

**ESTUDIO *IN VITRO* SOBRE EL EFECTO DE LA TAGATOSA EN EL
CRECIMIENTO BACTERIANO, VARIACIÓN DEL PH Y ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA EN *STREPTOCOCCUS MUTANS* Y *LACTOBACILLUS*
*SPP.***

**POR: CONSTANZA DANIELA BASTIDAS CARREÑO Y SEBASTIÁN
IGNACIO HERNÁNDEZ CARRASCO**

**Tesis presentada a la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del
Desarrollo para optar al grado académico de Licenciado en Odontología**

PROFESOR GUIA

Bioquímico, CARMEN GLORIA NARVÁEZ CARRASCO

Noviembre, 2018

CONCEPCIÓN

...Dedicada a mi abuelo Jorge, que no alcanzó a compartir
en vida este momento conmigo, para él este logro...

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a todos quienes fueron parte de esta investigación, de manera especial a la Sra. Reinella Muñoz y a Nathalie Venegas, por su paciencia infinita para enseñarnos y apoyarnos durante las largas horas de trabajo en el laboratorio de investigación.

Agradecemos a nuestra tutora, por su orientación y ayuda durante todo el proceso y por incentivar en nosotros las ganas de seguir investigando.

Agradecemos a nuestras familias por su apoyo incondicional, por motivarnos y acompañarnos durante las horas de mayor carga académica, siendo un pilar fundamental en nuestras vidas.

A nuestros amigos, compañeros y pololos, por los mensajes de ánimo, la paciencia y el cariño entregado durante este tiempo.

Por último, queremos agradecer a Nicolás Barriga y a Tomás Artaza, ya que gracias a ellos fue posible la realización de esta investigación.

TABLA DE CONTENIDOS

	Páginas
DEDICATORIA	2
AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE DE TABLAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	6
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	8
MARCO TEÓRICO	10
SUPUESTOS	16
OBJETIVOS	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
RESULTADOS	22
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	34
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

INDICE DE TABLAS

	Página
TABLA 1: Variables del estudio.	18
TABLA 2: Concentración de soluciones utilizadas en el estudio <i>in vitro</i> .	20
TABLA 3: Recuento bacteriano según % de tagatosa en ufc/mL a los 30 minutos.	22
TABLA 4: Recuento bacteriano según % de tagatosa + sacarosa en ufc/mL a los 30 minutos.	23
TABLA 5: Recuento bacteriano en ufc/mL de tagatosa al 50% en función del tiempo.	24
TABLA 6: Recuento bacteriano en ufc/mL de tagatosa y controles a los 60 min.	25

INDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1: Variación de pH en el tiempo para <i>Lactobacillus spp.</i> expuesto a tagatosa.	26
FIGURA 2: Variación de pH en el tiempo para <i>Streptococcus mutans</i> expuesto a tagatosa.	27
FIGURA 3: Variación de pH en el tiempo para <i>Lactobacillus spp.</i> en relación a los controles.	28
FIGURA 4: Variación de pH en el tiempo para <i>Streptococcus mutans</i> en relación a los controles.	29
FIGURA 5: Halo de inhibición en <i>Streptococcus mutans</i> expuesto a tagatosa al 50%, sacarosa y clorhexidina al 0,12% respectivamente.	29
FIGURA 6: Halo de inhibición en <i>Lactobacillus spp.</i> expuesto a sacarosa, tagatosa al 50% más sacarosa y clorhexidina al 0,12% respectivamente.	30

RESUMEN

Introducción: El ser humano siempre ha tenido un deseo innato por el sabor dulce, encontrado principalmente en la sacarosa. En la cavidad oral, las bacterias son capaces de metabolizar diversos sustratos, tales como azúcares refinados, generando ácido láctico principalmente y favoreciendo el desarrollo de caries dental, de lo cual, *Streptococcus mutans* ha sido considerado como el principal agente etiológico junto a *Lactobacillus spp.* Por lo mismo, la D-tagatosa ha atraído mucho la atención en los últimos años debido a sus beneficios para la salud y sus propiedades similares a la sacarosa, pero con menor efecto cariogénico. **Objetivo:** Evaluar *in vitro* el efecto de la tagatosa en el crecimiento bacteriano, variación del pH y capacidad antimicrobiana de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus spp.* **Materiales y métodos:** Se realizó un estudio cuantitativo de tipo experimental en el laboratorio de investigación de la Universidad del Desarrollo durante los meses de Junio a Octubre del 2018. Se evaluó el crecimiento bacteriano en ufc/mL de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus spp.* a tiempos de 0, 30, 120 y 240 minutos posterior a la aplicación de tagatosa en distintas concentraciones. Además, se registró el pH obtenido del caldo de cultivo líquido con un pH-metro para el análisis de acidificación del medio. Finalmente se evaluó su actividad antimicrobiana a través halo de inhibición. **Resultados:** Se evidenció aumento de crecimiento bacteriano al aplicar tagatosa al 50% en un tiempo de 30 minutos, obteniendo para *Streptococcus mutans* un valor de $2,2 \times 10^6$ ufc/mL y un pH de 6,21. *Lactobacillus spp.* presentó un crecimiento bacteriano de $5,6 \times 10^6$ ufc/mL con un pH de 6,19; ambos demostrando valores más ácidos y de mayor crecimiento que ante la exposición a agua destilada. Ambas cepas no presentaron halo de inhibición frente a la tagatosa independiente de la concentración utilizada. **Conclusión:** Los resultados demuestran la existencia de crecimiento bacteriano, ausencia de halo de inhibición y una curva de pH más ácida en cepas de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus spp.* expuestas a tagatosa.

INTRODUCCIÓN

El ser humano desde sus inicios se ha relacionado con los alimentos y ha ido buscando nuevas alternativas para satisfacer el apetito, es decir, la necesidad fisiológica de alimentarse a través de la ingesta selectiva de alimentos, las que a su vez han cambiado a lo largo de los años al modificar los estilos de vida y con ello las conductas alimentarias, teniendo mayor incidencia en la salud y la esperanza de vida de las distintas poblaciones (Cárcamo & Mena, 2006).

La dieta inadecuada es uno de los principales factores de riesgo de aparición de las principales enfermedades no transmisibles (ENT), como las cardiovasculares, el cáncer o la diabetes mellitus (Mariño, Velázquez & Gámez, 2016). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (2015) las ENT constituyen la principal causa de mortalidad en el mundo, dado que en 2012 provocaron el 68% de ellas, por lo que en este contexto una ingesta elevada de azúcares libres es preocupante por su asociación con la mala calidad de la dieta, la obesidad y el riesgo de contraer enfermedades no transmisibles.

El ser humano siempre ha tenido un deseo innato por el sabor dulce, por lo que ha sido buscado en alimentos como la miel y frutas, sin embargo, desde que se refinó en azúcar de mesa o sacarosa, ésta se ha convertido en el estándar para el dulzor, utilizado en diferentes presentaciones de consumo habitual por la población (Leskinen, 2007). Esto es especialmente relevante si se considera que las enfermedades dentales son las ENT más prevalentes del mundo, destacando la relación entre la ingesta de azúcares libres

con la caries dental (OMS, 2015). El 60%-90% de los escolares y casi el 100% de los adultos tienen caries dental en todo el mundo, y que junto a la enfermedad periodontal, son las principales causas de pérdida de piezas dentarias (OMS, 2012). Por esto, se recomienda firmemente una ingesta reducida de azúcares libres a lo largo de toda la vida, a menos del 10% de la ingesta calórica total e idealmente menor a 5% (OMS, 2015).

Muy poco se enfatiza en la motivación y la educación para la salud, que incluye la generación de destrezas en técnicas de higiene oral a la población de mayor riesgo, y el control del consumo de azúcares en los escolares, adolescentes y adultos mayores (Contreras, 2016).

La OMS (2003) ha definido la caries dental como un proceso localizado de origen multifactorial que se inicia después de la erupción dentaria, determinando el reblandecimiento del tejido duro del diente que puede evolucionar hasta la formación de una cavidad.

La D-tagatosa ha atraído mucho la atención en los últimos años debido a sus beneficios para la salud y para el control de la diabetes en la población (Rouhi, Mohammadi, Mortazavian & Sarlak, 2015). La tagatosa podría ser un sustituto de endulzantes en enjuagues bucales y pastas de dientes, además presenta diversos beneficios que la diferencian, tanto del azúcar común como de otros edulcorantes, lo que podría favorecer la masificación de este producto en diversas presentaciones comerciales y farmacéuticas (Jayamuthunagai, Gautam, Srisowmeya & Chakravarthy, 2016).

MARCO TEÓRICO

La formación de una caries resulta de la destrucción localizada del tejido dental duro por contenido ácido que procede de los procesos de fermentación llevados a cabo por determinadas bacterias patógenas (García, Casado & García, 2013). En la cavidad oral, las bacterias son capaces de metabolizar diversos sustratos, tales como azúcares refinados, generando ácidos, en especial ácido láctico, lo que puede desencadenar un pH por debajo de 5.5. Este descenso conlleva una disolución del componente principal de los prismas que forman el diente, denominada hidroxiapatita, que se constituye de iones de calcio, fosfato e hidroxilo, lo que genera como resultado final una cavitación localizada de la estructura dentaria (Núñez & García, 2010). La formación de ácidos orgánicos seguida de la exposición a carbohidratos dietéticos fermentables y la correspondiente disminución del pH de la placa sería un factor importante en la etiología de la caries (Vastenabond & cols., 2011).

En la concepción actual de la etiopatogenia de la caries, cambios medioambientales orales generan predominancia de algunas especies con potencial acidogénico, necesario para la generación de lesiones de caries. Así, por ejemplo, las especies tradicionalmente asociadas con lesiones de caries incluyen a *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, *Actinomyces spp.* y *Lactobacillus spp.* (Giacaman, Muñoz, Bravo & Farfán, 2013).

La bacteria *Streptococcus mutans* ha sido considerado como el principal agente etológico de la caries dental, ya que se adhiere a la película adquirida en la superficie del diente, sintetiza glucanos gracias a las enzimas glucosiltransferasas (GTF) y promueve la formación de la placa dental, produciendo ácidos como resultado del metabolismo de los carbohidratos de la dieta, viéndose involucrado en la iniciación de la desmineralización del esmalte; a diferencia de *Lactobacillus spp.*, que se asociaría mayormente con la colonización de zonas retentiva creadas por las lesiones en las que quedan atrapados físicamente, aumentando en número durante la progresión y avance de la lesión cariosa (Giacaman & cols.)

El término edulcorante, hace referencia a aquel aditivo alimentario que es capaz de mimetizar el efecto dulce del azúcar y que, habitualmente, aporta menor energía. Algunos de ellos son extractos naturales mientras que otros son sintéticos, en este último caso se denominan edulcorantes artificiales. desde el punto de vista del consumo de productos edulcorados, existen datos procedentes de encuestas que afirman que, actualmente, el empleo de edulcorantes acalóricos se busca con el objeto de disminuir el valor calórico total de la dieta, promover un descenso del peso corporal y/o prevenir el desarrollo de enfermedades como la Diabetes o la caries dental (García, Casado & García, 2013).

De acuerdo a la literatura disponible sobre la química de carbohidratos, la D-tagatosa fue descubierta por Lobry de Bruyn & Van Ekenstein en 1897, cuando experimentaban con

los efectos de álcalis sobre D-galactosa, observando que las aldosas cambiaron a aldosas epiméricas y en adición de dos o más 2-cetosas (Roy & cols., 2018).

La FDA (2003) declara que la D-tagatosa es un alimento legal y lícito, y que no promueve el desarrollo de la caries dental. La seguridad de los edulcorantes se evalúa por las autoridades nacionales, por el Comité Científico de la Unión Europea sobre la Alimentación (SCF) y por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (García & cols., 2013).

La D-tagatosa es una rara cetohexosa natural, encontrada naturalmente en el árbol tropical *Sterculia setigera*, siendo un isómero de la D-galactosa y un epímero de la D-fructosa, sufriendo una quiralización del C4 de la cadena molecular. También se puede encontrar en productos lácteos, como chocolate caliente, algunos quesos y yogurt. (Patel, 2016). El poder endulzante de la D-tagatosa es casi equivalente a la sacarosa pero con un menor valor calórico de 1.5 kcal/g para los humanos (Zhan, 2014). El valor calórico es calculado bajo el supuesto de un 100% de absorción y utilización de energía de ácidos grasos de cadena corta producidos por la fermentación de tagatosa en el intestino, por lo que se considera un sobreestimado y su valor debería ser menor a 1.5 kcal/g ya que no toda la tagatosa es absorbida (Muddada, 2012).

La forma cíclica de la D-tagatosa consiste en α -D-tagato-2,6-piranososa (79%), β -D-tagato-2,6-piranososa (14%), α -D-tagato-2,5-furanosa (2%) y β -D-tagato-2,6-furanosa (5%) (Deok-Kun, 2007).

La tagatosa puede ser producida por procesos enzimáticos o químicos. Se han estudiado diferentes fuentes de biocatalizadores en el último tiempo, dentro de los cuales se encuentra la L-arabinosa isomerasa que cataliza la conversión de D-galactosa en D-tagatosa. La L-arabinosa isomerasa, presente en diversos microorganismos, cataliza la conversión de L-arabinosa a L-ribulosa *in vivo*. Dada su capacidad de isomerizar D-galactosa a D-tagatosa *in vitro*, también se denominan como D-galactosa isomerasas. La tasa de bioconversión de D-galactosa en D-tagatosa está estrechamente relacionada a la temperatura, ya que el equilibrio de la reacción se desplaza más hacia la D-tagatosa a una mayor temperatura, y debería realizarse bajo condiciones ácidas para prevenir la formación de subproductos amargos indeseados (Zhang, 2014).

No existe una enzima fructosa 4-epimerasa que pueda convertir fructosa en tagatosa. Una ruta alternativa es convertir fructosa en tagatosa vía alulosa usando una alulosa 3-epimerasa seguido por un reciclo con talitol dehidrogenasa/reductasa con NAD^+ (Seon, Seung, Kyoung, Deok-Kun, 2017).

Solo un 20% de la tagatosa ingerida oralmente es completamente metabolizada, principalmente en el hígado, siguiendo una vía metabólica idéntica a la de la fructosa. La porción remanente no absorbida es completamente fermentada por la microflora intestinal, ejerciendo un efecto prebiótico (Lu, Levin & Donner, 2007).

Dentro de las propiedades de este edulcorante se encuentra una temperatura de fusión de 134 °C, es estable a pH entre 2-7, posee alta solubilidad [58% a 21°C], por lo que es

ideal como potenciador de sabor en refresco y yogures. La D-tagatosa es menos higroscópica que la fructosa y tiene una viscosidad de 180 cP a 70% y 20°C siendo menor a la de la sacarosa. Se descompone más fácilmente a altas temperaturas en comparación con la sacarosa (Deok-Kun, 2007). Gracias a estas propiedades, la D-tagatosa puede ser usada como endulzante, texturizante, estabilizador, humectante y excipiente en alimentos y medicamentos (Muddada, 2012).

Estudios preliminares en animales muestran que la D-tagatosa disminuye los niveles de glucosa, generando gran interés en la comunidad científica. El mecanismo de acción propuesto es que podría generar interferencia en la absorción de carbohidratos a través de la inhibición de las disacaridasas intestinales y del transporte de glucosa. También podría actuar a través de la inhibición de la glucogenólisis hepática. Además de contribuir a reducir los niveles de colesterol, VLDL y LDL en comparación a la sacarosa, también parece aumentar los niveles del colesterol HDL. (Guerrero, Durán y Angavita, 2018).

No hay evidencia de que exista asociación entre el consumo de tagatosa y la generación de cáncer, efectos tóxicos neuronales, cambios metabólicos, reacciones alérgicas, teratogénesis, modificaciones en el control del apetito ni modificaciones en el control y balance de líquidos y electrolitos, siendo aprobados por distintos países para su consumo. En humanos el consumo de más de 30 g al día de D-tagatosa puede producir flatulencia y molestias gastrointestinales debido a que la flora fisiológica del colon la

puede fermentar, sin alterar la absorción de otros nutrientes (Calzada, Ruiz, Altamirano & Padrón, 2013).

Se ha visto que la D-tagatosa puede tener variados beneficios en la cavidad oral, dentro de los cuales se encuentra su capacidad anti-placa en relación a diversas bacterias peridonto-patógenas, dando como resultado su capacidad de disociar coagregaciones bacterianas (Lu & Levin, 2002).

La D-tagatosa podría incluso superar a otros edulcorantes que podrían competir con ella en la categoría de no cariogénicas. El xilitol altera los procesos metabólicos bacterianos y tiene un efecto bacteriostático sobre *Streptococcus mutans* forzando la captación y eflujo de este poliol no cariogénico. Sin embargo, se demostró que la capacidad superior del xilitol de suprimir la producción de ácidos desapareció cuando se agregó sacarosa, a diferencia de la D-tagatosa que sería capaz de inhibir la actividad de la sacarosa. Se menciona que la capacidad de la D-tagatosa de reducir la producción de ácidos y síntesis de glucanos insolubles en agua se debería a la reducción del crecimiento bacteriano (Sawada & cols., 2015).

A pesar de que puede resultar imposible eliminar el consumo de sacarosa en la población, sería ideal al menos reducir la frecuencia de consumo, reemplazándolos con análogos como la tagatosa, con el fin de disminuir o prevenir la prevalencia de enfermedades orales como la caries (Vastenabond & cols., 2012).

SUPUESTOS DE INVESTIGACIÓN

El crecimiento bacteriano, en función del tiempo, de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus spp.* disminuirá al ser expuesto a tagatosa y a tagatosa con sacarosa.

La variación del pH en el tiempo, en *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus spp.* será más básico al ser expuesto a tagatosa y a tagatosa con sacarosa.

Existirá actividad antimicrobiana a través de formación de halo de inhibición en *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus spp.* al ser expuesto a tagatosa y a tagatosa con sacarosa.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar *in vitro* el efecto de la tagatosa en el crecimiento bacteriano, variación de pH y su capacidad antimicrobiana sobre *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus spp.*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Describir la variación de pH en el tiempo de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus spp.* expuestos a tagatosa y a tagatosa con sacarosa.

Determinar el recuento bacteriano en función del tiempo de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus spp.* expuestos a tagatosa y a tagatosa con sacarosa.

Determinar la capacidad antimicrobiana a partir de la formación de halos de inhibición en *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus spp.* expuestos a tagatosa y a tagatosa con sacarosa.

MATERIALES Y MÉTODO

La presente investigación corresponde a un estudio cuantitativo de ciencias básicas de tipo experimental *in vitro*, realizado entre los meses de Junio y Octubre del año 2018 en el laboratorio de investigación de la Universidad del Desarrollo, respetando todas las normas y medidas de bioseguridad del lugar.

TABLA 1. Variables del estudio.

Nombre variable	Clasificación variable	Definición conceptual	Definición operacional	Indicador
Crecimiento bacteriano	Cuantitativa Razón Discreta	Crecimiento en el número de bacterias a través de fisión binaria o simple.	Se cuenta el número de colonias por placa.	Ufc/mL.
Variación de pH	Cuantitativa Continua Razón	Es la diferencia en el grado de acidez o alcalinidad de la solución.	Determinación del pH por medio de un pH-metro.	Escala pH (0 a 14).
Tipo bacteria	Cualitativa Dicotómica Nominal	Microrganismos unicelulares procariontes que se pueden clasificar según su respiración, necesidades de crecimiento o forma.	Bacterias reconocidas por su potencial cariogénico.	(1) Cepas <i>Streptococcus mutans</i> . (2) Cepas <i>Lactobacillus spp.</i>

Concentración de tagatosa	Cuantitativa Continua Razón	Cantidad en gramos de Tagatosa dividido por mL de solución.	Concentración como edulcorante.	g/mL (%).
Actividad antimicrobiana	Cualitativa Dicotómica Nominal	Capacidad de matar/destruir/inactivar microorganismos, impedir su proliferación y/o impedir su acción.	Capacidad de formar halo de inhibición	Presencia o ausencia de halo.

Para la recolección de datos lo primero a realizar fue favorecer el crecimiento de *Streptococcus mutans spp 50* y *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356 (Lactobacillus spp)* a partir de ceparios presentes en el Laboratorio de investigación de la Universidad del Desarrollo, esto a través de medio de cultivo líquido, para asegurar una población bacteriana viable de ambas cepas, de lo que luego se obtuvo un cultivo sólido. Para ello, *Streptococcus mutans* se cultivó en placas Petri con agar mitis salivarius con 20% de sacarosa durante 48 hrs a 37°C en ambiente de microaerofilia. *Lactobacillus spp* se cultivó en placas Petri con agar rogosa más 40 micro litros de ácido acético. Se prepararon diversas soluciones de tagatosa (Tagatesse® Damhert Nutrition) al 25%,

50%, 75% y 100%, considerándose 50% la concentración necesaria para una taza de agua de 200mL según indicaciones de la tagatosa utilizada. De igual forma se realizaron soluciones con tagatosa al 25%, 50%, 75% y 100% pero sumándole sacarosa en una misma concentración relacionada también con la concentración necesaria para una taza de agua de 200mL. Además se realizaron 4 controles, un control positivo que corresponde a clorhexidina al 0,12%, un control negativo utilizando agua destilada, y además sacarosa (Azúcar Iansa®) y sucralosa (SugarOff® Daily) utilizando la misma lógica de concentración. Finalmente se obtuvieron 12 tubos de ensayo previamente esterilizados con diferentes concentraciones a estudiar (Tabla 2).

TABLA 2. Concentración de soluciones utilizadas en el estudio *in vitro*.

		Gramos	mL	
Solución 1	Tagatosa 100%	0.27 g	10 mL	
Solución 2	Tagatosa 75 %	0.2025 g	10 mL	
Solución 3	Tagatosa 50%	0.135 g	10 mL	
Solución 4	Tagatosa 25%	0.0675 g	10 mL	
Solución 5	Tagatosa 100% + Sacarosa	0.27 g	0.25 g	10 mL
Solución 6	Tagatosa 75% + Sacarosa	0.2025 g	0.25 g	10 mL
Solución 7	Tagatosa 50% + Sacarosa	0.135 g	0.25 g	10 mL
Solución 8	Tagatosa 25% + Sacarosa	0.0675 g	0.25 g	10 mL

Solución 9	Sacarosa	0.25 g	10 mL
Solución 10	Sucralosa	0.06 g	10 mL
Solución 11	Clorhexidina 0.12%		
Solución 12	Agua destilada		

Datos obtenidos de fuente propia

Se realizó cultivos líquidos para *Lactobacillus spp* en donde se agregó a cada tubo de ensayo previamente esterilizado 4mL de caldo agar rogosa, 100µL de bacteria y 1mL de solución. Para el cultivo líquido de *Streptococcus mutans*, se añadió 4mL de caldo mitis salivarius, 100µL de bacteria y 1mL de solución. La concentración de bacterias de donde se extrajo los 100µL fue obtenida utilizando el estándar de turbidez de McFarland. De los tubos preparados se sacó 50µL para el cultivo de cada placa Petri, con su respectivo medio de cultivo sólido, ya sea mitis salivarius o agar rogosa. La extracción de los µL del tubo de ensayo para la siembra en placas Petri fue sacada de la estufa de cultivo (QUIMIS®) a distintos tiempos desde la exposición a la solución, siendo estos a los 0 min, 30 min, 60 min y 240 min. Lo anterior fue realizado por triplicado en placas Petri previamente rotuladas, con asa de siembra, bajo campana y expuesto a mechero para asegurar esterilidad. Luego de ser sembradas se dejó incubar por 48 horas en ambiente de microaerofilia. Transcurrido el tiempo necesario, las placas Petri se llevaron a un contador de colonias (PHOENIX CP 600 PLUS®) para su registro. Para el estudio de variación del pH, se realizó tubos de ensayo con cada solución, más su medio de cultivo líquido y bacteria correspondiente, de la misma forma con lo cual se sembró, estas fueron dejadas en la estufa de cultivo, y a los 0, 30 y 60 minutos desde la exposición a la

solución, posteriormente se midió su pH con un pH-metro (HANNA pH 211®). Para el estudio de halo de inhibición, las bacterias se sembraron en placas Petri por triplicado con una tórula, 50µL aproximadamente, luego se perforó en su centro con un saca bocado y se añadió 150µL de solución. Se dejó incubar en las mismas condiciones y posteriormente se analizó la presencia de halo de inhibición. Los datos fueron escritos en formato Excel de donde se obtuvo media y desviación estándar en caso de los triplicados y sólo media en los resultados de medición de pH.

RESULTADOS

Para el análisis de crecimiento bacteriano se obtuvo un total de 288 placas Petri, según las distintas concentraciones utilizadas y los diferentes tiempos de siembra desde su exposición a dichas soluciones. En todas las placas Petri, ya sea con *Lactobacillus spp* o *Streptococcus mutans* se observó crecimiento bacteriano, independiente de la concentración de tagatosa utilizada. Sin embargo, con respecto a los 30 minutos, en *Lactobacillus spp* se observa que a medida que se aumenta la concentración de tagatosa existe una disminución en la cantidad de ufc/mL, siendo el valor más bajo con tagatosa al 100% de $3,1 \times 10^6 \pm 10,8 \times 10^5$, presentando un comportamiento inversamente proporcional, indistintamente, con *Streptococcus mutans* se observa que el valor más bajo se da con tagatosa al 25%, siendo este de $1,2 \times 10^6 \pm 3,8 \times 10^5$, sin embargo no presenta proporcionalidad (Tabla 3).

TABLA 3. Recuento bacteriano según % de tagatosa en ufc/mL a los 30 minutos.

	<i>Lactobacillus spp</i>		<i>Streptococcus mutans</i>	
	Media	DE	Media	DE
Tagatosa 25%	$6,1 \times 10^6$	$3,8 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$	$2,0 \times 10^5$
Tagatosa 50%	$5,6 \times 10^6$	$7,6 \times 10^5$	$2,2 \times 10^6$	$2,3 \times 10^5$
Tagatosa 75%	$4,8 \times 10^6$	$12,7 \times 10^5$	$1,3 \times 10^6$	$2,8 \times 10^5$
Tagatosa 100%	$3,1 \times 10^6$	$10,8 \times 10^5$	$1,7 \times 10^6$	$3,8 \times 10^5$

El crecimiento bacteriano posterior a la exposición de tagatosa más sacarosa indicó que para ambas cepas bacterianas disminuyó la cantidad de ufc/mL en la medida que se aumentaba la concentración de tagatosa, manteniendo constante la de sacarosa, por ende, su valor más bajo fue con tagatosa al 100%, dando en *Lactobacillus spp* un $2,6 \times 10^6 \pm 4,3 \times 10^5$ y en *Streptococcus mutans* un $1,5 \times 10^6 \pm 2,8 \times 10^5$ (Tabla 4).

TABLA 4. Recuento bacteriano según % de tagatosa + sacarosa en ufc/mL a los 30 minutos.

	<i>Lactobacillus spp</i>		<i>Streptococcus mutans</i>	
	Media	DE	Media	DE
Tagatosa 25% + sacarosa	$5,3 \times 10^6$	$10,0 \times 10^5$	$\gg 10^6$	0,0
Tagatosa 50% + sacarosa	$4,2 \times 10^6$	$0,9 \times 10^5$	$2,2 \times 10^6$	$3,4 \times 10^5$
Tagatosa 75% + sacarosa	$3,8 \times 10^6$	$0,8 \times 10^5$	$1,9 \times 10^6$	$0,5 \times 10^5$
Tagatosa 100% +	$2,6 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$2,8 \times 10^5$

sacarosa

El comportamiento bacteriano en función del tiempo, desde la exposición a tagatosa al 50%, indicó en *Lactobacillus spp* una disminución, siendo su valor más bajo a los 240 minutos con $4,1 \times 10^6 \pm 4,6 \times 10^5$ y su valor más alto en cuanto a la cantidad de ufc/mL a los 0 min con $6,0 \times 10^6 \pm 6,1 \times 10^5$. De distinta forma, *Streptococcus mutans* demostró que a medida que transcurría el tiempo la cantidad de ufc/mL fue en aumento, siendo su valor más bajo a los 0 min con $1,8 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^5$ y su valor más alto a los 240 minutos con $\gg 10^6$, lo que ocasionó el tapiz completo de la placa Petri (Tabla 5).

TABLA 5. Recuento bacteriano en ufc/mL de tagatosa al 50% en función del tiempo.

	<i>Lactobacillus spp</i>		<i>Streptococcus mutans</i>	
	Media	DE	Media	DE
Tagatosa a los 0 min	$6,0 \times 10^6$	$6,1 \times 10^5$	$1,8 \times 10^6$	$1,1 \times 10^5$
Tagatosa a los 30 min	$5,6 \times 10^6$	$7,6 \times 10^5$	$2,2 \times 10^6$	$2,3 \times 10^5$
Tagatosa a los 60 min	$4,9 \times 10^6$	$6,9 \times 10^5$	$2,3 \times 10^6$	$0,8 \times 10^5$
Tagatosa a los 240 min	$4,1 \times 10^6$	$4,6 \times 10^5$	$\gg 10^6$	$0,0 \times 10^5$

Con respecto al crecimiento bacteriano y sus respectivos controles a los 60 minutos desde la exposición a la solución, se puede observar el nulo crecimiento con clorhexidina, tanto para *Lactobacillus spp* como para *Streptococcus mutans* con $0,0 \pm$

0,0. Por el contrario, la que presentó mayor crecimiento en el caso de *Lactobacillus spp* fue la sacarosa con un $5,7 \times 10^6 \pm 5,0 \times 10^5$ y en el caso de *Streptococcus mutans* fue la tagatosa al 50% con un valor de $2,3 \times 10^6 \pm 0,8 \times 10^5$. Para ambas cepas bacterianas la tagatosa al 50% presenta mayor crecimiento bacteriano en comparación con su control negativo con agua destilada (Tabla 6).

TABLA 6. Recuento bacteriano en ufc/mL de tagatosa y controles a los 60 min.

	<i>Lactobacillus spp</i>		<i>Streptococcus mutans</i>	
	Media	DE	Media	DE
Tagatosa 50%	$4,9 \times 10^6$	$6,9 \times 10^5$	$2,3 \times 10^6$	$0,8 \times 10^5$
Tagatosa 50% + sacarosa	$5,6 \times 10^6$	$0,3 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6$	$3,1 \times 10^5$
Clorhexidina (+)	0,0	0,0	0,0	0,0
Agua destilada (-)	$3,7 \times 10^6$	$10,3 \times 10^5$	$0,9 \times 10^6$	$0,8 \times 10^5$
Sacarosa	$5,7 \times 10^6$	$5,0 \times 10^5$	$2,1 \times 10^6$	$3,7 \times 10^5$
Sucralosa	$5,2 \times 10^6$	$5,4 \times 10^5$	$1,4 \times 10^6$	$2,4 \times 10^5$

Relacionado con la variación de pH en el tiempo, posterior a la aplicación de tagatosa en *Lactobacillus spp*, es posible visualizar que desde el minuto 0 hasta el minuto 30 existió en todas las concentraciones una acidificación del medio, siendo su valor más bajo a los 30 minutos con tagatosa al 50% obteniendo un pH de 6,19 y su valor más alto con tagatosa al 100% con un pH de 6,29. Transcurrido el tiempo, desde los 30 a 60 minutos

todas las concentraciones presentan un aumento de pH hacia un medio más básico (Figura 1).

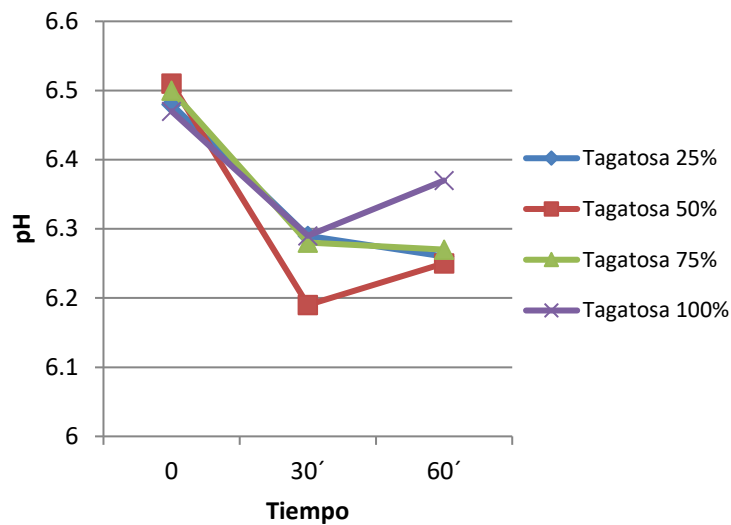


FIGURA 1: Variación de pH en el tiempo para *Lactobacillus spp.* expuesto a tagatosa.

De la misma forma pero aplicada a *Streptococcus mutans*, se observó que desde el minuto 0 hasta el minuto 30 también existe en todas las concentraciones de tagatosa una acidificación del medio, con su valor más bajo para tagatosa al 50% y 75% con un pH de 6,21 y su valor más básico con tagatosa al 100 % con un pH de 6,25. Transcurrido el tiempo, desde los 30 a 60 minutos todas las concentraciones continúan presentando una disminución de pH hacia un medio más ácido, alcanzando su valor más bajo la tagatosa al 25% con un pH de 6,16 (Figura 2).

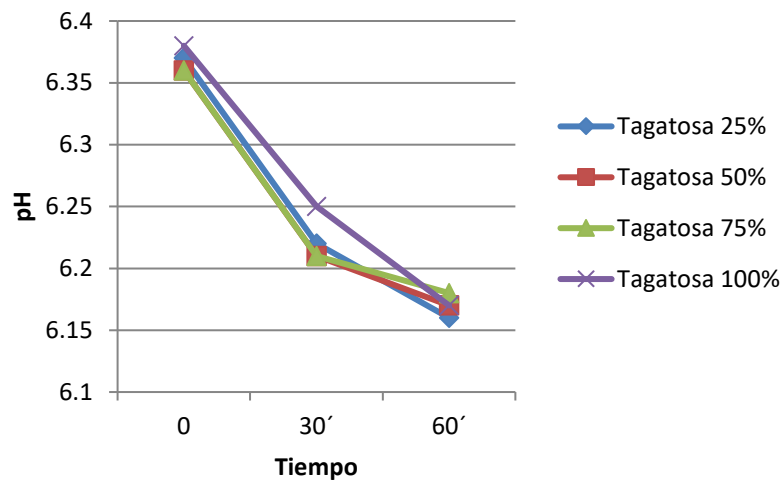


FIGURA 2: Variación de pH en el tiempo para *Streptococcus mutans* expuesto a tagatosa.

La variación de pH en el tiempo para *Lactobacillus spp* relacionada con sus controles, demostró que la tagatosa al 50% obtuvo el valor más ácido a los 30 minutos con un pH de 6,19, más ácido que el control negativo con un pH de 6,38, e incluso por bajo la sacarosa, que obtuvo un valor de 6,43; por el contrario, el valor más básico en el mismo tiempo lo obtuvo el control positivo con clorhexidina, con un pH de 6,46 (Figura 3).

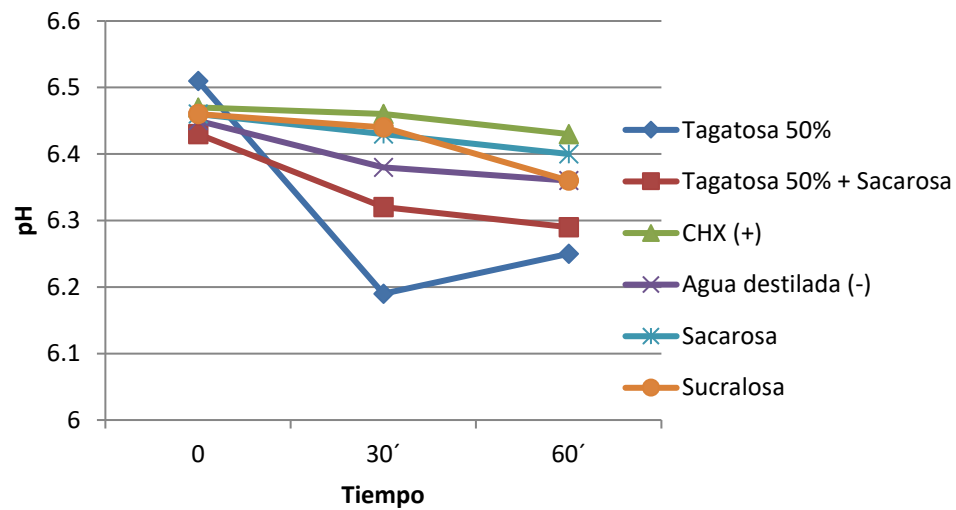


FIGURA 3: Variación de pH en el tiempo para *Lactobacillus spp.* en relación a los controles.

Por el contrario, la variación de pH en el tiempo para *Streptococcus mutans* relacionada con sus controles, demostró que la sucralosa obtuvo el valor más ácido a los 30 minutos con un pH de 6,19, seguida por la tagatosa al 50% con un pH de 6,21 y luego por la sacarosa con un valor de 6,22; todas indicando valores más ácidos que con agua destilada que dio un pH de 6,28; a diferencia de lo anterior, el valor más básico en el mismo tiempo lo obtuvo el control positivo con clorhexidina, con un pH de 6,48 (Figura 4).

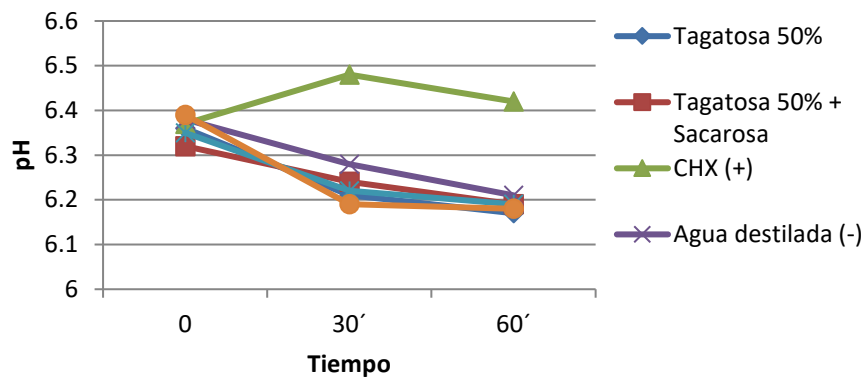


FIGURA 4: Variación de pH en el tiempo para *Streptococcus mutans* en relación a los controles.

Los resultados de la actividad antimicrobiana de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus spp.*, posterior al análisis de halo de inhibición estuvo presente sólo en el caso del control positivo con clorhexidina al 0,12%, en todas las demás soluciones empleadas no se observó halo de inhibición, independiente de la concentración utilizada (Figuras 5 y 6).

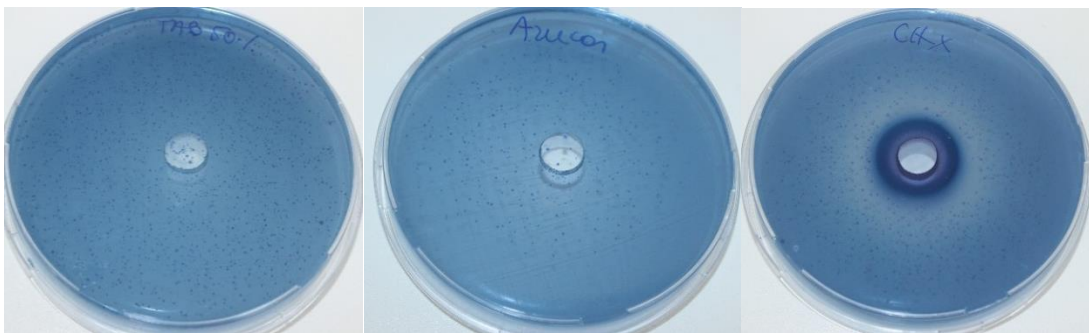


FIGURA 5: Halo de inhibición en *Streptococcus mutans* expuesto a tagatosa al 50%, sacarosa y clorhexidina al 0,12% respectivamente.



FIGURA 6: Halo de inhibición en *Lactobacillus spp.* expuesto a sacarosa, tagatosa al 50% más sacarosa y clorhexidina al 0,12% respectivamente.

DISCUSIÓN

El uso de endulzantes no cariogénicos representa hoy en día un importante método para prevenir la caries dental, por lo que a partir de esta premisa es que se han identificado y clasificado diversos edulcorantes como el xilitol, la isomaltosa, la sucralosa y la D-tagatosa como edulcorantes que no son fermentados por las bacterias de la placa dental, es decir, amigables con la salud dental (Leskinen, 2007).

En el presente estudio se demostró que frente a la exposición a tagatosa en sus diversas concentraciones, el pH para *Lactobacillus spp.* y *Streptococcus mutans* se volvía más ácido, inclusive en comparación con la sacarosa quién demostró una acidificación menor (Figuras 3 y 4). Lo anterior difiere a lo descrito por Vastenabond & cols. (2011) en relación al efecto de la D-Tagatosa con la formación de caries dental, ya que realizaron un estudio en base a enjuagues con D-tagatosa y sacarosa, en donde concluyen que a los 30 minutos de enjuagarse con D-tagatosa no se alcanza un pH crítico, mientras que al

hacerlo solamente con sacarosa, éste descendía logrando incluso un pH bajo 5.0. Esta discrepancia puede ser explicada por la formulación de la tagatosa comercial, ya que ésta, al igual que otros edulcorantes, presenta entre sus componentes algunos agentes de carga o excipientes, que corresponden a elementos destinados a favorecer la consistencia o mejorar el sabor. Dentro de los excipientes que contiene la tagatosa utilizada se encuentran la inulina y los oligosacáridos, que son carbohidratos que pueden ser fermentados por bacterias cariogénicas como *S.mutans* para producir ácidos y por consiguiente generar un descenso en el pH de la cavidad oral (Ojeda, Oviedo & Salas, 2013). Esto podría significar que a pesar de los posibles beneficios de este edulcorante en la cavidad bucal, no sería efectivo debido a la ineficacia de los formatos comercializados para la población.

En base a los resultados que se obtuvo al exponer a *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus spp* a tagatosa más sacarosa, se evidenció un menor crecimiento bacteriano en la medida que se aumentaba la concentración de tagatosa (Tabla 3). En relación a lo anterior, en el estudio realizado por Sawada & cols. (2015) se establece que la D-tagatosa podría incluso superar a otros edulcorantes en la categoría de no cariogénicos, como por ejemplo al xilitol, que vio afectada su capacidad de suprimir la producción de ácidos cuando se agregó sacarosa, a diferencia de la D-tagatosa que fue capaz de inhibir la actividad de la sacarosa. También Hasibul & cols. (2018) concluyen que la D-tagatosa produce un retardo en el crecimiento *in vitro* de *S. mutans*, así como una reducción de la formación de biopelícula al interferir con la utilización de sacarosa, estableciendo que la D-tagatosa podría competir en el uso de la glicosiltransferasa

bacteriana. En el presente estudio, los resultados podrían eventualmente deberse a una saturación del medio que impediría mayor crecimiento bacteriano, más que a un efecto inhibitorio de la tagatosa a la sacarosa, ya que todos los resultados indican que la tagatosa comercial utilizada sería efectivamente metabolizada por las bacterias cariogénicas, ya que en su mayoría, independiente de la concentración utilizada, se evidencia mayor crecimiento bacteriano (Tablas 2 y 5) y un pH más ácido (Figuras 3 y 4) en relación a su control negativo.

De las placas realizadas para estudiar la actividad antimicrobiana, se observó inexistencia de halo de inhibición, tanto para *Lactobacillus spp.* como para *Streptococcus mutans*, expuestos a tagatosa en sus diversas concentraciones, independiente de la adición de sacarosa, como además, en sus controles con agua destilada, sacarosa y sucralosa, siendo las placas Petri con clorhexidina al 0,12% las únicas con presencia de halo de inhibición. No se han encontrado estudios que evalúen la actividad antimicrobiana de la tagatosa, a diferencia de otros edulcorantes como el xilitol y stevia, en donde Tovar & Cupé (2016) determinaron que ambos forman halo de inhibición comprobando su eventual actividad antimicrobiana frente a *S. mutans*. Incluso, se ha demostrado la eficacia clínica a partir de enjuagues bucales de xilitol y clorhexidina (Jain & cols, 2015). Dicho lo anterior, no se le puede atribuir un efecto bacteriostático o bactericida a la tagatosa comercial utilizada en este estudio.

Según un estudio realizado por Deok-Kun. (2007) la D-tagatosa ha demostrado ser un edulcorante con abundantes beneficios tanto físicos, químicos y biológicos, en especial

para el uso de diversos formatos comerciales asociados al área dental. Sin embargo, se sugiere un estudio exhaustivo en relación al tipo de tagatosa a utilizar, ya que según los resultados obtenidos en el presente estudio, este formato comercial de tagatosa podría ocasionar un aumento de la actividad bacteriana cariogénica por sobre un beneficio en la salud bucal. Es por ello importante la realización de nuevos estudios, que utilicen tagatosa tanto de uso comercial como pro análisis, y que comparen su efecto sobre el crecimiento de *S.mutans* y *Lactobacillus spp.*, ya sea, en presencia como en ausencia de sacarosa añadida, como de igual forma en relación a controles positivos y negativos, para comprobar que los beneficios asociados a este edulcorante son realmente aplicados a la salud de las personas a través de los formatos comercializados.

CONCLUSIÓN

Los resultados demuestran la existencia de crecimiento bacteriano, ausencia de halo de inhibición y una curva de pH más ácida en cepas de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus spp.* expuestas a tagatosa en función del tiempo y en comparación a controles con clorhexidina al 0,12%, agua destilada, sacarosa y sucralosa.

Se evidenció aumento de crecimiento bacteriano al aplicar Tagatosa al 50% en un tiempo de 30 minutos, obteniendo para *Streptococcus mutans* un valor de $2,2 \times 10^6$ ufc/mL $\pm 2,3 \times 10^5$ y un pH de 6,21. *Lactobacillus spp.* presentó un crecimiento bacteriano de $5,6 \times 10^6$ ufc/mL $\pm 7,6 \times 10^5$ con un pH de 6,19; ambos demostrando incluso valores más ácidos y de mayor crecimiento que ante la exposición al control negativo con agua destilada. Ambas cepas no presentaron halo de inhibición frente a la tagatosa independiente de la concentración utilizada a excepción de las expuestas a su control positivo con clorhexidina al 0,12%.

Los resultados obtenidos contrastan con los supuestos de investigación planteados al inicio del estudio, por lo que es necesario realizar nuevos estudios en base a tagatosa de uso comercial para ver su real efecto y beneficio sobre la población en general, para ver que las aplicaciones que se le dan a este edulcorante sean realmente las adecuadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Calzada, R., Ruiz, M., Altamirano, N. & Padrón, M. (2013). Características de los edulcorantes no calóricos y su uso en niños. *Acta pediátrica de México*. 34:141-153. Obtenido de la base de datos EBSCO el día 12 de Octubre de 2018.

Cárcamo, G., & Mena, C. (2006). ALIMENTACION SALUDABLE. *Horizontes Educativos*, (11). Obtenido de la base de datos EBSCO el día 26 de Agosto de 2017.

Contreras Rengifo, Adolfo. (2016). La promoción de la salud general y la salud oral: una estrategia conjunta. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*, 9(2), 193-202.

Deok-Kun Oh. (2007). Tagatose: properties, applications, and biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 76, 1-8. Obtenido de la base de datos EBSCO el día 26 de Agosto de 2017.

Foods and Drug Administration. (2003). Food Labeling: Health Claims; D-tagatose and Dental Caries. Recuperado el 26 de Agosto de 2017 de <https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2003-07-03/html/03-16949.htm>.

García, J., Casado, G., & García, J. (2013). Una vision global y actual de los edulcorantes. Aspectos de regulación. *Nutrición Hospitalaria*, 28 (4). Obtenido de la base de datos EBSCO el día 26 de Agosto de 2017.

Giacaman. R., Muñoz. C., Bravo. E., & Farfán. P. (2013). Cuantificación de bacterias relacionadas con la caries dental en saliva de adultos y adultos mayores. *Revista clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación*, 6 (2), 71-74.

Guerrero, M., Durán, S. & Angarita, L. (2018). D-Tagatose Is a Promising Sweetener to Control Glycaemia: A New Functional Food. *BioMed Research International*, vol 18. Obtenido de la base de datos EBSCO el día 20 de Marzo de 2018.

Hasibul, K., Nakayama, H., Hashimoto, M., Yamasaki, H., Junpei, T., Tada, A., Yoneda, S., Tokuda, M., Miyake, M. & Kuwahara, T. (2017). D-Tagatose inhibits the growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Molecular Medicine Reports*, 17(1):843-85. Obtenido de la base de datos EBSCO el 20 de Marzo de 2018.

Jain, A., Bhaskar, D., Gupta, D., Agali, C., Gupta, V., Gupta, R., Yadav, P., Lavate, A. & Chaturvedi M. (2015). Comparative evaluation of honey, chlorhexidine gluconate (0,2%) and combination of xylitol and chlorhexidine mouthwash (0,2%) on the clinical level of dental plaque: A 30 days randomized control trial. *Perspect Clin Res*, (6) 53-7. Recuperado de la base de datos EBSCO el día 11 de Agosto de 2018.

- Jayamuthunagai, J., Gautam, P., Srisowmeya, G. & Chakravarthy, M. (2016). Biocatalytic Production of D-Tagatose: A Potential Rare Sugar with Versatile Applications, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(16):3430-3437. Obtenido de la base de datos EBSCO el día 26 de Agosto de 2017.
- Leskinen, K. (2007). Sweets for my sweet, sugar-free for my honey. *Vital*, 4, 42-43. Obtenido de la base de datos EBSCO el día 26 de Agosto de 2017.
- Lu, Y. & Levin, G. (2002). Removal and prevention of dental plaque with D-tagatose. *International Journal of Cosmetic Science*, 24, 225-234. Obtenido de la base de datos EBSCO el día 26 de Agosto de 2017.
- Lu, Y., Levin, G. & Donner, T. (2008). Tagatose, a new antidiabetic and obesity control drug. *Diabetes Obes Metab*, 10(2):109-34. Obtenido de la base de datos EBSCO el día 26 de Agosto de 2017.
- Mariño, A., Núñez, M., & Gámez, A. (2016). Alimentación saludable. *Acta médica de Cuba*, 17 (1).
- Muddada, S. (2012). Tagatose: The Multifunctional Food Ingredient and Potential Drug. *Journal of Pharmacy Research*, 5(1), 626-631. Obtenido de la base de datos EBSCO el 10 de Agosto de 2018.
- Núñez, D. & García, L. (2010). Bioquímica de la caries dental. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 9 (2), 156-166.
- Ojeda, J., Oviedo, E. & Salas, L. (2013). Streptococcus mutans and dental caries. *CES Odontología*, 26(1), 44-56. Recuperado de la base de datos EBSCO el 10 de Agosto de 2018.
- Organización Mundial de la Salud (2003). The World Oral Health Report 2003. Recuperado el 26 de Agosto de 2017 de <http://apps.who.int/iris/handle/10665/68506>.
- Organización Mundial de la Salud. (Abril de 2012). Salud bucodental. Recuperado el 8 de Mayo de 2018, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es/>.
- Organización Mundial de la Salud. (2015). Directriz: Ingesta de azúcares para adultos y niños. Recuperado el 19 de Mayo de 2017 de http://www.who.int/nutrition/publications/guidelines/sugars_intake/es/
- Patel, M., Patel, A., Akhani, R., Dedania, S. & Patel, D. (2016). Bioproduction of D-Tagatose from D-Galactose Using Phosphoglucose Isomerase from Pseudomonas aeruginosa PAO1. *Appl Biochem Biotechnol*. 179(5):715-27. Obtenido de la base de datos EBSCO el día 12 de Octubre de 2018.

Rouhi, M., Mohammadi, R., Mortazavian, A. & Sarlak, Z. (2015). Combined effects of replacement of sucrose with D-tagatose and addition of different probiotic strains on quality characteristics of chocolate milk. *Dairy Science. & Technology*. 95:115–133. Obtenido de la base de datos EBSCO el día 12 de Octubre de 2018.

Roy, S., Chikkerur, J., Roy, S., Dhali, A., Kolte, A., Sridhar, M. & Samanta, A. (2018) Tagatose as a Potential Nutraceutical: Production, Properties, Biological Roles, and Applications. *J Food Sci*, 83(11):2699-2709. Obtenido de la base de datos EBSCO el 3 de Noviembre de 2018.

Sawada, D., Ogawa, T., Miyake, M., Hasui, Y., Yamaguchi, F., Izumori, K., & Tokuda, M. (2015).

Potent Inhibitory Effects of D-tagatose on the Acid Production and Water-insoluble Glucan Synthesis of *Streptococcus mutans* GS5 in the Presence of Sucrose. *Acta Medica Okayama*, 69 (2), 105-111. Recuperado de la base de datos ESCO el día 12 de Octubre de 2018.

Seon, L., Seung, H., Kyoung, K. & Deok-Kun, O. (2017) High-yield production of pure tagatose from fructose by a three-step enzymatic cascade reaction. *Biotechnol Lett*, (39): 1141 – 1143. Obtenido de la base de datos EBSCO el día 21 de Julio de 2018.

Tovar, G. & Cupé, A. (2016). Actividad antimicrobiana de la stevia en comparación con el xilitol, frente a los *Streptococcus mutans* -un estudio in vitro. *Revista Odontología Activa Cuenca*, (1) 2; 51-54. Recuperado de la base de datos EBSCO el 21 de Julio de 2018.

Vastenabond, C., Bertelsen, H., Hansen, S., Laursen, R., Saunders, J. & Eriknauer, K. (2011). Tagatose (D-tagatose). En L. O'Brien (Ed.), *Alternative sweeteners* (pp. 197-207). North America: CRC Press.

Zhan, Y., Xu, Z., Li, S., Liu, X., Xu, L., Feng, X. & Xu, H. (2014). Coexpression of β -D-galactosidase and L-arabinose isomerase in the production of D-tagatose: a functional sweetener. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62(11):2412-7. Obtenido de la base de datos EBSCO el día 12 de Octubre de 2018.

Zhang, Y., Fan, Y., Haijie, H., Yang, H., Luo, X., Li, Z., Zhou, H., Ma, W., Song, Y. & Zhang, T. (2017). D-Tagatose production by *Lactococcus lactis* NZ9000 Cells Harboring *Lactobacillus plantarum* L-arabinose Isomerase. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 51(2):288-294. Obtenido de la base de datos EBSCO el día 12 de Agosto de 2018.