

Universidade Federal de  
Santa Catarina

Programa de Pós-  
Graduação em Nutrição

www.pos.ufsc.br/ppgn

Campus Universitário

Florianópolis- SC

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
graduação em Nutrição, Departamento de Nutrição  
do Centro de Ciências da Saúde da Universidade  
Federal de Santa Catarina, como requisito para  
obtenção do Título de Mestre em Nutrição

Orientador: Vera Lúcia Cardoso Garcia Tramonte

Florianópolis, 2013

Efeito da administração oral do edulcorante à base de estévia em ratas prenhes e  
o reflexo do tratamento nos fetos  
Lílian de Souza Leite Fausto

Efeito da administração oral do edulcorante à base de  
estévia em ratas prenhes e o reflexo do tratamento nos  
fetos

Lílian de Souza Leite Fausto

Estudo experimental  
sobre edulcorante à  
base de estévia  
durante a prenhez de  
ratas *Wistar* e a  
observação do reflexo  
do tratamento nos  
fetos

Orientador:

Vera Lúcia Cardoso  
Garcia Tramonte





Lílian de Souza Leite Fausto

**Efeito da administração oral do edulcorante à base de estévia em ratas prenhes e o reflexo do tratamento nos fetos**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Nutrição.

Orientador: Prof. Dra. Vera Lúcia Cardoso Garcia Tramonte

Florianópolis  
2013

**Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca  
Universitária da UFSC.**

Fausto, Lílian de Souza Leite

Efeito da administração oral do edulcorante à base de estévia em ratas prenhes e o reflexo do tratamento nos fetos / Lílian de Souza Leite Fausto ; orientadora, Vera Lúcia Cardoso Garcia Tramonte - Florianópolis, SC, 2013. 51 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Nutrição.

Inclui referências

1. Nutrição. 2. Estévia. 3. Edulcorante. 4. Adoçantes Dietéticos. 5. Estudo experimental. I. Tramonte, Vera Lúcia Cardoso Garcia . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. III. Título.

Lílian de Souza Leite Fausto

**Efeito da administração oral do edulcorante à base de estévia em ratas prenhes e o reflexo do tratamento nos fetos**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Nutrição.

Florianópolis, 02 de Dezembro de 2013.

---

Prof. Giovanna Medeiros Rataichesk Fiates, Dra.  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Vera Lúcia Cardoso Garcia Tramonte, Dra.– Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Silvia Maria Franciscato Cozzolino, Dra.  
Universidade de São Paulo

---

Gerson Luis Faccin, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Ricardo Tramonte, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Sandra Paulon Avancini, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico inteiramente à Anna Júlia,  
minha filha.

Foi por ela que permaneci, continuei e  
tive forças para concluir.

## AGRADECIMENTOS

Sou eternamente grata a *Deus*.

Dedico e agradeço este trabalho à *minha filha*, que veio para alegrar, facilitar e dar sentido a este trabalho. Foi companheira de aula, de pesquisa, de experimento, de noites em claro e, principalmente, das alegrias do caminho.

Ao *meu marido*. Sou grata pela parceria, paciência, amizade, amor e incentivo. Agradeço pela presença, pelas horas de conforto, pelo apoio e por compartilhar todo esse momento.

Aos *meus pais*, com muito carinho, que realizam um sonho a cada nova conquista de suas filhas. Meu exemplo de vida. Agradeço pelo amor incondicional e pela dedicação integral. A distância é apenas física.

A *minha irmã*. Agradeço pela amizade, incentivo e “trocas de figurinhas”. A distância é apenas física.

De maneira especial, apresento os meus mais sinceros votos de agradecimento à *Professora Dra. Vera Lúcia Cardoso Garcia Tramonte*. Agradeço, sobretudo, pelo respeito que me teve. Sou grata pelo acolhimento, pela confiança depositada, pelas orientações, pelas oportunidades e por todo o apoio necessário para a conquista de um objetivo tão almejado.

Ao *Gerson*. Agradeço pelas contribuições, orientações, apoio e disponibilidade. Agradeço especialmente pela ajuda prática no experimento.

Ao professor *Ricardo Tramonte*. Pessoa solícita, que esbanja conhecimento e contribuiu imensamente para o meu aprendizado. Agradeço pelas contribuições, orientações, apoio e oportunidades.

A professora *Sandra Avancini*. Sou grata pela colaboração, apoio e atenção, sempre disponível.

À *turma de mestrado*. Agradeço pela recepção, pelo companheirismo, pelas amizades, pelo bom humor, pelas risadas, pelos desabafos, pela disponibilidade, pelas discussões produtivas, pelo conhecimento

compartilhado. Foi incrível conhecer cada uma de vocês. Um presente. Agradeço também pelos mimos durante a gravidez – foram revigorantes.

Às *novas amigas*. De maneira especial, devo agradecer a Stella, a Iana, a Amanda Della Giustina e a Amanda Donini pela parceria, pelas contribuições durante as análises laboratoriais e pelas boas conversas. Agradeço pela boa companhia e sinceridade da Carol Moreira.

Apresento o meu agradecimento à ***Professora Dra. Karla Suzanne Florentino da Silva Chaves Damasceno***. Uma inspiração para carreira acadêmica. Deixo registrado todo meu carinho pela professora.

Ao ***PPGN***, pelo apoio institucional. Aos professores, agradeço pelo conhecimento transmitido. Ao Nailor e a Candice, agradeço pela atenção, sempre solícitos.

Ao ***Programa de Bolsas Demanda Social (CAPES)***. Agradeço pelo período de bolsa concedida.

“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que fez tua  
rosa tão importante.”  
Antoine de Saint-Exupéry

## RESUMO

FAUSTO, L.S.L. **Efeito da administração oral do edulcorante à base de estévia em ratas prenhes e o reflexo do tratamento nos fetos.** Florianópolis, 2013. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Programa de Pós Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

**OBJETIVOS:** avaliar o efeito do adoçante à base de estévia em ratas prenhes e o reflexo do tratamento nos fetos.

**MÉTODOS:** vinte oito ratas *Wistar* foram distribuídas em 04 grupos: GC (controle)– dieta padrão e água; GS (sacarose)– dieta padrão e solução de sacarose; GE4 (estévia 4mg/kg/dia)– dieta padrão e 4mg/kg/dia de adoçante; GE8 (estévia 8mg/kg/dia)– dieta padrão e 8mg/kg/dia de adoçante. O tratamento ocorreu do 8º ao 17º dia de prenhez, por gavagem. Foram avaliados: consumo de ração, ganho de peso gestacional, peso de órgãos, concentrações séricas de glicose, perfil lipídico sérico, número de fetos, peso e comprimento dos fetos, medida do cordão umbilical e presença de malformações maiores externas.

**RESULTADOS:** o consumo de ração foi estatisticamente diferente entre os grupos. Houve ganho gradual e progressivo do peso corporal das ratas durante a prenhez em todos os grupos, sendo este ganho mais evidente no período final, porém não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas. Houve redução significativa na concentração plasmática de HDL-c das ratas tratadas com adoçante. O peso e comprimento dos fetos foram significativamente maiores no GE8. Apesar de ter havido aumento do número de natimortos e de malformações nos grupos tratados, os dados não foram significativamente diferentes dos controles.

**CONCLUSÃO:** o adoçante à base de estévia durante a prenhez não mostrou efeitos nocivos para a mãe ou para o feto. Contudo, estudos controlados em humanos são necessários para determinar os efeitos do adoçante em grupo populacionais específicos.

**Palavras-chave:** Stevia; Edulcorantes; Adoçantes Dietéticos.

## ABSTRACT

FAUSTO, L.S.L. **The evaluation of Stevia administration in rats treated during pregnancy and its effect in their fetuses.** Florianópolis, 2013. Dissertation (Maser in Nutrition) – Programa de Pós Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

**OBJECTIVE:** the present study assessed the effect of stevia in pregnant rats and its consequences on their fetuses.

**METHODS:** twenty eight *Wistar* rats were randomly divided into four groups: a control group (CG)– fed with a commercial chow and water; sucrose group (SG)– fed with a commercial chow and sucrose; GE4 (stevia 4mg/kg/day)– fed with a commercial chow and 4mg/kg/day sweetener; GE8 (stevia 8mg/kg/day)– fed with a commercial chow and 8mg/kg/day sweetener. The treatment was from the 8th to 17th days of pregnancy by gavage. The observed aspects were: feed intake, gestational weight, organ weight, levels of serum glucose, lipid profile, number of fetuses, fetal weight and length, the length of the umbilical cords and the presence of external malformations.

**RESULTS:** the feed intake was statistically different between groups. There was a progressive and gradual increase in body weight during the course of pregnancy in all the groups, which was more evident in the final period, but with no significant difference among groups. There was significant reduction in plasma HDL-c of rats treated with sweetener. The weight and length of fetuses were significantly higher in GE8. Although the study showed increasing numbers of stillbirths and malformations in the treated groups, the data were not significantly different from the Control Group.

**CONCLUSION:** these results showed no ill effects to the mother or the fetus. However, controlled studies in humans are needed to determine the effects of the sweetener group specific population.

**Keywords:** Stevia; Sweetening Agents; Dietetic Sweeteners.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do esteviol e seus derivados .....	23
Figura 2 – Quantidade de produtos alimentícios com estévia lançados por ano em todo mundo no período de 2003 a 2011 .....	25
Figura 3 – Alimentos e bebidas com estévia lançados em diferentes países no ano de 2011.....	26
Figura 4 – Publicações científicas sobre estévia nos últimos anos.....	26
Figura 5 – Protocolo experimental do ensaio biológico.....	33

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ABIAD – Associação Brasileira da Indústria de Alimentos Dietéticos e para Fins Especiais

ADA – American Diabetic Association

ALT – alanina aminotransferase

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AST – aspartato aminotransferase

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DM – Diabetes mellitus

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DCNT – Doenças crônicas não transmissíveis

EFSA – European Food Safety Authority

FDA – Food and Drug Administration

GGT – gama glutamil transpeptidase

GRAS – Geralmente Recomendados como Seguros

GSI – Global Stevia Institute

IDA – Ingestão Diária Aceitável

IDEC – Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor

IMC – Índice de Massa Corporal

JECFA/FAO/WHO – Joint Expert Committee on Food Additives/ Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação/ Organização Mundial da Saúde

SCF – Scientific Committee on Food

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>15</b>
2.1	ADOÇANTES .....	15
2.1.1	Conceitos e classificações.....	15
2.1.2	Consumo de adoçantes e de produtos dietéticos.....	16
2.1.3	O uso de adoçantes em relação à saúde.....	19
2.2	ESTÉVIA.....	22
2.2.1	Historico.....	22
2.2.2	Estrutura química e poder edulcorante .....	22
2.2.3	Emprego da estévia em produtos industrializados.....	24
2.2.4	Legislação .....	27
2.2.5	Segurança .....	28
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
4.1	DESENHO DO ESTUDO .....	33
4.2	ASPÉCTOS ÉTICOS .....	33
4.3	ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	33
4.4	ACASALAMENTO .....	34
4.5	DIETA E GAVAGEM.....	34
4.6	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS .....	35
4.7	AFERIÇÃO DO PESO E MEDIDAS DE COMPRIMENTO .....	36
4.8	CONSUMO ALIMENTAR .....	36
4.9	DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS .....	36
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	37
<b>5</b>	<b>ARTIGO ORIGINAL</b> .....	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>41</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>42</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, os consumidores constituem um público mais consciente e se mostram cada vez mais preocupados com a segurança dos alimentos e os seus efeitos em relação à saúde. De modo geral, a opinião comum é que o consumo de alimentos disponíveis no mercado não constitui risco para a saúde ou oferecem quaisquer efeitos adversos. Dentre os mais discutidos, os aditivos alimentares são o principal alvo dos debates, com destaque para os adoçantes. Embora estudos científicos indiquem que os adoçantes permitidos para uso em alimentos sejam seguros, alguns indivíduos e organizações regulamentadoras continuam céticos quanto aos seus efeitos sobre a saúde (MORTESEN, 2006; FITCH e KEIM, 2012).

Os adoçantes são substitutos naturais ou artificiais do açúcar que conferem sabor doce com menor número de calorias por grama. Aqueles denominados “adoçantes dietéticos” são produtos destinados a atender as necessidades de pessoas em condições metabólicas e fisiológicas específicas regulamentados pela Portaria nº 29 de 13 de janeiro de 1998 (BRASIL, 1998). Estes substitutos vêm sendo cada vez mais comercializados e consumidos em todo o mundo, especialmente durante os últimos 40 anos. Atualmente, os adoçantes dietéticos são produtos utilizados também para os consumidores que desejam desfrutar do sabor doce sem aumentar seu consumo energético, além de serem ferramentas auxiliares na dietoterapia de algumas doenças crônicas (ZANINI, ARAÚJO e MARTÍNEZ-MESA, 2011).

Dentre os adoçantes dietéticos, o esteviosídeo é um glicosídeo diterpênico, principal componente edulcorante encontrado nas folhas de *Stevia rebaudiana* Bertoni. A sua propriedade edulcorante já era conhecida pelos índios Guaranis, que usavam para adoçar chás e bebidas medicamentosas (GEUNS, 2003). A estévia é um adoçante não-calórico, com doçura até 300 vezes maior do que a sacarose e totalmente estável a uma ampla faixa de pH e ao calor, o que o torna interessante sob o ponto de vista da indústria alimentícia (GOTO e CLEMENTE, 1998; LEMUS-MONDACA et al., 2011).

O interesse científico e comercial em plantas medicinais e aromáticas é crescente e a espécie sul-americana *Stevia rebaudiana* Bertoni é uma planta de importância econômica que vem atraindo atenção. Uma das questões em destaque sobre esta espécie é a liberação de consumo por órgãos governamentais de saúde apenas em alguns países. No Brasil, sua regulamentação ocorreu desde meados de 1987, como agente flavorizante e edulcorante em várias classes de alimentos.

A inocuidade da estévia para ser utilizada como um adoçante de uso geral, como um ingrediente não-medicinal em dose de até 4 mg/kg de peso corporal por dia, é assegurada também pelo Comitê Conjunto de Especialistas em Aditivos Alimentares da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação/Organização Mundial de Saúde (JECFA/FAO/OMS) (EFSA, 2010).

O esteviosídeo parece estar ganhando público como suplemento dietético, devido às vantagens que apresenta: estabilidade, não-calórico, não-cariogênico, reduz a ingestão de açúcar e pode ser utilizado por diabéticos, indivíduos com sobrepeso e obesidade, além dos fenilcetonúricos (GEUNS, 2003).

No Brasil, ressalta-se a carência de estudos que forneçam estimativas sobre a prevalência de utilização de adoçantes dietéticos à base de estévia pela população em geral ou por grupos específicos, especialmente de mulheres durante a gestação e sua relação com a saúde. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito da administração oral de adoçante à base de estévia sobre ratas prenhes e o reflexo do tratamento nos seus fetos.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 ADOÇANTES**

#### **2.1.1 Conceitos e classificações**

A expressão “produto dietético” foi utilizada oficialmente pela primeira vez no decreto-lei nº 15.642/46 (BRASIL, 1946), definindo estes produtos como uma mistura de substâncias particularmente ricas em nutrientes e cujo emprego era aconselhado para completar ou substituir parcialmente os alimentos comuns em regimes especiais. Em 1965, no decreto-lei nº 55.871 (BRASIL, 1965), o termo “edulcorante” foi descrito, também, pela primeira vez, como qualquer substância orgânica artificial, não-glicídica, capaz de conferir sabor doce aos alimentos.

No Brasil, até a década de 1980, devido à legislação vigente, os produtos dietéticos eram regulamentados como drogas, sendo consumidos apenas por portadores de diabetes ou outras doenças com indicação de limitação na ingestão de sacarose. A partir de 1988, uma nova legislação regulamentou o uso de aditivos intencionais no mercado nacional, incluindo os edulcorantes (ZANINI, ARAÚJO e MARTÍNEZ-MESA, 2011).

A legislação passou por contínuas atualizações e, com isso, os termos foram sendo redefinidos. Assim, desde a publicação da Portaria nº 29 de 13 de janeiro de 1998 (BRASIL, 1998), a expressão “adoçante dietético” refere-se aos produtos formulados para atender às necessidades de pessoas sujeitas às dietas com restrição de sacarose, frutose e/ou glicose. A terminação “edulcorante” também sofreu alterações e, hoje, entende-se por este aditivo alimentar toda substância diferente dos açúcares, que confere sabor doce ao alimento (BRASIL, 1997). E, em 2005, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2005) adotou o termo “adoçante de mesa” para o produto formulado para conferir sabor doce aos alimentos e bebidas, podendo conter mono e/ou dissacarídeos como veículos.

Os veículos ou agentes de corpo são compostos utilizados para conferir o equilíbrio de textura e palatabilidade nas formulações. Os adoçantes de mesa podem conter os seguintes veículos em sua composição: álcool etílico, amidos, água, amidos modificados; dextrinas; dextrose; fruto-oligossacarídeos; isomaltoligossacarídeos; frutose e seus xaropes; xarope de glicose; glicerina ou glicerol; isomalte; lactose; maltitol e seu xarope; maltodextrina; manitol; polidextrose;

polietileno glicol; propilenoglicol; sacarose; sorbitol; e outros previstos em Regulamentos Técnicos específicos. Todos os agentes de corpo são considerados seguros para o consumo humano, em quantidades ilimitadas, e não existem estudos específicos na gestação (BRASIL, 2005; TORLONI et al., 2007).

Quanto à classificação, a denominação entre “naturais” e “artificiais” é bem aceita. No Brasil, a RDC n.º 3 de 02/01/2001 sobre aditivos edulcorantes em alimentos, classificou os edulcorantes quanto a sua origem: naturais (manitol, sorbitol, glicosídeos de esteviol, xilitol, isomalte, maltitol e lactitol) ou artificiais (aspartame, sacarinas, ciclamatos, acessulfame de potássio e sucralose). Contudo, no atual Regulamento Técnico da ANVISA, RDC n.º 18/2008, que revoga a RDC n.º 3/2001, esta classificação não esteve mais presente (BRASIL, 2008).

Porém, é a classificação em “nutritivos” e “não-nutritivos” proposta pela *American Diabetic Association* (ADA) a mais atualizada na literatura científica. Aqueles que transmitem doçura com um valor de energia de até 4 kcal/g são rotulados como adoçantes nutritivos ou calóricos (sacarose, frutose, glicose, xarope de milho, agave, polióis). Já os adoçantes não-nutritivos, também citados como adoçantes de alta intensidade ou não-calóricos, são aqueles que conferem doçura com nenhuma energia ou com valores não significativos (acessulfame-k, aspartame, ciclamato, estévia, neotame, sacarina e sucralose). São estes produtos os destinados a ajudar no controle de peso, diabetes e outras doenças crônicas, além de auxiliar na saúde bucal e na qualidade da alimentação (ADA, 2004; FITCH e KEIM, 2012).

### **2.1.2 Consumo de adoçantes e de produtos dietéticos**

A preferência pelo sabor doce é uma característica inata do ser humano. O sabor amargo era atribuído aos alimentos tóxicos. A humanidade tem adicionado substâncias doces para sua alimentação desde os tempos mais remotos. O primeiro adoçante utilizado pelo homem foi o mel, desde as culturas antigas da Grécia e da China, sendo posteriormente substituído por sacarose, o açúcar comum, que foi originalmente obtido da cana de açúcar (WEIHRAUCH e DIEHL, 2004).

O consumo de adoçantes e produtos dietéticos cresceu, especialmente durante os últimos 40 anos (TORLONI et al., 2007; SHANKAR, AHUJA e SRIRAM, 2013) quando o mercado de produtos dietéticos esteve em franca ascensão. Dados da Associação Brasileira da

Indústria de Alimentos Dietéticos e para Fins Especiais (ABIAD) informam que em 13 anos o mercado brasileiro cresceu 1.875% (mais de 144% ao ano), saltando de US\$160 milhões em 1991, para US\$3 bilhões movimentados em 2003, o que caracteriza um crescimento espetacular desse mercado no curto espaço de tempo (IDEC, 2006).

No Brasil, as vendas de adoçantes não calóricos foram estimadas em R\$1,5 bilhão em 2002, ao nível de consumidor final, dos quais menos de 1% desse valor representa a participação dos derivados de estévia, ficando as maiores cifras para a participação da mistura de ciclamato e sacarina e do aspartame, nesta ordem. É válido ressaltar que na década anterior as vendas globais de adoçantes foram estimadas em apenas R\$70 milhões, evidenciando um crescimento significativo neste mercado (LIMA FILHO, VALOIS e LUCAS, 2004). Entre 2008 e 2012 houve um aumento global de 400% na venda de novos produtos à base de estévia, com uma elevação de 158% apenas entre 2011 e 2012, segundo uma empresa de consultoria internacional do setor de alimentos (HEYDEN, 2013).

O consumo de alimentos contendo adoçantes não-nutritivos aumentou entre as pessoas de todas as idades. Nove em cada 10 consumidores nos Estados Unidos compram ou usam produtos reduzido teor calórico, incluindo alimentos e bebidas sem açúcar e de baixo teor de gordura. Na Europa, o uso de adoçantes dietéticos também é crescente, devido ao interesse em saúde e envelhecimento pela população. Esta tendência é altamente prevalente entre as crianças, especialmente quando se trata de consumo de bebidas contendo adoçantes não-nutritivos (aumentou de 6,1% para 12,5% entre as crianças e de 18,7% para 24,1% entre os adultos) (ADA, 2004; SHANKAR, AHUJA e SRIRAM, 2013).

Os adoçantes dietéticos apresentam-se como uma ferramenta auxiliar na dietoterapia de algumas morbidades. Atualmente, estes produtos são também uma opção de escolha para os consumidores saudáveis que desejam apenas desfrutar do sabor doce sem aumentar seu consumo energético, conciliando dietas restritivas e a palatabilidade. Neste público, o uso de adoçantes e produtos dietéticos tem se revelado mais prevalente entre as mulheres, quando comparado aos homens. Essa prática feminina pode estar relacionada a um forte estímulo ao desenvolvimento e à manutenção de estilos de vida saudáveis, em que o controle de peso está inserido, somado ao fato de que as mulheres sentem-se cada vez mais pressionadas a atingir um padrão estético socialmente imposto (TORLONI et al., 2007; BELZER et al., 2010).

No Brasil, de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2008) são autorizados o uso de sorbitol, manitol, isomaltitol, maltitol, sacarina, ciclamato, aspartame, glicosídeos de esteviol (estévia), acessulfame de potássio, sucralose, neotame, taumatina, lactitol, xilitol e eritritol como aditivos edulcorantes em alimentos, considerando seus limites máximos que não devem ultrapassar os valores da Ingestão Diária Aceitável (IDA).

A IDA é uma recomendação de consumo máximo individual (mg/kg peso corporal/dia) e normalmente está bem acima do consumo habitual da maioria das pessoas. Contudo, é importante ressaltar que alguns consumidores de adoçantes referem sua utilização na forma de “esguicho”, em vez de contar o número de gotas, tornando-se inviável quantificar a ingestão total. Além disso, o uso de edulcorantes como aditivo alimentar pela indústria em uma variedade de alimentos e bebidas aumentou ao longo das últimas décadas (CASTRO e FRANCO, 2002; ANTON et al., 2010).

Somada a essa crescente demanda, é importante lembrar que os aditivos são elementos utilizados também como excipientes na preparação de medicamentos pela indústria farmacêutica. Essas substâncias são classificadas quanto à finalidade a que se destinam como conservantes (preservativos), corantes, aromatizantes (flavorizantes), adoçantes (edulcorantes), espessantes, emulsificantes, estabilizantes e antioxidantes, e são amplamente utilizadas em medicações pediátricas ou para uso geral, principalmente em medicamentos líquidos e mastigáveis que costumam ter sabor desagradável. Os edulcorantes mais usados pela indústria farmacêutica são a sacarose (açúcar), substitutos artificiais (sacarina sódica, ciclamato de sódio e aspartame) e o sorbitol (BALBANI, STELZER e MONTOVANI, 2006; STEFANI et al., 2009).

Dentre as opções disponíveis no mercado, sabe-se que o aspartame é um dos edulcorantes mais utilizados no mundo, desde sua liberação para o uso, em 1981, até os dias atuais. Outros edulcorantes bastante difundidos são o ciclamato e a sacarina, que a partir da sua mistura houve um aumento considerável do consumo desde a década de 60. Contudo, atualmente, em um mundo onde os consumidores estão buscando as opções de melhor sabor, produtos naturais e saudáveis, os adoçantes a base de estévia são geralmente a escolha de preferência. Com isso, observa-se o crescente aumento do uso de estévia como adoçante natural, satisfazendo às exigências dos consumidores e aos requerimentos dos fabricantes de alimentos e de bebidas (ARRUDA,

MARTINS e AZOUBEL, 2003; SOFFRITTI, 2007; ALLEVA et al., 2011).

### **2.1.3 O uso de adoçantes em relação à saúde**

A necessidade de redução do consumo de açúcares simples tem chamado atenção dos profissionais de saúde e da população, devido à crescente incidência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) (BRASIL, 2011). O Brasil, ao seguir a tendência mundial, tem passado por processos de transição demográfica, epidemiológica e nutricional nas últimas quatro décadas. Essas mudanças produziram e ainda produzem importantes mudanças no perfil das doenças ocorrentes na população (MALTA et al., 2006). O intenso debate tem refletido nas regulamentações aprovadas pelos órgãos governamentais e, conseqüentemente, no comportamento dos consumidores sobre o teor de açúcar de diferentes produtos alimentícios. Como resultado, a utilização de edulcorantes em alimentos vem aumentando consideravelmente (NOWICKA e BRYNGELSSON, 2006; CHATSUDTHIPONG e MUANPRASAT, 2009).

Porém, substituir a sacarose (açúcar comum) pelos edulcorantes dietéticos pode ser contraproducente, pois ao restringir o consumo de calorias sem orientação profissional, tende-se a compensar a falta de energia com alimentos ricos em carboidratos e lipídeos. Além disso, alguns produtos dietéticos trazem teores de gordura mais altos que os dos convencionais, e aos adoçantes têm sido adicionado teores consideráveis de sódio para realçar o sabor doce e disfarçar o resíduo amargo do produto (CHRISTANTE, 2009).

Ao longo dos anos, os efeitos do uso de adoçante sobre a saúde têm sido uma preocupação constante entre os profissionais de saúde e do próprio consumidor por várias razões. A preocupação com a ingestão de adoçantes passou de diabetes na década de 1960, para questões de hiperatividade e comportamento em crianças na década de 1990, até a etiologia da obesidade nos anos 2000 (ADA, 2004, 2009; FITCH e KEIM, 2012).

Na infância, de acordo com a *American Diabetic Association*, em seu posicionamento quanto ao uso de adoçantes em relação à saúde, o consumo de adoçantes é seguro, mesmo considerando a ampla gama de produtos disponíveis no mercado e o emprego de misturas de edulcorantes em alimentos e bebidas industrializados (importante fonte de adoçantes na dieta) (ADA, 2004; FITCH e KEIM, 2012). Os adoçantes não-nutritivos exercem também o papel auxiliar na saúde

bucal, uma vez que estas substâncias não são substratos para as bactérias promotoras de cáries (FITCH e KEIM, 2012).

Os adoçantes exercem papel auxiliar na dieta, como melhoria da qualidade alimentar, considerando que vários estudos têm associado o elevado consumo de açúcares com a baixa ingestão de micronutrientes (KREBS-SMITH, 2001; ROSADO e MONTEIRO, 2001; BHARGAVA e AMIALCHUK, 2006; FITCH e KEIM, 2012; ARAÚJO et al., 2013; VEIGA et al., 2013). A incorporação de adoçantes tende a diminuir a densidade energética dos alimentos, possibilitando ao consumidor a escolha de alimentos mais vantajosos nutricionalmente. Nesse contexto, os adoçantes contribuiriam ainda, no controle do consumo de energia, sendo apropriado para terapia da diabetes e para a promoção de perda de peso em indivíduos com sobrepeso e obesidade, além de facilitar a manutenção da redução no peso corporal em longo prazo (ADA, 2004; FITCH e KEIM, 2012).

O diabetes mellitus (DM) destaca-se entre as DCNT e apresenta impacto considerável como problema de saúde pública pela morbidade, mortalidade e custos no seu tratamento. Diabetes mellitus pode ser definida como grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresenta em comum a hiperglicemia, a qual é o resultado de defeitos na ação da insulina, na secreção de insulina ou em ambos (OLIVEIRA e FRANCO, 2010; BRASIL, 2011).

Pacientes com diabetes possuem restrições para o consumo de carboidratos e fazem uso de adoçantes e produtos dietéticos para conferir doçura aos alimentos com pouca ou nenhuma caloria. Apesar destes produtos não serem necessários para o controle metabólico do DM, eles têm um papel significativo no convívio social e no aspecto psicológico destes pacientes e proporcionam a palatabilidade e o prazer do sabor doce. Outra alternativa amplamente utilizada, por vezes sem conhecimento do profissional, é o tratamento com ervas medicinais (CASTRO e FRANCO, 2002; NEGRI, 2005; ZANINI, ARAÚJO e MARTÍNEZ-MESA, 2011).

Deve-se destacar a condição de Diabetes Mellitus Gestacional (DMG), definido pela diminuição da tolerância aos carboidratos, que se inicia ou é reconhecida pela primeira vez na gestação, podendo ou não persistir após o parto. Neste caso, é consensual na literatura a importância do cuidado nutricional para o adequado controle glicêmico em gestantes com o objetivo de apoiar a saúde materno-fetal, sendo recomendado o uso moderado de edulcorantes. Geralmente Recomendados como Seguros (GRAS) (PADILHA, 2010; FITCH e KEIM, 2012).

Para diminuir as complicações desta condição clínica na gestação, é de fundamental importância que se ofereça orientação nutricional para uma adequada nutrição materno-fetal, ganho de peso recomendado e controle metabólico, além de insulino-terapia, prática de atividade física, assistência pré-natal e avaliação do bem estar fetal (PADILHA, 2010).

E, ainda, especialmente nas últimas décadas, motivadas pelo anseio de atingir os padrões estéticos preconizados pela cultura vigente, muitas mulheres submetem-se a sucessivas dietas restritivas, por longos períodos de suas vidas, com uso de adoçantes dietéticos ou de produtos industrializados *diet/ light*, independentemente de haver recomendação profissional ou não. E ao engravidar, é comum a mulher que usa adoçante, mesmo sem diagnóstico de DMG, questionar se o uso é seguro durante os períodos de gestação e de lactação. Vale salientar que a gestação é um período de desejos alimentares, na sua maioria pelo sabor doce (TORLONI et al., 2007; BELZER et al., 2010; ZANINI, ARAÚJO e MARTÍNEZ-MESA, 2011).

No entanto, regularmente o potencial carcinogênico sobre os edulcorantes é questionado, principalmente em relação ao aspartame, ciclamato de sódio e sacarina sódica. Weihrauch e Diehl (2004) em uma revisão da literatura sobre aspartame, ciclamato de sódio e sacarina sódica, concluíram que o possível risco de adoçantes artificiais para induzir câncer em humanos parece ser insignificante. Kamenickova et al. (2013) também consideraram os adoçantes seguros em um estudo *in vitro* com hepatócitos humanos e células cancerosas humanas, pois não observaram efeitos negativos do aspartame, acessulfame, ciclamato e sacarina sobre receptores que desempenham papel importante no desenvolvimento do câncer em humanos.

No Posicionamento da Academia de Nutrição e Dietética sobre o uso de adoçantes nutritivos e não-nutritivos, Fitch e Keim (2012) reportam a notificação do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, na qual se afirma que não há nenhuma evidência clara de que os adoçantes não-nutritivos disponíveis comercialmente nos Estados Unidos (acessulfame-k, aspartame, estévia, neotame, sacarina e sucralose), estão associados com o risco de câncer em seres humanos.

## 2.2 ESTÉVIA

### 2.2.1 Histórico

*Stevia rebaudiana* Bertoni, originalmente conhecida como Ka'a He'ê (significa erva doce em tupi-guarani), é um gênero botânico pertencente à família *Asteraceae* (*Compositae*). A planta é um arbusto semi-perene nativa da região centro-oeste da América do Sul (Paraguai e Brasil). A sua propriedade edulcorante já era conhecida pelos índios Guaranis nativos do nordeste do Paraguai, que a utilizavam para adoçar chás e bebidas medicamentosas (BRANDLE, STARRATT e GIJZEN, 1998; GEUNS, 2003).

Apesar de conhecida pelos índios e documentada pelos pesquisadores espanhóis, somente em 1899 foi descrita pela primeira vez na literatura científica pelo naturalista suíço Moisés Santiago Bertoni (diretor da Faculdade de Agricultura de Assunção, Paraguai) classificando-a botanicamente como *Eupatorium rebaudiana*. Posteriormente, verificou-se que a planta pertencia ao gênero *Stevia*, e não *Eupatorium*. Em 1905, Bertoni a redefiniu como *Stevia rebaudiana*, membro da família *Compositae*, como esta é conhecida atualmente. Mais tarde a Sociedade Botânica do Paraguai denominou-a de *S. rebaudiana* Bertoni. O nome "rebaudiana" é dado em homenagem ao químico paraguaio Dr. Ovídio Rebaudi, que foi o primeiro a extrair uma substância doce das folhas da estévia (LIMA FILHO, VALOIS e LUCAS, 2004; PACKER, 2006).

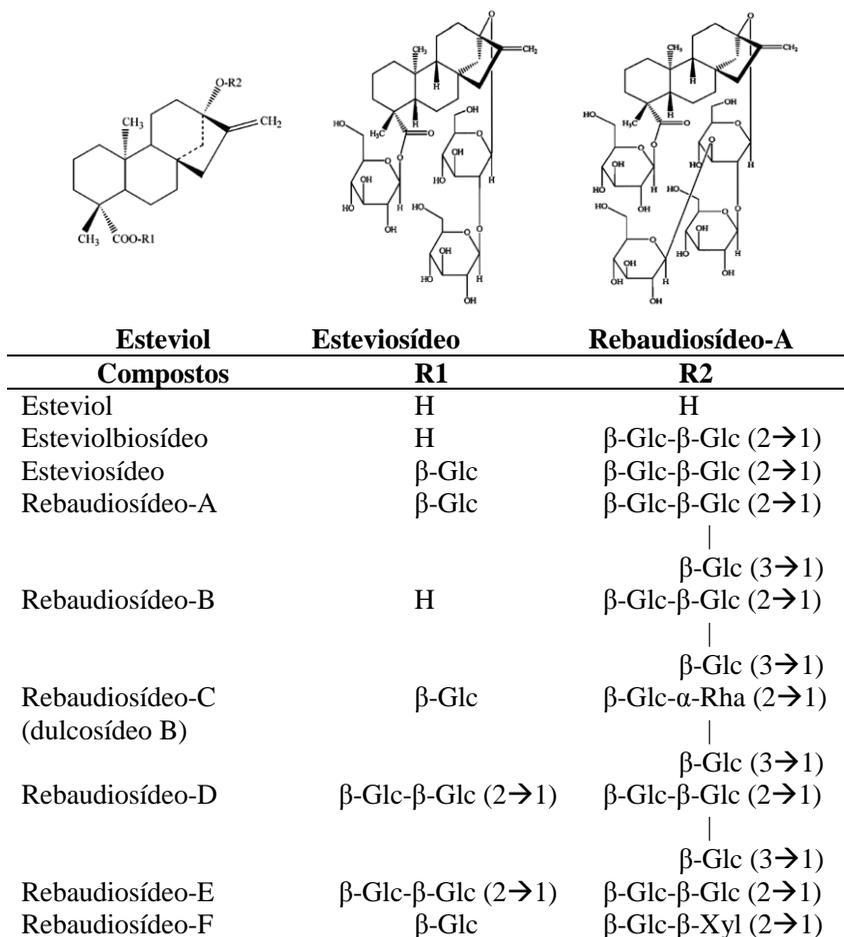
A primeira descrição da estévia no Brasil foi feita em 1926 e, em 1943, o assunto da planta edulcorante voltou à tona por meio de publicações científicas. Na década de 70, o interesse comercial ressurgiu por intermédio dos japoneses, quando intensificaram, paulatinamente, os estudos relativos à planta. Desde então, a planta ganhou importância do ponto de vista social, econômico, ambiental e político, principalmente pela produção de dois edulcorantes, o esteviosídeo e o rebaudiosídeo (Figura 01) (LIMA FILHO, VALOIS e LUCAS, 2004).

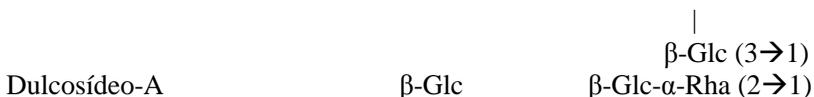
### 2.2.2 Estrutura química e poder edulcorante

O princípio doce foi isolado pela primeira vez em 1909 e, somente em 1931, o extrato foi purificado para produzir esteviosídeo. Em 1952, sua estrutura química foi estabelecida como um glicosídeo diterpênico, composto por três moléculas de glicose ligada a uma aglicona, a molécula esteviol (Figura 1) (LEMUS-MONDACA et al.,

2012). Durante a década de 70, outros compostos foram isolados, com poder adoçante muito superior à sacarose, presentes principalmente nas folhas. O teor de cada um varia entre 04 e 20% do peso seco das folhas, dependendo das condições de cultivo e crescimento. O esteviosídeo é o principal componente edulcorante (250 a 300 vezes superior à sacarose). Outros glicosídeos diterpênicos isolados das folhas de estévia, com o respectivo poder adoçante relativo à sacarose, são: esteviolbiosídeo (100-125), rebaudiosídeo-A (350-450), rebaudiosídeo-B (300-350), rebaudiosídeo-C (dulcosídeo B) (50-120), rebaudiosídeo-D (200-300), rebaudiosídeo-E (250-300), dulcosídeo-A (50-120) (GEUNS, 2002).

Figura 1 – Estrutura do esteviol e seus derivados





FONTE: GEUNS, 2003

A droga vegetal é constituída pelas folhas secas contendo, no mínimo, 12% de carboidratos totais e 4% de esteviosídeo (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). O esteviosídeo possui a maior concentração – 5 a 15% de a matéria seca foliar, enquanto o rebaudiosídeo apresenta-se em menor concentração nas folhas, de 3 a 6%, porém com um poder adoçante superior (1,2 a 1,5 vezes maiores). Existe, na verdade, uma correlação negativa entre o teor de esteviosídeo e rebaudiosídeo (LIMA FILHO, VALOIS e LUCAS, 2004). Outros compostos presentes, mas em concentração muito menor são: dulcosídeo-A ( $\pm 0,5\%$ ), esteviolbiosídeo (traços), rebaudiosídeo-A ( $\pm 3\%$ ), B (traços), C ( $\pm 1,5\%$ ), D e E (vestígios) (GEUNS, 2002; LEMUS-MONDACA, 2012). As folhas de *S. rebaudiana* contém ainda flavonoides, vitamina C e A, proteína, fibras, fósforo, zinco, cálcio, potássio, sódio e magnésio (GEUNS, 2003; PACKER, 2006).

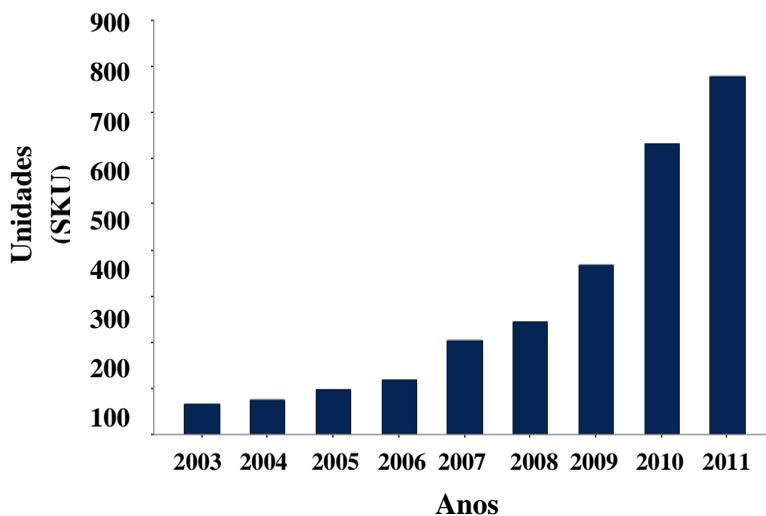
### 2.2.3 Emprego da estévia em produtos industrializados

Devido ao conjunto de suas características – doçura, propriedades terapêuticas de suas folhas, alegação do natural, relação custo-benefício positiva – a *S. rebaudiana* Bertoni tem atraído interesses econômicos e científicos. O Japão, em 1970, foi o primeiro país da Ásia que regulamentou o uso de esteviosídeo como agente edulcorante em alimentos, bebidas e na indústria farmacêutica. Desde então, o cultivo desta planta se expandiu para vários outros países da Ásia, incluindo China, Malásia, Singapura, Coreia do Sul, Taiwan e Tailândia. Na América é cultivada principalmente no Paraguai e no Brasil, mas também é cultivada na Argentina e no Uruguai. No Brasil, existem informações sobre a ocorrência de 14 espécies (PACKER, 2006; CHATSUDTHIPONG e MUANPRASAT, 2009). Os glicosídeos de esteviol são utilizados como edulcorantes para uma variedade de alimentos, tais como doces, tortas, pudins, iogurte, xaropes, balas, goma de mascar, leite em pó e condensado, vegetais em conserva, molhos de soja, cereais, algumas bebidas, o próprio adoçante dietético, além do seu emprego em pastas de dente e outros produtos farmacêuticos, sem causar efeitos colaterais ao ser humano. É importante destacar que, no nível atual de tecnologia, os produtos à base de estévia já são competitivos em termos de custos e preços de venda com os adoçantes

químicos artificiais (LIMA FILHO, VALOIS e LUCAS, 2004; CHATSUDTHIPONG e MUANPRASAT, 2009; GSI, 2011).

Globalmente, o interesse comercial em adoçantes de glicosídeo de esteviol tem crescido continuamente nos últimos oito anos e cada vez mais alimentos e bebidas adoçados com estévia estão sendo lançados no mercado. Desde 2008, com as aprovações contínuas pelos órgãos regulamentadores em todo o mundo, o aumento do número de produtos lançados com estévia apresentou crescimento expressivo (Figura 2). No primeiro semestre de 2011 houve um aumento de 15% em novos alimentos e bebidas lançados mundialmente, em comparação com o mesmo período de 2010, sendo que quase 80% destes produtos foram lançados nos Estados Unidos, Japão, França, Brasil e Chile (Figura 3) (GSI, 2011, 2012).

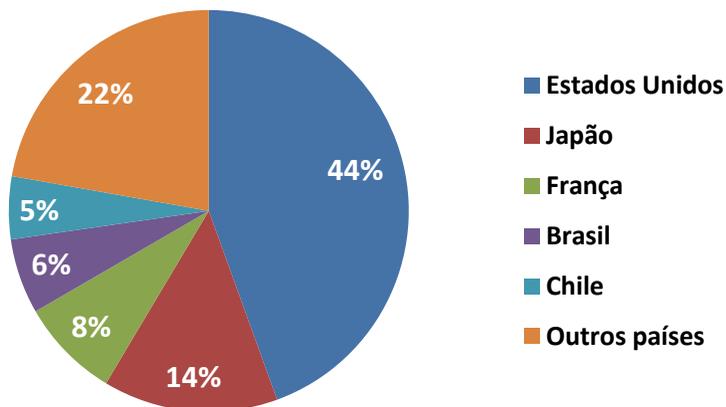
Figura 2 – Quantidade de produtos alimentícios com estévia lançados por ano em todo mundo no período de 2003 a 2011



FONTE: *Global Stevia Institute*, 2012

NOTA: SKU é um número ou cadeia de caracteres alfabéticos e numéricos que identificam um produto. É uma unidade universal que representa números de peças ou números de produtos.

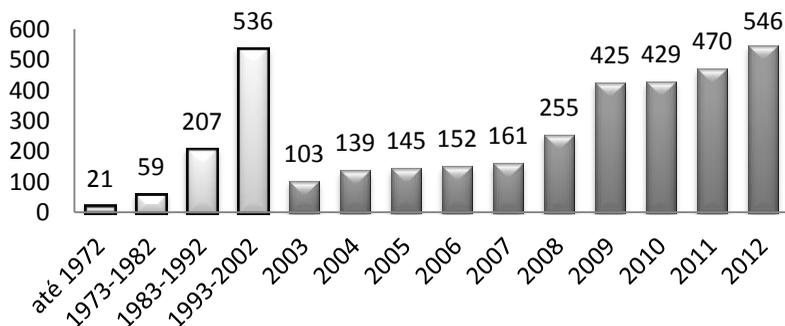
Figura 3 – Alimentos e bebidas com estévia lançados em diferentes países no ano de 2011



FONTE: *Global Stevia Institute*, 2012

É fato que a colocação da estévia no mercado cresceu acentuadamente nos últimos anos. Pode-se, portanto, relacionar esta evolução com o avanço na literatura sobre o tema. Em um levantamento de dados na literatura, nas bases de dados Bireme, PubMed, Scielo.org e Portal Periódicos Capes, utilizando como descritor o termo “*stevia*”, observa-se também uma curva ascendente na publicação científicas sobre o tema, especialmente na última década (Figura 4).

Figura 4 – Publicações científicas sobre estévia nos últimos anos



FONTE: Bases de dados Bireme, PubMed, Scielo.org e Portal Periódicos Capes.

## 2.2.4 Legislação

O uso de adoçantes é avaliado por órgãos governamentais em todo o mundo, incluindo a *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos e os comitês de especialistas científicos, tais como o *Scientific Committee on Food* (SCF), *European Food Safety Authority* (EFSA) da Comissão Europeia e o *Joint Expert Committee on Food Additives* administrado conjuntamente pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação e pela Organização Mundial da Saúde (JECFA/FAO/WHO).

No Brasil, a regulamentação do uso de edulcorantes é de responsabilidade do Ministério da Saúde, por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, considerando as referências internacionais do *Codex Alimentarius*, do *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA/FAO/WHO) e da FDA, nos Estados Unidos.

Atualmente, a estévia é aprovada como um adoçante para alimentos e bebidas em mais de 100 países pelos seus respectivos órgãos governamentais, incluindo Coreia do Sul, Japão, Argentina, Paraguai, Brasil, China, Rússia, Indonésia, México, Senegal, Tailândia e Israel (EFSA, 2010; FDA, 2012; GSI, 2012).

Nos Estados Unidos, alguns edulcorantes são denominados como Geralmente Reconhecidos como Seguros, ou seja, tem consenso científico sobre sua segurança baseada em uma história de uso ou sobre informações científicas bem documentadas. Em 2008, a FDA permitiu o *status* de GRAS para o rebaudiosídeo A e esteviosídeo purificados (pureza entre 95% e 98%), podendo ser legalmente comercializados e adicionados aos produtos alimentares vendidos nos Estados Unidos. Estes glicosídeos purificados não devem ser confundidos com o extrato puro das folhas de estévia, que são vendidas apenas como suplementos alimentares, por conter uma série de outros componentes ativos (EFSA, 2010; FDA, 2012; FITCH e KEIM, 2012).

No Brasil, a regulamentação ocorreu no fim da década de 80, como agente flavorizante e edulcorante em várias classes de alimentos (BRASIL, 1988). Em 2008, o JECFA/FAO/WHO afirmaram que o uso dos glicosídeos de esteviol puros ( $\geq 95\%$ ) é seguro para consumo humano como um ingrediente não-medicinal, não sendo cancerígenos, genotóxicos ou associados com qualquer toxicidade reprodutiva ou de desenvolvimento, em dose de até 4mg/kg de peso corporal por dia (EFSA, 2010).

No mesmo ano, em 2008, a ANVISA considerando que é necessário revisar a legislação que autoriza o uso de aditivos

edulcorantes em alimentos e, de acordo com as normas internacionais, atualizou o Regulamento Técnico que autoriza o uso de aditivos edulcorantes em alimentos, com seus respectivos limites máximos, mantendo a regulamentação dos glicosídeos de esteviol (BRASIL, 2008). É importante destacar que a ANVISA corrobora com a IDA estabelecida de 4mg/kg/dia.

Em 2010, a EFSA publicou um parecer científico favorável com relação à segurança dos glicosídeos de esteviol como aditivos alimentares e concordando com a IDA de 4mg/kg/dia. A avaliação foi enviada à Comissão Europeia que irá considerar se deve ou não autorizar as substâncias para o uso proposto na União Europeia (EFSA, 2010; EFSA, 2011). Essa aprovação é resultado de uma atualização regulatória que decorre desde 1985 quando o SCF avaliou o esteviosídeo como um potencial edulcorante, porém, ainda considerava a insuficiência de dados na literatura apropriados para avaliar adequadamente a segurança do esteviosídeo, concluindo o seu uso como toxicologicamente não-aceitável.

Mais recentemente, em 2012, a Organização de Saúde do Canadá acrescentou a estévia (glicosídeo de esteviol) à lista de aditivos alimentares aprovados para uso em alimentos e bebidas. Também em 2012, a estévia foi aprovada como um adoçante na África do Sul (GSI, 2012).

### 2.2.5 Segurança

A preocupação com os efeitos teratogênicos e sobre a fertilidade promovidos pelo esteviosídeo foi levantada depois que Mazzei-Planas e Kuc (1968) publicaram que houve redução de até 79% da fertilidade de ratas adultas como efeito do consumo de uma decoção de estévia. Posteriormente, dois estudos realizados com ratos machos trouxeram dados consistentes com a possibilidade de que o extrato de estévia pode diminuir a fertilidade em ratos machos. A administração de um extrato aquoso de *S. rebaudiana* refletiu na redução do peso final dos testículos (MELIS, 1999), da cauda epididimária (MELIS, 1999) e da vesícula seminal (OLIVEIRA-FILHO et al., 1989; MELIS, 1999).

A administração oral crônica a ratos de um extrato aquoso de folhas secas de estévia a ratos causou hipotensão induzida, diurese e natriurese com taxa de filtração glomerular constante (MELIS, 1994).

Estudos posteriores sobre avaliações toxicológicas dos esteviosídeo sugerem que é um composto relativamente seguro, além de oferecer alguns benefícios terapêuticos: anti-hiperglicêmica, anti-

hipertensiva, anti-inflamatória, anti-tumoral, anti-diarreico, diurético e imunomodulador (GEUNS, 2002, 2003; JEPENSEN et al., 2002).

Sobre a tolerabilidade do esteviosídeo em pacientes hiperlipidêmicos, não foram reveladas quaisquer alterações clinicamente relevantes nos parâmetros investigados (IMC, glicose, colesterol, triglicerídeos e enzimas ALT, AST e GGT), bem como efeitos adversos severos, concluindo que o esteviosídeo é seguro, embora não apresente efeito hipolipemiante (SILVA et al., 2006).

Em contrapartida, em um ensaio biológico com ratos *Wistar* tratados com solução de esteviosídeo (4mg/mL), Nunes et al. (2007) encontraram ocorrência de lesões nas células do sangue periférico, fígado, cérebro e baço, em níveis diferentes, sendo o maior efeito no fígado.

Em uma revisão de literatura com o objetivo de oferecer uma perspectiva sobre o possível risco genético associado com o consumo de glicosídeos de esteviol e de esteviosídeo, Brusick (2008) concluiu que essas substâncias não representam risco de dano genético após o consumo humano. Com base nos estudos analisados, nenhum dos compostos demonstrou reação direta com o DNA, evidenciando um baixo potencial mutagênico, geralmente limitado a ensaios *in vitro*. Nesta revisão, o ensaio realizado por Nunes et al. (2007) é questionado quanto à metodologia e, conseqüentemente, à validade dos resultados encontrados.

Carakostas et al. (2008) analisaram somente estudos conduzidos sob diretrizes de boas práticas e que foram submetidos a revisões por pares antes de serem aceitos para publicação, sobre o processo de avaliação da segurança do rebaudiosídeo-A para uso em alimentos e bebidas. Nesta revisão, os autores concluíram que os estudos sobre a toxicidade geral e reprodutiva de rebaudiosídeo-A corroboram com estudos realizados com glicosídeos de esteviol purificado, demonstrando segurança em altos níveis de consumo. Os autores ainda descrevem os resultados encontrados na literatura quanto à reprodução e fertilidade. No entanto, contestam alguns estudos (MAZZEI-PLANAS e KUC, 1968; OLIVEIRA-FILHO et al., 1989; MELIS, 1999) em relação aos efeitos da estévia sobre a fertilidade de fêmeas e machos, questionando a natureza pura do material de teste administrado e as limitações nos delineamentos experimentais.

Curry, Roberts e Brown (2008) administraram rebaudiosídeo-A em diferentes concentrações através da dieta para duas gerações de ratos machos e fêmeas. Em seus resultados não observaram associação a quaisquer sinais de toxicidade clínica ou efeitos adversos relacionados

aos parâmetros de desempenho reprodutivo, incluindo o desempenho do acasalamento, a fertilidade, o tempo de gestação e ciclos estrais, além de motilidade, concentração ou morfologia dos espermatozoides.

Gil et al. (2008) também concluíram que o consumo de extratos de diferentes concentrações de *S. rebaudiana* não afeta a fertilidade em ratos, porém está associado a uma acentuada diminuição do peso dos testículos, além do aumento das concentrações de testosterona e estrógeno.

Com o objetivo de avaliar agora a excreção renal do esteviol, Melis, Rocha e Augusto (2009) avaliaram o efeito da administração intravenosa desta aglicona e observaram a secreção de esteviol pelo epitélio tubular renal, causando diurese, natriurese, caliurese e uma redução na reabsorção tubular renal de excreção de glicose.

Chatsudthipong e Muanprasat (2009) chamaram atenção para áreas onde lacunas importantes no conhecimento permanecem, impedindo a regulamentação da estévia por comitês científicos importantes. Os autores destacaram: a necessidade de realização de mais estudos em humanos e com metodologias bem documentadas, como um pré-requisito fundamental; a padronização dos substratos utilizados em diferentes estudos permitindo conclusões unívocas sobre os efeitos observados; além de abordagens sobre o metabolismo do esteviol e seus derivados.

Awney, Massoud e El-Maghrabi (2010) em um estudo exploratório experimental investigaram os efeitos de três doses de esteviosídeo (alta, baixa e baixa com inulina) em ratos e não observaram efeitos tóxicos sobre peso corporal, parâmetros hematológicos e bioquímicos ou sobre a atividade das enzimas investigadas. Park e Cha (2010) obtiveram resultados anti-obesogênicos com a suplementação de extrato de estévia em ratos com obesidade induzida por dieta com alto teor de gordura.

Lemus-Mondaca et al. (2012) reuniram uma seleção de dados básicos essenciais provenientes de diversas pesquisas científicas sobre a estévia, enfatizando o potencial desta como um adoçante de alta intensidade juntamente com as suas propriedades funcionais e benefícios terapêuticos. Os autores destacaram a *S. rebaudiana* como uma boa fonte de carboidratos, proteínas, fibra bruta e minerais, sendo útil na dietoterapia daqueles que precisam restringir a ingestão de carboidratos na dieta. Além disso, reforçaram a sua inocuidade, mostrando-se não-mutagênica, não-teratogênica e não-cancerígena.

Recentemente, Shivanna et al. (2013) publicaram resultados positivos sobre as propriedades antioxidantes de folhas de estévia

estudadas *in vivo* em relação às complicações diabéticas em ratos. Os resultados sugerem que os polifenóis presentes nas folhas de estévia são os principais responsáveis pelos múltiplos benefícios observados: redução da glicose no sangue, incremento do nível de insulina; melhora a sua capacidade antioxidante através de enzimas antioxidantes; melhora a tolerância à glicose e sensibilidade à insulina; redução dos danos no fígado e nos rins induzidos pela estreptozotocina.

Observa-se que a literatura têm se ampliado sobre os efeitos de compostos da estévia. Deve-se, portanto, explorar as controvérsias quanto aos aspectos de inocuidade e considerar as lacunas ainda existentes.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito do edulcorante à base de estévia em ratas tratadas durante a prenhez e o reflexo do tratamento em seus fetos.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Nas matrizes:

- Quantificar o consumo de ração e o ganho de peso gestacional.
- Avaliar o peso dos órgãos: fígado, rim e placentas.
- Determinar as concentrações séricas de glicose.
- Avaliar o perfil lipídico sérico (triglicerídeos, colesterol total, HDL-colesterol, LDL-c e VLDL-colesterol).
- Avaliar o número de fetos por ninhada.
- Calcular a taxa de viabilidade ao nascimento.

Nos fetos:

- Avaliar o peso dos fetos.
- Avaliar o comprimento crânio-caudal.
- Avaliar a medida do cordão umbilical.
- Verificar a presença de malformações maiores externas.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 DESENHO DO ESTUDO

Estudo experimental desenvolvido no Laboratório de Nutrição Experimental da Universidade Federal de Santa Catarina por meio de ensaio biológico com aproximadamente 40 dias de duração (adaptação, acasalamento e tempo de gestação) (Figura 5).

Figura 5 – Protocolo experimental do ensaio biológico realizado no período de maio-jul/2012.

Período experimental																																			
Maio			Junho																											Julho					
29	30	31	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	1	2	3
Adaptação			Acasalamento													Intervenção										Sacrifício									

### 4.2 ASPÉCTOS ÉTICOS

Após aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (Protocolo PP00777), foi iniciado o ensaio biológico com animais mantidos de acordo com os Princípios Éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### 4.3 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 32 fêmeas e 08 machos da espécie *Rattus norvegicus albinus* Wistar procedentes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Foram estudadas ratas fêmeas, primíparas, com peso médio de 203,6 g ( $\pm 12,9$ ) e idade média de 60 dias. Os machos foram utilizados apenas para o acasalamento.

As ratas foram distribuídas aleatoriamente em 04 grupos de 08 animais cada:

GC (controle - água): dieta padrão e administração de água

GS (sacarose): dieta padrão e administração de sacarose diluída em água

GE4 (estévia - 4mg/kg/dia): dieta padrão e administração de doses de 4mg/kg/dia de adoçante

GE8 (estévia - 8mg/kg/dia): dieta padrão e administração de doses de 8mg/kg/dia de adoçante

Os animais foram alocados em caixas de polipropileno de dimensões adequadas (41x34x16cm), com maravalha, em ambiente climatizado ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), com ciclo claro/escuro de 12 horas, controlado por *timer*. Os animais receberam água e dieta padrão *ad libitum* durante todo o período de experimento.

#### 4.4 ACASALAMENTO

As ratas foram distribuídas de acordo com a data de nascimento em caixas de polipropileno para o acasalamento com os machos na proporção de 01 macho para 04 fêmeas, contabilizando os 08 ratos machos. A confirmação da prenhez foi feita por esfregaços vaginais com solução fisiológica a 0,9% para verificar a presença de espermatozoides. Os lavados vaginais foram analisados com o auxílio de um microscópio de luz e a observação da presença de espermatozoides no esfregaço foi usada como indicador do primeiro dia de prenhez. Confirmada a prenhez, as ratas foram separadas dos machos e distribuídas aleatoriamente entre os grupos, ficando duas fêmeas por caixa. Após o acasalamento, os machos foram isolados até o final do experimento.

#### 4.5 DIETA E GAVAGEM

A dieta padrão comercial para ratos administrada foi da marca Nuvilab® CR1 Nuvital Nutrientes S/A, *Brazil*. A sacarose utilizada foi açúcar cristal comum, adquirido comercialmente. O adoçante a base de estévia (Stevita®) foi adquirido em supermercado na cidade de Florianópolis-SC. Os critérios de seleção do adoçante foram a composição (estévia como único edulcorante), forma de apresentação (líquido) e a disponibilidade do produto no mercado local.

O adoçante foi administrado por gavagem do 8º ao 17º dia de prenhez – período comum de tratamento para avaliar a toxicidade de uma substância durante a gestação da rata (ERB, 2005):

GC: água pura no volume igual ao maior volume administrado entre os grupos;

GS: solução de sacarose (no volume igual ao maior volume administrado) com diluição correspondente às indicações do fabricante do adoçante (0,4mL – 08 gotas – equivalem a 01 colher de chá de açúcar);

GE4: adoçante líquido na dosagem de 4mg/kg/dia. O volume calculado foi acrescido de água para corresponder ao maior volume administrado; GE8: adoçante líquido na dosagem de 8mg/kg/dia (maior volume administrado)

Para os grupos GE4 e GE8 as doses de adoçantes foram calculadas de acordo com o peso do primeiro dia de gavagem (oitavo dia de prenhez) e foi recalculado no sétimo dia de gavagem (14° dia de prenhez), para corresponder à variação de peso.

#### 4.6 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

No 20° dia de prenhez (a gestação da rata tem duração de 21 dias), as ratas foram pesadas e anestesiadas por via intraperitoneal, utilizando-se cloridrato de xilazina (10mg/kg) e quetamina (90mg/kg), para a realização da cesariana, retirada dos órgãos e de sangue. O sangue foi coletado por punção cardíaca e imediatamente utilizado para dosagem da glicose; o restante foi colocado em tubos de ensaio heparinizados e, em seguida, centrifugado para obtenção do plasma para posterior análise de perfil lipídico. O plasma foi armazenado em microtubos tipo *Eppendorf* sob temperatura negativa. Depois destes procedimentos, as ratas foram submetidas à eutanásia por meio do aprofundamento anestésico.

A intervenção cirúrgica para retirada dos fetos foi por laparotomia com incisão ampla longitudinal mediana, expondo os órgãos internos. Em sequência os cornos uterinos foram abertos para extração dos fetos e das placentas. Após a cesariana, os fetos foram cuidadosamente retirados e examinados para avaliar: peso da ninhada, considerando o número de fetos; comprimento craniocaudal; medida do cordão umbilical; e, presença de malformações maiores externas.

Nas matrizes foram avaliados: ganho de peso gestacional (diferença do peso corporal entre o 1° e último dia de prenhez), consumo de ração, número de fetos e a taxa de viabilidade ao nascimento (VA), além do peso do fígado, rim direito e das placentas. Foram realizadas ainda as determinações séricas de glicose, triglicerídeos, colesterol total e frações (HDL-c, LDL-c e VLDL-c). As taxas de viabilidade ao nascimento são observadas conforme:  $VA = 100 \times (\text{número de fetos natimortos/nascidos vivos})$ .

#### 4.7 AFERIÇÃO DO PESO E MEDIDAS DE COMPRIMENTO

O peso corporal das ratas foi aferido semanalmente durante todo o experimento. Também foram registrados os pesos referentes ao primeiro e último dias de prenhez e primeiro e sétimo dias de gavagem (oitavo dia de prenhez), sendo os dados expressos em ganho percentual que foram calculados de acordo com a seguinte fórmula:  $\Delta\% = (\text{peso no dia } x - \text{peso inicial}) \times 100 / \text{peso inicial}$ ; onde, x representa os dias da pesagem. Para a pesagem, foi utilizada balança eletrônica com capacidade de 1,5kg (Coleman, modelo PN-3015 com sensibilidade para 0,1g).

O peso dos fetos foi aferido pelo peso da ninhada, considerando o número de fetos. Para a aferição do peso dos fetos e dos órgãos das matrizes (fígado, rim e placentas) foi utilizada balança analítica de precisão (Marte – Sensib com sensibilidade para 0,001g). As placentas também foram pesadas em grupo, considerando o tamanho da ninhada por rata.

Com auxílio de um paquímetro, foram realizadas as medidas de comprimento craniocaudal em cada feto e dos cordões umbilicais. O comprimento craniocaudal é a medida entre a região occipital e a base do início da cauda. O comprimento do cordão umbilical corresponde à distância da ligação da base da placenta até a raiz da cicatriz umbilical no abdome do feto.

#### 4.8 CONSUMO ALIMENTAR

O consumo de ração foi aferido três vezes por semana durante todo o ensaio biológico, pela diferença entre o alimento oferecido e o residual. O valor final foi a média de o consumo alimentar de dois animais por caixa.

#### 4.9 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

As determinações bioquímicas foram feitas no Laboratório de Nutrição Experimental/UFSC.

A dosagem de glicose plasmática foi determinada utilizando-se um glicosímetro digital (Accu-Chek Active<sup>®</sup>, Roche) e tiras reagentes apropriadas. As determinações foram realizadas no momento da coleta sanguínea por punção cardíaca.

Para as dosagens de triglicerídeos, colesterol total e fração HDL utilizaram-se kits padronizados e comercialmente disponíveis por

metodologia enzimática-colorimétrica (ANALISA<sup>®</sup>). As dosagens foram feitas em duplicata.

Para a determinação da fração LDL foi utilizada a fórmula de Friedewald:  $LDL_{\text{colesterol}} = \text{colesterol total} - (\text{HDL}_{\text{colesterol}} + \text{VLDL}_{\text{colesterol}})$ , sendo que  $\text{VLDL}_{\text{colesterol}} = \text{triglicerídeos}/5$ .

#### 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

A análise dos dados foi realizada no software *GraphPad Instat* 3.0. Os resultados foram expressos como média±desvio-padrão. Para verificação de diferenças das variáveis entre os grupos estudados, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni. O teste *t* pareado foi utilizado para comparação dos valores de peso inicial e final das ratas. O teste exato de Fisher com IC95% foi usado para a análise das proporções de malformações e óbitos fetais. Para todas as análises, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## 5 ARTIGO ORIGINAL

### **EFEITO DO ADOÇANTE À BASE DE ESTÉVIA (*S. rebaudiana*) DURANTE A GESTAÇÃO DE RATAS WISTAR E O REFLEXO DO TRATAMENTO NOS FETOS**

Estévia em ratas prenhes e nos fetos  
*Stevia in pregnant rats and offspring*

#### **Autores:**

**Lílian de Souza Leite Fausto** - Nutricionista, aluna do Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.

**Vera Lúcia Cardoso Garcia Tramonte** - Doutora, docente do Departamento de Nutrição e do Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.

**Sandra Regina Paulon Avancini** - Doutora, docente do Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.

**Gerson Luis Faccin** - Doutor, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.

**Ricardo Tramonte** – Doutor, docente do Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.

**Instituição:** trabalho de mestrado realizado no Programa de Pós-Graduação em Nutrição/UFSC – Programa de Bolsas Demanda Social / Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

**Autor para correspondência:** Vera Lúcia Cardoso Garcia Tramonte. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Campus Universitário – Trindade – CEP: 88040-900 – Florianópolis-SC, Brasil. e-mail: [velutra@yahoo.com.br](mailto:velutra@yahoo.com.br)  
Fone: (48) 3721-5138 - Fax: (48) 3721-9737

## RESUMO

**OBJETIVOS:** avaliar o efeito do adoçante à base de estévia em ratas prenhes e o reflexo do tratamento nos fetos.

**MÉTODOS:** vinte oito ratas *Wistar* foram distribuídas em 04 grupos: GC (controle)– dieta padrão e água; GS (sacarose)– dieta padrão e solução de sacarose; GE4 (estévia 4mg/kg/dia)– dieta padrão e 4mg/kg/dia de adoçante; GE8 (estévia 8mg/kg/dia)– dieta padrão e 8mg/kg/dia de adoçante. O tratamento ocorreu do 8º ao 17º dia de prenhez, por gavagem. Foram avaliados: consumo de ração, ganho de peso gestacional, peso de órgãos, concentrações séricas de glicose, perfil lipídico sérico, número de fetos, peso e comprimento dos fetos, medida do cordão umbilical e presença de malformações maiores externas.

**RESULTADOS:** o consumo de ração foi estatisticamente diferente entre os grupos. Houve ganho gradual e progressivo do peso corporal das ratas durante a prenhez em todos os grupos, sendo este ganho mais evidente no período final, porém não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas. Houve redução significativa na concentração plasmática de HDL-c das ratas tratadas com adoçante. O peso e comprimento dos fetos foram significativamente maiores no GE8. Apesar de ter havido aumento do número de natimortos e de malformações nos grupos tratados, os dados não foram significativamente diferentes dos controles.

**CONCLUSÃO:** o adoçante à base de estévia durante a prenhez não mostrou efeitos nocivos para a mãe ou para o feto. Contudo, estudos controlados em humanos são necessários para determinar os efeitos do adoçante em grupo populacionais específicos.

**Palavras-chave:** Stevia; Edulcorantes; Adoçantes Dietéticos.

## ABSTRACT

**OBJECTIVE:** the present study assessed the effect of stevia in pregnant rats and its consequences on their fetuses.

**METHODS:** twenty eight *Wistar* rats were randomly divided into four groups: a control group (CG)– fed with a commercial chow and water; sucrose group (SG)– fed with a commercial chow and sucrose; GE4 (stevia 4mg/kg/day)– fed with a commercial chow and 4mg/kg/day sweetener; GE8 (stevia 8mg/kg/day)– fed with a commercial chow and 8mg/kg/day sweetener. The treatment was from the 8th to 17th days of pregnancy by gavage. The observed aspects were: feed intake, gestational weight, organ weight, levels of serum glucose, lipid profile, number of fetuses, fetal weight and length, the length of the umbilical cords and the presence of external malformations.

**RESULTS:** the feed intake was statistically different between groups. There was a progressive and gradual increase in body weight during the course of pregnancy in all the groups, which was more evident in the final period, but with no significant difference among groups. There was significant reduction in plasma HDL-c of rats treated with sweetener. The weight and length of fetuses were significantly higher in GE8. Although the study showed increasing numbers of stillbirths and malformations in the treated groups, the data were not significantly different from the Control Group.

**CONCLUSION:** these results showed no ill effects to the mother or the fetus. However, controlled studies in humans are needed to determine the effects of the sweetener group specific population.

**Keywords:** Stevia; Sweetening Agents; Dietetic Sweeteners.

## INTRODUÇÃO

*Stevia rebaudiana* Bertoni é um arbusto semi-perene nativa da região centro-oeste da América do Sul (Paraguai e Brasil). A sua propriedade edulcorante já era conhecida pelos índios Guaranis nativos do nordeste do Paraguai, que a utilizavam para adoçar chás e bebidas medicamentosas<sup>1,2</sup>. O esteviosídeo é o principal componente edulcorante encontrado nas folhas de estévia com poder adoçante de 250 a 300 vezes superior à sacarose<sup>3</sup>.

Globalmente, o interesse comercial em adoçantes de glicosídeo de esteviol tem crescido continuamente e cada vez mais alimentos e bebidas adoçados com estévia estão sendo lançados no mercado<sup>4,5</sup>. O interesse, científico ou comercial, em plantas medicinais e aromáticas é crescente e a espécie sul-americana *Stevia rebaudiana* Bertoni é uma planta de importância econômica que vem atraindo considerável controvérsia<sup>6</sup>.

Há relatos científicos que a estévia provocou infertilidade em ratos fêmeas e machos<sup>7,8,9</sup>, além de redução do peso final dos testículos<sup>9</sup>, da cauda epididimária<sup>9</sup> e da vesícula seminal<sup>8,9</sup>, causou hipotensão induzida, diurese e natriurese com taxa de filtração glomerular constante<sup>10</sup>, além de ocorrência de lesões nas células do sangue periférico, fígado, cérebro e baço, em níveis diferentes, sendo o maior efeito no fígado<sup>11</sup>.

Outros estudos sobre avaliações toxicológicas dos esteviosídeo sugerem benefícios terapêuticos: anti-hiperglicêmica, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, anti-tumoral, anti-diarreico, diurético e imunomodulador<sup>2,3,12,13</sup> e não sugerem quaisquer sinais de toxicidade clínica ou efeitos adversos relacionados aos parâmetros de desempenho reprodutivo, incluindo o desempenho do acasalamento e a fertilidade<sup>14,15</sup>, o tempo de gestação e ciclos estrais, além de motilidade, concentração ou morfologia dos espermatozoides<sup>14</sup>.

Observa-se que a literatura têm se ampliado sobre os efeitos de compostos da estévia. Deve-se, portanto, explorar as controvérsias quanto aos aspectos de inocuidade e considerar as lacunas ainda existentes.

No Brasil, ressalta-se a carência de estudos que forneçam estimativas sobre a prevalência de utilização de adoçantes dietéticos à base de estévia pela população em geral ou por grupos específicos, especialmente de mulheres durante a

gestação e sua relação com a saúde. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito da administração oral de adoçante à base de estévia sobre ratas prenhes e o reflexo do tratamento nos seus fetos.

## **METODOLOGIA**

Estudo experimental desenvolvido no Laboratório de Nutrição Experimental da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), com aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC (Protocolo PP00777).

O adoçante a base de estévia (Stevita®) foi adquirido comercialmente em supermercado na cidade de Florianópolis-SC. Os critérios de seleção foram a composição (estévia como único edulcorante), forma de apresentação (líquido) e a disponibilidade do produto no mercado local.

Foram utilizadas 28 fêmeas e 08 machos da espécie *Rattus norvegicus albinus* Wistar procedentes do Biotério Central da UFSC. Foram estudadas ratas fêmeas, primíparas, com média de peso de 203,6g ( $\pm 12,9$ ) e média de idade de 60 dias. As ratas foram distribuídas em caixas de polipropileno para o acasalamento com os machos na proporção de 01 macho para 04 fêmeas. A confirmação da prenhez foi feita através de esfregaços vaginais com solução fisiológica a 0,9% para verificar a presença de espermatozoides. A presença de espermatozoides no esfregaço foi usada como indicador do primeiro dia de prenhez. Confirmada a prenhez, as ratas foram separadas dos machos e distribuídas aleatoriamente entre os grupos, ficando duas fêmeas por caixa. Após o acasalamento, os machos foram isolados até o final do experimento.

Todos os animais foram alocados em caixas de polipropileno de dimensões adequadas, com maravalha, em ambiente climatizado ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), com ciclo claro/escuro de 12 horas, controlado por timer. Os animais receberam água e dieta padrão *ad libitum* durante todo o período de experimento.

As ratas foram distribuídas em 04 grupos de 07 animais cada, de acordo com o produto para gavagem, administrados do 8° ao 17° dia de prenhez<sup>16</sup>:

Grupo Controle (GC): água pura no volume igual ao maior volume administrado entre os grupos;

Grupo Sacarose (GS): solução de sacarose (no volume igual ao maior volume administrado) com diluição correspondente às

indicações do fabricante do adoçante (0,4mL – 08 gotas – equivalem a 01 colher de chá de açúcar);

Grupo estévia - 4mg/kg/dia (GE4): adoçante líquido na dosagem de 4mg/kg/dia. O volume calculado foi acrescido de água para corresponder ao maior volume administrado;

Grupo estévia - 8mg/kg/dia (GE8): adoçante líquido na dosagem de 8mg/kg/dia (maior volume administrado).

No 20° dia de prenhez, as ratas foram pesadas e anestesiadas por via intraperitoneal, utilizando-se cloridrato de xilazina (10mg/kg) e quetamina (90mg/kg), para a realização da cesariana, retirada dos órgãos e de sangue. A intervenção cirúrgica para retirada dos fetos foi por laparotomia com incisão ampla longitudinal mediana, expondo os órgãos internos. Em sequência os cornos uterinos foram abertos para extração dos fetos e das placentas. Após a cesariana, os fetos foram cuidadosamente retirados e examinados para avaliar: peso da ninhada, considerando o número de fetos; comprimento craniocaudal; medida do cordão umbilical; e, presença de malformações maiores externas (principalmente espinha bífida, encurtamento dos membros e lábio leporino/fenda palatina, que correspondem às dismorfias mais frequentes).

Nas matrizes foram avaliados: ganho de peso gestacional (diferença do peso corporal entre o 1° e último dia de prenhez), consumo de ração, número de fetos e a taxa de viabilidade ao nascimento (VA), além do peso do fígado, rim direito e das placentas. Foram realizadas ainda as determinações séricas de glicose, triglicerídeos, colesterol total e frações (HDL, LDL e VLDL). As taxas de viabilidade ao nascimento são observadas conforme:  $VN = 100 \times (\text{número de fetos natimortos/nascidos vivos})$ .

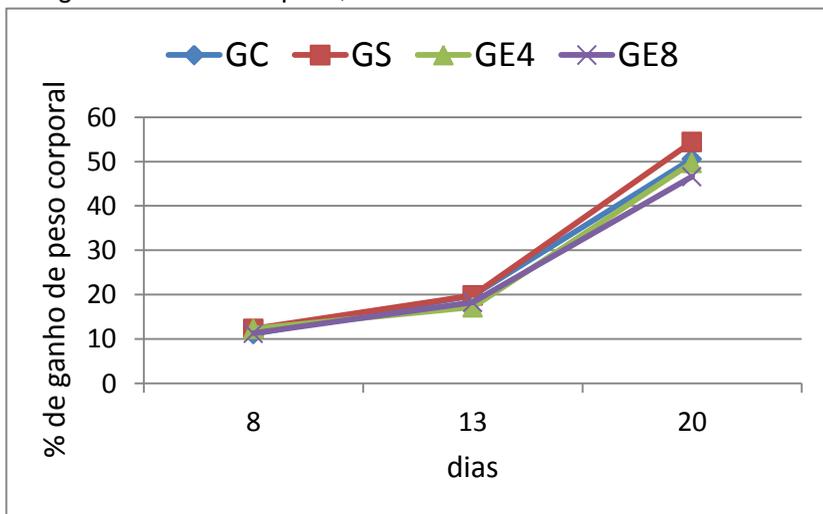
A análise dos dados foi realizada no software *GraphPad InStat* 3.0. Os resultados foram expressos como média, desvio-padrão. Para verificação de diferenças das variáveis entre os grupos estudados, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni. O teste *t* pareado foi utilizado para comparação dos valores de peso inicial e final das ratas. O teste exato de Fisher com IC95% foi usado para a análise das proporções de malformações e óbitos fetais. Para todas as análises, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Foi significativa a diferença no consumo de ração entre os grupos ( $p < 0,0001$ ). O grupo controle apresentou a maior média de consumo ( $419,86 \pm 30,53g$ ), enquanto os animais que receberam solução de sacarose (GS) apresentaram a menor média de consumo de ração ( $337,47 \pm 14,73g$ ).

Apesar das diferenças no consumo de ração, os resultados significativos não refletiram em diferenças do peso final entre grupos ( $p = 0,320$ ) ou no ganho de peso gestacional nos diferentes grupos ( $p = 0,254$ ). Houve ganho ponderal durante todo o período de prenhez nos animais dos quatro grupos com variação significativa de peso (final – inicial) ( $p < 0,001$ ). O maior ganho de peso foi observado no GS ( $113,89 \pm 12,6g$ ) (Figura 01).

**Figura 01** – Ganho percentual de peso das ratas *Wistar* em função do primeiro dia de prenhez durante tratamento com adoçante à base de estévia e sacarose expostas durante a fetogênese – Florianópolis, 2012.



Os grupos foram tratados do 8° ao 17° dia de prenhez.  
Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ).

Não se observaram diferenças significativas entre os pesos de fígado, rins e placentas das ratas (Tabela 01). Quanto ao perfil lipídico, na Tabela 01 pode-se observar redução significativa na concentração plasmática de HDL-c das ratas

tratadas com adoçante ( $p=0,02$ ). Observa-se que não houve diferenças significativas ( $p>0,05$ ) entre os tratamentos para as concentrações de triglicerídeos, colesterol total, LDL-c, VLDL-c, bem como da glicemia.

**Tabela 01** – Efeito do tratamento com adoçante à base de estévia e sacarose sobre parâmetros morfométricos e séricos das ratas *Wistar* expostas durante a fetogênese – Florianópolis, 2012.

	GC n=7	GS n=7	GE4 n=7	GE8 n=7	p*
Consumo de ração (g)	419,86±30, 53 a	337,47±14, 73 b	386,83±19, 67 c	385,79±17, 42 cd	<0,00 1
Ganho de peso gestacional (g)	102,57±11, 6	113,89±12, 6	110,21±14, 2	103,57±8,5	0,25
Peso da placenta (g)	2,49±0,36	2,47±0,26	2,44±0,25	2,65±0,32	0,06
Peso do fígado (g)	12,84±1,52	13,00±0,89	12,85±1,28	12,68±1,10	0,97
Peso do rim (g)	0,82±0,11	0,86±0,06	0,81±0,05	0,81±0,06	0,61
Glicose (mg/dL)	108,6±9,4	128,7±28,3	112,6±20,4	105,0±13,8	0,13
Triglicerídeos (mg/dL)	173,9±50,1	147,5±38,0	215,9±89,3	221,2±52,1	0,09
Colesterol total (mg/dL)	99,7±10,9	109,8±13,2	94,9±11,1	110,4±12,4	0,06
HDL-c (mg/dL)	19,1±4,9 ab	22,2±4,7 a	15,5±3,5 b	15,3 ±3,6 b	0,02
LDL-c (mg/dL)	45,8±16,9	58,1±16,3	43,4±15,9	50,9±15,1	0,35
VLDL-c (mg/dL)	34,8±10,0	29,5±7,6	43,2±17,9	44,3±10,4	0,09

Resultados apresentados como média±desvio-padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas ( $p<0,05$ ). \*ANOVA, pós-teste de Bonferroni

A Tabela 02 apresenta as variáveis fetais analisadas.

**Tabela 02** – Efeito do tratamento com adoçante à base de estévia e sacarose nos fetos das ratas *Wistar* expostas durante a fetogênese – Florianópolis, 2012.

	GC n=7	GS n=7	GE4 n=7	GE8 n=7	p*
<b>Número de fetos (n)</b>	11±2,98	13±1,50	12±2,12	12±1,68	0,378
<b>Peso dos fetos (g)</b>	2,38±0,15 a	2,55±0,19 ab	2,52±0,05 ab	2,62±0,15 b	0,04
<b>Comprimento dos fetos (cm)</b>	2,90±0,25 a	2,97±0,25 ab	2,92±0,18 ab	2,99±0,14 b	0,009
<b>Comprimento do cordão umbilical (cm)</b>	2,49±0,36	2,47±0,26	2,44±0,25	2,65±0,32	0,803
<b>Número total de fetos (n)</b>	88	89	85	82	-
<b>Malformações fetais (n)</b>	0	0	1	2	-
<b>Número de natimortos (n)</b>	0	1	2	2	-
<b>Taxa de viabilidade ao nascer (%)</b>	100	98,9	97,7	97,6	-

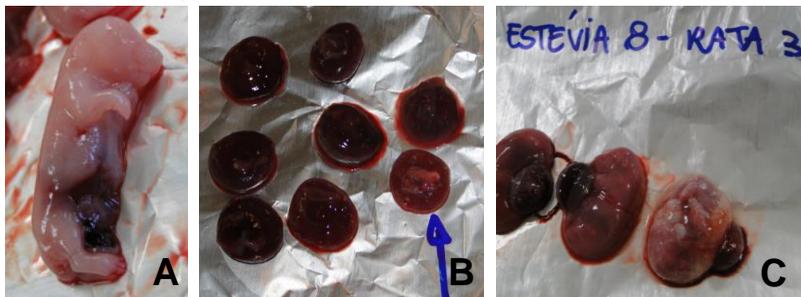
Resultados apresentados como média±desvio-padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas ( $p<0,05$ ). \*ANOVA, pós-teste de Bonferroni

Quanto ao peso e comprimento dos fetos, houve diferença significativa no efeito do tratamento, com médias superiores nos fetos do GE8 ( $p=0,04$ ). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas no número de fetos por rata e no comprimento do cordão umbilical ( $p>0,05$ ).

Não foram observadas malformações nos fetos dos grupos Controle e Sacarose. Enquanto no GE4 foi observado macroscopicamente um animal com abertura abdominal e hipovascularizado (1,2%) (Figura 02). E no GE8, os animais malformados (2,4%) apresentaram pele delgada, placenta com hipovascularização, encurtamento dos membros superiores, necrose tecidual evidente e do líquido amniótico. Pelo teste exato de Fisher não foram observadas diferenças significativas na ocorrência de malformações por grupo: GC e GS ( $p=1,00$  – IC95% 0,93;1,07), GC e GE4 ( $p=0,78$  – IC95% 0,94;1,09), GC e GE8 ( $p=0,59$  – IC95% 0,95;1,11), GS e GE4 ( $p=0,78$  – IC95%

0,94;1,09), GS e GE8 ( $p=0,58$  – IC95% 0,95;1,11) e GE4 e GE8 ( $p=0,61$  – IC95% 0,97;1,05).

**Figura 02** – Malformações em feto e placenta hipovascularizada em ratas tratadas com adoçante à base de estévia expostas durante a fetogênese – Florianópolis, 2012.



A – feto com abertura abdominal e hipovascularizado (GE4); B – placenta hipovascularizada (GE8); C – feto natimorto com necrose tecidual evidente e do líquido amniótico (GE8).

Os grupos que receberam o adoçante à base de estévia apresentaram três fetos natimortos (2,4%), enquanto no GS houve ocorrência de apenas 01 animal natimorto (1,1%) com necrose bolhosa. O grupo Controle não teve nenhuma ocorrência de fetos natimortos. Com isso, a taxa de viabilidade ao nascimento teve seu menor percentual no grupo que recebeu maior dose de adoçante (GE8=97,6%). A análise estatística pelo teste de Fisher não mostrou diferença estatisticamente significativa entre número de fetos natimortos por grupo: GC e GS ( $p=1,00$  – IC95% 0,99;1,03), GC e GE4 ( $p=0,24$  – IC95% 0,99;1,06), GC e GE8 ( $p=0,23$  – IC95% 0,99;1,06), GS e GE4 ( $p=0,61$  – IC95% 0,97;1,05), GS e GE8 ( $p=0,61$  – IC95% 0,97;1,06) e GE4 e GE8 ( $p=1,00$  – IC95% 0,95;1,05).

As consequências comportamentais da exposição ao adoçante à base de estévia também foram observadas. Comparados aos animais do Grupo Controle, as ratas do Grupo Sacarose eram animais mais dóceis e de fácil manipulação, enquanto as ratas do GE8 apresentaram comportamento mais esquivo durante a manipulação.

## DISCUSSÃO

Alterações no organismo materno causam alterações do desenvolvimento embrionário<sup>17,18</sup> e pós-natal, sendo diagnosticada particularmente pela perda de peso corporal, embora outras alterações também sejam consideradas: decréscimo do peso corporal, de consumo de alimento e água, alteração da deambulação na gaiola, diarreia, mortalidade materna, entre outros<sup>19</sup>.

Foram observadas alterações significativas no consumo de ração, com menor média de consumo pelo GS. Contudo, este comportamento pode ser justificado pela densidade calórica<sup>20</sup> agregada à solução de sacarose administrada, sugerindo que houve uma compensação energética<sup>21</sup>. Uma dieta rica em glicose e de alto teor calórico influencia o controle da saciedade e, conseqüentemente, diminui o consumo de alimentos<sup>22</sup>.

Resultados diferentes foram encontrados em um estudo com aspartame (25 e 50 mg/kg/dia) em ratas prenhes, no qual não houve diferenças significativas na média de consumo de ração entre os grupos<sup>23</sup>. Também não foram observadas diferenças significativas na ingestão diária e peso corporal em ratos obesos tratados com sacarose ou adoçante não-nutritivo (99% eritritol, 1% aspartame)<sup>22</sup>.

O peso de órgãos é um requisito importante em ensaios toxicológicos para avaliar os efeitos em órgãos específicos, já que este pode ser um indicador mais sensível para o efeito de um composto experimental e pode ocorrer na ausência de quaisquer alterações morfológicas<sup>24</sup>. No presente trabalho, não se observou alteração do peso das placentas, fígado e rins das ratas, o que pode ser uma indicação de ausência de alteração placentária, danos hepático e renal devido ao adoçante.

Em um estudo com ratas prenhes tratadas com 30mg/kg/dia de sucralose por gavagem do 10º ao 14º dia de prenhez também não foram encontradas alterações placentárias<sup>25</sup>. Porém, foi observada redução significativa nos pesos das placentas de ratas tratadas com 60 mg/kg/dia de ciclamato de sódio via intraperitoneal do 10º ao 14º dia de prenhez<sup>26</sup>, com 14 mg/kg de aspartame em temperatura ambiente e a 40°C administrado por gavagem no 9º, 10º e 11º dias de gestação<sup>27</sup> e com 25 e 50mg/kg/dia de aspartame administrado por gavagem do 8º ao 12º dia de prenhez<sup>23</sup>.

O peso do fígado de ratos tratados com altas doses (1500 mg/kg/dia) de solução purificada de esteviosídeo teve redução significativa no estudo de Awney et al<sup>28</sup>. Shivana et al<sup>13</sup> não encontrou diferenças significativas no peso renal de ratos tratados ou com folhas de estévia em pó (4%) ou polifenóis ou fibra extraída estévia.

A observação mais marcante da alteração do perfil lipídico do plasma foi a redução significativa da fração HDL-c nos grupos que receberam estévia comparados ao Grupo Sacarose. Diferente dos resultados do estudo com ratos machos<sup>29</sup>, que houve aumento significativo nos concentrações de HDL-c nos grupos tratados com estévia em comparação ao grupo tratado com açúcar. Esses resultados sugerem que o uso de adoçantes durante a gestação pode alterar o perfil lipídico.

Corroborando os resultados deste experimento, outros estudos encontraram concentrações mais altas de triglicerídeos no sangue sem diferenças significativas dos grupos tratados com esteviosídeo<sup>29,30,31</sup>, indicando que o esteviosídeo não afeta a absorção intestinal de nutrientes. Vale ressaltar que a hipertrigliceridemia materna é uma alteração fisiológica normal da última fase da gestação, a partir da qual a rata se prepara para a lactação<sup>23</sup>.

Contudo, o crescimento fetal foi alterado, com diferenças significativas de peso e comprimento fetal. Os fetos do GE8 foram maiores e mais pesados do que os fetos do GC, o que permite inferir que houve passagem efetiva do adoçante pela membrana placentária. Deve-se ressaltar que o peso corporal alterado do feto é um indicador de alteração do organismo fetal ou embriotoxicidade<sup>23</sup>.

A diminuição do comprimento do cordão umbilical pode indicar movimento fetal diminuído ou bloqueio da circulação fetal<sup>32</sup>. O fato de não ter sido encontradas reduções significativas no comprimento do cordão umbilical, sugere que o adoçante a base de estévia não causou alterações no movimento fetal e na presença de espaço adequado na cavidade uterina. Em estudos experimentais com outros adoçantes, foi observado redução significativa no comprimento do cordão umbilical no grupo tratado com 14 mg/kg/dia de aspartame ( temperatura ambiente ou 40°C) por gavagem do 9° ao 11° dia de gestação<sup>27</sup>, e no grupo tratado com 30 mg/kg/dia de sucralose do 10° ao 14° de prenhez<sup>25</sup>.

Por fim, a associação não significativa na ocorrência de malformações, bem como no número de fetos natimortos nos diferentes grupos sugere que a intervenção com adoçante à base de estévia não deve ser considerada entre os fatores de risco para a ocorrência de óbitos e malformações fetais. Em um experimento com aspartame (25 e 50 mg/kg/dia) em ratas grávidas, houve diferença estatisticamente significativa na ocorrência de malformações fetais entre o grupo controle e os grupos que receberam adoçante. As malformações observadas foram: manchas no crânio, face e dorso; malformação na orelha, olho, calota craniana, região da órbita direita e pele delgada <sup>23</sup>.

## **CONCLUSÃO**

O adoçante à base de estévia administrado às ratas *Wistar* durante a prenhez tanto na dose de 4mg/kg/dia quanto na de 8mg/kg/dia não apresenta efeitos nocivos para a mãe e nem apresentou efeitos prejudiciais para o feto. Contudo, os resultados sugerem que altas doses de adoçantes à base de estévia podem não ser seguros durante a gestação.

Os dados clínicos deste estudo, apesar de contribuírem cientificamente, não são suficientes para tirar conclusões sobre os benefícios ou fatores de risco de adoçantes à base de estévia durante a gestação e reflexo nos fetos. Portanto, estudos controlados são necessários para determinar os efeitos do adoçante em grupo populacionais específicos.

## REFERÊNCIAS

1. Brandle JE, Starratt AN, Gijzen M. *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties. *Can J Plant Sci* 1998;78:527-536. doi: 10.4141/P97-114
2. Geuns JM. Stevioside. *Phytochem* 2003;64:913-921. doi: 10.1016/S0031-9422(03)00426-6
3. Geuns JM. Safety evaluation of *Stevia* and stevioside. *Stud Nat Prod Chem* 2002;27:299-319. doi:10.1016/S1572-5995(02)80039-4
4. European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on the safety of steviol glycosides for the proposed uses as a food additive. *EFSA Journal* 2010;8(4):1537.
5. Global Stevia Institute [<http://www.globalstevia institute.com>]. Estévia de alta pureza. Novas tendências sobre a estévia. Boletim de Fevereiro de 2012. Datamonitor, fevereiro de 2012 [acesso em 10 jun 2012]. Disponível em: <http://globalstevia institute.com/pt/Default/ResourceLibrary/Newsletters/NewsletterFebruary2012.aspx>.
6. Chatsudthipong V, Muanprasat C. Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacol Ther*, 2009;121:41-54. doi:10.1016/j.pharmthera.2008.09.007
7. Mazzei-Planas G, Kuc J. Contraceptive properties of *Stevia rebaudiana*. *Sci* 1968;162:1007.
8. Oliveira-Filho RM, Uehara OA, Minetti CASA, Valle LB. Chronic administration of aqueous extract of *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni in rats: endocrine effects. *Gen Pharmacol* 1989;20:187-191. doi: 10.1016/0306-3623(89)90013-X
9. Melis MS. Effects of chronic administration of *Stevia rebaudiana* on fertility in rats. *J Ethnopharmacol* 1999;167:157-161. doi: 10.1016/S0378-8741(99)00081-1

10. Melis MS. Chronic administration of aqueous extract of *Stevia rebaudiana* in rats: renal effects. *J Ethnopharmacol* 1994;47:129–134. doi: 10.1016/0378-8741(95)01271-E
11. Nunes AP, Ferreira-Machado SC, Nunes RM, Dantas FJ, De Mattos JC, Caldeira-de-Araújo A. Analysis of genotoxic potentiality of stevioside by comet assay. *Food Chem Toxicol* 2007;45:662–666. doi:10.1016/j.fct.2006.10.015
12. Jeppesen PB, Gregersen S, Alstrup KK, Hermansen K. Stevioside induces antihyperglycaemic, insulinotropic and glucagonostatic effects in vivo: studies in the diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *Phytomedicine* 2002;9:9–14. doi:10.1078/0944-7113-00081
13. Shivanna N, Naika M, Khanum F, Kaul V. Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. *J Diabetes Complications* 2013;27:103–113. doi:10.1016/j.jdiacomp.2012.10.001
14. Curry LL, Roberts A, Brown N. Rebaudioside A: two-generation reproductive toxicity study in rats. *Food Chem Toxicol* 2008;46:21–30. doi:10.1016/j.fct.2008.05.005
15. Gil JC, Ligan P, Flores C, Chimoy PJ. Long-term effects of the consumption of *Stevia rebaudiana* (Magnoliopsida, Asteraceae) on fertility mice's. *Rev Peru Biol* 2008;15:85-90.
16. Erb C. Embryology and teratology. In: Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL. *The laboratory rat*. 2 ed. Academic; 2005. p. 817-843.
17. Khera KS. Maternal toxicity: a possible etiological factor in embryo-fetal deaths and fetal malformations of rodent-rabbit species. *Teratol* 1985;3:129-153.
18. Castro VL. Estudo experimental em ratos da interação mãe-filhote expostos a agroquímicos. Jaguariúna: EMBRAPA, 2006.

19. Chahoud I, Ligensa A, Dietzel L, Faqi AS. Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. *Reprod Toxicol* 1999;13:375–381. doi: 10.1016/S0890-6238(99)00035-0
20. Carakostas MC, Curry LL, Boileau AC, Brusick DJ. Overview: The history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. *Food Chem Toxicol* 2008;46:1–10. doi:10.1016/j.fct.2008.05.003
21. Rosado EL, Monteiro JBR. Obesidade e a substituição de macronutrientes da dieta. *Rev Nutr* 2001;14:145-152. doi: 10.1590/S1415-52732001000200008
22. Mitsutomi K et al. Effects of a nonnutritive sweetener on body adiposity and energy metabolism in mice with diet-induced obesity. *Metabol.* In press 2013. Doi: 10.1016/j.metabol.2013.09.002
23. Souza MLGV, Costa AMDD, Terra FS, Souza FV. Avaliação do efeito do aspartame em ratas tratadas durante a prenhez e o reflexo do tratamento em seus fetos. *Rev Bras Clin Med* 2010;8:328-32.
24. Marrer E, Dieterle F. Impact of biomarker development on drug safety assessment. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010;243:167–179. doi: 10.1016/j.taap.2009.12.015
25. Rodero AB, Batigália F, Azoubel R, Moura AA, Rodero LS, Silveira JR L. Effects of sucralose ingestion on fetal and placental weights and umbilical-cord length: experimental study. *Int J Morphol* 2010;28:823-827. doi: 10.4067/S0717-95022010000300025
26. De Matos MA, Martins AT, Azoubel R. Effects of sodium cyclamate on the rat placenta: A morphometric study. *Int J Morphol* 2006;24:137-142. doi: 10.4067/S0717-95022006000300001
27. Portela GS, Azoubel R, Batigália F. Effects of aspartame on maternal-fetal and placental weights, length of umbilical cord and

fetal liver: A Kariometric experimental study. *Int J Morphol* 2007;25:549-554. doi: 10.4067/S0717-95022007000300012

28. Awney HA, Massoudb MI, El-Maghrabib S. Long-term feeding effects of stevioside sweetener on some toxicological parameters of growing male rats. *J Appl Toxicol* 2011;31:431-438. doi: 10.1002/jat.1604

29. Reis TA, Goulart PFP, Oliveira RME, Oliveira L, Abreu OS, Azevedo AO. Parâmetros metabólicos de ratos Wistar submetidos à dieta suplementada com estévia e açúcar. *Semina: Ciências Agrárias* 2011;32:1477-1488. doi: 10.5433/1679-0359.2011v32n4p1477

30. Gregersen S, Jeppesen PB, Holst JJ, Hermansen K. Antihyperglycemic Effects of Stevioside in Type 2 Diabetic Subjects. *Metabol* 2004;53:73-76. doi: 10.1016/j.metabol.2003.07.013

31. Figlewicz DP, Ioannou G, Bennett Jay J, Kittleson S, Savard C, Roth C.L. Effect of moderate intake of sweeteners on metabolic health in the rat. *Physiol Behav* 2009;98:618-624. doi:10.1016/j.physbeh.2009.09.016

32. Miller ME et al. Short Umbilical Cord: Its Origin and Relevance. *Pediatrics* 1981;67:618-621.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O adoçante à base de estévia administrado às ratas *Wistar* durante a prenhez tanto na dose de 4mg/kg/dia quanto na de 8mg/kg/dia, não apresenta efeitos nocivos para a mãe e nem parece ser prejudicial para o feto. Contudo, os resultados sugerem que altas doses de adoçantes à base de estévia podem não ser seguros durante a gestação.

Os dados clínicos deste estudo, apesar de contribuírem cientificamente, não são suficientes para tirar conclusões sobre os benefícios ou fatores de risco de adoçantes à base de estévia durante a gestação e reflexo nos fetos. Portanto, estudos controlados em humanos são necessários para determinar os efeitos do adoçante em grupo populacionais específicos.

## REFERÊNCIAS

- ADA – AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION. Position of the American Dietetic Association: use of nutritive or nonnutritive sweeteners. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 104, p. 255–275, 2004.
- ADA – AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION. Position of the American Dietetic Association and American Society for Nutrition: Obesity, Reproduction, and Pregnancy Outcomes. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 109, p. 918–927, 2009.
- ALLEVA, R.; BORGHI, B.; SANTARELLI, L.; STRAFELLA, E.; CARBONARI, D.; BRACCI, M.; TOMASETTI, M. In vitro effect of aspartame in angiogenesis induction. **Toxicology in Vitro**, v. 25, p. 286–293, 2011.
- ANTON, S.D.; MARTIN, C.K.; HAN, H.; COULON, S.; CEFALU, W.T.; GEISELMAN, P.; WILLIAMSON, D.A. Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. **Appetite**, v. 55, p. 37–43, 2010.
- ARAÚJO, M.C.; BEZERRA, I.N.; BARBOSA, F.S.; JUNGER, W.L.; YOKOO, E.M.; PEREIRA, R.A.; SICHIERI, R. Consumo de macronutrientes e ingestão inadequada de micronutrientes em adultos. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, p. 177-189, 2013.
- ARRUDA, J.G.F.; MARTINS, A.T.; AZOUBEL, R. Ciclamato de sódio e rim fetal. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v.3, p. 147-150, 2003.
- AWNEY, H.A.; MASSOUD, M.I.; EL-MAGHRABI, S. Long-term feeding effects of stevioside sweetener on some toxicological parameters of growing male rats. **Journal of Applied Toxicology**, v. 31, p. 431–438, 2011.
- BALBANI, A.P.S.; STELZER, L.B.; MONTOVANI, J.C. Excipientes de medicamentos e as informações da bula. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 72, p. 400-406, 2006.

BELZER, L.M.; SMULIAN, J.C.; LU, S.; TEPPER, B.J. Food cravings and intake of sweet foods in healthy pregnancy and mild gestational diabetes mellitus. **Appetite**, v. 55, p. 609–615, 2010.

BHARGAVA, A.; AMIALCHUK, A. Added sugars displaced the use of vital nutrients in the National Food Stamp Program Survey. **The Journal of Nutrition**, v. 137, p. 453-60, 2006

BRANDLE, J.E.; STARRATT, A.N.; GIJZEN, M. Stevia rebaudiana: Its agricultural, biological, and chemical properties. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 78, p.527-536, 1998.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto-lei n. 55.871, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto n. 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto n. 691, de 13 de março de 1962. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, 09 abr. 1965.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n. 29 de 13 de janeiro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico referente a alimentos para fins especiais. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, 15 jan. 1998.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 18, de 24 de março de 2008. Aprova o Regulamento Técnico que autoriza o uso de aditivos edulcorantes em alimentos, com seus respectivos limites máximos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, 25 mar. 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 271, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para açúcares e produtos para adoçar. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, 23 set. 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n. 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, 28 out. 1997.

BRASIL. Assembleia Legislativa do Estado de São Paulo. Decreto-lei n. 15.642, de 09 de fevereiro de 1946. Aprova o Regulamento do Policiamento da Alimentação Pública. **Diário Oficial**, Poder Executivo, São Paulo, 24 fev. 1946.

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde. Resolução n. 04, de 24 de novembro de 1988. Aprovação referente aos aditivos intencionais, bem como os Anexos I, II, III e VII. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, 19 dez. 1988.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 5 ed. Fundação Oswaldo Cruz, Brasília: ANVISA, 2010

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. **Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRUSICK, D. J. A critical review of the genetic toxicity of steviol and steviol glycosides. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 83–91, 2008.

BRUSICK, D.J. A critical review of the genetic toxicity of steviol and steviol glycosides. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 83–91, 2008.

CARAKOSTAS, M.C.; CURRY, L.L.; BOILEAU, A.C.; BRUSICK, D.J. Overview: The history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 1–10, 2008.

CASTRO, A.G.P.; FRANCO, L.J. Caracterização do Consumo de Adoçantes Alternativos e Produtos Dietéticos por Indivíduos Diabéticos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia Metabologia**, v. 46, p. 280–287, 2002.

CHATSTUDTHIPONG, V.; MUANPRASAT, C. Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 121, p. 41–54, 2009.

CHRISTANTE, L. Os adoçantes na balança. **Revista Unesp Ciência**, 2009. Disponível em: <<http://www.unesp.br/revista/01>>. Acesso em: 13 jun. 2012.

CURRY, L.L.; ROBERTS, A.; BROWN, N. Rebaudioside A: two-generation reproductive toxicity study in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 21–30, 2008.  
do Sistema Único de Saúde. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 15, p. 47–65, 2006.

EFSA – EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Revised exposure assessment for steviol glycosides for the proposed uses as a food additive. **EFSA Journal**, v. 9, 1972p, 2011.

EFSA – EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific Opinion on the safety of steviol glycosides for the proposed uses as a food additive. **EFSA Journal**, v. 8, 1537p, 2010.

ERB, C. Embryology and teratology. In: \_\_\_\_\_. SUCKOW, M.A.; WEISBROTH, S.H.; FRANKLIN, C.L. **The laboratory rat**. 2 ed. Academic, 2005, cap. 28, p. 817-843.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Notice to the U.S. Food and Drug Administration (FDA) that the use of Rebiana (Rebaudioside A) derived from *Stevia rebaudiana*, as a Food Ingredient is Generally Recognized as Safe (GRAS). 2012. Disponível em: <<http://www.fda.gov/AboutFDA/Transparency/Basics/ucm214865.htm>> Acesso em: 10 ago 2013.

FITCH, C.; KEIM, K. S. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Use of Nutritive and Nonnutritive Sweeteners. **Journal of Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 112, p. 739-758, 2012.

GEUNS, J.M. Safety evaluation of *Stevia* and stevioside. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 27, p. 299–319, 2002.

GEUNS, J.M. Stevioside. **Phytochemistry**, v. 64, p.913–921, 2003.

GIL, J.C.; LINGAN, P.; FLORES, C.; CHIMOY, P.J. Long-term effects of the consumption of *Stevia rebaudiana* (Magnoliopsida, Asteraceae) on fertility mice's. **Revista Peruana de Biología**. v.15, p. 85-90, 2008.

GOTO, A.; CLEMENTE, E. Influência do rebaudiosídeo A na solubilidade e no sabor do esteviosídeo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, p. 3-6, 1998.

GSI – GLOBAL STEVIA INSTITUTE. A dose diária aceitável para a estévia. Tendências *Stevia*. Boletim de Agosto de 2011. Datamonitor, janeiro – julho de 2011. Disponível em: <<http://globalstevia institute.com/pt/Default/ResourceLibrary/Newsletters/NewsletterAugust2011.aspx>>. Acesso em: 10 jun 2012.

GSI – GLOBAL STEVIA INSTITUTE. Estévia de alta pureza. Novas tendências sobre a estévia. Boletim de Fevereiro de 2012. Datamonitor, fevereiro de 2012. Disponível em: <<http://globalstevia institute.com/pt/Default/ResourceLibrary/Newsletters/NewsletterFebruary2012.aspx>>. Acesso em: 10 jun 2012.

HEYDEN, T. Adoçante estévia ganha popularidade e vendas avançam. **BBC News**, Brasília, atualizado em 4 de junho, 2013. Disponível em: [http://www.bbc.co.uk/portuguese/noticias/2013/06/130604\\_adocante\\_stevia\\_jp.shtml](http://www.bbc.co.uk/portuguese/noticias/2013/06/130604_adocante_stevia_jp.shtml). Acesso em: 30 out. 2013.

IDEC – INSTITUTO BRASILEIRO DE DEFESA DO CONSUMIDOR. Pesquisa do Idec constata: adoçantes e bebidas light desrespeitam o Código de Defesa do Consumidor. 2006. Disponível em: <<http://www.idec.org.br/em-acao/em-foco/pesquisa-do-idec-constata-adocantes-e-bebidas-light-desrespeitam-o-codigo-de-defesa-do-consumidor>>. Acesso em: 10 jun. 2012.

JEPPESEN, P.B.; GREGERSEN, S.; ALSTRUP, K.K.; HERMANSEN, K. Stevioside induces antihyperglycaemic, insulinotropic and glucagonostatic effects in vivo: studies in the diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. **Phytomedicine**, v. 9, p. 9–14, 2002.

KAMENICKOVA, A.; PECOVA, M.; BACHLEDA, P.; DVORAK, Z. Effects of artificial sweeteners on the AhR- and GR-dependent CYP1A1 expression in primary human hepatocytes and human cancer cells. **Toxicology in Vitro**, v. 27, p. 2283–2288, 2013.

KREBS-SMITH, S.M. Choose beverages and foods to moderate your intake of sugars: Measurement requires quantification. **The Journal of Nutrition**, v. 131, p. 527-535, 2001.

- LEMUS-MONDACA, R.; VEGA-GÁLVEZ, A.; ZURA-BRAVO, L.; AH-HEN, K. Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1121–1132, 2012.
- LIMA FILHO, O.F.; VALOIS, A.C.C.; LUCAS, Z.M. **Estévia**. Sistema de Produção 5. 1 ed., Embrapa Agropecuária Oeste, 55p., 2004.
- MALTA, D.C.; CEZARIO, A.C.; MOURA, L.; NETO, O.L.M.; SILVA JÚNIOR, J.B. A construção da vigilância e prevenção das doenças crônicas não transmissíveis no contexto do Sistema único de Saúde. **Epidemiologia Serviços Saúde**, v. 15, p. 47-65, 2006.
- MAZZEI-PLANAS, G.; KUC, J. Contraceptive properties of Stevia rebaudiana. **Science**, v.162, 1007p, 1968.
- MELIS, M.S. Chronic administration of aqueous extract of *Stevia rebaudiana* in rats: renal effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 47, p.129–134, 1994.
- MELIS, M.S. Effects of chronic administration of *Stevia rebaudiana* on fertility in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 167, p.157–161, 1999.
- MELIS, M.S.; ROCHA, S.T.; AUGUSTO, A. Steviol effect, a glycoside of Stevia rebaudiana, on glucose clearances in rats. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, p. 371-374, 2009.
- MORTENSEN, A. Sweeteners permitted in the European Union: safety aspects. **Scandinavian Journal of Food and Nutrition**, v. 50, p.104–116, 2006.
- NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 41, p. 1212-142, 2005.
- NOWICKA, P.; BRYNGELSSON, S. Sugars or sweeteners: towards guidelines for their use in practice report from an expert consultation. **Scandinavian Journal of Food and Nutrition**, v. 50, p. 89–96, 2006.

NUNES, A.P.; FERREIRA-MACHADO, S.C.; NUNES, R.M.; DANTAS, F.J.; DE MATTOS, J.C.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A. Analysis of genotoxic potentiality of stevioside by comet assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 662–666, 2007.

OLIVEIRA, P.B.; FRANCO, L.J. Consumo de adoçantes e produtos dietéticos por indivíduos com diabetes melito tipo 2, atendidos pelo Sistema Único de Saúde em Ribeirão Preto, SP. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v. 54, p. 455-62, 2010.

OLIVEIRA-FILHO, R.M.; UEHARA, O.A.; MINETTI, C.A.S.A.; VALLE, L.B. Chronic administration of aqueous extract of *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni in rats: endocrine effects. **General Pharmacology**, v. 20, p.187–191, 1989.

PACKER, J.F. **Modificações enzimáticas de glicosídeos de *Stevia Rebaudiana* por *Gibberella fujikuroi***. 2006. 102f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, 2006.

PADILHA, P.C.; SENA, A.B.; NOGUEIRA, J.L.; ARAÚJO, R.P.S.; ALVES, P.D.; ACCIOLY, E.; SAUNDERS, C. Terapia nutricional no diabetes gestacional. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, p. 95-105, 2010.

PARK, J.; CHA, Y. *Stevia rebaudiana* Bertoni extract supplementation improves lipid and carnitine profiles in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p.1099–1105, 2010.

ROSADO, E. L.; MONTEIRO, J. B. R. Obesidade e a substituição de macronutrientes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 14, p. 145-152, 2001.

SHANKAR, P.; AHUJA, S.; SRIRAM, K. Non-nutritive sweeteners: review and update. **Nutrition**. v. 29, p. 1293-1299, 2013.

SHIVANNA, N.; NAIKA, M.; KHANUM, F.; KAUL, V. Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. **Journal of Diabetes and its Complications**. v. 27, p. 103–113, 2013.

SILVA, G.E.C.; ASSEF, A.H.; ALBINO, C.C.; FERRI, L.A.F.; TASIN, G.; TAKAHASHI, M.H.; FILHO, W.E.; BAZOTTE, R.B. Investigation of the tolerability of oral stevioside in brazilian hyperlipidemic patients. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, p. 583–587, 2006.

SOFFRITTI, M.; BELPOGGI, F.; TIBALDI, E.; ESPOSTI, D. D.; LAURIOLA, M. Life-Span Exposure to Low Doses of Aspartame Beginning during Prenatal Life Increases Cancer Effects in Rats. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, p. 1293–1297, 2007.

STEFANI, G.P.; HIGA, M.; PASTORINO, A.C.; CASTRO, A.P.B.M.; FOMIN, A.B.F.; JACOB, C.M.A. Presença de corantes e lactose em medicamentos: avaliação de 181 produtos. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**. v. 32, p. 18-26, 2009.

TORLONI, M.R.; NAKAMURA, M.U.; MEGALE, A.; SANCHEZ, V.H.S.; MANO, C.; FUSARO, A.S.; MATTAR, R. O uso de adoçantes na gravidez: uma análise dos produtos disponíveis no Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, p. 267–75, 2007.

VEIGA, G.V; COSTA, R.S.; ARAÚJO, M.C.; SOUZA, A.M.; BEZERRA, I.N.; BARBOSA, F.S.; SICHIERI, R.; PEREIRA, R.A. Inadequação do consumo de nutrientes entre adolescentes brasileiros. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, p. 212-221, 2013.

WEIHRAUCH, M. R.; DIEHL, V. Artificial sweeteners—do they bear a carcinogenic risk? **Annals of Oncology**, v. 15, p. 1460–1465, 2004.

ZANINI, R.V.; ARAÚJO, C.L.; MARTÍNEZ-MESA, J. Utilização de adoçantes dietéticos entre adultos em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil: um estudo de base populacional. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 27, p. 924–934, 2011.