Efeitos de dois adoçantes naturais: Stevia Rebaudiana Bertoni e Sorbitol no metabolismo bacteriano para o crescimento e produção de ácidos

Recebido em: out/2016
Aprovado em: dez/2016

Nilse Pangrazio de Kegler - *Mestre em Ciências com ênfase em Odontopediatria .Directora executivo da Academia Internacional de Odontologia Integral (AIOI) – Asunción/Paraguay*

Karen Kegler – *Especialista em Odontopediatria e Prevenção Asunción – Paraguay*

Autor de correspondência:
Nilse Pangrazio de Kegler
Av. San Martín, 1249
Asunción - Paraguai

Effects of two natural sweeteners Stevia Rebaudiana Bertoni and Sorbitol on the growth and acid production of the bacteria

RESUMO

O objetivo da pesquisa foi comparar os efeitos de edulcorantes naturais utilizados como substrato por *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus*, verificando a capacidade desses microrganismos em metabolizar os edulcorantes, favorecendo o crescimento e a produção de ácidos. Para tal estudo, realizou-se um total de 180 leituras para as variáveis crescimento e produção de ácido, e para o processamento dos dados usou-se o pacote estatístico SPSS. Dadas às condições da metodologia, foi possível concluir que a Stevia Rebaudiana Bertoni ofereceu melhores resultados na redução do crescimento bacteriano e na produção de ácidos do que o Sorbitol.

Descritores: adoçante; sorbitol; stevia rebaudiana bertoni; crescimento

ABSTRACT

This paper aimed at comparing the effects of natural sweeteners used as a substrate for Streptococcus mutans and Lactobacillus acidophilus, in order to verify the ability of these microorganisms to metabolize sweeteners, promoting the growth and the production of acids. For this study, the variables "growth" and "acid production" were analyzed and the processing data was based on the SPSS statistical package. It was concluded that Stevia rebaudiana Bertoni offered better results in reducing bacterial growth and production of the Sorbitol acids.

Descriptors: sweeteners; sorbitol; stevia rebaudiana bertoni; growth

RELEVÂNCIA CLÍNICA

Considerando que adoçantes estão de certa forma inseridos como fatores de prevenção no aparecimento de lesões de cárie, essa pesquisa fundamenta sua relevância clínica na análise comparativa experimental entre a Stevia Rebaudiana Bertoni e o Sorbitol.

Artigo 00 - Nilse.indd 21 16/02/17 12:17

INTRODUÇÃO

A cárie dentária é considerada um problema de saúde pública para uma grande parte da população a nível mundial. A sua etiologia, em síntese, está definida por quatro fatores: dieta, microrganismos, hospedeiro e tempo. Em condições clínicas, a ausência de um desses fatores limita o desenvolvimento de lesões de cárie. As abordagens terapêuticas e preventivas estão direcionadas no sentido de reduzir os fatores de risco. Entre os mecanismos que favorecem a prevenção de lesões de cárie, a ausência de sacarose para as bactérias envolvidas nesse processo poderia ser considerada, impedindo o metabolismo bacteriano e a produção de ácidos.[1] O potencial cariogênico da sacarose foi o ponto de partida para a emissão das mensagens "contenha o consumo de muito açúcar". No ano de 2000, surgiram as primeiras diretrizes com a seguinte declaração "escolha seus alimentos e bebidas com conteúdo moderado de açúcar".[2] Essas recomendações impactaram o interesse e o consumo dos adoçantes chamados de "substitutos do açúcar", que são aditivos alimentares de origem natural ou sintética e que possuem um sabor similar à sacarose.[3] Existem controvérsias quanto à possibilidade dos adoçantes constituírem um risco para a saúde.[4,5] Essa situação tem levado os consumidores a escolher substitutos naturais do açúcar, que atualmente lideram o mercado. Estes oferecem um sabor notavelmente diferente, sendo utilizados em combinação para elaborar diferentes produtos rotulados como "sem açúcar". Não há nenhum substituto ideal para o açúcar, por esta razão existe a necessidade de usar e procurar o produto mais benéfico.[6]

O Sorbitol é amplamente utilizado nas guloseimas em combinação com outros adoçantes. O sorbitol utilizado pelos microrganismos do biofilme dentário oferece um substrato que auxilia a sobrevivência bacteriana, porém não o torna cariogênico, por não produzir polissacarídeos extracelulares.[7] O Sorbitol é produzido a partir da glicose, oferece 2.6 kcal/g sendo 0.8 vezes mais doce que a sacarose. Pode ser encontrado de forma natural em diversos legumes e frutas como ameixas, damascos, cerejas e maçãs.[8]

A Stevia rebaudiana bertoni deriva de uma planta presente no norte do Paraguai e no Brasil sendo que seu sabor doce deve-se aos glicosídeos dulcósido (0,3%), rebaudiósido (0,6%), rebaudiósido A (3,8%) e Steviosideo (9%). Na sua forma natural é 30 vezes mais doce que o açúcar comum e o extrato é 200 a 300 vezes mais doce que o açúcar[9], razão pela qual pode ser utilizada sem combinações com um sabor aceitável. A Stevia rebaudiana bertoni foi aprovada para o consumo humano em 2008 e incluída na lista de aditivos do Codex alimentar da FAO em março de 2009.[10]

As evidências científicas do uso da Stevia ainda são limitadas devido ao curto tempo que se encontra no mercado como produto aprovado pelos organismos internacionais. Devido a esta lacuna de informação, considera-se importante realizar estudos relacionados a este produto. Assim, o objetivo deste trabalho é comparar os efeitos dos adoçantes naturais Stevia rebaudiana bertoni e sorbitol, observando a influência de cada um deles nos microrganismos *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus* evm relação ao metabolismo bacteriano no crescimento e produção de ácidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o presente estudo, foi utilizada a solução de Sorbitol obtida pela diluição de 4g de extrato puro em pó ("Drogaria Magistral") e solução de Stevia rebaudiana bertoni de 0,020g. A solução de sacarose foi obtida pela diluição do açúcar comum de 4g. Utilizou-se ainda a população bacteriana de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus* >105 UFC/ml. As bactérias foram isoladas, cultivadas e submetidas a provas de especificidade química e morfológica. Após a formação das colônias bacterianas, realizaram-se provas para avaliar a atividade bioquímica das mesmas. Tal fato permitiu a identificação final do espécimen estudando os sistemas enzimáticos únicos de cada espécie e que servem como marcadores de identificação.

As colônias necessárias para o estudo foram identificadas, transportadas para nova placa de Petri e encubadas por 24 horas, a 37°C, em condições de anaerobiose. Por meio da técnica de Turbidimetria, obtiveram-se as concentrações de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus* superior a 105 UFC/ml que foram submetidas aos procedimentos seguintes:

- Metabolismo bacteriano para o crescimento do *Lactobacillus acidophilus:* para permitir o crescimento do *Lactobacillus acidophilus*, preparou-se o Meio TSI modificado, onde foi agregado o extrato de Stevia rebaudiana bertoni, sorbitol e sacarose (Figura 01). Obtidos os ágares, foram colocados em placas de Petri e em tubos de ensaio, semeando a concentração de *Lactobacillus acidophilus* (Figura 02). Realizou-se a leitura para o crescimento bacteriano em períodos de 4, 16 e 24 horas. Considerou-se a presença (+) e a ausência (-) para caracterizar o crescimento bacteriano.

- Metabolismo bacteriano para o crescimento do *Streptococcus mutans:* à semelhança do método acima descrito, considerou-se um controle negativo (TSI modificado); controle posi-

FIGURA 1

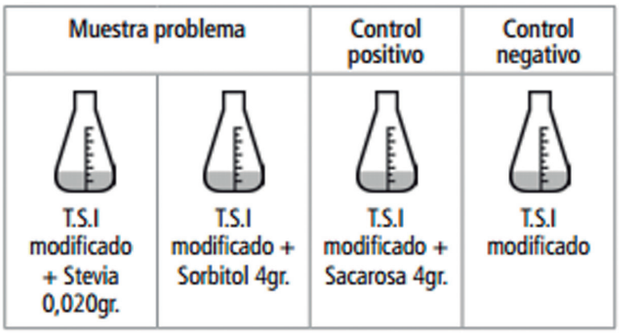
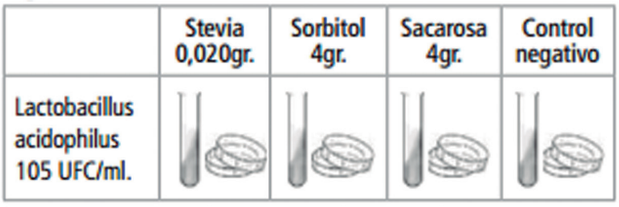


FIGURA 2



Artigo 00 - Nilse.indd 22 16/02/17 12:18

tivo (TSI Modificado + Sacarose 4g); e grupos experimentais (TSI Modificado + Stevia rebaudiana bertoni 0,020g e TSI Modificado + Sorbitol 4g). Realizaram-se as leituras nos períodos de 4, 16 e 24 horas observando presença (+) ou ausência (-) do crescimento bacteriano. Ao período de 24 horas, para a leitura qualitativa, designaram-se os valores de XXXX aos que apresentaram um crescimento abundante e uniforme; XXX aqueles com crescimento de abundante a regular; XX com crescimento regular a escasso e X aos que apresentaram crescimento escasso.

- Metabolismo bacteriano para a produção de ácido: o meio TSI modificado mostra a capacidade de fermentar os açúcares, permitindo a produção de ácidos pelo *Lactobacillus acidophilus* o qual é detectado pela mudança de cor. A mudança de cor indica a metabolização em ácidos em cada um dos meios com os substratos correspondentes segundo o pH (Amarelo >6,2; laranja claro 4,4 a 6,2; vermelho <4,4). Para observar a produção de ácidos pelos *Streptococcus mutans*, ao ágar nutritivo preparado com cada um dos substratos foi acrescentado 0,050g de vermelho de metilo para detectar as mudanças de cor, utilizando a mesma escala do amarelo ao vermelho.

RESULTADOS

O *Lactobacillus acidophilus* não apresentou novas colônias até o período de 24h na presença de adoçantes Stevia rebaudiana bertoni e Sorbitol; já com o controle positivo (sacarose) foi observado um crescimento de 67%. O *Streptococcus mutans* com o substrato Stevia rebaudiana bertoni apresentou um crescimento de 60% no período 4h, enquanto que com o Sorbitol foi de 80%, similar à sacarose. A mesma porcentagem foi mantida pela Stevia rebaudiana bertoni no período de 16h, enquanto que com o sorbitol e a sacarose observou um crescimento de 100% (Tabela 1).

Em relação às características qualitativas do crescimento, o mesmo foi considerado no período de 24h com a Stevia rebaudiana bertoni: regular a escasso (XX), com o Sorbitol abundante a regular (XXX) e com a sacarose abundante e uniforme (XXXX) (Gráfico 1).

O *Lactobacillus acidophilus* não apresentou produção de ácidos. Observou-se um pH superior a 6,2 nos períodos de 4, 16 e 24h com o Streptococcus mutans na presença de Stevia rebaudiana bertoni e Sorbitol. O controle positivo apresentou uma diferença de pH entre 4,4 e 6,2 no período de 4h e no período de 16h diminuiu consideravelmente (marcador vermelho). A leitura no período de 24h apresentou um pH inferior a 4,4 com o substrato sacarose (Tabela 2). A quantidade de ácidos metabolizados pelo *Streptococcus mutans* com a Stevia rebaudiana bertoni foi menor com o tempo de 4h e 16h tornando-se similar às 24h, em uma análise comparativa com o Sorbitol (Gráfico 2).

DISCUSSÃO

O papel do Sorbitol na prevenção da cárie dentária tem sido investigado e evidências científicas o define com características de tipo hipoacidogênico e pouco cariogênico. Assim, os resultados deste estudo concordam com essas definições. Entretanto, o crescimento bacteriano do *Streptococcus mutans* que utilizou o Sorbitol como substrato apresentou uma atividade metabólica para o crescimento bacteriano similar à da sacarose nos períodos experimentais de 4, 16 e 24 horas, divergindo

TABELA 1
Crescimento bacteriano Streptococcus mutans

Períodos	Stevia 0,020%	Sorbitol 4%	Sacarose 4%
4h	+ + + - -	+ + + + -	+ + + + -
16h	+ + + - -	+ + + + +	+ + + + -
24h	+ + + + +	+ + + + +	+ + + + +

GRÁFICO 1
Características qualitativas do crescimento

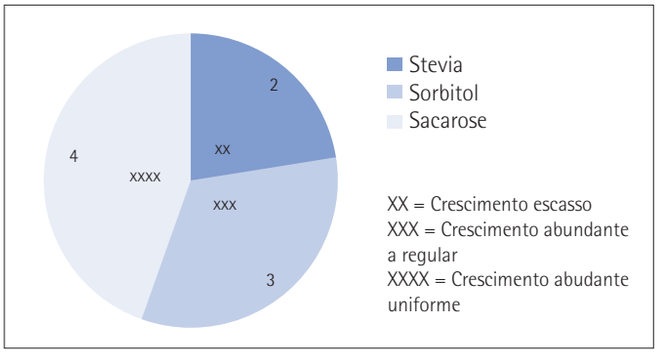
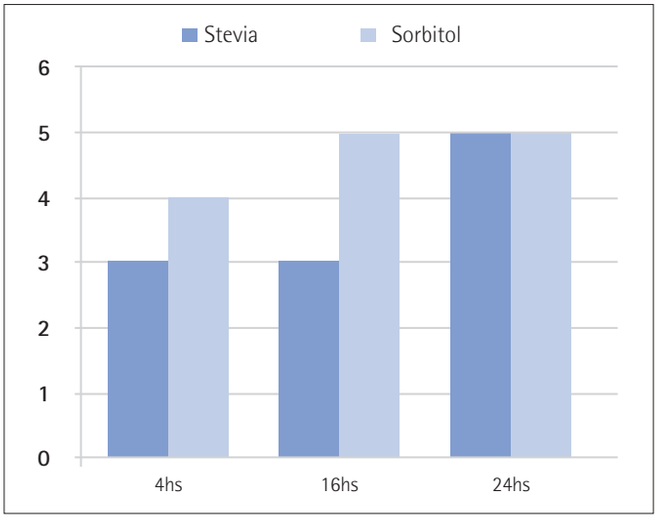


TABELA 2
Metabolismo para a produção dos ácidos

Períodos	Stevia 0,020%	Sorbitol 4%	Sacarose 4%
4h	a a a - -	a a a a -	1 1 1 1 -
16h	a a a - -	a a a a a	1 1 1 v v
24h	a a a a a	a a a a a	1 v v v v

GRÁFICO 2
Quantidade de ácido metabolizado pelo Streptococcus mutans com os substratos Stevia e Sorbitol através do tempo (Indicador amarelo)



Artigo 00 - Nilse.indd 23 16/02/17 12:18

dos resultados de Delgado J. *et al.* (1999).[9] Em relação ao *Lactobacillus acidophilus*, foi observada uma significativa diminuição do crescimento, porém neste estudo não existiu crescimento até às 24h. Em relação ao pH dos ácidos produzidos, os resultados são semelhantes (pH >6,2). Kalfas *et al* (1990)[10] em um estudo realizado com suspensão de células bacterianas obtidas do biofilme dentário após a fermentação com Sorbitol observaram que a produção de ácidos foi menor quando comparado com o uso da glicose. O presente estudo demonstrou que o principal mecanismo não cariogênico do Sorbitol é a baixa produção de ácidos com pH crítico. Stosser *et al.* (1990)[11] mensurou digitalmente o pH com um teste telemétrico e verificou que as pequenas diferenças de intensidade e duração da produção de ácidos com a sacarose, sorbitol e glicose não eram significativas para afirmar recomendações dietéticas. No presente estudo, também não foi encontrada uma diferença na quantidade de ácido produzido pelo *Streptococcus mutans* no período de 24 horas, no entanto, foram encontradas diferenças significativas na intensidade do ácido, sendo que com a sacarose foram obtidos pH críticos na leitura de 4 horas, enquanto com o Sorbitol foram produzidos ácidos com menor pH (pH>6,2). Em relação ao tempo, os resultados obtidos com o sorbitol e os Streptococcus mutans demonstraram que tanto o crescimento como a produção de ácidos foi similar quando comparada com a sacarose no período experimental de 24 horas, havendo diferenças nos períodos de 4 e 16 horas. Em um estudo in vivo, Kalfas *et al* (1990)[12] observaram que após um período de adaptação de 4 semanas com enxaguatórios e uma solução de sorbitol a 10%, existiu um incremento no número total de Streptococcus mutans que fermentaram o sorbitol. No presente estudo, os resultados obtidos com a Stevia rebaudiana bertoni em relação ao mecanismo anticariogênico são significativos, pois este adoçante apresentou vantagens quando comparado com o sorbitol em relação aos efeitos antibacterianos, verificando um menor crescimento de Streptococcus mutans nos períodos de 4h e às 16h. A Stevia rebaudiana bertoni também demonstrou ser hipoacidogênica. A ação antimicrobiana da Stevia rebaudiana bertoni ainda não é muito demostrada, porém os resultados deste estudo assemelham-se a outros que verificaram a eficácia da Stevia na redução de microrganismos. Gutierrez (2005)13, observou halos de inibição de crescimento microbiano, conseguindo verificar que quando a concentração de Stevia rebaudiana bertoni diminuía, aumentava o crescimento de Streptococcus mutans. No presente estudo, foi utilizada uma concentração ao açúcar (0,020g) e foi obtida uma importante diminuição do crescimento microbiano. Diferentemente de outros estudos in vitro, esse estudo utilizou colônias bacterianas em quantidades equivalentes a alto risco. Assim, os resultados indicam que a proteção seria maior nos casos com concentrações de colônias bacterianas consideradas de moderado a baixo risco. Este resultado, alinha-se ao de Kegler (2012)14, no qual a atividade metabólica do Streptococcus mutans em concentrações consideradas de baixo risco (< 103UFC/ml) para o crescimento bacteriano com a Stevia rebaudiana bertoni foi similar em três concentrações de Stevia (0,10% -0,020% - 0,055%) nas primeiras 16h onde foi observado um aumento da densidade microbiana. Pesquisas de Paciello et al (2006)15 e (2010)16 avaliando a eficácia da Stevia rebaudiana bertoni como antisséptico bucal demonstram uma inibição de crescimento do Lactobacillus casei, bem como uma diminuição de microrganismos aeróbios e anaeróbios. Em uma análise comparativa de ambos os estudos com o presente estudo, pode-se considerar que o efeito inibitório de crescimento dessas espécies bacterianas e também o efeito inibitório do crescimento do Streptococcus mutans é maior quando se eleva a concentração de Stevia rebaudiana bertoni, e a de Lactobacillus são mais sensíveis a concentração menores. Considerando a metodologia e os resultados advindos do presente trabalho, notadamente a Stevia rebaudiana bertoni apresentou um maior impacto no controle do crescimento bacteriano e na produção de ácidos quando comparado com o Sorbitol.

CONCLUSÃO

A Stevia rebaudiana bertoni apresentou melhores efeitos anticariogênicos quando comparado com o Sorbitol, considerando sua ação no metabolismo bacteriano, na densidade da população microbiana e na produção de ácidos. A Stevia rebaudiana bertoni pode ser considerada como alternativa potencial na substituição da sacarose e do Sorbitol. No entanto, considera-se importante a realização de um número maior de estudos múltiplos e independentes sobre o assunto.

REFERÊNCIAS

1. Maksukubo, T.; Takazoe, I. Sucrose substitutes and their role in caries prevention. Int.Dent. Jun; 56 (3):119-39. 2006.
2. U.S. Dept of Health & Human Services, U.S. Department of Agriculture. Dietary Guidelines for Americans. Internet: http://www.health.gov/dietaryguidelines/ history.htm (accessed 29 January 2008).
3. Bleich, S.; Wang, G.; Wang, C.; Wang, Y.; Gortmaker, S.L. Increasing consumption of sugarsweetened beverages among US adults 1988–1994 to 1999– 2004. Am J Clin Nutr. 89: 372–81. 2009
4. Weihrauch, M.R.; Diehl, V. Artificial sweeteners—do they bear a carcinogenic risk?. Annals of Oncology. 15: 1460– 1465, 2004
5. Huff, J.; Tomatis, L. Long-term toxicity and carcinogenicity studyof cyclamate in nonhuman primates. Toxicol Sci; 57: 186. 2000
6. Valencia, F.E. Memorias. En: Curso de Desarrollo De Alimentos Light. Medellín: Universidad de Antioquia. 2006.
7. Bordoni, N. Doño, R. Racionalización de los Hidratos de Carbono. Odontología Preventiva. Programa de Educación Continua Odontológica No Convencional. Washintong D. C. 26-42. 1992.
8. Escobar Gutierrez, A.J. Photosynthèse, Partition Du Carbone Et Métabolisme Du Sorbitol Dans Les Feuilles Adultes De Pêcher (Prunus Persica L.Batsch).Thèse De Doctorat De l'Université De Poitiers, France. 1995.
9. Oviedo, M. Stevia Paraguaya. Historia y Bondades, uso medicinal.Acceso 8 de abril, 2008. Disponible en http://stevia paraguaya.com.
10. FAO/OMS. Hoja informativa final. Glucosidos de Steviol (acceso 21 de junio del 2010) Disponible en http://www.fao.org/ ag/agn/agns/files/jecsa 69_final pdf.
11. Delgado, J.E.; CASTAÑEDA S.P.; Alvarez, A.; Sissi N.; Cabal, C. Comparación del crecimiento in vitro de Streptococcus mutans y Lactobacillus acidophilus con edulcorantes. Univ. Odontol ;18 (37): 33-8. 1999.
12. Kalfas, S.; Maki, Y.; Birhed, D.; Edwarsson, S. Effec of pH on acid production fron Sorbitol in washed cell suspensions of oral bacteria. Caries Res. 24 (2): 107-12.1990
13. Stosser, L; Tietze, W.; Kungzel, W.; Limberger, K. Intraoral pH measurement by determination of acidogenic potencials of dietary materials. Oral Prophilaxe. Dec; 12(4): 145-53. 1990.
14. Kalfas, S.; Svensater, G.; Edwardsson.; D. Sorbitol Adaptation of Dental Plaque in People with Low and Normal Salivary-secretion Rates. J Dent Res. 69; 442. 1990.
15. Gutierrez, L. Obtención del Extracto acuoso de la Stevia y su acción bactericida en el Streptococcus Mutans responsable de la cariogénesis humana.Universidad Catolica de Santa Maria. Arequipa-Perú. 2005.
16. Kegler, karen. Efectos del extracto de la Stevia rebaudiana Bertoni como edulcorante en la prevención de caries. Revista científica odontológica Academia Internacional de Odontología Integral 21: 2-8. Mayo 2012.
17. Paciello, M.R.; osorio M.S.; Zanotti Cavazzoni, J.C. Eficacia del Colutorio de Kaá heé (Stevia rebaudiana Bertoni) como antiséptico bucal a distintas concentraciones. Dirección General de investigación científica y Tecnológica. U:N:A:2006.
18. Paciello, M.R.; osorio M.S.; Gomez, R.; Arenas, R.; Vega, C.; Amarilla, A.; Nakayama, H.; Rolon, M.; Peralta, I.; Cardozo, C. Eficacia de las diferentes fracciones de la Stevia sobre microorganismos prevalentes en la placa bacteriana intraoral. Rev. de La Sociedad Científica del Paraguay. nº 26. 2010.

Artigo 00 - Nilse.indd 24 16/02/17 12:18