

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

BEATRIZ CARRICONDE COLVARA

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *STEVIA REBAUDIANA* BERTONI E DE ADOÇANTES NÃO
CALÓRICOS SOBRE BACTÉRIAS CARIOGÊNICAS - ESTUDO *IN VITRO*

Porto Alegre

2015

BEATRIZ CARRICONDE COLVARA

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *STEVIA REBAUDIANA* BERTONI E DE ADOÇANTES NÃO
CALÓRICOS SOBRE BACTÉRIAS CARIOGÊNICAS - ESTUDO *IN VITRO*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Cirurgiã-Dentista.

Orientadora: Profa. Dra.Sandra Liana Henz

Porto Alegre

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Carriconde Colvara, Beatriz
Atividade antimicrobiana de Stevia rebaudiana
Bertoni e de adoçantes não calóricos sobre bactérias
cariogênicas - estudo in vitro / Beatriz Carriconde
Colvara. -- 2015.
24 f.

Orientadora: Sandra Liana Henz.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade
de Odontologia, Curso de Odontologia, Porto Alegre,
BR-RS, 2015.

1. Adoçante natural. 2. Stevia. 3. S. mutans. 4.
L. casei. 5. Cárie dentária. I. Henz, Sandra Liana,
orient. II. Título.

RESUMO

COLVARA, Beatriz Carriconde. **Atividade antimicrobiana de *Stevia rebaudiana* Bertoni e de adoçantes não calóricos sobre bactérias cariogênicas - estudo *in vitro***. 2015. 24 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

A cárie dentária é uma doença de alta prevalência na população. Seu controle está associado a diversos fatores, o que caracteriza essa doença como multifatorial e determina um caráter de difícil controle. O uso de adoçantes busca controlar o consumo de uma substância tão relevante a esta doença, a sacarose. A utilização dessas substâncias, além de proporcionar a redução no consumo da sacarose, também pode possibilitar a inibição do crescimento de micro-organismos como *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*, micro-organismos cariogênicos presentes na cavidade bucal. O objetivo do estudo foi avaliar a ação antimicrobiana *in vitro* de soluções de *Stevia rebaudiana* Bertoni e de adoçantes não calóricos sobre o crescimento de *S. mutans* e *L. casei*. As soluções utilizadas foram eritritol (1%, 5%, 10%), Fit Sucralose® (1%, 5%, 10%), Stevia® (1%, 5%, 10%), solução de *Stevia rebaudiana* Bertoni (1%, 5%, 10%) e digluconato de clorexidina (1%, 5%, 10%) como controle positivo. As cepas utilizadas foram *Streptococcus mutans* UA159 e *Lactobacillus casei* ATCC7469. A análise do efeito inibitório desses compostos no crescimento das bactérias foi feita através da técnica de difusão em ágar. Inóculo ajustado foi semeado sobre placas de petri estéreis contendo meio Triptona de Soja (TSA). Posteriormente três cilindros plásticos estéreis foram dispostos de maneira equidistante sobre o ágar e dentro dos cilindros foi depositado igual volume de cada solução teste. As placas foram incubadas em microaerofilia à 37°C por 48 horas e os halos de inibição foram medidos em centímetros. O experimento foi repetido por três vezes em iguais condições. O resultado do presente estudo sugere que a solução de *Stevia rebaudiana* Bertoni e a solução de eritritol apresentaram efeito inibitório sobre o crescimento das cepas testadas de *L. casei* e *S. mutans*. Os demais adoçantes não apresentaram efeito sobre os micro-organismos testados.

Palavras-chave: Adoçante natural. Stevia. *S. mutans*. *L. casei*. Cárie dentária. Controle do biofilme.

ABSTRACT

COLVARA, Beatriz Carriconde. **Antimicrobial activity of *Stevia rebaudiana* Bertoni and non-caloric sweeteners on the cariogenic bacteria – *in vitro* study.** 2015. 24 p. Final Paper (Graduation in Dentistry) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

Dental caries is a high prevalent disease amongst the population. Its control is associated with several factors, which characterizes this disease as multifactorial one and difficult to be controlled. Sweeteners have been used as sugar substitutes, since sucrose is considered the substance most associated with this disease. The use of such sweeteners, in addition to reducing sucrose's consumption, also allowing the growth inhibition of micro-organisms such as *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus casei*, cariogenic micro-organisms present inside the oral cavity. This aim of this study was to evaluate the *in vitro* antimicrobial effect of *Stevia rebaudiana* Bertoni's solution and non-caloric sweeteners on the growth of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus casei*. The solutions used were: erythritol (1%, 5%, 10%), Fit Sucralose® (1%, 5%, 10%), Stevia® (1%, 5%, 10%), *Stevia rebaudiana* Bertoni solution (1%, 5%, 10%) and chlorhexidine digluconate (1%, 5%, 10%) as positive control. The strains used were *Streptococcus mutans* UA159 and *Lactobacillus casei* ATCC7469. The analysis of the inhibitory effect of these compounds on the growth of the bacteria was made by agar diffusion technique. Adjusted inocula were plated on sterile petri plates containing Trypticase Soy Agar (TSA). Subsequently three sterile plastic cylinders were placed equidistantly on the surface of the agar and an equal volume of each test solution was dispensed inside the cylinders. The plates were incubated under microaerophilic conditions at 37°C for 48 hours and the inhibition zones were measured in centimeters. The experiment was repeated three times under the same conditions. The results of this study suggests that *Stevia rebaudiana* Bertoni's solution and erythritol solution showed inhibitory effect on the tested strain of *L. casei* and *S. mutans*. Other sweeteners showed no effect on any of the tested micro-organisms.

Keywords: Natural sweetener. Stevia. *S. mutans*. *L. casei*. Dental caries, biofilm control

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	6
2	ARTIGO CIENTÍFICO.....	10
3	CONCLUSÃO.....	21
	REFERÊNCIAS.....	22

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença crônica de alta prevalência no mundo todo. Relacionados ao risco do desenvolvimento dessa doença estão diversos fatores, dos quais podemos citar os físicos, biológicos, ambientais, comportamentais e relacionados ao estilo de vida, elevado número de bactérias cariogênicas, baixo fluxo salivar, baixa ou inexistente exposição aos fluoretos, deficiências na higiene bucal e uma dieta rica em sacarose (SELWITZ; ISMAIL; PITTS, 2007). Visto isso, é possível compreender porque faz-se tão difícil o controle de doenças multifatoriais na população. Cada caso necessita de uma análise específica e de um planejamento terapêutico complexo para que haja sucesso no tratamento.

O desenvolvimento da doença cárie ocorre a partir do desequilíbrio dos fatores envolvidos, tal como o aumento da ingestão de carboidratos fermentáveis, resultando numa produção de ácidos decorrente do metabolismo das bactérias acidogênicas presentes no biofilme dental. O biofilme consiste em uma população bacteriana organizada envolta em uma matriz orgânica e, através dele, os ácidos se difundem ficando presentes na interface com os dentes, causando queda de pH e gerando a desmineralização da superfície dentária em contato com esse biofilme cariogênico. A continuidade desse processo de desmineralização, sem que ocorra um reequilíbrio dos fatores envolvidos para que se proceda a remineralização dessas superfícies, resulta na progressão da perda mineral e no desenvolvimento de cavidades que podem evoluir de tal maneira a resultar na destruição irreversível do dente (BADET; RICHARD, 2004; FIORETTI; HAÏKEL, 2010; JOHN; FEATHERSTONE, 2000; SELWITZ; ISMAIL; PITTS, 2007).

Dentre as principais bactérias associadas a doença cárie estão: *Streptococcus* do grupo mutans, envolvidas nas lesões iniciais e *Lactobacillus*, mais relacionadas a progressão das lesões cavitadas (BADET; RICHARD, 2004; LEITES; PINTO; SOUSA, 2006; MALTZ, 1996). Diferentemente dos *S. mutans*, os *Lactobacillus* não são capazes de produzir o polissacarídeo extracelular que proporciona aos *S. mutans* a capacidade de se aderirem a superfícies lisas e formarem um biofilme espesso e com maior capacidade de desmineralização (MALTZ, 1996; RÖLLA, 1989). A produção desses polissacarídeos se dá a partir da fermentação dos carboidratos da dieta, sendo que os polissacarídeos extracelulares (PEC) são formados essencialmente a partir da sacarose (PAES LEME et al., 2006; RÖLLA, 1989) e os

polissacarídeos intracelulares (PIC), que servem como uma fonte endógena de carbono durante os períodos de restrição de nutrientes (PAES LEME et al., 2006), são formados a partir de qualquer açúcar que possa ser convertido em glicose, como a própria glicose, a lactose, a maltose e a sacarose (LEITES; PINTO; SOUSA, 2006). Além desse efeito altamente cariogênico da sacarose, seu prejuízo para saúde geral também deve ser levado em consideração, uma vez que o excesso de peso e a obesidade são problemas atuais de saúde pública (GIACAMAN et al., 2013).

O excesso de peso é um importante fator de risco para a diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e hipertensão, e a obesidade já é considerada uma epidemia (CABALLERO, 2007; FOGEL¹, 1986 apud CABALLERO, 2007). O fácil acesso e o custo acessível da sacarose tornam essa substância prontamente disponível para o consumo diário (ZUMBÉ; STOREY; STOREY, 2001). Em vista disso, se faz necessária a inserção no cotidiano da população de alternativas que busquem reduzir o consumo de uma substância tão nociva a saúde bucal e geral.

Um grupo de adoçantes chamados de polióis – ou álcoois de açúcar - do qual fazem parte o eritritol e o xilitol, tem sido amplamente pesquisado devido ao seu conteúdo energético reduzido e a incapacidade de bactérias como os *Streptococcus* do grupo mutans de fermentarem essas substâncias, o que faz com que os polióis venham sendo considerados seguros aos dentes (ZUMBÉ; STOREY; STOREY, 2001). Além disso o eritritol parece ter propriedades cariostáticas semelhantes as encontradas para o xilitol (MICHAUD; HAEST, 2003). Mäkinen (2005) demonstrou em estudo *in vivo* - com utilização diária de eritritol e xilitol na forma de comprimidos mastigáveis e dentifrício - que esses adoçantes parecem exercer efeitos semelhantes sobre a placa dentária, tanto com uma diminuição significativa na quantidade da placa formada, como também uma redução dos níveis de *Streptococcus mutans* na placa e na saliva dos voluntários; e descreveu também que a presença do eritritol em meio de cultura resultou em inibição do crescimento de *Streptococcus mutans*.

O que viabiliza a produção industrial do eritritol é o fato dele ser obtido a partir da glicose por um processo de fermentação de uma levedura(EMBUSCADO; PATIL², 2001

¹ FOGEL R.W. Nutrition and the decline in mortality since 1700:some preliminary findings. In: ENGERMAN S.L.; GALLMAN R.E. (Eds.) **Long-term factors in American economic growth**. Chicago, IL: University of Chicago Press, 1986, p. 439–555 apud CABALLERO, 2007, p. 1.

² EMBUSCADO M.E.; PATIL S.K. "Erythritol". In: _____. **Food Science and Technology: Alternative Sweeteners**. New York: Marcel Dikker, 2001, p. 235-254 apud MICHAUD; HAEST, 2003, p.1.

apudMICHAUD; HAEST, 2003). Outros adoçantes de origem natural vêm sendo estudados, como os adoçantes oriundos da planta *Stevia rebaudiana* Bertoni, e cabe ressaltar a importância da utilização de adoçantes naturais e seguros no que tange a aceitação da população.

Devido ao seu característico sabor doce, a planta *Stevia rebaudiana* Bertoni vem sendo cada vez mais utilizada em países como o Japão, Coréia e Brasil, onde a planta faz parte da formulação de diversos alimentos, bebidas alcólicas e refrigerantes, além de ser utilizada como suplemento dietético em países como Estados Unidos e Itália (KINGHORN, 2002). Em uma revisão, Geuns (2003) concluiu que *Stevia* e esteviosídeo -principal componente doce nas folhas da planta- são seguros quando usados como adoçantes. Sendo interessante seu uso para pessoas em geral e para pessoas com necessidade de perda de peso, uma vez que a substituição do açúcar da dieta por *Stevia* ou esteviosídeo reduz o consumo de sacarose, contribuindo para um equilíbrio da saúde geral e mantendo uma boa saúde dentária a medida que reduz a presença de sacarose no meio bucal.

A substituição da ingestão de sacarose por adoçantes oriundos da planta é vantajosa dado que esses adoçantes não são fermentados pelas bactérias orais, como demonstrado em estudo *in vivo* com modelo animal, onde foi avaliado que nem esteviosídeo, nem rebaudiosídeo - segundo componente doce mais abundante (KENNELLY, 2002) - são cariogênicos; e, também, por esses adoçantes serem utilizados em sua grande maioria por enterobactérias e posteriormente excretados nas fezes humanas, o que resulta num valor energético de 0 kcal/g. Os adoçantes de *Stevia* são então considerados como não calóricos e não cariogênicos (DAS et al.³, 1992 apud MATSUKUBO; TAKAZOE, 2006).

Além de não cariogênica, a *Stevia* apresenta capacidade de alteração no padrão da formação do biofilme e no acúmulo do mesmo, sendo até 82% menor esse acúmulo em pacientes expostos a bochechos com solução de *Stevia*, quando comparado ao bochecho realizado com solução de sacarose nos mesmos padrões (SLAVUTZKY, 2010). A placa formada na presença de esteveosídeo apresenta níveis mais baixos de *S. mutans* e lactobacilos, e também menores concentrações de polissacarídeo solúvel e insolúvel quando comparada a placa formada na presença de sacarose (ROSSONI, 1996).

³ DAS, S. et al. Evaluation of the cariogenic potential of the intense natural sweeteners stevioside and rebaudioside A. **Caries Res**, Basel, v. 26, n. 5, p. 363-66, 1992 apud MATSUKUBO; TAKAZOE, 2006, p. 124.

Vem sendo demonstrado que em presença de adoçantes de *Stevia* as bactérias orais não só não são capazes de fermentá-los e utilizá-los na produção de ácidos, mas também existe uma inibição do crescimento bacteriano quando em presença de extratos da planta (DEBNATH, 2008; GAMBOA; CHAVES, 2012; MOHAMMADI-SICHANI et al., 2012).

Contreras (2013, p. 164) em uma revisão sistemática sugere que:

Se estudos mais aprofundados forem realizados em relação a esse assunto, *Stevia rebaudiana* Bertoni poderá tornar-se um complemento à saúde bucal utilizando-a na forma de bochechos, cremes dentais, gomas de mascar, saliva artificial, comprimidos mastigáveis e outros.⁴

Outro adoçante inerte a certas cepas de bactérias orais é a sucralose, edulcorante derivado da sacarose que apresenta um sabor doce até 600 vezes maior do que o da própria sacarose (YOUNG; BOWEN, 1990). Young e Bowen (1990) demonstraram que nenhuma das dez cepas de micro-organismos testados, entre eles *S. mutans* e *L. casei*, tiveram capacidade de produzir ácidos a partir da sucralose, que, como única fonte de carbono, não suporta o crescimento bacteriano (BOWEN; YOUNG; PEARSON, 1990; YOUNG; BOWEN, 1990). E mesmo quando em associação com outros ingredientes que conferem volume aos adoçantes comerciais, como a lactose, é menos cariogênica que a sacarose (GIACAMAN et al., 2013). Bowen, Young e Pearson (1990) consideram que a doçura da sucralose é adequada de tal maneira que essa substância pode ser um substituto não-cariogênico adequado para a sacarose.

Esses estudos demonstram que os adoçantes podem ser alternativas interessantes não só no controle do consumo da sacarose enquanto substância calórica e cariogênica, a medida que podem ser incorporados aos alimentos, mas aliados também na redução dos micro-organismos cariogênicos, uma vez que apresentam capacidade inibitória sobre o crescimento de micro-organismos tão relevantes como o *Streptococcus mutans* e o *Lactobacillus casei*. Dessa forma o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de uma solução de *Stevia rebaudiana* Bertoni e de soluções dos adoçantes eritritol, Fit Sucralose® e Stevita® sobre os micro-organismos *Streptococcus mutans* (UA159) e *Lactobacillus casei* (ATCC7469).

⁴ Trecho traduzido do artigo original em inglês.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *STEVIA REBAUDIANA* BERTONI E DE ADOÇANTES NÃO CALÓRICOS SOBRE BACTÉRIAS CARIOGÊNICAS - ESTUDO *IN VITRO*

**Antimicrobial activity of *Stevia rebaudiana* Bertoni and non-caloric sweeteners on the
cariogenic bacteria – *in vitro* study.**

Sandra Liana Henz*

Rodrigo Alex Arthur**

Beatriz Carriconde Colvara***

Raísa Severo***

Vinícius Felten***

*Professora doutora do Departamento de Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil

** Professor doutor do Departamento de Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil

*** Acadêmicos da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil

Autor correspondente:

Sandra Liana Henz.

Rua Ramiro Barcelos, 2492

Faculdade de Odontologia, UFRGS.

90035-003

Porto Alegre-RS

slhenz@yahoo.com.br

Resumo

Objetivo: o estudo avaliou a atividade antimicrobiana *in vitro* da planta *Stevia rebaudiana* Bertoni e de adoçantes não calóricos sobre o crescimento de *S. mutans* e *L. casei*, microrganismos cariogênicos presentes na cavidade bucal. Métodos: o estudo foi realizado utilizando as cepas padrão *Streptococcus mutans* (UA159) e *Lactobacillus casei*(ATCC7469). Foram avaliados diferentes compostos não calóricos substitutos da sacarose nas concentrações de 1, 5 e 10%:: eritritol (ER), Fit Sucralose® (SU), Stevita® (ST), solução de *Stevia rebaudiana* Bertoni (SSr) e, como controle positivo, digluconato de clorexidina (DC). A análise do efeito inibitório desses compostos no crescimento das bactérias foi feita através da técnica de

difusão em Ágar. Resultados: observou-se que existe um efeito inibitório de crescimento de ambos micro-organismos por parte da SSr e do ER, enquanto os demais adoçantes testados não tiveram efeito inibitório sobre esse micro-organismo. Conclusão: os resultados demonstram que SSR e ER apresentam efeito inibidor no crescimento das cepas testadas de *S. mutans* e *L. casei*.

Palavras-chave: Adoçante Natural, Stevia, *S. mutans*, *L. casei*, cárie dentária.

Abstract

Objective: the study evaluated the *in vitro* antimicrobial activity of the *Stevia rebaudiana* Bertoni plant and non-caloric sweeteners on the growth of *S. mutans* and *L. casei*, cariogenic microorganisms

present in the oral cavity. Methods: the study was conducted using the standard strains *Streptococcus mutans* (UA159) and *Lactobacillus casei* (ATCC7469). Different non-caloric sweeteners were evaluated with concentrations of 1, 5 and 10%: erythritol (RE), Fit Sucralose® (SU), Stevita® (ST), *Stevia rebaudiana* Bertonisolution (CSR) and chlorhexidine digluconate (DC) as positive control. The analysis of the inhibitory effect of these compounds on the growth of the bacteria were made by agar diffusion technique. Results: there is a growth inhibition potential of both microorganisms by the SSR and ER, whereas the other sweeteners tested had no inhibitory potential of this micro-organisms. Conclusion: The results show that SSR and ER have inhibitory effect on the growth tested strains *L. casei* and *S. mutans*.

Keywords: Natural Sweetener, Stevia, *S. mutans*, *L. casei*, dental caries.

Introdução:

A procura por adoçantes não calóricos aumenta a cada dia em função da maior preocupação mundial com a saúde, uma vez que a alta ingestão de sacarose representa um risco para o desenvolvimento de cárie dental, de obesidade e de diabetes. Em relação à cárie dental, a sacarose desempenha um papel extremamente importante no estabelecimento da doença, pois permite vantagens ecológicas a certas espécies bacterianas do biofilme, tornando-o mais cariogênico.¹

A cárie dental caracteriza-se por ser uma doença crônica, que decorre de um processo dinâmico que acontece nos depósitos bacterianos aderidos às superfícies dentárias. A partir de trocas iônicas entre biofilme aderido e superfícies dentárias, ocorrem perdas minerais que podem variar de condições leves, partindo desde lesões em estágio subclínico, até estados muito avançados, podendo resultar na destruição coronária total.²

Existem bactérias que tem sido associadas com a etiologia da doença cárie, como o *Streptococcus mutans* (EGM), que quando em presença de sacarose é capaz de produzir um polímero extracelular insolúvel (glucano) que aumenta o potencial cariogênico do biofilme dental. O *Lactobacillus casei* foi inicialmente considerado como principal agente etiológico da cárie, mas, posteriormente, se compreendeu que seu papel se dá principalmente na perpetuação da doença, atuando como invasor secundário.³

Frente ao potencial destrutivo que a doença cárie pode ter, torna-se importante pesquisar meios que auxiliem a população a prevenir a formação de depósitos bacterianos e que tornem o biofilme menos virulento. Atualmente, o digluconato de clorexidina é o padrão ouro em controle do biofilme dental. No entanto, seu uso é restrito uma vez que é um composto químico que pode apresentar diversos efeitos adversos, como alteração de paladar e manchamento extrínseco das superfícies

orais.⁴ Também é importante considerar que o uso de meios naturais tem uma melhor aceitação pela população.

Os adoçantes naturais à base de esteviosídeo apresentam um valor energético de 0 Kcal/g, já que a maior parte do adoçante ingerido é utilizada por enterobactérias, enquanto que o restante é excretado nas fezes. Além dessa propriedade não calórica, há estudos comprovando que os adoçantes à base de esteviosídeo não são cariogênicos.^{5,6}

A busca por adoçantes não calóricos tem ampliado o estudo dessas substâncias em diversos sentidos, buscando comprovar a segurança do uso e a aplicabilidade nas diferentes áreas.⁷ Diversos adoçantes já foram aprovados ou considerados seguros pela Food and Drug Administration (FDA), como a sucralose e o eritritol. Esses adoçantes têm sido demonstrados como não cariogênicos quando utilizados em sua forma isolada.⁸⁻¹⁰

O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de solução de *Stevia Rebaudiana* Bertoni e de solução dos adoçantes eritritol, Stevita® e Fit Sucralose® sobre os *Streptococcus mutans* e sobre os *Lactobacillus casei*. A hipótese nula é de que a *Stevia Rebaudiana* Bertoni e os adoçantes testados não apresentam efeito antimicrobiano sobre os *S. mutans* nem sobre os *L. casei*.

Materiais e métodos:

Preparo das soluções de adoçantes

Para a realização dos testes, foram preparadas soluções a partir dos seguintes adoçantes: eritritol (Lote: 1254758, validade: 08/2015. Eritritol zero STD Cargill), Stevita® (Lote: 368005, validade: 11/2015. Ingredientes: lactose, edulcorante natural glicosídeo de esteviol e antiemético dióxido de silício. Steviafarma Industrial S/A) e Fit Sucralose® (Lote: 489995, validade: 01/2016. Ingredientes: lactose, edulcorante artificial sucralose, edulcorante natura

glicosídeo de esteviol e antiemético dióxido de silício. Steviafarma Industrial S/A). Como controle positivo foram utilizadas soluções de digluconato de clorexidina nas mesmas concentrações das soluções teste, e para controle negativo água destilada e solução salina.

As soluções de adoçantes foram preparadas com uma concentração de 25% e, posteriormente, diluídas em água destilada para obtenção das concentrações finais testadas. Para o preparo da solução de *Stevia rebaudiana* Bertoni, as folhas secas (Lote: 00143, validade: 06/2017. Vis Vitalis®) foram maceradas e, após adição de uma quantidade de água destilada, realizou-se um protocolo de duas fervuras intercaladas com 15 horas de descanso da solução.¹¹ Posteriormente, a solução foi filtrada e a máxima concentração obtida ao final do processo foi 12,5%. Todas as soluções foram filtradas utilizando-se membrana 0,22µM.

Inóculo

Os micro-organismos utilizados foram a cepa de *Streptococcus mutans* UA159 e a cepa de *Lactobacillus casei* ATCC7469 para testar a ação dos diferentes compostos.

As cepas de *Streptococcus mutans* e de *Lactobacillus casei* foram reativadas a partir de estoques congelados em placas contendo meio Ágar Triptona de Soja (TSA) e incubados por 48h a 37°C em microaerofilia. Após, as colônias crescidas foram coletadas e inoculadas em frasco contendo meio Caldo Triptona de Soja (TSB) suplementado com 0,5% de sacarose e incubados à 37°C durante 24h em microaerofilia. Uma alíquota de 2mL foi transferida para um novo frasco contendo TSB e incubado nas mesmas condições. Após 24 horas, realizou-se o ajuste da densidade Óptica (DO) para 5 na escala McFarland em ambas suspensões dos micro-organismos.

Teste Difusão em Ágar

Foram testadas as concentrações de 1%, 5% e 10% das soluções de adoçantes e

da solução de estévia em triplicata. Inicialmente, foi inoculado 200µL da suspensão bacteriana com DO ajustada (*S. mutans* ou *L. casei*) em placas de Petri contendo 20 mL de meio TSA e espalhada na superfície com auxílio de pérolas de vidro estéreis. Após disposição do inóculo, 3 cilindros plásticos estéreis foram dispostos em cada placa de maneira equidistante e no interior desses cilindros foram adicionados 50 µL da solução correspondente, sendo uma placa para cada concentração testada. Os cilindros foram removidos da superfície do ágar após duas horas e as placas foram incubadas a 37°C em microaerofilia.

A medição dos halos de inibição foi realizada após 48h de incubação com auxílio de uma régua e os resultados expressos em centímetros.

O ensaio foi repetido por três vezes em iguais condições.

Resultados:

Todos os resultados obtidos foram expressos utilizando o valor das médias das repetições em centímetros e respectivos desvios padrão.

No ensaio realizado com *S. mutans* foram obtidos diferentes halos de inibição para as substâncias testadas. Observou-se, como o esperado, que não houve halo de inibição referente aos controles negativos (solução salina e água). O controle positivo teve halo de inibição nas três concentrações, sendo a medida dos halos nas concentrações de 1%: 2,9 cm ± 0,2; 5%: 3,0 cm ± 0,5; e 10%: 3 cm ± 0,16. No teste com a solução de *Stevia rebaudiana* Bertoni houve halo de inibição nas três concentrações, sendo suas medidas 1%: 1,45 cm ± 0,07; 5%: 1,75 cm ± 0,14; e 10%: 1,8 cm ± 0,04. Assim como na solução de *Stevia*, na solução de eritritol houve halo de inibição nas concentrações de 1%, 5% e 10%, sendo suas respectivas medidas: 1,86 cm ± 0,42; 1,46 cm ± 0,36; e 1,5 cm ± 0,2. Os adoçantes Sucralose® e Stevita® não apresentaram halo de

inibição em nenhuma das concentrações testadas.

Assim como o encontrado para os *S. mutans*, para *L. casei*, as substâncias usadas como controle negativo não desenvolveram nenhum halo de inibição. O controle positivo apresentou halo nas três concentrações, sendo a medida do halo na concentração de 1%: 3,18 cm ± 0,9; na concentração de 5%: 3,0 cm ± 0,3 e na concentração de 10%: 2,9 cm ± 0,3. A solução de *Stevia rebaudiana* Bertoni apresentou halo de inibição nas concentrações de 1% e 5%, sendo suas medidas, respectivamente: 1,2 cm ± 0,15; e 1,49 cm ± 0,19. Surpreendentemente no teste com a solução do adoçante eritritol houve halo de inibição somente na concentração de 1% sendo a medida: 1,6 cm ± 0,44. Os adoçantes Sucralose® e Stevita® não apresentaram halo de inibição em nenhuma das concentrações testadas.

Discussão

O estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de solução da planta *Stevia Rebaudiana* Bertoni e dos adoçantes não calóricos eritritol, Stevita®, Fit Sucralose®.

Os resultados encontrados mostram que a solução da planta *Stevia Rebaudiana* Bertoni apresenta inibição sobre o crescimento bacteriano dos micro-organismos *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*, o que coincide com resultados encontrados na literatura, como em estudo realizado com adoçantes xilitol, sorbitol e esteviosídeo onde constatou-se que não houve crescimento de *Streptococcus mutans* em meios contendo esses adoçantes.¹² Outro estudo demonstrou que o esteviosídeo não é metabolizado pelo *Streptococcus mutans* como fonte de carbono, bem como não permite a formação de ácidos e síntese de polissacarídeos extracelulares.¹³ Em outro estudo, os adoçantes esteviosídeo, aspartame, xilitol e sacarina não foram

metabolizados por micro-organismos, em especial *Streptococcus mutans*. Já o extrato da folha de *Stevia rebaudiana* foi um potente inibidor da síntese de polissacarídeo insolúvel, o qual desempenha importante papel na formação do biofilme dental.^{14,15}

Em relação ao eritritol, os resultados encontrados coincidem com o que vem sendo demonstrado em relação ao potencial dessa substância como inibidora do crescimento microbiano¹⁷, como o avaliado em estudo *in vivo* que constatou redução nos níveis de *S. mutans* na placa e na saliva de indivíduos que foram expostos aos polióis eritritol e xilitol.¹⁸

Um potencial efeito antimicrobiano e conseqüentemente anticariogênico tem sido descrito para a sucralose^{8,19}. Estudo *in situ*, demonstrou menor desmineralização do esmalte por adoçantes comerciais que continham a estévia, sucralose, sacarina e aspartame, quando foram comparados a desmineralização obtida com exposição a sacarose.²⁰ Contudo, a falta de resultados

inibitórios sobre o crescimento bacteriano no uso dos adoçantes Fit Sucralose® e Stevita® no presente estudo, demonstra a interferência causada pela combinação de diferentes substâncias na composição dos adoçantes, o que faz com que não tenhamos mais um controle da concentração de sucralose e estévia que está sendo aplicada sobre as bactérias, uma vez que ambos adoçantes apresentam como ingrediente em maior quantidade a lactose. Estudos demonstram que adoçantes como a sucralose não são cariogênicos por si só, mas quando em associação com ingredientes que conferem volume, como a lactose, esses adoçantes podem não ser mais seguros para os dentes. Isso porque a lactose é um carboidrato fermentável pelas bactérias orais e ocasiona quedas de pH principalmente críticas para a dentina.^{8,21}

O uso de um controle positivo de digluconato de clorexidina nas mesmas concentrações que as demais substâncias testadas (1%, 5% e 10%) é importante, uma vez que essa substância é considerada

o padrão-ouro no controle químico do biofilme dental - sendo esperado um efeito inibitório do crescimento bacteriano, e sendo essa substância corriqueiramente utilizada como controle em estudos *in vitro*.^{16, 20-21}

A substituição parcial de açúcar refinada dieta é uma importante ferramenta na prevenção da cárie dentária. A capacidade desses adoçantes de não serem metabolizados por bactérias relacionadas com a etiologia da cárie, e o potencial inibitório do crescimento bacteriano fazem dos substitutos do açúcar uma estratégia de promoção da saúde. Outros estudos, *in situ* e *in vivo* serão delineados buscando avaliar a ação da solução de estévia e de eritritol sobre a arquitetura e composição do biofilme dentário, já que quando buscamos um produto que interfira na formação do biofilme, não estamos restringindo o pensamento apenas a cárie dental, pois uma vez que o biofilme dentário se torna menos virulento e mais fácil de ser

controlado, teremos um efeito benéfico sobre a saúde bucal como um todo.

Conclusão:

Os resultados demonstram que as soluções de *Stevia rebaudina* Bertoni e eritritolapresentam um efeito inibidor no crescimento de *Streptococcus mutanse* *Lactobacillus casei*,evidenciando um

potencial emprego dessas substâncias para modificar a cariogenicidade do biofilme.

Estudos adicionais são necessários para melhor identificar o mecanismo responsável pela inibição do crescimento desses micro-organismos e também de sua efetividade quando utilizado *in vivo*.

Referências:

1. Rölla G. Why is sucrose so cariogenic? The role of glucosyltransferase and polysaccharides.Scand. J. Dent. Res. 1989 Apr; 97(2): 115-9.
2. Fejerskov O, Thylstrup A. Diferentes conceitos da cárie dentária e suas implicações. In: Thylstrup A, Fejerskov. Cariologia clínica. 2 ed. São Paulo: Santos; 1995. p.209-217.
3. Maltz MT.Cariologia. In: ToledoOA. Odontopediatria: fundamentos para a prática clínica. 2. ed. São Paulo: Premier; 1996. p.105-133.
4. Torres CRG, Kubo CH, Anido AA, Rodrigues JR. Agente antimicrobianos e seu potencial de uso na odontologia. Rev. Fac. Odontol. Sao Jose Campos. 2000 Dez; 3(2):43-52.
5. Matsukubo T, Takazoe I. Sucrose substitutes and their role in caries prevention.Int. dent. j. 2006 Jun; 56(3):119-30.
6. Gamboa F, Chaves M. Antimicrobial potential of extracts from *Stevia rebaudiana* leaves against bacteria of importance in dental caries. Acta Odontol. Latinoam. 2012 Oct; 25(2):171-75.

7. Ruiz JCG, Ordoñez YBM, Campos MRS. Biological activity of *Stevia rebaudiana* Bertoni and their relationship to health. Food Science and Nutrition. 2015 Oct [acesso em 01 dez 2015] Disponível em:
<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2015.1072083>
8. Mandel ID, Grotz VL. Dental considerations in sucralose use. J. clin. dent. 2002; 13(3):116-8.
9. Mäkinen KK. Sugar alcohol sweeteners as alternatives to sugar with special consideration of xylitol. Med Princ Pract. 2011; 20(4):303-20.
10. Kawanabe J, Hirasawa M, Takeuchi T, Oda T, Ikeda T. Noncariogenicity of erythritol as a substrate. Caries res. 1992; 26(5):358-62.
11. Slavutzky, SMB. Stevia and sucrose effect on plaque formation. J. Verb. Lebensm. 2010; 5(2):213-16.
12. Yabu M, Takase M, Toda K, Tanimoto K, Yasutake A. Studies on stevioside, natural sweetener. Effect on the growth of some oral microorganisms. Hiroshima Daigaku Shigaku Zasshi. 1977 Jan; 9(1):12-17.
13. Ikeda T, Okada A, Motada R. Effects of stevioside on certain metabolism of *Streptococcus mutans*. J. Nihon Univ. Sch. Dent. 1978; 4:24-27.
14. Chedid SJ. Efeitos dos adoçantes: steviosídeo, aspartame, xilitol e sacarina sobre a fermentação e síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis pelo *Streptococcus mutans* G55 E LM7 e pela placa dentária in vitro [tese dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 1990.
15. Pinheiro CE, Oliveira SS, Silva MSMB, Poletto MIF, Pinheiro CF. Efeito dos extratos de guaraná e de *Stévia Rebaudiana* Bertoni (folhas) e do esteviosídeo, sobre a fermentação e a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis da placa dentária. Rev. odontol. Univ. São Paulo. 1987 Out-Dez; 1(4):9-13.

16. Runnel R, Mäkinen KK, Honkala S, Olak J, Mäkinen PL, Nömmela R, Vahlberg T, Honkala E, Saag M. Effect of three-year consumption of erythritol, xylitol and sorbitol candies on various plaque and salivary caries-related variables. *J Dent.* 2013 Dec; 41(12):1236-44.
17. Hashino E, Kuboniwa M, Alghamdi AS, Yamaguchi M, Yamamoto R, Cho H; Amano A. Erythritol alters microstructure and metabolomic profiles of biofilm composed of *Streptococcus gordonii* and *Porphyromonas gingivalis*. *Mol Oral Microbiol.* 2013 Dec; 28(6):435-51.
18. Mäkinen KK, Saag M, Isotupa KP, Olak J, Nömmela R, Söderling E, Mäkinen PL. Similarity of the effects of erythritol and xylitol on some risk factors of dental caries. *Caries res.* 2005 Mai-Jun; 39(3):207-15.
19. Bowen WH, Young DA, Pearson SK. The effects of sucralose on coronal and root-surface caries. *J. dent. res.* 1990 Ago; 69(8):1485-7.
20. Giacaman RA, Campos P, Muñoz-Sandoval C, Castro RJ. Cariogenic potential of commercial sweeteners in an experimental biofilm caries model on enamel. *Arch. oral. biol.* 2013 Mar; 58(9):1116-22.
21. Aires CP, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA, Cury JA. Effects of a lactose-containing sweetener on root dentin demineralization in situ. *Caries Rev.* 2002 Feb; 36:167-9.

3 CONCLUSÃO

Os resultados sugerem ação antimicrobiana da solução da planta *Stevia rebaudiana* Bertoni e da solução do adoçante não calórico eritritol sobre as cepas testadas de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*. Mesmo com as limitações inerentes aos estudos *in vitro*, trabalhando-se com as bactérias de forma isolada e onde não temos as condições do meio bucal e da composição e arquitetura complexas do biofilme, esses resultados trazem uma perspectiva promissora para que se continue buscando a relação desses adoçantes não calóricos e dos adoçantes naturais com a saúde oral.

REFERÊNCIAS

- BADET, C.; RICHARD, B. Étude clinique de la carie. **EMC Dent.**, Paris, v. 1, no. 1, p. 40-48, Feb. 2004.
- BOWEN, W.H.; YOUNG, D.A.; PEARSON, S.K. The effect of sucralose on coronal and root-surface caries. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 69, no. 8, p. 1485-1487, Aug. 1990.
- CABALLERO, B. The global epidemic of obesity: an overview. **Epidemiol. Rev.**, Baltimore, v. 29, no. 1, p. 1-5, 2007.
- CONTRERAS, S. Anticariogenic properties and effect on periodontal structures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Narrative review. **J. Oral. Res.**, Concepción, v. 3, no. 3, p. 158-166, 2013.
- DEBNATH, M. Clonal propagation and antimicrobial activity of an endemic medicinal plant *Stevia rebaudiana*. **J. Med. Plant. Res.**, [S.l.], v. 2, no. 2, p. 45-51, Feb. 2008.
- FIORETTI, F.; HAÏKEL, Y. Carie et sucres. **Méd. Mal. Métab.**, Moulieaux, v. 4, no. 5, p. 543-549, Oct. 2010.
- GAMBOA, F.; CHAVES, M. Antimicrobial potential of extracts from *Stevia Rebaudiana* leaves against bacteria of importance in dental caries. **Acta Odontol. Latinoam.**, Buenos Aires, v. 25, no. 2, p. 171-175, Oct. 2012.
- GEUNS, J.M. Stevioside. **Phytochemistry**, New York, v. 64, no. 5, p. 913-921, Nov. 2003.
- GIACAMAN, R.A. et al. Cariogenic potential of commercial sweeteners in an experimental biofilm caries model on enamel. **Arch. Oral. Biol.**, Oxford, v. 58, no. 9, p. 1116-1122, Sept. 2013.
- JOHN, D.B.; FEATHERSTONE, M.S. C. The science and practice of caries prevention. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 131, no. 7, p. 887-899, July 2000.
- KENNELLY, E.J. Sweet and non-sweet constituents of *Stevia rebaudiana*. In: KINGHORN, A.D. (Ed.) **Stevia**. London: Taylor & Francis, 2002. Cap. 4, p. 68-85.
- KINGHORN, A.D. Overview. In: _____. **Stevia**. London: Taylor & Francis, 2002. Cap. 1, p. 1-17.
- LEITES, A.C.B.R; PINTO, M.B.; SOUSA, E.R. Aspectos microbiológicos da cárie dental. **Salusvita**, Bauru, v. 25, n. 2, p. 239-252, 2006.
- MÄKINEN, K.K. et al. Similarity of the effects of erythritol and xylitol on some risk factors of dental caries. **Caries Res.**, Basel, v. 39, no. 3, p. 207-215, May/June 2005.

MALTZ, M.T. Cariologia. In: TOLEDO, O. A. **Odontopediatria**: fundamentos para a prática clínica. 2. ed. São Paulo: Premier, 1996. p. 105-133.

MATSUKUBO, T.; TAKAZOE, I. Sucrose substitutes and their role in caries prevention. **Int. Dent. J.**, London, v. 56, no. 3, p. 119-130, June 2006.

MICHAUD, J.; HAEST, G. Erythritol: a new multipurpose excipient. **Pharm. Tech. Eur.** [S.l.], p. 69-72, Oct. 2003. Disponível em: <<http://www.pharmtech.com/erythritol-new-multipurpose-excipient>>. Acesso em 21 out. 2015.

MOHAMMADI-SICHANI, M. et al. Effect of different extracts of *Stevia rebaudiana* leaves on *Streptococcus mutans* growth. **J. Med. Plan. Res.**, [S.l.], v. 6, no. 32, p. 4731-4734, Aug. 2012.

PAES LEME, A. F. et al. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation – new insight. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 85, no. 10, p. 878-887, Oct. 2006.

RÖLLA, G. Why is sucrose so cariogenic? The role of glucosyltransferase and polysaccharides. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 97, no. 2, p. 115-119, Apr. 1989.

ROSSONI, E. **Estudo *in situ* do potencial cariogênico de um adoçante comercial a base de esteviosídeo**. 1996. 108 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

SELWITZ, R.H.; ISMAIL, A.I.; PITTS N. B. Dental caries. **Lancet**, London, v. 369, no. 9555, p. 51-59, Jan. 2007.

SLAVUTZKY, S.M.B. Stevia and sucrose effect on plaque formation. **J. Verbr. Lebensm.**, Basel, v. 5, no.2, p. 213-216, May 2010.

YOUNG, D.A.; BOWEN, W. H. The influence of sucralose on bacterial metabolism. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 69, no.8, p. 1480-1484, Aug. 1990.

ZUMBÉ, A.; STOREY, A.L.; STOREY D. Polyols in confectionery: the route to sugar-free, reduced sugar and reduced calorie confectionery. **Br. J. Nutr.**, London, v. 85, Suppl. 1, p. S31-S45, 2001.