

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**Estudo *In Situ* do Potencial Cariogênico de um Adoçante
Comercial a Base de Esteviosídeo**

ELOÁ ROSSONI

Orientador: Prof. Dr. João José Freitas Sarkis

Co-orientadora: Prof. Dra. Marisa Maltz

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-
Bioquímica, para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica**

Porto Alegre, maio de 1996

CIP - CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

R 838 e Rossoni, Eloá

Estudo *in situ* do potencial cariogênico de um adoçante comercial a base de esteviosídeo / Eloá Rossoni; Orient. João José Freitas Sarkis; Co-orient. Marisa Maltz. - Porto Alegre: UFRGS. Instituto de Biociências, 1996.

109p.: il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Biociências. Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas - Área de Concentração: Bioquímica, 1996.

1. ODONTOLOGIA PREVENTIVA 2. PLACA DENTÁRIA
3. CÁRIE DENTÁRIA 4. EDULCORANTES. I. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Biociências. II. Título

CDU 616.314-084

Preparado por: Eloisa Futuro Pfitscher CRB 10/598

AGRADECIMENTOS

À Profª. Marisa Maltz pela orientação, apoio e espírito crítico, os quais tornaram possível a realização deste trabalho.

Ao Prof. João José Freitas Sarkis por ter apoiado meu ingresso no Mestrado em Bioquímica e me aceitado como orientanda.

Ao colega Pedro Zeleniakas Corrêa pelo importante papel desempenhado nos experimentos, por sua dedicação e amizade.

À Profª. Altair A. Del Bel Cury, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, pela orientação e ajuda na execução dos experimentos de microdureza do esmalte.

Aos professores da Faculdade de Odontologia da UFRGS: Antonieta Lopes de Souza, Dalva Padilha, Eduardo Ferreira, Francesca Bercini, Taís Azambuja, Suzana Werner Samuel; pelo auxílio em diferentes etapas deste trabalho.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia da UFRGS pelo apoio e compreensão durante a realização do Mestrado em Bioquímica.

Aos colegas, professores e funcionários do Curso de Pós-graduação em Bioquímica por todas as colaborações prestadas.

Às alunas Adriana Beatriz Martins, Lúcia Cláudia Mosry Sperb, Ana Paula Weissheimer, Cândida Maria Muller, Cláudia Augusta Vianna Dutra e Larissa Simon Brouwers da Faculdade de Odontologia da UFRGS pela participação na parte experimental deste trabalho.

À Luciana Neves Nunes pelo assessoramento na análise estatística dos resultados.

Às bibliotecárias Norma Beatriz Loureiro Ataíde, Rejane Rasso Klaes, Clara Maria Pontes Pontes e Eloísa Futuro Pfitscher da Biblioteca da Faculdade de Odontologia da UFRGS pelas colaborações prestadas.

À Elaine Tweedie Luiz, médica chefe da Unidade Sanitária Murialdo, e aos cirurgiões-dentistas Cizino Rizzo da Rocha, Cléa Corrêa Ribeiro, Isabel Cristina Lisboa e Vera Lúcia dos Santos Badi pela compreensão em momentos difíceis deste trabalho.

Ao cirurgião-dentista Flávio Masotti pela colaboração na coleta de dentes para este trabalho.

Ao Prof. Mauro Silveira de Castro da Faculdade de Farmácia da UFRGS pela orientação em relação a esterilização dos blocos de esmalte dentário.

A todas aquelas pessoas que de uma forma ou de outra colaboraram para a execução deste trabalho.

Aos órgãos financiadores de pesquisa: CNPq e PROPESP/UFRGS.

OFERECIMENTO

Ao Marco e a meus filhos Marcelo e Alexandre por terem aceitado minhas ausências necessárias;

aos meus pais, Carmelindo e Celina, pelo exemplo de vida e educação que me possibilitaram chegar até aqui;

às minhas irmãs Juçara, Cláudia, Nildete, Suzana e Carmem, à vó Lourdes e à vó Marina por terem me substituído nos cuidados com as crianças em vários momentos;

a todas aquelas pessoas que gostam de mim e se orgulham do meu trabalho, em especial à Isaura Bueno;

e finalmente a Deus por nos ter dotado de inteligência, vontade e liberdade.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
OFERECIMENTO	v
SUMÁRIO	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE FÓRMULAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Cárie dentária	19
2.1.1 Aspectos gerais	19
2.1.2 Microbiologia da cárie dentária	20
2.1.2.1 Lactobacilos	22
2.1.2.2 Estreptococos do grupo mutans	24
2.1.3 Carboidratos e cárie	29
2.1.4 Metabolismo bacteriano dos carboidratos	35
2.1.4.1 Formação de ácidos	37
2.1.4.2 Polissacarídeos	39
2.2 Substitutos do açúcar	44
2.2.1 Adoçantes calóricos	47
2.2.1.1 Lactose	50
2.2.2 Adoçantes não-calóricos	51
2.2.2.1 Esteviosídeo	53
3. OBJETIVOS	61
3.1 Objetivo geral	61
3.2 Objetivos específicos	61
4. MATERIAIS E MÉTODOS	62
4.1 Amostra	62

4.2 Desenho experimental	62
4.3 Soluções-testes.....	63
4.4 Fase preparatória	63
4.4.1 Preparação dos blocos de esmalte dentário	63
4.4.2 Confeção dos aparelhos intra-orais	64
4.5 Coleta de placa bacteriana.....	64
4.6 Cultivo de placa bacteriana	67
4.7 Determinação da concentração de polissacarídeos solúveis e insolúveis	67
4.7.1 Determinação de polissacarídeos solúveis	68
4.7.2 Determinação de polissacarídeos insolúveis.....	69
4.8 Exame visual com lupa dos blocos de esmalte dentário.....	70
4.9 Medições de microdureza em profundidade nos blocos de esmalte dentário	71
4.10 Análise estatística	74
5. RESULTADOS.....	75
6. DISCUSSÃO	90
7. CONCLUSÕES.....	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
ANEXOS	109

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP - adenosina trifosfato

CPO-D - índice de dentes cariados, perdidos e obturados

FDA - Food and Drug Administration

ESTEV - esteviosídeo

KHN - número de dureza de Knoop

LACT - lactose

MBL - mancha branca localizada

MBG - mancha branca generalizada

MSB- ágar mitis salivarius com bacitracina

PEC - polissacarídeos extracelulares

PEP - fosfoenolpiruvato

PTS - sistema fosfotransferase

ppt- precipitado

rpm- rotações por minuto

R-SL- ágar Rogosa SL

SAC - sacarose

SM- estreptococos do grupo mutans

sob- sobrenadante

SPSS - Statistical Package for Social Science

STEV - Stevita®

UFC- Unidades Formadoras de Colônia

SM- estreptococos do grupo mutans

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Aparelho de acrílico palatino com os quatro blocos de esmalte dentário e a tela plástica.....	65
Figura 2 - Aparelho de acrílico palatino com a tela plástica parcialmente removida para a coleta de placa bacteriana formada sobre os blocos de esmalte dentário na presença de sacarose 17%, sete vezes ao dia, por um período de 28 dias.....	66
Figura 3 - Corpo de prova com os blocos de esmalte dentário submetidos aos tratamentos com sacarose, lactose, Stevita® e esteviosídeo do indivíduo 1.....	72
Figura 4 - Diagrama representando um bloco de esmalte com as 21 indentações nas posições A, B e C.....	72
Figura 5 - Mediana e quartis de \log_{10} UFC de estreptococos do grupo mutans por mg de placa após tratamento com as soluções de sacarose, lactose, Stevita® e esteviosídeo.....	77
Figura 6 - Mediana e quartis de \log_{10} UFC de lactobacilos por mg de placa após tratamento com as soluções de sacarose, lactose, Stevita® e esteviosídeo.....	78
Figura 7 - Zona de lesão de cárie com indentações em um dos blocos de esmalte dentário submetido ao tratamento com sacarose 17%, sete vezes ao dia, no indivíduo 1.....	85
Figura 8 - Percentual de volume mineral versus profundidade da superfície dos blocos de esmalte dentário submetidos ao tratamento com sacarose do indivíduo 2.....	85
Figura 9 - Zona de lesão de cárie com indentações em um dos blocos de esmalte dentário submetido ao tratamento com lactose 1,8%, sete vezes ao dia, no indivíduo 1.....	86
Figura 10 - Percentual de volume mineral versus profundidade da superfície dos blocos de esmalte dentário submetidos ao tratamento com lactose do indivíduo 1 (a) e do indivíduo 2 (b).....	86
Figura 11 - Zona de lesão de cárie com indentações em um dos blocos de esmalte dentário submetido ao tratamento com Stevita® do indivíduo 1.....	88

Figura 12 - Percentual de volume mineral versus profundidade da superfície dos blocos de esmalte dentário submetidos ao tratamento com Stevita® dos indivíduos 1 (a) e 3 (b).....	88
Figura 13 - Bloco de esmalte dentário sem lesão de cárie submetido ao tratamento com esteviosídeo do indivíduo 4.....	89
Figura 14 - Percentual de volume mineral versus profundidade da superfície dos blocos de esmalte dentário submetidos ao tratamento com esteviosídeo do indivíduo 4.....	89

LISTA DE FÓRMULAS

	Página
Fórmula 1 - Cálculo da concentração de polissacarídeos.....	69
Fórmula 2 - Cálculo do número de dureza de Knoop.....	73
Fórmula 3 - Cálculo do percentual de volume mineral.....	73

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Peso úmido de placa bacteriana (mg) após o tratamento com as soluções de sacarose (SAC), lactose (LACT), Stevita [®] (STEV) e esteviosídeo (ESTEVEV).....	75
Tabela 2 - Nível de estreptococos do grupo mutans (log ₁₀ UFC/mg de placa) após o tratamento com as soluções de sacarose (SAC), lactose (LACT), Stevita [®] (STEV) e esteviosídeo (ESTEVEV).....	76
Tabela 3 - Nível de lactobacilos (log ₁₀ UFC/mg de placa) após o tratamento com as soluções de sacarose (SAC), lactose (LACT), Stevita [®] (STEV) e esteviosídeo (ESTEVEV).....	77
Tabela 4 - Concentrações de polissacarídeos solúveis na placa bacteriana, após o tratamento com as soluções de sacarose, lactose, Stevita [®] e esteviosídeo.....	79
Tabela 5 - Concentrações de polissacarídeos insolúveis na placa bacteriana, após o tratamento com as soluções de sacarose, lactose, Stevita [®] e esteviosídeo.....	80
Tabela 6 - Concentrações de polissacarídeos (solúveis+insolúveis) na placa bacteriana, após o tratamento com as soluções de sacarose, lactose, Stevita [®] e esteviosídeo.....	80
Tabela 7 - Distribuição dos indivíduos (número e percentagem) com presença de alterações no esmalte após utilização de sacarose a 17% (SAC), lactose a 1,8% (LACT), Stevita [®] a 2% (STEV) e esteviosídeo a 0,2% (ESTEVEV).....	81
Tabela 8 - Características macroscópicas dos blocos de esmalte (número e percentagem) submetidos a diferentes soluções adoçantes.....	81
Tabela 9 - Análise estatística entre os diferentes adoçantes em relação ao número de blocos com alteração no esmalte e severidade de lesão.....	82
Tabela 10 - Microdureza em profundidade dos blocos de esmalte com os tratamentos Sacarose, Lactose, Stevita [®] , Esteviosídeo e Controle (média, desvio-padrão e amplitude).....	84

RESUMO

Os produtos comerciais a base de esteviosídeo usualmente contêm, em sua formulação, outros edulcorantes que podem modificar o efeito desse composto sobre a formação de placa bacteriana e desmineralização do esmalte dentário. O objetivo desta investigação foi testar o adoçante comercial Stevita®, que contém na sua composição esteviosídeo e lactose. Sete indivíduos usaram aparelhos de acrílico palatinos removíveis com quatro blocos de esmalte dentário. Cada adoçante foi utilizado por períodos de 28 dias. As soluções-testes foram: sacarose 17%, Stevita® 2% (esteviosídeo 10% + lactose 90%), lactose 1,8% e esteviosídeo 0,2%. Após 28 dias, amostras de placa foram coletadas de dois blocos de esmalte e analisada quanto à microflora cariogênica (estreptococos do grupo mutans-SM e lactobacilos). As amostras de placa coletadas dos outros dois blocos de esmalte foram utilizadas para determinação da concentração de polissacarídeos solúveis e insolúveis. A perda mineral dos blocos de esmalte dentário foi avaliada através de: 1) exame visual com lupa dos blocos de esmalte dentário, realizado por dois examinadores; 2) medições de microdureza em profundidade. Os resultados mostraram que o esteviosídeo é um adoçante não cariogênico, ocasionando o menor acúmulo de placa bacteriana ($9,20 \pm 3,26$ mg) e apresentando os mais baixos níveis de SM ($2,539 \pm 2,457 \log_{10}$ UFC/mg de placa) e lactobacilos ($0,310 \pm 0,481 \log_{10}$ UFC/mg de placa). A concentração de polissacarídeos solúveis ($5,80 \pm 4,36$ µg/mg de placa) e insolúveis ($5,32 \pm 5,03$ µg/mg de placa) na placa bacteriana formada com esteviosídeo foi inferior aos outros adoçantes, diferindo estatisticamente da sacarose. Os dados de exame visual com lupa e microdureza do esmalte não detectaram perda mineral nos blocos de esmalte testados com esteviosídeo. A sacarose foi o tratamento mais cariogênico. Todos os blocos de esmalte dentário testados com sacarose apresentaram perda mineral severa e esse adoçante ocasionou maior acúmulo de placa bacteriana ($28,80 \pm 15,00$ mg) e nível de crescimento de SM ($5,279 \pm 5,690 \log_{10}$ UFC/mg de placa) e lactobacilos ($6,147 \pm 6,312 \log_{10}$ UFC/mg de placa). A concentração de polissacarídeos insolúveis ($124,81 \pm 101,56$ µg/mg de placa) na placa bacteriana formada na presença de sacarose foi superior aos outros adoçantes ($p < 0,01$). O tratamento com lactose foi semelhante à sacarose nas variáveis peso úmido de placa bacteriana

(18,60±11,23 mg), nível de SM (4,249±4,403 log₁₀UFC/mg de placa) e lactobacilos (5,386±5,718 log₁₀UFC/mg de placa) e concentração de polissacarídeos solúveis (9,37±3,76 µg/mg de placa). A lactose diferiu estatisticamente da sacarose na concentração de polissacarídeos insolúveis (7,53±6,96 µg/mg de placa) e nas medições de microdureza em profundidade até 90 µm. A Stevita® apresentou semelhança com a lactose quanto ao peso úmido de placa (14,50±8,42 mg), ao nível de SM (4,242 ±4,520 log₁₀UFC/mg de placa), à concentração de polissacarídeos solúveis (7,53±3,66 µg/mg de placa) e insolúveis (8,08±5,28 µg/mg de placa) e às medições de microdureza em profundidade. Com lactose, 46,4% dos blocos de esmalte dentário mostraram perda mineral quando do exame visual com lupa, enquanto que a Stevita® ocasionou desmineralização em 21,4% dos blocos dentários. O adoçante comercial Stevita® apresenta um comportamento intermediário à lactose e ao esteviosídeo, podendo ser utilizado como substituto da sacarose em pacientes com alta atividade cariogênica.

ABSTRACT

Commercial products based on stevioside often contain ingredients which possibly modify the effect of this compound on plaque formation and enamel demineralization. The aim of this investigation was to test a commercial sweetener Stevita®, which contains stevioside and lactose. Seven subjects used palatal removable appliances with four enamel slabs. Each sweetener were used during 28 days. The test solutions studied were: sucrose 17%, Stevita® 2% (10% stevioside+90% lactose), lactose 1,8% and stevioside 0,2%. After 28 days, the plaque samples were removed from two enamel slabs and the number of cariogenic bacteria (mutans streptococci-SM and lactobacilli) was recorded. The plaque samples were removed from others two enamel slabs and used to determine the concentrations of soluble and insoluble polysaccharides. The mineral loss of four enamel slabs was evaluated by means of: 1) visual exam with magnifying-glass; 2) measurements of microhardness. The results showed that stevioside is not a cariogenic sweetener. Stevioside caused the lowest accumulation of dental plaque (means±s.d) (9,20±3,26 mg) and showed the lowest level of mutans streptococci (2,539±2,457 log₁₀ UFC/mg of plaque) and lactobacilli (0,310±0,481 log₁₀ UFC/mg of plaque). The soluble (5,80±4,36 µm/mg of plaque) and insoluble (5,32±5,03 µm/mg of plaque) polysaccharides concentrations in dental plaque formed with stevioside were lower than with other sweeteners. These differences were statistically significant when compared with sucrose, p<0,01 (Friedman's test). Visual exam with magnifying-glass and measurements of enamel microhardness did not detect mineral loss in enamel slabs tested with stevioside. Sucrose was the most cariogenic treatment. All enamel slabs tested with sucrose showed mineral loss. This sweetener caused the highest accumulation of dental plaque (28,80±15,00 mg) and mutans streptococci (5,279±5,690 log₁₀ UFC/mg of plaque) and lactobacilli level (6,147±6,312 log₁₀ UFC/mg of plaque). Insoluble polysaccharide concentration (124,81±101,56 µg/mg of plaque) in dental plaque formed with sucrose was higher than with others sweeteners (p<0,01). Treatment with lactose was similar to sucrose

on the following variables: wet weight of dental plaque ($18,60 \pm 11,23$ mg), mutans streptococci ($4,249 \pm 4,403 \log_{10}$ UFC/mg of plaque) and lactobacilli level ($5,386 \pm 5,718 \log_{10}$ UFC/mg of plaque) and soluble polysaccharide concentration ($9,37 \pm 3,76 \mu\text{m}/\text{mg}$ of plaque). Lactose was statistically different of sucrose regarding insoluble polysaccharide concentration ($7,53 \pm 6,96 \mu\text{g}/\text{mg}$ of plaque) and measurements of microhardness until $90 \mu\text{m}$. Stevita® were similar to lactose regarding: wet weight of plaque ($14,50 \pm 8,42$ mg), mutans streptococci level ($4,242 \pm 4,520 \log_{10}$ UFC/mg of plaque), soluble ($7,53 \pm 3,66 \mu\text{g}/\text{mg}$ of plaque) and insoluble ($8,08 \pm 5,28 \mu\text{m}/\text{mg}$ of plaque) polysaccharides concentrations and measurements of microhardness. Forty six percent of enamel slabs treated with lactose showed mineral loss, while Stevita® caused demineralization in 21,4% of enamel slabs (visual exam with magnifying-glass). The commercial sweetener Stevita® showed an intermediate behaviour between lactose and stevioside. This sweetener can be used as sucrose substitute in patients with high cariogenic activity.

1. INTRODUÇÃO

A cárie dentária, uma doença bacteriana, é um processo dinâmico que ocorre em função de uma série de eventos bioquímicos gerados pelos microrganismos da placa após exposição a carboidratos fermentáveis. Entre estes eventos, destaca-se a produção de ácidos e, conseqüentemente, a diminuição do pH da placa. Esse processo resulta em distúrbio do equilíbrio físico-químico entre o tecido duro (esmalte, dentina, cimento) e o fluido da placa circundante, com ocorrência de perda mineral e, eventualmente, cavitação (GEDDES, 1995).

Nem todos os carboidratos são igualmente cariogênicos. A sacarose é o açúcar mais associado com a doença cárie (LOESCHE, 1985). Ela tem um papel importante no desenvolvimento de cárie em superfícies lisas, porque, além de ocasionar a produção de ácidos e de polissacarídeos intracelulares, serve de substrato para a produção de polissacarídeos extracelulares (PEC). O PEC é uma substância que propicia a formação de uma placa espessa na medida em que aumenta a aderência entre as bactérias e destas às superfícies lisas do dente (NEWBRUN, 1988; RÖLLA, 1989; MACPHERSON et al, 1990; BURT, 1993).

O consumo de açúcar tem permanecido constante em vários países altamente industrializados durante as duas últimas décadas, ficando em torno de 40-60 kg/pessoa/ano, apesar da maioria desses países ter mostrado um substancial declínio na experiência de cárie em crianças nos últimos anos. A diminuição de cáries nesses países é atribuída ao uso de fluoretos nas suas várias formas, mais freqüentemente em dentifrícios (MARTHALER, 1990; IMFELD, 1993; BURT, 1993).

Apesar do declínio da prevalência de cárie observada nos países industrializados, alguns indivíduos apresentam alta atividade de cárie. O consumo de açúcar é, sem dúvida, o fator mais importante no processo de doença nesse grupo de indivíduos (NEWBRUN, 1988; HOLM, 1990; BURT, 1993).

Como alternativa de tratamento desses pacientes com alta atividade de cárie, várias pesquisas têm sido desenvolvidas na tentativa de controlar o desenvolvimento da doença cárie através do consumo racional de sacarose ou do uso de substâncias adoçantes sem poder cariogênico (LOESCHE, 1985; NEWBRUN, 1988).

Inúmeros produtos naturais com origem nas plantas sem potencial cariogênico foram descobertos decorrentes de observações laboratoriais e folclóricas (KINGHORN e SOEJARTO, 1989). Um exemplo é a planta *Stevia rebaudiana* Bertoni, usada no Paraguai, seu país de origem, para adoçar bebidas. O esteviosídeo e o rebaudiosídeo A são os adoçantes glicosídeos diterpenóides constituintes da *Stevia rebaudiana*. O esteviosídeo puro e os extratos de *Stevia rebaudiana* são usados como adoçante de uma variedade de alimentos e bebidas (DAS et al, 1992).

No Brasil, produtos comerciais a base de esteviosídeo contêm em sua formulação outros edulcorantes além do esteviosídeo (AURICCHIO et al, 1987/89), o que poderia alterar seu efeito não cariogênico.

MALTZ et al (1992) testaram *in vitro* o efeito de adoçantes comerciais a base de esteviosídeo e de aspartame que contêm em sua composição lactose, manitol ou sorbitol no metabolismo do *S. mutans* IB1600. Constataram que a produção de ácidos, formação de placa e produção de polissacarídeos nestes produtos é similar aos outros compostos presentes na formulação e não ao esteviosídeo e aspartame puro. Esses produtos comerciais têm provavelmente menos efeito cariogênico do que a sacarose, pois promovem menor produção de ácidos, formação de placa e produção de polissacarídeos que a sacarose.

Uma vez que os produtos comerciais que contêm esteviosídeo interferem no metabolismo das bactérias cariogênicas, de forma diferente do composto puro, acredita-se que é importante testar a cariogenicidade desses produtos *in vivo*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cárie dentária

2.1.1 Aspectos gerais

A cárie dentária caracteriza-se por ser uma doença crônica que progride em geral muito lentamente e raramente é autolimitante, sendo que na ausência de tratamento pode levar à destruição do dente (THYLSTRUP e FEJERSKOV, 1995).

A doença cárie decorre de um processo dinâmico que acontece nos depósitos bacterianos (placa bacteriana aderida à superfície dos dentes) toda vez que carboidratos são metabolizados, resultando em flutuações no pH da placa e conseqüentemente em distúrbio do equilíbrio entre a substância do dente e o fluido da placa adjacente. A doença pode afetar o esmalte, a dentina e o cimento (FEJERSKOV e THYLSTRUP, 1995).

A destruição localizada dos tecidos duros dentários, geralmente chamada lesão, é o sinal da doença. Os sinais da doença podem ser classificados em uma escala que vai desde a perda inicial de mineral à nível ultra-estrutural, passando ao estágio visível clinicamente que se caracteriza por diferentes graus de opacidade do esmalte, difíceis de serem discernidos, até atingirem grandes cavidades que se estendem à polpa dentária (FEJERSKOV e THYLSTRUP, 1995).

Embora muitos pesquisadores considerem o início e a progressão da cárie como resultantes de múltiplos fatores interrelacionados, ninguém nega que a destruição cariiosa só se desenvolve na presença de acúmulos localizados de bactérias orais na superfície do dente. Entretanto os dentes podem estar revestidos por bactérias sem sinais visíveis de lesão de cárie e, portanto, pode-se concluir que, ao mesmo tempo que os depósitos microbianos são necessários, não são suficientes para causar cárie (THYLSTRUP e FEJERSKOV, 1995).

O metabolismo bacteriano dos carboidratos provoca aumento na concentração de ácidos orgânicos, principalmente ácido láctico na placa. Se o aumento das concentrações de íons hidrogênio após cada ingestão de carboidratos fermentáveis levar à subsaturação de cálcio e fosfato na fase do fluido adjacente, ocorre a desmineralização do dente. O pH próximo da neutralidade encontrado em placas com ausência de sacarose significa um período de repouso. Se os ataques ácidos forem frequentes ou tiverem duração longa em relação aos períodos de pH neutro, o resultado final será uma lesão cáriosa (JOHANSSON e BIRKHED, 1995).

Os eventos que ocorrem na interface esmalte-placa são fortemente influenciados por uma multiplicidade de fatores como: acúmulo bacteriano (quantidade e qualidade); condições salivares (capacidade tampão, fluxo e composição); acesso a fluoretos e, principalmente, pela dieta (composição, frequência e consistência). A doença cárie também é influenciada por classe social, renda, grau de instrução, comportamentos e atitudes (MANJI e FEJERSKOV, 1995).

2.1.2 Microbiologia da cárie dentária

A relação entre bactéria e cárie é discutida há muito tempo. Em 1683, van Leeuwenhoek, um cientista holandês, enviou uma carta à Sociedade Científica Britânica descrevendo a presença de “animalículos” em acúmulos encontrados sobre os dentes (CARLSSON, 1985).

No começo do século, algumas observações científicas indicaram a necessidade da presença de bactérias para o desenvolvimento da doença cárie. Estas observações eram: (1) dentes extraídos em presença de saliva e carboidratos desenvolvem lesões semelhantes à cárie; (2) o dente apresenta lesão de cárie somente quando em contato com a saliva e microflora - dente incluso jamais apresenta cárie; (3) a lesão de cárie se localiza sob acúmulo de bactérias e (4) a placa dentária *in vivo*, em presença de carboidrato, produz ácido, o que causa diminuição do pH da placa dentária (MALTZ, 1996).

Somente no final da década de 40 foi que o papel dos microrganismos no processo de cárie ficou estabelecido. MCCLURE e HEWITT (1946) observaram inibição de cárie em ratos que receberam penicilina, apesar de estarem sob dieta cariogênica. O papel decisivo das bactérias no processo de cárie foi demonstrado por ORLAND et al (1954) em um trabalho com animais “livres de germes”. Esses animais não desenvolveram cárie mesmo recebendo uma dieta cariogênica.

KEYES (1960) provou ser a cárie uma doença infecciosa e transmissível, em animais, estudando colônias de hamsters com diferentes experiências de cárie (hamsters albinos livres de cárie e hamsters cárie-ativos). Em uma série de experiências, nas quais os animais receberam uma dieta rica em sacarose, observou que:

a) hamsters albinos e hamsters cárie-ativos quando não misturados desenvolveram atividade de cárie diferente;

b) quando hamsters albinos e cárie-ativos eram colocados na mesma gaiola todos desenvolviam lesões de cárie;

c) inoculação das fezes de hamsters cárie-ativos em hamsters albinos ocasionou transmissão da doença;

d) hamsters cárie-ativos que receberam penicilina durante o período de amamentação, suprimindo desta maneira sua flora cariogênica, não desenvolveram cárie, a não ser que fossem colocados em contato com fezes ou placa de animais contaminados.

Assim como não são todas as bactérias da cavidade bucal que colonizam o dente, da mesma maneira não são todos os microrganismos da placa dentária que causam a lesão de cárie. Algumas bactérias desempenham papel mais importante no processo cariioso.

As pesquisas efetuadas entre 1890 e 1990 demonstraram que o processo cariioso é complexo e requer, além do consumo freqüente de açúcar refinado, o acúmulo de um grupo relativamente pequeno de bactérias acidogênicas na microbiota da placa, que interage com os vários fatores modificadores do hospedeiro. Os estreptococos do

grupo mutans são reconhecidos como membros importantes deste grupo bacteriano há mais de 30 anos. Um estudo efetuado recentemente implicou outros estreptococos, bem como lactobacilos e actinomicetos, em várias formas da doença (CARLSSON e HAMILTON, 1995).

Talvez o achado mais importante das pesquisas recentes tenha sido o reconhecimento de que a placa dentária consiste de inúmeros ecossistemas microbianos pequenos, cada um composto por uma microbiota exclusiva, controlada pelas leis da ecologia. Uma mudança importante no ambiente de qualquer local específico pode conduzir ao desenvolvimento de um “grupo patogênico”, cujo metabolismo acidogênico vai dominar o ecossistema, levando ao início das lesões de cárie (CARLSSON e HAMILTON, 1995).

2.1.2.1 Lactobacilos

Os lactobacilos foram uns dos primeiros microrganismos associados com a cárie dentária por estarem presentes na saliva e em lesões cariosas e por serem acidogênicos e acidúricos. Estudos em animais demonstraram que alguns lactobacilos são cariogênicos, mas a maioria não coloniza superfícies lisas necessitando de sítios retentivos para a colonização (KRASSE, 1988; BRATTHALL e ERICSSON, 1995).

Os lactobacilos são bastonetes gram positivos, anaeróbicos e sacarolíticos, que se mostram extremamente resistentes aos ácidos (acidúricos) (LOESCHE, 1993).

Os lactobacilos estão entre os primeiros colonizadores da mucosa oral e especialmente da língua. Eles são conhecidos por aumentarem em número na flora salivar, quando os indivíduos comem carboidratos em alta frequência (não necessariamente sacarose). Nessas circunstâncias, eles podem estar associados com o desenvolvimento da cárie dentária (CROSSNER, 1981; TANZER, 1992).

Os níveis de lactobacilos na placa bacteriana são geralmente muito baixos tanto nas placas sobre a superfície hígida como sobre lesões de “mancha branca”. A proporção de lactobacilos na placa bacteriana de superfície intacta é de menos de

0,01% da microflora cultivável (IKEDA et al, 1973). MACPHERSON et al (1990) realizaram um estudo onde os indivíduos utilizavam aparelhos de acrílico com blocos de esmalte dentário intra-oralmente e aplicavam sacarose sobre estes blocos extra-oralmente, para avaliar a microflora da placa bacteriana. Eles observaram que os lactobacilos encontravam-se em mais altas proporções nos sítios de esmalte em que ocorreram perdas minerais extensas. Os lactobacilos são encontrados em grandes quantidades em cavidades de cárie dentinária. Em relação à cárie de superfície lisa de esmalte, esse microrganismo parece não desempenhar papel importante como agente etiológico de início da lesão de cárie. Os lactobacilos parecem ser invasores secundários em algumas lesões de cárie, devendo contribuir para a progressão dessas graças às suas características acidogênicas (EDWARDSSON, 1974).

Os lactobacilos mais freqüentemente isolados na cavidade bucal são *Lactobacilos casei*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. fermentum* e *L. salivarius*. Desses microrganismos, o *L. casei* é o mais numeroso, podendo ser caracterizado pela capacidade de fermentar manitol e sorbitol. Em modelos animais, *L. casei* é capaz de causar cárie de fissura. A maioria dos lactobacilos orais são homofermentativos, mas alguns são heterofermentativos. Os últimos, por definição, convertem cerca de 50% das hexoses que eles fermentam em ácido láctico e, além disso, produzem outros ácidos, etanol e dióxido de carbono (LOESCHE, 1993).

Inúmeros estudos tentaram esclarecer a prevalência de lactobacilos em várias populações (KLOCK e KRASSE, 1977; ZICKERT et al, 1982b). Esses dois estudos suecos, um comparando 646 indivíduos, com 9 a 12 anos de idade, e outro de 101 indivíduos, entre 13 a 14 anos de idade, observaram que cerca de 50% dos indivíduos desses grupos apresentavam níveis baixos de lactobacilos e 10 a 20% apresentavam níveis altos desse microrganismo (BRATTHALL e ERICSSON, 1995).

As contagens de lactobacilos foram utilizadas em alguns estudos para prever o incremento de novas lesões de cárie. CROSSNER (1981) realizou um estudo com um grupo de crianças de 14 anos que tinha recebido tratamento odontológico no início da pesquisa e não possuía lesão aberta de cárie no momento da coleta de amostra bacteriana da saliva. Exames clínicos foram realizados no início do estudo e após um

período de 33 e 64 semanas. Os resultados mostraram que no grupo de indivíduos com alta contagem de lactobacilos muitos apresentaram novas lesões de cárie.

2.1.2.2 Estreptococos do grupo mutans

Outro grupo de microrganismos associado com a doença cárie é o dos estreptococos do grupo mutans. A bactéria responsável pela transmissão de cárie em hamsters observada por FITZGERALD e KEYES (1960) foi identificada como sendo estreptococos. Estreptococos similares aos encontrados nos hamsters foram isolados em humanos. Esses microrganismos, quando inoculados em animais, causavam cárie. Como as bactérias identificadas por Fitzgerald e Keyes eram idênticas aos estreptococos mutans descrito por Clark em 1924, esses estreptococos cariogênicos foram denominados de estreptococos mutans (CARLSSON, 1967).

Os estreptococos mutans exibem um alto grau de heterogenicidade quando examinados bioquimicamente, sorologicamente e geneticamente (BRATTHALL, 1970; COYKENDALL, 1974; SHKLAIR e KEENE, 1974). Com base nesses estudos, eles são atualmente chamados estreptococos do grupo mutans e foram divididos em sete espécies: *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. cricetus*, *S. rathus*, *S. macacae*, *S. ferus* e *S. downei* (COYKENDALL e LISOTTE, 1978). Os últimos três não são de origem humana, só foram encontrados na natureza colonizando humanos e alguns animais (LINDQUIST, 1991).

As seguintes características dos estreptococos do grupo mutans determinam seu potencial cariogênico (KRASSE, 1988):

a) colonizam os dentes e superfícies que não descamam, portanto só colonizam a cavidade bucal após a erupção dos dentes e em pacientes desdentados desde que portadores de prótese;

b) produzem polissacarídeos extracelulares a partir da sacarose (formação de placa espessa, podendo também servir de reservatório energético);

c) são altamente acidogênicos e acidúricos;

d) produzem polissacarídeo intracelular (reservatório de energia) a partir de carboidratos;

e) metabolizam várias das glicoproteínas salivares adsorvidas ao esmalte.

O consumo de sacarose favorece o estabelecimento desses microrganismos na cavidade bucal. Em estudos de pequena duração, observa-se que o número de estreptococos do grupo mutans aumenta quando os indivíduos aumentam a frequência do consumo de sacarose (VAN HOUTE e DUCHIN, 1975; KARJALAINEN et al, 1993), mas eles também podem colonizar os dentes na ausência de sacarose e em pacientes com intolerância hereditária à frutose (VAN HOUTE et al, 1976; HOOVER et al, 1980).

Outros fatores, além da sacarose, que podem influenciar a infecção e o estabelecimento dos estreptococos do grupo mutans na dentição humana são: os componentes das secreções bucais, incluindo imunoglobulinas e outros fatores de defesa, variação nas propriedades de superfície dos microrganismos ou uma maior ou menor quantidade da flora indígena antagonista (LINDQUIST, 1991).

Os estreptococos do grupo mutans apresentam um modo localizado de colonização na dentição, o que significa que algumas superfícies dos dentes podem ter esses microrganismos e outras não (LINDQUIST et al, 1990; BRATTHALL e ERICSSON, 1995).

Os sítios dentários retentivos favorecem a colonização por esse microrganismo. Após a erupção dos dentes, eles rapidamente colonizam as fissuras oclusais. A colonização das superfícies interproximais ocorre simetricamente, e é observado um número mais alto de sítios infectados na região de molares do que na anterior (KRISTOFFERSON et al, 1984; LINDQUIST, 1991).

Uma relação positiva entre o número de estreptococos do grupo mutans na placa e na saliva tem sido apontada em diferentes estudos. A quantidade de estreptococos do grupo mutans na saliva está relacionada ao número de superfícies

colonizadas. Esse fato é a base para os testes de saliva referente à presença de estreptococos do grupo mutans. Uma alta contagem na saliva ($\geq 10^6$ Unidades Formadoras de Colônia por ml de saliva) indica que a maioria das superfícies está colonizada por essas bactérias e, portanto, sujeitas a um aumentado risco de cárie (KÖHLER et al, 1981; LINDQUIST et al, 1989; BRATTHALL e ERICSSON, 1995).

A correlação entre estreptococos do grupo mutans e cárie dentária vem sendo extensivamente estudada (VAN HOUTE, 1980; ZERO et al, 1986; MACPHERSON et al, 1990). Em estudos com animais que receberam uma dieta rica em sacarose, os estreptococos do grupo mutans têm-se mostrado altamente cariogênicos, causando lesões de cárie em superfícies lisas, superfícies radiculares e fissuras.

Vários estudos demonstram que o risco à cárie em uma superfície aumenta se essa estiver colonizada por estreptococos do grupo mutans. IKEDA et al (1973) fizeram mapas topográficos das dentições de crianças com respeito aos sítios colonizados por estreptococos do grupo mutans. Sítios positivos, muitas vezes, exibiam lesões de cárie e sítios que eram negativos se tornavam ocasionalmente positivos, isto ocorria geralmente antes do desenvolvimento de lesões de cárie inicial (mancha branca) naqueles sítios.

Amostras de placa coletadas de manchas brancas no esmalte foram avaliadas em relação à presença de lactobacilos e aos estreptococos do grupo mutans. Lactobacilos estavam presentes em baixas percentagens, enquanto no centro das lesões a percentagem de estreptococos do grupo mutans era extremamente alta, diminuindo somente na periferia da lesão (DUCHIN e VAN HOUTE, 1978).

Investigação da composição da microflora da placa associada com desmineralização inicial do esmalte em um modelo intra-oral realizada por MACPHERSON et al (1990) mostrou que ocorria um aumento progressivo do isolamento de estreptococos do grupo mutans à medida que aumentava a perda mineral do esmalte. Esse grupo de microrganismos desempenha papel importante na etiologia da cárie também em humanos. Segundo BRATTHALL e ERICSSON (1995), vários

estudos mostraram que indivíduos com alto índice de colonização por estreptococos do grupo mutans ($\geq 10^6$ UFC/ml de saliva) apresentam muito mais lesões cariosas que os indivíduos sem nenhum ou com baixos níveis ($\leq 10^5$ UFC/ml de saliva) desses estreptococos.

Estudos longitudinais em humanos têm mostrado correlação positiva entre a presença e progressão de lesões de cárie e a prevalência de estreptococos do grupo mutans na saliva e na placa (IKEDA et al, 1973; KLOCK e KRASSE, 1977; LINDQUIST, 1989).

MALTZ et al (1989) observaram esta relação em crianças brasileiras. ZICKERT et al (1982a) encontraram uma forte relação entre crianças com alto número de estreptococos do grupo mutans na saliva e o incremento de novas lesões de cárie. As crianças com alto número de estreptococos mutans desenvolveram aproximadamente três vezes mais novas lesões de cárie, em três anos, em comparação com o grupo controle que tinha menos estreptococos do grupo mutans. Essa correlação também foi encontrada por ALALUUSUA et al (1990).

O fato de vários estudos demonstrarem associação entre estreptococos do grupo mutans e cárie não significa que seja o único microrganismo cariogênico e nem que é sempre cariogênico (WILLCOX et al, 1990). Cárie coronária pode ocorrer na ausência de significantes proporções desse microrganismo (MACPHERSON et al, 1990; SANSONE et al, 1993; VAN HOUTE, 1994).

Observações recentes mostram que altos níveis salivares de estreptococos do grupo mutans também podem ser encontrados em populações com baixa prevalência de cárie (CARLSSON et al, 1985; CARLSSON et al, 1987). BRATTHALL et al (1986) estudando 171 crianças, de 11 a 13 anos, residentes na Tailândia, observaram que as crianças residentes na zona rural apresentavam baixa experiência de cárie (CPO-D=0,38), apesar de 82% das crianças serem infectadas com estreptococos do grupo mutans e algumas apresentarem alto nível desta bactéria. Esse estudo demonstra que o nível de estreptococos do grupo mutans não implica automaticamente um certo nível de cárie dentária, visto que a cárie é uma doença multifatorial.

Entretanto, em Bangkok, zona urbana, a atividade cariogênica é maior (CPO-D=3,46), e as crianças que apresentavam níveis elevados de estreptococos do grupo mutans eram as que tinham maior prevalência de cárie.

BRATTHALL e ERICSSON (1995), analisando os trabalhos que estudam a relação entre os estreptococos do grupo mutans com os níveis de cárie nas populações, concluíram que:

- a) a maioria dos indivíduos com alta incidência de cárie, possui altos níveis de estreptococos do grupo mutans;
- b) poucos indivíduos com baixos níveis de estreptococos do grupo mutans apresentam alta incidência de cárie;
- c) os indivíduos livres de cárie podem ser colonizados por diferentes níveis de estreptococos do grupo mutans.

Devido à relação dessa bactéria com a doença cárie, vários métodos que influenciam a colonização dos estreptococos do grupo mutans, reduzem ou eliminam esse microrganismo têm sido testados no homem. Esses métodos incluem: o controle mecânico da placa, cujo efeito é limitado; o uso de substâncias quimioterápicas, como a clorexidina, que suprimem a população de estreptococos do grupo mutans na placa e na saliva; a restrição no consumo de açúcares que resulta em diminuição do número de estreptococos do grupo mutans na placa, mas não elimina totalmente o microrganismo e o uso de substitutos do açúcar que interferem na colonização e metabolismo das bactérias cariogênicas (MALTZ et al, 1981, ZICKERT et al, 1982a; LINDQUIST, 1991; MALTZ et al, 1992).

O pH baixo gerado pelo metabolismo bacteriano dos carboidratos é um dos responsáveis pela instalação na placa bacteriana de uma comunidade microbiana acidúrica e acidogênica. O uso de substitutos do açúcar é uma abordagem já aceita para a prevenção de cárie, que também pode influenciar a ecologia da placa. A maioria das pesquisas nessa área estudou o efeito do sorbitol e xilitol. Esses substitutos do açúcar podem exercer um efeito importante na ecologia da placa bacteriana, pela redução na

freqüência de diminuições do pH da placa entre as refeições, criando, assim, uma saída para alterar o ambiente ácido da placa bacteriana que favorece as bactérias cariogênicas (ZERO, 1995).

Portanto, é importante estudar também a interferência de adoçantes comerciais, utilizados na dieta de humanos, na colonização de bactérias cariogênicas (estreptococos do grupo mutans e lactobacilos), na placa bacteriana *in vivo*.

2.1.3 Carboidratos e cárie

Os fatores fundamentais que conduzem ao início e progresso das lesões cariosas foram, primeiramente, elucidados por Miller (1890), quando ele reconheceu que o metabolismo dos carboidratos, através das bactérias orais com a geração de produtos finais ácidos, se constituía no evento central do processo de desmineralização do dente (LOESCHE, 1985; CARLSSON e HAMILTON, 1995).

Historicamente, a prevalência da doença cárie e de outras doenças é influenciada pelo desenvolvimento da sociedade. Durante o século passado, a mudança no estilo de vida e nos hábitos tradicionais da população levou ao explosivo aumento da incidência de cárie, doenças cardiovasculares, obesidade e diabetes. Os alimentos naturais foram substituídos por produtos processados, e os nutrientes fornecedores de energia obtidos a partir de generosas ingestões de carboidratos complexos foram trocados por um consumo mais pesado de proteínas, ácidos graxos saturados e carboidratos refinados (JOHANSSON e BIRKHED, 1995).

Na Idade Média, um tempo em que os adoçantes eram uma luxúria e a sacarose era utilizada em pequenas quantidades como ocorre na natureza, a cárie em humanos era predominantemente de raiz, com algumas cáries de fissura. Cárie em superfície lisa livre e interproximal era rara em humanos. Evidências como essas suportam a associação entre baixa ingestão de sacarose e baixa experiência de cárie (BURT, 1993).

A importância da sacarose como um determinante cariogênico é observada em estudos epidemiológicos, os quais mostraram que populações isoladas, nas quais foram introduzidos alimentos processados com sacarose em sua dieta, exibiram um notável aumento na prevalência e incidência de cárie. Por exemplo, entre os esquimós e em algumas culturas insulares relativamente isoladas, como a taitiana, a incidência de cárie disparou dramaticamente quando os habitantes tiveram o primeiro contato com a sacarose refinada. Situação inversa foi encontrada na II Guerra Mundial, quando a restrição do consumo de sacarose levou a uma profunda queda na prevalência de cárie entre as populações européia e japonesa (LOESCHE, 1985, 1993).

Um grande número de estudos mostra que a dieta exerce um papel importante no desenvolvimento da doença cárie. Observações laboratoriais (*in vitro*), experimentos em animais, bem como observações de pacientes mostraram uma relação positiva entre o consumo de carboidratos fermentáveis e o desenvolvimento de lesões cariosas.

Experimentos em animais esclareceram muitos aspectos da cariogenicidade da sacarose relativos a outros componentes da dieta e levaram ao conceito de que cárie dentária é uma infecção bacteriana dependente da sacarose, envolvendo os estreptococos do grupo mutans (KEYES, 1968; VAN HOUTE, 1980).

O estudo sueco de Vipeholm demonstrou ligações na cadeia de evidências que provam a correlação entre o consumo de sacarose e cárie dentária. Doentes mentais institucionalizados foram submetidos a diferentes tipos e freqüências de ingestão de sacarose. Uma das conclusões deste estudo é que a ingestão freqüente de açúcar entre as refeições, principalmente na forma pegajosa, está associada com a alta atividade de cárie (GUSTAFSSON et al, 1954).

Soluções de sacarose em diferentes concentrações e freqüências diárias foram testadas por TEHRANI et al (1983) em um modelo intra-oral. Eles observaram que seis aplicações diárias com solução de sacarose a 1% provocavam desmineralização dos blocos de esmalte em todos indivíduos que participaram do estudo, enquanto com nove aplicações diárias com solução de sacarose a 0,5%, a desmineralização dos blocos

de esmalte não ocorreu em todos os sujeitos, mostrando, dessa maneira, que a concentração também é importante.

O consumo de açúcares e doces tem permanecido constante em vários países altamente industrializados durante as duas últimas décadas, enquanto a prevalência de cárie tem diminuído (MARTHALER, 1990; JOHANSSON, 1993; BURT, 1993).

Vários pesquisadores têm atribuído o declínio na prevalência de cárie principalmente ao uso de fluoretos nas várias formas, mais freqüentemente em dentifrícios. Os cremes dentais fluoretados ocupam cerca de 80 a 95% do mercado de dentifrícios (MARTHALER, 1990; KÖNIG, 1993; HOLM, 1990; BURT, 1993 e DOWNER, 1995). Certamente, a disseminação do uso de fluoretos está associada ao declínio, mas esse é apenas um dos muitos fatores que podem explicar a mudança do quadro epidemiológico de cárie (MANJI e FEJERSKOV, 1995).

Até a metade da década de 80, crianças islandesas estavam entre as mais afetadas pela cárie dentária no mundo. Dados obtidos dessa população entre 1984-91 mostraram uma acentuada diminuição na experiência de cárie. Não houve nenhuma diminuição na importação do açúcar durante esse período, e esses resultados são atribuídos à combinação de métodos preventivos ensinados nas escolas e à ampla educação pública dirigida à população (MANJI e FEJERSKOV, 1995).

A correlação da diminuição da prevalência de cárie com o aumento do uso de fluoretos; a diminuição da freqüência de ingestão de açúcares; hábitos de higiene bucal e controle de placa foram discutidos por KÖNIG (1990). Ele analisa a percentagem de escolares livres de cárie em Basel, Suíça, antes, durante e após a II Guerra. Antes e durante essa guerra, com um consumo de açúcar não limitado e nenhum acesso a fluoretos, a percentagem de crianças livres de cárie aos sete anos não excedia 2 a 3%. Em 1944/45, a Guerra restringiu o suplemento de açúcar de 48kg para 16kg/pessoa/ano. Ocorreu, então, um aumento no número de crianças livres de cárie para cerca de 15%. Após a guerra, o açúcar voltou a ser liberado. No entanto, o acesso à

água fluoretada, em 1962, na Suíça, fez com que mais de 50% das crianças de sete anos permanecessem livres de cárie.

Medidas de higiene bucal são difíceis de serem avaliadas epidemiologicamente, e a relação entre diminuição do volume de placa bacteriana e desafios cariogênicos é um assunto controverso. No entanto o aumento da quantidade de dentifrícios e escovas vendidos está automaticamente associado com escovações mais freqüentes por indivíduo. O importante disso é o contato mais freqüente dos dentes com os fluoretos contidos nos dentifrícios (MARTHALER, 1990; KÖNIG, 1990).

A conclusão dessas observações é que a administração de fluoretos parece ser mais efetiva na redução de cáries que a diminuição nos suplementos de açúcar e a higiene bucal (KÖNIG, 1990; MARTHALER, 1990). Entretanto somente o uso de fluoretos não é suficiente para o controle da doença cárie.

O largo uso de doces e gomas de mascar com substitutos de açúcar em vários países é uma realidade. Isso pode ser observado na Holanda, onde, concomitantemente com a diminuição na prevalência de cárie, houve uma diminuição na freqüência de alimentos contendo açúcar entre refeições. Além disso, as gomas de mascar sem açúcar têm ganhado 50% do mercado das gomas de mascar (KÖNIG, 1990).

Na Finlândia, o xilitol parece ser um fator da dieta que contribuiu para o declínio de cárie. Desde 1982, mais da metade das gomas de mascar tem sido adoçadas com xilitol ou outros álcoois-açúcares. Outros 30 produtos doces são adoçados com xilitol (MARTHALER, 1990). O xilitol tem múltiplos efeitos sobre a placa bacteriana (SÖDERLING et al, 1989).

Na Suíça, o uso de adoçantes não-acidogênicos é regulamentado. O mercado é de mais de 50% de gomas de mascar com substitutos de açúcar, sendo que o mercado de produtos “seguros para os dentes” alcançou 10% em 1984 e continua aumentando (MARTHALER, 1990; BURT, 1993).

Desde que o declínio de cárie se tornou reconhecido, alguns trabalhos têm reportado pouca correlação entre experiência de cárie e várias medidas de ingestão de açúcar. Dois estudos longitudinais conduzidos em Newcastle, Inglaterra (RUGG-GUNN et al, 1984), e em Michigan, USA (BURT et al, 1988), empregando medidas precisas de ingestão dietética e análise estatística detalhada encontraram uma frágil correlação entre experiência de cárie e consumo de açúcar (MANJI e FEJERSKOV, 1995).

Desde os anos 70, concomitantemente com a diminuição na prevalência de cárie, ocorreu um grande declínio nos Estados Unidos quanto à proporção de adoçantes calóricos constituídos por sacarose. Em compensação, houve um aumento proporcional na quantidade de adoçantes de xarope de milho rico em frutose (BURT, 1993; TANZER, 1995).

Os estudos de Newcastle e Michigan mostram que as crianças inglesas consumiam mais sacarose (83% de sacarose do total de consumo de açúcar em 1984, que foi de 45,9kg/pessoa) do que as americanas (47% de sacarose de 61kg de açúcar por pessoa em 1986) e apresentavam mais lesões cáries interproximais e de superfície lisa livre (HOLM, 1990; BURT, 1993; MANJI e FEJERSKOV, 1995).

O declínio na prevalência de cárie não é observado somente como uma redução de novas lesões de cárie, mas há também na maioria dos países uma diminuição na velocidade de progressão das lesões de cárie. Esse fato, juntamente com as mudanças no tratamento de lesões cáries iniciais voltadas para uma estratégia orientada para prevenção, tem resultado em uma considerável diminuição no número de superfícies com necessidade de restauração (HOLM, 1990).

Enquanto a cárie está declinando em alguns países, observa-se um aumento em outros. A diminuição geralmente ocorre em países desenvolvidos (mas, em vários deles, a prevalência ainda é alta), enquanto a cárie está aumentando em países em desenvolvimento. Em alguns desses, ocorreu aumento na prevalência de cárie, em outros, há pouco ou nenhum aumento. Essa variação parece estar associada ao acesso que as pessoas têm ao açúcar refinado, possivelmente devido a mudanças na produção, distribuição e consumo de sacarose (HOLM, 1990; TANZER, 1995).

A diminuição na prevalência de cárie implicou mudanças na distribuição da doença, fazendo com que uma pequena fração da população detenha os índices mais elevados de experiência de cárie. Os indivíduos com escores mais altos de lesões de cárie-ativas são definidos como indivíduos com alta atividade de cárie, pois possuem características que os tornam mais afetados pela doença (HOLM, 1990; JOHANSSON, 1993).

Muitos autores têm tentado quantificar esse grupo, e percentagens de 10 a 20% têm sido mencionadas como a proporção de indivíduos caracterizados como de alta atividade de cárie nos vários grupos etários (KRASSE, 1988; HOLM, 1990; JOHANSSON, 1993). Em geral, esses indivíduos possuem hábitos dietéticos inadequados, freqüente exposição dos dentes a carboidratos refinados em combinação com má higiene bucal e baixa exposição a fluoretos. A presença de xerostomia e a baixa capacidade tampão da saliva são condições associadas com a alta atividade de cárie (HOLM, 1990).

Muitas evidências indicam que um alto e freqüente consumo de açúcar por indivíduos suscetíveis à cárie resultará no desenvolvimento de cárie dentária. Provavelmente, a dieta dos grupos com alta atividade de cárie é muito similar, quer seja em países desenvolvidos, quer nos em desenvolvimento (HOLM, 1990).

As evidências científicas sugerem que o uso disseminado de fluoretos aliado a outras medidas preventivas diminuíram o efeito da sacarose como fator de risco para a ocorrência da doença. No entanto, para o grupo de indivíduos com alta atividade cariogênica, o consumo de açúcar continua sendo de grande importância (NEWBRUN, 1988; HOLM, 1990).

Tendo em vista a importância do controle do uso da sacarose em pacientes com alta atividade cariogênica, é interessante estudar a cariogenicidade de produtos comerciais que contenham adoçantes não metabolizados pelas bactérias da placa dentária, ou cujos produtos metabólicos não sejam tão cariogênicos como os da sacarose.

2.1.4 Metabolismo bacteriano dos carboidratos

Quando os açúcares funcionam como fonte de energia e de carbono, passam a contribuir de duas formas, pelo menos, para a patogênese das lesões cariosas. Os polissacarídeos são produzidos de maneira a formar um estroma intermicrobiano, ligando os microrganismos entre si e aos dentes, e os produtos finais metabólicos são excretados provocando queda no pH da placa bacteriana (CARLSSON e HAMILTON, 1995).

As bactérias da cavidade bucal residem em um ambiente de “fartura” ou de “escassez”. A saliva é a fonte básica de nutrição para as bactérias; todavia a concentração de nutrientes nas secreções salivares é muito baixa. Visto que a saliva possui baixo nível de carboidratos, a exposição prolongada à saliva resulta no desenvolvimento de placa bacteriana esparsa, com pouca capacidade de metabolizar açúcares. Esse tipo de placa é encontrado em pacientes sujeitos à alimentação por intubação durante período prolongado (CARLSSON e HAMILTON, 1995).

O consumo de alimento resulta no aparecimento repentino de nutrientes para as bactérias da placa. Exposição das bactérias orais a altos níveis de açúcar dos alimentos pode provocar a morte da célula. O açúcar entrará rapidamente nas células bacterianas e resultará em “morte acelerada por substrato”. Os microrganismos, vivendo em um ambiente com flutuações de nutrientes, desenvolvem mecanismos adaptativos para sobreviver. Situações interessantes são criadas em *habitats* como a superfície do dente, onde os microrganismos estão sujeitos a ciclos contínuos de fartura e inanição. Os microrganismos estarão em contínua competição, não apenas por fonte de energia e carbono, mas também por nitrogênio, enxofre e fósforo, bem como por aminoácidos específicos, vitaminas, pirimidinas ou purinas (ZERO, 1995).

Importante para a etiologia das lesões de cárie é a competição por açúcar efetuada pela bactéria oral sacarolítica. Quando a concentração de açúcar dentro da cavidade bucal é mantida em um nível alto, ocorre alteração na composição e atividade metabólica da microbiota da placa (VAN HOUTE, 1994; ZERO, 1995).

O metabolismo do açúcar através das bactérias orais resulta na geração de produtos finais ácidos, criando um ambiente ácido na placa. Algumas bactérias orais são acidúricas e crescerão em níveis de pH significativamente mais baixos. Esses microrganismos são favorecidos pela acidez do ambiente e então dominarão a microbiota (KRASSE, 1988; SANSONE et al, 1993; ZERO, 1995).

O açúcar é a principal fonte de energia da microbiota na placa bacteriana. As vias de energia são essenciais para o crescimento celular e para outros processos que mantêm a integridade celular e a homeostase; conseqüentemente, as enzimas dessas vias estão sempre presentes na célula bacteriana, ou são constitutivas. Por exemplo, grande parte das bactérias orais sacarolíticas degradam glicose através da via glicolítica de Embden-Meyerhof, composta de enzimas constitutivas. Todavia muitos microrganismos são capazes de utilizar diversos outros açúcares e álcoois de açúcar pela indução de enzimas específicas, sintetizadas apenas na presença do açúcar específico ou do álcool de açúcar. Essa característica pode conceder a um microrganismo a vantagem seletiva na competição com outras bactérias (ZERO, 1995; CARLSSON e HAMILTON, 1995).

Os açúcares da dieta como sacarose, maltose, lactose e frutose e os álcoois de açúcar como sorbitol e o manitol requerem a síntese de enzimas “indutíveis” para que esses substratos sejam fonte de energia para as bactérias orais. Isso requer a indução de pelo menos duas enzimas específicas, uma para transportar o açúcar para dentro da célula e uma ou mais para converter o açúcar em metabólito que possa ser degradado pela via glicolítica constitutiva do microrganismo. O transporte de açúcares do ambiente externo para o citoplasma bacteriano requer proteínas “carreadoras” específicas para facilitar o processo de captação (difusão facilitada). Quando grandes quantidades de açúcar estão presentes, o transporte é facilitado e não requer gasto de energia (CARLSSON e HAMILTON, 1995).

Entretanto nutrientes essenciais como os açúcares são necessários dentro da célula em concentrações mais elevadas que fora da célula e esse transporte contra um gradiente de concentração requer energia (transporte ativo). O principal mecanismo de transporte ativo em bactérias acidogênicas, como estreptococos, lactobacilos e

actinomicetes, envolve o fosfoenolpiruvato (PEP) e o sistema de fosfotransferase do açúcar (PTS). Esse sistema utiliza o PEP como fonte de energia e resulta no transporte e fosforilação do açúcar na superfície interna da célula (CARLSSON e HAMILTON, 1995).

O sistema PTS possui muita influência no metabolismo global da célula, uma vez que a molécula de açúcar é fosforilada durante o transporte, e o produto da reação geralmente é um intermediário da via glicolítica, ou pode ser convertido para um componente daquela via. No caso da sacarose-fosfato, ela é rapidamente hidrolisada pela célula, formando glicose que entra na via glicolítica e frutose que é fosforilada intracelularmente ou se difunde para fora da célula (CARLSSON e HAMILTON, 1995).

Pesquisa recente efetuada com estreptococos do grupo mutans indicou que a glicose também é transportada por permease e fosforilada por um processo dependente de ATP (Adenosina Trifosfato). Esse mecanismo funciona com altas concentrações de glicose, baixos níveis de pH e altos níveis de crescimento (CARLSSON e HAMILTON, 1995).

2.1.4.1 Formação de ácidos

O destino metabólico dos produtos finais produzidos pela célula bacteriana depende das condições ambientais onde elas se encontram. Os microrganismos possuem vários sistemas para a conversão de piruvato, que podem variar de acordo com o tipo de microrganismo e com a quantidade e tipo de açúcar disponível, bem como com a presença de oxigênio e dióxido de carbono. A via metabólica dos açúcares em altos níveis, pelas bactérias da placa, é a da lactato desidrogenase com formação de ácido láctico. Essa via é utilizada pelos estreptococos em condições aeróbicas e anaeróbicas, mas somente quando os açúcares estão presentes em excesso (CARLSSON e HAMILTON, 1995).

A via piruvato formiato-liase é utilizada pelos estreptococos, lactobacilos e actinomicetos em baixos níveis de açúcar e sob condições anaeróbicas, gerando os

ácidos fórmico, acético e etanol como produtos finais. Os actinomicetos também geram ácido succínico. Sob condições aeróbicas, os estreptococos do grupo mutans usam piruvato desidrogenase para converter o piruvato em ácido acético e etanol, ao passo que outros estreptococos usam a piruvato oxidase originando a formação de ácido acético e peróxido de hidrogênio.

A presença de vários produtos finais ácidos na placa, em consequência do metabolismo do açúcar, varia de indivíduo para indivíduo e entre várias regiões da boca. Pela manhã, antes da primeira refeição, os ácidos fórmico, acético, láctico, propiônico e butírico, geralmente, podem ser detectados na placa dentária, sendo o principal ácido o ácido fórmico. A exposição da placa a açúcares resulta em mudanças dramáticas nas proporções e quantidades desses vários ácidos com um rápido aumento na concentração de ácido láctico (CARLSSON e HAMILTON, 1995).

A acidez do ambiente do dente é influenciada não apenas pelo número e espécies de bactérias presentes, mas também pela capacidade-tampão da saliva e do fluido da placa, pelo fluxo e viscosidade da saliva, pelas características de difusão da placa, pela presença de fluoreto no esmalte e na placa, pelo tipo de dieta alimentar e pela frequência de ingestão de açúcar (CARLSSON e HAMILTON, 1995).

A dieta alimentar pode influenciar de três formas a composição da microbiota da placa e suas atividades metabólicas: através da composição química do alimento, de sua consistência física e da frequência de ingestão (JOHANSSON e BIRKHED, 1995).

Componentes com alto peso molecular, como grãos, vegetais e proteínas podem não ser degradados ou degradados tão lentamente durante a sua permanência na boca, que não fornecem componentes com baixo peso molecular para uso das bactérias orais (LOESCHE, 1993).

Carboidratos de baixo peso molecular como a sacarose, glicose, frutose e lactose na dieta alimentar facilmente se difundem na placa e são imediatamente metabolizados pelas bactérias orais. Uma série de adoçantes não são metabolizados ou são metabolizados lentamente por estas bactérias (LOESCHE, 1993; ZERO, 1995).

A consistência e a frequência de ingestão de alimentos são importantes fatores que contribuem para a disponibilidade dos carboidratos (GUSTAFSSON et al, 1954; KRASSE, 1988). Em *habitats* protegidos e menos expostos, até mesmo os alimentos com alto peso molecular podem ser retidos e servir como fonte potencial de nutrientes para a placa bacteriana. Com relação a isso, são de especial interesse os carboidratos contendo amido, que podem ser degradados até maltose e várias dextrinas pela α -amilase salivar e algumas enzimas bacterianas. Esses produtos, com peso molecular mais baixo, ficam, então, disponíveis para serem degradados pelas bactérias orais (LOESCHE, 1993; BOWDEN e EDWARDSSON, 1995).

As melhores dietas alimentares para a saúde em termos de cáries são as que fornecem quantidades mínimas de carboidratos rapidamente fermentáveis, compatíveis com a nutrição geral do hospedeiro. A microbiota oral mantida em dietas desse tipo assegura que a proteção do hospedeiro contra colonização oral por patógenos exógenos, garantida pela microbiota residente, não será comprometida. Baixos níveis de carboidratos fermentáveis manterão o pH da placa relativamente alto, anulando qualquer vantagem dada às bactérias acidúricas pelo baixo pH ambiental. Da mesma maneira, o consumo de adoçantes não metabolizados por bactérias orais favorecem o estabelecimento de uma placa não cariogênica (com baixa proporção de lactobacilos e estreptococos do grupo mutans). Produtos comerciais alternativos à sacarose devem ser testados quanto a essa característica.

2.1.4.2 Polissacarídeos

As evidências na literatura que sugerem que a sacarose é mais cariogênica que outros açúcares da dieta, não estão relacionadas aos efeitos imediatos sobre o pH da placa, porque, bochechando com soluções de sacarose, glicose ou frutose, se chega a curvas de pH da placa *in vivo* similares (STEPHAN, 1940; NEFF, 1967; FRÖSTELL, 1973), bem como se chega a semelhante desmineralização do esmalte dentário, conforme foi avaliado por testes intra-orais (KOULORIDES et al, 1976; BRUDEVOLD et al, 1983).

Estudos em animais experimentais e em seres humanos indicam que o consumo freqüente de sacarose pode causar mudanças na composição bacteriana da placa humana, favorecendo microrganismos altamente cariogênicos, tais como estreptococos do grupo mutans. Isso parece resultar, principalmente, da capacidade dos estreptococos do grupo mutans sintetizar polissacarídeos extracelulares a partir da sacarose, outros açúcares da dieta não servem como substrato para síntese de PEC (VAN HOUTE, 1980, LOESCHE, 1993).

A sacarose da dieta aumenta o volume da placa dental. Grande parte do volume da placa formada na presença de sacarose é de polissacarídeos extracelulares. Os estreptococos do grupo mutans são capazes de produzir um polímero de glicose insolúvel rico em ligações α -1,3. Os polissacarídeos extracelulares, formados na parede celular da bactéria, além de serem importantes na adesão bacteriana também contribuem para as propriedades de difusão da matriz da placa. Tem sido relatado que a matriz intermicrobiana, contendo polissacarídeos, contribui para a cariogenicidade dos estreptococos do grupo mutans (ZERO et al, 1986). Uma possível explicação para isso é que a matriz influencia a difusão de açúcares na placa bacteriana e aumenta a concentração de ácido na interface esmalte-placa. As células bacterianas e outros materiais sólidos retardam a difusão, causando tortuosidades nas vias de difusão, enquanto que os polissacarídeos abrem essas vias (RÖLLA, 1989).

A primeira evidência direta da ocorrência de polissacarídeos na placa bacteriana foi fornecida por McDOUGALL apud GUGGENHEIM (1970). Extratos de amostra de placa precipitados com etanol 70% foram hidrolizados, e análises revelaram que frutose era o único componente. O autor concluiu que o polissacarídeo era um levano. Uma investigação similar foi realizada por CRITCHLEY et al (1967), que extraíram amostras de placa com água fria e, subsequentemente, com hidróxido de sódio 0,5N. A hidrólise ácida e a cromatografia de papel do extrato dialisado com água fria mostraram glicose e frutose como principais componentes, ao passo que glicose foi o principal constituinte no material hidrolisado extraído com álcali. O procedimento de extração foi repetido após incubação *in vitro* das amostras de placa em sacarose. O material solúvel em água encontrado foi uma mistura de frutano e dextrano, enquanto

que na fração solúvel em álcali foi encontrado um glicano que precipitou em etanol 45%. Análises desse material mostraram que os polissacarídeos da placa eram glicanos e frutanos. Entretanto os produtos da reação foram somente identificados qualitativamente por cromatografia de papel. O glicano foi o principal polissacarídeo encontrado na matriz da placa, enquanto que o frutano correspondeu apenas a 1 a 2% do total de peso seco (GUGGENHEIM, 1970).

A minúscula quantidade de polissacarídeos extracelulares extraíveis da placa bacteriana não é suficiente para extensivas análises químicas, além do mais, essas substâncias não são homogêneas. Para superar essas dificuldades, polissacarídeos extracelulares sintetizados *in vitro* por culturas puras de estreptococos orais têm sido estudados. Duas frações de polissacarídeos extracelulares foram isoladas a partir de estreptococos do grupo mutans, e ambos evidenciaram ser glicanos, sendo que somente uma fração foi solúvel em água (DONOHUE et al, 1966; GUGGENHEIM et al, 1968).

A partir desses dados, pode-se concluir que uma das características das bactérias da placa é a capacidade de sintetizar substâncias extracelulares. Polissacarídeos extracelulares são um dos principais constituintes da matriz da placa e são produzidos por determinadas bactérias orais a partir da sacarose. Têm sido demonstrado que os polissacarídeos isolados da placa bacteriana são glicanos e frutanos. Entretanto esses compostos não são homogêneos do ponto de vista químico ou morfológico, apresentando diferenças na solubilidade. Análises químicas, incluindo alguns trabalhos estruturais, têm sido feitas principalmente sobre frações que eram solúveis em água e sobre o material que foi extraído com soluções alcalinas fracas. A fração de polissacarídeos insolúveis somente é extraída com álcali forte (GUGGENHEIM, 1970).

Várias espécies bacterianas da placa, quando recebem sacarose, podem sintetizar vários tipos de polissacarídeos ou convertê-la em ácido. Os principais grupos de polissacarídeos que podem ser formados são (JENKINS, 1978):

- polímeros de glicose (com o nome geral de glicanos), formados pela enzima glicosiltransferase a partir da sacarose, apresentando-se como

uma massa gelatinosa extracelular sobre a superfície da bactéria. Os glicanos com a maioria das ligações na posição α -1,6 são denominados de dextrans e os com predominância de ligações α -1,3 são chamados de mutanos. Os mutanos são geralmente altamente insolúveis e rígidos e podem formar agregados fibrosos, enquanto que os dextrans formam cadeias flexíveis e quase sempre são solúveis. Os mutanos podem ser considerados como peça de resistência da matriz da placa bacteriana (GUGGENHEIM, 1970). A formação de polissacarídeos, evidentemente, aumenta o volume da placa, e análises mostram que a fração insolúvel de alto peso molecular pode ocupar acima de 10% do peso seco da placa formada na presença de sacarose (o carboidrato total é aproximadamente 15%) (KREMBEL et al, 1969);

- polímeros de frutose (frutanos), formados pela enzima frutossiltransferase a partir da sacarose. Os frutanos são polímeros extracelulares de frutose, bastante solúveis, com ligações na posição β -2,6, que são formados em uma extensão menor do que os glicanos. Quando o suprimento de sacarose é esgotado, frutanos são rapidamente metabolizados pelas bactérias da placa (NEWBRUN, 1988).

Muitas bactérias orais estocam carboidratos como polissacarídeos intracelulares tipo glicogênio. Ao contrário dos polissacarídeos extracelulares, que são formados essencialmente a partir da sacarose, os polissacarídeos intracelulares podem ser formados a partir de qualquer tipo de açúcar que possa ser convertido em glicose 1-P (incluindo glicose, lactose, maltose e sacarose) e são metabolizados quando outras fontes de carboidratos estão ausentes, como entre as refeições (LOESCHE, 1993; CARLSSON e HAMILTON, 1995).

O melhor exemplo de adesão interbacteriana mediada por polímeros bacterianos diz respeito aos estreptococos do grupo mutans. Os estreptococos do grupo mutans formam depósitos microbianos aderentes na presença de sacarose, ocasionando

a formação de uma placa bacteriana espessa em animais alimentados com uma dieta contendo esse substrato (GIBBONS e VAN HOUTE, 1973).

A quantidade de matriz intermicrobiana na placa é extremamente variável e amplamente dependente da dieta. A placa é formada mesmo em indivíduos alimentados por sonda, mas é fina e produz relativamente pouco ácido. Quando a ingestão de sacarose é alta, a placa cresce rapidamente devido à formação de uma quantidade substancial de polissacarídeos extracelulares (MANDEL, 1974).

Existe uma correlação positiva entre dieta rica em sacarose e aumento na síntese de polissacarídeos extracelulares e intracelulares na placa bacteriana (GAWRONSKI et al, 1975).

O efeito cariogênico da sacarose relacionado com a concentração de polissacarídeos na placa bacteriana foi estudado por vários pesquisadores. GEDDES et al (1978), observaram que mudanças visuais semelhantes a cáries iniciais ocorreram quando dez voluntários não escovaram seus dentes por 14 dias e bochecharam uma solução de sacarose nove vezes ao dia, enquanto que o grupo controle que não bochechou com sacarose mostrou uma mudança no esmalte significativamente menor. A concentração de polissacarídeos no grupo sacarose foi significativamente maior.

REBELO (1994), estudando o efeito da frequência do uso de sacarose (0, 2, 4 e 8 vezes ao dia) na composição química da placa em um modelo *in situ*, observou que a placa bacteriana formada na presença de sacarose apresenta maior concentração orgânica (polissacarídeo extracelular insolúvel) do que a placa formada na sua ausência. Esse efeito tornou-se mais acentuado quanto maior a frequência do uso de sacarose, sendo que, a partir da frequência diária de quatro vezes, ocorreu perda de mineral nos blocos de esmalte dentário. Essa autora, ao contrário de GEDDES et al (1978) observa uma menor concentração inorgânica na placa bacteriana (Ca, P, F), quanto maior o consumo de sacarose.

A acidogenicidade e a cariogenicidade da matriz extracelular da placa sintetizada por estreptococos orais, a partir de diferentes concentrações de sacarose, foram avaliadas por ZERO, VAN HOUTE e RUSSO (1986). O efeito acidogênico foi

medido *in vitro*, e o efeito cariogênico, *in vivo*, usando o teste de desmineralização intra-oral descrito por BRUDEVOLD et al (1983). O teste com as cepas de estreptococos (*S. mitis*, *S. salivarius*) reforçou as observações feitas com a cepa de estreptococos do grupo mutans, ou seja, que um aumento de matriz extracelular na placa bacteriana está associado a um aumento de desmineralização do esmalte dentário, apesar do efeito ser menos pronunciado com as cepas de estreptococos, as quais não são do grupo mutans.

A presença de glicano aumenta a espessura da placa bacteriana e o índice de difusão e produção de ácido na camada mais profunda da placa adjacente à superfície dentária (FU et al, 1991).

Vários adoçantes, quando comparados com a sacarose, produzem menores concentrações de polissacarídeos extracelulares na placa bacteriana, o que diminui muito a cariogenicidade dessa placa (SKINNER et al, 1982; MALTZ et al, 1992).

A substituição da sacarose por adoçantes que não baixem o pH da placa a níveis críticos ($\text{pH} \leq 5,5$), de tal modo que não promovam a desmineralização do tecido dentário, ou que não produzam polissacarídeos extracelulares, é uma das alternativas para o controle da cárie dentária. Estudos analisando a produção de polissacarídeos a partir desses adoçantes são necessários.

2.2 Substitutos do açúcar

Existe uma série de substâncias que têm sabor doce e não são metabolizadas ou são metabolizadas lentamente pelas bactérias orais. O potencial não cariogênico ou anticariogênico dessas substâncias tem sido extensivamente estudado.

Estudos epidemiológicos indicam que a sacarose é particularmente cariogênica quando consumida frequentemente entre refeições (GUSTAFSSON et al, 1954; LOESCHE, 1985). Quando a sacarose é ingerida junto às refeições, os sistemas

de tamponamento da saliva, do dente e da placa, trabalhando em harmonia com o sistema de remineralização salivar, podem combater o poder cariogênico da sacarose, mas, se a sacarose entra na cavidade bucal entre as refeições em intervalos freqüentes, o processo de desmineralização do esmalte dentário predomina sobre a remineralização, acarretando perda de mineral da estrutura dentária. Redução de cárie pode ser observada quando restrição de sacarose entre refeições é adotada em indivíduos suscetíveis à cárie. Entretanto tal tentativa é impraticável na maioria das vezes devido a não cooperação do paciente ou de seus pais(LOESCHE, 1985).

Em função de todas essas observações, uma proposta de tratamento para indivíduos com alta atividade cariogênica deve envolver, além do uso racional do açúcar na dieta, também a substituição da sacarose por um adoçante de menor cariogenicidade (NEWBRUN, 1988; HOLM, 1990; BURT, 1993).

Uma alternativa é o uso de compostos que sejam seguros para a saúde do indivíduo, tenham a mesma doçura que a sacarose, mas não sejam metabolizados pelas bactérias da placa dentária (LOESCHE, 1985).

A questão da substituição do açúcar na dieta não é tão simples. Muitos dos adoçantes hoje utilizados possuem efeitos colaterais. Quarenta anos atrás, muito pouco se conhecia a cerca desse tópico, nos últimos 20 anos é que o conhecimento sobre os substitutos do açúcar em relação à saúde bucal vêm sendo mais estudado (BIRKHED, 1989).

A sacarose possui uma doçura que é preferida pelo homem. Um substituto da sacarose deve ser capaz de providenciar um gosto comparável para ser aceito pelo consumidor. Para serem comparados com a sacarose, os compostos muito doces, como a sacarina, devem ser muito diluídos, e os “poucos doces”, como o sorbitol, devem ter sua concentração aumentada. Mesmo após essas manipulações, a doçura resultante pode não ser satisfatória como aquela sentida com a sacarose (LOESCHE,1985).

A doçura da sacarose, aliada a seu valor como agente capaz de proporcionar massa e ser fonte de calorías, transmite aceitação para o consumidor e garante mercado aos alimentos processados industrialmente. É praticamente impossível um adoçante

não-calórico imitar o sabor, a textura e as outras características da sacarose. Em produtos cozidos surgem problemas para desenvolver uma certa textura com um bom sabor. Biscoitos cozidos com adoçantes não-calóricos, mesmo com a adição de agentes de massa, tendem a ser duros e resistentes. Em bolos, é extremamente difícil conseguir qualquer desenvolvimento razoável de umidade, estrutura e volume total. Em produtos como geléias, xaropes de frutas e leite condensado, a sacarose fornece uma preservação osmótica protetora. Caso a sacarose seja substituída, o risco de estrago por microrganismos é aumentado, a não ser que outras medidas corretivas sejam adotadas. Um controle microbiano mais rigoroso do produto é necessário até mesmo durante o processo de fabricação (NEWBRUN, 1988; LOESCHE, 1993).

Alguns dos problemas de textura e massa podem ser superados pela associação do uso de substitutos do açúcar com agentes formadores de massa de baixa caloria como a polidextrose (Pfizer). Quimicamente, a polidextrose é um polímero com ligações ao acaso, contendo quantidades pequenas de grupos terminais de sorbitol e de ácido cítrico acoplado. Ela foi aprovada pela FDA como um agente formador de massa, auxiliar em fórmulas e para conferir textura a alimentos cozidos, misturas de bolo, chicletes, confeitos e coberturas, molhos de saladas, sobremesas congeladas e balas duras e moles (NEWBRUN, 1988).

Para um adoçante ser aceito comercialmente, ele deve ter um suficiente poder adoçante; ser atóxico; ser razoavelmente barato e ser termoestável, isto é, resistir a temperaturas de cozimento. A maioria das substâncias doces não satisfaz todos esses requisitos. Uma busca constante por adoçantes aceitáveis, inofensivos, não fermentáveis, é importante. Ao aconselhar pacientes com atividade de cárie, restringir a frequência de ingestão de sacarose sem sugerir alternativas não soluciona o problema. Um adoçante, não cariogênico e seguro é muito necessário para estes pacientes (NEWBRUN, 1988).

Os substitutos do açúcar disponíveis atualmente no mercado podem ser divididos em dois grupos: os adoçantes calóricos e os adoçantes não-calóricos.

2.2.1 Adoçantes calóricos

Os adoçantes calóricos podem ser quimicamente divididos em álcoois-açúcares e açúcares. As substâncias mais comuns que formam os álcoois-açúcares são o sorbitol, o xilitol, o manitol e o maltitol. Trabalhos têm mostrado que esses polióis têm baixo potencial cariogênico (MÖLLER e POULSEN, 1973; FROSTELL et al, 1974; SCHEININ e MÄKINEN, 1975).

O xilitol é um carboidrato natural, um álcool-açúcar do tipo pentitol. Ele ocorre na natureza, e nosso metabolismo tem uma rota metabólica normal preexistente para sua utilização, ele entra pela rota da pentose fosfato através do ciclo do ácido glicurônico. O xilitol tem sido usado por diabéticos, devido ao seu metabolismo ser considerado independente de insulina.

Os microrganismos orais e, especificamente, os estreptococos do grupo mutans não têm enzimas para utilizar o xilitol como fonte de energia para produção de ácidos ou para síntese de polissacarídeos extracelulares (MOUNTON et al, 1975).

A absorção do xilitol, apesar de lenta e incompleta, é maior do que a do sorbitol e manitol. Por essa razão, o problema da diarreia osmótica é menos severo e a maioria dos indivíduos pode adaptar-se ao xilitol ingerindo até 750 mg/kg/dia (NIKIFORUK, 1985).

Os efeitos do xilitol no processo de cárie podem ser descritos como não-cariogênico, pois é uma substância não metabolizada pelos microrganismos (especialmente os estreptococos do grupo mutans), os quais crescem melhor com sacarose e isso previne a formação de ácido pela placa e altera a flora oral pela privação de seu substrato. SCHEININ e MÄKINEN (1975) sugerem que o xilitol tem uma atividade anticariogênica, visto que, em seus estudos de substituição total de açúcares pelo xilitol, a concentração salivar de lactoperoxidase é alta e a de invertase é baixa no grupo do xilitol. No entanto, nos estudos de substituição parcial com gomas de mascar, não se observa diferença entre os grupos do xilitol e do sorbitol. A anticariogenicidade do xilitol, inferida pelos baixos escores de cárie no grupo da goma de mascar com xilitol, pode ser um efeito geral de estímulo salivar não-acidogênico.

O sorbitol e o manitol são álcoois-açúcares do tipo hexitol, e ambos são metabolizados por algumas bactérias orais, incluindo os estreptococos do grupo mutans (NIKIFORUK, 1985; NEWBRUN, 1988).

O sorbitol é preparado da glicose por hidrogenação, tendo cerca da metade da doçura da sacarose e é utilizado sozinho ou com outros adoçantes para adoçar alimentos dietéticos e, especialmente, em doces e gomas de mascar (NIKIFORUK, 1985).

O sorbitol, como outros polióis, é lenta e incompletamente absorvido no intestino, podendo resultar em diarréia osmótica. A dose recomendada pela Food and Agricultural Organization é da ingestão de até 150 mg/kg/dia. Após sua absorção, o sorbitol da dieta é oxidado a frutose pela sorbitol desidrogenase e, após o metabolismo é idêntico ao da frutose. Sorbitol também é produzido em mamíferos como um metabólito intermediário normal (NEWBRUN, 1988).

Raras bactérias da placa são capazes de fermentar essas substâncias. Aquelas que podem fermentá-las, como os estreptococos do grupo mutans e o *Lactobacilos casei*, os quais fermentam também o manitol, têm as enzimas necessárias para a sua degradação, tais como a sorbitol-6-fosfato desidrogenase, presente em baixos níveis devido ao fenômeno de repressão de catabólito da glicose. Se o tempo de exposição desses hexitóis é curto, não há tempo suficiente para essas enzimas serem sintetizadas, ocorrendo uma fermentação mínima *in vivo* (LOESCHE, 1993).

A fermentação do sorbitol mesmo por estas bactérias é lenta e pouca queda do pH da placa ocorre quando comparado com a rápida queda de pH associada ao uso da sacarose (NIKIFORUK, 1985; MALTZ et al, 1992). Há evidências de que o primeiro passo do metabolismo do sorbitol pelos microrganismos envolve a fosforilação para sorbitol-6-fosfato e oxidação a frutose-6-fosfato, que, então, entra pela via glicolítica. Os estreptococos do grupo mutans adaptados ao sorbitol possuem alta atividade da alcool desidrogenase, sugerindo a indução do sorbitol para mudar a fermentação do ácido láctico para a produção de etanol. Assim, essas bactérias formam, a partir de uma molécula de sorbitol ou manitol, os seguintes produtos finais: uma molécula de ácido

lático, uma molécula de etanol e uma molécula de ácido fórmico. Isso é consideravelmente menos ácido do que quatro moléculas de ácido láctico que são produzidas a partir de uma molécula de sacarose (LOESCHE, 1993).

Nos estudos feitos em animais, uma dieta com sorbitol resulta em menos cárie e em menor acúmulo de placa que uma dieta com sacarose. Há poucos estudos clínicos de longa duração em humanos avaliando o sorbitol em relação à cárie, entretanto o uso de gomas de mascar com sorbitol indicam uma modesta redução de cárie (MÖLLER e POULSEN, 1973), e a ingestão de chocolate contendo sorbitol promoveu uma redução de 62% no índice de cárie CPO-D, quando comparado com igual ingestão de chocolate com sacarose (BANÓCZY et al, 1981).

Os álcoois-açúcares são muitas vezes utilizados em pastilhas, gomas de mascar e balas. Pastilhas com substitutos do açúcar para pacientes com xerostomia são um exemplo importante de onde a substituição do açúcar deve ser empregada para reduzir o risco à cárie.

O problema com os álcoois-açúcares é, em primeiro lugar, o preço, em segundo lugar, os efeitos colaterais (diarréia osmótica) e, em terceiro, o gosto. Eles são todos, com exceção do xilitol, menos doce que a sacarose.

O grupo dos adoçantes calóricos inclui também os açúcares como a frutose, glicose, maltose, lactose e açúcar invertido. Esses açúcares não servem como substrato para a produção de PEC, mas todos são passíveis de fermentação pelas bactérias da placa. Curvas idênticas de pH da placa são obtidas com glicose, frutose, maltose e sacarose, enquanto a queda de pH com a lactose é, de certo modo, menor (NEFF, 1967; BIRKHED et al, 1993).

Estudos utilizando aparelhos intra-orais com blocos de esmalte bovino, comparando nove açúcares, demonstraram que alguns desses açúcares têm menor cariogenicidade do que a sacarose (KOULORIDES et al, 1976). Eles observaram, através de medições de microdureza superficial nas amostras de esmalte, que não havia diferença entre sacarose, glicose, frutose e rafinose. Lactose, manitol, melibiose e

sorbitol foram significativamente menos cariogênicos que a sacarose, enquanto xilose e xilitol foram não-cariogênicos.

2.2.1.1 Lactose

A lactose é usada em muitos alimentos infantis. Contudo, uma vez que a lactose não é muito doce e considerando que algumas pessoas não a toleram em grandes quantidades, ela vem sendo usada em formulações, em conjunto com outros adoçantes, por exemplo, o esteviosídeo (AURICCHIO et al, 1987/89; MALTZ et al, 1992).

Vários trabalhos mencionam o fato de que a fermentação da lactose pelos estreptococos do grupo mutans e outros microrganismos da placa bacteriana depende da síntese de enzimas indutíveis, fazendo com que o potencial cariogênico da lactose, em diferentes indivíduos ou em um indivíduo em diferentes tempos, possa variar grandemente, dependendo de exposições recentes à lactose (BRUDEVOLD et al, 1983; BIRKHED et al, 1993).

Quando a cariogenicidade da lactose é comparada com a de outros açúcares, como a sacarose, glicose, frutose e rafinose, esta parece ser menor (KOULORIDES et al, 1976; BRUDEVOLD et al, 1983).

A lactose é um dos componentes do leite humano e bovino. O leite em geral é considerado não-cariogênico ou, até mesmo, anticariogênico, apesar do fato de a lactose ser fermentada pela placa bacteriana. No leite bovino, a concentração de lactose é baixa (4%), ao passo que no leite humano contém 6-9%. Por outro lado, o leite possui uma combinação de componentes anticariogênicos na forma imediatamente disponível: proteína (caseína), cálcio e fosfato. No leite humano, essas concentrações são um pouco mais baixas que no leite bovino (JOHANSSON e BIRKHED, 1995).

As mudanças do pH da placa bacteriana humana, antes e após bochechos com lactose e leite bovino, foram estudadas por BIRKHED et al (1993). Eles observaram que o pH da placa diminuía após o período de adaptação, tanto com a lactose como com o leite bovino. Leite humano, leite bovino e lactose 5% resultaram

em similares diminuições no pH da placa. Esses achados na resposta acidogênica da placa bacteriana *in situ* para o leite e a lactose, após um período de adaptação, sugerem que o potencial cariogênico do leite pode variar dependendo da exposição individual. Uma indução, isto é, um aumento na produção de enzimas bacterianas envolvidas no transporte e catabolismo da lactose é a provável explicação para isso em várias cepas de estreptococos orais.

Estudos *in situ* da cariogenicidade do leite bovino e do leite materno em humanos demonstraram que esses produtos causam menor acúmulo de placa bacteriana, concentração de polissacarídeos insolúveis e desmineralização do esmalte em comparação ao leite bovino com adição de sacarose a 10% ou solução de sacarose a 20%. Mesmo sob condições de alto desafio cariogênico induzido (acúmulo de placa, alta exposição ao substrato e limitada ação salivar), o leite bovino e o humano não são cariogênicos (CARBONEL et al, 1994; ARAUJO et al, 1994).

São necessários estudos que avaliem a cariogenicidade da lactose utilizada em conjunto com outros adoçantes em produtos comerciais.

2.2.2 Adoçantes não-calóricos

Sacarina, ciclamato de sódio, aspartame, acesulfame-k e esteviosídeo são alguns exemplos de adoçantes não-calóricos. Eles não são cariogênicos. São usados em refrigerantes e adoçantes para café e chá. Entretanto muitas pessoas que usam esse tipo de produto não o fazem por razões cariológicas, mas devido à obesidade e a diabetes (BIRKHED, 1989).

A sacarina tem sido usada como adoçante por quase um século. Ela é um composto orgânico aromático, O-sulfobenzimida, usado principalmente na forma de sal de sódio. A sacarina é estável na maioria das condições de preparo e processamento de alimentos, e nenhuma perda do poder adoçante por instabilidade tem sido encontrada. O amargo da sacarina detectado por 25% da população é intrínseco à molécula de sacarina e não é devido a impurezas ou decomposição (NEWBRUN, 1988). Ela tem sido extensivamente utilizada em refrigerantes e em alimentos dietéticos, em

enxaguatórios, em preparações medicinais e também como adoçante para uso na mesa (NIKIFORUK, 1985).

Trabalho sobre o potencial carcinogênico da sacarina foi realizado por HOWE et al (1977), onde eles compararam pacientes hospitalizados com câncer de bexiga e grupo controle. O risco de câncer de bexiga foi encontrado ser 60% maior entre os homens que tinham usado tabletes de sacarina. Em alguns estudos relatados por WALKER et al (1982), uma associação frágil foi encontrada, e em outros nenhuma associação foi detectada.

O ciclamato de sódio é um adoçante orgânico cerca de 30 vezes mais doce que a sacarose. Ele não é metabolizado pelos microrganismos orais. Estudos a curto prazo sobre toxicidade aguda e crônica do ciclamato em animais não mostram efeitos adversos em doses usualmente consumidas pelo homem. Apesar de não existir evidências definitivas quanto à carcinogenicidade, ele foi proibido nos Estados Unidos (NEWBRUN, 1988; NIKIFORUK, 1985).

Cerca de 25% dos indivíduos podem converter um pouco do ciclamato ingerido oralmente em cicloexilamina. Tem sido verificado no homem, em ratos e em porcos que a conversão é afetada por microrganismos albergados no trato intestinal inferior. A cicloexilamina tem efeitos simpaticomiméticos, possivelmente mediados pela liberação de catecolaminas. Por isto, a possibilidade de potenciação de outras drogas ou de efeitos adversos devem ser considerados (NEWBRUN, 1988).

O aspartame é composto de dois aminoácidos: L-aspartate e L-fenilalaninametiléster. Seu poder adoçante em solução aquosa é cerca de 180 vezes superior ao da sacarose, pouco estável, manifestando essa instabilidade através da perda de doçura durante o armazenamento e o aquecimento. A preocupação quanto à segurança do aspartame diz respeito ao seu conteúdo de fenilalanina, limitando seu uso em indivíduos portadores de fenilcetonúria (NEWBRUN, 1988).

O aspartame vem sendo usado em comprimidos, bebidas e gelatinas. Com o aspartame não são produzidos ácidos e polissacarídeos insolúveis pelos estreptococos

do grupo mutans e existem evidências *in vitro* que ele reduz a capacidade de adesão desses microrganismos (OLSON, 1977).

2.2.2.1 Esteviosídeo

Inúmeros produtos naturais, com origem nas plantas, têm sido descobertos em decorrência de observações laboratoriais e folclóricas (KINGHORN e SOEJARTO, 1989). Um dos melhores exemplos é a planta *Stevia rebaudiana* Bertoni.

“Stévia”, planta de sabor doce, nativa do Paraguai e de áreas limítrofes do Mato Grosso do Sul, já era utilizada pelos indígenas devido ao seu sabor doce, motivo pelo qual era chamada pelos guaranis de *Ka'á he ã* (AURICCHIO et al, 1987/89).

Em 1889, o botânico Bertoni, descreveu essa planta como uma nova espécie do gênero *Eupatorium*, chamando-a de *Eupatorium rebaudianum*. Em 1901, o Jardim Botânico de Kew, na Inglaterra recebeu amostras e informações do *Eupatorium* fornecidas pelo cônsul inglês em Assunção (AURICCHIO et al, 1987/89).

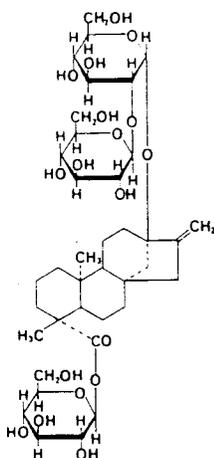
O próprio Bertoni, em 1905, ratificou a classificação da planta e a designou então de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Os estudos para se conhecer os componentes químicos da planta iniciaram, em 1900, com Rebaudi e, em 1931, Bridel e Lavieille, na França, isolaram e purificaram o esteviosídeo (AURICCHIO et al, 1987/89).

Dados históricos da utilização da Stévia como adoçante na América do Sul estão relatados em documentos dos conquistadores espanhóis da época. A Stévia é cultivada no Japão, na Coreia, em Taiwan, na Tailândia, na Indonésia, em Laos, no Paraguai e no Brasil (SAKAGUCHI e KAN, 1982).

Em 1969, Sumita levou algumas sementes da Stévia fornecidas pelo Instituto de Botânica de São Paulo para o Japão, onde muitos trabalhos relacionados com a Stévia estão sendo realizados. Esses estudos compreendem as áreas de aspectos químicos, cultivo, extração e purificação do esteviosídeo, aplicações e testes de inocuidade (SAKAGUCHI e KAN, 1982).

O esteviosídeo é um adoçante natural encontrado nas folhas, caule, inflorescência e aquênios (mas não ocorre nas raízes) da *Stevia rebaudiana*, uma planta perene da família das Compositae (SAKAGUCHI e KAN, 1982).

O esteviosídeo é um esteróide glicosídeo. É um ácido diterpenóico esterificado a uma unidade de glicose e unido através de ligação glicosídica a duas outras unidades de glicose (NEWBRUN, 1988). O esteviosídeo é uma substância higroscópica, levógira, solúvel em água e etanol e insolúvel em éter, clorofórmio e éter de petróleo. Sua fórmula química é $C_{18}H_{60}O_{38}$ (FELIPPE, 1977).



Através de cromatografia em camada delgada dos extratos de folhas e caule de *Stevia* em água ou em álcool, observam-se manchas de compostos similares ao esteviosídeo. As denominações e configurações dos mesmos foram descritas por TANAKA apud SAKAGUCHI e KAN (1982) como sendo rebaudiosídeo A, rebaudiosídeo D, rebaudiosídeo E, zurcosídeo A e zurcosídeo B (rebaudiosídeo C). Dessas substâncias, o rebaudiosídeo C (zurcosídeo B) é um produto secundário do rebaudiosídeo A, por consequência do processo de extração.

O esteviosídeo puro e extratos de *Stevia rebaudiana* tem sido utilizados no Japão como adoçante de uma variedade de alimentos e de bebidas. No Brasil, o esteviosídeo também é comercializado em alguns produtos (AURICCHIO et al, 1987/89; MALTZ et al, 1992).

O interesse no uso potencial do esteviosídeo e do rebaudiosídeo A como substituto da sacarose está aumentando nos Estados Unidos e na Europa Ocidental. No entanto, ênfase maior tem sido dada ao estudo do esteviosídeo. O rebaudiosídeo A está presente na planta em mais baixos níveis que o esteviosídeo (DAS et al, 1992).

Todos os glicosídeos da *Stevia rebaudiana* apresentam características doces, mas existe uma grande variação quanto à intensidade e à qualidade da doçura. Desses, os mais doces são o esteviosídeo e o rebaudiosídeo A (SAKAGUCHI e KAN, 1982).

O esteviosídeo é 300 vezes mais doce que a sacarose. Segundo KATAYAMA e YOKOYAMA apud SAKAGUCHI e KAN (1982), essa relação é verdadeira comparando o esteviosídeo com a mínima concentração de sacarose, cuja doçura é perceptível ao homem. Na concentração de 5 a 10 % de sacarose utilizada em processamento de alimentos, a relação passa a ser de 100 a 120 vezes mais doce que a sacarose; os zurcosídeos A e B são 80 vezes mais doces que a sacarose e para os D e E não existem dados específicos.

A qualidade de doçura dos adoçantes oriundos da *Stevia rebaudiana* é semelhante ao da sacarose e o seu sabor residual permanece um pouco mais em evidência do que a sacarose, o que o caracteriza como um adoçante de ótima qualidade. Essa propriedade despertou o interesse do uso tanto da planta *Stevia rebaudiana*, assim como de seus componentes purificados em dietas de substituição da sacarose (AURICCHIO et al, 1987/89).

O aperfeiçoamento do sabor do esteviosídeo para assemelhar-se mais à qualidade da sacarose está em fase de pesquisas. ISHIMA e KATAYAMA apud SAKAGUCHI e KAN (1982) experimentaram misturar diversos açúcares com esteviosídeo, observando a qualidade e o sabor residual, e chegaram aos seguintes resultados: o melhor é acrescentar o esteviosídeo à sacarose, seguindo-se à glicose, frutose, sorbitol e maltitol; a mistura que deixa menor sabor residual é a com frutose.

As empresas que trabalham com a *Stevia rebaudiana* no Japão estão pesquisando a mistura de esteviosídeo com açúcares ou com combinações de açúcares e

de misturas com substâncias pépticas e aminoácidos constataram que o ácido cítrico, ácido acético, ácido láctico, ácido málico e ácido tartárico diminuem o sabor residual do esteviosídeo (SAKAGUCHI e KAN, 1982).

Vários investigadores têm estudado *in vitro* o efeito do esteviosídeo no metabolismo de bactérias cariogênicas. YABU et al (1977) não observaram crescimento de estreptococos do grupo mutans e lactobacilos nos meios contendo xilitol, sorbitol e esteviosídeo. O esteviosídeo influenciou a atividade da glicosiltransferase produzida pelos estreptococos do grupo mutans, quando o meio era acrescido de glicose; entretanto, em presença de sacarose, o esteviosídeo não diminuiu a atividade da glicosiltransferase.

Estudo *in vitro* da utilização do esteviosídeo por cepas de estreptococos do grupo mutans demonstrou que o esteviosídeo não era metabolizado por esses microrganismos como fonte de carbono, bem como não permitia a formação de ácidos e síntese de polissacarídeos extracelulares (IKEDA et al, 1978). Redução de crescimento bacteriano e produção de ácidos pelos estreptococos do grupo mutans em meio contendo esteviosídeo, quando comparado com sacarose, glicose e frutose também foi observado por BERRY e HENRY (1981).

PINHEIRO et al (1987), estudando o extrato de *Stevia rebaudiana*, encontraram que o mesmo estimulou a fermentação na placa, mas apresentou grande efeito inibitório sobre a síntese de polissacarídeos insolúveis. Quanto ao esteviosídeo, houve pequena redução na fermentação da placa, a qual não foi significativa, no entanto 0,25% do esteviosídeo foi capaz de inibir em 78% a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis na placa bacteriana.

Os adoçantes esteviosídeo, aspartame, xilitol e sacarina foram avaliados *in vitro* por CHEDID (1990) quanto ao seu papel dentro de processos bioquímicos de fermentação e síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis pelos microrganismos da placa e, em especial, pelo *S. mutans* GS-5 e LM-7. Nenhum dos adoçantes estudados foi metabolizado por esses microrganismos. Os adoçantes não interferiram na fermentação e na produção de ácidos quando associados com a

sacarose. Para a síntese de polissacarídeos extracelulares, a associação do esteviosídeo com sacarose inibiu em 45,23% a produção de polissacarídeos insolúveis para *S. mutans* LM-7 e 56,35%, para placa bacteriana.

O efeito *in vitro* de produtos comerciais brasileiros a base de esteviosídeo e aspartame sobre o metabolismo do *S. mutans* IB 1600 foi estudado por MALTZ et al (1992). Os produtos testados foram Stevita®, Steviplus, Vitahervas (baseados no esteviosídeo) e Finn, Zero Cal (baseados no aspartame). Os diferentes compostos presentes na fórmula comercial foram usados como controle (sorbitol, lactose e manitol). A produção de ácido, formação de placa e produção de polissacarídeos nos produtos comerciais foram similares aos outros compostos presentes na formulação como lactose, manitol e sorbitol e menores do que a sacarose. Entretanto os produtos comerciais diferiram dos resultados obtidos com esteviosídeo e aspartame puros. Portanto os produtos comerciais têm provavelmente menos efeito cariogênico que a sacarose, desde que promovem menor produção de ácido, formação de placa e produção de polissacarídeos que a sacarose.

O esteviosídeo não apresentou ação cariogênica nos estudos em animais. OLIVEIRA et al (1985) observaram que, em ratos desmamados, mantidos com dieta cariogênica, os produtos naturais guaraná, *Stevia rebaudiana* Bertoni, esteviosídeo e associação de guaraná-esteviosídeo reduziram os escores de cárie de esmalte e dentina de dentes molares. Os melhores resultados foram com a associação guaraná-esteviosídeo. No estudo de DAS et al (1992), o esteviosídeo e o rebaudiosídeo A não foram cariogênicos quando administrados na dieta de ratos albinos colonizados por *S. sobrinus*.

Toxicidade do esteviosídeo

O esteviosídeo apresenta boas qualidades quanto à doçura. Para que seja utilizado em maior escala em alimentos, é necessário avaliar a inocuidade dessa substância. A *Stevia rebaudiana* é empregada há centenas de anos pelos índios paraguaios como adoçante.

Pomaret e Lavieille (1931) observaram que o esteviosídeo não tem ação hemolítica como afirmava Kobert (1977), não constatando efeitos tóxicos na administração do esteviosídeo subcutaneamente em camundongos. O esteviosídeo administrado em galos, via oral, é eliminado pelo trato digestivo sem metabolização (FELIPPE, 1977).

A possibilidade do chá de Stevia ter efeito anticoncepcional foi avaliada por alguns pesquisadores (AKASHI YOKOYAMA apud SAKAGUCHI e KAN, 1982). Esteviosídeo na quantidade correspondente a 100g/dia de açúcar, administrado em ratos não altera a fertilidade tanto dos machos quanto das fêmeas. Os fetos não apresentavam anormalidade para os extratos purificados de esteviosídeo, enquanto que para o extrato bruto são necessários mais estudos. Esteviosídeo em altas concentrações não causa toxicidade aguda em camundongos, não ocorrendo nenhuma anormalidade nos órgãos internos dos animais. Quando a amostra de cristais de extrato bruto é administrada na forma de suspensão e em doses excessivas, ocorre entupimento do estômago e, portanto, a *causa mortis* não se deve à toxicidade do esteviosídeo e sim a forma de administração.

Os efeitos da administração aguda e subaguda de 0,6 ml de extrato aquoso total de *Stevia rebaudiana* Bertoni sobre a respiração e eletrocardiograma foi estudado em ratos Wistar por COPETTI et al (1986). Os resultados mostraram que na respiração não houve alteração significativa; concernente ao eletrocardiograma, observa-se que, nos animais com uso agudo de *Stevia rebaudiana*, não houve alterações, no entanto com administração subaguda houve efeito bradicartizante, enquanto que a utilização endovenosa em animais com uso subagudo apresentou efeito taquicardizante.

A toxicidade oral crônica e carcinogenicidade do esteviosídeo em ratos Wistar que receberam dietas contendo esteviosídeo (85% puro), em concentrações de 0,2; 0,6 ou 1,2%, foi estudada por XILI et al (1992). Os ratos-testes não apresentaram diferença estatística dos controles quanto ao crescimento, utilização de alimentos, aparência geral e mortalidade. A incidência e severidade de mudanças não neoplásicas e neoplásicas não foram relacionadas aos níveis de esteviosídeo na dieta. Esses autores

aconselham a ingestão diária de esteviosídeo de no máximo 7,938 mg/kg peso corporal dia para humanos.

O estudo da ação do esteviosídeo sobre a fisiologia celular é amplamente justificado em função da utilização desse glicosídeo na dieta e nas indústrias farmacêuticas e de alimentos. ASSIS e RODRIGUES (1988) estudaram *in vitro* o efeito que soluções de esteviosídeo em diferentes concentrações poderiam ter sobre a estabilidade das membranas dos diversos componentes do compartimento lisossômico, isolados de fígados de camundongos. Os resultados indicaram que as soluções nas concentrações de $3,3 \times 10^{-4}$ a 10^{-6} M têm efeito estabilizador sobre os complexos de membranas de lisossomos hepáticos, enquanto que as soluções $3,3 \times 10^{-7}$ a 10^{-9} M não determinaram nenhum efeito estatisticamente significativo.

Mais recentemente, ASSIS et al (1991) estudaram *in vivo* o efeito do esteviosídeo sobre a atividade lisossômica do rim e do fígado de camundongos. Eles não observaram mudanças estatisticamente significantes na estabilidade das membranas lisossômicas do rim e do fígado, em camundongos tratados com 50 mg/kg peso corporal por dia. Na dose de 100 mg/kg/dia, foi observado um pequeno efeito labilizador nos lisossomos hepáticos, mas não sobre os renais.

O efeito do esteviosídeo sobre a função renal tem sido estudado em ratos (MELIS, 1992a; MELIS, 1992b) e cães (CHAGAS et al, 1990). O esteviosídeo infundido intravenosamente em 4 concentrações (4, 8, 12 e 16 mg/kg) induz diurese, natriurese e uma queda na reabsorção tubular renal de glicose (MELIS, 1992b). Esse autor também estudou o efeito do esteviosídeo sobre a função renal de ratos normais e hipertensos experimentalmente e observou hipotensão, diurese, natriurese em ambos, isto é atribuído ao efeito vasodilatador sistêmico do esteviosídeo (MELIS, 1992a). Ao contrário de MELIS (1992), CHAGAS et al (1990) não observaram alterações sobre os parâmetros de pressão arterial, da respiração e de dosagens plasmáticas e urinárias quando a *Stevia rebaudiana* e o esteviosídeo foram administrados, pela via oral e endovenosa, em cães hidropênicos ou com sobrecarga hídrica.

O efeito do extrato aquoso de *Stevia rebaudiana* e do esteviosídeo sobre o sistema nervoso central foi estudado por CHAGAS et al (1985). utilizando 450 camundongos que foram distribuídos em grupos de três animais no Octógrafo para registro de atividade motora. Após administração oral e intraperitoneal de extrato aquoso total de Stévia e esteviosídeo, eles observaram que tanto o extrato aquoso de Stévia como o esteviosídeo ocasionaram diminuição da atividade desses animais.

A maioria dos estudos *in vivo* e *in vitro* não tem demonstrado toxicidade aguda ou crônica do esteviosídeo nas concentrações utilizadas para adoçar alimentos, sendo, portanto, uma substância que pode ser utilizada na dieta de humanos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial cariogênico do adoçante comercial Stevita®, cuja formulação apresenta lactose e esteviosídeo, estudando a formação e composição da placa bacteriana e a desmineralização do esmalte dentário, utilizando um modelo *in situ*.

3.2 Objetivos específicos

Comparar os efeitos do adoçante comercial Stevita® com os edulcorantes presentes na sua formulação lactose e esteviosídeo e com a sacarose, em relação à formação e à composição da placa bacteriana através de:

- peso úmido da placa bacteriana;
- colonização por bactérias cariogênicas (estreptococos do grupo mutans e lactobacilos);
- concentração de polissacarídeos solúveis e insolúveis.

Analisar o grau de desmineralização dos blocos de esmalte dentário submetidos aos tratamentos com o adoçante comercial Stevita®, a lactose, o esteviosídeo e a sacarose através de:

- exame visual com lupa dos blocos de esmalte dentário;
- medições de microdureza de Knoop em profundidade.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostra

Sete indivíduos adultos, residentes em Porto Alegre (região de água fluoretada), idade entre 19 e 35 anos, participaram do estudo. Eles apresentavam bom estado de saúde bucal, sem lesão de cárie ativa ou doença periodontal, fluxo salivar normal (≥ 1 ml/minuto), não estavam utilizando antibióticos ou medicamentos com efeitos colaterais hipossalivatórios no período do experimento, e o número de unidades formadoras de colônia (UFC) de estreptococos do grupo mutans e lactobacilos por ml de saliva variava entre 10^2 e 10^5 .

4.2 Desenho experimental

O estudo é do tipo cruzado e duplo-cego, e compreendeu quatro períodos de 28 dias. Os indivíduos usaram diariamente, inclusive para dormir, aparelhos de acrílico palatinos removíveis com quatro blocos de esmalte dentário íntegros. O aparelho era removido e estocado em ambiente úmido toda vez que o indivíduo ingeria alimentos e durante a realização da higiene bucal. Os blocos de esmalte do aparelho intra-oral foram submetidos à imersão em uma das soluções-testes, sete vezes ao dia, durante dez minutos. Em seguida, o aparelho era lavado com água deionizada e reinsertado na boca.

Em cada um dos quatro períodos experimentais, os indivíduos utilizaram uma das soluções, de tal modo que todos foram submetidos a todas soluções-testes.

Durante o experimento, os indivíduos foram orientados a não utilizar produtos contendo flúor, exceto água. A escovação dos dentes e a limpeza do aparelho foi feita com dentifício não fluoretado (Anexo 1).

4.3 Soluções-testes

As soluções-testes utilizadas foram: sacarose (Difco); lactose (Isofar); esteviosídeo (Ingá) e o produto comercial Stevita® (Ingá). O produto comercial Stevita® foi utilizado na concentração de 2%, segundo recomendação do fabricante, que corresponde a um sachet de adoçante para uma xícara de cafezinho (1g dissolvido em 50 ml). Como a Stevita® tem na sua formulação 90% de lactose e 10% de esteviosídeo, foram também utilizadas as soluções de lactose a 1,8% e esteviosídeo a 0,2%. A solução-teste sacarose 17% (equivalente a duas colheres de açúcar em uma xícara de cafezinho, que corresponde, segundo o fabricante, a um sachet de adoçante) foi usada como controle positivo. As soluções de sacarose e lactose eram esterilizadas em autoclave (15 minutos a 121°C), e a de esteviosídeo e Stevita®, por filtração à vácuo (filtro de membrana, 0,2 µm, Sartorius).

4.4 Fase preparatória

4.4.1 Preparação dos blocos de esmalte dentário

Foram preparados blocos de esmalte dentário de terceiros molares inclusos íntegros extraídos por razões clínicas, com mais de dois terços de raiz completa e sem defeitos de esmalte. Os dentes foram armazenados em água deionizada com cristais de timol para prevenir desidratação e crescimento bacteriano (KOULORIDES, 1976; CHANDLER, 1990; RUEGGERBERG, 1991).

Os dentes tiveram suas coroas dentárias seccionadas com disco diamantado dupla face (Sorensen), montado em micromotor, a fim de se obter blocos de esmalte 3x3x2 mm do terço médio coronário. A superfície externa dos blocos de esmalte foi polida com lixa metalográfica de 600 grãos sob água deionizada para remover 50 µm da camada externa do esmalte (FEATHERSTONE e ZERO, 1992).

Os blocos de esmalte foram esterilizados em solução de glutaraldeído a 2%, com pH neutro, por dez horas e após lavados várias vezes com solução de bissulfito de sódio a 1% e água deionizada esterilizada (BLOCK, 1991).

De cada conjunto de blocos de esmalte obtidos do mesmo dente, um era guardado como controle em água deionizada e os outros usados como blocos-testes. Tanto os blocos-testes quanto os controles foram obtidos do terço médio coronário do mesmo dente, visto que as medidas de dureza de Knoop são semelhantes no mesmo terço coronário, ocorrendo uma queda no número de dureza de Knoop (KHN) do terço oclusal para cervical no mesmo dente (PURDELL-LEWIS et al, 1976).

4.4.2 Confecção dos aparelhos intra-orais

Os quatro blocos de esmalte foram colocados em aparelhos palatinos confeccionados com resina acrílica autopolimerizável e inseridos com 1 mm de recessão da superfície externa do acrílico. Uma tela plástica foi fixada sobre os blocos dentais para reter a placa bacteriana formada (CORPRON, 1992; BENELLI et al, 1993) conforme Figura 1.

4.5 Coleta de placa bacteriana

Após 28 dias, as telas plásticas que recobriam os blocos de esmalte foram removidas com lâmina de bisturi nº 15 e as amostras de placa coletadas, usando um escavador dental estéril (MACPHERSON et al, 1990), conforme Figura 2.

A placa bacteriana correspondente a dois blocos de esmalte (um de cada lado do aparelho) foi utilizada para determinação do número de UFC de estreptococos do grupo mutans e lactobacilos por mg de placa e a correspondente aos outros dois blocos de esmalte para a determinação da concentração de polissacarídeos extracelulares.

Figura 1 - Aparelho de acrílico palatino com os quatro blocos de esmalte dentário e a tela plástica.

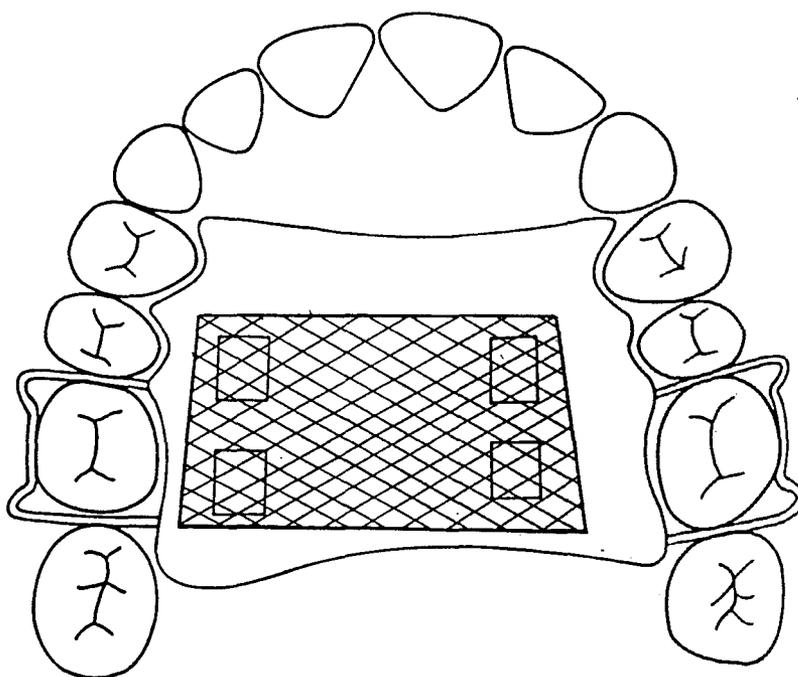
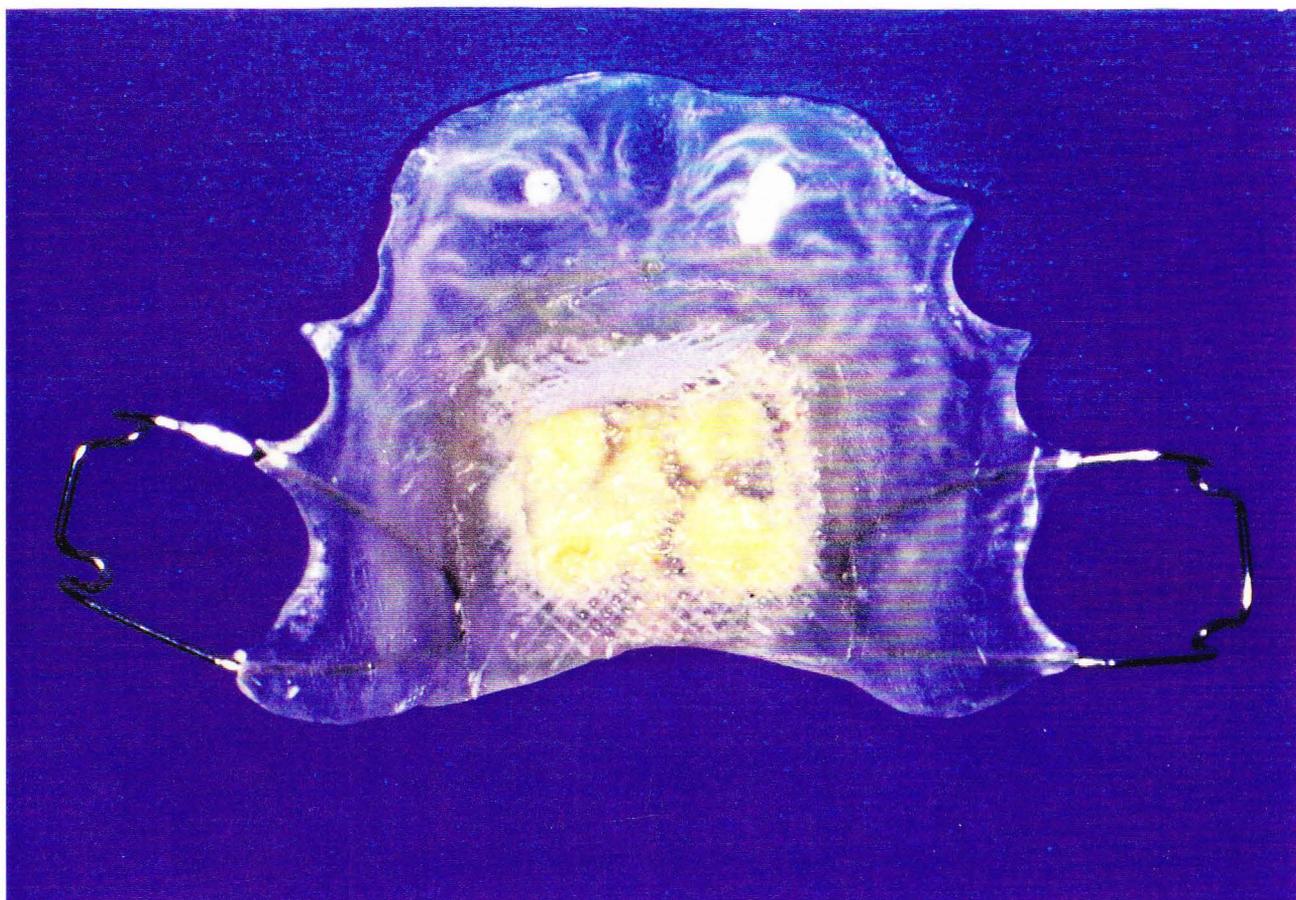


Figura 2 - Aparelho de acrílico palatino com a tela plástica parcialmente removida para a coleta de placa bacteriana formada sobre os blocos de esmalte dentário na presença de sacarose 17%, sete vezes ao dia, por um período de 28 dias.



4.6 Cultivo de placa bacteriana

Após a determinação do peso úmido das amostras de placa bacteriana (balança de precisão Owa Labor), essas foram homogeneizadas e diluídas em solução tampão de fosfato (pH 7,3), cultivadas nos meios de cultura Ágar Mitis Salivarius (Difco) com Bacitracina (MSB) e Ágar Rogosa SL (R-SL)(Difco). O MSB, utilizado para identificação dos estreptococos do grupo mutans (SM) e o R-SL para identificação dos lactobacilos, foram incubados a 37° C em microanaerobiose por 48 e 72 horas respectivamente.

As espécies bacterianas foram identificadas com base na morfologia de colônias. Nos casos de dúvida quanto à identificação dos estreptococos do grupo mutans, foram realizados testes bioquímicos para identificação desta bactéria através da fermentação dos carboidratos sorbitol e manitol (SHKLAIR e KEENE, 1974; COLMAN e BALL, 1984).

A contagem da microflora cariogênica foi expressa em UFC/mg de placa bacteriana.

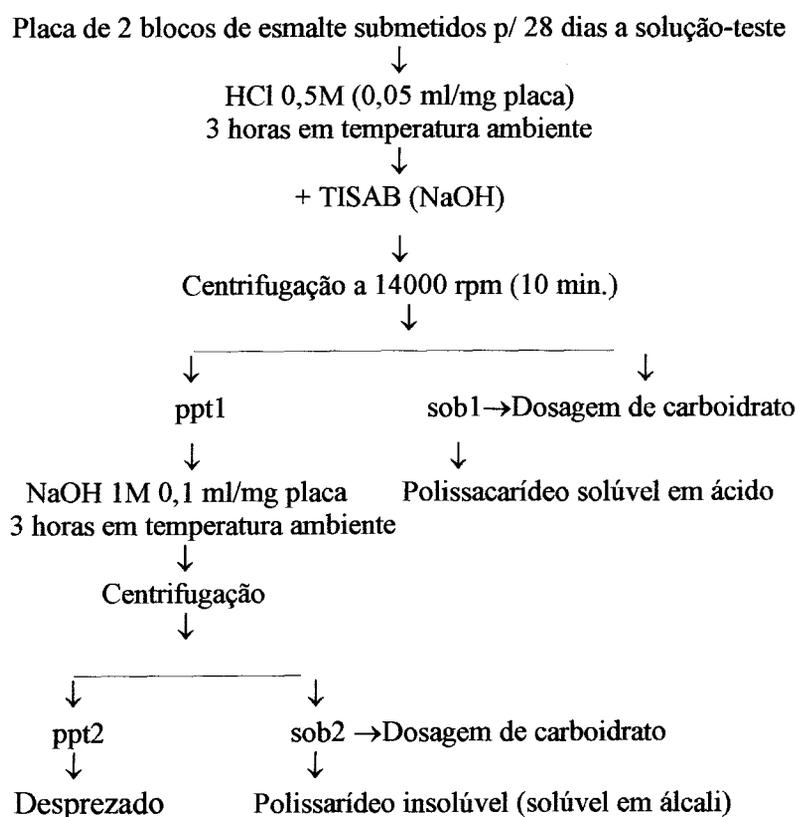
4.7 Determinação da concentração de polissacarídeos solúveis e insolúveis

Para realizar a determinação da concentração de polissacarídeos solúveis e insolúveis, amostras de placa coletadas de dois blocos de esmalte e previamente pesadas, foram tratadas com HCl 0,5 M (na proporção de 0,05 ml/mg de placa). Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por três horas, sendo agitados de 20 em 20 minutos. A seguir, o ácido foi tamponado com TISAB¹ no volume correspondente ao ácido. Após este tratamento, os tubos foram centrifugados (centrífuga Eppendorf modelo 5410) a 14000 rpm durante 10 minutos. No sobrenadante (sob₁), foi

¹ TISAB: Ácido acético glacial (Reagen) (57,0 ml), NaCl (Reagen) (58,0 g), CDTA (Sigma) (4,0 g), NaOH (Merck) (20,0 g), 1 litro de água.

determinada a concentração de polissacarídeos solúveis(carboidratos solúveis em ácido). No precipitado (ppt₁), foi adicionado 0,10 ml de NaOH 1M por mg de placa, deixando-se três horas em temperatura ambiente, agitando-se de 20 em 20 minutos em um agitador de tubos (Vortex). Em seguida, os tubos foram centrifugados (centrífuga Eppendorf modelo 5410) a 14000 rpm durante 10 minutos. O precipitado (ppt₂) foi desprezado e no sobrenadante (sob₂) foi determinada a concentração de polissacarídeos insolúveis (carboidratos solúveis em álcali) (MÄKINEN et al, 1989; REBELO, 1994).

O fluxograma abaixo resume o método usado para determinação de concentração de polissacarídeos solúveis e insolúveis.



4.7.1 Determinação de polissacarídeos solúveis

A determinação de polissacarídeos solúveis nas amostras (sob1) foi realizada pelo método de dosagem de carboidratos totais (DUBOIS et al, 1956) que se baseia na reação de um açúcar quando na presença de um ácido forte (H₂SO₄) formar

compostos furfúricos a partir de uma pentose ou hexose. Os compostos furfúricos na presença de fenol obtêm uma coloração laranja, cuja intensidade é proporcional ao teor de açúcar presente na amostra que foi obtida a partir de: 0,05 ml do sobrenadante, ao qual foi acrescentado 0,45 ml de água destilada, 0,5 ml de fenol a 5% e 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado (Merk). Decorrido 20 minutos, após as amostras terem sido preparadas, a intensidade da cor foi medida em um espectrofotômetro (Spectronic DV21), no comprimento de onda de 490 nm. O resultado foi obtido através da Fórmula 1 e expresso em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de placa:

Fórmula 1 - Cálculo da concentração de polissacarídeos

$$C = \frac{DO_{AM} \times F \times D}{\text{Peso de placa em mg}} = \mu\text{g}/\text{mg de placa}$$

onde,

C= concentração de polissacarídeos solúveis em ácido;

DO_{AM} = absorvância da amostra em 490 nm;

F = fator obtido através de uma curva de glicose;

D = diluição da amostra.

4.7.2 Determinação de polissacarídeos insolúveis

A determinação de polissacarídeos insolúveis contidos nas amostras (sob2) foi realizada pelo método de dosagem de carboidratos totais (DUBOIS et al, 1956). A Fórmula 1 foi utilizada para cálculo da concentração de polissacarídeos insolúveis, onde C é igual a concentração de polissacarídeos insolúveis.

4.8 Exame visual com lupa dos blocos de esmalte dentário

Após o período de 28 dias, os blocos de esmalte foram removidos, limpos e estocados em água deionizada. A análise macroscópica dos blocos de esmalte foi realizada por dois examinadores utilizando lupa com aumento de 15,75 vezes, estando os blocos secos no momento do exame.

Os critérios utilizados para esse exame foram:

1º **Hígido (H)**: superfície sem alteração;

2º **Mancha Branca Localizada (MBL)**: superfície com lesão delimitada, de aspecto esbranquiçado e sem brilho;

3º **Mancha Branca Generalizada (MBG)**: lesão de mancha branca em toda a superfície do esmalte;

4º **Cavidade (C)**: superfície com cavitação.

Cada examinador fez a análise dos blocos de esmalte individualmente, anotando os resultados em uma ficha apropriada. Em seguida, as fichas foram confrontadas e os resultados que divergiram foram analisados em conjunto.

4.9 Medições de microdureza em profundidade nos blocos de esmalte dentário

Ao término de cada período experimental, os blocos de esmalte dentário testes foram removidos do aparelho intra-oral, limpos e mantidos em água deionizada até a confecção dos corpos de prova.

Para confecção dos corpos de prova (Figura 3), os blocos de esmalte testes e controles foram embebidos em resina acrílica autopolimerizável incolor e prensados na embutidora metalográfica (Arotec PRE30) com a superfície do esmalte perpendicular à superfície do bloco de resina. Em seguida, o corpo de prova era cortado (cortadeira Isomet) com disco diamantado, de modo que o corte passasse pelo meio dos blocos dentais (FEATHERSTONE et al, 1983; MEYEROWITZ et al, 1991).

A fatia mais grossa foi polida com lixa d'água 600 grãos e com feltro e pasta diamantada de granulação 3 μm e após com a de 1 μm (Buehler, pasta diamantada Metamedi) em uma politriz (Arotec APL 4). A superfície do corpo de prova deve estar bem plana e polida para que sejam realizadas as medições de microdureza. Os corpos de prova foram lavados com água deionizada e detergente, com o auxílio de sonicador e secados com papel absorvente.

As medições de microdureza dos blocos de esmalte dentário foram realizadas em três posições nas profundidades de 10, 20, 30, 50, 70, 90 e 110 μm da superfície externa do esmalte. A primeira posição escolhida foi a porção central do bloco de esmalte (ponto zero), depois a 100 μm para cima e 100 μm para baixo do ponto zero, num total de 21 indentações em cada bloco de esmalte (Figura 4). Nas zonas de cárie com perda mineral severa, onde as leituras das indentações não puderam ser feitas, atribuiu-se escore zero.

Figura 3 - Corpo de prova com os blocos de esmalte dentário submetidos aos tratamentos com sacarose, lactose, Stevita® e esteviosídeo do indivíduo 1.

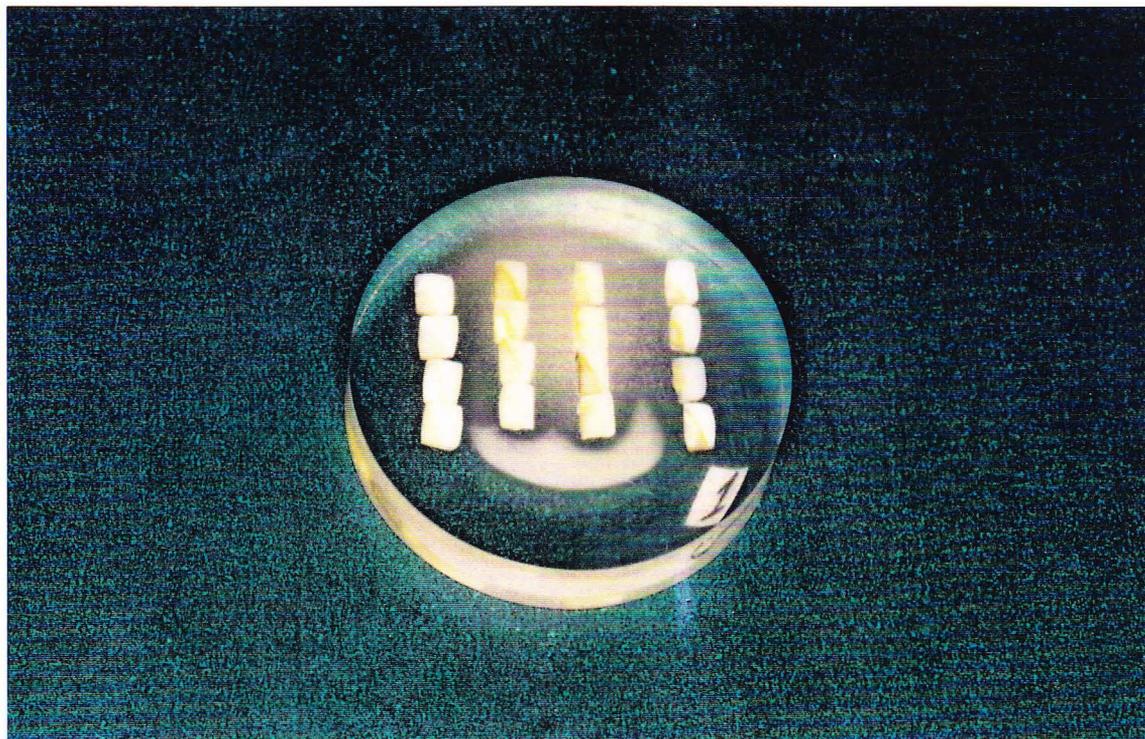
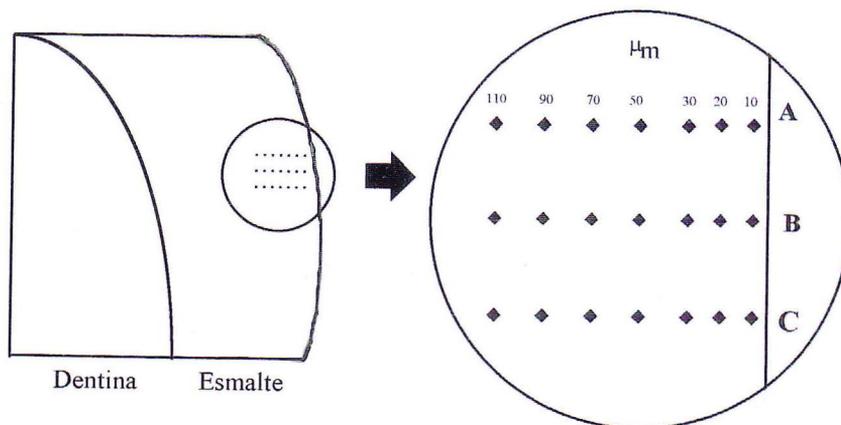


Figura 4 - Diagrama representando um bloco de esmalte dentário com as 21 indentações nas posições A, B e C.



As indentações foram feitas com o longo eixo do diamante paralelo a superfície externa do esmalte (ARENDS et al, 1980; FEATHERSTONE et al, 1983) com um diamante Knoop, peso estático de 25g, que foi aplicado por 30 segundos (microdurômetro Shimadzu HMVZ 2000). As leituras do número de dureza de Knoop (KHN) foram obtidas diretamente do aparelho.

Fórmula 2 - Cálculo do número de dureza de Knoop

$$\text{KHN} = \frac{14230 \times P}{l^2}$$

onde,

P = peso aplicado em gramas;

l^2 = comprimento da indentação em micrometros.

As medições de microdureza foram realizadas em 134 blocos de esmalte dentário, assim distribuídos: 26 blocos de esmalte dentário utilizados com a solução-teste sacarose, 25 blocos de esmalte com a lactose, 27 blocos de esmalte com a Stevita®, 28 blocos de esmalte com o esteviosídeo e 28 blocos de esmalte controle.

As medições de microdureza determinam perda ou ganho de mineral. O comprimento de indentação aumenta quanto maior for a perda mineral. Medições de microdureza através de secções do esmalte dão uma detalhada avaliação das condições da lesão (PURDELL-LEWIS et al, 1976). O volume de ganho ou perda de mineral dentro do esmalte é quantificado como perfil de microdureza através da conversão do número de dureza de Knoop obtido em diferentes profundidades pelo uso da fórmula proposta por FEATHERSTONE et al (1983):

Fórmula 3 - Cálculo da percentagem de volume mineral

$$\% \text{Vol. Mineral} = 4,3\sqrt{\text{KHN}} + 11,3 \quad (r = 0,919)$$

4.10 Análise estatística

O peso úmido de placa bacteriana, o número de UFC de estreptococos do grupo mutans e lactobacilos por mg de placa bacteriana e a concentração de polissacarídeos solúveis e insolúveis obtidos com os diferentes tratamentos foram avaliados através do teste não paramétrico de Friedman, complementado por um teste de comparações múltiplas do Teste de Friedman.

Os valores de microdureza de Knoop foram analisados pelo método paramétrico de Análise de Variância, para avaliação do efeito dos tratamentos dentro de cada profundidade medida nos blocos de esmalte. Para determinar as diferenças significativas entre os tratamentos, foi utilizado o Teste de Comparações Múltiplas de Tukey. Esses testes foram realizados através do software SPSS (Statistical Package for Social Science).

O nível de significância adotado foi convencionalmente fixado em $\leq 5\%$.

5. RESULTADOS

5.1 Peso úmido de placa bacteriana

O peso úmido de placa bacteriana coletada de dois blocos de esmalte variou de acordo com a solução adoçante utilizada (Tabela 1). Observa-se que, com a solução de sacarose, ocorre formação de maior quantidade de placa bacteriana do que com as soluções de Stevita® e de esteviosídeo ($p < 0,001$). Apesar de a lactose formar menor quantidade de placa bacteriana do que a sacarose, essa diferença não foi estatisticamente significativa. O esteviosídeo ocasionou o menor acúmulo de placa bacteriana.

Tabela 1 - Peso úmido de placa bacteriana (mg) após o tratamento com as soluções de sacarose (SAC), lactose (LACT), Stevita® (STEV) e esteviosídeo (ESTEVEV)

INDIVÍDUOS	PESO ÚMIDO DE PLACA			
	SAC	LACT	STEV	ESTEVEV
1	48,50	42,80	29,40	14,40
2	40,30	16,00	7,60	9,70
3	13,00	9,30	9,10	5,60
4	14,60	15,30	23,30	6,40
5	42,60	12,30	12,70	8,60
6	15,20	20,80	8,60	12,60
7	27,10	13,80	11,10	7,30
Média	28,80 ^a	18,60 ^{ab}	14,50 ^b	9,20 ^b
Desvio-Padrão	15,00	11,23	8,42	3,26

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ($p < 0,001$, Teste de Friedman).

5.2 Colonização por bactérias cariogênicas

As Tabelas 2 e 3 relacionam o nível de estreptococos do grupo mutans e lactobacilos de acordo com as soluções-testes utilizadas. Consta-se que o nível de SM por mg de placa na presença de esteviosídeo ($2,539 \pm 2,457 \log_{10}$ UFC/mg de placa) foi inferior ao encontrado com os adoçantes sacarose ($5,279 \pm 5,690 \log_{10}$ UFC/mg de placa), lactose ($4,249 \pm 4,403 \log_{10}$ UFC/mg de placa) e Stevita® ($4,242 \pm 4,520 \log_{10}$ UFC/mg de placa), $p < 0,05$. Observou-se uma maior prevalência de SM com a sacarose do que com a lactose e Stevita®, apesar dessa diferença não ser estatisticamente significativa (Tabela 2).

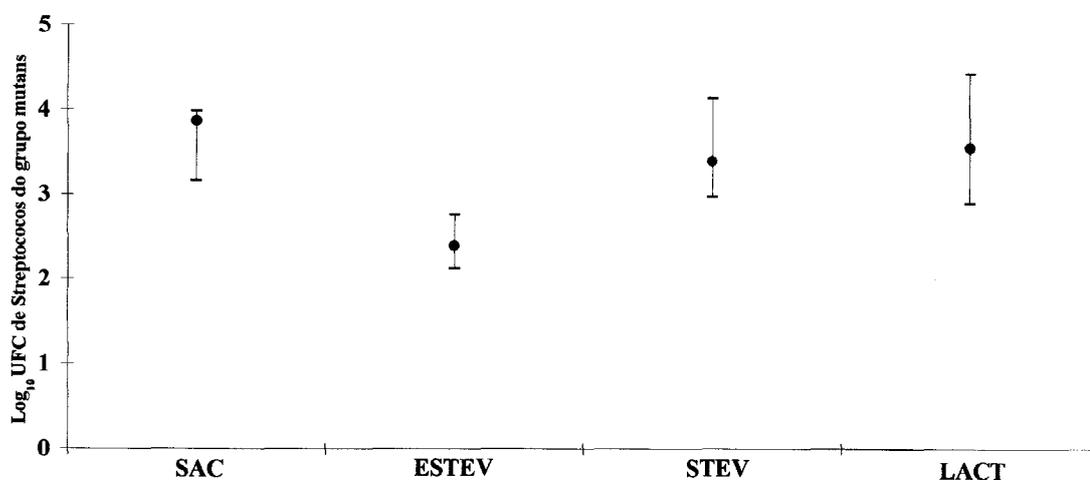
Tabela 2 - Nível de estreptococos do grupo mutans (\log_{10} UFC/mg de placa) após o tratamento com as soluções de sacarose (SAC), lactose (LACT), Stevita® (STEV) e esteviosídeo (ESTEVEV)

INDIVÍDUOS	SOLUÇÃO			
	SAC	LACT	STEV	ESTEVEV
1	2,778	3,041	3,041	2,301
2	6,114	2,699	3,398	0,000
3	2,778	0,000	0,000	1,845
4	3,863	4,813	4,954	2,748
5	4,079	4,602	3,580	2,869
6	3,362	4,146	4,380	2,778
7	3,869	3,556	2,908	2,398
Média	5,279 ^a	4,249 ^a	4,242 ^a	2,539 ^b
Desvio-Padrão	5,690	4,403	4,520	2,457

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ($p < 0,05$, Teste de Friedman)

A Figura 5 mostra a distribuição dos dados de estreptococos do grupo mutans de acordo com sua mediana e quartis dentro dos quatro tratamentos utilizados neste estudo.

Figura 5 - Mediana e quartis de \log_{10} UFC de streptococos do grupo mutans por mg de placa após tratamento com as soluções de sacarose (SAC), lactose (LACT), Stevita® (STEV) e esteviosídeo (ESTEVE)



De acordo com a Tabela 3, foi observado menor crescimento de lactobacilos com esteviosídeo ($0,310 \pm 0,481 \log_{10}$ UFC/mg de placa) do que com sacarose ($6,147 \pm 6,312 \log_{10}$ UFC/mg de placa) e com lactose ($5,386 \pm 5,718 \log_{10}$ UFC/mg de placa), $p < 0,001$. O nível de crescimento de lactobacilos com esteviosídeo e Stevita® foi semelhante.

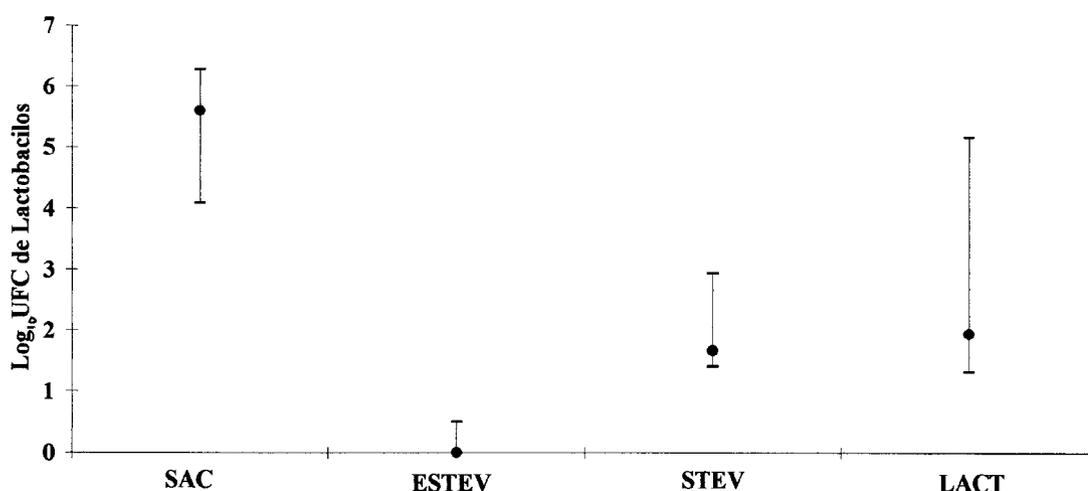
Tabela 3 - Nível de lactobacilos (\log_{10} UFC/mg de placa) após o tratamento com as soluções de sacarose (SAC), lactose (LACT), Stevita® (STEV) e esteviosídeo (ESTEVE)

INDIVÍDUOS	SOLUÇÃO-TESTE			
	SAC	LACT	STEV	ESTEVE
1	6,748	1,949	1,531	0,000
2	2,556	1,591	0,000	0,000
3	5,602	6,146	3,431	0,556
4	6,176	3,079	3,000	0,000
5	4,380	0,204	1,672	0,000
6	6,362	5,477	2,869	0,903
7	2,477	0,602	1,255	0,431
Média	6,147 ^a	5,386 ^a	2,812 ^b	0,310 ^b
Desvio-Padrão	6,312	5,718	2,996	0,481

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ($p < 0,001$, Teste de Friedman)

A Figura 6 mostra a distribuição dos dados de lactobacilos de acordo com sua mediana e quartis dentro dos quatro tratamentos utilizados neste estudo.

Figura 6 - Mediana e quartis de \log_{10} UFC de lactobacilos por mg de placa após tratamento com as soluções de sacarose (SAC), lactose (LACT), Stevita[®] (STEV) e esteviosídeo (ESTEVE)



5.3 Concentração de Polissacarídeos Solúveis e Insolúveis

As Tabelas 4, 5 e 6 mostram a média, o desvio-padrão e a amplitude das concentrações de polissacarídeos solúveis e insolúveis encontrados na placa bacteriana após o uso das diferentes soluções-testes, expressos em μg por mg de placa.

A solução de sacarose possibilitou a formação de placa bacteriana com concentrações mais elevadas de polissacarídeos solúveis ($33,68 \pm 14,63 \mu\text{g}/\text{mg}$ de placa) do que com as soluções de Stevita[®] ($7,53 \pm 3,66 \mu\text{g}/\text{mg}$ de placa) e de esteviosídeo ($5,80 \pm 4,36 \mu\text{g}/\text{mg}$ de placa) ($p < 0,01$) (Tabela 4). Apesar de a lactose produzir menores concentrações de polissacarídeos solúveis ($9,37 \pm 3,76 \mu\text{g}/\text{mg}$ de placa) do que a sacarose, essa diferença não foi estatisticamente significativa. A placa

bacteriana formada na presença de esteviosídeo foi a que apresentou as mais baixas concentrações de polissacarídeos solúveis.

A média da concentração de polissacarídeos solúveis produzidos na placa bacteriana na presença de sacarose foi seis vezes superior ao esteviosídeo, quatro vezes à da Stevita® e três vezes à da lactose. Não houve diferença significativa em termos de formação de polissacarídeos solúveis entre a lactose, a Stevita® e o esteviosídeo (Tabela 4).

Tabela 4 - Concentrações de polissacarídeos solúveis na placa bacteriana, após o tratamento com as soluções de sacarose, lactose, Stevita® e esteviosídeo

Tratamentos	Média ± Desvio-padrão (µg/mg)	Amplitude
Sacarose	33,68 ± 14,63 a	13,68 – 55,17
Lactose	9,37 ± 3,76 ab	5,55 – 16,70
Stevita®	7,53 ± 3,66 b	4,27 – 15,06
Esteviosídeo	5,80 ± 4,36 b	0,73 – 13,22

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ($p < 0,01$, Teste de Friedman).

Em relação à produção de polissacarídeos insolúveis (Tabela 5) formados na placa bacteriana após o uso das diferentes soluções-testes, o que se pode observar é que a placa bacteriana formada na presença de alta frequência de sacarose apresenta concentrações mais elevadas de polissacarídeos insolúveis ($124,81 \pm 101,56$ µg/mg de placa) do que as outras três soluções-testes lactose ($7,35 \pm 6,96$ µg/mg de placa), Stevita® ($8,08 \pm 5,28$ µg/mg de placa) e esteviosídeo ($5,32 \pm 5,03$ µg/mg de placa). A placa bacteriana formada na presença de esteviosídeo foi a que apresentou as menores concentrações de polissacarídeos insolúveis.

Tabela 5 - Concentrações de polissacarídeos insolúveis na placa bacteriana, após o tratamento com as soluções de sacarose, lactose, Stevita® e esteviosídeo

Tratamentos	Média ± Desvio-padrão (µg/mg)	Amplitude
Sacarose	124,81 ± 101,56 a	25,80 – 315,39
Lactose	7,35 ± 6,96 b	0,48 – 17,41
Stevita®	8,08 ± 5,28 b	2,70 – 18,17
Esteviosídeo	5,32 ± 5,03 b	0,50 – 15,54

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si (P<0,01, Teste de Friedman).

Como mostra a Tabela 6, o uso da solução-teste sacarose a 17% na frequência de sete vezes ao dia favoreceu a formação de placa bacteriana com concentrações de polissacarídeos totais (solúveis + insolúveis) dez vezes superior ao uso da lactose a 1,8% e da Stevita® a 2% e quatorze vezes superior ao do esteviosídeo a 0,2% na mesma frequência diária. Portanto, a placa bacteriana formada na presença de sacarose apresentou concentrações de polissacarídeos totais ($158,68 \pm 106,54$ µg/mg de placa), diferente estatisticamente ($p < 0,01$) dos adoçantes lactose ($16,78 \pm 5,52$ µg/mg de placa), Stevita® ($15,68 \pm 5,72$ µg/mg de placa) e esteviosídeo ($11,16 \pm 6,24$ µg/mg de placa). Nenhuma diferença estatística entre os adoçantes Stevita®, lactose e esteviosídeo foi observada.

Tabela 6 - Concentrações de polissacarídeos (solúveis+insolúveis) na placa bacteriana, após o tratamento com as soluções de sacarose, lactose, Stevita® e esteviosídeo (média, desvio-padrão e amplitude)

Tratamentos	Média ± Desvio-padrão (µg/mg)	Amplitude
Sacarose	158,68 ± 106,54 a	51,14 – 363,64
Lactose	16,78 ± 5,52 b	8,07 – 23,97
Stevita®	15,68 ± 5,72 b	6,97 – 24,08
Esteviosídeo	11,16 ± 6,24 b	1,23 – 18,95

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si (P<0,01, Teste de Friedman)

5.4 Exame visual com lupa dos blocos de esmalte dentário

A distribuição dos indivíduos com alteração na superfície dos blocos de esmalte após a utilização de diferentes soluções adoçantes é mostrada na Tabela 7.

Tabela 7 - Distribuição dos indivíduos (número e percentagem) com presença de alterações no esmalte após utilização de sacarose a 17% (SAC), lactose a 1,8% (LACT), Stevita® a 2% (STEV) e esteviosídeo a 0,2% (ESTEVE)

INDIVÍDUOS	SOLUÇÕES ADOÇANTES			
	SAC	LACT	STEV	ESTEVE
Sem alteração	0 (0,0)	2 (28,6)	4 (57,1)	7 (100)
Com alteração	7 (100)	5 (71,4)	3 (42,9)	0 (0,0)

Os números entre parênteses representam a percentagem

Observa-se que 100% dos indivíduos que utilizaram sacarose apresentaram alterações macroscópicas no esmalte. Essa proporção diminuiu com a lactose (71,4%) e com a Stevita® (42,9%). Nenhum indivíduo apresentou alteração nos blocos de esmalte quando utilizou o esteviosídeo.

A Tabela 8 apresenta a severidade do desenvolvimento da lesão de cárie na superfície dos blocos de esmalte após o tratamento com as respectivas soluções adoçantes.

Tabela 8 - Características macroscópicas dos blocos de esmalte (número e percentagem) submetidos a diferentes soluções adoçantes

EXAME VISUAL	SOLUÇÃO- TESTE			
	SAC	LACT	STEV	ESTEVE
Hígido	0 (0)	15 (53,6)	22 (78,6)	28 (100,0)
MB Loc	0 (0)	5 (17,8)	2 (7,1)	0 (0)
MB Gen	4 (14,3)	4 (14,3)	1 (3,6)	0 (0)
Cavidade	24 (85,7)	4 (14,3)	3 (10,7)	0 (0)
TOTAL	28 (100,0)	28 (100,0)	28 (100,0)	28 (100,0)

Os números entre parênteses representam a percentagem

A sacarose causou desmineralização em todos os blocos de esmalte, sendo que, na maioria dos casos (85,7%), ocorreu formação de cavidades. Nenhum caso de desmineralização clínica foi observado com o esteviosídeo. A lactose apresentou 46,4%

dos blocos com alteração macroscópica no esmalte (17,8% MBL, 14,3% MBG e 14,3% C). Em relação à Stevita®, constatou-se desmineralização em 21,4% dos blocos (7,1% MBL, 3,6% MBG e 10,7% C).

Nos casos em que ocorreu formação de cavidades, observa-se que a sacarose causou alterações mais severas, sendo as cavidades maiores e melhor definidas em relação às cavidades encontradas com as soluções de lactose e Stevita®.

A Tabela 9 apresenta o resultado da análise estatística entre as diferentes soluções adoçantes, segundo as alterações macroscópicas encontradas nos blocos de esmalte.

Tabela 9 - Análise estatística entre os diferentes adoçantes em relação ao número de blocos com alteração no esmalte e severidade de lesão

GRUPOS	SIGNIFICÂNCIA
SAC X LACT	S*
SAC X STEV	S
SAC X ESTEV	S
LACT X STEV	NS
LACT X ESTEV	S
STEV X ESTEV	NS

*Teste de Friedman, $p < 0,001$

Houve diferença estatisticamente significativa no número e severidade de lesão dos blocos de esmalte entre a sacarose e os demais adoçantes. Essa diferença foi observada também entre a lactose e o esteviosídeo. Apesar de a lactose apresentar no exame visual com lupa 46,4% dos blocos com alteração e a Stevita® 21,4% (Tabela 8), essa diferença não foi estatisticamente significativa. Não se observou diferença significativa entre a Stevita® e o esteviosídeo.

5.5 Medições de microdureza em profundidade no esmalte dentário

As médias e os desvios-padrões dos dados de microdureza de Knoop (KHN) nas profundidades estudadas para os diferentes tratamentos a que os blocos de esmalte dentário foram submetidos *in situ* estão apresentados na Tabela 10. As médias de microdureza nas diferentes profundidades mostram que o tratamento com sacarose foi aquele que apresentou os menores valores em todas as profundidades, demonstrando, assim, que o uso da solução-teste sacarose 17% foi capaz de provocar perda mineral no tecido dentário de todos os blocos de esmalte utilizados neste estudo (Figura 7). Até a profundidade de 70 μm , o tratamento com sacarose apresentou diferença estatisticamente significativa dos outros tratamentos, a partir de 90 μm de profundidade, esse tratamento atingiu um valor médio de KHN acima de 300. A sacarose ocasionou extensa área de desmineralização nos blocos de esmalte dentário de todos os indivíduos (Figura 8).

Os tratamentos com as soluções-testes lactose e Stevita® não mostraram diferença estatisticamente significativa entre as médias de microdureza nas profundidades de 10 a 70 μm . No entanto, a média de microdureza do esmalte com lactose foi menor até 20 μm de profundidade diferindo estatisticamente do esteviosídeo e do controle. Isso demonstra que a lactose promove perda mineral no esmalte dentário quando utilizada nas concentrações e frequências diárias deste estudo (Figura 9). Observou-se uma grande variação entre os indivíduos quanto ao grau de severidade da lesão quando utilizou-se lactose; no entanto, nem todos os blocos de esmalte exibiram perda mineral (Figuras 10a e 10b).

Na profundidade de 30 μm , a lactose apresenta a média de KHN menor do que o esteviosídeo e o controle, apesar de a diferença com o controle não ser estatisticamente significativa. Já na profundidade de 50 μm não é observada diferença estatística entre a lactose e os outros tratamentos estudados, com exceção da sacarose.

Tabela 10 - Microdureza em profundidade (KHN) dos blocos de esmalte dentário com os tratamentos Sacarose, Lactose, Stevita[®], Esteviosídeo e Controle (média, desvio-padrão e amplitude).

Tratamentos	n	Profundidades						
		10µm	20µm	30µm	50µm	70µm	90µm	110µm
Sacarose	26	30,92 ± 50,27 ^a (0,0 - 185,0)	50,15 ± 70,14 ^a (0,0 - 208,0)	90,75 ± 90,84 ^a (0,0 - 274,3)	201,47 ± 109,61 ^a (0,0 - 408,7)	266,38 ± 84,48 ^a (0,0 - 402,7)	301,86 ± 55,74 ^a (135,0 - 389,0)	316,27 ± 36,21 ^a (222,7 - 384,3)
Lactose	25	194,58 ± 115,49 ^b (0,0 - 369,0)	235,99 ± 76,89 ^b (0,0 - 336,0)	263,09 ± 65,00 ^b (0,0 - 329,0)	306,68 ± 71,61 ^b (0,0 - 403,7)	311,68 ± 51,81 ^b (85,2 - 373,3)	314,89 ± 34,86 ^a (232,7 - 393,0)	323,96 ± 28,58 ^{ac} (270,0 - 381,0)
Stevita [®]	27	228,30 ± 80,38 ^{bd} (35,9 - 361,0)	255,05 ± 62,77 ^{bc} (58,3 - 340,0)	286,85 ± 55,77 ^{bc} (68,9 - 358,0)	328,94 ± 44,87 ^b (161,7 - 404,0)	333,56 ± 33,94 ^b (235,3 - 385,0)	342,28 ± 30,21 ^b (280,7 - 395,0)	349,91 ± 27,32 ^b (268,7 - 409,7)
Esteviosídeo	28	254,79 ± 58,55 ^{cd} (137,7 - 371,0)	295,63 ± 41,43 ^c (203,7 - 381,0)	312,54 ± 40,55 ^c (247,7 - 391,0)	346,82 ± 18,56 ^b (316,7 - 407,0)	345,91 ± 24,68 ^b (279,7 - 390,0)	349,07 ± 21,48 ^b (300,3 - 388,3)	348,82 ± 26,47 ^b (278,3 - 407,0)
Controle	28	286,00 ± 53,62 ^c (174,0 - 372,0)	290,91 ± 29,55 ^c (231,0 - 348,0)	307,80 ± 32,09 ^{bc} (254,0 - 392,3)	344,70 ± 26,22 ^b (305,0 - 399,3)	345,14 ± 28,95 ^b (270,3 - 389,0)	344,43 ± 19,76 ^b (306,0 - 384,0)	343,37 ± 20,23 ^{bc} (297,3 - 375,0)

* Médias seguidas de letras distintas diferem entre si na mesma coluna - Teste de Tukey (p<0,05).

Figura 7 - Zona de lesão de cárie com indentações em um dos blocos de esmalte dentário submetido ao tratamento com sacarose 17%, sete vezes ao dia, no indivíduo 1 (200 x). 1 - resina, 2 - esmalte dentário, 3 - lesão de cárie em esmalte, ← = indentação.



Figura 8 - Percentual de volume mineral versus profundidade da superfície dos blocos de esmalte dentário submetidos ao tratamento com sacarose do indivíduo 2.

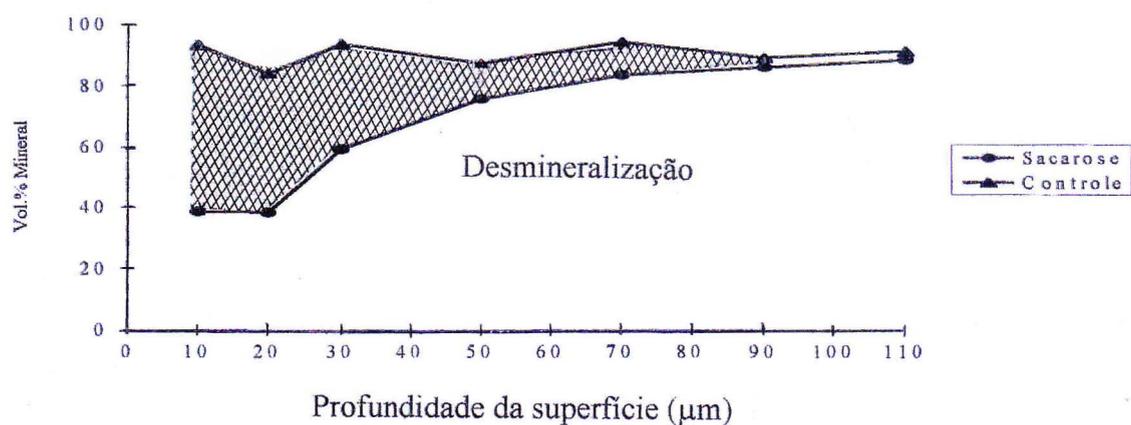
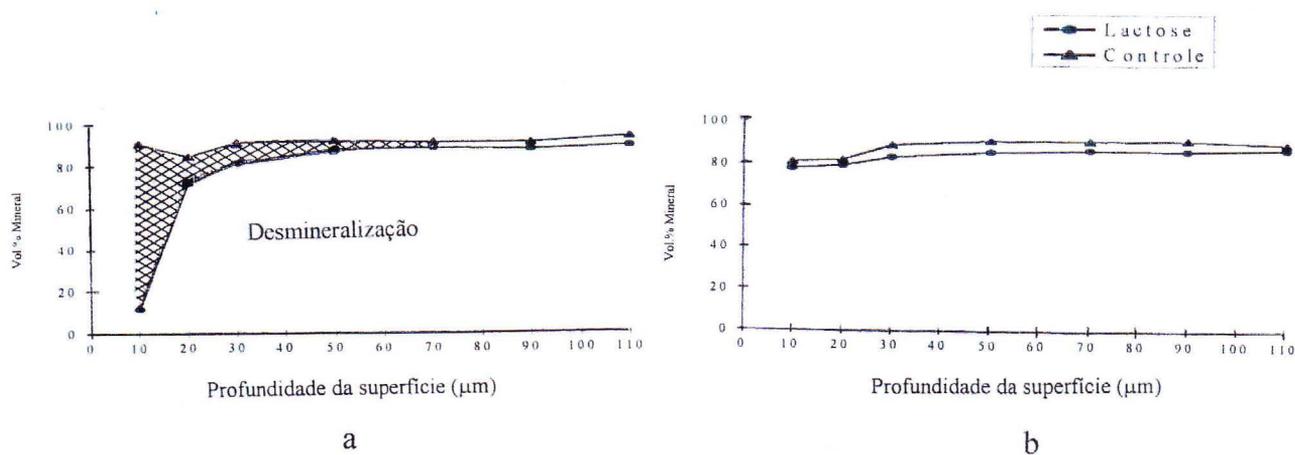


Figura 9 - Zona de lesão de cárie com indentações em um dos blocos de esmalte dentário submetido ao tratamento com lactose 1,8%, sete vezes ao dia, no indivíduo 1 (200 x). 1 - resina, 2 - esmalte dentário, 3 - lesão de cárie em esmalte, ← = indentação.



Figura 10 - Percentual de volume mineral versus profundidade da superfície dos blocos de esmalte dentário submetidos ao tratamento com lactose do indivíduo 1 (a) e do indivíduo 2 (b).



A Stevita® apresentou médias de microdureza maiores do que a sacarose, e, portanto, foi diferente estatisticamente dessa em todas as profundidades. A Stevita® obteve valores de média de KHN menores (228,70) que o controle (286,00) somente na profundidade de 10 μm , sendo diferente estatisticamente desse nessa profundidade. A Stevita® mostra valores de KHN intermediários entre a lactose e o esteviosídeo, não apresentando diferença estatística desses dois adoçantes.

As Figuras 11 e 12 mostram respectivamente a lesão de cárie subsuperficial e a área de perda mineral nos blocos de esmalte dentário tratados com Stevita® provocadas por esse tratamento nos indivíduos 1 e 3. O indivíduo 1 apresentou desmineralização em dois blocos de esmalte, o indivíduo 3 em todos os blocos e o indivíduo 2 em apenas um dos quatro blocos, os demais indivíduos não apresentaram blocos de esmalte com perda mineral.

O esteviosídeo não ocasionou desmineralização nos blocos de esmalte dentário de todos os indivíduos (Figura 13). Analisando as médias de microdureza referente às profundidades dentro de cada tratamento, verifica-se que somente o controle e o esteviosídeo não apresentaram diferenças significativas entre si em nenhuma profundidade, isto é, os blocos de esmalte dentário tratados com esteviosídeo mostraram um perfil de microdureza semelhante aos blocos de esmalte controle, que não foram colocados na cavidade bucal (Figura 14).

Figura 11 - Zona de lesão de cárie com indentações em um dos blocos de esmalte dentário submetido ao tratamento com Stevita® do indivíduo 1 (200 x). 1 - resina, 2 - esmalte dentário, 3 - lesão de cárie em esmalte, ← = indentação.

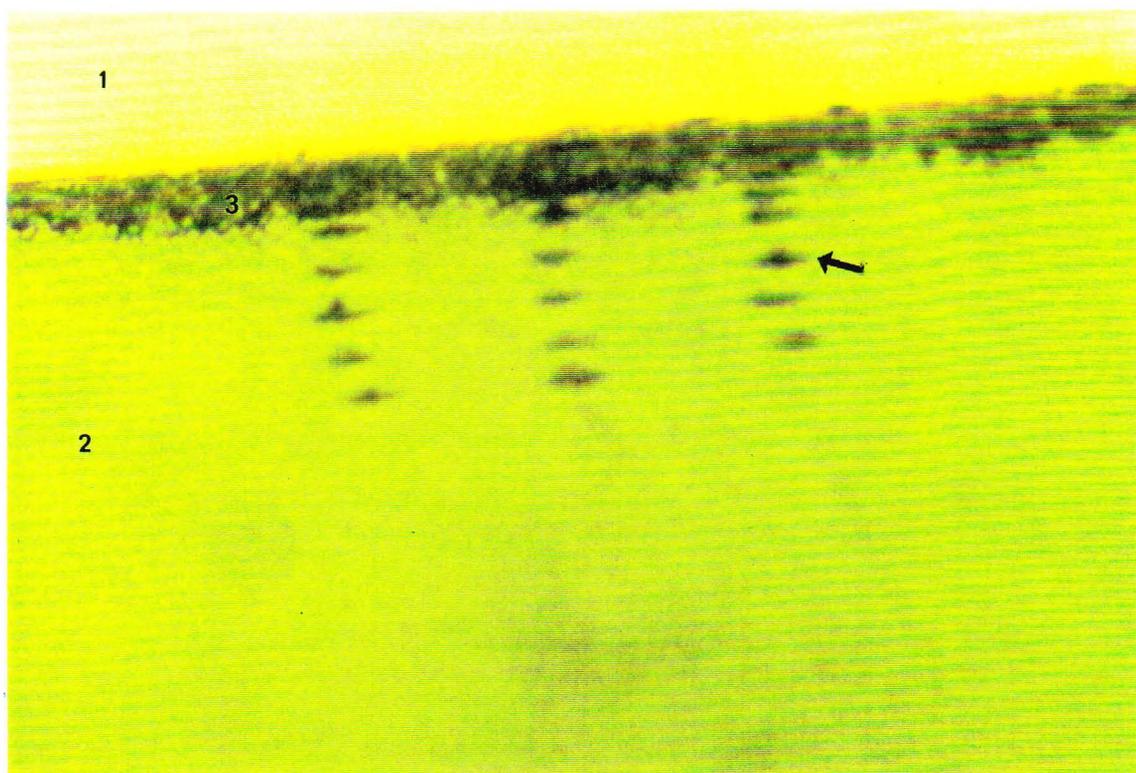


Figura 12 - Percentual de volume mineral versus profundidade da superfície dos blocos de esmalte dentário submetidos ao tratamento com Stevita® dos indivíduos 1 (a) e 3 (b).

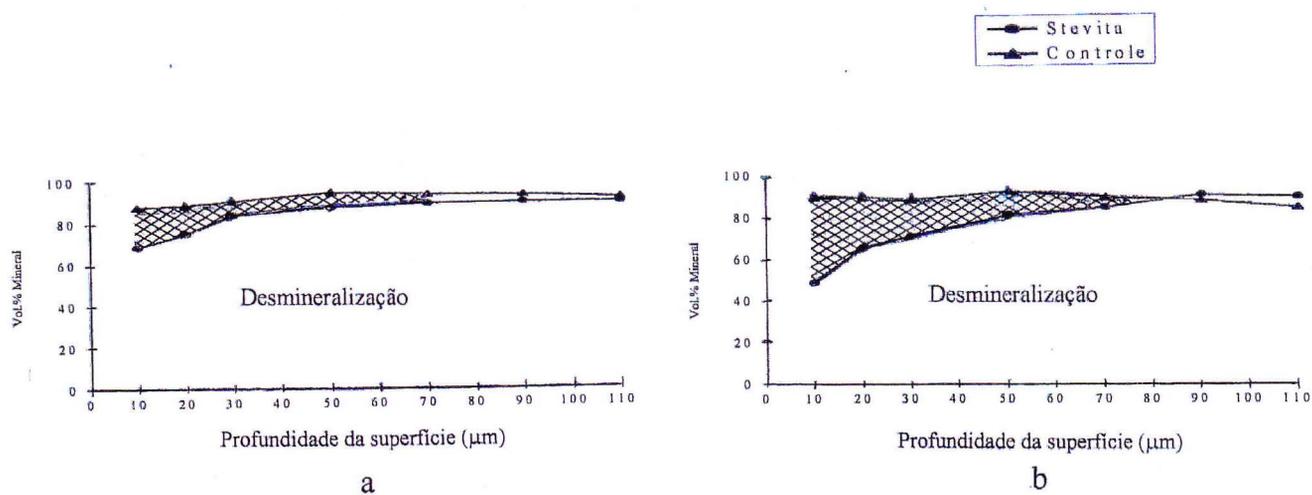


Figura 13 - Bloco de esmalte dentário sem lesão de cárie submetido ao tratamento com esteviosoído do indivíduo 4 (200 x). 1 - resina, 2 - esmalte dentário, ← = indentação.

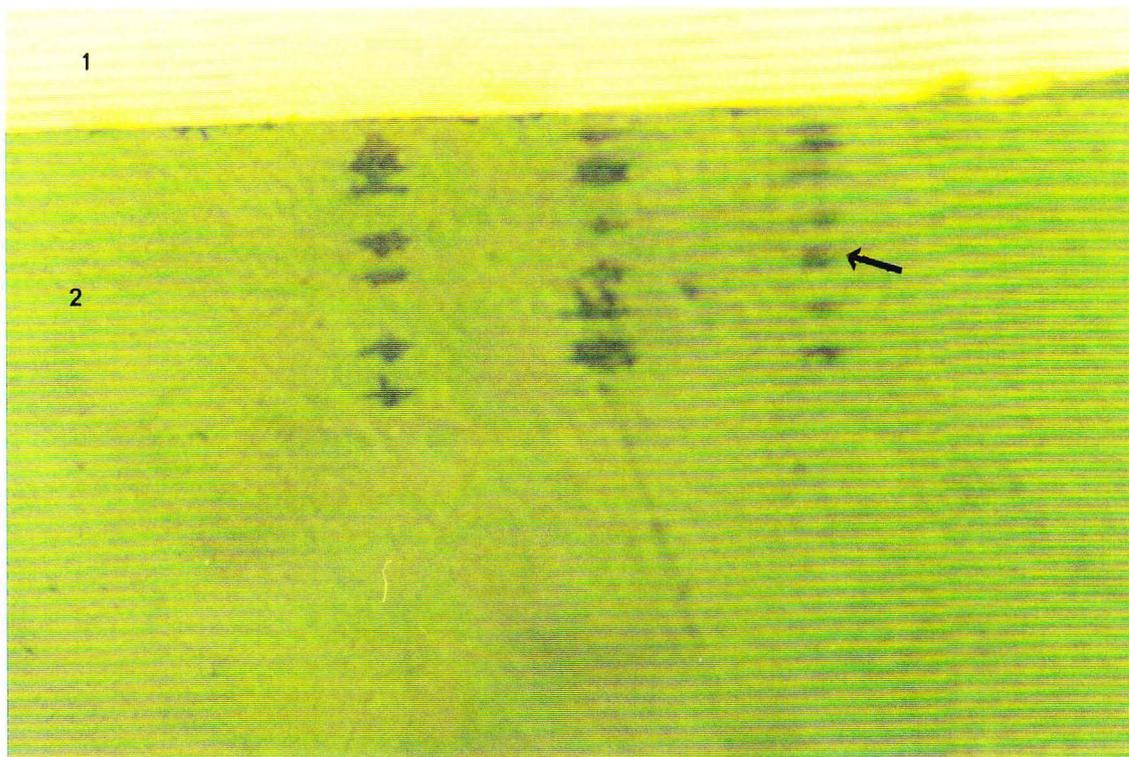
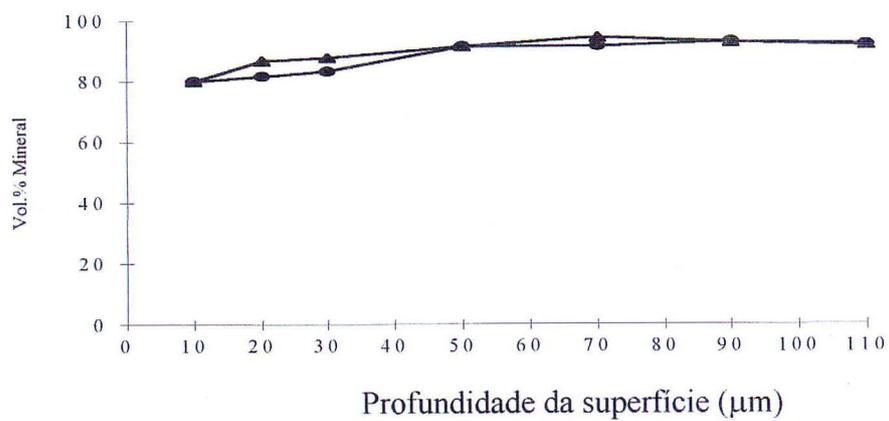


Figura 14 - Percentual de volume mineral versus profundidade da superfície dos blocos de esmalte dentário submetidos ao tratamento com esteviosoído do indivíduo 4.



6. DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliado o potencial cariogênico do adoçante comercial Stevita®, que tem na sua formulação 90% de lactose e 10% de esteviosídeo, comparando com soluções de lactose, esteviosídeo e sacarose utilizando um modelo *in situ*.

Os resultados encontrados mostram que a sacarose é o tratamento mais cariogênico, o que coincide com outros trabalhos existentes na literatura (GUSTAFSSON et al, 1954; KOULORIDES et al, 1976; TEHRANI et al, 1983; BRUDEVOLD et al, 1983; REBELO, 1994). O tratamento com esteviosídeo mostrou-se não cariogênico como indicam os estudos *in vitro* (YABU et al, 1977; IKEDA et al, 1978; BERRY e HENRY, 1981; PINHEIRO et al, 1987; CHEDID, 1990; MALTZ et al, 1992) e em animais (OLIVEIRA et al, 1985; DAS et al, 1992). A lactose apresentou uma cariogenicidade menor do que a sacarose, como nos estudos em modelos intra-orais de KOULORIDES et al (1976); BRUDEVOLD et al (1983); BIRKHED et al (1993). MALTZ et al (1992), estudando o efeito *in vitro* da sacarose, lactose, Stevita® e esteviosídeo no metabolismo de bactérias cariogênicas, observou que a produção de ácido e polissacarídeos é maior na presença de sacarose do que de lactose. A Stevita® apresentou resultados semelhantes à lactose. No presente estudo, a Stevita® apresentou uma cariogenicidade menor que a lactose e maior do que o esteviosídeo. Os resultados indicam que o produto comercial Stevita®, à base de lactose e esteviosídeo, é um substituto adequado para a sacarose.

As análises de microdureza em profundidade e do exame visual com lupa mostraram perda mineral em todos os blocos de esmalte dentário de todos os indivíduos quando a sacarose foi utilizada na frequência de sete vezes ao dia. Os blocos de esmalte dentário exibiam na maioria das vezes cavitação evidente, inclusive quando do exame visual com lupa. KOULORIDES et al (1976) testando solução de sacarose em concentração e frequência menores do que a do presente estudo (solução de sacarose a 3%, quatro vezes ao dia), observaram desmineralização nos blocos de esmalte dentário. Uma relação positiva entre frequência de ingestão de sacarose e desmineralização do

esmalte dentário também foi observada em outros trabalhos. REBELO (1994), utilizando *in situ* solução de sacarose a 20%, nas frequências de zero, duas, quatro e oito vezes ao dia, observou que a partir de quatro vezes, os blocos de esmalte já exibiam desmineralização, sendo que na frequência de oito vezes ao dia, todos os blocos de esmalte apresentavam desmineralização. TEHRANI et al (1983) verificaram que solução de sacarose a 1%, seis vezes ao dia, provoca desmineralização dos blocos de esmalte em todos os indivíduos.

O tratamento com esteviosídeo não ocasiona perda mineral nos blocos de esmalte dentário, conforme mostram os dados de microdureza em profundidade e do exame visual com lupa, coincidindo com os estudos realizados em animais (ratos) por OLIVEIRA et al (1985) e DAS et al (1992).

O uso da solução de lactose a 1,8% provocou perda mineral no esmalte dentário em média até a profundidade de 30 μ m. Quase a metade (47%) dos blocos de esmalte testados com lactose apresentavam algum grau de lesão de cárie, quando do exame visual com lupa, sendo que 14,3 % dos blocos de esmalte exibiram cavitação. Estudos em humanos, usando modelos intra-orais, onde o efeito cariogênico da lactose foi avaliada junto com outros açúcares, mostraram resultados semelhantes ao deste estudo em termos de desmineralização dos blocos de esmalte dentário (KOULORIDES et al, 1976; BRUDEVOLD et al, 1983). Observou-se, neste estudo, uma certa variabilidade na severidade das lesões de cárie entre os indivíduos (Tabela 10). Isso pode ser observado nas Figuras 10 a e b, onde os dados de percentual de volume mineral nos blocos testes e controle nas diferentes profundidades são apresentados. Nota-se na Figura 10a, correspondente ao uso da lactose pelo indivíduo um, a extensa área de desmineralização, enquanto que no indivíduo dois, essa área praticamente não existe, pois as medidas de microdureza dos blocos testes são muito semelhantes aos seus respectivos controles (Figura 10b).

BRUDEVOLD et al (1983) e BIRKHED et al (1993), ao discutirem os resultados encontrados com a lactose em termos de desmineralização dos blocos de esmalte dentário e efeito sobre o pH da placa bacteriana *in vivo*, mencionam o fato de que a fermentação da lactose pelos microrganismos da placa depende da síntese de

enzimas indutíveis, fazendo com que o potencial cariogênico da lactose em diferentes humanos ou em um sujeito em diferentes tempos possa variar grandemente, dependendo de exposições recentes à lactose. Essa é uma das prováveis explicações para a variação na severidade da desmineralização dos blocos de esmalte dentário observada neste estudo entre os indivíduos que utilizaram lactose. KOULORIDES et al (1976), MACPHERSON et al (1990) e FEATHERSTONE e ZERO (1992) observaram, em estudos *in situ*, com esse e outros substratos, grande variação entre indivíduos. No presente estudo foi observada também variação entre indivíduos nos tratamentos com sacarose e Stevita®, portanto outras variáveis como composição da saliva, fluxo salivar, capacidade tampão da saliva, dieta dos indivíduos, etc. podem estar influenciando essa variação.

Os resultados de desmineralização dos blocos de esmalte dentário foram diferentes entre lactose e esteviosídeo, mas não houve diferença estatística entre Stevita® e lactose e Stevita® e esteviosídeo, conseqüentemente o tratamento com a Stevita® mostrou perdas minerais no esmalte dentário menores do que a lactose e maiores do que o esteviosídeo, mostrando um comportamento intermediário a esses dois adoçantes.

Estudos mostram uma certa correlação entre freqüência de consumo de sacarose e aumento no número de estreptococos do grupo mutans na placa e na saliva (VAN HOUTE, 1980; ZICKERT et al, 1982; ZERO et al, 1986; MACPHERSON et al, 1990). Neste estudo, a colonização dos blocos de esmalte dentário por estreptococos do grupo mutans ocorreu em todos os indivíduos que tinham entre 10^2 e 10^5 UFC de estreptococos do grupo mutans por ml de saliva. Os blocos de esmalte dentário, submetidos à solução-teste sacarose a 17%, sete vezes ao dia, apresentaram níveis mais elevados de estreptococos do grupo mutans quando comparados aos outros tratamentos. No entanto, o nível de estreptococos do grupo mutans entre a sacarose, lactose e Stevita® não apresentaram diferença estatisticamente significativa. O tratamento com esteviosídeo foi o que apresentou os mais baixos níveis de colonização por estreptococos do grupo mutans, diferindo estatisticamente da sacarose, lactose e Stevita®.

Os dados obtidos neste estudo, em termos de colonização dos blocos de esmalte dentário por estreptococos do grupo mutans com os tratamentos sacarose, lactose e Stevita®, são compatíveis com a presença de desmineralização encontrada nesses blocos de esmalte, bem como os baixos níveis de SM encontrados no tratamento com esteviosídeo são igualmente compatíveis com a ausência de perda mineral observada nos blocos de esmalte utilizados nesse tratamento. Resultados semelhantes foram observados por MACPHERSON et al (1990), que encontraram níveis mais elevados de SM nos sítios de esmalte que apresentavam maior perda mineral. No presente estudo, assim como no de MACPHERSON et al (1990), observou-se a presença de SM em sítios de esmalte, onde mínima ou nenhuma desmineralização ocorreu. Esses resultados situam-se dentro da variação encontrada por outros trabalhos (DUCHIN e VAN HOUTE, 1978; MARSH et al, 1989).

Os níveis de lactobacilos na placa bacteriana são geralmente muito baixos, tanto nas placas sobre a superfície hígida como sobre lesões de “mancha branca”(IKEDA et al, 1973). MACPHERSON et al (1990) observaram que ocorre níveis mais elevados de lactobacilos em sítios de esmalte onde há perdas minerais extensas. No presente trabalho, nos tratamentos com sacarose e lactose, cujos blocos de esmalte dentário apresentam além de lesões de mancha branca também cavitação, observou-se níveis mais elevados de lactobacilos. A Stevita® apresentou graus leves de desmineralização dos blocos de esmalte dentário e apenas um indivíduo apresentou cavidades quando do exame visual com lupa. No entanto, essas cavidades não foram observadas no microdurômetro devido à localização do corte realizado nos blocos de esmalte para realização das medições de microdureza em profundidade. Os blocos de esmalte usados com Stevita® só diferiram estatisticamente dos blocos controle em microdureza na profundidade de 10 μm , e os níveis de lactobacilos foram extremamente baixos. O tratamento com esteviosídeo não ocasionou desmineralização dos blocos de esmalte, apresentando níveis baixos de lactobacilos em três indivíduos e não sendo detectado nos demais. Os níveis de lactobacilos com esteviosídeo foram menores que com os outros adoçantes, mas não diferiram estatisticamente da Stevita®. Os achados mostram que os níveis de lactobacilos na placa aumentam na presença de desmineralização estabelecida e que as mudanças no ambiente local favorecem esses

microrganismos. Os resultados estão de acordo com as observações de EDWARDSSON (1974) e MACPHERSON et al (1990), que indicam que os lactobacilos estão associados com a progressão da lesão através do esmalte para dentro da dentina.

Vários estudos com modelos intra-orais foram conduzidos em períodos de duas semanas (ZERO et al, 1991) ou até menos (KOULORIDES et al, 1976; BRUDEVOLD et al, 1983). Como os indivíduos que participaram do presente estudo residem em local com água fluoretada, optou-se por períodos experimentais de quatro semanas, para que os tratamentos pudessem provocar desmineralização nos blocos de esmalte dentário.

Nos aparelhos de acrílico intra-orais utilizados pelos indivíduos, uma tela plástica foi colocada 1mm acima dos blocos de esmalte para maior retenção de placa sobre os mesmos e induzindo, dessa maneira, condições de alto desafio cariogênico. No estudo-piloto, observou-se que o não uso da tela plástica sobre os blocos de esmalte faz com que parte da placa bacteriana se desprenda com o decorrer do experimento.

A presença de placa volumosa também está associada à frequência de ingestão de sacarose. Observou-se que o tratamento com sacarose promove a formação de uma quantidade maior de placa bacteriana sobre os blocos de esmalte dentário. No presente estudo, o peso úmido de placa bacteriana foi semelhante estatisticamente entre a lactose e a sacarose e entre a lactose, a Stevita® e o esteviosídeo. Essa semelhança entre sacarose e lactose pode ser explicada pelo fato de que, embora tenha sido permitido um acúmulo de placa por 28 dias, a espessura final foi limitada pela altura entre as superfícies dos blocos e a tela plástica que os protegia. Caso a espessura de placa não tivesse sido limitada, provavelmente as diferenças seriam mais evidentes, pois a sacarose aumenta a quantidade de placa formada (MANDEL, 1974; REBELO, 1994).

Os achados em relação ao peso úmido de placa bacteriana são compatíveis com as concentrações de polissacarídeos insolúveis encontrados na placa bacteriana formada sobre os blocos de esmalte dentário com os diferentes tratamentos.

Os resultados mostram que houve uma maior concentração de polissacarídeos insolúveis (carboidratos solúveis em álcali) e total de polissacarídeos na placa bacteriana formada na presença de sacarose. Resultados semelhantes foram encontrados também por MANDEL (1974), GAWRONSKI et al (1975), GEDDES et al (1978) e REBELO (1994). O tratamento com sacarose diferiu estatisticamente da lactose, isto também foi demonstrado *in vivo* por ARAUJO et al (1994); da Stevita® como observado *in vitro* por MALTZ et al (1992); e do esteviosídeo como foi avaliado *in vitro* por CHEDID (1990) e MALTZ et al (1992). Os resultados obtidos neste estudo são coerentes com o conhecimento científico sobre o papel dos polissacarídeos na cariogenicidade da placa bacteriana. Desse modo, a maior concentração de polissacarídeos insolúveis (mutanos), formada na presença de sacarose, levaria a uma placa mais cariogênica. O PEC é uma substância que propicia a formação de uma placa espessa na medida em que aumenta a aderência entre as bactérias e dessas às superfícies lisas dos dentes (NEWBRUN, 1988; RÖLLA, 1989; MACPHERSON et al, 1990). Os polissacarídeos extracelulares, além de serem importantes para a adesão bacteriana, também contribuem para as propriedades de difusão na matriz da placa e para a cariogenicidade dos estreptococos do grupo mutans (GIBBONS e VAN HOUTE, 1973; ZERO et al, 1986). Uma explicação para isto é que a matriz influencia a difusão de açúcares na placa bacteriana e aumenta a concentração de ácido na interface esmalte-placa (RÖLLA, 1989), onde quedas mais acentuadas de pH ocorrem (FU e ZERO, 1991).

Os tratamentos com lactose, Stevita® e esteviosídeo acarretam baixas concentrações de polissacarídeos insolúveis e total de polissacarídeos quando comparados com o tratamento com sacarose. Essas baixas concentrações de polissacarídeos insolúveis não são atribuídas às substâncias testadas, pois as mesmas não dão origem a polissacarídeos extracelulares. Os polissacarídeos extracelulares só se formam na presença de sacarose. Portanto, as concentrações de polissacarídeos insolúveis, encontradas na placa bacteriana formada na presença de lactose, Stevita® e esteviosídeo, devem ser decorrentes da dieta desses indivíduos, visto que mesmo que esses indivíduos tenham ingerido alimentos sem o aparelho de acrílico intra-oral, os alimentos ingeridos demoram um certo tempo para serem eliminados da cavidade bucal

e, conseqüentemente, podem ter sido aproveitados pelas bactérias das placas dos blocos experimentais, que voltaram à boca logo após a alimentação.

Apesar da variação entre os indivíduos dentro de cada tratamento, este estudo consegue mostrar as diferenças em termos de potencial cariogênico entre os adoçantes testados. A sacarose é o tratamento mais cariogênico, isto ficou demonstrado através das variáveis estudadas: peso úmido de placa bacteriana, níveis de bactérias cariogênicas, concentração de polissacarídeos insolúveis e total de polissacarídeos, bem como pelas perdas minerais provocadas em 100 % dos blocos de esmalte dentário. O tratamento com esteviosídeo pode ser considerado não cariogênico, pois diferiu estatisticamente da sacarose em relação aos valores encontrados para peso úmido de placa bacteriana, concentração de polissacarídeos solúveis, insolúveis e total de polissacarídeos e pela ausência de perda mineral nos blocos de esmalte compatíveis com os baixos níveis de estreptococos do grupo mutans e lactobacilos encontrados na placa bacteriana formada sobre esses blocos.

A lactose promoveu uma perda mineral menor do que a sacarose, apesar de que as variáveis peso úmido de placa e níveis de estreptococos do grupo mutans e lactobacilos mostrarem-se semelhantes com os dois tratamentos. No entanto, em relação às concentrações de polissacarídeos insolúveis e total de polissacarídeos, esses adoçantes diferiram estatisticamente, reforçando os dados já existentes na literatura de que a concentração de polissacarídeos na placa influencia seu potencial cariogênico.

A Stevita® mostrou-se semelhante à lactose, quanto às variáveis peso úmido de placa, nível de estreptococos do grupo mutans, concentração de polissacarídeos e microdureza em profundidade. Ela também apresentou um comportamento semelhante ao esteviosídeo quanto às variáveis níveis de lactobacilos, concentração de polissacarídeos e microdureza em profundidade. Portanto, a Stevita® é um adoçante com cariogenicidade intermediária à lactose e ao esteviosídeo, podendo ser utilizado como substituto da sacarose em pacientes com alta atividade cariogênica.

7. CONCLUSÕES

1) A sacarose é um tratamento altamente cariogênico, pois provocou desmineralização em todos os blocos de esmalte dentário de todos os indivíduos.

2) O tratamento com esteviosídeo é não cariogênico. Não ocasionou perda mineral nos blocos de esmalte dentário e apresentou valores inferiores ao tratamento com Stevita®, para peso úmido de placa bacteriana e nível de estreptococos do grupo mutans. O esteviosídeo diferiu da sacarose em todas as variáveis.

3) A lactose apresentou menor grau de cariogenicidade do que a sacarose, o que pode ser observado pelos resultados de perda mineral nos blocos de esmalte dentário e concentração de polissacarídeos insolúveis.

4) A Stevita® é um adoçante com cariogenicidade intermediária a lactose e ao esteviosídeo, podendo ser utilizado como substituto da sacarose no tratamento de pacientes com alta atividade cariogênica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALALUUSUA, S. et al. Salivary caries-related tests as predictors of future caries increment in teenagers. A three year longitudinal study. *Oral Microbiology and Immunology*, Copenhagen, v.5, p.77-81, 1990.
2. ARAUJO, D.R. et al. *Estudo in situ da cariogenicidade do leite humano*. In: XI REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISAS ODONTOLÓGICAS. Anais ...São Paulo: Sociedade Brasileira de Pesquisas Odontológicas, Divisão da IADR, 1994. Abstract 321.
3. ARENDS, J.; SCHUTHOF, J; JONGEBLOED, W.G. Lesion depth and microhardness indentations on artificial white spot lesions. *Caries Research*, Basel, v.14, n.4, p.190-195, 1980.
4. ASSIS, V.Q.; RODRIGUES, L.E.A. Efeito *in vitro* do esteviosídeo sobre a atividade lisossômica. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v.40, n.1, p.57-59, jan. 1988.
5. ASSIS, V.Q.; COSTA, M.F.; RODRIGUES, L.E.A. *In vivo* effects of stevioside upon mice liver and kidney lysosomes. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v.43, n.4, p.310-312, Jul./Aug., 1991.
6. AURICCHIO, M.T.; BATISTIC, M.A.; HOPPEN, V.R.; YAMASHITA, I.Y. Pesquisa de adoçantes não calóricos sintéticos em adoçante natural de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, São Paulo, v.2, n.4, p.53-61, 1987/89.
7. BANÓCZY, J. et al. Three years results with sorbitol in clinical longitudinal experiments *Journal of the International Association of Dentistry for Children*, London, v.12, n.2, p.59- 63, Dec. 1981.
8. BENELLI, E.M.; SERRA, M.C.; RODRIGUES JR., A.L.; CURY, J.A. *In situ* anticariogenic potencial of glass ionomer cement. *Caries Research*, Basel, v.27, n.4, p.280-284, 1993.
9. BERRY, C.W.; HENRY, C.A. Effect of stevioside on the growth and acid production of *Streptococcus mutans*. *Journal of Dental Research*, Washington, v.60, p.430, 1981, Abstract 480, Sp. Issue.
10. BIRKHED, D. Sugar substitutes: one consequence of the Vipeholm study? *Scandinavian Journal of Dental Research*, Copenhagen, v.97, n.2, p. 126-129, Apr. 1989.
11. BIRKHED, D.; IMFELD, T.; EDWARDSSON, S. pH changes in human dental plaque from lactose and milk before and after adaptation. *Caries Research*, Basel, v. 27, n.1, p.43-50, 1993.

12. BLOCK, S.S. *Desinfection, esterilization and preservation*. 4.ed. Filadelfia: Lea Febiger, 1991.
13. BRATTHALL, D. Demonstration of five serological groups of streptococcal strains resembling *Streptococcus mutans*. *Odontologisk Revy*, Malmo, v.21, p.143-152, 1970.
14. BRATTHALL, D. et al. *Streptococcus mutans* and dental caries in urban and rural schoolchildren in Thailand. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, Copenhagen, v.14, p.274-276, 1986.
15. BRATTHALL, D.; ERICSSON, D. Testes para determinar o risco de cárie dentária. In: THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. *Cariologia clínica*. 2.ed., São Paulo: Santos, 1995, Cap. 16, p.333-353.
16. BOWDEN, G.; EDWARDSSON, S. Ecologia oral e cárie dentária. In: THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. *Cariologia clínica*. 2.ed., São Paulo: Santos, 1995, Cap.3, p.45 -69.
17. BRUDEVOLD, F. et al. Enamel demineralization potencial of dietary carbohydrates. *Journal of Dental Research*, Washington, v.62, n.12, p. 1218-1220, Dec. 1983.
18. BURT, B.A. et al. The effects of sugars intake and frequency of ingestion on dental caries increment in a three-year longitudinal study. *Journal of Dental Research*, Washington, v.67, p.1422-1429, 1988.
19. BURT, B.A. Relative consumption of sucrose and others sugars: has it been a factor in reduced caries experience? *Caries Research*, Basel, v. 27, p.56-63, 1993, suppl. 1.
20. CARBONEL, V.V. et al. *Estudo in situ da cariogenicidade do leite bovino*. In: XI REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISAS ODONTOLÓGICAS. Anais... São Paulo: Sociedade Brasileira de Pesquisas Odontológicas, Divisão Brasileira da IADR. Águas de São Pedro, 1994. Abstract 320.
21. CARLSSON, J. Presence of various types of non-haemolytic streptococci in dental plaque and other sites of the oral cavity in man. *Odontologisk Revy*, Malmo, v.18, p.55-74, 1967.
22. CARLSSON, J. Microbiologia da doença periodontal associada à placa. In: LINDHE, J. *Tratado de Periodontologia Clínica*. Rio de Janeiro: Interamericana, 1985. Cap.4, p.89-107.

23. CARLSSON, P.; OLSSON, B.; BRATTHALL, D. The relationship between the bacterium *Streptococcus mutans* in the saliva and dental caries in children in Mozambique. *Archives of Oral Biology*, Oxford, v.3, p.265-268, 1985.
24. CARLSSON, P. et al. High prevalence of mutans streptococci in a population with extremely low prevalence of dental caries. *Oral Microbiology and Immunology*, Copenhagen, v.2, p.121-124, 1987.
25. CARLSSON, P. The distribution of mutans streptococci in populations with different levels of sugar consumption. *Scandinavian Journal of Dental Research*, Copenhagen, v.97, n.2, p.120-125, Apr. 1989.
26. CARLSSON, P.; HAMILTON, I. Atividade metabólica das bactérias orais. In: THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. *Cariologia clínica*. 2.ed., São Paulo: Santos, 1995, Cap.4, p.71-88.
27. CHAGAS, A.M. et al. Estudo da atividade da *Stevia rebaudiana* Bertoni sobre o sistema nervoso central em camundongos. *Saúde*, Santa Maria, v.11, n.1-2, p.31-38, jan./dez., 1985.
28. CHAGAS, A.M. et al. Ação do extrato aquoso de *Stevia rebaudiana* e seu esteviosídeo nos parâmetros renais de cães hidropênicos ou com sobrecarga hídrica. *Revista Ciência e Biomédica*, São Paulo, v.11, p.1-11, 1990.
29. CHANDLER, N.P. Preparation of dental enamel for use in intraoral cariogenicity experiments. *Journal of Dentistry*, Guildford, v.18, p.54-58, 1990.
30. CHEDID, S.J. *Efeito dos adoçantes: esteviosídeo, aspartame, xilitol e sacarina sobre a fermentação e síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis pelo Streptococcus mutans GS-5 e LM-7 e pela placa bacteriana in vitro*. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP, 1990. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria). São Paulo: Faculdade de Odontologia, USP, 1990.
31. COLMAN, G.; BALL, L.C. Identification of streptococci in a medical laboratory. *Journal Applied Bacteriology*, Oxford, v.57, p.1-14, 1984.
32. COPETTI, H.; CHAGAS, A.M.; ROSA, L.M.S. Pneumograma e eletrocardiograma: efeitos da administração aguda e sub-aguda do extrato aquoso da *Stevia rebaudiana* Bertoni em ratos. *Saúde*, Santa Maria, v.12, n.1, p.75-84, jan./jun. 1986.
33. CORPRON, R.E.; MORE, F.G.; MOUNT, G. Comparison of fluoride profiles by SIMS with mineral density of subsurface enamel lesions treated intraorally with a fluoride-releasing device. *Journal of Dental Research*, Washington, v.71, , p.828-831, Apr. 1992. Sp. Issue.

34. COYKENDALL, A.L. Four types of *Streptococcus mutans* based on their genetic, antigenetic and biochemical characteristics. *Journal General Microbiology*, Reading, v.83, p.327-338, 1974.
35. COYKENDALL, A.L.; LISOTTE, P.A. *Streptococcus mutans* isolated identified by biochemical tests and DNA base contents. *Archives of Oral Biology*, Oxford, v.23, p.427-428, 1978.
36. CRITCHLEY, P. et al. The polymerisation of dietary sugars by dental plaque. *Caries Research*, Basel, v.1, p.112, 1967.
37. CROSSNER, C.G. Salivary lactobacillus counts in the prediction of caries activity. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, Copenhagen, v.9, n.4, p.182-190, Aug. 1981.
38. DAS, S. et al. Evaluation of the cariogenic potencial of the intense natural sweeteners stevioside and rebaudioside A. *Caries Research*, Basel, v. 26, n.5, p.363-366, Sept./Oct. 1992.
39. DONOHUE, J.J. et al. *The utilization of sugar by selected strains of oral streptococci*. In: General Meeting, 44, Miami: IADR, 1966. Abstract 58.
40. DOWNER, M.C. Impacto das mudanças de padrão de cárie dental. In: BOWEN, W.H.; TABAK, L.A. *Cariologia para a década de 90*. São Paulo: Santos, 1995. p.13-23.
41. DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemical*, Washington, v.28, p.350-356, 1956.
42. DUCHIN, S.; VAN HOUTE, J. Relationship of *Streptococcus mutans* and lactobacilli to incipient smooth surface dental caries in man. *Archives of Oral Biology*, Oxford, v.23, p. 779-786, 1978.
43. EDWARDSSON, S. Bacteriological studies on deep areas of carious dentine. *Odontologisk Revy*, Malmo, v.25, 1974. Suppl.32.
44. FEATHERSTONE, J.D.B.; ten CATE, J.M.; SHARIATI, M; ARENDS, J. Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. *Caries Research*, Basel, v.17, p.385-391, Sept./Oct., 1983.
45. FEATHERSTONE, J.D.B.; ZERO, D.T. An *in situ* model for simultaneous assesment inhibition of demineralization and enhancement of remineralization. *Journal of Dental Research*, Washington, v.71, p.804-810, Apr.1992. Sp. Issue.
46. FEJERSKOV, O.; THYLSTRUP, A. *Cariologia Clínica*. 2.ed. São Paulo: Santos, 1995, Cap. 9. Diferentes conceitos sobre a cárie dentária e suas implicações. p.209-217.

47. FELLIPE, G.M. *Stevia rebaudiana* Bertoni: uma revisão. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v.29, n.11, p.1240-1248, 1977.
48. FITZGERALD, R.J.; KEYES, P.H. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamsters. *Journal American Dental Association*, Chicago, v.61, p.9-19, 1960.
49. FROSTELL, G. Effects of mouthrinses with sucrose, glucose, fructose, lactose, sorbitol and lycasin on the pH of dental plaque. *Odontologisk Revy*, Malmo, v.24, p.217-226, 1973.
50. FROSTELL, G. et al. Substitution of sucrose by lycasin in candy. "The Roslagen study". *Acta Odontologica Scandinavia*, Oslo, v.32, p.235-254, 1974.
51. FU, J.; ZERO, K.M.; ANNE, K.M.; DASS, A. Effect of plaque thickness on glucose retention and acid productions. *Journal of Dental Research*, Washington, v.70, p.493, 1991, Sp. Issue, Abstract 1815.
52. GAWRONSKI, T.H.; STAAT, R.A.; ZAKI, H.A.; HARRIS, R.S; FOLKE, L.E.A. Effects of dietary sucrose levels on extracelullar polysaccharide metabolism of human dental plaque. *Journal of Dental Research*, Washington, v.54, n.4, p.881-890, Jul./Aug.1975.
53. GEDDES, D.A.M.; COOKE, J.A.; EDGARD, W.M.; JENKINS, G.N. The effect of frequent sucrose mouthrinsing on the induction *in vivo* of caries-like changes in human dental enamel. *Archives of Oral Biology*, Oxford, v.23, p.663-665, 1978.
54. GEDDES, D.A.M. Relação dos estudos *in vitro* com os problemas clínicos. In: BOWEN, W. H.; TABAK, L.A. *Cariologia para a década de 90*. São Paulo: Santos, 1995. p.197-205.
55. GIBBONS, R.J.; VAN HOUTE, J. On formation of dental plaques. *Journal of Periodontology*, Chicago, v.44, p.347-360, 1973.
56. GIBBONS, R.J. Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. *Journal of Dental Research*, Washington, v.68, p.378-385, 1984.
57. GUGGENHEIM, B. Streptococci of dental plaques. *Caries Research*, Basel, v.2, p.147-163, 1968.
58. GUGGENHEIM, B. Extracellular polysaccharides and microbial plaque. *International Dental Journal*, Guildford, v.20, n.4, p.657-678, 1970.
59. GUSTAFSSON, B. et al. The Vipeholm dental caries study. The effect of different levels of carbohydrate intake on caries ativity in 436 individuals observed for five years. *Acta Odontologica Scandinavia*, Oslo, v.11, p.195-388, 1954.

60. HOLM, A.K. Diet and caries in high-risk groups in developed and developing countries. *Caries Research*, Basel, v.24, p.44-52, 1990. Suppl. 1.
61. HOOVER, C.I. et al. Microflora and chemical composition of dental plaque from subjects with hereditary fructose intolerance. *Infection and Immunity*, Washington, v.28, p.853-859, 1980.
62. HOWE, G.R. et al. Artificial sweeteners and human bladder cancer. *Lancet*, London, v.2, p.578-581, 1977.
63. IMFELD, T. Efficacy of sweeteners and sugar substitutes in caries prevention. *Caries Research*, Basel, v.27, p.50-55, 1993. Suppl. 1.
64. IKEDA, T.; OKADA, A.; MOTADA, R. Effect of stevioside on certain metabolism of *Streptococcus mutans*. *Nihon University Journal Oral Science*, Tokio, v.4, p.24-27, 1978.
65. IKEDA, T. et al. Changes in *Streptococcus mutans* and lactobacilli in plaque in relation to the initiation of caries in negro children. *Archives of Oral Biology*, Oxford, v.18, p.555-556, 1973.
66. JENKINS, G.N. *The physiology and biochemistry of the mouth*. 4. ed. Oxford: Blackwell, 1978. Cap. X. Pellicle, plaque and calculus. p.360-413.
67. JOHANSSON, I. Diet counselling and behaviour change. *Caries Research*, Basel, v.27, p.47-49, 1993. Suppl.1.
68. JOHANSSON, I.; BIRKHED, D. A dieta e o processo cariogênico. In: THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. *Cariologia clínica*. 2.ed., São Paulo: Santos,1995. Cap.13. p.283-310.
69. KARJALAINEN, S.; KARJALAINEN, M.; SÖDERLING, E. Effect of sucrose rinses on the oral microflora and on salivary sucrase activity. *Caries Research*, Basel, v.27, p.38-42, 1993.
70. KEYES, P.H. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. *Archives of Oral Biology*, Oxford, v.1, p.304-320, 1960.
71. KINGHORN, A.D.; SOEJARTO, D.A. Intensely sweet compounds of natural origin. *Medical Research Review*, New York, v.9, p.91-115, 1989.
72. KLOCK, B.; KRASSE, B. Microbial and salivary conditions in 9-12 year old children. *Scandinavian Journal of Dental Research*, Copenhagen, v.85, p.56-63, 1977.
73. KÖLLER, B.; PETTERSSON, B.M.; BRATTHALL, D. *Streptococcus mutans* in plaque saliva and development of caries. *Scandinavian Journal of Dental Research*, Copenhagen, v. 89, p.19-25, 1981.

74. KÖNIG, K.G. Role of fluorides toothpastes in a caries-preventive strategy. *Caries Research*, Basel, v.27, p.23-28, 1993. Suppl.1.
75. KÖNIG, K.G. Changes in the prevalence of dental caries: how much can be attributed to changes in diet? *Caries Research*, Basel, v.24, p.16-18, 1990. Suppl.1.
76. KOULORIDES, T. et al. Cariogenicity of nine sugars tested with an intraoral device in man. *Caries Research*, Basel, v.10, p.427-441, 1976.
77. KRASSE, B. *Risco de cárie*. 2. ed. São Paulo: Quintessence, 1988, 113p.
78. KREMBEL, J.; FRANK, R.R.; DELUZARCHE, A. Fractionation of human dental plaques. *Archives of Oral Biology*, Oxford, v.14, p.563-565, 1969.
79. KRISTOFFERSON, K.; AXELSSON, P.; BRATTHALL, D. Effect of a professional tooth cleaning program on interdentally localized *Streptococcus mutans*. *Caries Research*, Basel, v.18, p.385-390, 1984.
80. LINDQUIST, B.; EMILSON, C.G.; WENNERHOLM, K. Relationship between *mutans streptococci* in saliva and their colonization of the tooth surfaces. *Oral Microbiology and Immunology*, Copenhagen, v.4, p.71-76, 1989.
81. LINDQUIST, B.; EMILSON, C.G. Distribution and prevalence of *mutans streptococci* in the human dentition. *Journal of Dental Research*, Washington, v.69, p.1160-1166, 1990.
82. LINDQUIST, B. *Mutans streptococci in human dentition. Some factors influencing colonization and distribution*. Göteborg: Faculty of Odontology, 1991. Tese (Doutorado em Odontologia) Sweden, Göteborg: Faculty of Odontology, University of Göteborg, 1991.
83. LOESCHE, W.J. *Cárie dental: uma infecção tratável*. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1993.
84. LOESCHE, W.J. The rationale for caries prevention through the use of sugars substitutes. *International Dental Journal*, Guildford, v.35, n.1, p.1-8, Mar. 1985.
85. MACCLURE, F.F.; HEWITT, W.L. The relation of penicilin to induced rat dental caries and oral *L. acidophilus*. *Journal of Dental Research*, Washington, v.25, p.441-443, 1946.
86. MACPHERSON, L.M.D.; MACFARLANE, T.W.; STEPHEN, K.W. An intra-oral appliance study of the plaque microflora associated with early enamel demineralization. *Journal of Dental Research*, Washington, v.69, n.11, p.1712-1716, Nov.1990.

87. MÄKINEN, K.K. et al. Oral biochemical status and depression of *Streptococcus mutans* in children during 24 to 36 month use of xylitol chewing gum. *Caries Research*, Basel, v.26, p.261-267, 1989.
88. MALTZ, M. Mutans streptococci, lactobacilli and oral health in Brazilian children 9-10 years old. *Caries Research*, Basel, v.23, n.2, p.128, 1989.
89. MALTZ, M.; ZICKERT, I.; KRASSE, B. Effect of intensive treatment with chlorhexidine on number of *Streptococcus mutans* in saliva. *Scandinavian Journal of Dental Research*, Copenhagen, v.89, p.445-449, 1981.
90. MALTZ, M.; SCHOENARDIE, A.; WEBWER, G. Effect of commercial sweeteners on the metabolism of *S. mutans*. *Journal of Dental Research*, Washington, v.71, p.695, 1992. Sp. Issue. Abstract 1435.
91. MALTZ, M. Cariologia. In: TOLEDO, O.A. de. *Odontopediatria: fundamentos para a prática clínica*. 2.ed. São Paulo: Panamericana, 1996. Cap.6. In press.
92. MANDEL, I.D. Relation of saliva and plaque to caries. *Journal of Dental Research*, Washington, v.53, suppl. 2, p.246-271, 1974.
93. MANJI, F.; FEJERSKOV, O. Um enfoque epidemiológico para a cárie dentária. In: THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. *Cariologia clínica*. 2.ed., São Paulo: Santos, 1995. Cap.7. p. 159-191.
94. MARSH, P.D. A microbiological study of early caries of approximal surfaces in schoolchildren. *Journal of Dental Research*, Washington, v.68, p.1151-1154, 1989.
95. MARTHALER, T.M. Changes in the prevalence of dental caries: how much can be attributed to changes in diet? *Caries Research*, Basel, v.24, p.3-15, 1990. Suppl.1.
96. MELIS, M.S. Is stevioside Os effect on renal function of normal and hypertensive rats. *Journal Ethnopharmacology*, Limerick, v.36, n.3, p.213-217, Jun.1992.
97. _____. Renal excretion of Is stevioside Os in rats. *Journal of Natural Products*, Columbus, v.55, n.5, p.688-690, May 1992.
98. MEYEROWITZ, C. et al. Use of intra-oral model to evaluate 0,05% sodium fluoride mouthrinse in radiation-reduced hiposalivation. *Journal of Dental Research*, Washington, v.70, n.5, p.894-898, May 1991.
99. MOLLER, I.J.; POULSEN, S. The effect of sorbitol containing chewing gum of incidence of dental caries, plaque and gingivitis in Danish schoolchildren. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, Copenhagen, v.1, p.58-67, 1973.

100. MOUTON, C.; SCHEININ, A.; MAKINEN, K.K. Effect on plaque of a xylitol containing chewing gum. *Acta Odontologica Scandinavica*, Oslo, v.33, p.27-31, 1975.
101. NEFF, D. Acid production from different carbohydrate sources in human plaque *in situ*. *Caries Research*, Basel, v.1, p.78-87, 1967.
102. NEWBRUN, E. *Cariologia*. Rio de Janeiro: Santos, 1988, 326 p.
103. NIKIFORUK, G. *Understanding dental caries*. New York: Karger, 1985. v.2. Cap.9. Sugar substitutes, food additives and dental caries. p.204-224.
104. OLIVEIRA, S. et al. Influência do guaraná, da *Stevia rebaudiana* Bertoni e do esteviosídeo na incidência de cárie em ratos. *Estomatologia e Cultura*, São Paulo, v.15, n.3, p.16-19, 1985.
105. OLSON, B.L. An in vitro study of the effects of artificial sweeteners on adherent plaque formation. *Journal of Dental Research*, Washington, v.56, n.11, p.1426, nov. 1977.
106. ORLAND, F.J. et al. Use of the germfree animal technic in the study of experimental dental caries. *Journal of Dental Research*, Washington, v.33, p.147-174, 1954.
107. PINHEIRO, C.E. et al. Efeito dos extratos de guaraná e *Stevia rebaudiana* Bertoni (folhas) e do esteviosídeo sobre a fermentação e a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis da placa dentária. *Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo*, São Paulo, v.1, n.4, p.9-13, 1987.
108. PURDELL-LEWIS, D.J.; GROENEVELD, A.; ARENDS, J. Hardness tests on sound enamel and artificially demineralized white spot lesions. *Caries Research*, Basel, v.10, p.201-215, 1976.
109. REBELO, M.A.B. *Estudo in situ da composição bioquímica da placa dental em função da frequência diária do uso da sacarose*. São Paulo: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas. Dissertação (Mestrado em Ciências com área de concentração em Biologia e Patologia Bucodental). São Paulo: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, 1994.
110. RÖLLA, G. Why is sucrose so cariogenic? The role of glucosyltransferase and polysaccharides. *Scandinavian Journal of Dental Research*, Copenhagen, v.97, p.115-119, 1989.
111. RUEGGERBERG, F.A. Substrate for adhesion testing to tooth structure: review of the literature. *Dental Materials*, Washington, v.7, p.2-10, Jan.1991.

112. RUGG-GUNN, A.J. et al. Relationship between dietary habits and caries increment assessed over two years in 405 english adolescent schoolchildren. *Archives of Oral Biology*, Oxford, v.29, p.983-992, 1984.
113. SAKAGUCHI, M.; KAN, T. As pesquisas japonesas com *Stevia rebaudiana* Bertoni e o esteviosídeo. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v.34, n.2, p.235-248, fev.1982.
114. SANSONE, C. et al. The association of mutans streptococci and non-mutans streptococci capable of acidogenesis at a low pH with dental caries on enamel and root surfaces. *Journal of Dental Research*, Washington, v.72, n.2, p.508-516, Feb.1993.
115. SCHEININ, A.; MAKINEN, K.K. Turku sugar studies I-XXI. *Acta Odontologica Scandinavica*, Oslo, v.33, 1975. Suppl. 70.
116. SHKLAIR, I.L.; KEENE, H.J. A biochemical scheme for the separation of the five varieties of streptococcus mutans. *Archives of Oral Biology*, Oxford, v.19, p.1079-1081, 1974.
117. SKINNER, A.; CONOLLY, P.; NAYLOR, M.N. The influence of the replacement of dietary sucrose by maltose on the formation and biochemistry of human dental plaque. *Archives of Oral Biology*, Oxford, v.27, n.7, p.603-608, 1982.
118. SÖDERLING, E. et al. Effect of sorbitol, xylitol, and xylitol/sorbitol chewing gums on dental plaque. *Caries Research*, Basel, v.23, p.378-384, 1989.
119. STEPHAN, R.M. Changes in hydrogen-ion concentration on tooth surfaces and in caries lesions. *Journal American Dental Association*, Chicago, v.27, p.718-723, 1940.
120. TANZER, J.M. Microbiology of dental caries. In: SLOTS, J.; TAUBMAN, M.A. *Contemporary oral microbiology and immunology*. St. Louis: Mosby Year Book, 1992. Cap.22, p.377-424.
121. TANZER, J.M. Adoçantes e cárie: alguns pontos emergentes. In: BOWEN, H.W.; TABAK, L.A. *Cariologia para a década de 90*. São Paulo: Santos, 1995, p.383-396.
122. TEHRANI, A. et al. Enamel demineralization by mouthrinses containing different concentrations of sucrose. *Journal of Dental Research*, Washington, v.62, n.12, p.1216-1217, Dec.1983.
123. THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. *Cariologia clínica*. 2.ed. São Paulo: Santos, 1995, Cap.6. Características clínicas e patológicas da cárie dentária, p. 111-157.

124. VAN HOUTE, J. Bacterial specificity in the etiology of dental caries. *International Dental Journal*, Guildford, v.30, p.305-326, 1980.
125. VAN HOUTE, J. et al. Role of sucrose in colonization of *Streptococcus mutans* in conventional Sprague-Dawley rats. *Journal of Dental Research*, Washington, v.55, p.202-215, 1976.
126. VAN HOUTE, J.; DUCHIN, S. *Streptococcus mutans* in the mouths of children with congenital sucrase deficiency. *Archives of Oral Biology*, Oxford, v.20, p.771-773, 1975.
127. VAN HOUTE, J. Role of micro-organisms in caries etiology. *Journal of Dental Research*, Washington, v.73, n.3, p.672-681, Mar. 1994.
128. WALKER, A.M. et al. An independent analysis on non-nutritive sweeteners and bladder cancer. *American Journal Public Health*, Washington, v.72, p.376-381, 1982.
129. WILLCOX, M.D.P.; DRUCKER, D.B.; GREEN, R.M. In vivo dental plaque-forming ability and cariogenicity of the bacterium *Streptococcus bovis* in gnotobiotics rats. *Archives of Oral Biology*, Oxford, v.35, p.163-166, 1990.
130. YABU, M. et al. Studies on stevioside natural sweetener: effect on the growth of some oral microorganisms. *Hiroshima Daigaku Shigaiku Zasshi*, Hiroshima, v.9, p.12-17, 1977.
131. XILI, L. et al. Chronic oral toxicity and carcinogenicity study of 1s stevioside in rats. *Food Chemical Toxicology*, Oxford, v.30, n.11, p.957-965, Nov. 1992.
132. ZERO, D.T.; VAN HOUTE, J.; RUSSO, J. The intra-oral effect on enamel demineralization of extracellular matrix material synthesized from sucrose by *Streptococcus mutans*. *Journal of Dental Research*, Washington, v.65, p.918-923, 1986.
133. ZERO, D.T. Adaptações na placa dental. In: BOWEN, H.W.; TABAK, L.A. *Cariologia para a década de 90*. São Paulo: Santos, 1995, p.333-349.
134. ZICKERT, I.; EMILSON, C.G.; KRASSE, B. Effect of caries preventive measures in children highly infected with the bacterium *Streptococcus mutans*. *Archives of Oral Biology*, Oxford, v.10, p.77-81, 1982a.
135. ZICKERT, I.; EMILSON, C.G.; KRASSE, B. *Streptococcus mutans*, lactobacilli and dental health in 13-14 year old Swedish children. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, Copenhagen, v.10, p.77-81, 1982b.