone también el material, soluciones y medios de cultivo a usarse en el ensayo, para asegurar una completa asepsia de trabajo.

5.1.2 Cinética de crecimiento

Se comienza con de 100 mL de caldo enriquecido (TS) contenido en un matraz Erlenmeyer de 200 mL, el cual es inoculado con 1.5×10^8 células/mL ($DO_{600nm}=0.2$ en la Escala de McFarland) de *S. mutans UA130* activada previamente (Baca Castañón et al, 2015). Se somete a incubar a 37 °C sin agitación, y después de 5 minutos transcurridos para que la bacteria se adapte a las condiciones de cultivo, se toma una primera muestra de 3.5 mL y se vierte en un tubo falcon de 15 mL estéril y se dispone a medir los parámetros como sigue:

- (a) 500 µL de muestra serán dispuestos en una celda para Espectrofotómetro (SmartSpec 3000, BioRad) y se anotará el valor obtenido de la Absorbancia_{600nm} y su equivalente en concentración celular (expresado en células/mL).
- (b) 1.5 mL utilizados para medir el pH con un potenciómetro (PC820 Kit, Apera).
- (c) 1.5 mL para evaluar la concentración de azúcares reductores (mg/mL).

Los valores obtenidos de **a**, **b**, **c** y **d** en esta primera toma de muestra se establecieron como el “tiempo 0”. De manera subsecuente se tomarán muestras cada hora hasta cumplidas 8 horas de incubación, o hasta que se establezca la fase estacionaria de crecimiento. Los datos obtenidos de los parámetros medidos se vaciarán en una hoja de Excel (ver ejemplo Tabla 1), para luego realizar un análisis estadístico.

El mismo procedimiento se aplicó para las cinéticas de crecimiento en donde en el cultivo de *S. mutans UA130* incluyó 1% de bebida azucarada prevista en este estudio: Refresco de Cola (normal), Jugo de fruta de Mango, formula láctea etapa 3, Jugo de Manzana sin azúcares añadidos, yogurt bebible de fresa, y leche saborizada de chocolate.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

5.1.3 Concentración de azúcares reductores

La cuantificación de azúcares reductores por el método del Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), es considerado el más adecuado para identificar el contenido en muestras de biomasa hidrolizada, fermentación, industria azucarera y laboratorios de biotecnología (Zohri et al, 2018). La cuantificación de DNS incluye el procedimiento Miller en la adición de fenol y sal Rochelle.

Se tomaron 3 mL de una solución de glucosa (como referencia de control) preparada en un rango de 0.1 a 0.5 mg/mL y se mezclaron con 3 mL del reactivo DNS (1 g de DNS disuelto en 100 mL de hidróxido de sodio-1% que contiene 0.2 g de fenol y 0.05 gr de bisulfito de sodio). La mezcla de reacción fue calentada a 90°C por 15 minutos en baño de agua. Posteriormente se añadió 1 mL de Tartrato de sodio y potasio al 40% y se dejó enfriar.

Finalmente se midió la Absorbancia a una longitud de onda (λ) de 540nm. Con las lecturas de cada una de las concentraciones de glucosa, se realizó la curva de calibración en Excel, para posteriormente hallar la ecuación matemática que permitió determinar el contenido de azúcares reductores presentes en cada una de las muestras tomadas durante las curvas de crecimiento de *S. mutans* en presencia de 1% de bebida azucarada comercial y sin la presencia de esta. El resultado esperado fue una reducción en el contenido de azúcares reductores, en consecuencia, de la degradación del sustrato por la bacteria cariogénica para obtener la energía requerida para su crecimiento, el pH se vio afectado como parte de la fermentación del azúcar y producción de ácido. Mediante una “línea de tendencia”, se calculó la concentración de azúcares reductores en cada muestra.

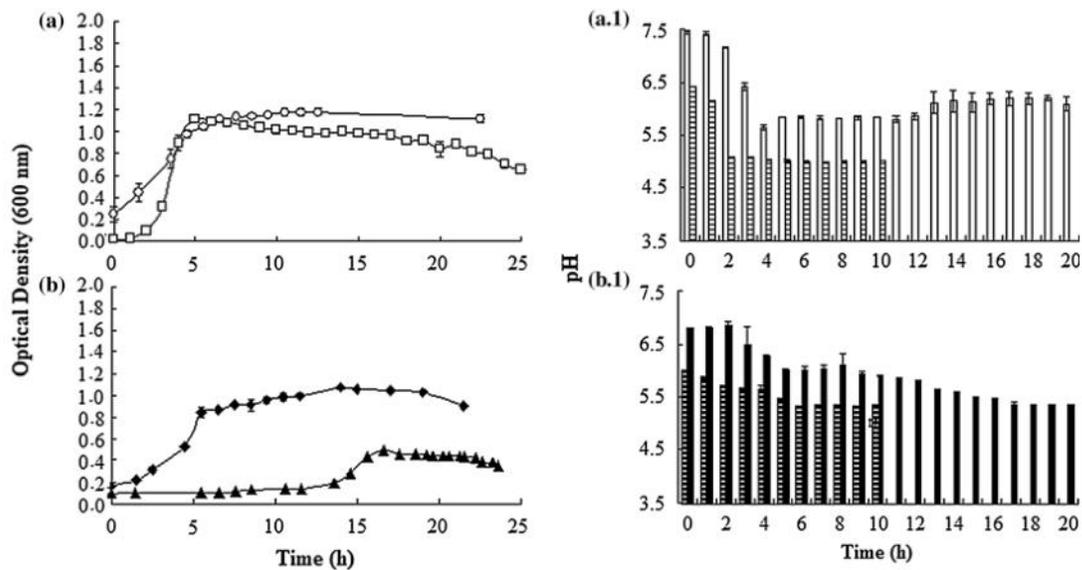


Fig. 2 Growth kinetics and pH values (represented in bar) of oral pathogenic bacteria in dental caries (a, a.1): *S. gordonii* (open circle, striped bar) and *S. mutans* (open square, open bar), and periodontal

disease (b, b.1): *A. naestlundii* (filled triangle, filled bar) and *T. forsythia* (filled diamond, filled striped bar)

Figura 6. Ejemplo de cinéticas de crecimiento con Gráficas tomadas de artículo publicado por Baca-Castañón et al, (2015)

Tabla 2. Bebidas Azucaradas de consumo frecuente en niños

Nombre de Bebida	Ingredientes	Edad de uso
<p>Refresco de Cola Regular 600 ml</p>	<p>Agua carbonatada, azúcares añadidos (azúcar 63 gr; jarabe de alta fructosa, color caramelo clase IV, ácido fosfórico, saborizantes, sucralosa (4.4mg).</p>	
<p>Jugo sabor mango</p>	<p>Agua, azúcares añadidos (36 gr) (pulpa de mango de concentrado (20%), jarabe de maíz de alta fructosa, ácido cítrico y ácido ascórbico.</p>	
<p>Fórmula láctea infantil Etapa 3</p>	<p>Leche descremada, Maltodextrina, Aceites vegetales (oleína de palma, canola y girasol), Lactosa (mg), Proteína de suero de leche de vaca, Citrato de calcio, Lecitina de soja, Ácido graso poliinsaturado de cadena larga (DHA), cultivos Bífidos y Lactobacillus, Nucleótidos (AMP, UMP, CMP, GMP), Vitaminas, (A, D, E, K, B1, B2, Niacina, B6, Ácido Fólico, Acido Pantoténico, B12, Biotina, Taurina,</p>	<p>Fórmula de continuación para niños desde 1 y hasta 3 años.</p>

	<p>Yoduro de Potasio), Sulfato ferroso, Sulfato de zinc, Sulfato de cobre.</p> <p>“Contiene: leche, derivados: de leche y de soja”.</p>	
Yogurt bebible de fresa	<p>Leche pasteurizada desnatada, azúcar, puré de fresa (6%), nata pasteurizada, leche en polvo desnatada, almidón de arroz, sales de calcio, aromas naturales, zumos concentrados de zanahoria negra y limón, fermentos lácticos y vitamina D. Origen de la leche: España. Puede contener cereales con gluten y semillas de sésamo.</p>	
Leche saborizada de chocolate	<p>Leche Parcialmente Descremada, Azúcares Añadidos mg (Azúcar), Cocoa (1%), Saborizantes Naturales, Celulosa Microcristalina, Carragenina, Carboximetilcelulosa, Sal Yodada, Canela Y Vitaminas (A Y D).</p>	
Jugo sabor Manzana sin azúcares añadidos	<p>Agua, jugo de manzana concentrado reconstituido</p>	

5.2 Análisis estadístico.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado para posteriormente obtener valores promedio con desviación estándar (DE) y realizar gráficas en forma de curvas o histogramas. Para el análisis estadístico según las características del estudio y el tipo de muestras, se utilizó la prueba de ANOVA. Para cada grupo experimental considerado se calculó un coeficiente de correlación de Pearson entre las unidades de absorbancia y pH, para verificar si las respuestas de estas variables están correlacionadas. Se utilizó el nivel de significancia de 5%, por lo cual un resultado se consideró estadísticamente significativo, siempre que $p \leq 0,05$. Los datos fueron procesados utilizando programa estadístico Prism Graph Pad, bajo ambiente Apple, versión Air 2020.

6. Resultados

6.1 Curvas de Crecimiento de Streptococcus mutans UA130

En general, el crecimiento bacteriano más elevado se observó en el grupo de productos lácteos como se muestra en la Figura 7, destacándose la fórmula infantil con el mayor crecimiento, seguida de la leche saborizada de chocolate, y en tercer lugar el yogurt bebible de fresa. La fase de latencia (lag) fue muy breve de apenas 1 hora posterior a la inoculación de *S. mutans*. La fase exponencial de crecimiento se observó entre las 2-4 horas para el grupo de bebidas azucaradas, con la excepción del jugo de manzana sin azúcares añadidos, que mantuvo su fase de crecimiento exponencial hasta las 5 horas. La fase estacionaria duró tres horas, observándose una meseta. En el caso del jugo de manzana, esta fase duró unas 2 horas, seguido de una aparente continuación de la fase exponencial de crecimiento a las 7 horas. Para los cultivos de *S. mutans* suplementados con cualquiera de las tres bebidas lácteas, la fase exponencial se presentó a partir de las 2 horas de inoculación y concluyó a las 5 horas. Finalmente se presentó una meseta estacionaria de dos horas antes de comenzar la fase de muerte celular.

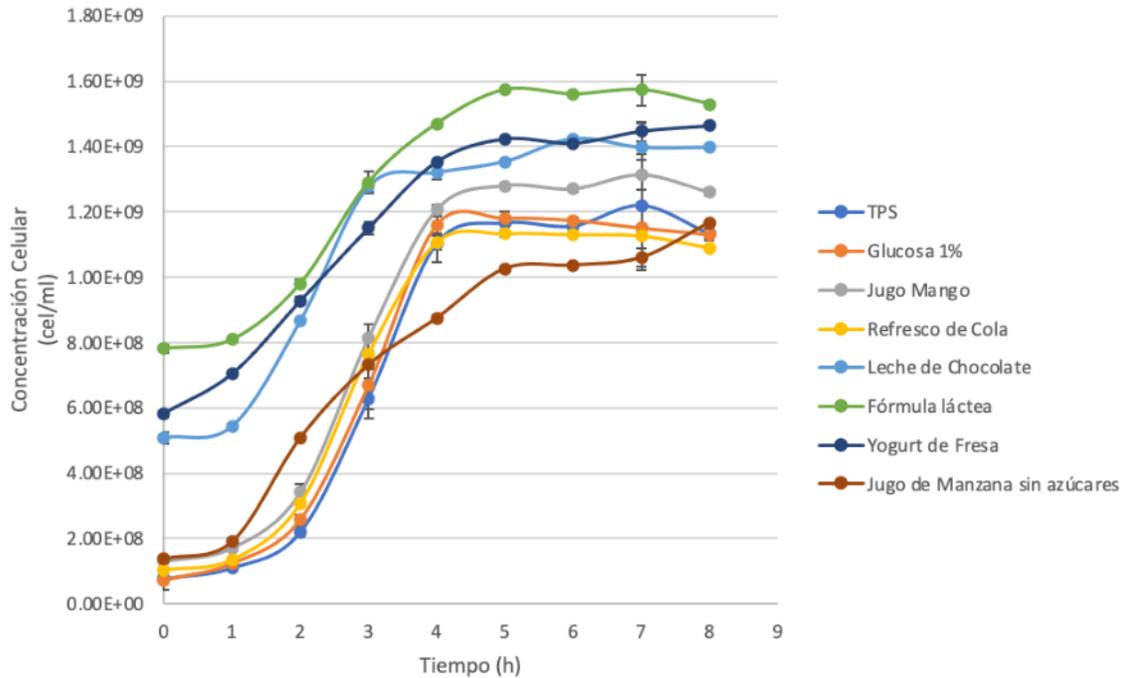


Figura 7. Cinéticas de crecimiento de *S. mutans* cultivada en Trypticaseína de soya como control de referencia (◆), y en caldo TS suplementado con 1% de fuente de carbono como: glucosa al 1% (◊), jugo sabor mango (◊), refresco de cola (◆), jugo sin azúcares añadidos sabor manzana (◆), fórmula infantil (◆), leche saborizada de chocolate (◆) y yogurt bebible sabor fresa (◆).

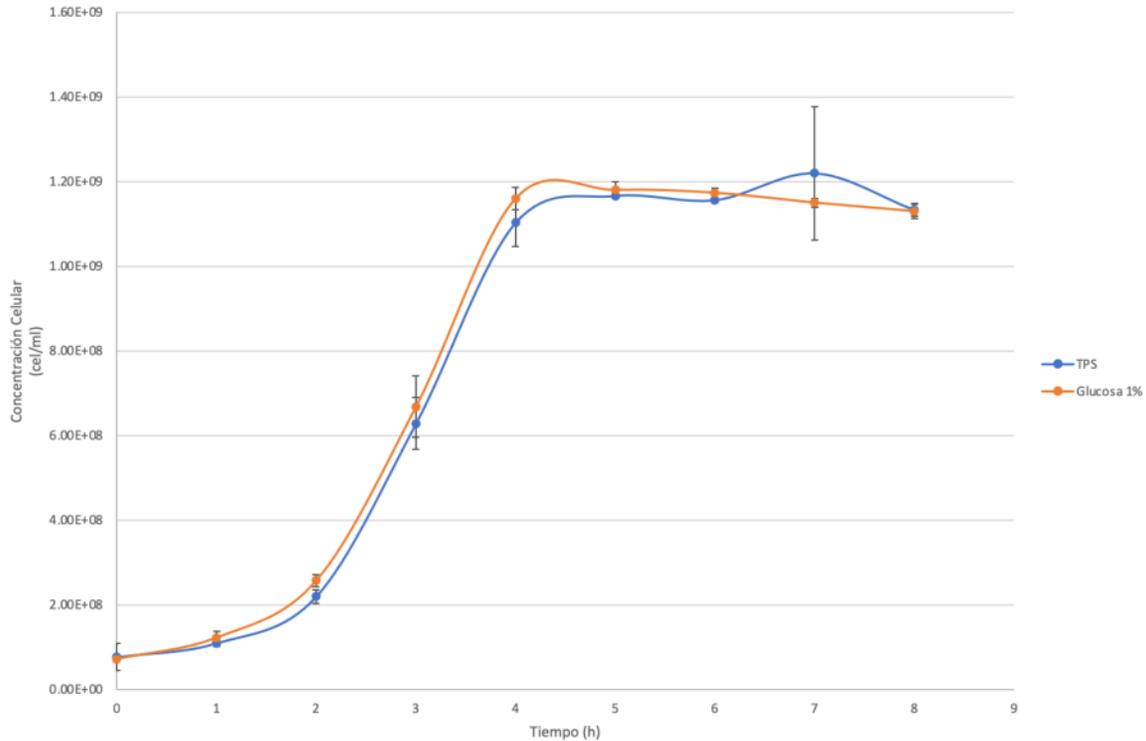


Figura 8. Cinética de Crecimiento de *Streptococcus mutans* UA130 en caldo de Tripticaseína de Soya (TS) como referencia de crecimiento habitual (◆), y en caldo TS suplementado con Glucosa 1% (◆).

Para evaluar el comportamiento de *Streptococcus mutans* UA130 como bacteria patógena etiológica de la caries dental en presencia de distintas fuentes de carbono o azúcares que contienen productos comerciales de consumo cotidiano en la población infantil en México, se fijó el crecimiento de *S. mutans* en un caldo nutritivo de Tripticaseína de Soya (TS), el cual estuvo formulado desde su adquisición, con ingredientes que estimulan el crecimiento, tomándose como un cultivo de referencia para poder comparar su proliferación.

En un primer tiempo, la bacteria *S. mutans* denota una adaptación rápida al caldo TS, de apenas 1 h (ver Figura 8), teniendo un crecimiento exponencial a partir de las 2 h de incubación y hasta

las 4 h cuando alcanza el máximo crecimiento logarítmico promedio y una desviación estándar correspondiente a $1.10 \times 10^9 \pm 5.69 \times 10^7$ células/mL; seguida de un mantenimiento bacteriano que evidencía la fase estacionaria, con un ligero incremento bacteriano a las 7 h. Cuando al caldo TS se le agrega 1% de glucosa adicional al que ya contiene, el comportamiento de *S. mutans* es el mismo alcanzando una fase logarítmica exponencial de $1.16 \times 10^9 \pm 2.65 \times 10^7$ células/mL. Posterior a este evento, las células de *S. mutans* se mantienen viables.

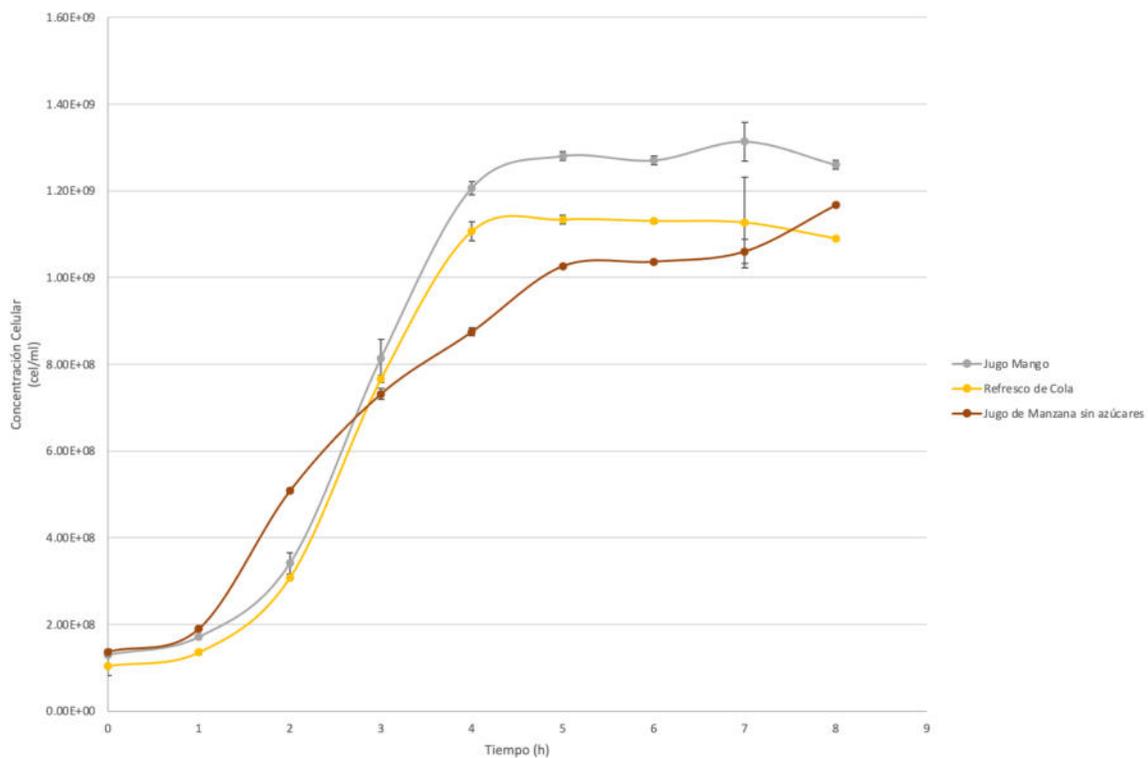


Figura 9. Cinética de Crecimiento de cultivos de *Streptococcus mutans* UA130 en caldo de Tripticaseína de Soya (TS) suplementado con 1% de bebida azucarada: jugo sabor mango (■), refresco de cola (◆) y jugo sin azúcares añadidos sabor manzana (●).

Con respecto a los cultivos de *S. mutans* en caldo TS suplementados con 1% de bebida comercial azucarada, la tendencia en el desarrollo bacteriano (Figura 9) fue similar en la fase de adaptación a 1 h, a excepción del jugo de manzana que no presentó y la fase exponencial de crecimiento fue inmediata desde el inicio del proceso de incubación, alcanzando su máximo crecimiento logarítmico a las 5 h con una concentración celular promedio de $1.03 \times 10^9 \pm 4.09 \times 10^7$ células/mL; después de 2 horas de una fase estacionaria, se reanudó la multiplicación bacteriana alcanzando $1.17 \times 10^9 \pm 1.50 \times 10^8$ células/mL.

En los cultivos con 1% de jugo de mango Jumex y Coca Cola, la fase logarítmica de crecimiento se obtuvo en 4 h alcanzando una concentración celular promedio de $1.21 \times 10^9 \pm 1.53 \times 10^7$ y $1.11 \times 10^9 \pm 1.15 \times 10^7$ células/mL, respectivamente. La fase estacionaria para ambos cultivos fue relativamente estable hasta las 7 h de incubación, antes de iniciar un declive celular.

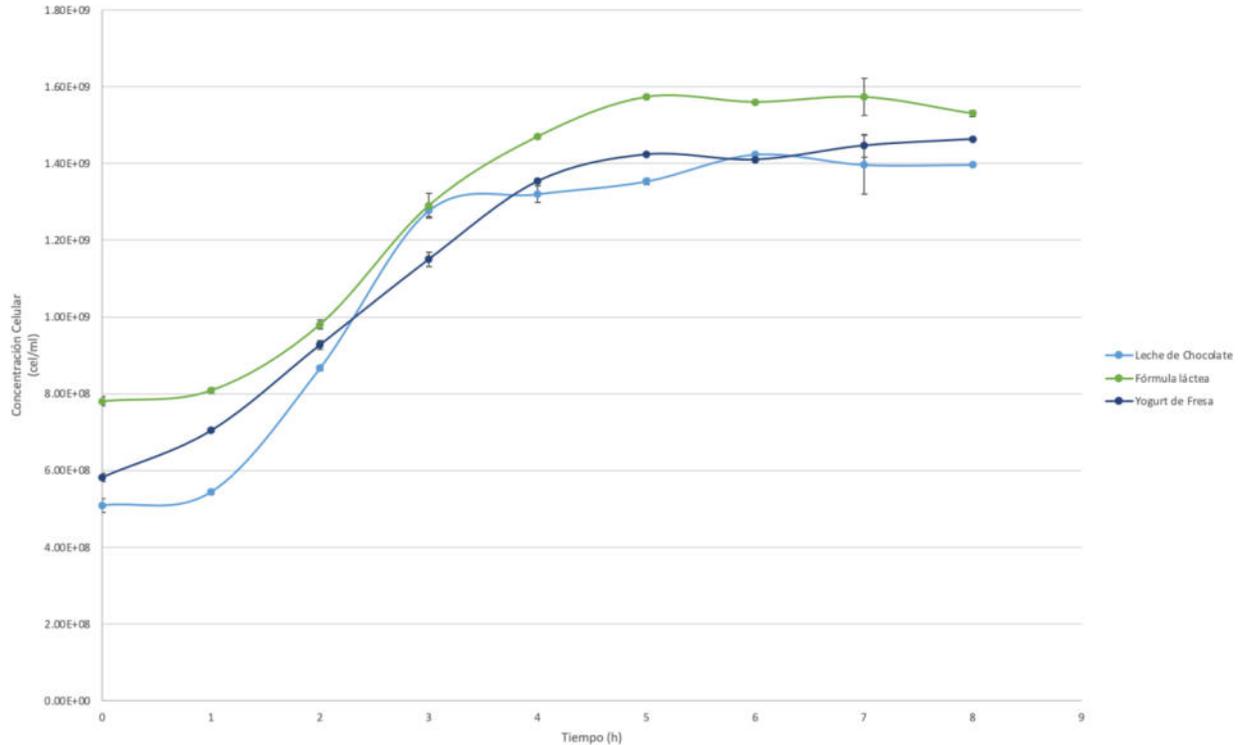


Figura 10. Cinética de Crecimiento de cultivos de *Streptococcus mutans* UA130 en caldo de Tripticaseína de Soya (TS) suplementado con 1% de bebida láctea: fórmula infantil (◆), leche saborizada de chocolate (●) y yogurt bebible sabor fresa (♦).

Las bebidas lácteas en las cuales coincide una ausencia de la fase de adaptación y un crecimiento inmediato, tal y como se observa en la Figura 11. En primer lugar, el cultivo de *S. mutans* en presencia de 1% de la fórmula infantil presentó una fase logarítmica exponencial en las 5 horas inmediatas a la incubación, alcanzando una población bacteriana promedio de $1.57 \times 10^9 \pm 2.31 \times 10^7$ células/mL, seguida de la leche sabor chocolate con $1.42 \times 10^9 \pm 2.08 \times 10^7$ células/mL y en tercer lugar el yogurt bebible sabor fresa con $1.29 \times 10^9 \pm 3.06 \times 10^7$ células/mL en 5 h y 3 h respectivamente. Posterior a este tiempo, se observó una tendencia estable en fase estacionaria hasta las 8 h que se detuvo la incubación para el cultivo con leche saborizada de chocolate. Mientras que, para el cultivo con la fórmula láctea, tras 7 h de incubación inició un declive

celular, la fase de muerte. Finalmente, en el cultivo de *S. mutans* en presencia de yogurt bebible de fresa se observó una tendencia leve a multiplicar la población bacteriana.

6.2 pH

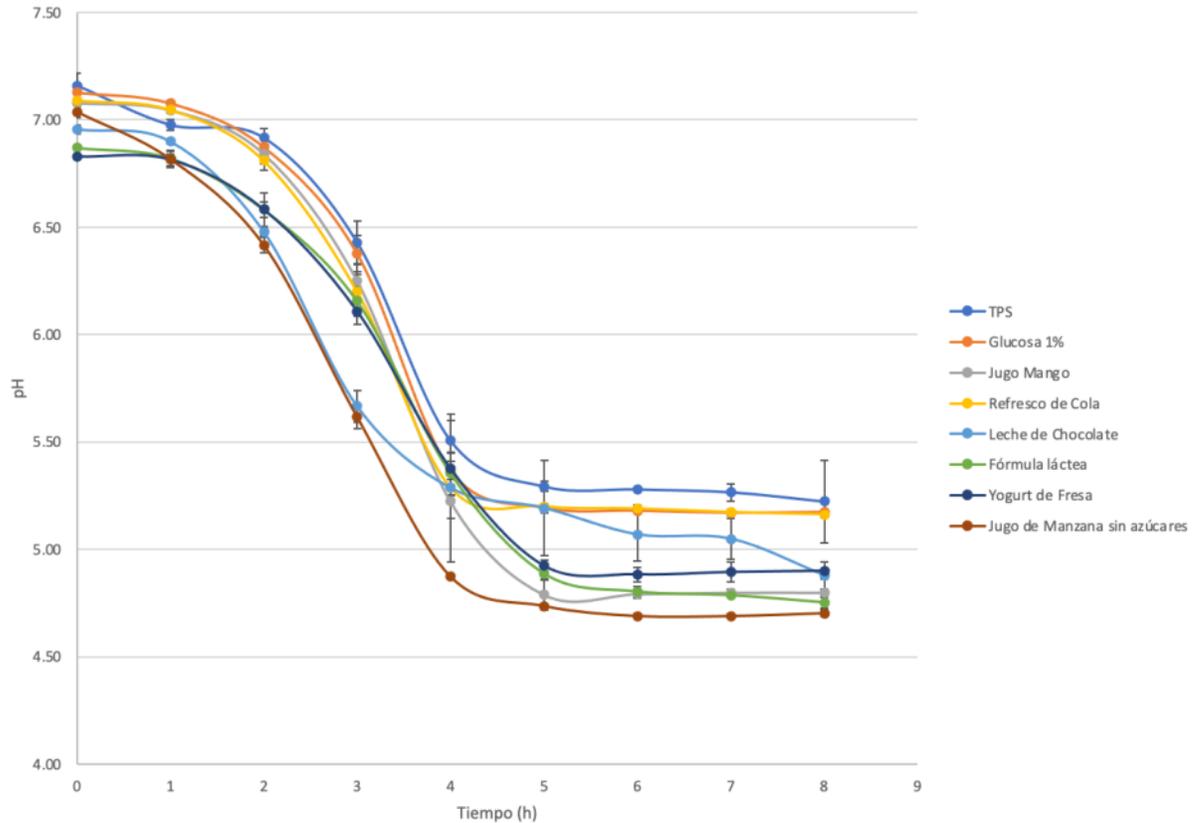


Figura 11. Variación de pH en el transcurso del crecimiento de *Streptococcus mutans* UA130 en caldo Trypticaseína de soya como control de referencia (◆), y en caldo TS suplementado con 1% de fuente de carbono como: glucosa al 1% (◆), jugo sabor mango (◆), refresco de cola (◆), jugo sin azúcares añadidos sabor manzana (◆), fórmula infantil (◆), leche saborizada de chocolate (◆) y yogurt bebible sabor fresa (◆).

En la Figura 12, se muestra una evidente disminución del pH en los cultivos adicionados de una fuente de carbono (glucosa, bebidas lácteas y bebidas azucaradas). En general, se aprecia un pH promedio de $6,99 \pm 0,17$ minutos después de la inoculación, un pH que disminuye en un lapso de 1 h y durante las 4 h posteriores, alcanzando una estabilidad en 4.96 ± 0.26 . *S. mutans* es una bacteria neutrófila que tolera pH en el rango de 5.5-8.5 para su óptimo crecimiento. El pH inicial del cultivo de *S. mutans* en caldo TS fue de 7.16 ± 0.0 mismo que disminuye a 5.29 ± 0.015 en 5 h de incubación, manteniéndose en este valor las 8 h de incubación establecidas para el ensayo. En el grupo de bebidas lácteas el pH inicial fue de 6.96 ± 0.0208 para la leche saborizada de chocolate, 6.87 ± 0.0060 para la fórmula infantil etapa 3 y 6.83 ± 0.0119 para el yogurt bebible de fresa, disminuyendo a 5.19 ± 0.228 , 4.89 ± 0.0268 y 4.93 ± 0.0257 , respectivamente en un periodo de 5 h. Si recordamos, en este mismo tiempo, los cultivos de *S. mutans* adicionados con cada bebida láctea, alcanzaron la fase logarítmica de crecimiento.

Por último, el pH registrado en los cultivos de *S. mutans* adicionados con 1% de bebidas azucaradas, fue similar desde el inicio de la incubación (0 h), arrojando un valor de pH para el jugo de mango de 7.077 ± 0.0404 , de 7.09 ± 0.0361 y de 7.04 ± 0.0252 para los cultivos con 1% de refresco de Cola y jugo de manzana sin azúcares añadidos, respectivamente. Al igual que los cultivos antes mencionados, se alcanzó una disminución máxima de pH a las 5 h que oscila entre 4.790 ± 0.0700 para el cultivo en presencia de jugo de mango, 5.16 ± 0.0764 , para el refresco de Cola y de 4.70 ± 0.0058 para el cultivo con jugo de manzana.

6.3 Azúcares Reductores

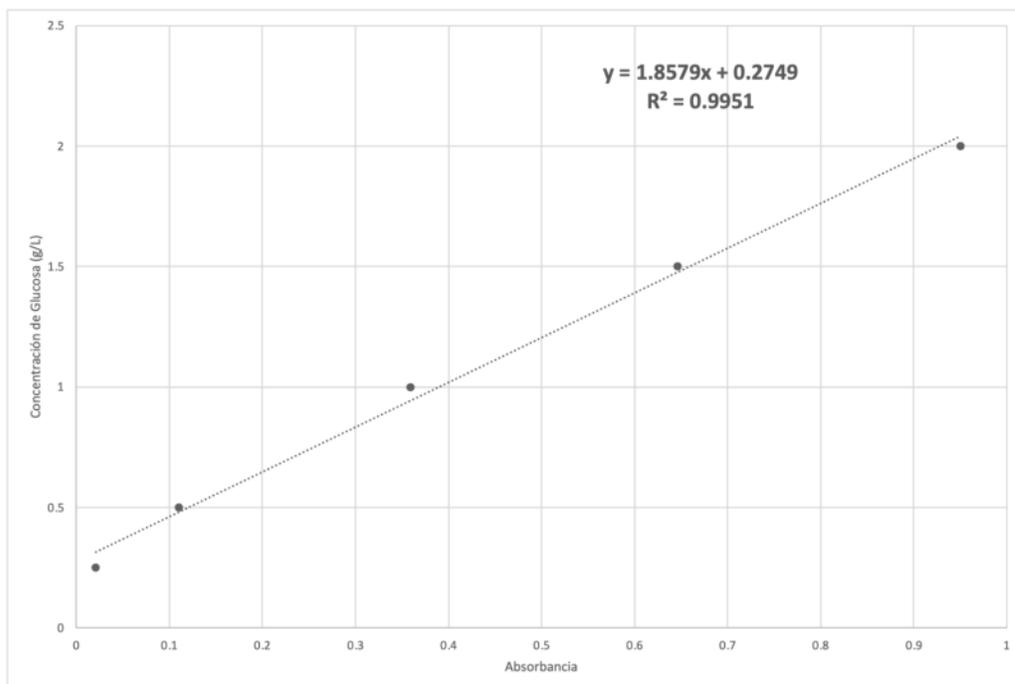


Figura 12. Curva de Calibración de Reactivo DNS. Método de óxido-reducción propuesto por Miller (1959), basado en la capacidad de la glucosa para reducir el ácido 3,5-dinitrosalicílico incrementando la concentración de azúcares reductores.

Se elaboró una curva de calibración de glucosa a diferentes concentraciones, con el empleo del método colorimétrico DNS, se determinaron las lecturas de absorbancia para cada concentración tomadas a una absorbancia de 540 nm.

La pendiente de la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación arrojaron un valor de $R^2 = 0,9951$ correlación entre la lectura de absorbancia y la concentración de glucosa (mg/mL) debido a su cercanía al valor 1; es decir, existe una confiabilidad en este método para la cuantificación de azúcares reductores.

La ecuación de la recta obtenida por regresión lineal fue despejada para determinar la concentración de azúcares reductores en las muestras tomadas de los cultivos de *S. mutans* suplementados con diferentes bebidas azucaradas.

Ecuación de la recta: $y = mx + b$

Dónde

y	Lectura de Absorbancia a 540nm
m	1.8579
x	Azúcar reducido (mg/mL)
b	0.2749

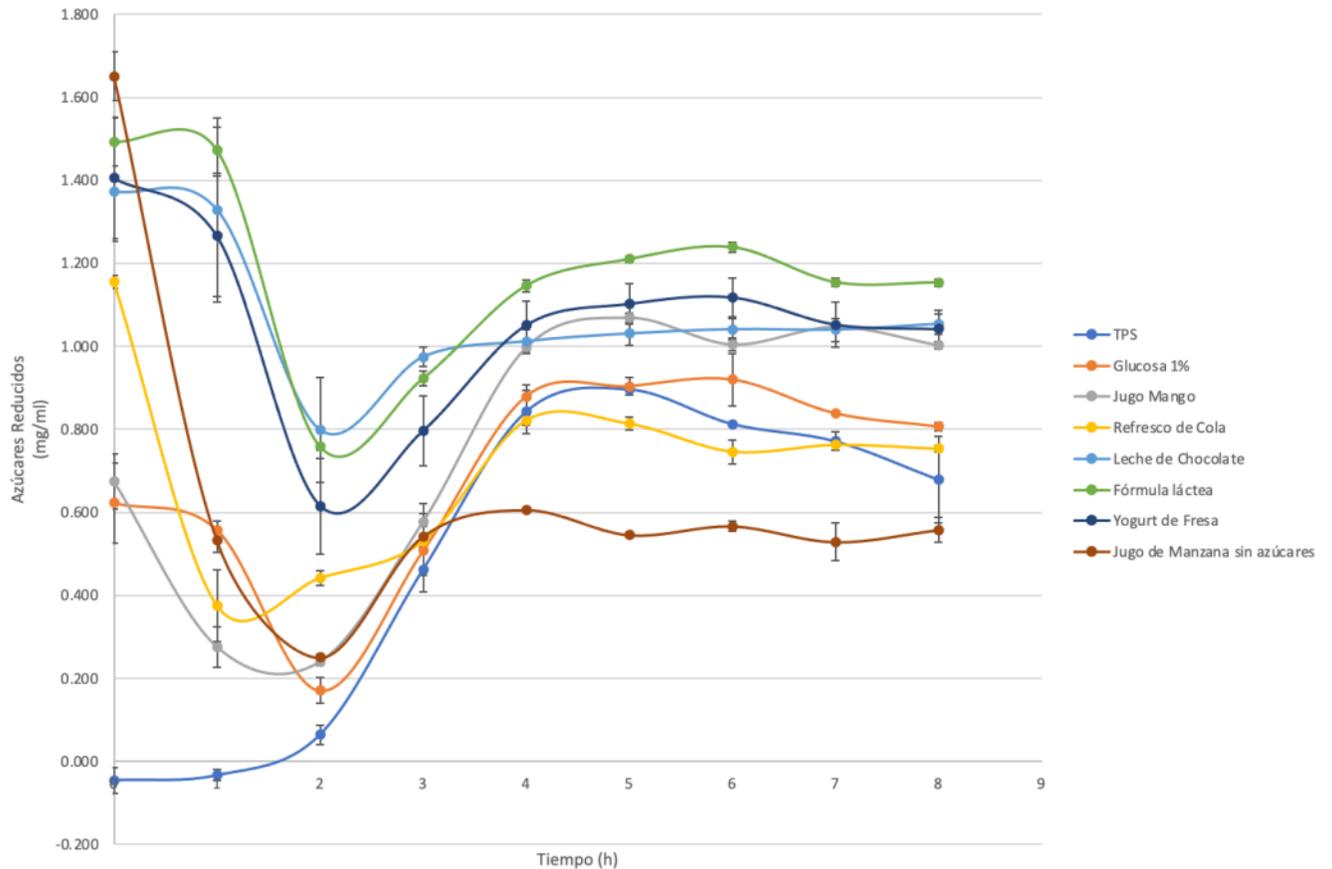


Figura 13. Metabolismo de Azúcares Reductores de *Streptococcus mutans* UA130 en caldo Tripticaseína de soya como control de referencia (◆), y en caldo TS suplementado con 1% de fuente de carbono como: glucosa al 1% (◊), jugo sabor mango (◊), refresco de cola (◆), jugo sin azúcares añadidos sabor manzana (◊), fórmula infantil (◆), leche saborizada de chocolate (◆) y yogurt bebible sabor fresa (◆).

El cultivo de *S. mutans* en caldo TS usado como referencia en el crecimiento convencional, fue formulado comercialmente con 8.33 % de D-Dextrosa (2.5 gr/L). Para los ensayos se le adicionó 1 % de glucosa (D-dextrosa anhidra) o de otras bebidas comerciales azucaradas según correspondiera.

Por tanto, al cultivo convencional de *S. mutans* en caldo TS la concentración de azúcares reductores detectada por espectrofotometría de forma inmediata a la inoculación (tiempo 0 h) fue de 0 mg/mL de glucosa degradada como ingrediente de formulación del caldo. Mientras que a las 5 horas de incubación se obtuvo un valor máximo azúcar reductor de 0.896 ± 0.013 mg/mL, es decir, *S. mutans* utilizó la glucosa como fuente de energía para desarrollarse y vía de fermentación.

Las muestras tomadas cada hora durante las 8 h que se incubó el cultivo de *S. mutans* conteniendo 1% de la bebida azucarada, para medir y monitorear la concentración de azúcar reductor conforme el desarrollo la bacteria, arrojaron los datos siguientes ilustrados en la Fig 13. Al iniciar la incubación 0 h se cuantificó una concentración de 1.650 ± 0.058 mg/mL de azúcares reductores en los cultivos con jugo de manzana sin azúcares añadidos, y de 1.155 ± 0.016 mg/mL con refresco de cola. Posteriormente se redujo de forma drástica la concentración de azúcar reductor-detectada hasta 0.3 mg/mL, al cabo de 2 h de incubado el cultivo. Finalmente se mantuvo estable la concentración detectada de azúcares reductores con 0.681 ± 0.141 mg/mL a partir de las 5 h de incubación y hasta concluir las 8 h del ensayo. Esta estabilidad coincide con la fase estacionaria de la curva de crecimiento de *S. mutans* (Fig 10) en presencia de esta bebida azucarada. En el caso del cultivo conteniendo jugo de mango, la bacteria *S. mutans* tuvo un crecimiento similar a los anteriores jugos y bebidas azucaradas, sin embargo, alcanzo su valor máximo a la quinta hora de fermentación con un valor de 1.069 ± 0.011 mg/mL. En cuanto al cultivo suplementado con glucosa al 1 %, la bacteria cariogénica tuvo una hora de adaptación a las condiciones de crecimiento antes de comenzar la degradación de glucosa en el medio TS alcanzando un valor máximo de 0.920 ± 0.063 mg/mL de azúcares reductores a las 6h de cultivo.

En los cultivos de TS que contenían 1% de (fórmula infantil, leche saborizada de chocolate y yogurt bebible de fresa); *S. mutans* presentó al inicio de la fermentación una concentración de azúcares reductores elevada, con 1.492 ± 0.057 mg/mL, 1.373 ± 0.120 mg/mL, 1.406 ± 0.146 mg/ml respectivamente. El valor mínimo detectado de azúcares reductores fue alrededor de las 2 hr de crecimiento, tiempo en el que la bacteria cariogénica estaba en fase exponencial de crecimiento.

Estadísticos descriptivos del efecto de azúcares añadidos en los cultivos de *S. mutans*

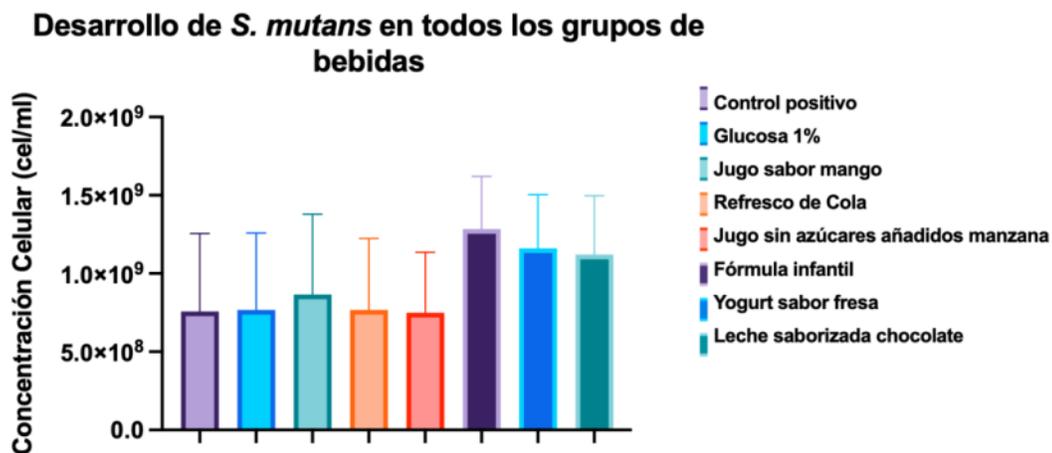


Figura 14. Análisis estadístico del desarrollo de *Streptococcus mutans* UA130 en un caldo de tripticaséina de soya (TS) como cultivo de referencia (control positivo), en relación con cultivos adicionados con 1% de: glucosa, Jugo de mango, refresco de cola, jugo de manzana sin azúcares añadidos, fórmula infantil, yogurt bebible de fresa y leche saborizada de chocolate. Prueba de ANOVA y nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

En la comparación estadística de las cinéticas de crecimiento de *S. mutans*, aplicando la prueba ANOVA de una vía; no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales y el grupo control. Es decir, para el grupo experimental de glucosa al 1%, el valor de p fue > 0.9999 ; seguido por el jugo saborizado de mango con $p > 0.9999$ y $p > 0.9999$ para el refresco de cola. Para el cultivo adicionado del jugo natural de manzana, la p fue de > 0.999 . En el caso de los cultivos adicionados de un producto lácteo, no se encontraron diferencias significativas al comparar la fórmula infantil ($p = 0.0817$), el yogurt bebible de fresa ($p = 0.3557$) y la leche saborizada de chocolate ($p = 0.5459$). Lo anterior establece el rechazo de la hipótesis de este trabajo.

Comparativo de pH entre los grupos de bebidas

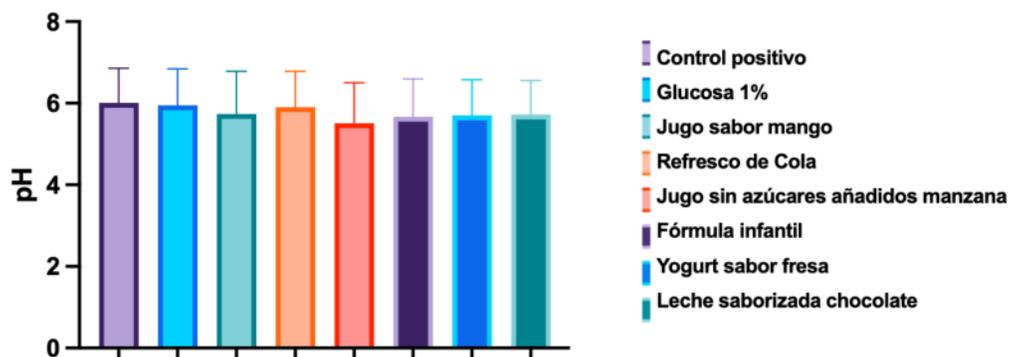


Figura 15. Análisis estadístico comparativo del pH del cultivo de *Streptococcus mutans* UA130 en un caldo de tripticaseína de soya (TS) como cultivo de referencia (control positivo), en relación con cultivos adicionados de 1% de: glucosa, Jugo de mango bebidas, refresco de cola, jugo sin azúcares añadidos de manzana, fórmula infantil, yogurt bebible de fresa y leche saborizada de chocolate. Prueba de ANOVA y nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

Los resultados revelaron la ausencia de significancia entre los grupos analizados y el grupo control, dado que todos obtuvieron un valor de $p > 0.9999$. Por lo tanto, la hipótesis es rechazada.

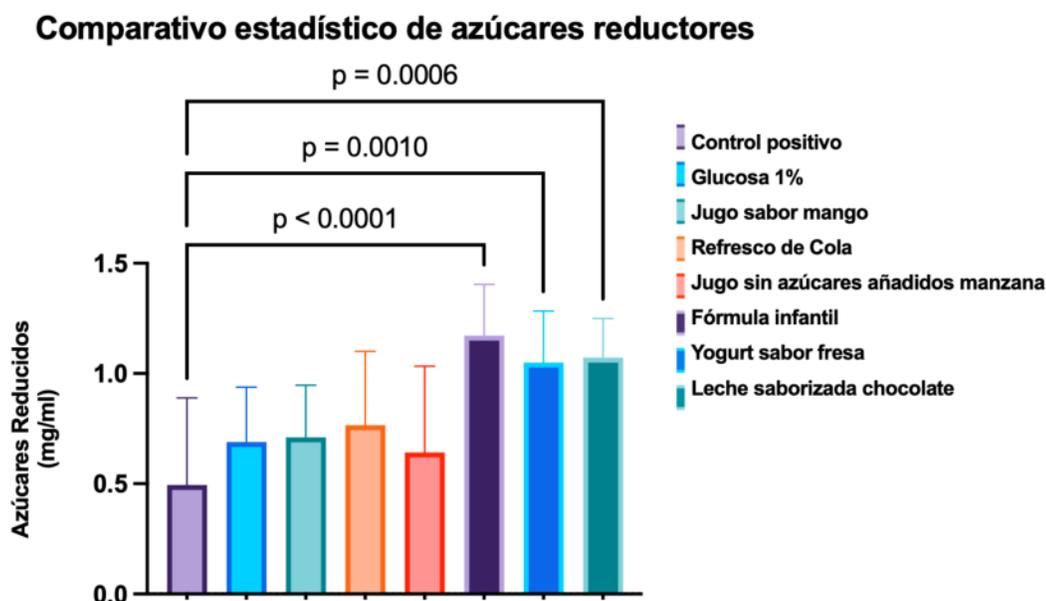


Figura 16. Análisis estadístico de los azúcares reductores para cada uno de los cultivos de *Streptococcus mutans UA130* en un caldo de tripticaseína de soya (TS) como cultivo de referencia en relación con cultivos adicionados de distintas bebidas lácteas (a), bebidas azucaradas (b) y comparación con todas las fuentes de azúcar adicionadas en 1% (c). Prueba de ANOVA, coeficiente de correlación de Pearson y nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

En la comparación estadística del comportamiento de los azúcares reductores, no se encontraron diferencias significativas en los grupos experimentales que incluían jugos o bebidas azucaradas. El primero de estos grupos fue el cultivo con glucosa al 1% con $p = 0.8583$, seguido del jugo saborizado de mango ($p = 0.3494$, el refresco de cola regular ($p =$

0.6757) y el jugo natural de manzana ($p > 0.9999$). Sin embargo, en los tres grupos experimentales lácteos, se encontraron diferencias significativas, siendo en la fórmula infantil ($p < 0.0001$), el yogurt bebible de fresa ($p = 0.0010$) y finalmente la leche saborizada de chocolate ($p = 0.0006$). Con los valores anteriores, la hipótesis de este trabajo es aceptada.

7. Discusión

En este estudio fue evaluado el comportamiento de *Streptococcus mutans* UA130 como bacteria patógena etiológica de la caries dental en presencia de distintas fuentes de carbono o azúcares. La bacteria creció en todos los medios de cultivos con azúcares que fueron probados en este estudio ya que es capaz de utilizar como fuente de energía y carbono a diferentes carbohidratos fermentables, como pueden ser sacarosa, glucosa, lactosa, rafinosa, manitol e inulina. El catabolismo de estos azúcares produce ácido láctico, propiónico, acético y fórmico (Acosta, 2017).

S.mutans expresa proteínas que son transportadores inducibles para carbohidratos específicos, presenta varios tipos de sistemas transportadores de azúcar-fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP-PTS), los cuales permiten la absorción inmediata de gran variedad de carbohidratos los cuales son incorporados al metabolismo bacteriano de forma eficiente y rápida. De aquí se explica la causa de que *S. mutans* creció en presencia de todas las bebidas azucaradas con distintas fuentes de carbohidrato. Además, presenta una dotación enzimática que permite el funcionamiento de rutas intracelulares para el anabolismo de polisacáridos extracelulares solubles e insolubles que le confieren la virulencia, le permiten adherirse al diente, así como incrementan la producción de ácido que puede llegar a perforar la pieza dental y a producir la caries dental.

S.mutans mediante un sistema de transporte dependiente del fosfoenolpiruvato fosfotransferasa (PEP-PTS) y otros independientes. Utiliza a este monosacárido como fuente de energía y carbono intracelular, lo incorpora a la glucólisis en el citoplasma y a la síntesis de polisacáridos intracelulares y extracelulares hasta que esta se agota. Se pudo observar que

en los medios de cultivo probados que tienen glucosa ya sea formando parte de la sacarosa, lactosa o como glucosa de manera independiente, el crecimiento en la fase exponencial empezó rápido con un tiempo de inicio máximo de 1 h y en algunos de estos inóculos la duración de la fase exponencial resultó menor o similar al control.

Acosta, 2017 refiere en estudio similar en los cultivos de *S.mutans* a los que se le añadió glucosa, en donde la etapa de crecimiento exponencial fue más corta que en el grupo control. El consumo de glucosa fue proporcional al mayor crecimiento bacteriano del microorganismo en las primeras horas dada su fácil y rápida adaptación al contenido inicial de glucosa; ya que este se adaptó a una mayor concentración de glucosa y la utilizó para crecer, para esto necesitó que se transcribieran los genes para el transporte y fosforilación de la glucosa, a la vez que ocurrió la represión de los genes de los carbohidratos no preferidos o necesarios en ese momento por el microorganismo.

La presencia de una fuente de carbono en el medio de cultivo es esencial para el crecimiento y proliferación bacteriana, en este caso la presencia de azúcares simples como ingredientes de bebidas azucaradas, en un cultivo de *S. mutans*. Mientras la bacteria cariogénica metaboliza la glucosa o fuente de carbono, ocurre de forma simultánea un crecimiento y proliferación de *S. mutans*, así como una producción de ácido láctico principalmente, que acidifica el medio de cultivo y por ende disminuye el pH. Esto último, como producto de la glucólisis o vía de fermentación de la glucosa efectuada por la bacteria cariogénica.

En este estudio el crecimiento de *S. mutants* fue mayor en los medios de cultivo con lactosa debido a la capacidad de procesamiento de la lactosa que posee esta bacteria lo que provocó

que existiera una mayor disponibilidad de la fuente energética para crecer. La lactosa es un disacárido formado por la unión de D-galactosa y la D- glucosa mediante enlaces O glucosídicos Beta 1-4, es abundante en los lácteos que consumimos. La lactosa es fermentada rápidamente por estreptococos, incluida la bacteria oral cariogénica *Streptococcus mutans*, así como por una variedad de bacterias de ácido láctico, como son: *Lactobacillus bulgaricus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus thermophilus* y *Lactococcus lactis* (Parvez et al, 2017) (Corsetti et al, 2009). Zeng et al, 2010 reporta que la lactosa es internalizada por el sistema de azúcar-fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP) (PTS), produciendo lactosa-6-fosfato de forma muy eficiente y casi de forma exclusiva en bacterias Grampositivas. La Lac-6-P es hidrolizada a glucosa y galactosa-6-fosfato por una fosfo- β -galactosidasa citoplasmática que posee la bacteria, y la Gal-6-P puede ser catabolizada por la vía de la tagatosa-6-fosfato. La lactosa intracelular es escindida por las enzimas β -galactosidasa y como resultado la D-galactosa puede ingresar directamente a la vía de Leloir de *S. mutans*. Esta vía Leloir está codificada en un operón que incluye las tres enzimas del metabolismo de la Galactosa *galK* (galactoquinasa), *galT* (galactosa-1-fosfato uridiltransferasa) y *galE* (UDP-glucosa 4-epimerasa). Resulta importante señalar que la expresión de la vía de la tagatosa en *S. mutans* es inducible por lactosa, o sea que mientras más lactosa exista, mayor será la expresión de las enzimas que la degradan y que la conviertan en una fuente energética accesible para la bacteria. Por otra parte, la expresión de la vía de Leloir puede ser inducida por galactosa extracelular (en el medio) o por intracelular (liberada de α -galactósidos internalizados). La galactosa libre probablemente existe en bajas cantidades en la cavidad oral y surge de la escisión de las fracciones de galactosa de las glicoproteínas derivadas del huésped o de los sustratos dietéticos (Zeng, 2010).

Con respecto a la leche con chocolate y el yogurt bebible, *S. mutans* degradó favorablemente no solo la lactosa formulada en estos productos, sino también la sacarosa. Gamboa et al 2014, reporta que en medios de cultivo con sacarosa este microorganismo tiene la capacidad de producir polisacáridos extracelulares y adquirir una apariencia opaca, rugosa y blanca, no adherente al medio de cultivo y ocasionalmente rodeada por polímeros de glucano de aspecto húmedo. Estos estreptococos no hidrolizan el almidón y fermentan la inulina, la rafinosa, el manitol y el sorbitol. Dicha producción de exopolisacáridos está regulada por la acción de: la glucosiltransferasa (GTF), que sintetiza glucano a partir de la glucosa; y la fructosiltransferasa (FTF), que sintetiza fructano a partir de la fructosa.

Peres et al (2009), sugirió que la leche de fórmula infantil era tan cariogénica como la sacarosa, mientras que la leche de vaca natural tenía una cariogenicidad mínima. En el estudio aquí presentado, se constató como el crecimiento bacteriano y la disminución del pH son significantes en la fórmula pediátrica utilizada, lo que coincide con hallazgos previamente citados. La lactosa como azúcar de la leche, se encuentra en un 4.5 a 5% en la leche de vaca, representando entre el 18% y el 25% del contenido energético total de la leche (Løvendahl et al, 2018; Gaucheron, 2011), y en un 6 a 7% en la leche materna, lo que representa su principal fuente de carbohidratos. Esta concentración es mayor que la de la leche de vaca, lo que facilita la absorción de nutrientes y proporciona energía esencial para el desarrollo del cerebro del lactante (Lawrence, 2010; Ballard, 2013; Duale et al, 2022). En las fórmulas infantiles el proceso que sufre la leche líquida es la eliminación completa de agua a través de un sistema de inyección de aire caliente que, al entrar en contacto con la leche líquida, propicia la evaporación del agua, recuperando el precipitado pulverizado de la leche. En este estado pulverizado el contenido de nutrientes y elementos propios de la leche,

se encuentran concentrados, es decir ahora su porcentaje es mayor a cuando se encuentran suspendidos en estado líquido (López-Roa et al, 2021), a excepción de componentes bioactivos sensibles al calor (vitaminas). Algunos investigadores sugieren que la leche de fórmula podría ser cariogénica debido a su contenido de lactosa, sin embargo, Shelton y colaboradores (1977) advirtieron que asociar este proceso únicamente con la leche puede ser una condena inapropiada del producto, ya que este es esencial para el crecimiento y bienestar del lactante. Un estudio realizado por Bowen et al (1997) indica que la leche y la lactosa no son cariogénicos o en su defecto, son mínimamente promotoras de la caries. En el estudio aquí presentado, las bebidas lácteas de fórmula infantil, leche saborizada de chocolate y yogurt bebible de fresa, utilizadas como suplemento (1%) al medio de cultivo de TS, contenían lactosa en común. En estos cultivos se mostró un mayor crecimiento del patógeno etiológico de la caries dental, en comparación a cuando fueron adicionadas otras bebidas azucaradas.

Acosta et al, 2017 plantea que *S. mutans* utiliza la glucosa a nivel intracelular, misma que se incorpora a la ruta de la glicólisis para producir energía y ácidos orgánicos. Estos ácidos se liberan al medio extracelular mediante la translocación de protones que se bombean al exterior por una ATPasa sintetasa, propiciando un gradiente transmembrana que genera una fuerza transportadora de ácido láctico fuera de la célula hacia la matriz extracelular. Su acumulación en esa zona disminuye el pH externo y alcaliniza el medio intracelular del microorganismo, esta función de la bomba H⁺/ATPasa se relaciona con la característica acidogénica de *S. mutans* y su participación en la desmineralización del esmalte. El autor Acosta et al 2017 comenta el rápido efecto que puede provocar la presencia de ácido láctico en condiciones *in vitro*, lo cual ha demostrado que modifica un medio de pH 7 a pH 4.2 en

24 horas. El ácido láctico de *S. mutans* es acidófilo, acidogénico y acidúrico además es capaz de producir una matriz extracelular denominada exopolisacáridos, presentes en la dieta sacarosa y almidón, la cual modula la formación de la biopelícula cariogénica.

El metabolismo de carbohidratos fermentables de *S. mutans* puede llevarse a cabo según Acosta et al 2017 debido a la existencia de factores de virulencia en la bacteria. Es decir, la actividad de las exoenzimas bacterianas que generan exopolisacáridos, tales como la enzima glucosiltransferasa (GTFs) que produce glucanos insolubles (α 1,3-enlaces) y solubles (α 1,6 enlaces), con liberación de fructosa, la fructosiltransferasa (FTFs) que produce fructanos, principalmente inulina (β 2,1-enlaces) y que libera glucosa; contribuyen de manera determinante a conformar la matriz extracelular y, por ende, a modular la coagregación bacteriana.

Los glucanos insolubles producidos por estas enzimas GTFb y GTFc son esenciales en la estructura tridimensional y el microambiente de pH localizado en la biopelícula cariogénica. Además, existen otras enzimas con actividad extracelular como la invertasa, que es una α -glucosidasa que hidroliza el enlace α 1, β 2 de la sacarosa, la pulanasa y endodextranasa extracelular, entre otras, las cuales generan monosacáridos, disacáridos o trisacáridos disponibles. Estos azúcares se transportan al interior de la bacteria por un sistema mediado por el (PEP-PTS); por un sistema de transporte dependiente de una proteína de unión (BPTS) o por un sistema múltiple del metabolismo de azúcares (MSM) para que puedan ser utilizados por la bacteria para crecer.

8. Conclusiones

S. mutans cuenta con un metabolismo rápido y en este estudio demuestra un consumo de azúcares especialmente los contenidos en bebidas lácteas con que fue suplementado el caldo TS, evidenciando una fase de adaptación rápida y un crecimiento exponencial sostenido. La disminución del pH es proporcional al crecimiento bacteriano y depende del tipo de azúcar contenido y añadido al cultivo. Existe una relación entre el origen del azúcar contenido en las bebidas lácteas, pues permiten un crecimiento inmediato; mientras que en presencia de las otras bebidas azucaradas comerciales la bacteria requiere al menos 1h de adaptación. El mayor crecimiento de *S. mutans* en un menor tiempo, fue con la adición de formula infantil al caldo TS, seguido por el yogurt bebible y la leche sabor chocolate con un crecimiento semejante y ligeras diferencias en el tiempo de máxima proliferación.

En este estudio se concluye que la proliferación de *S. mutans* es dependiente del tipo de azúcar y la formulación de la bebida comercial azucarada. Los hallazgos indican la continuidad de un estudio *in vitro* con piezas dentales en contacto con las bebidas azucaradas aquí evaluadas, para determinar el tiempo, mecanismo y grado de formación de caries en presencia de *S. mutans*.

9. Literatura Citada

1. Acosta, S., Pérez-Domínguez, M., Ramos, N., Pérez-Ybarra, L. (2017). Efecto de glucosa y de Stevia rebaudiana sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* en medio de cultivo axénico. *Odous Científica*, 18(1), 7-20.
2. Baca-Castañón, M. L., De la Garza-Ramos, M. A., Alcázar-Pizaña, A. G., Grondin, Y., Coronado-Mendoza, A., Sánchez-Najera, R. I., Cárdenas-Estrada, E., Medina-De la Garza, C. E., Escamilla-García, E. (2015). Antimicrobial Effect of *Lactobacillus reuteri* on Cariogenic Bacteria *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mutans*, and Periodontal Diseases *Actinomyces naeslundii* and *Tannerella forsythia*. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 7(1), 1-8.
3. Ballard, O., & Morrow, A. L. (2013). Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatric Clinics of North America*, 60(1), 49-74.
4. Barroso, J., Guinot, F., Castelblanque, V., & Bellet, L. (2007). La importancia de la dieta en la prevención de la caries. *Gaceta Dental*, 116-132.
5. Briones-Avila LS, Moranchel-Hernández MA, Moreno-Riolobos D, Silva Pereira TS, Ortega Regules AE, Villaseñor López K, Islas Romero LM. Analysis of Caloric and Noncaloric Sweeteners Present in Dairy Products Aimed at the School Market and Their Possible Effects on Health. *Nutrients*. 2021 Aug 27;13(9):2994.
6. Bueno, J., Gutierrez, F., Guerrero, M., & Garcia, R. Índice CPOD y ceo-d de estudiantes de una escuela primaria de la ciudad de Tepic, Nayarit. 2019 *Revista Latinoamericana de Ortodoncia y Odontopediatría*.
7. Berger, P. K., Monk, C., Bansal, R., Sawardekar, S., Goran, M. I., Peterson, B. S. (2021). Association of Prenatal Sugar Consumption with Newborn Brain Tissue Organization. *Nutrients*, 13(7), 2435. <https://doi.org/10.3390/nu13072435>

8. Berger, P. K., Plows, J. F., Jones, R. B., Alderete, T. L., Rios, C., Pickering, T. A., Fields, D. A., Bode, L., Peterson, B. S., Goran, M. I. (2020). Associations of maternal fructose and sugar-sweetened beverage and juice intake during lactation with infant neurodevelopmental outcomes at 24 months. *Am J Clin Nutr*, 112(6), 1516-1522. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33020800/>
9. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2015). *Bioquímica* (8.^a ed.). Editorial Reverte
10. Bowen, W. H., Pearson, S. K., Rosalen, P. L., Miguel, J. C., Shih, A. Y. (1997). Assessing the cariogenic potential of some infant formulas, milk, and sugar solutions. *J Am Dent Assoc.*, 128(7), 865-871. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1997.0336>
11. Briones-Ávila, L. S., Moranchel-Hernández, M. A., Moreno-Riolobos, D., Silva Pereira, T. S., Ortega Regules, A. E., Villaseñor López, K., Islas Romero, L. M. (2021). Analysis of Caloric and Noncaloric Sweeteners Present in Dairy Products Aimed at the School Market and Their Possible Effects on Health. *Nutrients*, 13(9), 2994.
12. Cerón-Bastidas, X. A. (2015). El sistema ICDAS como método complementario para el diagnóstico de caries dental. *CES Odontología*, 28(2), 100-109.
13. Chi, D. L., Scott, J. M. (2019). Added Sugar and Dental Caries in Children: A Scientific Update and Future Steps. *Dent Clin North Am.*, 63(1), 17-33.
14. Cohen, J. F.W., Rifas-Shiman, S. L., Young, J., Oken, E. (2018). Associations of Prenatal and Child Sugar Intake with Child Cognition. *Am. J. Prev. Med.*, 54, 727–735. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2018.02.020>
15. Corsetti, A., & Hill, C. (2009). *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects*. Springer Science & Business Media.

16. Dagon, N., Greenstein, R. B., Mazor, Y., Ratson, T. (2019). Cariogenic Potential of Infant Formulas-An In Vitro Study. *J Clin Pediatr Dent.*, 43(3), 181-184.
<https://doi.org/10.17796/1053-4625-43.3.6>
17. Dinis, M., Agnello, M., Cen, L., Shokeen, B., He, X., Shi, W., Wong, D. T. W., Lux, R., Tran, N. C. (2022). Oral Microbiome: *Streptococcus mutans*/Caries Concordant-Discordant Children. *Front Microbiol.*, 13:782825.
18. Duale, A., Singh, P., & Al Khodor, S. (2022). Breast milk: A meal worth having. *Frontiers in Nutrition.* <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.800927>
19. EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA); Turck, D., Bohn, T., Castenmiller, J., de Henauw, S., Hirsch-Ernst, K. I., Knutsen, H. K., Maciuk, A., Mangelsdorf, I., McArdle, H. J., Naska, A., Peláez, C., Pentieva, K., Siani, A., Thies, F., Tsabouri, S., Adan, R., Emmett, P., Galli, C., Kersting, M., Moynihan, P., Tappy, L., Ciccolallo, L., de Sesmaisons-Lecarré, A., Fabiani, L., Horvath, Z., Martino, L., Muñoz Guajardo, I., Valtueña Martínez, S., Vinceti, M. (2022). Tolerable upper intake level for dietary sugars. *EFSA J.*, 20(2)
20. Flores, A. A., & Olea, J. G. V. (2017). *Ecología oral*. Editorial El Manual Moderno.
21. Fox, P. F., & McSweeney, P. L. H. (2003). *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1: Proteins, Parts A & B* (3rd ed.). Springer.
22. Garza-Juárez, A., Pérez-Carrillo, E., Arredondo-Espinoza, E. U., Islas, J. F., Benítez-Chao, D. F., & Escamilla-García, E. (2023). Nutraceuticals and Their Contribution to Preventing Noncommunicable Diseases. *Foods (Basel, Switzerland)*, 12(17), 3262.
<https://doi.org/10.3390/foods12173262>

23. Gaucheron, F. (2011). Milk and Dairy Products: A Unique Micronutrient Combination. In *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2nd ed., pp. 129-136). Academic Press.
24. Guo, Y., Li, B., Ma, T., Moore, E. R., Xie, H., Wu, C., Li, L. (2022). Unraveling the binding microprocess of individual *Streptococcus mutans* cells via sucrose-dependent adhesion based on surface plasmon resonance imaging. *J Oral Microbiol.*, 14(1):2038906.
25. GBD 2017 Oral Disorders Collaborators; Bernabe E, Marcenes W, Hernandez CR, Bailey J, Abreu LG, Alipour V, Amini S, Arabloo J, Arefi Z, Arora A, Ayanore MA, Bärnighausen TW, Bijani A, Cho DY, Chu DT, Crowe CS, Demoz GT, Demisie DG, Dibaji Forooshani ZS, Du M, El Tantawi M, Fischer F, Folleyan MO, Futran ND, Geramo YCD, Haj-Mirzaian A, Hariyani N, Hasanzadeh A, Hassanipour S, Hay SI, Hole MK, Hostiuc S, Ilic MD, James SL, Kalhor R, Kemmer L, Keramati M, Khader YS, Kisa S, Kisa A, Koyanagi A, Lalloo R, Le Nguyen Q, London SD, Manohar ND, Massenburg BB, Mathur MR, Meles HG, Mestrovic T, Mohammadian-Hafshejani A, Mohammadpourhodki R, Mokdad AH, Morrison SD, Nazari J, Nguyen TH, Nguyen CT, Nixon MR, Olagunju TO, Pakshir K, Pathak M, Rabiee N, Rafiei A, Ramezanzadeh K, Rios-Blancas MJ, Roro EM, Sabour S, Samy AM, Sawhney M, Schwendicke F, Shaahmadi F, Shaikh MA, Stein C, Tovani-Palone MR, Tran BX, Unnikrishnan B, Vu GT, Vukovic A, Warouw TSS, Zaidi Z, Zhang ZJ, Kassebaum NJ. Global, Regional, and National Levels and Trends in Burden of Oral Conditions from 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease 2017 Study. *J Dent Res.* 2020 Apr;99(4):362-373

26. Huang, Y., Chen, Z., Chen, B., Li, J., Yuan, X., Li, J., Wang, W., Dai, T., Chen, H., Wang, Y., Wang, R., Wang, P., Guo, J., Dong, Q., Liu, C., Wei, Q., Cao, D., Liu, L. (2023). Dietary sugar consumption and health: umbrella review. *BMJ*, 381
27. Huang, Y., Thompson, T., Wang, Y., Yu, Q., Zhu, L., Xu, X., Wen, Z. T., Townsend, J. A. (2019). Analysis of cariogenic potential of alternative milk beverages by in vitro *Streptococcus mutans* biofilm model and ex vivo caries model. *Arch Oral Biol.*, 105, 52-58. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.07.011>
28. ICDAS Foundation. (2013). International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) and its International Caries Classification and Management System (ICCMS) - methods for staging of the caries process and enabling dentists to manage caries. *Community Dent Oral Epidemiol.*, 41(1), e41-52.
29. International Diabetes Federation. (2021). Global Burden of Diabetes. *Diabetes Atlas (10th ed.)*.
30. Khalid, M., Petroianu, G., & Adem, A. (2022). Advanced glycation end products and diabetes mellitus: Mechanisms and perspectives. *Biomolecules*, 12(4), 542. <https://doi.org/10.3390/biom12040542>
31. Kucuk, Z. D., & Aydin, M. (2018). Use of Probiotic Lactobacillus in the Treatment of Caries and Periodontal Disease. *Anaerobe*, 52, 139-146.
32. Lawrence, R. A., & Lawrence, R. M. (2010). *Breastfeeding: A Guide for the Medical Profession* (7.^a ed.). Elsevier Health Sciences.
33. López-Roa, I., Olivares, M., y Navarro-Blasco, I. (2021). Nutritional Composition of Powdered Milk: Proteins, Minerals, and Trace Elements Content. *International Dairy Journal*, 117, 105052. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105052>

34. Løvendahl, P., & Weisbjerg, M. R. (2018). Lactose in milk: Beneficial in management and breeding. En *Proceedings of ICAR Technical Series 22: Big ideas for big data in animal production* (pp. 100-103). ICAR - International Committee for Animal Recording. Recuperado de <https://www.icar.org>
35. Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Bender, K. S. (2017). Brock Biology of Microorganisms (15th ed.). Pearson Education.
36. Mahboobi Z, Pakdaman A, Yazdani R, Azadbakht L, Montazeri A. Dietary free sugar and dental caries in children: A systematic review on longitudinal studies. *Health Promot Perspect.* 2021 Aug 18;11(3):271-280.
37. Marengo, A., & Ulloque, J. Guía de Contenidos: Indicadores Epidemiológicos de la Situación de Salud Bucal. 2014 *Odontología Preventiva y Comunitaria II* (págs. 2-15). Universidad Nacional de Córdoba
38. Mateos, M., Garcillan, R., Bratos, E., & Salgado, O. Valoración del riesgo de caries en el paciente infantil. Identificación de sus componentes mediante la historia clínica. Revisión bibliográfica. 2018 *Odontología Pediátrica*, 26(3), 193-203.
39. Martínez-Álvarez, G., & Guzmán-Castillo, P. (2021). Preservantes y reguladores de la acidez en la alimentación. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 52(4), 37-46.
40. Milani, M., & Kleiner, P. (2018). Sugar alcohols in dentistry: Applications and clinical outcomes. *J. Dent.*, 32(6), 451-458.
41. Martínez, S., & Alvarado, G. (2021). Determinación del contenido de azúcares en productos lácteos. *Revista Internacional de Ciencias y Tecnología*, 12(3), 45-52.

42. Morones, R. G., Benavides, A. J., & Villa, R. R. (2019). Estudio de la resistencia a la caries dental en niños con hábitos alimenticios saludables. *Revista Mexicana de Pediatría*, 86(4), 109-115.
43. Moreno, J. F., & Marín, M. T. (2020). Técnicas avanzadas en la evaluación de la microbiota oral y su relación con la salud bucal infantil. *Revista de Odontología Pediátrica*, 48(3), 215-220.
44. Moya, A., & Torres, E. (2019). Uso de probióticos en el tratamiento de la caries dental: Revisión de la literatura. *Revista de Odontología del Caribe*, 34(2), 101-110.
45. Norma Mexicana NOM-051-SCFI/SSA1-2010. Disponible en:
http://www.dof.gob.mx/normasOficiales/8150/seeco11_C/seeco11_C.html
46. Ojeda-Garcés, J. C., Oviedo-García, E., & Salas, L. A. Streptococcus mutans y caries dental. 2013 *CES odontologia*, 26(1), 44-56.
47. OPS 2020. El etiquetado frontal como instrumento de política para prevenir enfermedades no transmisibles en la Región de las Américas. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud; 2020. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
<https://iris.paho.org/handle/10665.2/53013>
48. Palacios C, Rivas-Tumanyan S, Morou-Bermúdez E, Colon AM, Torres RY, Elías-Boneta AR. Association between Type, Amount, and Pattern of Carbohydrate Consumption with Dental Caries in 12-Year-Olds in Puerto Rico. *Caries Res*. 2016;50(6):560-570
49. Parvez, S., Kang, M. S., Kang, S. H., & Kim, H. Y. (2017). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(12), 1111-1118.

50. Peña, F. D., & Sánchez, L. (2022). Efectos del consumo de azúcares en la salud dental infantil. *Estudios de Salud Pública*, 24(1), 58-64.
51. Peres, R. C., Coppi, L. C., Volpato, M. C., et al. (2009). Cariogenic potential of cows', human and infant formula milks and effect of fluoride supplementation. *Br J Nutr*, 101(3), 376-382. <https://doi.org/10.1017/S0007114508020734>
52. Pérez, S. D., & Martínez, S. C. (2020). Impacto de la nutrición infantil sobre el desarrollo de caries dental. *Revista Latinoamericana de Nutrición y Salud*, 22(1), 21-28.
53. Pinto, M. A., & Valdés, S. (2023). Evaluación de la relación entre el consumo de azúcar y la incidencia de caries en la población infantil. *Revista de Ciencias de la Salud*, 32(4), 82-89.
54. Pitts NB, Ekstrand KR; ICDAS Foundation. International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) and its International Caries Classification and Management System (ICCMS) - methods for staging of the caries process and enabling dentists to manage caries. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2013 Feb;41(1):e41-52.
55. Procuraduría Ferederal del Consumidor. 2012. *El Laboratorio Profeco Reporta*.
56. Procuraduría Federal del Consumidor 2021. *Revista del Consumidor*.
57. Reynolds, E. C., & Del Rio, A. (1984). Effect of casein and whey-protein solutions on caries experience and feeding patterns of the rat. *Arch Oral Biol*, 29(11), 927-933. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(84\)90093-1](https://doi.org/10.1016/0003-9969(84)90093-1)
58. Roberts WE, Mangum JE, Schneider PM. Pathophysiology of Demineralization, Part II: Enamel White Spots, Cavitated Caries, and Bone Infection. *Curr Osteoporos Rep*. 2022 Feb;20(1):106-119.

59. Rodríguez, M. A., & Fernández, R. E. (2021). Efectos de los edulcorantes artificiales sobre la microbiota oral y la salud dental en niños. *Revista Internacional de Odontología*, 40(2), 121-128.
60. Santos, J. R., & Torres, A. L. (2019). Estudio sobre la influencia de la dieta en el riesgo de caries dental en niños. *Revista de Salud Pública Infantil*, 15(2), 35-41.
61. Sánchez, M. F., & Mendoza, L. C. (2020). La importancia de los lácteos en la salud dental infantil. *Revista de Ciencias Nutricionales*, 27(1), 90-95.
62. Sabharwal A, Stellrecht E, Scannapieco FA. Associations between dental caries and systemic diseases: a scoping review. *BMC Oral Health*. 2021 Sep 25;21(1):472.
63. Sanders A, Cardel M, Laniado N, Kaste L, Finlayson T, Perreira K, Sotres-Alvarez D. Diet quality and dental caries in the Hispanic Community Health Study/Study of Latinos. *J Public Health Dent*. 2020 Jun;80(2):140-149.
64. Shelton, P. G., Berkowitz, R. J., & Forrester, D. J. (1977). Nursing bottle caries. *Pediatrics*, 59(5), 777-778.
65. Tiwari T, Rai NK, Wilson AR, Gansky SA, Albino J. What Can We Learn from Parents of Caries-Free and Caries-Active Hispanic Children? *JDR Clin Trans Res*. 2021 Jan;6(1):47-58.
66. Talaro, K. P., & Talaro, A. (2021). *Foundations in Microbiology* (10th ed.). McGraw-Hill Education.
67. Téllez, J., & Ruiz, M. P. (2018). La relación entre las dietas altas en azúcar y el desarrollo de la caries dental en niños pequeños. *Odontología Pediátrica de México*, 42(3), 180-188.
68. Wolf, I., & Perotti, M. Los Productos lácteos y su rol en la salud bucal. 2021 *La alimentación latinoamericana*, 66-76.

69. World Health Organization. 2019. Ending childhood dental caries: WHO implementation manual.
70. World Health Organization. *Governing Body matters: Key issues arising out of the Seventy-fourth World Health Assembly and the 148th and 149th sessions of the WHO Executive Board* (No. SEA/RC74/13). World Health Organization 2021. Regional Office for South-East Asia.
71. Zepeda, L. L., & Romero, J. S. (2021). Métodos innovadores para el diagnóstico de caries dental en niños. *Revista Mexicana de Tecnología en Salud*, 16(2), 66-71.
72. Zhu, Y., Zhang, Z., & Zhang, L. (2022). "Modeling and applications of microbial growth curves in laboratory environments." *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 14(3), 113-122. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000334>
73. Zohri AA, Abdelazim M, Ibrahim S. 2-Aminoethanaminium 2-(ethoxycarbonyl)-4,6-dinitrophenolate as a greener route in reducing sugar quantification. *MethodsX*. 2018 Jun 5;5:609-612.

10. Resumen Biográfico

M.C.D. Talía Rodríguez Amaral
Candidato para el Grado de
Maestro en Ciencias Odontológicas en el área de Odontopediatría

Tesis:

Efecto De Diferentes Bebidas Azucaradas Sobre El Crecimiento De *Streptococcus Mutans* y La Respuesta En La Reducción De Azúcares

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacida en La Habana, Cuba el 10 de noviembre de 1998, hija de Cintia Amaral Montesino y Yeovany Rodríguez Menendez.

Educación: Egresado de la Universidad de Monterrey (UDEM), grado obtenido Médico Cirujano Dentista en Diciembre de 2021, con mención honorífica y reconocimiento de programa de honores Magna Cum Laude, primer lugar en la generación.

Experiencia Profesional:

PUBLICACIONES:

Rodríguez AT, García GFG, Salinas NA. Osteonecrosis de los maxilares: reacción medicamentosa.. Rev ADM. 2022;79(4):232-238. doi:10.35366/106918.

PARTICIPACIONES EN CONGRESOS:

Nombre del congreso	Título del Trabajo	Participación	Fecha	Palabras Claves	Colaboradores	Organiza
IX Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina y VII	Efecto de Diferentes bebidas azucaradas sobre el crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i> y la respuesta en la	Ponente - Cartel	10 octubre 2024	<i>Streptococcus mutans</i> , crecimiento celular, bebidas azucaradas,	Juan Carlos Segoviano Ramírez, Erandi Escamilla García	La Licenciatura de Químico Bacteriólogo Parasitólogo de la Facultad de Ciencias Químicas, de la

Simposio Nacional de Microbiología Aplicada	reducción de azúcares.			azúcares reductore		Universidad Autónoma de Nuevo León.
XVI Encuentro Internacional de Cuerpos Académicos y Grupos de Investigación en Odontología	Manejo quirúrgico ortodóntico de odontoma compuesto en un paciente pediátrico: reporte de caso clínico	Ponente	17 a 20 de Abril de 2024		Dr. Juan Arizpe Coronado, Dr. Mauricio Vélez Domínguez, Dr. Carlos Reyes Escalera, Dra. Marcela Montes Villarreal	Universidad Veracruzana y Cuerpos Académicos en Odontología AC CONACAO
XXVII Semana Cultural, Científica y Deportiva	Alternativas de Tratamiento del Sector Anterior en dentición decidua	Ponente en Seminarios de Posgrados	20 de mayo de 2024		Dra. Marcela Montes Villarreal, Dra. Alejandra Chapa Hernández, Dra. Diana Isabel Gamboa Quintanilla	Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Nuevo León
Congreso Internacional de Investigación Academia Journals CDMX 2023	Infraoclusión y Anquilosis Dental en la Dentición Primaria: Revisión de la Bibliografía	Ponente y Autora de Artículo	30 de noviembre y 1 de diciembre de 2023	diente sumergido, anquilosis dental, infraoclusión, molares primarios	Dra. Marcela Montes Villarreal Dra. María Teresa Pérez Quintero Dr. Enrique Nieto Ramírez	Tecnológico Nacional de México
Greater New York Dental Meeting 2019	Oral Manifestations during pregnancy: a systematic review	Ponente de Póster Científico	29 de noviembre a 5 de diciembre 2019		Dra. Daniela Isabel Hernández Falcón, Dr. Mario Eduardo López	Universidad de Monterrey.

Anexos