

## Efecto de glucosa y de *Stevia rebaudiana* sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* en medio de cultivo axénico

### *Effect of glucose and Stevia rebaudiana on the growth of Streptococcus mutans in axenic culture medium*

Acosta Sri Arturo<sup>1</sup>, Pérez-Domínguez Mariela<sup>1</sup>, Ramos Norys<sup>1</sup>, Pérez-Ybarra Luis<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Investigación Morfopatológicas (UNIMPA). Facultad de Odontología. Universidad de Carabobo. Valencia. Venezuela. <sup>2</sup>Departamento de Ciencias Básicas. Escuela de Bioanálisis sede Aragua. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Maracay. Venezuela.  
mdperez1@uc.edu.ve

Recibido: 06/03/2017  
Aceptado: 20/04/2017

## Resumen

*Streptococcus mutans* es una bacteria Gram positivo presente en la biopelícula cariogénica, cuyo metabolismo produce polisacáridos extracelulares que potencian la virulencia bacteriana y genera ácidos que libera extracelularmente durante la fermentación de los carbohidratos de la dieta, esto compromete la estructura mineral del diente. Un sustituto de la sacarosa en la dieta es *Stevia rebaudiana* un edulcorante no calórico de origen vegetal con potencial actividad antimicrobiana. El objetivo de esta investigación fue comparar el efecto de la glucosa y *Stevia rebaudiana* sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* y la concentración del pH extracelular en un medio axénico. La muestra estuvo conformada por tres grupos de cultivos de *Streptococcus mutans* en caldo BHI. Al grupo 1 se le añadió 8mM de edulcorante comercial de extracto de hoja de *Stevia rebaudiana*, al grupo 2 se le añadió glucosa 8mM y el grupo control no se le añadió suplemento. El crecimiento de *Streptococcus mutans* se registró según la absorbancia  $A_{600nm}$  con un espectrofotómetro y el pH del cultivo se midió con un peachímetro a 0, 24, 48 y 72h. Los resultados demostraron que el grupo al que se le añadió glucosa presentó mayor crecimiento de *Streptococcus mutans* que el grupo con edulcorante comercial a base de *Stevia*, además este último cultivo presentó menor pH. Se evidenció de esta manera que la *Stevia rebaudiana* inhibe el crecimiento de *Streptococcus mutans* pero disminuye el pH del medio hasta el punto de poder causar desmineralización del esmalte dental.

**Palabras clave:** *Stevia rebaudiana*, *Streptococcus mutans*, crecimiento bacteriano, pH.

## Summary

*Streptococcus mutans* is a Gram positive bacterium present in the cariogenic biofilm, whose metabolism produces extracellular polysaccharides that enhance bacterial virulence and generates acids that release extracellularly during dietary carbohydrates fermentation, compromising the mineral structure of the tooth. A substitute for sucrose in the diet is *Stevia rebaudiana*, a non-caloric plant-based sweetener with potential antimicrobial activity. The objective of this research was to compare the effect of glucose and *Stevia rebaudiana* on the growth of *Streptococcus mutans* and the extracellular pH concentration in an axenic medium. The sample consisted of three groups of *Streptococcus mutans* cultures in BHI broth. Group 1 was supplemented with 8mM commercial sweetener of *Stevia rebaudiana* leaf extract, group 2 was added 8mM glucose and the control group without added supplement. Growth of *Streptococcus mutans* was recorded according to the absorbance  $A_{600nm}$  with a spectrophotometer and the culture pH was measured with a pH-meter at 0, 24, 48 and 72h. The results showed that the group to which glucose was added presented greater growth of *Streptococcus mutans* than the group with commercial sweetener based on *Stevia*, in addition the latter culture had lower pH. In this way, it was evidenced that *Stevia rebaudiana* inhibits the growth of *Streptococcus mutans* but decreases the pH of the medium to the point of being able to cause demineralization of dental enamel.

**Key words:** *Stevia rebaudiana*, *Streptococcus mutans*, bacterial growth, pH.

## Introducción

Los tejidos de la cavidad bucal se encuentran colonizados por más de 19 mil filotipos bacterianos asociados en proporciones

particulares durante un tiempo determinado<sup>1</sup>. Todas estas especies conforman un complejo y dinámico sistema ecológico y simbiótico, representado en un microbioma que incluye bacterias, arqueas, hongos, protozoarios y virus; los cuales se distribuyen en micronichos en forma de fase planctónica o de libre flotación suspendidos en la saliva y en forma de biopelícula sobre la mucosa bucal y dientes, que contribuyen de forma directa e indirectamente en el normal desarrollo del sistema de defensa del huésped.<sup>2</sup>

Los microorganismos de la biopelícula dental pueden contener alrededor de 20 especies que están rodeados por una matriz extracelular de exopolisacáridos, proteínas y de ácidos nucleicos, cuya síntesis, concentración, cohesión, carga, especificidad y naturaleza, determina la formación altamente dinámica de la estructura tridimensional de la biopelícula; la cual puede variar en grados de porosidad, zonas de densidad y presencia de canales, lo que proporciona hábitats muy diversos a pequeña escala que favorecen la biodiversidad.<sup>3</sup>

La producción de una matriz extracelular de exopolisacáridos producida por *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), cuando están presentes en la dieta sacarosa y almidón, modula la formación de una biopelícula cariogénica, ya que el metabolismo de estos carbohidratos produce ácidos orgánicos que se disocian y liberan hidrogeniones próximos a los dientes que pueden causar una ruptura del balance mineral entre el diente y la biopelícula, provocando la pérdida de calcio y fosfato del esmalte.<sup>4-8</sup>

El género *Streptococcus* representa la mayor población bacteriana en la cavidad bucal, aunque la distribución varía según la especie, tal es el caso de *S. mutans* y *S. sanguis*, que suelen colonizar las superficies de los dientes y estructuras protésicas, *S. salivarius* presente en

menor número en la biopelícula dental, *S. mitior*, localizado en toda la cavidad bucal y *S. sanguis*, que solo se ha evidenciado después de la erupción de los dientes<sup>9</sup>. Los *Streptococcus* pertenecen al *Phylum Firmicutes* bajo el orden de *Lactobacillales* y la familia de *Streptococcaceae*, se han establecido tres géneros en la familia de *Streptococcaceae* que incluyen *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Lactovum*.<sup>10</sup>

*S. mutans* representa una de las 79 especies de *Streptococcus* que se ha asociado con la etiopatogenia de la caries dental, fue aislado en 1924 por J. Clarke, a partir de lesiones cariosas y su nombre se debe a que se puede visualizar como cocobacilo cuando se aísla de un medio con pH ácido y como cocócea cuando se cultiva en un medio neutro o alcalino. Es una bacteria Gram positivo, anaerobia facultativa, no móvil que suele presentarse en pares o cadena, utiliza como fuente de energía y carbono a carbohidratos fermentables, tales como sacarosa, glucosa, lactosa, rafinosa, manitol e inulina, entre otros; y produce ácidos tales como ácido láctico, propiónico, acético y fórmico<sup>11-13</sup>.

El ácido láctico en condiciones *in vitro* ha demostrado que modifica un medio de pH 7 a pH 4,2 en 24 horas<sup>13</sup>. Se han identificado varios serotipos de *S. mutans* (c, e, f y k), lo cual se atribuye a la estructura de la pared bacteriana, la cual es determinante en el proceso de adherencia y colonización del microorganismo.<sup>13,14</sup>

El metabolismo de los carbohidratos fermentables de *S. mutans* se ha relacionado con varios factores de virulencia. La actividad de las exoenzimas bacterianas que generan exopolisacáridos, tales como la enzima glucosiltransferasa (GTFs) que produce glucanos insolubles ( $\alpha$ 1,3-enlaces) y solubles ( $\alpha$ 1,6-enlaces), con liberación de fructosa, la fructosiltransferasa (FTFs) que produce fructanos, principalmente inulina ( $\beta$ 2,1-enlaces) y que libera glucosa; contribuyen de manera determinante a conformar la matriz extracelular

y a modular la coagregación de microorganismos; no obstante, los glucanos insolubles producidos por GTFb y GTFc son esenciales en la estructura tridimensional y microambiente de pH localizado en la biopelícula cariogénica. Además, están presentes otras enzimas con actividad extracelular como la invertasa, que es una  $\alpha$ -glucosidasa que hidroliza el enlace  $\alpha$ 1, $\beta$ 2 de la sacarosa, la pulanasa y endodextranasa extracelular, entre otras, las cuales generan monosacáridos, disacáridos o trisacáridos disponibles para que se transporten al interior de la bacteria por un sistema mediado por el fosfoenolpiruvato fosfotransferasa (PEP-PTS) o diferente al PEP-PTS; por un sistema de transporte dependiente de una proteína de unión (BPTS) o por un sistema múltiple del metabolismo de azúcares (MSM)<sup>7,15,16</sup>.

A nivel intracelular, la glucosa se incorpora en la ruta de la glicólisis para generar energía y en consecuencia se producen ácidos. Estos ácidos son liberados al medio extracelular mediante la translocación de protones que son bombeados fuera de la bacteria por una ATPasa sintetasa, una hidrolasa que provoca un gradiente transmembrana que genera una fuerza que transporta el ácido láctico fuera de la célula hacia la matriz extracelular, y cuya acumulación disminuye el pH del microambiente, establece una reserva de protones para una variedad de transportes secundarios y alcaliniza el medio intracelular, esta función de la bomba H<sup>+</sup>/ATPasa se relaciona con la característica acidogénica de *S. mutans* y su participación en la desmineralización del esmalte.<sup>7,17</sup>

La modificación de la dieta con la incorporación de carbohidratos no refinados y edulcorantes no fermentables representa un factor que previene el desarrollo de la caries dental y que también favorece la condición de pacientes con enfermedades metabólicas, entre ellas la diabetes *mellitus*. Se han propuesto edulcorantes para las bebidas tales como Sacarina, Aspartame, Sucralosa, Ciclamato, Acesulfame K, Neotamo,



Alitamo y *Stevia*, este último es un endulzante natural no calórico, sin sabor metálico y no carcinógeno. Fue aceptado en 2009 por *Food and Drug Administration* (FDA), es de origen vegetal y nativo de Suramérica. La planta fue registrada científicamente en 1899 como *Eupatorium rebaudianum* en Paraguay por Moisés Santiago Bertoni, pero luego fue cambiada a *Stevia rebaudiana* Bertoni, perteneciente a la familia *Asteraceae*. Este género incluye unas 240 especies y su sabor dulce es considerado 450 veces mayor que la sacarosa, lo cual depende de los glicósidos diterpénicos presentes principalmente en las hojas, tales como esteviósido, esteviolbiósido, rebaudiósido A, B, C, D, E y F y dulcósido, los cuales representan de 3-17% de su peso. Específicamente, la fracción de peso del esteviósido es 5-10% y el rebaudiósido A 2-4%, ambas moléculas son mucho más dulces que la sacarosa entre 110- 270 veces y 180-400 veces, respectivamente.<sup>18-21</sup>

*Stevia rebaudiana* contiene 62% de carbohidratos, 16% de fibras crudas, 11% de proteínas, ácido ascórbico, β-caroteno, riboflavina, tiamina, minerales tales como potasio, calcio, sodio, magnesio, cobre, manganeso, cobalto, fósforo, estaño, hierro y zinc, entre otros; además de aminoácidos esenciales, lípidos y aceites esenciales<sup>22,23</sup>.

No obstante, dependiendo del método de extracción de las hojas de la planta, el contenido y tipo de carbohidrato puede variar; tal es el caso del edulcorante comercial en polvo que presenta carbohidratos solubles a razón de 754 mg/gr del polvo seco, a diferencia de los extractos obtenidos por otros métodos que contienen carbohidratos solubles que varían de 188-477 mg/gr del extracto seco. Los carbohidratos reducidos y no reducidos también son mayores en el edulcorante comercial, aproximadamente 98mg y 656mg, respectivamente, con respecto a los extractos de la planta obtenidos por otros métodos, cuyos carbohidratos no reducidos

varían entre 35-82 mg y los carbohidratos reducidos entre 153-438 mg<sup>24</sup>.

En el metabolismo humano los glucósidos de esteviol no son absorbidos a nivel intestinal, pero la microflora del colon (*Bacterioides spp.*) hidroliza estas moléculas, que son absorbidas y por vía porta llegan al hígado para producir glucurónido de esteviol que se elimina por la orina.<sup>25</sup>

Al rebaudiósido A y al esteviol se le han atribuido propiedades tales como antihipertensivo, antidiabético, antiinflamatorio, antitumoral, antioxidante, antidiarreicos, antihiperlipemiantes, diuréticos, protector renal y gástrico, antiviral e inmunomoduladora; inclusive el esteviol puede actuar como transportador de drogas debido a sus características físico-químicas<sup>26,27</sup>. Sin embargo, la especie *S. rebaudiana* es la única a la que se le relaciona con propiedades antimicrobianas<sup>26,28-30</sup>.

Algunos estudios han documentado la actividad antimicrobiana de *S. rebaudiana*, como el realizado por Tomita *et al.*<sup>31</sup>, quienes observaron actividad bactericida de extractos de *S. rebaudiana* sobre *E. coli* enterohemorrágica O157:H7. También se comprobó la actividad antimicrobiana de esta planta contra *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *P. aeruginosa*, *A. niger* y *B. subtilis*<sup>29</sup>.

Además se ha documentado que el extracto crudo de hoja de *S. rebaudiana* obtenido mediante los disolventes metanol y cloroformo presenta actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *S. mutans*, *B. subtilis* y *E. coli*, comparable con concentraciones 1% de antimicrobianos como estreptomocina y nistatina<sup>30</sup>. Al parecer la propiedad antimicrobiana de esta planta está relacionada con el metabolito esteviósido.<sup>32</sup>

Gamboa y Chaves<sup>33</sup> evaluaron la actividad antimicrobiana de extractos de hojas de *S.*

*rebaudiana* sobre microorganismos cariogénicos y demostraron la propiedad antimicrobiana de diferentes extractos de esta planta sobre *Streptococcus* y *Lactobacillus*. Asimismo, se evidenció la actividad antimicrobiana del extracto de hojas de *S. rebaudiana* obtenido con acetona, metanol y etanol contra *S. mutans*; específicamente los extractos con acetona y metanol fueron más eficientes para la obtención del metabolito activo antimicrobiano<sup>34</sup>.

Una investigación más reciente también demostró que el extracto de *S. rebaudiana* obtenido con etanol presentó mayor propiedad antimicrobiana sobre *S. mutans*<sup>35</sup>, y en una biopelícula de *S. mutans* en condiciones *in vitro* se ha comprobado que este edulcorante natural interfiere en el metabolismo de carbohidratos de la bacteria y reduce la síntesis de polisacáridos extracelulares insolubles, lo que disminuye su virulencia<sup>36</sup>.

La presente investigación tiene como objetivo comparar el efecto de la glucosa y *Stevia rebaudiana* sobre el crecimiento de *S. mutans* y la concentración del pH extracelular en un medio axénico, lo cual podría sugerir información sobre la modificación del metabolismo del microorganismo y su potencial cariogénico en presencia de un edulcorante como *Stevia*.

## Materiales y métodos

El tipo de estudio llevado a cabo fue experimental, ya que se condujo bajo condiciones controladas, donde las variables independientes fueron manipuladas convenientemente para inducir una respuesta en escenarios previamente delineados y de interés para los investigadores; adicionalmente, el estudio fue de carácter longitudinal, ya que se tomaron varias mediciones a través del tiempo; es decir, se analizó la evolución del fenómeno de interés a lo largo de un período determinado.<sup>37</sup>

## Preparación de los cultivos de *Streptococcus mutans*

El ensayo de laboratorio se condujo con tres grupos experimentales o tratamientos, a saber: el grupo 1, formado por cultivo de *S. mutans* y *Stevia rebaudiana*; el grupo 2 representado por cultivo de *S. mutans* y glucosa; y el grupo 3 o control, el cual estuvo formado por cultivo de *S. mutans*; cada de uno de ellos con tres (3) repeticiones y cuatro (4) observaciones en el tiempo a las 0, 24, 48 y 72 horas; lo cual corresponde a un experimento con tres tratamientos, tres repeticiones y cuatro observaciones repetidas en el tiempo bajo un diseño de experimental completamente aleatorizado.

Los cultivos se prepararon a partir de la cepa liofilizada de *S. mutans* Clarke (ATCC® 25175™), la cual fue recuperada en caldo cerebro-corazón (BHI) OXOID® CM0225, el cual corresponde a una modificación de las formulaciones desarrolladas por Rosenow y Hayden<sup>38,39</sup>. El inóculo de *S. mutans* se preparó en tubos de ensayos para cultivos con tapa rosca 150×16 mm en 5 mL de caldo BHI a 37°C en condiciones de microaerofilia durante 24 horas. La recuperación de la cepa y pureza de cultivo se verificó con tinción de Gram y observación directa de la bacteria al microscopio óptico.

Los ensayos se realizaron en fiolas tipo *Erlenmeyer* de 250 mL con 80 mL de medio BHI, que se preparó de acuerdo a las indicaciones del fabricante y que se esterilizaron en autoclave durante 15 min a 121°C (15 libras de presión). En las fiolas del grupo 1 se agregaron una solución 8 mM del edulcorante de extracto de hoja de *Stevia rebaudiana* (Naturesweet® Universo Natural SAS, en polvo con 90% de pureza) y 0,5 unidades  $A_{600nm}$  del inóculo con *S. mutans*.

Las unidades de absorbancias se midieron mediante espectrofotometría (Spectronic 20®

Milton Roy Company). En las fiolas grupo 2 se agregaron 8 mM de glucosa y 0,5 unidades  $A_{600nm}$  del inóculo con *S. mutans*; y en las fiolas del grupo control se agregó solo 0,5 unidades  $A_{600nm}$  del inóculo con *S. mutans*. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 72 horas.

Es importante señalar que el caldo BHI contiene 2 g/L de glucosa; sin embargo, esto no constituye un problema para el tratamiento control, ya que el contenido basal de glucosa es el mismo para todos los tratamientos (se empleó la misma cantidad de BHI en todos los ensayos), por lo tanto el efecto de consumir esta cantidad del monosacárido por parte de *S. mutans* se autocorrigie.

En términos de modelos lineales podría escribirse o modelarse el efecto de cada tratamiento de la siguiente manera: sea  $\mu$  el efecto del contenido de glucosa basal del caldo BHI, sea  $\tau_1$  el efecto del tratamiento control,  $\tau_2$  el efecto de la glucosa añadida y  $\tau_3$  el efecto de la *Stevia rebaudiana*, (en términos generales sea  $\tau_i$ ,  $i = 1, 2, 3$ , el efecto de cada tratamiento),  $\varepsilon_{ij}$  el error aleatorio y  $y_{ij}$  la respuesta (crecimiento bacteriano o pH, en un instante cualquiera del experimento); en ese caso el modelo lineal quedaría establecido como:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Entonces, el efecto del contenido basal de glucosa  $\mu$  es constante para cualquier  $\tau_i$  y por ende, si bien se acepta que interviene en la respuesta, es importante destacar que interviene de la misma manera en todos los tratamientos, y dado que el análisis de varianza (ANOVA) está diseñado para probar el sistema de hipótesis:

$$\begin{cases} H_0: \tau_i = 0 & \text{para } i = 1, 2, 3 \\ H_1: \tau_i \neq \tau_j & \text{para algún } i \neq j \end{cases}$$

cuando se rechaza  $H_0$ , se está afirmando que al menos una par de los efectos de los tratamientos

$\tau_i$  fueron diferentes, siendo irrelevante en términos estadísticos y prácticos el efecto que haya podido tener  $\mu$ , ya que éste está contenido y autocorregido por el ANOVA durante el análisis.

### Determinación de crecimiento bacteriano y producción de ácidos de *Streptococcus mutans*

El crecimiento bacteriano se determinó con mediciones en los tres grupos experimentales de las unidades  $A_{600nm}$  en los instantes 0, 24, 48 y 72 horas, ya que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de los microorganismos.

La producción de ácidos del microorganismo se determinó con valores de pH en los instantes 0, 24, 48 y 72 horas, estos últimos se registraron con un peachímetro DM-23 Digimed® y un electrodo Sensorex® S200C en los tres grupos experimentales.

### Análisis estadístico

Sobre los resultados del ensayo se aplicó el ANOVA, tanto para el modelo completo con observaciones repetidas en el tiempo, como para las observaciones tomadas por separado a las 0, 24, 48 y 72 horas. Para el modelo completo se aplicó la prueba de esfericidad de Mauchly seguido del ANOVA multivariado corregido según el resultado de esta prueba. Para las observaciones tomadas por separado a las 0, 24, 48 y 72 horas se aplicó el ANOVA univariado ordinario. Las medias aritméticas de los tratamientos se compararon mediante la prueba de la diferencia honestamente significativa de Tukey. Para cada uno de los grupos experimentales considerados se calculó el coeficiente de correlación de Pearson entre las unidades  $A_{600nm}$  y pH, obtenidos durante la duración del ensayo a fin de verificar si las respuestas de estas variables están correlacionadas. Se trabajó al nivel de significación de 5%, por lo cual un resultado se

consideró estadísticamente significativo siempre que  $p \leq 0,05$ . Los datos se procesaron utilizando los programas estadísticos SPSS 21.0 y Minitab 16.0, ambos bajo ambiente Windows.

## Resultados

### Curvas de crecimiento bacteriano de *Streptococcus mutans*

La prueba de esfericidad de Mauchly indicó que la matriz de varianzas-covarianzas puede considerarse esférica ( $p=0,642$ ), por lo cual no fue necesario corregir el ANOVA; por otra parte,

este último indicó que hay diferencias significativas para el crecimiento bacteriano de los tratamientos ( $p < 0,001$ ), asimismo, tal crecimiento en forma general varió a través del tiempo ( $p < 0,001$ ), y el crecimiento no fue homogéneo para los tratamientos durante la duración del ensayo ( $p < 0,001$ ).

En forma general, el mayor crecimiento bacteriano se presentó en el grupo control, seguido del grupo 2, cultivo de *S. mutans* y glucosa; y por último, el grupo 1, cultivo de *S. mutans* y solución del edulcorante comercial de extracto de *Stevia rebaudiana*, (tabla 1).

**Tabla 1. Crecimiento bacteriano general [ $A_{600nm}$ ] clasificado por tratamientos.**

Tratamientos	n	Media aritmética ± Desviación estándar
<i>S. mutans</i> y <i>Stevia rebaudiana</i>	12	0,1535±0,0041 <sup>C</sup>
<i>S. mutans</i> y glucosa	12	0,2809±0,0034 <sup>B</sup>
Control	12	0,3032±0,0057 <sup>A</sup>
<i>F</i>		3026,26
<i>p</i>		<0,001

Nota: Tratamientos con igual letra no presentan diferencias estadísticamente significativas.

El comportamiento a través del tiempo del crecimiento bacteriano mantuvo la tendencia general observada en la tabla 1 a partir de las 48 horas, ya que de allí en adelante el grupo 1, cultivo de *S. mutans* y solución del edulcorante

comercial de extracto de *Stevia rebaudiana*, presentó menor crecimiento bacteriano que el grupo 2, cultivo de *S. mutans* y glucosa, y el grupo control, (tabla 2).

**Tabla 2. Crecimiento bacteriano [ $A_{600nm}$ ] clasificado por tratamientos y tiempo.**

Tratamientos	Media aritmética ± Desviación estándar							
	n	0h	n	24h	n	48h	n	72h
<i>S. mutans</i> y <i>Stevia rebaudiana</i>	3	0,0238±0,0004 <sup>B</sup>	3	0,2380±0,0050 <sup>C</sup>	3	0,1717±0,0047 <sup>C</sup>	3	0,1807±0,0045 <sup>C</sup>
<i>S. mutans</i> y glucosa	3	0,0238±0,0009 <sup>B</sup>	3	0,4060±0,0087 <sup>A</sup>	3	0,3470±0,0046 <sup>B</sup>	3	0,3470±0,0056 <sup>B</sup>
Control	3	0,0262±0,0004 <sup>A</sup>	3	0,3563±0,0051 <sup>B</sup>	3	0,4523±0,0035 <sup>A</sup>	3	0,3780±0,0027 <sup>A</sup>
<i>F</i>		16,25		526,49		3249,99		1737,47
<i>p</i>		0,004		<0,001		<0,001		<0,001

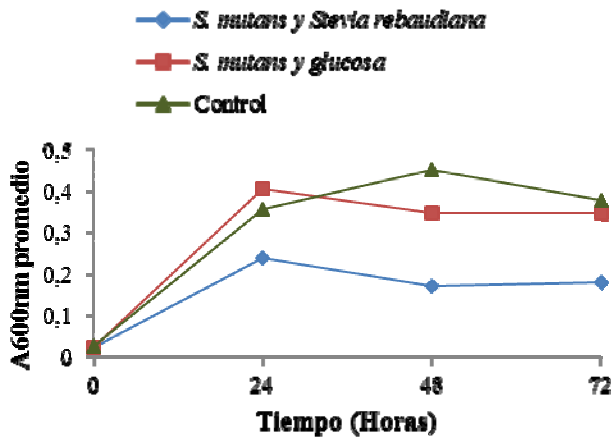
Nota: Tratamientos con igual letra no presentan diferencias estadísticamente significativas.

La figura 1 muestra las curvas promedio del crecimiento bacteriano para los tratamientos, en la misma se observa que los grupos 1 y 2

alcanzaron un máximo a las 24 horas, mientras que el grupo control lo alcanzó a las 48 horas; asimismo, los grupos 1 y 2 mostraron un

crecimiento bacteriano estacionario para 48 y 72 horas.

**Figura 1.** Curva de crecimiento de los cultivos de *Streptococcus mutans* de los tres grupos en caldo BHI a 37°C durante 72 horas.



La prueba de esfericidad de Mauchly indicó que la matriz de varianzas-covarianzas puede considerarse esférica ( $p=0,170$ ), por lo cual no fue necesario corregir el ANOVA; por otra parte, este último indicó que hay diferencias significativas para el pH de los tratamientos ( $p<0,001$ ), asimismo, tal pH en forma general varió a través del tiempo ( $p<0,001$ ), y éste no fue

homogéneo para los tratamientos durante la duración del ensayo ( $p<0,001$ ).

En términos generales, el grupo control y el grupo 2, cultivo de *S. mutans* y glucosa, mostraron pH homogéneo entre sí y el grupo 1, cultivo de *S. mutans* y solución del edulcorante comercial de extracto de *Stevia rebaudiana*, mostró menor pH que éstos, (tabla 3).

Tabla 3. pH clasificado por tratamientos.

Tratamientos	n	Media aritmética ± Desviación estándar
<i>S. mutans</i> y <i>Stevia rebaudiana</i>	12	4,93±0,15 <sup>B</sup>
<i>S. mutans</i> y glucosa	12	5,38±0,09 <sup>A</sup>
Control	12	5,48±0,19 <sup>A</sup>
<i>F</i>		46,06
<i>p</i>		<0,001

Nota: Tratamientos con igual letra no presentan diferencias estadísticamente significativas.

El comportamiento del pH a través del tiempo indicó que los grupos empezaron a diferenciarse a partir de las 24 horas, para estabilizarse mostrando el comportamiento general observado en la tabla 3 a partir de las 48 horas, es decir, el grupo 1 mostró el menor pH, y los grupos control y grupo 2 mostraron pH homogéneos entre sí y superiores al grupo 1, (tabla 4).

Tabla 4. pH clasificado por tratamientos y tiempo.

Tratamientos	Media aritmética ± Desviación estándar							
	n	0h	n	24h	n	48h	n	72h
<i>S. mutans</i> y <i>Stevia rebaudiana</i>	3	7,04±0,24 <sup>A</sup>	3	4,66±0,13 <sup>B</sup>	3	3,54±0,12 <sup>B</sup>	3	4,48±0,03 <sup>B</sup>
<i>S. mutans</i> y glucosa	3	7,00±0,17 <sup>A</sup>	3	4,89±0,03 <sup>AB</sup>	3	4,47±0,03 <sup>A</sup>	3	5,16±0,06 <sup>A</sup>
Control	3	7,02±0,13 <sup>A</sup>	3	4,98±0,15 <sup>A</sup>	3	4,76±0,33 <sup>A</sup>	3	5,14±0,05 <sup>A</sup>
<i>F</i>		0,03		6,25		29,66		197,18
<i>p</i>		0,972		0,034		0,001		<0,001

Nota: Tratamientos con igual letra no presentan diferencias estadísticamente significativas.

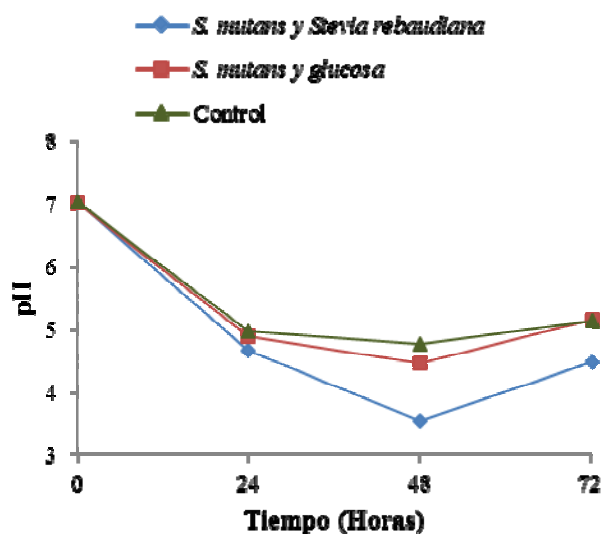
La figura 2 indica que todos los tratamientos alcanzaron el pH mínimo a las 48 horas, para presentar una tendencia a aumentar a las 72

horas; sin embargo, se observa que la tendencia a presentar el menor pH ocurrió en el grupo 1 a partir de las 24 horas con valores inferiores a 5 y



a las 48 horas pH menor 4, valores potencialmente cariogénicos.

**Figura 2.** Registro de pH de los cultivos de *Streptococcus mutans* de los tres grupos en caldo BHI a 37°C durante 72 horas.



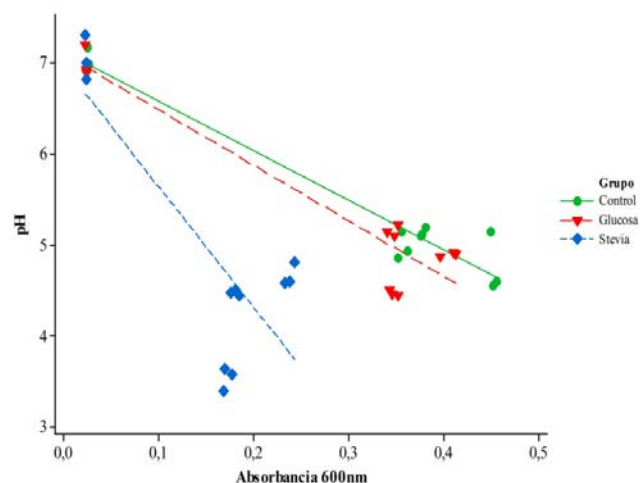
### Asociación entre unidades $A_{600nm}$ y pH

Se encontró asociación estadísticamente significativa entre las unidades  $A_{600nm}$  y pH para todos los grupos experimentales. En el grupo control el coeficiente de correlación de Pearson fue  $r=-0,977$ , ( $p<0,001$ ); para el grupo cultivo de *S. mutans* y glucosa,  $r=-0,946$ , ( $p<0,001$ ); y para el grupo cultivo de *S. mutans* y solución del edulcorante comercial de extracto de *Stevia rebaudiana*  $r=-0,812$ , ( $p=0,001$ ).

Todas las asociaciones encontradas indicaron una relación inversamente proporcional entre  $A_{600nm}$  y pH, lo cual indica que en la medida que es mayor la población *S. mutans* en el medio, menor es el pH de éste; asimismo, la figura 3 muestra que esta relación fue bastante similar entre el grupo control y el grupo cultivo de *S. mutans* y glucosa, y más pronunciada en el grupo

cultivo de *S. mutans* y solución del edulcorante comercial de extracto de *Stevia rebaudiana*.

**Figura 3.** Gráficas de dispersión y líneas de tendencia para  $A_{600nm}$  y pH clasificados por grupo experimental.



### Discusión

*S. mutans* expresa proteínas como los transportadores inducibles para carbohidratos específicos y cinco tipos de transportadores de PEP-PTS, que permiten la absorción inmediata de una gran variedad de carbohidratos tales como glucosa, fructosa, maltosa, sacarosa, lactosa, celobiosa, rafinosa, maltotriosa, estaquiosa y manitol, entre otros; los cuales son incorporados al metabolismo bacteriano<sup>40</sup>. Además, el proteoma bacteriano presenta exoenzimas del metabolismo de los carbohidratos para la síntesis de polisacáridos extracelulares solubles e insolubles (glucanos y fructanos), que le confieren propiedades de virulencia a *S. mutans*; y enzimas de rutas intracelulares para el anabolismo y síntesis de polisacáridos u oxidación de monosacáridos con la consecuente producción de ácidos<sup>5,6,41,42</sup>.

En el presente estudio se evidenció mayor crecimiento de *S. mutans* para el grupo control, de forma similar a la reportada por Romero *et al.*<sup>43</sup> y Leitão *et al.*<sup>44</sup>, al parecer los ingredientes presentes en BHI contienen suficientes biomoléculas, oligoelementos, coenzimas, componentes iónicos y energéticos a pH adecuado que sustentan la proliferación de *S. mutans* por un lapso más prolongado que en los grupos a los que además del medio BHI se les añadió glucosa o el edulcorante comercial a base de *Stevia*. En el caso de los cultivos a los que se les añadió glucosa, la etapa de crecimiento exponencial fue más corta que la registrada en los ensayos del grupo control, aunque las primeras 24 horas se evidenció un mayor crecimiento del microorganismo<sup>45</sup>, probablemente se debe a que *S. mutans* se adaptó a un medio con mayor concentración de glucosa, lo que afecta de manera importante el metabolismo bacteriano, ya que se aumenta la transcripción de algunos genes que incrementan el transporte y fosforilación de la glucosa y se reprimen otros genes asociados con el catabolismo de otros carbohidratos disponibles que no son preferidos por el microorganismo<sup>16</sup>.

La glucosa es utilizada como sustrato para formar los polímeros extracelulares como los glucanos, y como fuente de energía y carbono intracelular, por lo cual este monosacárido ingresa al *S. mutans* mediante varios sistemas, uno dependiente de PEP-PTS y otros independientes de este, para incorporarse en la vía de la glicólisis a nivel citoplasmático y en la síntesis de polisacáridos intracelulares, hasta que se agota<sup>15,17,40</sup>.

No obstante, en los cultivos con edulcorante comercial de extracto de hojas de *Stevia rebaudiana* se observó el menor crecimiento del microorganismo entre los grupos estudiados, aunque no tuvo un efecto bactericida, este resultado fue similar a los observados por Giacaman *et al.*<sup>36</sup>, Debnath<sup>32</sup>, Brambilla *et al.*<sup>46</sup> y

Ajagannanavar *et al.*<sup>47</sup>, lo cual está relacionado con algunos fitoquímicos presentes en esta planta, entre los que se han identificado: ácido ursólico y ácido oleanólico, ácido gálico, ácido tánico y polifenoles, los cuales disminuyen la formación y propiedades de adherencia de los polisacáridos extracelulares de *S. mutans*; por lo tanto, estas moléculas afectan la actividad catalítica de GTFb y GTFc; además, flavonoides como miricetin y procianidina A2 actúan sobre ATPasa e interrumpen la caída del pH glicolítico intracelular<sup>48</sup>. Por otra parte, algunos estudios han demostrado que la actividad antibacteriana de *Stevia rebaudiana* depende del tipo de extracto obtenido a partir de las hojas<sup>33-35</sup>. Entre los extractos de la planta con mayor actividad antibacteriana se han reportado: el extracto de cloroformo que contiene altas concentraciones de alcaloides, el extracto de hexano con altas concentraciones de alcaloides y esteroides, el extracto de metanol, con moderada cantidad de flavonoides y esteroides y el extracto de etanol, del cual se han obtenido flavonoides, fenoles, esteroides y taninos<sup>49</sup>. Los cultivos con edulcorante comercial de extracto de hojas de *Stevia rebaudiana* de la presente investigación presentaron el mismo patrón de la etapa exponencial y estacionaria que los cultivos a los que se les agregó glucosa, pero con menos crecimiento bacteriano, lo cual probablemente se debe a que se estimula la misma expresión genética pero el funcionamiento metabólico está más limitado por la disminución de la actividad de ATPasa de *S. mutans*<sup>48</sup>, lo que impide mantener la homeostasis pH intracelular; es decir, que de manera progresiva disminuye el pH intracelular y en consecuencia disminuye la actividad biológica de la batería enzimática de la bacteria<sup>50</sup>, lo que podría explicar el efecto de la *Stevia* en la síntesis disminuida de los polisacáridos extracelulares<sup>33,36,46</sup>.

Adicionalmente, en los cultivos con edulcorante comercial de extractos de hojas de *Stevia rebaudiana*, se registró el menor pH extracelular, el cual disminuyó hasta la etapa de crecimiento

estacionario del cultivo bacteriano, ciertamente los medios de cultivo de los otros 2 grupos estudiados también presentaron pH ácido, aunque superior, pero con un patrón de comportamiento similar; es decir, disminuyó el pH hasta la etapa estacionaria. Por lo cual, se encontró asociación significativa entre la proliferación bacteriana y pH extracelular en los 3 grupos de cultivos bacterianos. Esto se atribuye a la acumulación y liberación de metabolitos secundarios, principalmente ácido láctico de *S. mutans*, el cual presenta características acidófila, acidogénica y acidúrica<sup>5,6,17,30</sup>. El efecto acidogénico de *Stevia* sobre *S. mutans* también fue reportado por Giacaman *et al.*<sup>36</sup>, aunque la fructosa y la sacarosa inducen mayor acidogenicidad en la bacteria que la *Stevia*. Lo cual coincide con el estudio realizado por Rezaei-Soufi *et al.*<sup>51</sup> en el que se demostró que la glucosa y la fructosa causan mayor desmineralización en el esmalte que los extractos de hojas de *Stevia rebaudiana*. Por otra parte, en el presente estudio se registraron cultivos con valores de pH<5, que se han relacionado con la alteración del equilibrio del componente mineral del esmalte<sup>11,13,52</sup>, específicamente los cultivos con el edulcorante comercial de extracto de hojas de *Stevia rebaudiana* probablemente presentaron mayor presencia de ácidos extracelulares, como consecuencia de la producción bacteriana y de la liberación del contenido citoplasmático por la muerte bacteriana inducida por la acidificación intracelular no compensada por la bomba H<sup>+</sup>/ATPasa.

## Conclusiones

En la presente investigación se demostró que los cultivos de *S. mutans* con edulcorante comercial de extracto de hoja de *Stevia rebaudiana* mostraron menor proliferación en el crecimiento bacteriano, relacionado con los fitoquímicos presentes en la planta; asimismo, se demostró

que los cultivos con *Stevia* presentaron pH potencialmente cariogénico y que en condiciones *in vivo* podría favorecer la desmineralización del esmalte.

## Referencias

1. Nibali L, Donos N, Henderson B. Periodontal infectogenomics. *J Med Microbiol* 2009; 58(10):1269-74.
2. Samaranayake L, Matsubara VH. Normal oral flora and the oral ecosystem. *Dent Clin N Am* 2017; 61(2):199-215.
3. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8(9):623-33.
4. Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation - new insight. *J Dent Res* 2006; 85(10):878-87.
5. Díaz-Garrido N, Lozano C, Giacaman RA. Frequency of sucrose exposure on the cariogenicity of a biofilm-caries model. *Eur J Dent* 2016; 10(3):345-50.
6. Figueroa M, Acevedo AM, Alonso G. Microorganismos presentes en las diferentes etapas de la progresión de la lesión de caries dental. *Acta Odontol Venez* 2009; 47(1):227-40.
7. Klein MI, Hwang G, Santos PHS, Campanella OH, Koo H. *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Front Cell Infect Microbiol* 2015; 13(5):10.
8. Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res* 2004; 38(3):182-91.
9. Linossier AC, Valenzuela CY, Soler ER, Contreras EM. Colonización de la cavidad oral por *Streptococcus* grupo *mutans*, según edad, evaluado en saliva por un método



- semi-cuantitativo. *Rev Chil Infectol* 2011; 28(3):230-7.
10. Toit MD, Huch M, Cho GS, Franz CMAP. The family *Streptococcaceae*. In: Lactic acid bacteria: Biodiversity and taxonomy. Holzappel WH, Wood BJB, Eds.; John Wiley & Sons, Ltd.: New York, NY, USA, 2014; pp. 445-446.
  11. Rojas-Sánchez F. Algunas consideraciones sobre caries dental, fluoruros, su metabolismo y mecanismos de acción. *Acta odontol. venez* 2008; 46(4):509-16.
  12. Ojeda-Garcés JC, Oviedo-García E, Salas LA. *Streptococcus mutans* y caries dental. *Rev CES odontol* 2013; 26(1):44-56.
  13. Gamboa Jaimes FO. Identificación y caracterización microbiológica, fenotípica y genotípica del *Streptococcus mutans*: experiencias de investigación. *Universitas Odontologica* 2015; 33(71):76-84.
  14. Nakano K, Nomura R, Nakagawa I, Hamada S, Ooshima T. Demonstration of *Streptococcus mutans* with a cell wall polysaccharide specific to a new serotype, *k*, in the human oral cavity. *J Clin Microbiol* 2004; 42(1):198-202.
  15. Marsh P, Martin M. *Microbiología oral*. 5 ed. Almoca, Actualidades Médicas CA: 2011; pp. 63-69.
  16. Moye ZD, Zeng L, Burne RA. Fueling the caries process: carbohydrate metabolism and gene regulation by *Streptococcus mutans*. *J Oral Microbiol* 2014; 6(1).
  17. Kawada-Matsuo M, Oogai Y, Komatsuzawa H. Sugar allocation to metabolic pathways is tightly regulated and affects the virulence of *Streptococcus mutans*. *Genes (Basel)* 2017; 8(1):11.
  18. GRAS Associates LLC. Purified steviol glycosides with rebaudioside A and stevioside as the principal components. [Internet]: [Citado el 03 de mayo de 2016]. Disponible en: <https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm181937.htm>
  19. Morlock GE, Meyer S, Zimmermann BF, Roussel JM. High-performance thin-layer chromatography analysis of steviol glycosides in *Stevia* formulations and sugar-free food products, and benchmarking with (ultra) high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 2014; 1350:102-11.
  20. Lemus-Mondaca R, Vega-Gálvez A, Zura-Bravo L, Ah-Hen K. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry* 2012; 132(3):1121-32.
  21. López Díaz MT, Medán Robledo E, Gilabert Santos JA, Encinas Cerezo T. De la stevia al E-960: un dulce camino. *REDUCA* 2014; 6(1):305-11.
  22. Aminha S, Soumya AN, Raju VG, Goud BM, Irfath M, Quadri SAP. Isolation and extraction of artificial sweetener (*Stevia*). *World J Pharm Res* 2014; 3:481-6.
  23. Contreras MS. Anticariogenic properties and effects on periodontal structures of *stevia rebaudiana* Bertoni. Narrative Review. *J Oral Res* 2013; 2(3):158-66.
  24. Howlader MS, Ahmed SR, Kubra K, Bhuiyan KH. Biochemical and phytochemical evaluation of *Stevia rebaudiana*. *Asian J Med Biol Res* 2016; 2(1):121-30.
  25. Geuns JMC, Buyse J, Vankeirsbilck A, Temme EHM. Metabolism of stevioside by healthy subjects. *Exp Biol Med* 2007; 232(1):164-73.
  26. Ferrazzano GF, Cantile T, Alcidi B, Coda M, Ingenito A, Zarrelli A *et al.* Is *Stevia rebaudiana* Bertoni a non cariogenic sweetener? A review. *Molecules*. 2015; 21(1):E38.



27. Goyal SK, Samsner, Goyal RK. *Stevia rebaudiana* a bio-sweetener. *Int J Food Sci Nutr* 2010; 61(1):1-10.
28. Vitery Sapuyes GR, Escribano Vargas S, Gamboa Jaimes FO, Chavarria Bolaños N, Gómez Scarpetta RA. Actividad inhibitoria de la *Stevia rebaudiana* sobre el *Lactobacillus acidophilus* y el *Streptococcus mutans*. *Rev Nal Odo UCC* 2010; 6(10):57-64.
29. Tadhani MB, Subhash R. *In vitro* antimicrobial activity of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Trop J Pharm Res* 2006; 5(1):557-60.
30. Matsukubo T, Takazoe I. Sucrose substitutes and their role in caries prevention. *Int Dent J* 2006; 56(3):119-30.
31. Tomita T, Sato N, Arai T, Shiraishi H, Sato M, Takeuchi M *et al.* Bactericidal activity of a fermented hot-water extract from *Stevia rebaudiana* Bertoni towards enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and other food-borne pathogenic bacteria. *Microbiol Immunol* 1997; 41(12):1005-9.
32. Debnath M. Clonal propagation and antimicrobial activity on an endemic medicinal plant *Stevia rebaudiana*. *J Med Plant Res* 2008; 2(2):45-51.
33. Gamboa F, Chaves M. Antimicrobial potential of extracts from *Stevia rebaudiana* leaves against bacteria of importance in dental caries. *Acta Odontol Latinoam* 2012; 25(2):171-5.
34. Mohammadi-Sichani M, Karbasizadeh V, Aghai F, Mofid MR. Effect of different extracts of *Stevia rebaudiana* leaves on *Streptococcus mutans* growth. *J Med Plant Res* 2012; 6(32):4731-4.
35. Chakravarthy Y, Hussain A. Antimicrobial efficacy of *Stevia rebaudiana* on *Streptococcus mutans* using three different solvents - an *in vitro* comparative study. *Int J Pharmacol Res* 2016; 6(3):152-7.
36. Giacaman, RA, Campos P, Muñoz-Sandoval C, Castro RJ. Cariogenic potential of commercial sweeteners in an experimental biofilm caries model on enamel. *Arch Oral Biol* 2013; 58(9):1116-22.
37. Rodríguez D, Valldeoriola J. Metodología de la investigación. Universitat Oberta de Catalunya, España. 2007. [Internet]: [Citado el 19 de febrero de 2017]. Disponible en: [http://zanadoria.com/syllabi/m1019/mat\\_cas\\_t-nodef/PID\\_00148556-1.pdf](http://zanadoria.com/syllabi/m1019/mat_cas_t-nodef/PID_00148556-1.pdf)
38. Hayden RL. Elective localization in the eye of bacteria from infected teeth. *Arch Int Med* 1923; 32:828-49.
39. Rosenow EC. Studies on elective localization. *J Dent Res* 1919; 1:205-49.
40. Ajdić D, Pham VTT. Global transcriptional analysis of *Streptococcus mutans* sugar transporters using microarrays. *J Bacteriol* 2007; 189(14):5049-59.
41. Ajdić D, McShan WM, McLaughlin RE, Savić G, Chang J, Carson MB *et al.* Genome Sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(22):14434-9.
42. Len AC, Harty DW, Jacques NA. Proteome analysis of *Streptococcus mutans* metabolic phenotype during acid tolerance. *Microbiology* 2004; 150(5):1353-66.
43. Romero MY, Hernández Y, Gil M. Actividad inhibitoria de la *Matricaria recutita* “Manzanilla alemana” sobre el *Streptococcus mutans*. *Rev Latinoam Ortod Odontopediat* 2009. [Internet]: [Citado el 15 de julio de 2016]. Disponible en: <http://www.ortodoncia.ws/publicaciones/2009/art1.asp>
44. Leitão DP, da Silva AA, Polizello ACM, Bastos JK, Spadaro ACC. Comparative evaluation of *in-vitro* effects of Brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. *Biol Pharm Bull* 2004; 27(11):1834-9.



45. Zeng L, Burne RA. Multiple sugar: phosphotransferase system permeases participate in catabolite modification of gene expression in *Streptococcus mutans*. Mol Microbiol 2008; 70(1):197-208.
46. Brambilla E, Cagetti MG, Ionescu A, Campus G, Lingström P. An *in vitro* and *in vivo* comparison of the effect of *Stevia rebaudiana* extracts on different caries-related variables: a randomized controlled trial pilot study. Caries Res 2014; 48(1):19-23.
47. Ajagannanavar SL, Shamarao S, Battur H, Tikare S, Al-Kheraif AA, Al Sayed MS. Effect of aqueous and alcoholic *Stevia rebaudiana* extracts against *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus* in comparison to chlorhexidine: An *in vitro* study. J Int Soc Prev Community Dent 2014; 4(Suppl 2):S116-21.
48. Abachi S, Lee S, Rupasinghe HP. Molecular mechanisms of inhibition of *Streptococcus* species by phytochemicals. Molecules 2016; 21(2):E215.
49. Preethi D, Sridhar TM, Josthna P, Naidu CV. Studies on antibacterial activity, phytochemical analysis of *Stevia rebaudiana* (Bert.) - An important calorie free biosweetener. J Ecobiotechnol 2011; 3(7):5-10
50. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. J Dent Res 2011; 90(3):294-303.
51. Rezaei-Soufi L, Raedi S, Alikhani MY, Vahdatinia F, Farazyani A, Hosseini SM *et al*. Comparison the effect of stevia extract with glucose and fructose on dental enamel caries formation. J Chem Pharm Sci 2016; 9(2):685-9.
52. Nuñez DP, García Bacallao L. Bioquímica de la caries dental. Rev Haban Cienc Med 2010; 9(2):156-66.

