

**UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO**

**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA**

**ESCUELA DE ESTOMATOLOGÍA**



**“EFECTO *IN VITRO* DE BEBIDAS CARBONATADAS CON EDULCORANTES  
CALÓRICOS Y ACALÓRICOS SOBRE *STREPTOCOCCUS MUTANS ATCC*  
*25175*”.**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE CIRUJANO DENTISTA**

**AUTOR: Esteban Jhordy Maldonado Orihuela.**

**ASESOR: Dr. José Guillermo Gonzales Cabeza.**

**Trujillo – Perú**

**2017**

## DEDICATORIA

A Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de la carrera, por ser mi fortaleza en mis momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

A mis padres y hermanos, quienes son mi guía y el camino para poder cumplir cada meta trazada; que con su ejemplo, dedicación y palabras de aliento nunca bajaron los brazos para que yo tampoco lo haga aun cuando todo se complicaba.

Los amo.

Esteban M.O.

## **AGRADECIMIENTOS**

Un agradecimiento especial a mi madre Nieves Orihuela Bravo y a mi padre Esteban Maldonado Limas, que nunca dejaron de ayudarme, que hasta en la cosa más mínima estuvieron preocupados por mi carrera y que pudiera culminar con éxito.

A mi asesor, Dr. José Guillermo Gonzales Cabeza, por su apoyo y dedicación para el desarrollo y realización del presente estudio.

Al personal que labora en el laboratorio de Investigación de Microbiología Molecular y Biotecnología del Departamento Académico de Ciencias, de la Universidad Privada Antenor Orrego por brindarme su ayuda.

Esteban M.O.

## ÍNDICE

DEDICATORIA .....	i
AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN .....	iv
ABSTRACT .....	vi
I. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. FUNDAMENTO TEÓRICO: .....	1
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA .....	5
1.3. HIPÓTESIS.....	5
1.4. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN .....	5
II. DISEÑO METODOLÓGICO.....	6
2.1. MATERIAL DE ESTUDIO.....	6
2.2. MÉTODOS, TÉCNICAS E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	8
2.3. VARIABLES Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES .....	15
2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA INFORMACION.....	16
III. RESULTADOS.....	17
IV. DISCUSIÓN .....	41
V. CONCLUSIONES .....	45
VI. RECOMENDACIONES .....	46
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	47
VIII. ANEXOS .....	50

## RESUMEN

**OBJETIVO:** Determinar el efecto *in vitro* de bebidas carbonatadas con edulcorantes calóricos y acalóricos sobre el *Streptococcus mutans ATCC 25175*.

**MATERIALES Y MÉTODOS:** El estudio prospectivo, longitudinal, comparativo y experimental. La muestra estuvo constituida por 176 tubos de ensayo. Conteniendo la macrodilución de las bebidas carbonatadas y *Streptococcus mutans ATCC 25175* en caldo Infusión cerebro corazón (BHI). El efecto de las bebidas carbonatas sobre el *Streptococcus mutans ATCC 25175*, se determinó a través de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA que fue completada con la prueba de DUNCAN.

**RESULTADOS:** Las bebidas carbonatadas con edulcorantes calóricos mostraron que en casi todas las concentraciones ensayadas, los datos obtenidos son muy superiores al control positivo; encontrando la CMI en el 50% para la Coca Cola (original), mientras que para la bebida Inca Kola (original), la CMI se halló en el 25%. Contrariamente, la presentación (zero) de las bebidas carbonatadas con edulcorantes acalóricos estudiados, Coca Cola e Inca Kola, los datos obtenidos de la espectrofotometría estuvieron por debajo del control positivo, por lo que no fue posible encontrar la CMI.

**CONCLUSIÓN:** Las bebidas carbonatadas con edulcorantes calóricos, en la mayoría de las concentraciones trabajadas, estimulan al crecimiento *in vitro* del *Streptococcus mutans ATCC 25175*. Mientras que para las bebidas carbonatadas con edulcorantes acalóricos, todas las concentraciones estudiadas disminuyeron el crecimiento *in vitro* del *Streptococcus mutans ATCC 25175*.

**PALABRAS CLAVE:** Bebidas carbonatadas, edulcorantes, efecto inhibitorio, *Streptococcus mutans*.

## ABSTRACT

**OBJECTIVE:** To determine the *in vitro* effect of carbonated beverages with caloric and no caloric sweeteners on *Streptococcus mutans ATCC 25175*.

**MATERIALS AND METHODS:** The prospective, longitudinal, comparative and experimental study. The sample consisted of 176 test tubes. Contents of macrodilution of carbonated beverages and *Streptococcus mutans ATCC 25175* in Broth Heart Infusion (BHI). The effect of carbonated beverages on *Streptococcus mutans ATCC 25175* was determined through the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). Statistical analysis was performed using the ANOVA test that was completed with the DUNCAN test.

**RESULTS:** Carbonated beverages with caloric sweeteners showed that in almost all the concentrations tested, the data obtained are much higher than the positive control; Finding the MIC at 50% for Coca Cola (original), while for the Inca Kola beverage (original), the MIC was found at 25%. In contrast, the (zero) presentation of carbonated beverages with no caloric sweeteners studied, Coca Cola and Inca Kola, the data obtained from the spectrophotometry were below the positive control, so it was not possible to find the MIC.

**CONCLUSION:** Carbonated beverages with caloric sweeteners at most concentrations worked up stimulated the *in vitro* growth of *Streptococcus mutans ATCC 25175*. While for carbonated beverages with no caloric sweeteners, all concentrations studied decrease the *in vitro* growth of *Streptococcus mutans ATCC 25175*.

**Key words:** Carbonated beverages, sweeteners, inhibitory effect, and *Streptococcus mutans*.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 FUNDAMENTO TEÓRICO:

Debido a la importancia creciente que va adquiriendo el consumo de productos edulcorados naturalmente y artificialmente, y puesto que no existen estudios donde se evalúe la efecto de bebidas carbonatadas con edulcorantes calóricos y acalóricos sobre *Streptococcus mutans*, es que se decide realizar la presente investigación.

La caries constituye un problema de salud pública en numerosos países. En poblaciones latinoamericanas la incidencia y prevalencia de esta enfermedad suele ser más elevada<sup>1</sup>. La caries dental es la enfermedad bucal más común del hombre actual, la OMS considera que del 60 al 90% de la población presenta caries. Cambios en los hábitos de higiene y de alimentación han provocado que aumente la prevalencia de la caries<sup>2</sup>. Los factores dietarios incluyen la cantidad de azúcar consumida, concentración de azúcar del alimento, forma física del carbohidrato, retención oral, frecuencia de comer alimentos y golosinas, intervalo de tiempo entre el comer y la secuencia del consumo de alimento<sup>3</sup>.

La microbiota oral se caracteriza por ser extraordinariamente compleja en géneros y especies. Según muchos investigadores señalan que existen más de 600 especies bacterianas en el ambiente oral. Entre los principales microorganismos asociados a la producción de caries es encuentra el *Streptococcus Mutans*<sup>4</sup>.

El *Streptococcus Mutans* fue aislado e identificado por Clarke, en 1924. Lo denominó *Streptococcus Mutans* por las formas mutantes en que se presenta<sup>4</sup>. Los Streptococcus son cocos Gram positivos agrupados en pares o cadenas, no esporulados e inmóviles que presentan un metabolismo fermentativo, Son además, anaerobios facultativos<sup>5</sup>.

*Streptococcus mutans* produce ácido láctico, ácido propiónico, ácido acético y ácido fórmico cuando metaboliza carbohidratos fermentables como la sacarosa, glucosa y fructosa. Estos ácidos circulan a través de la placa dental hacia el esmalte poroso, disociándose y liberando hidrogeniones, los cuales disuelven rápidamente el mineral del esmalte, generando calcio y fosfato, los cuales a su vez, difunden fuera del esmalte. Este proceso se conoce como desmineralización del esmalte dental que es el paso inicial en lesiones de caries dental<sup>6,7</sup>.

Cuando la desmineralización predomina, la lesión cariosa produce una cavidad, pero la remineralización continuamente estimulada puede detenerla, teniendo entonces lesiones activas versus inactivas. La remineralización convierte a estas últimas, en alteraciones que no requieren de tratamiento invasivo, ya que sólo necesitan de medidas que estimulen el proceso de remineralización<sup>8</sup>.

Las bacterias cariogénicas necesitan hidratos de carbono simples para producir los ácidos orgánicos que inician el proceso de caries en el esmalte por lo que la preocupación es que una mayor ingesta de bebidas que contienen azúcar puede aumentar el riesgo de desarrollar caries dental<sup>9</sup>.

Las bebidas carbonatadas (también llamada refresco, bebida gaseosa o soda) contienen típicamente agua carbonatada, saborizante y edulcorantes naturales o artificiales. También pueden contener cafeína, colorantes, conservantes y otros ingredientes<sup>10,11</sup>.

Estas bebidas suelen consumirse frías, para que sean más refrescantes y se evite la pérdida del dióxido de carbono, que le otorga la efervescencia. El agua carbonatada, es un agua que contiene ácido carbónico ( $H_2CO_3$ ) que, al ser inestable, se descompone fácilmente en agua y dióxido de carbono ( $CO_2$ ), el cual sale en forma de burbujas cuando la bebida se despresuriza<sup>10</sup>.



En el Perú el consumo de bebidas carbonatadas (gaseosas) se ha incrementado en los últimos años, para ubicarnos dentro del consumo actual, tenemos como la bebida más consumida a Inca Kola con 37% dejando en segundo lugar a Coca-Cola con 25%. Otra marca ya asentada con la tercera dentro del mercado peruano es Kola Real con 16%<sup>12</sup>.

El termino edulcorante, hace referencia a aquel aditivo que proporciona dulzura a los alimentos. Algunos de ellos son extractos naturales mientras que otros son sintéticos, en este último caso se denomina edulcorantes artificiales<sup>13,14</sup>.

En las bebidas gaseosas el edulcorante puede ser azúcar, jarabe de maíz alto en fructosa, zumo de fruta, etc<sup>11</sup>. Una bebida típica contendría alrededor de 10-12,5% w / v de sacarosa o fructosa<sup>15</sup>.

La sacarosa es uno de los azúcares más cariogénicos, porque su fermentación produce grandes cantidades de ácido dentro del biofilm, también produce disminución del ph bucal y consecuentemente en la cariogenicidad de los agregados microbianos en los dientes<sup>16, 17</sup>.

Los edulcorantes artificiales más utilizados en estas bebidas son: sacarina, ciclamatos, aspartamo, acesulfamo K, y sucralosa<sup>4</sup>. Estos pueden poseer un mayor poder endulzante que la sacarosa (30 a 300 veces) pero con escaso aporte calórico<sup>18</sup>.

Cada vez más se emplean los edulcorantes artificiales acalóricos que busca la disminución del valor calórica total de la dieta, promover un descenso del peso corporal y/o prevenir el desarrollo de enfermedades como la diabetes o la caries dental<sup>7, 13, 15, 19</sup>.

No se encontraron estudios semejantes al nuestro, sin embargo se citan algunas investigaciones sobre edulcorantes frente al *Streptococcus mutans*.

Pérez R y Carrasco M (2006) Observaron el crecimiento *in vitro* de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus* en una solución con edulcorantes xilitol, aspartame, sucralosa y sacarina sódica en concentración de 5% y compararlo con dos grupos control sacarosa y sin endulzante. Utilizaron 30 tubos con *Streptococcus mutans* y 30 con *Lactobacillus acidophilus*. El crecimiento de bacterias fue medida en un espectrofotómetro calibrado. Los resultados de este estudio indicaron que los edulcorantes son efectivos para la reducción del crecimiento *in vitro* de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidiphilus* son el xilitol y sacarina sódica mientras que el aspartame y sucralosa lo estimulan <sup>5</sup>.

Das S y col (1991) evaluaron el aspartamo y la caries dental en ratas. Se ensayó en 60 crías de ratas que dieron positivos a *Streptococcus mutans* el cual se dividieron al azar en 6 grupos de 10. Las ratas se alimentaron de acuerdo al grupo designado, Grupo1: 50% de sacarosa; Grupo2: 30% de sacarosa; Grupo3: 30% de sacarosa + 0,15% de aspartamo; Grupo4: 0,30% de aspartamo; Grupo5: 0,15% de aspartamo y Grupo6: sin adición. Se encontró que el grupo3 de dieta redujo significativamente la caries en comparación con las ratas alimentadas con dieta Grupo2. En los animales alimentados sólo con aspartamo, no había caries. La diferencia fue significativa<sup>20</sup>.

Las bebidas carbonatadas son cada vez más populares, sin embargo, muchos de estos productos están endulzadas con azúcar y edulcorantes artificiales acalóricos. Por lo tanto, esta investigación tuvo como propósito evaluar el efecto *in vitro* de bebidas carbonatadas (Original y Zero), sobre *Streptococcus mutans*, a fin de generar nuevo conocimiento sobre el efecto que podría producir en la cavidad oral estos tipos de bebidas de consumo frecuente en consumidores habituales de estos, siendo los principales los niños y jóvenes; acompañado de una mala higiene.

## 1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cuál será el efecto *in vitro* de bebidas carbonatadas con edulcorantes calóricos y acalóricos sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175?

## 1.3 HIPÓTESIS

Existe diferencia sobre el crecimiento del *Streptococcus mutans* ATCC 25175 entre bebidas carbonatadas calóricas y bebidas carbonatadas acalóricas.

## 1.4 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

### 1.4.1 Objetivo General:

Determinar el efecto *in vitro* de bebidas carbonatadas con edulcorantes calóricos y acalóricos sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

### 1.4.2 Objetivos Específicos

- Determinar el efecto *in vitro* de la bebida carbonatada calórico “Inca Kola Original” sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175, a través de la concentración mínima inhibitoria.
- Determinar el efecto *in vitro* de la bebida carbonatada calórico “Coca Cola Original” sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175, a través de la concentración mínima inhibitoria.
- Determinar el efecto *in vitro* de la bebida carbonatada acalórico “Inca Kola Zero” sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175, a través de la concentración mínima inhibitoria.

- Determinar el efecto *in vitro* de la bebida carbonatada acalórico “Coca Cola Zero” sobre el *Streptococcus mutans ATCC 25175*, a través de la concentración mínima inhibitoria.

## II. DISEÑO METODOLÓGICO:

### 2.1 MATERIAL DE ESTUDIO

#### 2.1.1 Tipo de estudio:

El presente estudio corresponde a un diseño Experimental.

<b>En relación al periodo de captación de la información</b>	<b>En relación a la captación del fenómeno en estudio</b>	<b>En función de la comparación entre poblaciones</b>	<b>En función de la interferencia del investigador en el fenómeno que se analiza.</b>
Prospectivo	Longitudinal	Comparativo	Experimental

#### 2.1.2 Área de estudio.

La presente investigación se realizará en el Laboratorio de Investigación de Microbiología Molecular y Biotecnología del Departamento Académico de Ciencias de la Universidad Privada Antenor Orrego, Trujillo - Perú.

### **2.1.3 Definición de la población muestral:**

#### **2.1.3.1 Características generales:**

##### **2.1.3.1.1 Criterios de inclusión:**

- Tubo de ensayo estéril, conteniendo el caldo Infusión cerebro corazón (BHI), la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y la dilución de la bebida carbonatada.

##### **2.1.3.1.2 Criterios de exclusión:**

- Tubo de ensayo con la macrodilución que presente algún tipo de daño o rajadura en su estructura durante el proceso de incubación.
- Tubo de ensayo con la macrodilución cuyo resultado en el proceso de incubación pueda ser dudoso (contaminado).

##### **2.1.3.1.3 Criterios de eliminación:**

- Tubo de ensayo con la macrodilución que sufra deterioro, daño o rajadura durante la conservación y los procedimientos que no permitan su medición posterior.
- Todos los conjuntos de repeticiones en donde se observe una reducción en la concentración de la dilución.

#### **2.1.3.2 Diseño estadístico de muestreo:**

##### **2.1.3.2.1 Unidad de análisis.**

Cada uno de los tubos de ensayo estéril, conteniendo caldo Infusión cerebro corazón (BHI), la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y la dilución de la bebida carbonatada.

#### **2.1.3.2.2 Unidad de muestreo.**

Cada uno de los tubos de ensayo estéril, conteniendo caldo Infusión cerebro corazón (BHI), la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y la dilución de la bebida carbonatada.

#### **2.1.3.2.3 Tamaño de muestra.**

Por las condiciones propias que caracterizan a un trabajo de investigación experimental y en las condiciones del laboratorio de Investigación de Microbiología Molecular y Biotecnología del Departamento Académico de Ciencias de la Salud, de la Universidad Privada Antenor Orrego. Se ha creído conveniente tener cuatro repeticiones por cada bebida carbonatada.

#### **2.1.3.2.4 Método de selección**

La selección de la muestra se realizará a través de un método no probabilístico, a conveniencia.

## **2.2 MÉTODOS, TÉCNICAS E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS:**

### **2.2.1 Método: Observación.**

### **2.2.2 Descripción del procedimiento:**

#### **2.2.2.1 De la aprobación del proyecto:**

El primer paso para la realización del presente estudio de investigación, fue la obtención del permiso para la ejecución, mediante la aprobación del proyecto por el Comité Permanente de

Investigación Científica de la Escuela de Estomatología de la Universidad Privada Antenor Orrego con la correspondiente Resolución Decanal.

#### **2.2.2.2 De la autorización para la ejecución:**

Una vez aprobado el proyecto, se procedió a solicitar el permiso para la ejecución en el Laboratorio de Investigación de Microbiología Molecular y Biotecnología del Departamento Académico de Ciencias de la Universidad Privada Antenor Orrego.

#### **2.2.2.3 De las bebidas carbonatadas:**

Se utilizaron bebidas carbonatadas con edulcorantes calóricos y acalóricos de la marca Inca Kola y Coca Cola, obtenidas en los diferentes centros comerciales de la ciudad de Trujillo. De bebidas carbonatadas de la marca Inca Kola se utilizaron en sus dos presentaciones: \*Inca Kola Original (azúcar) \*Inca Kola Zero (Aspartamo, Acesulfamo K). Mientras que de la marca Coca Cola se utilizaron: \*Coca Cola Original (Azúcar), \*Coca Cola Zero (Aspartamo, Acesulfamo K).

#### **2.2.2.4 Obtención de la Cepa:**

En el presente estudio se utilizó una cepa de *Streptococcus mutans ATCC25175*, obtenida del cepario del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología del Departamento de

Ciencias de la Universidad Privada Antenor Orrego (UPAO). Las cepas se encuentran conservadas en crioviales a  $-30^{\circ}\text{C}$ .

#### **2.2.2.5 Activación de la Cepa:**

Retirado el vial criogénico de  $-30^{\circ}\text{C}$ , fue condicionado a temperatura ambiente durante al menos 3 horas, y posteriormente colocada en incubadora a  $37^{\circ}\text{C}$  durante un periodo de tiempo similar.

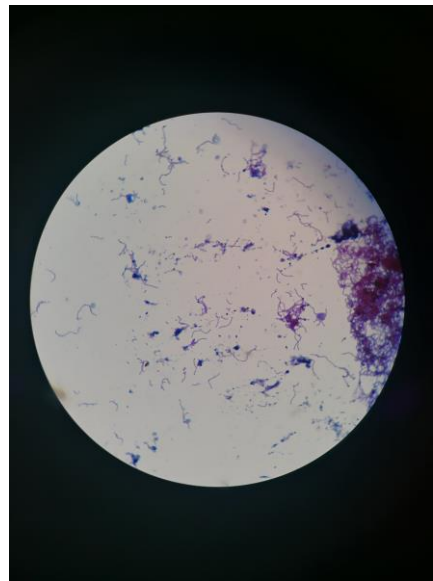
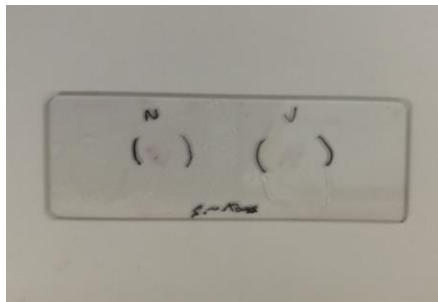
Bajo condiciones de esterilidad, se sembró en agar nutritivo, BHI y agar sangre; a partir de los cuales se evaluó en cuál de ellos se presentó un mejor crecimiento. Las condiciones de incubación fueron de  $37^{\circ}\text{C}$  y bajo anaerobiosis, empleando la técnica de vela en jarra.





### 2.2.2.6 Comprobación Fenotípica:

A partir de las colonias aisladas, se efectuará la debida comprobación fenotípica; las cuales consistirán en coloración Gram, prueba de catalasa, crecimiento en caldo thioglicolato y capacidad hemolítica sobre agar sangre.



### **2.2.2.7 Cultivos Overnight:**

Son los denominados cultivos de noches, los cuales consistió en colocar inóculos procedentes de la cepa deseada caldo Infusión cerebro corazón (BHI), por un periodo de tiempo promedio de 16 hrs. de incubación a 37°C, en agitación a 180 rpm. y bajo condiciones de semi anaerobiosis.

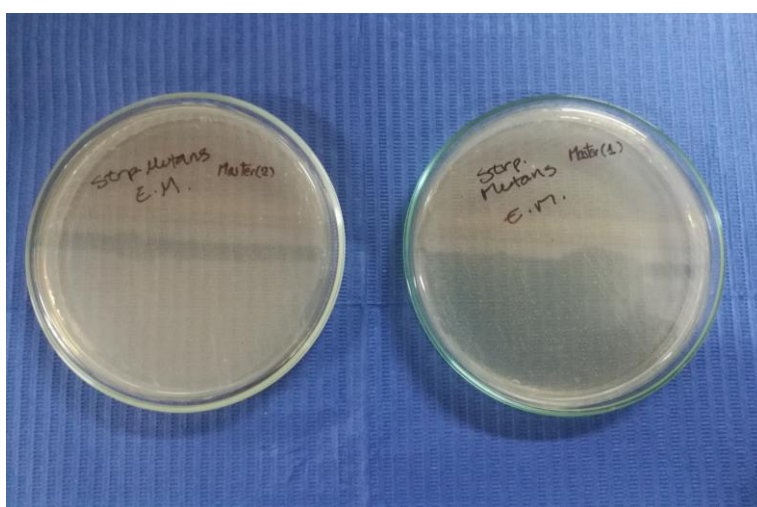


### **2.2.2.8 Preparación de viales criogénicos:**

A fin de preservar la cepa, es necesario conservarla por largos periodos; para lo cual, se preparó glicerizados al 30% a partir de un overnight. En ese sentido, se esterilizó previamente 3 mL. de glicerol, sobre los cuales se le adicionó 7 mL. del overnight del cultivo en cuestión. Se agitó enérgicamente y distribuyó 2 mL. en viales criogénicos y mantener a -30°C.

### 2.2.2.9 Preparación de placas master:

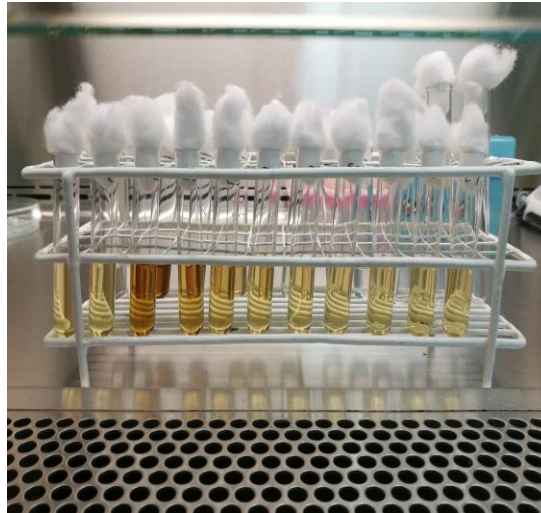
Efectuada la comprobación fenotípica es necesario tener placas master, las cuales son las placas de trabajo rutinario. Usualmente deben de prepararse en número de tres y almacenadas bajo condiciones de refrigeración (4°) y ante la menos evidencia de que alguna de ella pudiera estar contaminada se recomienda eliminarla inmediatamente y tomar otra placa master.



### 2.2.2.10 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria(CMI), (Prueba de macrodilución en tubo):

Se siguió el protocolo establecido por este laboratorio, según tabla adjunta (Anexo 1). En la ejecución se trabajó con caldo BHI (2X) y se efectuó 08 diluciones seriadas del producto a analizar más los 03 controles necesarios. Las lecturas se efectuaron al inicio de la experiencia y al término de las 24 o 48 hrs; para ello se dispuso de un espectrofotómetro utilizando una longitud de onda de 550 nm.

Se realizó cuatro repeticiones, a partir de los cuales se efectuaron las correspondientes medidas de tendencia central y de dispersión, para luego ser representados mediante una gráfica, donde se estableció la CMI durante el ensayo.



#### **2.2.2.11 Instrumento de recolección de datos:**

Para efectos de la investigación, se elaboró una ficha (Anexo 2).

El instrumento contiene: Los resultados de la densidad óptica dada por el espectrofotómetro a  $DO_{550\text{ nm}}$ .

### 2.3 VARIABLES:

Variable	Definición conceptual	Dimensión	Definición operacional e indicadores	Tipo de variable		Escala de medición
				Naturaleza	Función	
Bebidas carbonatadas	Definidas como bebidas que generalmente están endulzadas y saborizadas, que a veces tienen sales o minerales incluidos, que son cargadas con dióxido de carbono <sup>21</sup> .	-----	Tipos de bebidas carbonatadas con:  <b>Edulcorantes calóricos:</b> - Inca Kola original - Coca Cola original <b>Edulcorantes acalóricos:</b> - Inca Kola Zero - Coca Cola Zero	Cualitativa	Independiente	Ordinal
Efecto en el crecimiento del <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	Capacidad de una sustancia química sintetizada parcial o totalmente en laboratorio que es capaz de inhibir y/o estimular el crecimiento del <i>S. mutans</i> <sup>22</sup> .	Concentración mínima inhibitoria	Se registra la DO expresada en longitud de onda (nm) mediante el espectrofotómetro	Cuantitativa	Dependiente	De razón

## 2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA INFORMACIÓN:

Se realizó la revisión de los datos obtenidos, luego se colocaron en la base de datos Excel para su tabulación y presentación en gráficos. Los análisis estadísticos se realizaron empleando el software estadístico SPSS versión 18 obteniendo las medias estadísticas descriptivas: Media y Desviación Estándar.

Para la comprobación de los tratamientos establecidos con sus respectivas repeticiones, se utilizara la prueba de análisis de variación (ANOVA) que nos permitirá determinar si existen diferencias entre al menos dos tratamientos.

Seguidamente para verificar la significancia del crecimiento del *Streptococcus mutans ATCC 25175*, según los tratamientos establecidos se utilizara la prueba de rango múltiple de DUNCAN al 5% de significancia.

### **III. RESULTADOS**

#### **3.1. COCA COLA ORIGINAL**

Primero se trabajó con la presentación Coca Cola Original, que presenta como edulcorante calórico a la sacarosa. Donde se realizaron distintas diluciones a la cual fue sometida la bebida carbonatada calórica Coca Cola Original, se hicieron 8 diluciones tomándose además tres controles: un control negativo de esterilidad de producto (C1), un control negativo de esterilidad del caldo BHI (C2) y un control positivo (C3). En cada una de ellas 4 repeticiones de tratamientos, apareciendo sus promedios y su correspondiente desviación estándar en cada tabla respectiva.

La lectura se realizó en un espectrofotómetro a 550nm de la cual se obtuvo 2 lecturas, a las 24 y 48 horas. A las 24 horas las lecturas obtenidas son las que aparecen en la tabla n° 1 acompañadas con su correspondiente análisis estadístico tabla n°2 y n°3. Las lecturas obtenidas a las 48 horas son las que aparecen en la tabla n°4, también acompañadas con su correspondiente análisis estadístico tabla n°5 y n°6. Se realizó un gráfico donde se registran todos los datos obtenidos, comparando las lecturas de 24 y 48 horas, estos aparecen en el gráfico n°1.

**3.1.1 TABLA N°1: Efecto *in vitro* de bebida carbonatadas con edulcorantes calóricos Coca Cola Original, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. (Evaluación a las 24 Horas).**

Conc.	N	Media	Desv. Est.
C1	4	0.005	0.002
C2	4	-0.007	0.009
C3	4	0.266	0.011
100.00%	4	0.156	0.001
50.00%	4	0.220	0.013
25.00%	4	0.281	0.014
12.50%	4	0.301	0.013
6.25%	4	0.320	0.028
3.12%	4	0.350	0.023
1.56%	4	0.372	0.008
0.78%	4	0.376	0.013

**3.1.1.1 TABLA N°2 Análisis de Varianza del efecto *in vitro* de bebida carbonatadas con edulcorantes calóricos Coca Cola Original, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. (Evaluación a las 24 Horas).**

FV	SC	gl	CM	F	P
Tratamientos	0.7352	10	0.0735	52.4481	2.369E-17
Error	0.0463	33	0.0014		
Total	0.7815	43			

En el análisis de varianza nos arroja que hay diferencias significativas ( $p < 0.001$ ), es decir el análisis estadístico nos indica que hay diferencias de respuestas entre los tratamientos de cada dilución.



**3.1.1.2 TABLA N°3 Prueba de Duncan para el efecto *in vitro* de bebida carbonatadas con edulcorantes calóricos Coca Cola Original, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. (Evaluación a las 24 Horas).**

CONC.	N	Grupo para alfa = 0.05					
		G1	G2	G3	G4	G5	G6
C2	4	-0.007					
C1	4	0.005					
100.0%	4		0.156				
50.0%	4			0.220			
C3	4			0.266	0.266		
25.0%	4				0.281		
12.5%	4				0.301	0.301	
6.25%	4				0.320	0.320	0.320
3.12%	4					0.350	0.350
1.56%	4						0.372
0.78%	4						0.376

La prueba de Duncan encuentra las diferencias, separándolo 6 grupos de forma ascendente, donde: en el primer grupo se encontró a los controles C2 y C1. En el segundo grupo solo está la concentración de 100%. En el tercer grupo está la concentración del 50% y el control positivo C3; en el cuarto grupo vuelve a encontrar al control C3 con una media de (0.266nm), más a las siguientes concentraciones: 25%, 12.5% y 6.25%. En los siguientes grupos se encuentra las concentraciones que presentaron mayor crecimiento que el control positivo C3. En el quinto grupo se halla a las siguientes concentraciones 12.5%, 6.25% y 3.12%. En el sexto grupo está las concentraciones del 6.25%, 3.12%, 1.56% y 0.78%. En algunos grupos se repiten las concentraciones y eso es debido a que existe variabilidad en los datos.

**3.1.2 TABLA N°4: Efecto *in vitro* de bebida carbonatadas con edulcorantes calóricos Coca Cola Original, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. (Evaluación a las 48 Horas)**

Conc.	N	Media	Desv. Est.
C1	4	0.017	0.005
C2	4	0.002	0.013
C3	4	0.289	0.007
100.00%	4	0.163	0.003
50.00%	4	0.255	0.010
25.00%	4	0.301	0.025
12.50%	4	0.324	0.015
6.25%	4	0.323	0.022
3.12%	4	0.350	0.014
1.56%	4	0.379	0.012
0.78%	4	0.389	0.024

**3.1.2.1 TABLA N°5: Análisis de Varianza del efecto *in vitro* de bebida carbonatadas con edulcorantes calóricos Coca Cola Original, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. (Evaluación a las 48 Horas).**

FV	SC	gl	CM	F	P
Tratamientos	0.7360	10	0.0736	50.8224	3.834E-17
Error	0.0478	33	0.0014		
Total	0.7838	43			

En el análisis de varianza del control de 48 horas, dice que hay diferencias significativas ( $p < 0.001$ ), es decir el análisis estadístico nos indica que hay diferencias de respuestas entre los tratamientos de cada dilución.

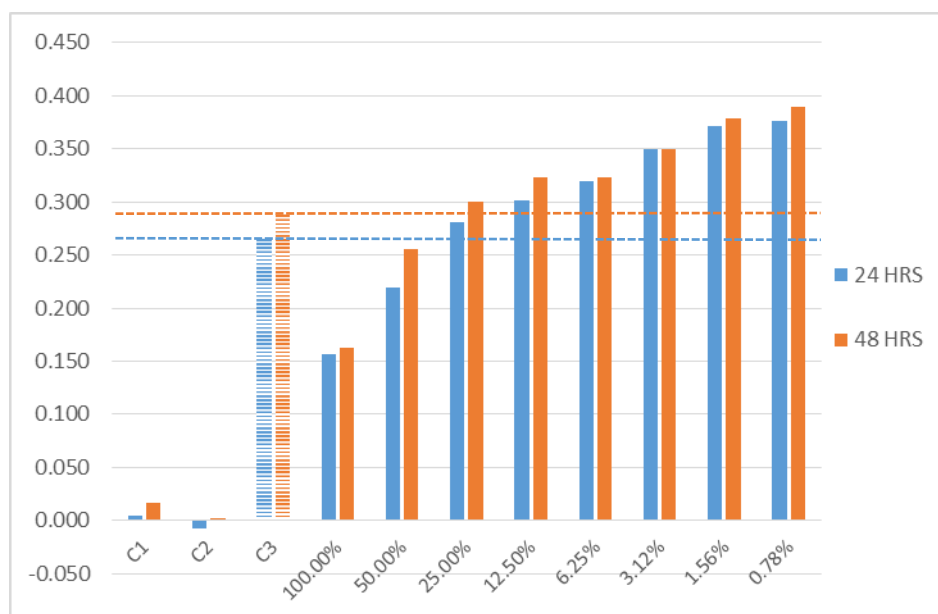
**3.1.2.2 TABLA N°6: Prueba de Duncan para el efecto *in vitro* de bebida carbonatadas con edulcorantes calóricos Coca Cola Original, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. (Evaluación a las 48 Horas).**

CONC.	N	Grupo para alfa = 0.05						
		G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
C2	4	0.002						
C1	4	0.017						
100.0%	4		0.163					
50.0%	4			0.255				
C3	4			0.289	0.289			
25.0%	4			0.301	0.301	0.301		
6.25%	4				0.323	0.323	0.323	
12.5%	4				0.324	0.324	0.324	
3.12%	4					0.350	0.350	0.350
1.56%	4						0.379	0.379
0.78%	4							0.389

Esta prueba separó los tratamientos en 7 grupos de diferencias en forma ascendente. En el primer grupo se encontró a los controles C2 y C1. En el segundo grupo solo está la concentración de 100%. En el tercer grupo están las concentraciones del 50% y 25% más el control positivo C3. En el cuarto grupo se encuentra el control positivo C3 con una media de (0.289nm) y a las concentraciones: 25%, 6.25%, 12.5%. El quinto grupo está conformado por el 25%, 6.25%, 12.5% más el 3.12%. En el sexto grupo está el 6.25%, 12.5%, 3.12% y 1.56%. El séptimo grupo está conformado por el 3.12%, 1.56% y el 0.78%.

En la mayoría de grupos se repiten las concentraciones y eso es debido a que existe variabilidad en los datos.

**3.1.2.3 GRAFICO N°1: Efecto *in vitro* de bebida carbonatadas con edulcorantes calóricos Coca Cola Original, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.**



Las lecturas obtenidas de cada control y concentración se ubican en el eje “X” y en el eje “Y” la densidad óptica. Cada una de las columnas representa el crecimiento *in vitro* de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. En el gráfico se aprecia los tres controles realizados: **C1** (BHI2x + Px), **C2** (BHI2x + H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>), y **C3** (BHI2x + H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>+50μlS.M).

Las columnas azules, son los datos de la lectura obtenida a las 24 horas. Se observa que el crecimiento aumenta cuando la concentración disminuye, esto puede ser debido a que en altas concentraciones el edulcorante calórico actúe inhibiendo el crecimiento. El crecimiento máximo se encuentra en la última concentración 0.78%. Dado el grafico es muy probable alrededor del 50% se encuentre la CMI.

Las columnas naranjas, son los datos de la lectura obtenida a las 48 horas. El crecimiento en este control aumenta ligeramente a comparación del primer control de 24 horas. No hay cambios significativos, y en este control también se podría decir que la CMI, fue correspondiente a la concentración del 50%.

### **3.2. COCA COLA ZERO**

Se trabajó la presentación Coca Cola Zero, y este presenta como edulcorante artificial acalórico al Aspartame y al Acesulfame K. Donde se realizaron distintas diluciones a la cual fue sometida la bebida carbonatada calórica Coca Cola Zero, se hicieron 8 diluciones tomándose además tres controles: un control negativo de esterilidad de producto (C1), un control negativo de esterilidad del caldo BHI (C2) y un control positivo (C3). En cada una de ellas 4 repeticiones de tratamientos, apareciendo sus promedios y su correspondiente desviación estándar en cada tabla respectiva.

La lectura se realizó en un espectrofotómetro a 550nm de la cual se obtuvo 2 lecturas, a las 24 y 48 horas. A las 24 horas las lecturas obtenidas son las que aparecen en la tabla n° 7 acompañadas con su correspondiente análisis estadístico tabla n°8 y n°9. Las lecturas obtenidas a las 48 horas son las que aparecen en la tabla n°10, también acompañadas con su correspondiente análisis estadístico tabla n°11 y n°12. Se realizó un gráfico donde se registran todos los datos obtenidos, comparando las lecturas de 24 y 48 horas, estos aparecen en el gráfico n°2.

**3.1.3 TABLA N°7: Efecto *in vitro* de bebida carbonatada con edulcorantes acalóricos Coca Cola Zero, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. (Evaluación a las 24 Horas)**

CONC.	Ni	Media	Desv. Est.
C1	4	0.011	0.003
C2	4	0.003	0.001
C3	4	0.406	0.002
100.00%	4	0.174	0.000
50.00%	4	0.254	0.001
25.00%	4	0.341	0.002
12.50%	4	0.382	0.002
6.25%	4	0.389	0.001
3.12%	4	0.402	0.002
1.56%	4	0.412	0.001
0.78%	4	0.426	0.003

**3.1.3.1 TABLA N°8: Análisis de Varianza del efecto *in vitro* de bebida carbonatada con edulcorantes acalóricos Coca Cola Zero, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. (Evaluación a las 24 Horas)**

FV	SC	gl	CM	F	P
Tratamientos	1.021	10	0.102	21124.63	8.450E-60
Error	0.000	33	0.000		
Total	1.021	43			

En el análisis de varianza del control de 24 horas, dice que hay diferencias significativas ( $p < 0.001$ ), es decir el análisis estadístico nos indica que hay diferencias de respuestas entre los tratamientos de cada dilución.

**3.1.3.2 TABLA N°9: Prueba de Duncan para el efecto *in vitro* de bebida carbonatada con edulcorantes acalóricos Coca Cola Zero, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. (Evaluación a las 24 Horas)**

CONC.	N	Grupo para alfa = 0.05										
		G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11
C2	4	0.003										
C1	4		0.011									
100.0%	4			0.174								
50.0%	4				0.254							
25.0%	4					0.341						
12.5%	4						0.382					
6.25%	4							0.389				
3.12%	4								0.402			
C3	4									0.406		
1.56%	4										0.412	
0.78%	4											0.426

Esta prueba separó los tratamientos en 11 grupos de diferencias, y se ordenó de forma ascendente las lecturas obtenidas. Cada grupo está compuesta solo por un tratamiento o control. En el noveno grupo se encuentra el control positivo C3 con una media de (0.406nm), y en adelante, los dos grupos restantes fueron los únicos en mostrar mayor crecimiento que el control positivo El grupo décimo que está la concentración 1.56% con una media de (0.412nm) y por último el grupo décimo primero con una media de (0.426nm).

**3.1.4 TABLA N°10: Efecto *in vitro* de bebida carbonatada con edulcorantes acalóricos Coca Cola Zero, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. (Evaluación a las 48 Horas)**

CONC.	Ni	Media	Desv. Est.
C1	4	0.020	0.001
C2	4	0.001	0.000
C3	4	0.448	0.003
100.00%	4	0.202	0.002
50.00%	4	0.282	0.002
25.00%	4	0.362	0.001
12.50%	4	0.401	0.003
6.25%	4	0.398	0.002
3.12%	4	0.390	0.004
1.56%	4	0.393	0.000
0.78%	4	0.427	0.002

**3.1.4.1 TABLA N°11: Análisis de Varianza del efecto *in vitro* de bebida carbonatada con edulcorantes acalóricos Coca Cola Zero sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. (Evaluación a las 48 Horas)**

FV	SC	gl	CM	F	P
Tratamientos	1.027	10	0.103	47710.64	1.228E-65
Error	0.000	33	0.000		
Total	1.027	43			

En el análisis de varianza del control de 48 horas, dice que hay diferencias significativas ( $p < 0.001$ ), es decir el análisis estadístico nos indica que hay diferencias de respuestas entre los tratamientos de cada dilución.

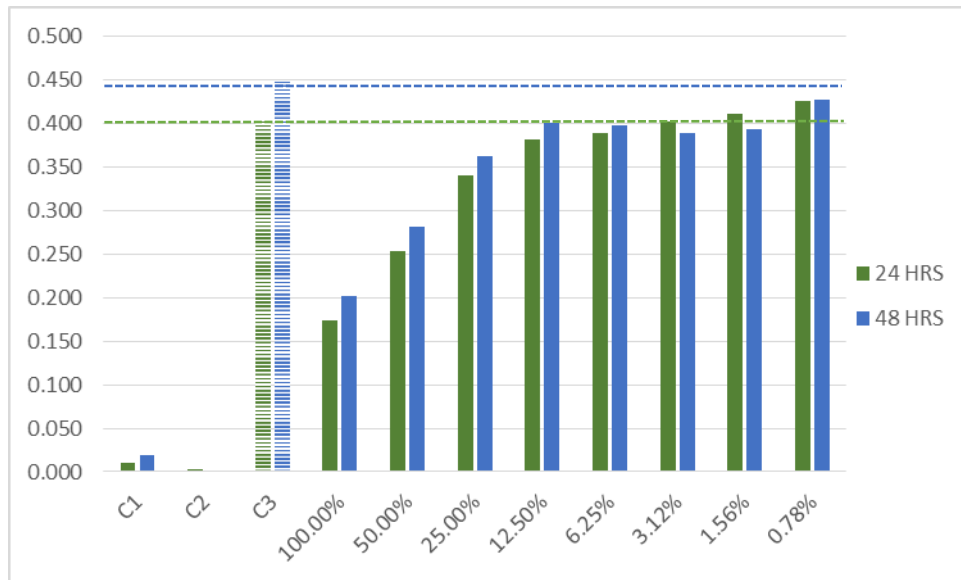


**3.1.4.2 TABLA N°12: Prueba de Duncan para el efecto *in vitro* de bebida carbonatada con edulcorantes acalóricos Coca Cola Zero, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. (Evaluación a las 48 Horas)**

CONC.	N	Grupo para alfa = 0.05										
		G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11
C2	4	0.001										
C1	4		0.020									
100.0%	4			0.202								
50.0%	4				0.282							
25.0%	4					0.362						
3.12%	4						0.390					
1.56%	4							0.393				
6.25%	4								0.398			
12.5%	4									0.401		
0.78%	4										0.427	
C3	4											0.448

Esta prueba separó los tratamientos en 11 grupos de forma ascendente al igual que en el primer control de 24 horas. En los primeros grupos se encontraron los controles negativos (C2 y C1) donde se aprecia que presentaron menor densidad óptica a la hora de la evaluación de 48 horas. Mientras que el control positivo C3 se ubicó en el último grupo, el décimo primero con una media de (0.448nm)

**3.1.4.3 GRÁFICO N°2: Efecto *in vitro* de bebida carbonatada con edulcorantes acalóricos Coca Cola Zero, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.**



Las lecturas obtenidas de cada control y concentración se ubican en el eje “X” y en el eje “Y” la densidad óptica. Cada una de las columnas representa el crecimiento *in vitro* de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

En el gráfico se aprecia los tres controles realizados: **C1** (BHI2x + Px), **C2** (BHI2x + H<sub>2</sub>Od), y **C3** (BHI2x + H<sub>2</sub>Od+50μlS.M).

Las columnas de color verde, son los datos de la lectura obtenida a las 24 horas. Se observa que el crecimiento aumenta progresivamente cuando la concentración disminuye. Solo dos concentraciones mostraron mayor crecimiento que el control positivo **C3**. Pero no son tan notorios. El crecimiento máximo se encuentra en la última concentración 0.78%. En las concentraciones ensayadas no se detectó la CMI.

Las columnas de color azul, son los datos de la lectura obtenida a las 48 horas. El crecimiento en este control aumenta ligeramente a comparación

del primer control de 24 horas. En este control, las concentraciones mostraron un crecimiento pero por debajo del control positivo. En las concentraciones ensayadas no se detectó la CMI.

### **3.3. INCA KOLA ORIGINAL**

Primero se trabajó con la presentación Inca Kola Original, que presenta como edulcorante calórico a la sacarosa. Donde se realizaron distintas diluciones a la cual fue sometida la bebida carbonatada calórica Inca Kola Original, se hicieron 8 diluciones tomándose además tres controles: un control negativo de esterilidad de producto (C1), un control negativo de esterilidad del caldo BHI (C2) y un control positivo (C3). En cada una de ellas 4 repeticiones de tratamientos, apareciendo sus promedios y su correspondiente desviación estándar en cada tabla respectiva.

La lectura se realizó en un espectrofotómetro a 550nm de la cual se obtuvo 2 lecturas, a las 24 y 48 horas. A las 24 horas las lecturas obtenidas son las que aparecen en la tabla n° 13 acompañadas con su correspondiente análisis estadístico tabla n°14 y n°15. Las lecturas obtenidas a las 48 horas son las que aparecen en la tabla n°16, también acompañadas con su correspondiente análisis estadístico tabla n°17 y n°18. Se realizó un gráfico donde se registran todos los datos obtenidos, comparando las lecturas de 24 y 48 horas, estos aparecen en el gráfico n°3.

**3.1.5 TABLA N°13: Efecto *in vitro* de bebida carbonatada con edulcorantes calóricos Inca Kola Original, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. (Evaluación a las 24 Horas)**

CONC.	N	Media	Desv. Est.
C1	4	0.013	0.016
C2	4	0.010	0.002
C3	4	0.227	0.005
100.00%	4	0.055	0.011
50.00%	4	0.106	0.002
25.00%	4	0.152	0.004
12.50%	4	0.227	0.020
6.25%	4	0.298	0.045
3.12%	4	0.390	0.029
1.56%	4	0.448	0.006
0.78%	4	0.384	0.004

**3.1.5.1 TABLA N°14: Análisis de Varianza del efecto *in vitro* de bebida carbonatada con edulcorantes calóricos Inca Kola Original, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. (Evaluación a las 24 Horas)**

FV	SC	gl	CM	F	P
Tratamientos	0.977	10	0.098	302.543	1.814E-29
Error	0.011	33	0.000		
Total	0.988	43			

En el análisis de varianza del control de 24 horas, dice que hay diferencias significativas ( $p < 0.001$ ), es decir el análisis estadístico nos indica que hay diferencias de respuestas entre los tratamientos de cada dilución.

**3.1.5.2 TABLA N°15: Prueba de Duncan para el efecto *in vitro* de bebida carbonatada con edulcorantes calóricos Inca Kola Original, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. (Evaluación a las 24 Horas)**

CONC.	N	Grupos para alfa = 0.05							
		G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
C2	4	0.010							
C1	4	0.013							
100.0%	4		0.055						
50.0%	4			0.106					
25.0%	4				0.152				
C3	4					0.227			
12.5%	4					0.227			
6.25%	4						0.298		
0.78%	4							0.384	
3.12%	4							0.390	
1.56%	4								0.448

Esta prueba separó los tratamientos en 8 grupos de diferencias, y se ordenó de forma ascendente las lecturas obtenidas de la densidad óptica. En el primer grupo se encuentra los controles negativos (C1 y C2). En el segundo está conformado solo por 100%. En el tercer está conformado solo por 50%. El cuarto grupo está conformado solo por 25%. En el quinto grupo se encuentra a la concentración de 12.5% y al control positivo C3 que tiene como media (0.227nm). En adelante, los siguientes grupos presentaron mayor densidad óptica que el control positivo, siendo el sexto grupo que está conformado por 6.25%. El séptimo grupo conformado por 0.78% y 3.12%. El octavo grupo conformado por 1.56% con una media de (0.448nm).

**3.1.6 TABLA N°16: Efecto *in vitro* de bebida carbonatada con edulcorantes calóricos Inca Kola Original, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. (Evaluación a las 48 Horas)**

CONC.	N	48 HRS	Desv. Est.
C1	4	0.015	0.003
C2	4	0.012	0.016
C3	4	0.260	0.010
100.00%	4	0.075	0.002
50.00%	4	0.145	0.000
25.00%	4	0.175	0.008
12.50%	4	0.236	0.019
6.25%	4	0.311	0.057
3.12%	4	0.399	0.033
1.56%	4	0.463	0.005
0.78%	4	0.395	0.005

**3.1.6.1 TABLA N°17: Análisis de Varianza del efecto *in vitro* de bebida carbonatada con edulcorantes calóricos Inca Kola Original, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. (Evaluación a las 48 Horas)**

FV	SC	gl	CM	F	P
Tratamientos	0.981	10	0.098	220.690	3.049E-27
Error	0.015	33	0.000		
Total	0.996	43			

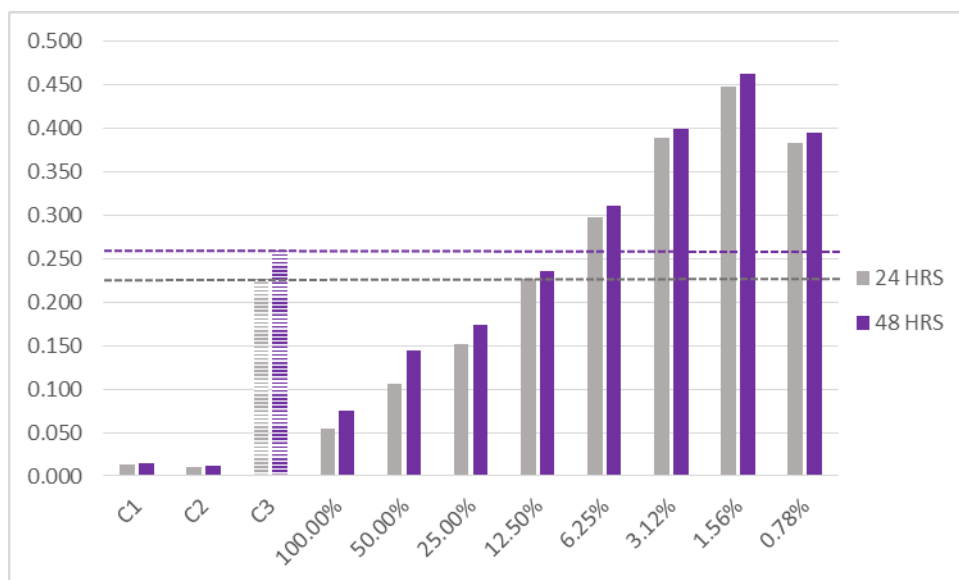
En el análisis de varianza del control de 48 horas, dice que hay diferencias significativas ( $p < 0.001$ ), es decir el análisis estadístico nos indica que hay diferencias de respuestas entre los tratamientos de cada dilución.

**3.1.6.2 TABLA N°18: Prueba de Duncan para el efecto *in vitro* de bebida carbonatada con edulcorantes calóricos Inca Kola Original, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. (Evaluación a las 48 Horas)**

CONC.	N	Grupos para alfa = 0.05						
		G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
C2	4	0.012						
C1	4	0.015						
100.0%	4		0.075					
50.0%	4			0.145				
25.0%	4			0.175				
12.5%	4				0.236			
C3	4				0.260			
6.25%	4					0.311		
0.78%	4						0.395	
3.12%	4						0.399	
1.56%	4							0.463

Esta prueba separó los tratamientos en 7 grupos de diferencias, y se ordenó de forma ascendente las lecturas obtenidas de la densidad óptica. En el primer grupo se encuentra los controles negativos (C1 y C2). En el segundo se encuentra solo a la concentración del 100%. En el tercer grupo está el 50% y 25%. El cuarto grupo está conformado por 12.5% y el control positivo C3. En los grupos restantes se encuentran las concentraciones que presentaron mayor densidad óptica que el control positivo C3 que tiene una media de (0.260nm). En el quinto grupo se encuentra a la concentración del 6.25%. El sexto grupo está conformado por las concentraciones de 0.78% y 3.12% y por último al séptimo grupo donde está el 1.56% con una media de (0.463nm).

**3.1.6.3 GRÁFICO N°3: El efecto *in vitro* de bebida carbonatada con edulcorantes calóricos Inca Kola Original, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.**



Las lecturas obtenidas de cada control y concentración se ubican en el eje “X” y en el eje “Y” la densidad óptica. Cada una de las columnas representa el crecimiento *in vitro* de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. En el gráfico se aprecia los tres controles realizados: **C1** (BHI2x + Px), **C2** (BHI2x + H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>), y **C3** (BHI2x + H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>+50μlS.M).

Las columnas de color plomo, son los datos de la lectura obtenida a las 24 horas. Se observa que el crecimiento aumenta cuando la concentración disminuye, esto puede ser debido a que en altas concentraciones el edulcorante calórico actúe inhibiendo el crecimiento. El crecimiento máximo se encuentra en la concentración 1.56% para luego descender en la siguiente concentración. Dado el grafico se podría decir que la CMI se encuentra en la concentración del 25%.



Las columnas de color morado, son los datos de la lectura obtenida a las 48 horas. El crecimiento en este control aumenta ligeramente a comparación del primer control de 24 horas. No hay cambios significativos, y en este control se podría decir que la CMI fue correspondiente a la concentración del 12.5%.

### **3.4. INCA KOLA ZERO**

Se trabajó la presentación Inca Kola Zero, y este presenta como edulcorante artificial acalórico al *Aspartame* y al *Acesulfame K*. Donde se realizaron distintas diluciones a la cual fue sometida la bebida carbonatada calórica Inca Kola Zero, se hicieron 8 diluciones tomándose además tres controles: un control negativo de esterilidad de producto (C1), un control negativo de esterilidad del caldo BHI (C2) y un control positivo (C3). En cada una de ellas 4 repeticiones de tratamientos, apareciendo sus promedios y su correspondiente desviación estándar en cada tabla respectiva.

La lectura se realizó en un espectrofotómetro a 550nm de la cual se obtuvo 2 lecturas, a las 24 y 48 horas. A las 24 horas las lecturas obtenidas son las que aparecen en la tabla n° 19 acompañadas con su correspondiente análisis estadístico tabla n°20 y n°21. Las lecturas obtenidas a las 48 horas son las que aparecen en la tabla n°22, también acompañadas con su correspondiente análisis estadístico tabla n°23 y n°24. Se realizó un gráfico donde se registran todos los datos obtenidos, comparando las lecturas de 24 y 48 horas, estos aparecen en el gráfico n°4.

**3.1.7 TABLA N°19: Efecto *in vitro* de bebida carbonatada con edulcorantes acalóricos Inca Kola Zero, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. (Evaluación a las 24 Horas).**

Conc.	Ni	24 HRS	Des. Est.
C1	4	0.012	0.005
C2	4	0.007	0.002
C3	4	0.295	0.000
100.00%	4	0.049	0.007
50.00%	4	0.159	0.001
25.00%	4	0.232	0.002
12.50%	4	0.254	0.007
6.25%	4	0.277	0.003
3.12%	4	0.293	0.002
1.56%	4	0.304	0.000
0.78%	4	0.342	0.007

**3.1.7.1 TABLA N°20: Análisis de varianza del efecto *in vitro* de bebida carbonatada con edulcorantes acalóricos Inca Kola Zero, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. (Evaluación a las 24 Horas)**

FV	SC	gl	CM	F	P
Tratamientos	0.6221	10	0.0622	3432.7505	8,723E-47
Error	0.0006	33	0.0000		
Total	0.6227	43			

En el análisis de varianza del control de 24 horas, dice que hay diferencias significativas ( $p < 0.001$ ), es decir el análisis estadístico nos indica que hay diferencias de respuestas entre los tratamientos de cada dilución.

**3.1.7.2 TABLA N°21: Prueba de Duncan para el efecto *in vitro* de bebida carbonatada con edulcorantes acalóricos Inca Kola Zero, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. (Evaluación a las 24 Horas)**

CONC.	N	Grupos para alfa = 0.05								
		G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9
C2	4	0.007								
C1	4	0.012								
100.0%	4		0.049							
50.0%	4			0.159						
25.0%	4				0.232					
12.5%	4					0.254				
6.25%	4						0.277			
3.12%	4							0.293		
C3	4							0.295		
1.56%	4								0.304	
0.78%	4									0.342

Esta prueba separó los tratamientos en 9 grupos de diferencias, y se ordenó de forma ascendente las lecturas obtenidas. En el primer grupo se encuentra a los controles negativos (C1 y C2). En el segundo está la concentración 100%. Tercer grupo está la concentración 50%. Cuarto grupo está la concentración 25%. En el quinto grupo está la concentración 12.5%. En el sexto grupo está la concentración 6.25%. En el séptimo grupo se encuentra la concentración 3.12% y al control positivo C3 con una media de (0.295nm). Solo dos grupos lograron obtener mayor densidad óptica que la del control positivo C3. El octavo grupo que tiene a la concentración 1.56%. El noveno grupo presenta a la concentración 0.78% con una media de (0.342nm)

**3.1.8 TABLA N°22: Prueba de Duncan para el efecto *in vitro* de bebida carbonatada con edulcorantes acalóricos Inca Kola Zero, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. (Evaluación a las 48 Horas)**

CONC.	Ni	Media	Desv. Est.
C1	4	0.014	0.010
C2	4	0.009	0.003
C3	4	0.302	0.005
100.00%	4	0.067	0.002
50.00%	4	0.174	0.004
25.00%	4	0.248	0.003
12.50%	4	0.268	0.012
6.25%	4	0.286	0.000
3.12%	4	0.302	0.006
1.56%	4	0.311	0.003
0.78%	4	0.360	0.013

**3.1.8.1 TABLA N°23: Análisis de varianza del efecto *in vitro* de bebida carbonatada con edulcorantes acalóricos Inca Kola Zero, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. (Evaluación a las 48 Horas)**

FV	SC	gl	CM	F	P
Tratamientos	0.6425	10	0.0643	1537.0465	4,875E-41
Error	0.0014	33	0.0000		
Total	0.6439	43			

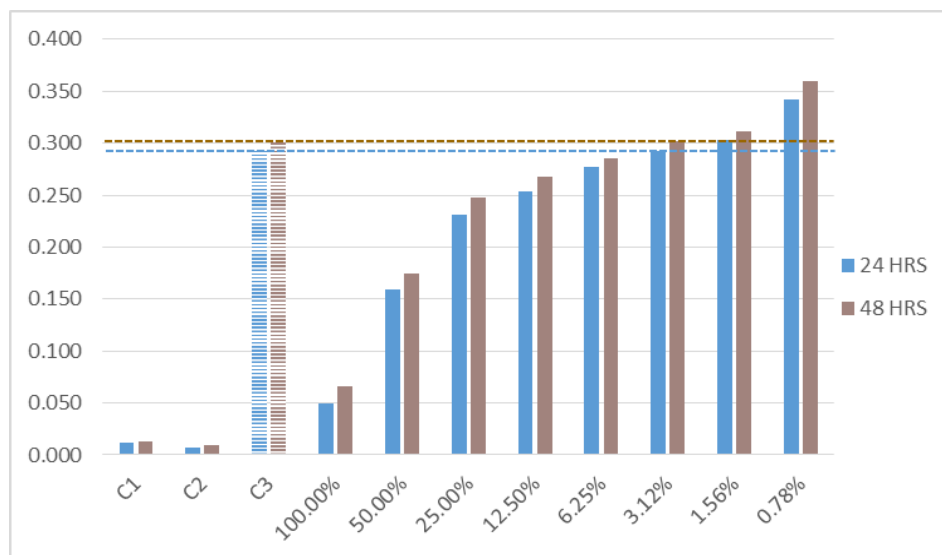
En el análisis de varianza del control de 48 horas, dice que hay diferencias significativas ( $p < 0.001$ ), es decir el análisis estadístico nos indica que hay diferencias de respuestas entre los tratamientos de cada dilución.

**3.1.8.2 TABLA N°24: Prueba de Duncan para el efecto *in vitro* de bebida carbonatada con edulcorantes acalóricos Inca Kola Zero, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. (Evaluación a las 48 Horas)**

CONC.	N	Grupos para alfa = 0.05							
		G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
C2	4	0.009							
C1	4	0.014							
100.0%	4		0.067						
50.0%	4			0.174					
25.0%	4				0.248				
12.5%	4					0.268			
6.25%	4						0.286		
3.12%	4							0.302	
C3	4							0.302	
1.56%	4							0.311	
0.78%	4								0.360

Esta prueba separó los tratamientos en 8 grupos de diferencias, y se ordenó de forma ascendente las lecturas obtenidas. En el primer grupo se encuentra a los controles negativos (C1 y C2). En el segundo está la concentración 100%. Tercer grupo está la concentración 50%. Cuarto grupo está la concentración 25%. En el quinto grupo está la concentración 12.5%. En el sexto grupo está la concentración 6.25%. En el séptimo grupo se encuentra la concentración 3.12%, 1.56% y al control positivo C3 con una media de (0.302nm). Solo un grupo logró obtener mayor densidad óptica que la del control positivo C3. El octavo grupo que presenta a la concentración 0.78% con una media de (0.342nm)

**3.1.8.3 GRÁFICO N°4: Efecto *in vitro* de bebida carbonatada con edulcorantes acalóricos Inca Kola Zero, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.**



Las lecturas obtenidas de cada control y concentración se ubican en el eje “X” y en el eje “Y” la densidad óptica. Cada una de las columnas representa el crecimiento *in vitro* de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. En el gráfico se aprecia los tres controles realizados: **C1** (BHI2x + Px), **C2** (BHI2x + H<sub>2</sub>Od), y **C3** (BHI2x + H<sub>2</sub>Od+50µlS.M).

Las columnas de color azul, son los datos de la lectura obtenida a las 24 horas. Se observa que el crecimiento aumenta progresivamente cuando la concentración disminuye. Solo dos concentraciones mostraron mayor crecimiento que el control positivo **C3**. Pero no son tan notorios. El crecimiento máximo se encuentra en la última concentración 0.78%. En las concentraciones ensayadas no se detectó la CMI.

Las columnas de color marrón, son los datos de la lectura obtenida a las 48 horas. En este control, las concentraciones mostraron un incremento en el crecimiento pero no hay cambios significativos. En las concentraciones ensayadas no se detectó la CMI.

#### IV. DISCUSIÓN

En los últimos años se ha incrementado el empleo de edulcorantes acalóricos como sustitutos del azúcar en la dieta humana; todos estos son pobremente metabolizados por las bacterias bucales, o bien metabolizados por vías que no conducen a la formación de ácidos, o algunos de ellos reducen el metabolismo<sup>23</sup>. Los edulcorantes acalóricos en las bebidas carbonatadas presentes en nuestro estudio, es el aspartamo y el acesulfamo K; el primero de ellos está formado por dos aminoácidos: el ácido aspártico y la fenilalanina, y es desdoblado por el organismo en sus componentes: ácido aspártico, fenilamina y metanol. Por otro lado; el acesulfamo-K, se trata de un edulcorante no calórico sintético; siendo empleado frecuentemente en combinación con otros edulcorantes para intensificar su grado de dulzor y disminuir su sabor amargo<sup>14</sup>.

Esta investigación tuvo como propósito, evaluar el efecto *in vitro* del crecimiento del *Streptococcus mutans ATCC 25175* frente a las diferentes bebidas carbonatadas con edulcorantes calóricos y acalóricos, y así mismo el estimular la CMI; a través de lecturas espectrofotométricas a las 24 horas y 48 horas.

Con respecto al ensayo de las bebidas carbonatadas de la marca Coca Cola e Inca Kola, mostraron que existe una diferencia muy marcada en el crecimiento *in vitro* de *Streptococcus mutans ATCC 25175*, para sus dos presentaciones, con edulcorante calórico (original), y con edulcorantes acalóricos (zero).

La formulación de ambas bebidas carbonatadas (original) según el anexo 3, se tiene como principal edulcorante calórico a la sacarosa, la cual podría estar asociado con los resultados obtenidos en los ensayos, donde existió un mayor crecimiento de *Streptococcus mutans ATCC 25175*.

El gráfico N°1 de Coca Cola (original), se observa que para las concentraciones del 100% y 50%, el crecimiento del *Streptococcus mutans ATCC 25175* se encuentra por

debajo del control positivo; el cual carece de producto alguno, se estima que la CMI está muy próxima al 50%. Estas dos concentraciones son las dos únicas que presentaron un crecimiento pobre, debido probablemente a la alteración de la presión osmótica, ya que la alta concentración del soluto en el medio (sacarosa), genera un medio hipertónico, entonces por ósmosis, se estaría produciendo la salida del agua del interior del *Streptococcus mutans ATCC 25175*.

Sin embargo; a medida que las concentraciones disminuyen se observa que hay un incremento por encima del control positivo de forma progresiva de la curva del crecimiento. En la misma gráfica se percibe que a partir del 25%, quizás debido, a que a partir de esta concentración y concentraciones inferiores, el *Streptococcus mutans ATCC 25175*, podría estar aprovechando la fuente de carbono de la bebida carbonatada con edulcorante calórico, que en este caso sería el azúcar.

Con respecto en la presentación (original) de bebida carbonatada Inca Kola, los datos obtenidos fueron similares a los de Coca Cola (original); pero en este caso, la CMI fue cercana a una concentración del 25%. Estos ensayos también mostraron un crecimiento de forma ascendente, el pico más alto de crecimiento fue hallada en la concentración del 1.56%. También se observó que en la concentración de 100%, 50% y 25% del producto, el crecimiento del *Streptococcus mutans ATCC 25175*, fue menor probablemente por un efecto inhibitorio de la alta concentración de sacarosa.

Por otro lado; como lo habíamos señalado, las bebidas carbonatadas acalóricas tienen como edulcorantes ya antes mencionados, al aspartamo y acesulfamo K (anexo 4). Con respecto a los resultados presentados para las presentaciones (zero) de ambas bebidas, Coca Cola (gráfico2) e Inca Kola (gráfico4) respectivamente, se muestra que el crecimiento de *Streptococcus mutans ATCC 25175*, estuvo por debajo del control positivo en todas las concentraciones ensayadas, esto podría ser consecuencia de que el



aspartamo está compuesta por dos aminoácidos: el ácido aspártico y la fenilamina, que al descomponerse puede dar como residuo un alcohol, el metanol; el cual puede actuar sobre las membranas biológicas fundamentalmente de 3 formas: i) alterando la fluidez de las membranas, lo que indirectamente afectaría el funcionamiento de las proteínas como enzimas, y canales de transporte; ii) produciendo una deshidratación a nivel de las membranas; iii) interactuando directamente con las proteínas de la membrana<sup>25</sup>. Por otra parte; para poder desempeñar los procesos metabólicos, las bacterias, como todos los seres vivos deben producir y almacenar energía para luego poder reutilizarla; sin embargo, los edulcorantes acalóricos poseen poder endulzante pero con escaso aporte calórico, por lo que puede afectar notoriamente en el crecimiento; en las concentraciones ensayadas no se detectó la CMI.

Con respecto, al crecimiento del *Streptococcus mutans* expuesto a edulcorantes acalóricos, se encontró una investigación *in vitro*, que reporta resultados diferentes a los obtenidos en nuestro trabajo. Pérez R y Carrasco M (2006), quienes observaron el crecimiento *in vitro* de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus* en soluciones con xilitol, aspartamo, sucralosa y sacarina sódica, y lo compararon frente a dos controles, uno sin edulcorante y otro con sacarosa. Este mismo estudio indica al xilitol y sacarina sódica, como los más efectivos para la reducción en el crecimiento *in vitro* de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidiphilus*, mientras que para el aspartamo y sucralosa, concluyen que estos aditivos estimulan al crecimiento<sup>5</sup>.

No obstante; el aspartamo ha demostrado tener efecto en la disminución del crecimiento del *Streptococcus mutans*; así lo demuestra Das S y col (1991), quienes evaluaron al aspartamo y la caries dental en ratas; quienes lo ensayaron formulando dietas sobre ratas (50% de sacarosa, 30% de sacarosa, 30% de sacarosa+ 0.15% de aspartamo, 15% de sacarosa+ 0.15% de aspartamo, y solo aspartamo sin adición). Estos resultados

demonstraron que el recuento de *Streptococcus mutans* fueron altos en las ratas que recibieron la dieta de sacarosa sola; mientras los que recibieron la dieta de sacarosa más aspartamo, el recuento de *Streptococcus mutans* fue pobre. Por otro lado, en ratas que recibieron la dieta sola de aspartamo, no hubo presencia de *Streptococcus mutans*<sup>20</sup>.

En esta investigación se comprobó que las bebidas carbonatadas con edulcorantes acalóricos, el aspartamo y el acesulfamo K, disminuyen el crecimiento *in vitro* del *Streptococcus mutans ATCC 25175* en comparación de las bebidas que contienen la sacarosa como edulcorante calórico.

## V. CONCLUSIÓN

- 5.1 La bebida carbonatada con edulcorantes calóricos, Coca Cola (original), estimula al crecimiento *in vitro* del *Streptococcus mutans ATCC 25175* a partir del 25%.
- 5.2 La bebida carbonatada con edulcorantes calóricos, Inca Kola (original), estimula al crecimiento *in vitro* del *Streptococcus mutans ATCC 25175* a partir del 12.50%.
- 5.3 Las concentraciones de 100% y 50% de la bebida carbonatada con edulcorantes calóricos, Coca Cola (original), mermaron el crecimiento *in vitro* del *Streptococcus mutans ATCC 25175*.
- 5.4 Las concentraciones de 100%, 50% y 25% de la bebida carbonatada con edulcorantes calóricos, Inca Kola (original), mermaron el crecimiento *in vitro* del *Streptococcus mutans ATCC 25175*.
- 5.5 Solo en las bebidas carbonatadas con edulcorantes calóricos se lograron hallar la CMI, siendo el 50% para la Coca Cola (original), y el 25% para la Inca Kola (original).
- 5.6 Las bebidas carbonatadas Coca Cola e Inca Kola en la presentación (zero), inhibieron el crecimiento *in vitro* del *Streptococcus mutans ATCC 25175* en todas las concentraciones trabajadas.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- 6.1 Trabajar con otras concentraciones para evaluar el efecto que existe sobre el *Streptococcus mutans*.
- 6.2 Realizar estudios donde se evalúe el efecto de las bebidas carbonatadas sobre otro tipo de bacterias asociadas a la caries dental.
- 6.3 Realizar estudios con otro tipo de bebidas de consumo común frente a bacterias asociadas a la caries dental.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Molina N, Castañeda R, Gaona E, Mendoza P, Gonzáles T. Consumo de productos azucarados y caries dental en escolares. *Rev Mex Pediatric*. 2004; 71(1):14-16.
2. Arreguin J, Rios C, Hernández C, Ostia M, Ventura J, Álvarez C, etc. Caries dental y microorganismos asociados a la caries en la saliva de los alumnos del primer año de la Facultad de Odontología, UNAM. *Rev Odont Mex*. 2016; 20(2):77-81.
3. Diaz N, Fajardo Z, Páez M, Solano L, Pérez M. Frecuencia de consumo de alimentos cariogénicos y prevalencia de caries dental en escolares venezolanos de estrato socioeconómico bajo. *Acta odontol venez*. 2012; 52(2):1-7.
4. Gamboa F. Identificación y caracterización microbiológica, fenotípica y genotípica del *Streptococcus mutans*: experiencias de investigación. *Univ Odontol*. 2014; 33(71): 65-73.
5. Pérez R, Carrasco M. Crecimiento in vitro de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus* en medios que contengan edulcorantes artificiales. *Kiru*. 2006; 3(1):2-6.
6. Ojeda J, Oviedo E, Salas L. *Streptococcus mutans* y caries dental. *Rev. CES Odont*. 2013; 26(1): 44-56.
7. Nadimi H, Wesamaa H, Janket S, Bollu P, Meurman J. Are sugar-free confections really beneficial for dental health? *JA - Br Dent JPB - Nature Publishing Group*, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved. *Br Dent J*. 2011; 211:E15.

8. Portilla J, Pinzón M, Huerta E, Obregón A. Conceptos actuales e investigaciones futuras en el tratamiento de la caries dental y control de la placa bacteriana. *Rev Odont Mex.* 2010; 14 (4): 218-225.
9. Sunqwoo L, Woosung S, Brian A, Sandretto A, Kolker J, Marshall T, Amid I. Cariogenicity of soft drinkd, milk and fruit juice in low-income African-American children- A longitudinal study. *JADA.* 2008; 139(7):959-67
10. Romina L. Consumo de bebidas gaseosas en escolares de 10 a 12 años de la ciudad de Rosario[Licenciatura en nutrición y alimentación];2012
11. Day L, Mc Sweeney P. Beverages. Elsevier[internet]. 2016 [citado el 14 Oct 2016];1-5 Disponible en:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081005965034090>
12. Saavedra D.Y, Efecto erosivo in vitro de cuatro bebidas de mayor consumo sobre el esmalte dentario. Trujillo 2013.[Tesis bachiller]: Biblioteca Digital-UNT; 2013.
13. García JM, Gracia M, Casado F, García J. Una visión global y actual de los edulcorantes. Aspectos de regulación. *Nutr Hosp.* 2013; 28 (4): 17-31.
14. González A y cols. Posición de consenso sobre las bebidas con edulcorantes no calóricos y su relación con la salud. *Rev Mex Cardiol* 2013; 24 (2): 55-68.
15. Philip R. Carbonated Beverages. Elsevier[internet]. 2016 [citado el 15 Oct 2016];1-5 Disponible en:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081005965032406>
16. Bamonde L, Castillo J, Espinoza C. Crecimiento bacteriano de Streptococcus mutans frente a la cetirizina y prednisona con y sin sacarosa: estudio in vitro. *Rev Estomatol Herediana.* 2014; 24(2): 82-90.

17. Dutra R, Albuquerque Y, Spolidorio D, Koga-Ito C, Aparecida E, Brighenti F. Effect of dietary sugars on dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* – a pilot study. *Rev Odontol UNESP*. 2016; 45(2): 90-96
18. Durán S, Cordón K, Rodríguez M. Edulcorantes no nutritivos, riesgos, apetito y ganancia de peso. *Rev Chil Nutr*. 2013; 40(3): 309-312.
19. Moynihan P. Dietary advice in dental practice. *Br Dent J*. 2002; 193(10): 563-568
20. Das S, Das A, Murphy R, Worawongvasu R. Aspartame and dental caries in the rat. *Pediatr Dent*. 1991; 13(4):217-220
21. Morris J. Manufacture and analysis of carbonated beverages. Ed 1. New York: Chemical Pub;1959
22. Negroni M. Microbiología Estomatológica, Fundamentos y guía práctica. 2da ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2009.
23. Nuñez D, García L. Bioquímica de la caries dentales. *Rev habn cien méd*. 2010; 9(2):156-166.
24. Hugo MV. Microbiología básica para el área de la salud y afines. 2.<sup>a</sup> edición. Medellín: Editorial universidad de Antioquia; 2008.
25. José R, Elvir M. Efecto del etanol sobre las membranas biológicas. *Rev. méd. hondur*. 1993; 61(1): 20-4.

# **VIII. ANEXOS**



## ANEXO N°1

PROTOCOLO ESTABLECIDO DE MACRODILUCIONES DEL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO.

### ENSAYO DE MACRODILUCION EN TUBO

#### DILUCIONES

	Control	Control	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8	Tubo 9	Tubo 10	Tubo 11	Tubo 12
H2O d	10 ml	—	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
Pdto."X"	—	5 ml	5 ml											
Agitar+Adicionar		5 ml de anterior		5 ml de T1	5 ml de T2	5 ml de T3	5 ml de T4	5 ml de T5	5 ml de T6	5 ml de T7	5 ml de T8	5 ml de T9	5 ml de T10	5 ml de T11

#### CONTROL

	Control	Control	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8	Tubo 9	Tubo 10	Tubo 11	Tubo 12
LB 2x	2 ml	4 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Diluciones	2 ml	—	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Cepa	—	—	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Lectura DO 550	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√

#### ENSAYO

	Control	Control	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8	Tubo 9	Tubo 10	Tubo 11	Tubo 12
LB 2x	4 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Diluciones	—	2 ml H2Od	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Cepa	100 µl		100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Incubar	24 hrs.		24 hrs.	24 hrs.	24 hrs.	24 hrs.	24 hrs.	24 hrs.	24 hrs.	24 hrs.	24 hrs.	24 hrs.	24 hrs.	24 hrs.
Lectura DO 550	√		√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√

## ANEXO N°2

### FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Efecto *in vitro* de bebidas carbonatadas con edulcorantes calóricos y acalóricos sobre

*Streptococcus mutans* ATCC 25175

#### Bebida Carbonatada Coca Cola Original

Concentraciones		DO 550nm											
		Ensayo1			Ensayo2			Ensayo3			Ensayo4		
		t 0hrs	t 24hrs	t 48hrs	t 0hrs	t 24hrs	t 48hrs	t 0hrs	t 24hrs	t 48hrs	t 0hrs	t 24hrs	t 48hrs
<b>BHI2x + Px</b>	C1	<b>0,390</b>	<b>0,397</b>	<b>0,412</b>	<b>0,390</b>	<b>0,397</b>	<b>0,412</b>	<b>0,390</b>	<b>0,397</b>	<b>0,412</b>	<b>0,390</b>	<b>0,397</b>	<b>0,412</b>
<b>BHI2x + H<sub>2</sub>OD</b>	C2	<b>0,031</b>	<b>0,022</b>	<b>0,034</b>	<b>0,031</b>	<b>0,022</b>	<b>0,034</b>	<b>0,031</b>	<b>0,022</b>	<b>0,034</b>	<b>0,031</b>	<b>0,022</b>	<b>0,034</b>
<b>BHI2x + H<sub>2</sub>OD+50 µl S.M</b>	C3	<b>0,035</b>	<b>0,390</b>	<b>0,420</b>	<b>0,035</b>	<b>0,390</b>	<b>0,420</b>	<b>0,035</b>	<b>0,390</b>	<b>0,420</b>	<b>0,035</b>	<b>0,390</b>	<b>0,420</b>
BHI2x + D.100% + 50 µl S.M	T1	0,355	0,524	0,536	0,384	0,527	0,529	0,370	0,526	0,533	0,369	0,526	0,533
BHI2x + D.50% + 50 µl S.M	T2	0,183	0,435	0,442	0,215	0,402	0,466	0,199	0,419	0,454	0,199	0,419	0,454
BHI2x + D.25% + 50 µl S.M	T3	0,092	0,378	0,384	0,137	0,412	0,446	0,115	0,395	0,415	0,115	0,395	0,415
BHI2x + D.12.5% + 50 µl S.M	T4	0,057	0,386	0,375	0,082	0,355	0,411	0,070	0,371	0,393	0,070	0,371	0,393
BHI2x + D.6.25% + 50 µl S.M	T1	0,035	0,402	0,397	0,060	0,333	0,344	0,048	0,368	0,371	0,048	0,368	0,371
BHI2x + D.3.12% + 50 µl S.M	T2	0,026	0,420	0,408	0,057	0,363	0,374	0,042	0,392	0,391	0,042	0,392	0,391
BHI2x + D.1.56% + 50 µl S.M	T3	0,019	0,415	0,427	0,048	0,395	0,398	0,034	0,405	0,413	0,034	0,405	0,413
BHI2x + D.0.78% + 50 µl S.M	T4	0,024	0,424	0,451	0,040	0,392	0,391	0,032	0,408	0,421	0,032	0,408	0,421

## FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Efecto *in vitro* de bebidas carbonatadas con edulcorantes calóricos y acalóricos sobre

*Streptococcus mutans* ATCC 25175

### Bebida Carbonatada Coca Cola Zero

Concentraciones		DO 550nm											
		Ensayo1			Ensayo2			Ensayo3			Ensayo4		
		t 0hrs	t 24hrs	t 48hrs	t 0hrs	t 24hrs	t 48hrs	t 0hrs	t 24hrs	t 48hrs	t 0hrs	t 24hrs	t 48hrs
BHI2x + Px	C1	0,359	0,370	0,378	0,360	0,370	0,380	0,360	0,370	0,379	0,360	0,370	0,379
BHI2x + H <sub>2</sub> OD	C2	0,014	0,020	0,015	0,020	0,020	0,020	0,017	0,020	0,018	0,017	0,020	0,018
BHI2x + H <sub>2</sub> OD+50 µl S.M	C3	0,020	0,421	0,466	0,020	0,430	0,470	0,020	0,426	0,468	0,020	0,426	0,468
BHI2x + D.100% + 50 µl S.M	T1	0,363	0,540	0,566	0,370	0,540	0,570	0,367	0,540	0,568	0,367	0,540	0,568
BHI2x + D.50% + 50 µl S.M	T2	0,191	0,448	0,474	0,200	0,450	0,480	0,196	0,449	0,477	0,196	0,449	0,477
BHI2x + D.25% + 50 µl S.M	T3	0,104	0,445	0,468	0,110	0,450	0,470	0,107	0,448	0,469	0,107	0,448	0,469
BHI2x + D.12.5% + 50 µl S.M	T4	0,062	0,445	0,463	0,070	0,450	0,470	0,066	0,448	0,467	0,066	0,448	0,467
BHI2x + D.6.25% + 50 µl S.M	T1	0,039	0,427	0,435	0,040	0,430	0,440	0,040	0,429	0,438	0,040	0,429	0,438
BHI2x + D.3.12% + 50 µl S.M	T2	0,032	0,436	0,421	0,040	0,440	0,430	0,036	0,438	0,426	0,036	0,438	0,426
BHI2x + D.1.56% + 50 µl S.M	T3	0,024	0,437	0,420	0,030	0,440	0,420	0,027	0,439	0,420	0,027	0,439	0,420
BHI2x + D.0.78% + 50 µl S.M	T4	0,020	0,442	0,444	0,020	0,450	0,450	0,020	0,446	0,447	0,020	0,446	0,447

## FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Efecto *in vitro* de bebidas carbonatadas con edulcorantes calóricos y acalóricos sobre

*Streptococcus mutans* ATCC 25175

### Bebida Carbonatada Inca Kola Original

Concentraciones		DO 550nm											
		Ensayo1			Ensayo2			Ensayo3			Ensayo4		
		t 0hrs	t 24hrs	t 48hrs	t 0hrs	t 24hrs	t 48hrs	t 0hrs	t 24hrs	t 48hrs	t 0hrs	t 24hrs	t 48hrs
BHI2x + Px	C1	0,003	0,018	0,019	0,004	0,015	0,017	0,004	0,017	0,018	0,004	0,017	0,018
BHI2x + H <sub>2</sub> O	C2	0,012	0,022	0,023	0,015	0,025	0,028	0,014	0,024	0,026	0,014	0,024	0,026
BHI2x + H <sub>2</sub> O + 50 µl S.M	C3	0,019	0,236	0,265	0,021	0,258	0,294	0,020	0,247	0,280	0,020	0,247	0,280
BHI2x + D.100% + 50 µl S.M	T1	0,014	0,054	0,085	0,010	0,080	0,089	0,012	0,067	0,087	0,012	0,067	0,087
BHI2x + D.50% + 50 µl S.M	T2	0,009	0,114	0,155	0,012	0,119	0,156	0,011	0,117	0,156	0,011	0,117	0,156
BHI2x + D.25% + 50 µl S.M	T3	0,015	0,160	0,198	0,012	0,170	0,178	0,014	0,165	0,188	0,014	0,165	0,188
BHI2x + D.12.5% + 50 µl S.M	T4	0,018	0,270	0,277	0,018	0,220	0,230	0,018	0,245	0,254	0,018	0,245	0,254
BHI2x + D.6.25% + 50 µl S.M	T1	0,022	0,375	0,402	0,022	0,265	0,263	0,022	0,320	0,333	0,022	0,320	0,333
BHI2x + D.3.12% + 50 µl S.M	T2	0,019	0,444	0,458	0,019	0,373	0,378	0,019	0,409	0,418	0,019	0,409	0,418
BHI2x + D.1.56% + 50 µl S.M	T3	0,022	0,476	0,490	0,020	0,462	0,477	0,021	0,469	0,484	0,021	0,469	0,484
BHI2x + D.0.78% + 50 µl S.M	T4	0,022	0,402	0,424	0,024	0,411	0,412	0,023	0,407	0,418	0,023	0,407	0,418

## FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Efecto *in vitro* de bebidas carbonatadas con edulcorantes calóricos y acalóricos sobre

*Streptococcus mutans* ATCC 25175

### Bebida Carbonatada Inca Kola Zero

Concentraciones		DO 550nm											
		Ensayo1			Ensayo2			Ensayo3			Ensayo4		
		t 0hrs	t 24hrs	t 48hrs	t 0hrs	t 24hrs	t 48hrs	t 0hrs	t 24hrs	t 48hrs	t 0hrs	t 24hrs	t 48hrs
<b>BHI2x + Px</b>	C1	0,001	0,014	0,015	0,001	0,011	0,014	0,001	0,013	0,015	0,001	0,013	0,015
<b>BHI2x + H<sub>2</sub>OD</b>	C2	0,013	0,019	0,020	0,011	0,019	0,022	0,012	0,019	0,021	0,012	0,019	0,021
<b>BHI2x + H<sub>2</sub>OD+50 µl S.M</b>	C3	0,017	0,308	0,313	0,016	0,315	0,324	0,017	0,312	0,319	0,017	0,312	0,319
BHI2x + D.100% + 50 µl S.M	T1	0,007	0,047	0,070	0,006	0,064	0,076	0,007	0,056	0,073	0,007	0,056	0,073
BHI2x + D.50% + 50 µl S.M	T2	0,011	0,170	0,189	0,008	0,167	0,178	0,010	0,169	0,184	0,010	0,169	0,184
BHI2x + D.25% + 50 µl S.M	T3	0,016	0,246	0,260	0,017	0,250	0,268	0,017	0,248	0,264	0,017	0,248	0,264
BHI2x + D.12.5% + 50 µl S.M	T4	0,019	0,264	0,272	0,019	0,282	0,301	0,019	0,273	0,287	0,019	0,273	0,287
BHI2x + D.6.25% + 50 µl S.M	T1	0,018	0,292	0,304	0,019	0,299	0,304	0,019	0,296	0,304	0,019	0,296	0,304
BHI2x + D.3.12% + 50 µl S.M	T2	0,024	0,310	0,315	0,017	0,316	0,329	0,021	0,313	0,322	0,021	0,313	0,322
BHI2x + D.1.56% + 50 µl S.M	T3	0,026	0,330	0,341	0,026	0,329	0,333	0,026	0,330	0,337	0,026	0,330	0,337
BHI2x + D.0.78% + 50 µl S.M	T4	0,021	0,355	0,364	0,021	0,371	0,397	0,021	0,363	0,381	0,021	0,363	0,381

## ANEXO N°3

### INFORMACIÓN NUTRICIONAL DE LA BEBIDAS CARBONATADAS CON EDULCORANTE CALÓRICOS



#### COCA-COLA® ORIGINAL

##### Guía diaria de alimentación (GDA)

Este envase tiene aprox. 3 porciones de 200ml.  
Cada porción de 1 vaso (200 ml) contiene:

Calorías 88 4%	Azúcares totales 21.6 g 24%	Grasas Totales 0.0 g 0%	Grasas saturadas 0.0 g 0%	Sodio 20 mg 1%
----------------------	--------------------------------------	----------------------------------	------------------------------------	----------------------

\* % del Valor Diario de Referencia para un adulto en base a 2000 kcal.

[Conoce más sobre GDA](#)

##### Ingredientes

Agua carbonatada, azúcar, color caramelo, ácido fosfórico, saborizantes naturales y cafeína.

##### Información Nutricional

	100 ml	1 vaso (200)ml
Energía	44 kcal	88 Kcal
Proteínas	0 g	0 g
Grasa Total	0 g	0 g
H. de C. Disp.	11 g	22 g
Azúcares totales	10.8 g	21.6 g
Sodio	≤ 10 mg	≤ 20 mg



#### INCA® Kola

##### Guía diaria de alimentación (GDA)

Este envase tiene aprox. 3 porciones de 200ml.  
Cada porción de 1 vaso (200 ml) contiene:

Calorías 80 4%	Azúcares totales 19.6 g 22%	Grasas Totales 0.0 g 0%	Grasas saturadas 0.0 g 0%	Sodio 20 mg 1%
----------------------	--------------------------------------	----------------------------------	------------------------------------	----------------------

\* % del Valor Diario de Referencia para un adulto en base a 2000 kcal.

[Conoce más sobre GDA](#)

##### Ingredientes

Agua carbonatada, azúcar, ácido cítrico, benzoato de sodio, cafeína, saborizantes naturales y artificiales y TARTRAZINA

##### Información Nutricional

	100 ml	1 vaso (200)ml
Energía	40 kcal	80 kcal
Proteínas	0 g	0 g
Grasa Total	0 g	0 g
H. de C. Disp.	10 g	20 g
Azúcares totales	9.8 g	19.6 g
Sodio	≤ 10 mg	≤ 20 mg

## ANEXO N°4

### INFORMACIÓN NUTRICIONAL DE LAS BEBIDAS CARBONATADAS CON EDULCORANTES ACALÓRICOS



#### COCA-COLA ZERO®

##### Guía diaria de alimentación (GDA)

Este envase tiene aprox. 3 porciones de 200ml.  
Cada porción de 1 vaso (200 ml) contiene:

Calorías 0	Azúcares totales 0.0 g	Grasas Totales 0.0 g	Grasas saturadas 0.0 g	Sodio 35 mg
0%	0%	0%	0%	1%

\* % del Valor Diario de Referencia para un adulto en base a 2000 kcal.

[Conoce más sobre GDA](#)

##### Información Nutricional

	100 ml	1 vaso (200)ml
Energía	0.2 kcal	0.4 kcal
Proteínas	0 g	0 g
Grasa Total	0 g	0 g
H. de C. Disp.	0 g	0 g
Azúcares totales	0 g	0 g
Sodio	≤ 18 mg	≤ 35 mg

##### Edulcorantes

Dosis edulcorante	mg en bebida final		IDA mg/kg masa corporal
	100 ml	Porción	
Aspartamo	24	48	40
Acesulfamo de potasio	16	32	15

##### Ingredientes

Agua carbonatada, color caramelo, ácido fosfórico, aspartamo, saborizantes naturales, benzoato de sodio, acesulfamo de potasio, citrato de sodio, cafeína, ácido cítrico.  
Fenilcetonúricos: contiene fenilalanina.



#### INCA® Kola Zero

##### Guía diaria de alimentación (GDA)

Este envase tiene aprox. 3 porciones de 200ml.  
Cada porción de 1 vaso (200 ml) contiene:

Calorías 1	Azúcares totales 0.0 g	Grasas Totales 0.0 g	Grasas saturadas 0.0 g	Sodio 35 mg
0%	0%	0%	0%	1%

\* % del Valor Diario de Referencia para un adulto en base a 2000 kcal.

[Conoce más sobre GDA](#)

##### Información Nutricional

	100 ml	1 vaso (200)ml
Energía	0.5 kcal	1 kcal
Proteínas	0 g	0 g
Grasa Total	0 g	0 g
H. de C. Disp.	0 g	0 g
Azúcares totales	0 g	0 g
Sodio	18 mg	35 mg

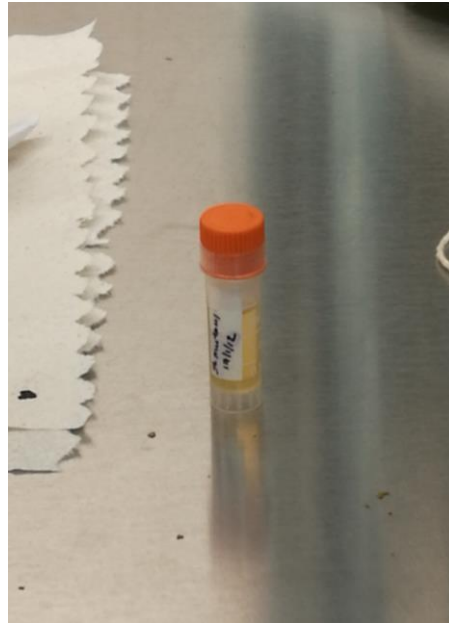
##### Edulcorantes

Dosis edulcorante	mg en bebida final		IDA mg/kg masa corporal
	100 ml	Porción	
Aspartamo	22	44	40
Acesulfamo de potasio	15	30	15

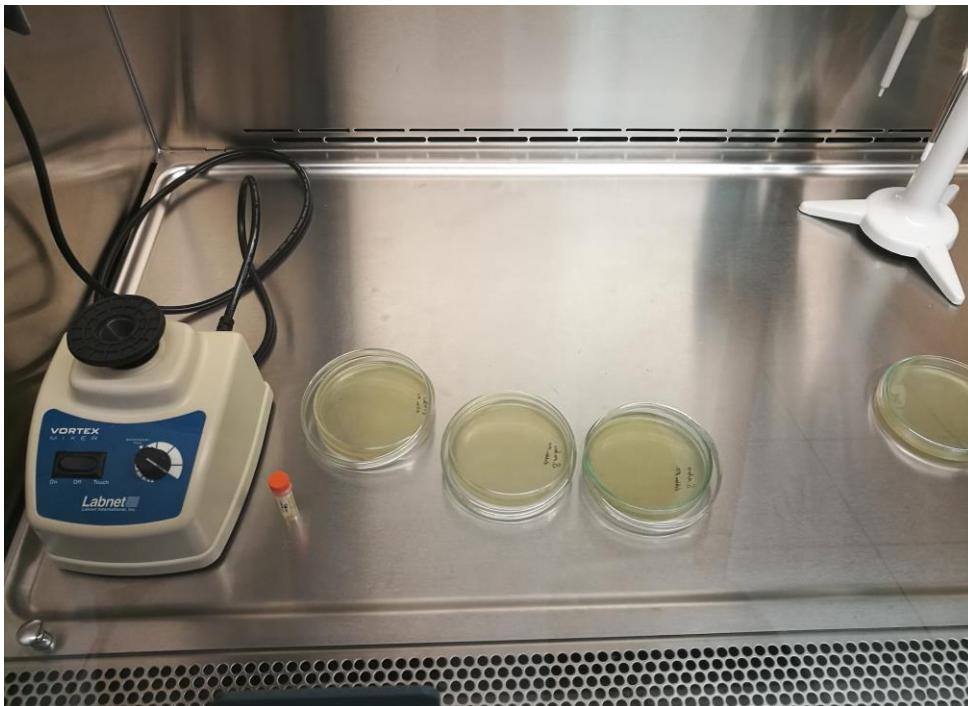
##### Ingredientes

Agua carbonatada, ácido cítrico, benzoato de sodio, ASPARTAMO, ACESULFAMO DE POTASIO, cafeína, saborizantes naturales y artificiales y TARTRAZINA.  
Fenilcetonúricos: contiene fenilalanina.

## ANEXO N°5



VIAL CRIOGÉNICO  
DE *STREPTOCOCCUS*  
*MUTANS* ATCC 25175



VIAL CRIOGÉNICO Y PLACAS PETRI CON AGAR  
NUTRITIVO

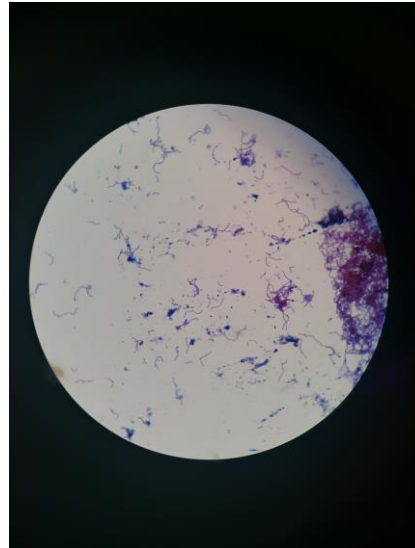
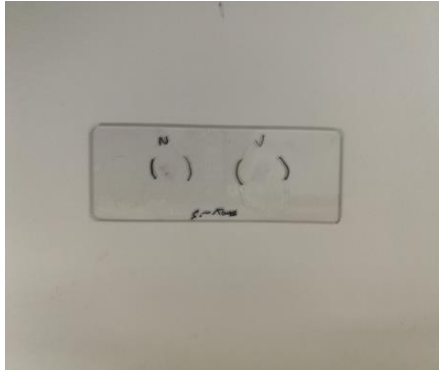




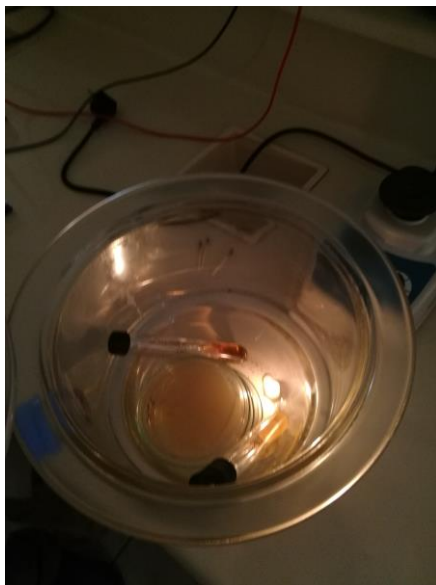
MÉTODO DE SIEMBRA EN ESTRIAS DE *STREPTOCOCCUS MUTANS* ATCC 25175



DESECACIÓN CON LA CAMPANA PARA ANAEROBIOSIS



COMPROBACIÓN FENOTÍPICA CON  
TINCIÓN GRAM DEL *STREPTOCOCCUS*  
*MUTANS* ATCC 25175



OVERNIGHT DE CALDO BHI CON *STREPTOCOCCUS*  
*MUTANS* ATCC 25175



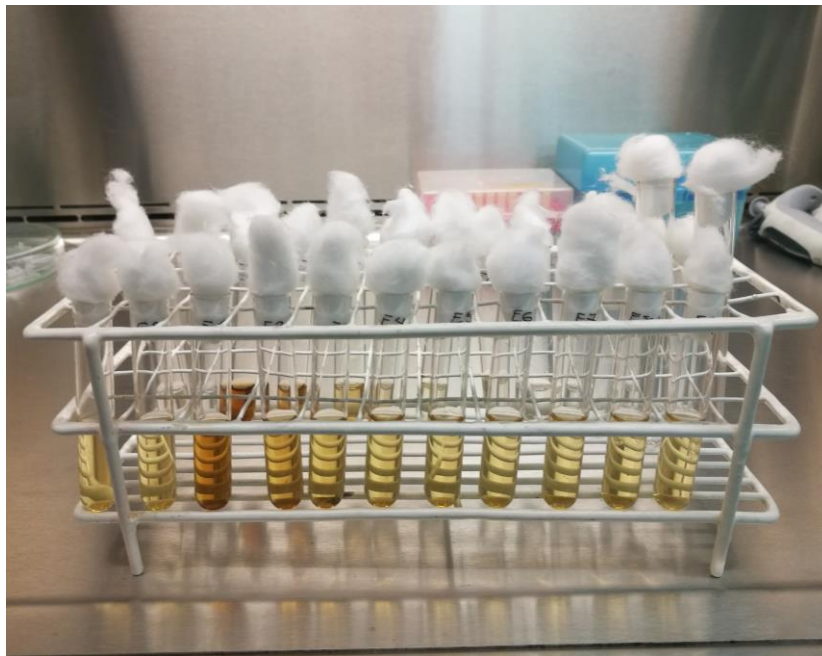
PREPARACIÓN DEL CALDO BHI Y  
AGAR MULLER HINTON



BEBIDAS CARBONATADAS PARA EL ENSAYO



DILUCIONES DE LA BEBIDA CARBONATADA



TUBOS DE ENSAYO CON 1mL DE CALDO BHI, 1mL DE LA DILUCION DE LA BEBIDA CARBONATADA Y 50 $\mu$ L DEL OVERNIGHT CON STREPTOCOCCUS MUTANS ATCC 25175



LECTURA DE LOS TUBOS DE ENSAYO EN  
EL ESPECTOFOTÓMETRO