

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

MAIELI MAIARA NIED

**EFEITO DE UMA INFUSÃO DE *STEVIA REBAUDIANA* BERTONI NA
DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE E NA FORMAÇÃO DO BIOFILME
DENTÁRIO – UM ESTUDO *IN SITU***

Porto Alegre

2019

MAIELI MAIARA NIED

**EFEITO DE UMA INFUSÃO DE *STEVIA REBAUDIANA* BERTONI NA
DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE E NA FORMAÇÃO DO BIOFILME
DENTÁRIO – UM ESTUDO *IN SITU***

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

Orientadora: Sandra Liana Henz

Co-orientador: Rodrigo Alex Arthur

Porto Alegre

2019

MAIELI MAIARA NIED

**EFEITO DE UMA INFUSÃO DE *STEVIA REBAUDIANA* BERTONI NA
DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE E NA FORMAÇÃO DO BIOFILME
DENTÁRIO – UM ESTUDO *IN SITU***

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

Orientadora: Sandra Liana Henz

Co-orientador: Rodrigo Alex Arthur

Porto Alegre, 07 de junho de 2019

Clarissa Cavalcanti Fatturi Parolo
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Lina Naomi Hashizume
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Sandra Liana Henz
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais Marcia e Vilmar por todo amor, confiança, apoio, suporte e compreensão durante toda minha jornada acadêmica. Agradeço pelas pessoas que vocês são, por me ensinarem tanto sobre a vida e me transmitirem valores tão importantes. Muito obrigada por cada “Vai dar tudo certo, fica tranquila”. Ao meu namorado Murilo que esteve presente ao meu lado, mesmo que à distância, me confortando e dando força para seguir firme. Agradeço por cada minuto do seu tempo, em que você deixou de fazer algo, para me ajudar com meus trabalhos, estudos e pesquisas.

Muito obrigada também, às minhas amigas Bruna, Camila, Kymberlly e Tatiana que foram minha segunda família durante os 5 anos de graduação, tornando essa trajetória mais leve e me dando a certeza de que encontrei aqui amigas-irmãs para a vida.

Agradeço aos voluntários da pesquisa por terem aceitado o convite e se disponibilizado durante o período do estudo. À acadêmica Ewelyn que me ajudou a preparar e conduzir a pesquisa e também à técnica de laboratório Luísa que esteve presente, auxiliando em todos os momentos da pesquisa. Ao professor Roger Keller Celeste que nos auxiliou na realização da análise estatística e na interpretação da mesma.

Agradeço à minha professora orientadora, Sandra Liana Henz, e ao professor Rodrigo Alex Arthur que sempre estiveram dispostos a me ensinar e a construir junto comigo esse estudo, sempre tiveram paciência com as minhas dificuldades e, muito além de conhecimentos científicos, são exemplos de pessoas, de profissionais e de dedicação para mim.

Agradeço de coração a todos que estiveram comigo durante essa caminhada, uma vez que sem vocês nada disso seria possível. Cada palavra dita, cada gesto e cada olhar, foi muito importante. Muito Obrigada!

“Nós nunca descobriremos o que vem depois da escolha se não tomarmos uma decisão. Por isso, entenda os seus medos, mas jamais deixe que eles sufoquem seus sonhos.”

Anne Alves

RESUMO

A redução do consumo de açúcar e sua substituição por adoçantes não calóricos é considerada uma abordagem útil para a prevenção da cárie, pois é de extrema importância o uso de substâncias que possam modificar a cariogenicidade desse biofilme. Estudos mostram que a planta da espécie *Stevia rebaudiana* pode modificar a cariogenicidade do biofilme, mas o mecanismo não é bem compreendido. O objetivo deste estudo *in situ* foi avaliar o efeito de uma infusão de *Stevia Rebaudiana* Bertoni na desmineralização do esmalte e na formação do biofilme dental. Em um estudo cruzado, onze voluntários adultos utilizaram um dispositivo intrabucal palatino contendo 4 blocos de esmalte dental bovino, em 3 fases de 7 dias cada. Sobre esses blocos de esmalte foram gotejadas em horários pré-estabelecidos 2 soluções: sacarose 20% na frequência de 8X/dia e outra solução, de tratamento na frequência de 2X/dia, podendo ser uma solução *Stevia* 5%, Clorexidina 0,12% (CHX) ou Cloreto de Sódio 0,9% (NaCl). Entre cada fase experimental foi adotada 1 semana de *wash-out*. Ao final de cada fase experimental, o biofilme formado sobre os blocos dentais foi coletado e analisado em relação a sua composição microbiológica [contagem de *Streptococcus mutans* (SM), *Lactobacillus* spp. (LB), *Candida albicans* (CA) e microorganismos totais (MT) (UFC/mg)], sua composição bioquímica em termos de quantificação de Polissacarídeos Extracelulares solúvel (PECS) e insolúvel (PECI)($\mu\text{g}/\text{mg}$) e avaliado qualitativamente por Microscopia Eletrônica de Varredura. O percentual de perda de dureza superficial (%PDS) dos blocos de esmalte também foi avaliado. Todos os desfechos foram analisados através de ANOVA a um nível de 5% de significância. Não foram encontradas diferenças entre *Stevia*, CHX e NaCl para PECS ($13,7^a \pm 14,9$; $15,1^a \pm 15$; $13,2^a \pm 10,8$; respectivamente), PECI ($28,6^a \pm 27,3$; $22^a \pm 21,1$; $24,8^a \pm 17,4$; respectivamente), SM ($2,8 \times 10^{4a} \pm 7 \times 10^4$; $4,1 \times 10^{3a} \pm 1,2 \times 10^4$; $7,2 \times 10^{3a} \pm 1,8 \times 10^4$; respectivamente), LB ($8 \times 10^{5a} \pm 1,2 \times 10^6$; $3,3 \times 10^{5a} \pm 7,3 \times 10^5$; $8,6 \times 10^{5a} \pm 1,7 \times 10^6$; respectivamente), CA ($8,9 \times 10^{5a} \pm 2 \times 10^6$; $1,9 \times 10^{4a} \pm 4,3 \times 10^4$; $1,9 \times 10^{5a} \pm 2,6 \times 10^5$; respectivamente) e TM ($8,1 \times 10^{7a} \pm 1,5 \times 10^8$; $3,9 \times 10^{7a} \pm 6,6 \times 10^7$; $1,2 \times 10^{7a} \pm 1,7 \times 10^7$; respectivamente). O %PDS encontrado na presença de CHX foi estatisticamente menor que o NaCl. O %PDS na presença de *Stevia* foi considerado intermediário entre ambos ($-7,4^a \pm 12$; $-33,4^b \pm 29,5$; $-22,1^{ab} \pm 28,8$; respectivamente). As evidências observadas no presente estudo, sugerem que a utilização de *Stevia* em situação de alto desafio cariogênico tem pouco efeito na modificação da cariogenicidade do biofilme e na progressão da lesão cariosa.

Palavras-chave: *Stevia*. Biofilme Dentário. Polissacarídeos. Desmineralização. Esmalte.

ABSTRACT

The reduction of sugar consumption and its substitution by non-caloric sweeteners is considered a useful approach for the prevention of caries, since it is extremely important to use substances that can modify the cariogenicity of this biofilm. Studies have shown that *Stevia rebaudiana* can modify the cariogenicity of the biofilm, but the mechanism is not well understood. The objective of this *in situ* study was to evaluate the effect of *Stevia rebaudiana* Bertoni infusion on enamel demineralization and on dental biofilm formation. In a cross-over desing, eleven adult volunteers used a palatal intraoral device containing 4 slabs of bovine enamel, in 3 phases of 7 days each. On these enamel slabs were dripped, at pre-set times, 2 solutions: sucrose 20% at the frequency of 8X/day and another solution, at a frequency of 2X/day, which was *Stevia* infusion 5%, 0,12% Chlorhexidine (CHX) or 0,9% Sodium Chloride (NaCl). Between each experimental phase was adopted 1 week of wash-out. At the end of each experimental phase, the biofilm formed on the slabs was collected and analyzed for microbiological composition [counts of *Streptococcus mutans* (SM), *Lactobacillus* spp. (LB), *Candida albicans* (CA) and total microorganisms (TM) (CFU/mg)], biochemical composition in terms of quantification of extracellular soluble (SEPS) and insoluble polysaccharides (IEPS)($\mu\text{g}/\text{mg}$) and qualitatively assessed by Scanning Electron Microscopy. Percentage of surface hardness loss (%SHL) was evaluated on enamel slabs. All the outcomes were analyzed by ANOVA at a level of 5% of significance. No differences were found among *Stevia*, CHX and NaCl for SEPS ($13,7^a \pm 14,9$; $15,1^a \pm 15$; $13,2^a \pm 10,8$; respectively), IEPS ($28,6^a \pm 27,3$; $22^a \pm 21,1$; $24,8^a \pm 17,4$; respectively), SM ($2,8 \times 10^4^a \pm 7 \times 10^4$; $4,1 \times 10^3^a \pm 1,2 \times 10^4$; $7,2 \times 10^3^a \pm 1,8 \times 10^4$; respectively), LB ($8 \times 10^5^a \pm 1,2 \times 10^6$; $3,3 \times 10^5^a \pm 7,3 \times 10^5$; $8,6 \times 10^5^a \pm 1,7 \times 10^6$; respectively), CA ($8,9 \times 10^5^a \pm 2 \times 10^6$; $1,9 \times 10^4^a \pm 4,3 \times 10^4$; $1,9 \times 10^5^a \pm 2,6 \times 10^5$; respectively) and TM ($8,1 \times 10^7^a \pm 1,5 \times 10^8$; $3,9 \times 10^7^a \pm 6,6 \times 10^7$; $1,2 \times 10^7^a \pm 1,7 \times 10^7$; respectively). The %SHL found in the presence of CHX was statistically lower than NaCl. The %SHL in the presence of *Stevia* was considered intermediate between them ($-7,4^a \pm 12$; $-33,4^b \pm 29,5$; $-22,1^{ab} \pm 28,8$; respectively). The evidences observed in the present study suggest that the use of *Stevia* in situations of high cariogenic challenge has little effect on the modification of biofilm cariogenicity and on the progression of the carious lesion.

Keywords: *Stevia*. Dental Plaque. Polysaccharides. Demineralization. Enamel.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	8
2	OBJETIVOS.....	16
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3	ARTIGO CIENTÍFICO.....	17
4	CONCLUSÃO.....	37
5	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	38
	REFERÊNCIAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

A ingestão de grandes quantidades de açúcar está relacionada a problemas de saúde, nutricionais e médicos e, nesse sentido, a dieta assume papel fundamental no funcionamento do organismo, sendo seu controle extremamente importante para a prevenção de doenças como a cárie dentária, diabetes, obesidade e doenças cardiovasculares (GROSS *et al.*, 2004; PURI; SHARMA; TIWARI, 2011; SAKAMOTO *et al.*, 2005; WELSH; DIETZ, 2005). A mudança nos hábitos alimentares é necessária, porém difícil, principalmente quando está associada ao consumo de sacarose. Sendo assim, a busca por substitutos naturais do açúcar é de extrema importância como uma forma de contribuir para a prevenção do desenvolvimento de doenças (SLAVUTZKY, 2010).

A *Stevia rebaudiana* Bertoni é um adoçante natural não calórico com potencial adoçante maior do que a sacarose, sem efeitos adversos e que tem demonstrado possuir muitos benefícios para a saúde sistêmica e, mais recentemente, para a saúde oral (CONTRERAS, 2013). É considerada uma fonte de carboidratos, proteínas, fibras, minerais, vitaminas e aminoácidos (GUPTA *et al.*, 2013; LEMUS-MONDACA *et al.*, 2012; RUIZ-RUIZ; MOGUEL-ORDOÑEZ; SEGURA-CAMPOS, 2017). Os compostos adoçantes são encontrados principalmente nas folhas da planta e são chamados de glicosídeos, como o esteviosídeo, o mais abundante, seguido pelo rebaudiosídeo A (LEMUS-MONDACA *et al.*, 2012). A literatura tem mostrado que a *Stevia rebaudiana* Bertoni, apresenta também atividade anticariogênica, antidiabética, antioxidante, hipotensiva, anti-hipertensiva, antimicrobiana, anti-inflamatória e antitumoral (PÓL; HOHNOVÁ; HYOTYLAINEN, 2007; RUIZ-RUIZ; MOGUEL-ORDOÑEZ; SEGURA-CAMPOS, 2017).

Os adoçantes de baixas calorias têm sido amplamente estudados e, atualmente, os adoçantes sintéticos são os mais disponíveis no mercado mundial, como o aspartame, a sacarina e a sucralose (GUPTA *et al.*, 2013). Entretanto, substâncias naturais com poucas calorias e grande potencial adoçante como a *Stevia rebaudiana* podem ser uma importante opção de substituição da sacarose e dos adoçantes sintéticos (LEMUS-MONDACA *et al.*, 2012). Essa necessidade existe porque a sacarose, por ser facilmente metabolizada pelas bactérias orais, resulta na produção de ácidos responsáveis por desmineralizar os tecidos dentários, culminando na formação da cárie dentária (MARSH, 2003). Por outro lado, na presença da *Stevia rebaudiana* ocorre uma diminuição da produção de ácidos pelas bactérias e de polissacarídeos insolúveis, determinando um baixo potencial cariogênico, um efeito anti-

placa e uma menor desmineralização do esmalte dentário (DAS *et al.*, 1992; GOODSON *et al.*, 2010; HENZ *et al.*, 2018; SUWANNAWONG *et al.*, 2004; TRIRATANA *et al.*, 2006).

A cárie dentária se caracteriza por ser uma doença biofilme-açúcar dependente, onde a presença de biofilme é o fator necessário e o açúcar é o fator determinante para o desenvolvimento da doença. Ou seja, as bactérias precisam se acumular nas superfícies dentárias e ser frequentemente expostas aos açúcares da dieta para o desenvolvimento da cárie dentária (CURY; TENUTA, 2009; FEJERSKOV; THYLSTRUP, 1994). Alterações na estrutura mineral do esmalte dependem do equilíbrio entre os processos de desmineralização e remineralização ocorridos no fluido do biofilme dentário (CURY; TENUTA, 2008).

A desmineralização da superfície dental é causada pelos ácidos orgânicos produzidos durante a metabolização de açúcar pelas bactérias que compõem o biofilme cariogênico, esses ácidos tornam o fluido do biofilme insaturado em relação às propriedades de solubilidade do esmalte (DAWES, 2003; SILVA *et al.*, 2008). Um pH crítico para a dissolução dos dentes é mantido por um certo tempo, mas retorna aos valores fisiológicos quando a exposição ao açúcar cessa. Portanto, quando o pH é elevado e as condições supersaturadas são novamente atingidas, uma certa quantidade de perda mineral pode ser recuperada pelo esmalte, e este processo é chamado de remineralização (CURY *et al.*, 2000, CURY; TENUTA, 2008). O biofilme dentário é formado por um grupo heterogêneo de bactérias imersas em uma matriz extracelular e sua atividade metabólica causa flutuações no pH que alteram o fluido do biofilme, ocasionando um desequilíbrio na interface dente-biofilme, levando a uma perda ou ganho de minerais da superfície dental (CURY *et al.*, 2000).

O pH ácido é responsável pela instalação de um biofilme dental acidúrico e acidogênico. Se os ataques ácidos forem frequentes ou de longa duração, o processo de desmineralização continuará ocorrendo e o resultado será uma lesão de cárie (JOHANSSON; BIRKHED, 1995).

Algumas bactérias presentes no biofilme utilizam os açúcares provenientes da dieta para seu metabolismo energético resultando na produção de Polissacarídeos Extracelulares (PEC) ou Polissacarídeos Intracelulares (PIC). Os PECs são capazes de modificar a matriz extracelular, alterando características do biofilme, aumentando a porosidade da matriz extracelular e o padrão de difusão dos ácidos nessa matriz, além de aumentar a aderência dos microorganismos entre si e à superfície dentária, tornando, dessa forma, o biofilme mais cariogênico (FEJERSKOV; MANJI, 1990; PAES LEME *et al.*, 2006; RÖLA, 1989). Entre os carboidratos da dieta, a sacarose é considerada a mais cariogênica, devido às mudanças provocadas na composição da matriz do biofilme quando metabolizada por essas bactérias

(PAES LEME *et al.*, 2008; RÖLA, 1989), pois somente a partir da sacarose é que ocorre a formação de PEC (FEJERSKOV; MANJI, 1990). Segundo Thylstrup e Fejerskov (2001), as bactérias com maior potencial cariogênico são os estreptococos do grupo mutans (EGM), pois são capazes de se aderir a superfícies que não descamam (a exemplo dos dentes) e de produzir PEC a partir da sacarose.

A *Stevia rebaudiana* Bertoni era utilizada antigamente pelas tribos Guaraní do Paraguai e do Brasil, como adoçante de erva-mate e chás para tratar azia e outras doenças, uma vez que ela é uma planta nativa da América do Sul, especificamente do nordeste do Paraguai e do Brasil, na região das Cataratas do Iguazu. Atualmente, é cultivada em várias regiões do mundo, como América do Norte, Ásia e Europa (CONTRERAS, 2013; LEMUS-MONDACA *et al.*, 2012; SLAVUTZKY, 2010). O Japão foi o primeiro país na Ásia a utilizar o esteviosídeo, glicosídeo da *S. rebaudiana*, como adoçante nas indústrias alimentícia e farmacêutica.

Em 1909 o princípio doce da *Stevia rebaudiana* foi, pela primeira vez, isolado. O gênero *Stevia* inclui 230 espécies, entretanto somente *Stevia rebaudiana* apresenta a essência doce (YADAV *et al.*, 2011). Diversos produtos naturais foram isolados a partir das folhas da *Stevia*, como o esteviol e seus glicosídeos, entre os quais se encontram o esteviosídeo e o rebaudiosídeo. Além disso, também podemos encontrar diversos tipos de nutrientes, a exemplo de proteínas, carboidratos, lipídeos, vitaminas (C, B2, B1) e minerais (GUPTA *et al.*, 2013; LEMUS-MONDACA *et al.*, 2012).

O esteviosídeo tem um potencial adoçante comparável à dos adoçantes artificiais comercializados e consumidos em vários alimentos e bebidas, sendo cerca de 300 vezes maior do que a sacarose. O rebaudiosídeo A é conhecido por ser ainda mais doce (até 450 vezes mais doce que a sacarose) e pode ser refinado para uma pureza de mais de 97%. As folhas, assim como o extrato de esteviosídeo puro, podem ser utilizados na sua forma natural ou preparados, e são termoestáveis à temperatura de até 200°C (LEMUS-MONDACA *et al.*, 2012).

Vários estudos mostram os efeitos anticariogênicos e antimicrobianos da *Stevia rebaudiana*. Em relação ao potencial anticariogênico, o mesmo está associado ao baixo potencial acidogênico e ao efeito antiplaca (GOODSON *et al.*, 2010; LEMUS-MONDACA *et al.*, 2012; SAPUYES *et al.*, 2010; SLAVUTZKY, 2010).

Goodson *et al.*, (2010), em um estudo *in vivo*, avaliaram o potencial cariogênico do rebaudiosídeo, comparando a queda de pH no biofilme de uma solução de rebaudiosídeo A e outra de sacarose. A utilização da solução de rebaudiosídeo A apresentou baixo potencial

acidogênico quando comparado com o grupo de enxágue oral com sacarose, uma vez que houve um aumento estatisticamente significativo no pH da placa no grupo de enxágue oral com *Stevia*.

Giacaman *et al.*, (2013) em seu estudo também demonstrou que a *Stevia rebaudiana*, além da Sacarina e Sucralose, apresenta baixa acidogenicidade, e todos os adoçantes testados, incluindo a *Stevia*, apresentaram menor perda de dureza da superfície do esmalte comparado à sacarose. Siraj *et al.*, (2018) conduziu um estudo para avaliar a eficácia clínica de solução aquosa de extrato de *Stevia* a 0,2% e de produto de *Stevia* comercialmente disponível sobre o pH da placa, em comparação com a solução de sacarose. Os resultados mostraram que houve uma redução no pH médio da placa após o enxágue com 10% de solução de sacarose, enquanto o pH da placa permaneceu quase o mesmo após o enxágue com o extrato de folhas de *Stevia* e as soluções do produto *Stevia*.

Dois experimentos *in vitro* com objetivos de verificar a inibição do *Streptococcus sobrinus* por soluções de *Stevia*, mostraram uma diminuição da produção de polissacarídeos extracelulares, da adesão bacteriana e da hidrofobicidade da superfície (SUWANNAWONG *et al.*, 2004; TRIRATANA *et al.*, 2006). Os efeitos dos extratos de plantas naturais sobre bactérias têm sido estudados por muitos pesquisadores em todo o mundo. Khan *et al.*, (2012), utilizou solventes como água, hexano, metanol, etanol, acetona, acetato de etila e clorofórmio para extrair metabólitos secundários das folhas, caules e raízes da *Stevia rebaudiana*. Após analisou sua atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando tetraciclina como controle. Os extratos obtidos a partir das folhas apresentaram maior atividade antimicrobiana do que os extratos de caules e raízes. Os resultados demonstram que a atividade antimicrobiana está relacionada com o teor de metabólitos secundários presentes nas diferentes partes da planta, que é variável.

Outro estudo avaliou a atividade antimicrobiana de extratos de folhas de *Stevia rebaudiana* em solução aquosa, etanol e metanol. Os extratos apresentaram atividade antimicrobiana em relação ao controle ampicilina, entretanto, essas atividades foram menores (DAS; DANG; GUPTA, 2009). Os extratos aquosos de *Stevia rebaudiana* apresentaram elevada atividade antimicrobiana contra bactérias e contra fungos como *Candida albicans* (JAYARAMAN; MANOHARAN; ILLANCHEZIAN, 2008). Gamboa e Chaves (2012), avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos de folhas de *Stevia rebaudiana* sobre microrganismos cariogênicos. A avaliação da atividade antimicrobiana de 5 extratos (hexano, metanol, etanol, acetato de etila e clorofórmio) foi feita através do método de difusão em poço, com 16 espécies bacterianas gram-positivas dos gêneros *Streptococcus* e *Lactobacillus*.

Para os extratos de hexano, etanol e metanol as zonas de inibição foram similares, entretanto, a concentração inibitória mínima (MIC) do extrato de hexano foi menor que as demais. As zonas de inibição para as espécies de *Lactobacillus* foram ligeiramente maiores nos extratos de acetato de etila e de clorofórmio, sugerindo que esses são microrganismos mais suscetíveis.

Stevia contém tanino, xantinas (cafeína) e flavonóides que têm atividade antiplaca (MENAKER, 1984). Autores demonstraram que tanino, um componente do guaraná, e *S. rebaudiana* tem efeito anticariogênico quando adicionados à dieta de ratos, bem como ação antibacteriana (OLIVEIRA *et al.*, 1985; PINHEIRO *et al.*, 1987).

Ajagannavar *et al.*, (2014), comparou a eficácia dos extratos alcoólico e aquoso da *S. rebaudiana*, sobre *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus* em relação a Clorexidina. O efeito inibitório do extrato alcoólico da *Stevia* mostrou-se maior contra ambos os grupos bacterianos quando comparado ao extrato aquoso, entretanto, essa inibição ainda é menor quando comparada à clorexidina. No que diz respeito ao MIC de extrato alcoólico de *Stevia*, a inibição de *S. mutans* e *L. acidophilus* com a concentração mais baixa foi superior quando comparada com a forma aquosa. Isto pode ser devido a uma melhor capacidade de dissolução em álcool, uma melhor biodisponibilidade e polaridade dos compostos antibacterianos (AJAGANNANAVAR *et al.*, 2014).

Um estudo realizado para verificar a atividade antibacteriana de clorofórmio e metanol, extraídos das folhas de *Stevia rebaudiana* contra *S. mutans*, mostrou que os extratos de clorofórmio e metanol exibiram atividades antibacteriana e antifúngica, dependendo da concentração utilizada. Acetona e etanol, também extraídos das folhas de *S. rebaudiana*, apresentaram efeito inibidor melhor contra *S. mutans* (DEBNATH, 2008).

Recentemente outro estudo *in vitro* também avaliou a atividade antimicrobiana *in vitro* de solução de *Stevia rebaudiana* Bertoni e de solução de adoçantes não calóricos eritritol, Stevita® e Fit Sucralose® sobre *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*. Os resultados encontrados mostram que a solução da planta *Stevia rebaudiana* Bertoni apresenta inibição sobre o crescimento bacteriano dos micro-organismos *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*. Em relação ao *S. mutans*, não foi encontrada diferença estatística no tamanho do halo de inibição entre as concentrações 1%, 5% e 10% para clorexidina, eritritol e *Stevia*. Já em relação ao *L. casei*, halos de inibição estatisticamente maiores foram encontrados na presença de clorexidina em relação à *Stevia*, nas concentrações de 1% e 5%, e em relação ao eritritol, em 1%. Não foram observados halos de inibição para os produtos sucralose e Stevita em nenhuma das concentrações analisadas tanto para *S. mutans* quanto para *L. casei* (HENZ *et al.*, 2018).

Com o objetivo de determinar o efeito da *S. rebaudiana* sobre o desenvolvimento de cáries quando incorporado em uma dieta cariogênica em um modelo de cárie controlada, dentes bovinos foram divididos em quatro grupos inoculados com *Streptococcus mutans* e expostos durante 4 dias a ciclos circulantes de caldo de soja trípico suplementado com 5% de sacarose (3x/dia) e uma solução de lavagem mineral. Entre esses ciclos, cada grupo recebeu uma das quatro soluções experimentais: tampão de fosfato (PBS -controle negativo), solução de *Stevia* a 0,5%, solução de *Stevia* 5% ou solução de xilitol a 5%. O desenvolvimento de lesões de cárie foi analisado através da dureza superficial do esmalte. Os resultados obtidos mostraram que o uso de xilitol 5% resultou em uma placa significativamente menor no final do estudo em comparação com PBS e *Stevia* 5%, mas não significativamente diferente de *Stevia* 0,5%. Os dentes submetidos a *Stevia* 5% apresentaram lesões significativamente mais suaves do que os outros grupos, enquanto não houve diferença significativa nos escores de dureza entre xilitol 5%, *Stevia* 0,5% e PBS. Sob as condições altamente cariogênicas deste estudo, embora uma solução de *Stevia* 0,5% e uma solução de xilitol a 5% reduziram significativamente a quantidade de bactérias que aderiram aos dentes, nenhum dos suplementos utilizados neste estudo foi suficientemente forte para diminuir o desenvolvimento de lesões de cárie (KISHTA-DERANI *et al.*, 2016).

Estudos pré-clínicos e clínicos sugerem a utilização terapêutica e farmacológica para a *Stevia rebaudiana* e seus extratos, uma vez que apresentam várias atividades biológicas e não são tóxicos. A *Stevia rebaudiana*, além da atividade anticariogênica, oferece também outros benefícios terapêuticos apresentando propriedades antidiabética, antioxidante, hipotensiva, anti-hipertensiva, antimicrobiana, anti-inflamatório, antitumoral e efeitos imunomoduladores (CHATSTUDTHIPONG; MUANPRASAT, 2009; FERRAZZANO *et al.*, 2015; RUIZ-RUIZ; MOGUEL-ORDOÑEZ; SEGURA-CAMPOS, 2017). No tratamento da diabetes mellitus, obesidade, hipertensão e na prevenção de cárie a *Stevia rebaudiana* e o esteviosídeo podem ser utilizados como substitutos da sacarose (PÓL; HOHNOVÁ; HYOTYLAINEN, 2007).

Estudos toxicológicos mostraram que o esteviosídeo não apresenta efeitos mutagênicos, teratogênicos ou cancerígenos e reações alérgicas não foram observadas quando utilizado como adoçante (PÓL; HOHNOVÁ; HYOTYLAINEN, 2007). Devido a sua composição e ao seu conteúdo de constituintes fitoquímicos promotores da saúde, a *Stevia* é também uma matéria prima adequada para a extração e produção de ingredientes alimentares funcionais, apresentando-se como uma boa fonte de carboidratos, proteínas, fibras brutas, minerais, bem como aminoácidos, que são valiosos para a nutrição humana.

Os resultados obtidos por vários autores indicam que a solubilidade, concentração e composição de metabolitos secundários são responsáveis pela atividade antimicrobiana dos diferentes extratos. Esses compostos são potenciais candidatos futuros a produtos microbicidas terapêuticos (GOSH; SUBUDHI; NAYAK, 2008; JAYARAMAN; MANOHARAN; ILLANCHEZIAN, 2008; KHAN; MISHRA; VANDANA, 2012; RUIZ-RUIZ; MOGUEL-ORDOÑEZ; SEGURA-CAMPOS, 2017). Também encontramos estudos sobre o papel dos adoçantes não calóricos na prevenção da cárie dentária, que sugeriram que a *Stevia* em goma de mascar ou bebidas pode ser uma ferramenta eficaz para a prevenção dessa doença (CONTRERAS, 2013; LOHNER; TOEWS; MEERPOHL, 2017).

A massificação do uso da *Stevia rebaudiana* na indústria alimentícia e como adoçante aumenta a importância de investigar sua eficácia em combinação com outras substâncias, como nas formulações que normalmente são entregues ao público nas diferentes formas comerciais (CONTRERAS, 2013). A *Stevia rebaudiana* recebeu recentemente muito interesse pelo uso em produtos de higiene bucal, uma vez que provou ser um potente antimicrobiano sem efeitos colaterais locais (HENZ *et al.*, 2018; VANDANA *et al.*, 2017).

Os estudos sobre a *Stevia rebaudiana* trazem importantes informações a respeito do papel anti-cariogênico, oriundo de sua capacidade de reduzir a carga bacteriana, a formação de biofilme, evitando diminuições de pH (CONTRERAS, 2013; KISHTA-DERANI *et al.*, 2016; SLAVUTZKY, 2010; VANDANA *et al.*, 2017). Estudos sobre um possível papel anti-periodontopático são insuficientes para afirmar benefícios em humanos e, portanto, estudos *in vivo* e *in vitro* tornam-se necessários para continuar investigando essa propriedade.

A *Stevia rebaudiana* tem grande potencial para se tornar um complemento importante aos cuidados de saúde bucal, uma vez que estudos mostraram que a mesma apresenta efeito anticariogênico, devido ao seu baixo potencial acidogênico (GIACAMAN *et al.*, 2013; GOODSON *et al.*, 2010; SIRAJ; PUSHPANJALI; MANORANJITHA, 2019), ao efeito antiplaca (CONTRERAS, 2013; SUWANNAWONG *et al.*, 2004; TRIRATANA *et al.*, 2006) e ao efeito antibacteriano em microrganismos associados à cárie dentária (CONTRERAS, 2013; DAS *et al.*, 1992; GAMBOA; CHAVES, 2012; TRIRATANA *et al.*, 2006). Também apresenta efeito antimicrobiano, visto que a *S. rebaudiana* Bertoni tem a capacidade de inibir o crescimento de certas bactérias (DAS *et al.*, 1992; GOSH; SUBUDHI; NAYAK, 2008; HENZ *et al.*, 2018; JAYARAMAN; MANOHARAN; ILLANCHEZIAN, 2008; KHAN; MISHRA; VANDANA, 2012). Possui o potencial de modificar o pH do biofilme devido a diminuição da produção de polissacarídeos extracelulares, da adesão bacteriana e da hidrofobicidade da superfície (GIACAMAN *et al.*, 2013; GOODSON *et al.*, 2010; SIRAJ;

PUSHPANJALI; MANORANJITHA, 2019; SUWANNAWONG *et al.*, 2004), modificando assim a virulência desse biofilme. Dessa forma, a *Stevia rebaudiana* Bertoni poderia ser usada na forma de bochechos, cremes dentais, goma de mascar, saliva artificial, comprimidos mastigáveis a fim de auxiliar no controle e modificação do biofilme dental.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de uma infusão de *Stevia rebaudiana* Bertoni na desmineralização do esmalte e no biofilme dentário formado *in situ* e sua possível capacidade de modificar a cariogenicidade do biofilme dentário com o uso concomitante da sacarose.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) avaliar se a infusão de *Stevia rebaudiana* Bertoni exerce algum efeito inibidor no processo de desmineralização do esmalte dentário, em termos de dureza de superfície;
- b) avaliar se a infusão de *Stevia rebaudiana* Bertoni exerce algum efeito sobre a quantidade de Polissacarídeos Extracelulares Solúvel e Insolúvel;
- c) avaliar se a infusão de *Stevia rebaudiana* Bertoni exerce algum efeito na quantidade de bactérias associadas a cárie, fungos e microrganismos totais presentes no biofilme;
- d) analisar através de Microscopia Eletrônica de Varredura o efeito sobre o biofilme dentário da utilização da infusão de *Stevia rebaudiana* Bertoni em relação aos morfotipos bacterianos presentes e estrutura do biofilme dentário.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Effect of *Stevia rebaudiana* Bertoni infusion on enamel demineralization and on dental biofilm formation – an *in situ* study

Maieli Maiara Nied¹, Rodrigo Alex Arthur¹, Ewelyn de Freitas Farias¹, Sandra Liana Henz^{1*}

Abstract

Stevia rebaudiana Bertoni (*Stevia*) is a natural non-caloric sweetener that can modify the cariogenicity of the biofilm. The objective of this *in situ* study was to evaluate the effect of *Stevia rebaudiana* Bertoni infusion on enamel demineralization and on dental biofilm formation. In a cross-over design, eleven volunteers used an intraoral palatal appliance containing 4 slabs of bovine enamel during 3 phases of 7 days each. All enamel slabs were exposed to 20% sucrose solution that was dripped 8x/day and treated 2x/day with: 0.9% Sodium Chloride (NaCl), 0.12% Chlorhexidine (CHX) or 5% infusion of *Stevia*. A one-week wash-out period was adopted in between each *in situ* phase. At the end of each experimental phase, the biofilm formed on the slabs was collected and analyzed for microbiological composition [counts of *Streptococcus mutans* (SM), *Lactobacillus* spp. (LB), *Candida albicans* (CA) and total microorganisms (TM) (CFU/mg)], biochemical composition in terms of quantification of extracellular soluble (SEPS) and insoluble polysaccharides (IEPS)($\mu\text{g}/\text{mg}$) and qualitatively assessed by Scanning Electron Microscopy. Percentage of surface hardness loss (%SHL) was evaluated on enamel slabs. All the outcomes were analyzed by ANOVA at a level of 5% of significance. No differences were found among NaCl, CHX and *Stevia* for IEPS, SEPS, SM, LB, CA and TM. The %SHL found in the presence of CHX was statistically lower than NaCl. The %SHL in the presence of *Stevia* was considered intermediate between them. We observed in this study that the use of *Stevia* in situations of high cariogenic challenge would probably have little effect on the modification of biofilm cariogenicity and on the progression of the carious lesion.

Keywords: *Stevia*; Dental plaque; Polysaccharydes; Demineralization; Enamel.

Introduction

The demand for non-caloric sweeteners increases every day due to the increased global health concern, since it is known that high intake of sucrose poses a risk for the development of dental caries, obesity and diabetes (Welsh, Dietz, 2005). Ingestion of large amounts of sugar is related to health, nutritional and medical problems and, in this sense, diet assumes a fundamental role in the functioning of the body, being extremely important for the prevention of diseases such as dental caries, diabetes, obesity and cardiovascular diseases (Pól et al., 2007; Chatsudthipong, Muanprasat, 2009). The change in eating habits is necessary, but difficult, especially when it is associated with the consumption of sucrose. Low-calorie sweeteners have been widely studied, and today synthetic sweeteners are the most available on the world market, such as aspartame, saccharin and sucralose. However, there are natural substances with few calories and great sweetening potential, such as stevioside and rebaudioside A, glycosides of *Stevia rebaudiana* Bertoni. The literature has shown that *Stevia rebaudiana* Bertoni also has anticariogenic, antidiabetic, antioxidant, hypotensive, antihypertensive, antimicrobial, anti-inflammatory and antitumor activity (Pól et al., 2007; Ruiz-Ruiz et al., 2017).

Stevia rebaudiana Bertoni is a South America native plant, specifically found in the northeastern of Paraguay and Brazil, and consists in a group of annual and perennial herbs, sub-shrubs and shrubs occurring in mountainous regions, open forests, riverbanks and valleys dried. Currently, it is cultivated in several regions of the world, such as North America, Asia and Europe (Lemus-Mondaca et al., 2012; Ruiz-Ruiz et al., 2017). *Stevia rebaudiana* is a natural non-caloric sweetener with a higher sweetening potential than sucrose, with no adverse effects. It has been shown to have many benefits for systemic health and more recently for oral health (Contreras, 2013).

Dental caries is one of the most common problem affecting the oral cavity being the result of the interaction among cariogenic microflora, a diet rich in fermentable carbohydrates and host factors over time (Fejerskov et al., 2015; Schwendicke et al., 2016). The biofilm formed in the presence of sucrose is extremely cariogenic, with low concentrations of calcium, phosphate, with porous and large amounts of extracellular polysaccharides. Sucrose, being easily metabolized by oral bacteria, results in the production of acids responsible for demineralizing dental tissues, culminating in the formation of dental caries (Marsh, 2003; Marshall, 2009). The reduction of sugar intake and its replacement with nonfermentable sweeteners is considered a useful approach to caries prevention, because it is of extreme

importance the use of substances that can modify the cariogenicity of this biofilm (Kim, Kinghorn, 2002; Marshall, 2009; Loveren et al., 2012).

In vitro (Ikeda et al., 1978; Sapuyes et al., 2010; Giacaman et al., 2013; Kishta-Derani et al., 2016) and *in vivo* (Slavutzky, 2010) studies showed that stevioside can modify the cariogenicity of biofilm, but the mechanism is not well understood. The objective of this *in situ* study was to evaluate the effect of *Stevia rebaudiana* Bertoni infusion on enamel demineralization and on dental biofilm formation, in terms of percentage of surface hardness loss, soluble and insoluble Extracellular Polysaccharides dosage, counts of total microorganisms, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* spp. and *Candida albicans*, in addition to qualitative analysis through Scanning Electron Microscopy of the present bacterial morphotypes and the structure of the dental biofilm.

Materials and methods

Experimental design

This was a crossed-over and randomized *in situ* study conducted in three experimental phases lasting 7 days each, with a wash-out of 1 week between each phase. Due to the preparation and use of an infusion of *Stevia rebaudiana* Bertoni from dried leaves, the infusion staining and flavor prevented the study from being double blind, since volunteers could identify the solution from these characteristics and, therefore, the study was blinded only in the analysis of the results. Eleven adult volunteers (average age of 23,8) used a palatal intraoral appliance, in each experimental phase, containing 4 slabs of bovine dental enamel (with known surface hardness), 2 slabs on each side of the appliance. All enamel slabs were exposed to 20% sucrose solution that was dripped 8x/day and treated 2x/day with one of the following solutions: 0.9% Sodium Chloride (NaCl), 0.12% Chlorhexidine (CHX) or 5% *Stevia* infusion. The volunteers were instructed to keep the intraoral appliance out of the mouth for 5 minutes after dripping the solutions and after that period the excess solution that might have been present in the appliance was cleaned with a gauze and reinserted into the mouth. During the study period, both experimental and wash-out phases, the volunteers used a standardized fluoride dentifrice twice a day (Colgate Tripla Ação; 1450 ppm F, 7335BR122I, Colgate-Palmolive Industrial LTDA, Brazil) and used fluoridated water (0.7 ppm F).

At the end of each experimental phase, the biofilm formed on the slabs was collected and analyzed for microbiological composition [counts of *Streptococcus mutans* (SM), *Lactobacillus* spp. (LB), *Candida albicans* (CA) and total microorganisms (TM)],

biochemical composition in terms of quantification of extracellular soluble (SEPS) and insoluble polysaccharides (IEPS) and qualitatively assessed by Scanning Electron Microscopy. Percentage of surface hardness loss (%SHL) was evaluated on enamel slabs. The study protocol was approved by the Ethics and Research Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul (CAAE 12557213.0.0000.5347). The Informed written consent was obtained from all subjects before to the start of the study, according to the Declaration of Helsinki. In order to be qualified to the study, all volunteers should present good oral and general health, non-stimulated salivary flow rates of at least 0.25 mL / min, did not present systemic diseases, did not use any type of orthodontic appliance and did not use antibiotic drugs for at least 2 months before the start of the *in situ* study. The sample size was calculated based on an previous *in situ* study (Paes Leme et al., 2004), considering a power of 80% and a confidence interval of 95%, resulting in the number of 12 volunteers.

Preparation of enamel slabs and intraoral appliance

The dental enamel slabs (6 mm diameter x 2 mm thick) were prepared from intact bovine incisors as previously described (Rezende et al., 2017). The prepared and selected enamel slabs had their surface hardness measured using the SHIMADZU HMV-2T microdurometer and the indentations in the enamel were made in the center of the planned region, with the long axis of the Knoop diamond parallel to the outer surface of the enamel applied with a load of 50 g for 5 s. Five indentations were performed in sequence, separated by a distance of 100 μm and the calculated arithmetic mean. A total of 129 slabs ($329,27 \pm 65,85 \text{ kg/mm}^2$) were selected and randomized among the treatments (CHX, NaCl or *Stevia*) and among the volunteers that the mean of surface hardness was similar among the volunteers ($317,76 \pm 2,35 \text{ kg/mm}^2$) in each experimental phase. The randomization of the enamel slabs was generated by computer using Excel® software, through a randomization list.

Removable palatal intraoral appliances were made on the plaster model of the upper arch of each volunteer, with self-curing acrylic resin. In each device there were 2 cavities, one on each side of the device, measuring 14 x 8 x 3 mm, designed to allocate 2 slabs of enamel in each (Sanchez et al., 2018). Three of the four enamel slabs placed in the device had known surface hardness and within the overall mean described above. The fourth enamel slab was destined for Scanning Electron Microscopy. The slabs were glued inside the cavity and covered by a plastic mesh to maintain a 1mm distance between the enamel surface and the mesh to allow biofilm accumulation (Hara et al., 2003).

Preparation of the solutions and treatments

The solutions used for the study were 20% Sucrose (Dinâmica® LTDA: São Paulo-Brasil), 5% *Stevia rebaudiana* Bertoni infusion, Chlorhexidine Digluconate 0.12% (Colgate PerioGard®; 2580BR121A; Colgate-Palmolive Industrial LTDA, Brazil) and 0.9% NaCl (Solução Fisiológica Panvel® Care; Sodium Chloride 0,9%; Lote:0002; FARMAX, Brazil). Of these, both the 20% sucrose and the *Stevia rebaudiana* solution were prepared by the researchers, while the Chlorhexidine and NaCl solutions used were the commercial forms found on the market. All solutions were distributed in dropper bottles the day before the start of the first phase, the 20% sucrose flasks were identified with the letter "S", while the flasks with the treatment solutions *Stevia* (1), Chlorhexidine (2) and NaCl (3) were identified according to the phase (1, 2 or 3), the voluntary (1 to 12) and the treatment (1,2 or 3). All solutions were frozen, and volunteers received new solutions every 2 days.

The 20% Sucrose solution was used by all volunteers 8x per day at pre-established times (08:00, 09:30, 11:00, 14:00, 15:30, 17:00, 19:00 and 21:00 h), when they dripped 4 drops, one on each enamel slab. The 5% *Stevia rebaudiana* Bertoni infusion was prepared using dry leaves (Batch: 0054, expiration: 01/02/2019, Foco Alternativo®) which were macerated, and, after adding an amount of distilled water, a two-hour protocol of two intercalated boils was performed, with 15 hours of rest of the infusion (Slavutzky, 2010). The choice of *Stevia* infusion at 5% concentration was based on a previous in vitro study (Henz et al., 2018), which showed antimicrobial effect of the plant against *S. mutans* and *Lactobacillus* spp. It was decided not to use trademarks that could have in their composition other components that could influence the results. The 0.12% Chlorhexidine Digluconate solution was used as a positive control and the 0.9% NaCl solution was used as negative control. *Stevia rebaudiana* Bertoni (*Stevia*), Chlorhexidine (CHX) and NaCl treatment solutions were dripped onto enamel slabs 2 times a day at pre-set times (07:30 and 20:30), dispensing 4 drops, one on each slab. New sets of enamel slabs and palatal appliances were used in each experimental phase. The volunteers were instructed to use the appliances during the day and at night and to remove them only during exposure to sucrose and to treatments, meals, beverages and oral hygiene. Considering this and considering an average time of 50 minutes for each of the main meals (breakfast, lunch and dinner) and 30 minutes to snack per day, the total time of use was estimated around 20 h / day. The volunteers were instructed to not use other fluoride products or any other dentifrice than the one provided by the study.

Biofilm collection and analysis

At the end of each of the 3 experimental phases the dental biofilm formed on the surface of the 3 enamel slabs was collected, while the blocks were cleaned and destined for analysis of the final surface microhardness. The biofilm formed on the fourth block was preserved and destined for Scanning Electron Microscopy. The plastic mesh was removed, all the biofilm formed was collected with a sterile curette and immediately transferred to pre-weighed sterile microtubes, identified with the experimental phase, the volunteer number and the number of the treatment. The wet weight of the biofilm (mg) was determined using a high precision analytical balance (SARTORIUS BP210D; Gottingen/Germany) and, after the biofilm was suspended in 1mL of sterile saline solution (PBS; 0,9% NaCl) and sonicated. Part of this suspension was used for microbiological analysis and the remainder was frozen and reserved for subsequent biochemical analyzes.

Dental biofilm microbiological analysis

After resuspension of the biofilm in 1 ml of sterile saline solution (PBS), an aliquot of the microbial suspension was collected, serially diluted and inoculated in duplicate in the following culture medium: Mitis Salivarius bacitracin agar (MSB; BD Difco™, Maryland, USA) for the growth of *Streptococcus mutans* (EGM), Rogosa SL agar (ROG; Hi Media® Mumbai- India) for growth of *Lactobacillus* spp., Brain Heart Infusion agar (BHI; Kasvi, Curitiba, Brazil) supplemented with sheep blood at 5% concentration for growth of total microorganisms and, finally, Sabouraud agar (SAB; Hi Media® Mumbai- India) for the growth of *Candida albicans* (Rezende et al., 2017). BHI and MSB plates were incubated at 37°C in microaerophilia for 48 h while ROG plates were incubated for 72 h under the same atmospheric conditions described above and the SAB medium was incubated in aerobic condition at 37°C for 48 h. After the incubation period the Colony Forming Units of each medium were determined using a stereomicroscope (OLYMPUS SZ51; Tokyo, Japan) and the results were expressed in Colony Forming Units per milligram of biofilm (CFU/mg).

Biochemical analysis of dental biofilm

In the biochemical analysis, soluble and insoluble extracellular polysaccharide (SEPS/IEPS) were evaluated through the sulfuric phenol micro-method (Dubois, 1956). For the biochemical analysis it is necessary a step of extracting soluble and insoluble extracellular polysaccharides from the biofilm sample, followed by two steps of precipitation and, subsequently, resuspension of the precipitate with NaOH solution, to make the dosage of

polysaccharides through the phenol-sulfuric micromethod. This method consists of the dehydration of sugars in concentrated acid medium and subsequent formation of complexes with phenol. Sugars and their derivatives, when treated with phenol and concentrated sulfuric acid, render the solution yellow-orange, maintaining this staining stable. The colored sample was placed in a spectrophotometer (THERMO BioMate3; Waltham, Massachusetts/USA) and compared to a reference in order to present the absorbance value of the solution, which is linearly proportional to the total sugars concentration (Dubois, 1956; Demiate et al., 2002). The dosages of polysaccharides were determined at a wavelength of 490 nm using a standard glucose curve. All the dosages were analyzed in duplicate, obtaining the absorbance and mean of the same.

Analysis of microhardness of enamel surface after biofilm formation

After the end of the experiment, the final surface microhardness of the enamel slabs was measured. Five indentations were performed after the treatments, located 100 µm distant between each other and indentations performed before the experimental phase, with a load of 50 g for 5 s. The percentage of surface hardness loss (% SHL) was calculated from the mean value of the 5 indents of each slab pre-experimental phase (A) and experimental post-phase (B) as follows: $\% \text{ SHL} = ([B - A]/A) \times 100$ (Cury et al., 2000).

Scanning Electron Microscopy after formation of biofilm

The preparation of the biological biofilm samples formed on the fourth slab started immediately after collection by immersion in a 25% glutaraldehyde solution for one week. After this fixation period the material passed through three washes of 30 minutes each with 0.2M Phosphate Buffer and distilled water in a ratio of 1: 1. The dehydration of the samples was performed by a sequence of 7 immersions in 30%, 50%, 70%, 90% acetone for 10 minutes each, after re-immersion in 90% acetone for 20 minutes, 100% acetone for 10 minutes, and again, in 100% acetone for 20 minutes. The dissection of the samples was performed in the Critical Point Dryer (Critical Point Dryer, BALZERS CPD030). The samples were metallized (Sputter Coater, BALZERS SCD050) and analyzed in the Scanning Electron Microscope (JEOL JSM 6060; Akishima Tokyo/Japan) at different magnifications, at the Electronic Microscopy Center of the Federal University of Rio Grande do Sul.

Statistical analysis

The mean, standard deviation, minimum and maximum values, p-value for the variables under study [%SHL, SEPS, IEPS and counts of *Streptococcus mutans* (SM), *Lactobacillus* spp. (LB), *Candida albicans* (CA) and total microorganism (TM)] were calculated in each of the conditions tested and analyzed statistically. The data were analyzed using the Analysis of Variance for repeated measurement (ANOVA). The software Stata 13.1 was used for the statistical analysis and the level of significance was 5%. All analyzes were done based on the data obtained from each volunteer in each phase of the experiment.

Results

The Table 1 shows the description of the variables, while Table 2 shows the comparison between the groups. The results of Table 2 suggest that the variables SEPS, IEPS, SM, LB, CA and TM did not present a statistically significant difference between the Stevia, CHX and NaCl treatments ($p > 0.05$). Meanwhile, a statistically significant difference was observed in % SHL between CHX and NaCl ($p < 0.05$). One of the volunteers gave up participating in the study even during the first phase resulting in a number of 11 volunteers.

Table 1. Description of the variables

<i>Stevia</i>	n	Average	Standard deviation	Min	Max
%SHL	11	-22,1 ^{ab}	28,8	-64,2	16,3
SEPS (µg/mg)	11	13,7 ^a	14,9	2,2	47,3
IEPS (µg/mg)	10	28,6 ^a	27,3	4,3	98,7
SM (CFU/mg)	11	2,8 x10 ^{4a}	7 x10 ⁴	0	2,3 x10 ⁵
LB (CFU/mg)	11	8 x10 ^{5a}	1,2 x10 ⁶	0	3,7 x10 ⁶
CA (CFU/mg)	11	8,9 x10 ^{5a}	2 x10 ⁶	4,9 x10 ¹	6,6 x10 ⁶
TM (CFU/mg)	11	8,1 x10 ^{7a}	1,5 x10 ⁸	7,1 x10 ⁴	3,9 x10 ⁸
Chlorhexidine					
%SHL	11	-7,4 ^a	12,0	-30,5	10,8
SEPS (µg/mg)	11	15,1 ^a	15,0	2,4	44,3
IEPS (µg/mg)	9	22,0 ^a	21,1	7,4	66,4
SM (CFU/mg)	11	4,1 x10 ^{3a}	1,2 x10 ⁴	0	3,8 x10 ⁴
LB (CFU/mg)	11	3,3 x10 ^{5a}	7,3 x10 ⁵	0	1,9 x10 ⁶
CA (CFU/mg)	11	1,9 x10 ^{4a}	4,3 x10 ⁴	0	1,3 x10 ⁵
TM (CFU/mg)	11	3,9 x10 ^{7a}	6,6 x10 ⁷	1 x10 ⁵	1,9 x10 ⁸
NaCl					
%SHL (µg/mg)	11	-33,4 ^b	29,5	-76,6	10,2
SEPS (µg/mg)	11	13,2 ^a	10,8	1,9	35,4
IEPS (µg/mg)	11	24,8 ^a	17,4	7,0	51,5
SM (CFU/mg)	11	7,2 x10 ^{3a}	1,8 x10 ⁴	0	5,8 x10 ⁴
LB (CFU/mg)	11	8,6 x10 ^{5a}	1,7 x10 ⁶	0	5,8 x10 ⁶
CA (CFU/mg)	11	1,9 x10 ^{5a}	2,6 x10 ⁵	0	6,7 x10 ⁵
TM (CFU/mg)	11	1,2 x10 ^{7a}	1,7 x10 ⁷	3,7 x10 ³	4,9 x10 ⁷

Means followed by distinct letters differ statistically. %SHL, percentage of surface hardness loss; SEPS, soluble extracellular polysaccharide; IEPS, insoluble extracellular polysaccharide; SM, *Streptococcus mutans*; LB, *Lactobacillus* spp.; CA: *Candida albicans*; TM, total microorganisms.

Table 2. Comparison between the treatment groups for SHL, SEPS, IEPS and counts of SM, LB, CA and MT

	n	Average			Anova
		<i>Stevia</i>	Chlorhexidine	NaCl	P-Value
%SHL	11	-22,1 ^{ab}	-7,4 ^a	-33,4 ^b	0,03
SEPS (µg/mg)	11	13,7 ^a	15,1 ^a	13,2 ^a	0,94
IEPS (µg/mg)	10	28,6 ^a	22,0 ^a	24,8 ^a	0,84
SM (CFU/mg)	11	2,8 x10 ^{4a}	4,1 x10 ^{3a}	7,2 x10 ^{3a}	0,40
LB (CFU/mg)	11	8 x10 ^{5a}	3,3 x10 ^{5a}	8,6 x10 ^{5a}	0,40
CA (CFU/mg)	11	8,9 x10 ^{5a}	1,9 x10 ^{4a}	1,9 x10 ^{5a}	0,20
TM (CFU/mg)	11	8,1 x10 ^{7a}	3,9 x10 ^{7a}	1,2 x10 ^{7a}	0,27

Means followed by distinct letters differ statistically. %SHL, percentage of surface hardness loss; SEPS, soluble extracellular polysaccharide; IEPS, insoluble extracellular polysaccharide; SM, *Streptococcus mutans*; LB, *Lactobacillus* spp.; CA: *Candida albicans*; TM, total microorganisms.

In Figures 1, 2, 3 and 4 (Fig 1, Fig 2, Fig 3 and Fig 4) we can visualize the surface of the enamel slabs covered by biofilm through the Scanning Electron Microscopy (SEM). In all the figures we verified the presence of a network that interlaced the biofilm, the Extracellular Polysaccharide (EPS) matrix, besides the presence of cocci, rods, filamentous and yeast.

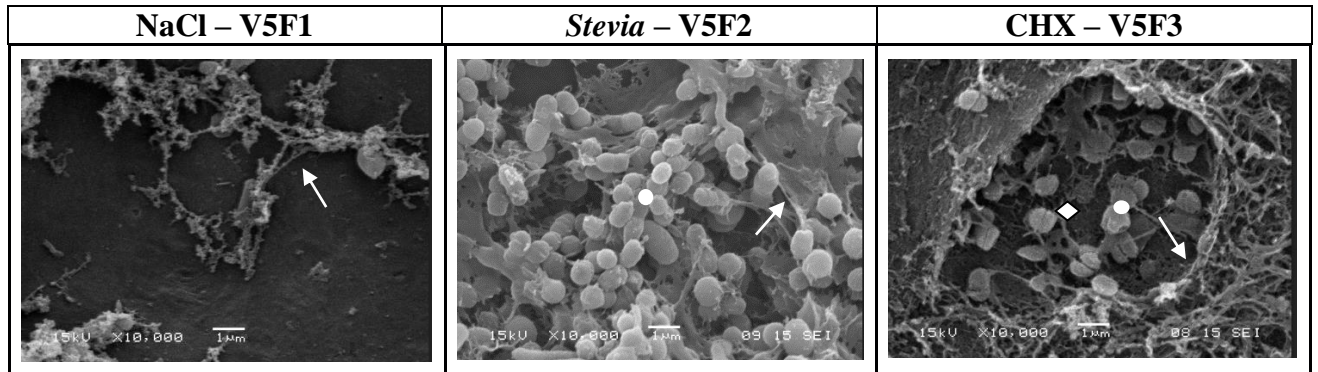


Fig 1. Visualization of the surface of the enamel slab with biofilm after treatment. V5, volunteer 5; F1, phase 1; F2, phase 2; F3, phase 3. (10000X magnification). Arrow: EPS; Round: coccus; Rhombus: filaments.

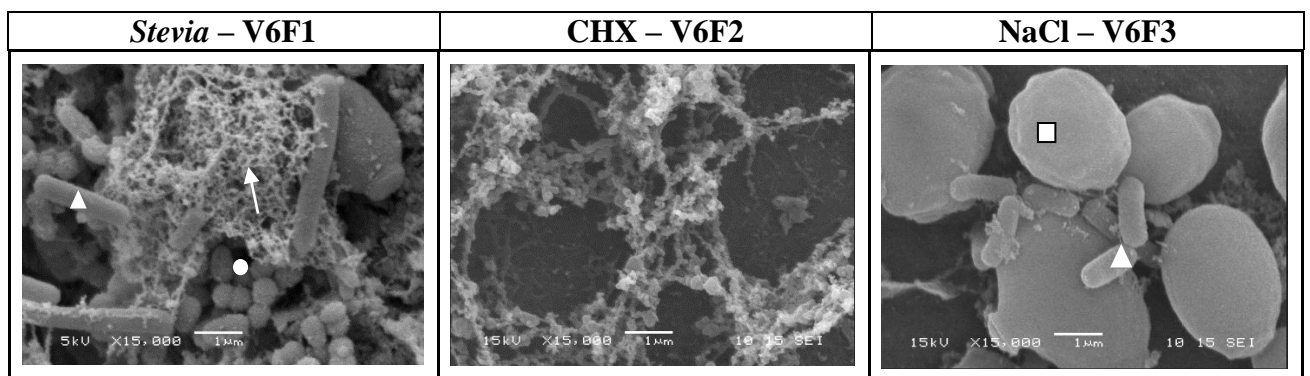


Fig 2. Visualization of the surface of the enamel slab with biofilm after treatment. V6, volunteer 6; F1, phase 1; F2, phase 2; F3, phase 3. (15000X magnification). Arrow: EPS; Round: coccus; Triangle: rods; Square: yeast.

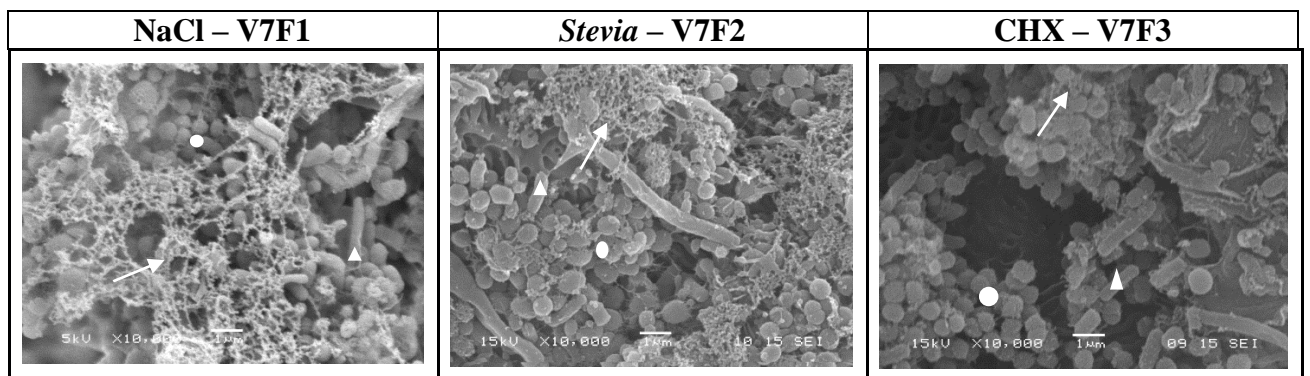


Fig 3. Visualization of the surface of the enamel slab with biofilm after treatment. V7, volunteer 7; F1, phase 1; F2, phase 2; F3, phase 3. (10000X magnification). Arrow: EPS; Round: coccus; Triangle: rods.

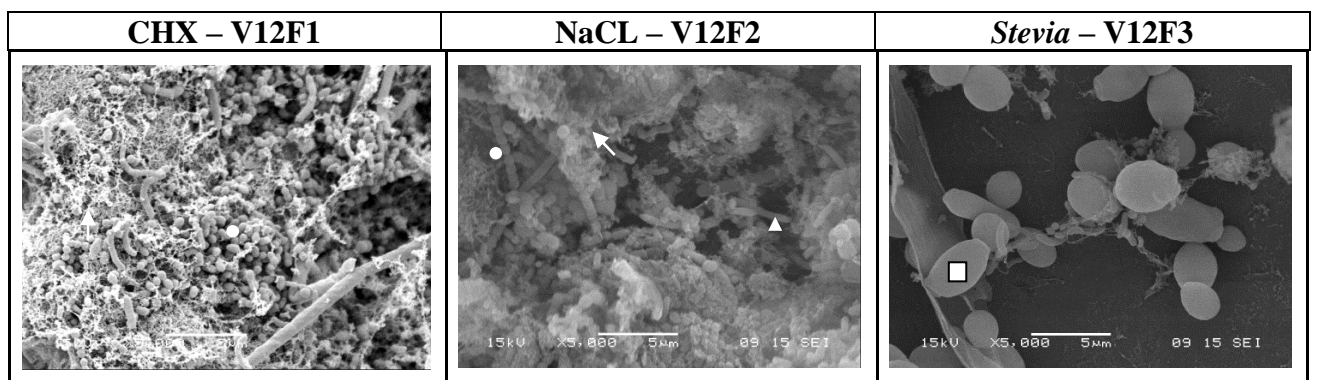


Fig 4. Visualization of the surface of the enamel slab with biofilm after treatment. V12, volunteer 12; F1, phase 1; F2, phase 2; F3, phase 3. (5000X magnification). Arrow: EPS; Round: coccus; Triangle: rods; Square: yeast.

Discussion

The effects of natural plant extracts on dental biofilm bacteria have been studied by many researchers around the world in recent decades and several of these studies show the anti-cariogenic and antimicrobial effects of *Stevia* (Goodson et al., 2010; Sapuyes et al., 2010; Slavutzky, 2010; Lemus-Mondaca et al., 2012). In this *in situ* study we observed that there was no significant difference in counting of total microorganisms (TM), *Streptococcus mutans* (SM), *Lactobacillus* spp. (LB) and *Candida albicans* (CA) among the *Stevia*, Chlorhexidine and NaCl treatment groups, as well as there was no difference in the presence of extracellular soluble polysaccharides (SEPS) and insoluble (IEPS).

In relation to the percentage of loss of hardness of the surface of the enamel slabs (% SHL), there was a significant difference between the studied groups, with emphasis on the biggest difference between Chlorhexidine (positive control) and NaCl (negative control), *Stevia* being intermediate between the two groups. *In situ* study by Cury et al. (2000) demonstrated that biofilms formed in the presence of sucrose have an increased cariogenic potential and that the mineral loss of enamel in the presence of sucrose may be twice higher than in the presence of glucose and fructose, which are not substrates for EPS synthesis. *In vitro* study performed by Giacaman et al. (2013), with commercial sweetener that contain other sugars such as lactose in its composition, observed that a sweetener containing *Stevia* had a lower percentage of loss of surface hardness compared to the sucrose positive control, but in our study we did not observe differences in the loss of superficial hardness in any of the treatments. In another *in vitro* study evaluating the effect of *Stevia* on enamel microhardness and the viability of *S. mutans* when incorporated into a cariogenic diet (three x/day), in a biofilm formed only with *S. mutans*, it was observed that *Stevia* highest concentration group had the highest amount of hardness lost, indicating that a higher concentration of *Stevia* would have a higher cariogenic effect in the presence of sucrose and *S. mutans* (Kistha-Derani et al., 2016). In our study we observed that *Stevia* used in a situation of high cariogenic challenge could not avoid the loss of hardness and decrease the counts of *S. mutans*.

In the literature, our study is the first to use an *in situ* model to evaluate the effect of an infusion of *Stevia rebaudiana* Bertoni on enamel demineralization and on dental biofilm in a situation of high cariogenic challenge (8 x/day). For this study we used a *Stevia* infusion prepared from dried leaves to preserve its properties, and not sweeteners available in the market, since they have in their composition other sugars and components that influence the results.

Regarding the production of Soluble Extracellular Polysaccharides (SEPS) and Insoluble (IEPS) we observed no differences among the 3 groups tested. However, Giacaman et al. revealed in its *in vitro* study a decrease in the production of intracellular polysaccharides (IPS) and extracellular polysaccharides (EPS) (Giacaman et al., 2013). Ikeda et al. demonstrated that stevioside is not metabolized by *S. mutans* as a carbon source, as well as does not allow acid formation and EPS synthesis (Ikeda et al., 1978). Other studies have also shown that stevioside, aspartame, xylitol and saccharine sweeteners were not metabolized by *S. mutans* and that *Stevia rebaudiana* leaf extract was a potent inhibitor of insoluble polysaccharide synthesis, which plays an important role in the formation of dental biofilm (Pinheiro et al., 1987; Chedid, 1990). In our study, we used an *in situ* model where we performed a high cariogenic challenge due to exposure to 8X sucrose daily and to 2X daily treatments. This high cariogenic challenge may be responsible for the increased production of soluble extracellular polysaccharides (SEPS) and insoluble (IEPS) induced by sucrose and this might explain the differences found in this study in relation to the *in vitro* studies described above. In fact, an increase in metabolic activity due to high sucrose exposure has been reported previously (Koo et al., 2009).

EPS is responsible for 40% of the dental biofilm composition, being one of the main virulence factors of the bacterial biofilm. The fermentation of sucrose by *Streptococcus mutans* leads to the production of an insoluble form of polysaccharides that integrate structurally in the extracellular matrix of the biofilm. Insoluble extracellular polysaccharides (IEPS) synthesized from sucrose can increase the diffusion pattern of acids throughout the biofilm matrix, increasing the porosity of the extracellular matrix. In addition, EPS acts as a biological glue that increases the adhesion of microorganisms to each other and to the surface of the tooth, which increases the formation of dental biofilm (Rolla, 1989; Paes Leme et al., 2006). Abdul Razak et al. (2017) reported that alternative sweeteners, such as *Stevia*, were equally effective as xylitol in reducing the presence of extracellular matrix in *Streptococcus* biofilms in an *in vitro* study.

Depending on factors such as diet and regular mechanical removal of plaque, the predominant type of microbiota in the oral cavity may vary. In individuals who maintain adequate oral hygiene and make low use of sucrose, the predominant microbiota may be less pathogenic, and the individual may have plaque and still be healthy (Marsh, 2012). However, when mechanical removal of the plaque is deficient and the use of sucrose is frequent, selection for certain pathogenic organisms occurs and plaque becomes more virulent. Thus,

according to Cury, the primary objective, in terms of oral health, would be to maintain control of the accumulation of bacteria on the teeth (Cury, 1997).

It is known that no antimicrobial solution has effect if there is no mechanical removal of the biofilm, since only the antimicrobial has no effect on the biofilm matrix (Newbrun, 1988; Thylstrup, Fejerskov, 1988). This was confirmed in the present study when chlorhexidine, considered the gold standard in the chemical control of the supragingival biofilm, did not have significant results in the studied variables. The use of a positive control of chlorhexidine digluconate as a treatment is important, since it is expected to have an inhibitory effect on bacterial growth (Hashino et al., 2013; Ferrazzano et al., 2015).

In our findings, we did not find any changes in the counts of *S. mutans* (SM), *Lactobacillus* spp. (LB) and *C. albicans* (CA), nor in the total counts of microorganisms (TM) for any treatment, suggesting that the high exposure of sucrose may have overcome any beneficial effect of the tested treatments (specially Stevia and CHX). In the literature we find many studies that address the antimicrobial effect of *Stevia rebaudiana*. In 1997, Grenby found that *Streptococcus mutans* had higher growth suppression when in stevioside containing medium than in medium containing sucrose, glucose or fructose (Grenby, 1997). Other *in vitro* studies compared the effect of *Stevia* extracts with different solvents on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus*. In these studies, *Stevia* extracts inhibited the growth of *S. mutans* and *L. acidophilus*, verifying the antibacterial activity of *Stevia* against these bacteria (Debnath et al., 2008; Sapuyes et al., 2010; Gamboa, Chaves, 2012; Mohammadi-Sichani et al., 2012, Ajagannavar et al., 2014). Giacaman et al. in an experimental work with commercial sweeteners, observed that *Stevia*, sucralose and saccharin leave significantly less viable cells (*S. mutans*) in biofilms compared to other sweeteners. In addition, *Stevia* and sucralose tend to induce the formation of less biomass (Giacaman et al., 2013). Recently another *in vitro* study also evaluated the antimicrobial activity of *Stevia rebaudiana* Bertoni solution and non-caloric sweeteners on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus casei*. The results show that the solution of the *Stevia rebaudiana* Bertoni plant presents inhibition on the bacterial growth of the *S. mutans* and *L. casei* microorganisms (Henz et al., 2018). The results found in the literature show that the solution of the *Stevia* plant presents inhibition on bacterial growth, but we cannot identify the same results in this *in situ* study.

In the images obtained by Scanning Electron Microscopy, we noticed the presence of many cocci, rods, filaments, yeasts and EPS. The EPS matrix, visible in all treatments, appears as a network involving and connecting microorganisms. There were no morfologic

differences between the different patients with different treatments in relation to the biofilm. This may be justified by the high cariogenic challenge of the study, 8 applications of sucrose 20%, masking the antimicrobial effect of *stevia* and chlorhexidine. Thus, with this amount of sucrose, there was the selection of microorganisms characteristic of cariogenic biofilms, due to the high synthesis of acids by the metabolization of this sugar. In addition, the study methodology uses enamel slabs protected by a screen in an intraoral appliance, made with self-curing acrylic resin, a porous material. This set of factors makes the appliance a biofilm retentive factor which stimulates the proliferation of *Candida albicans* and, for this reason, the presence of *C. albicans* is increased in the images and in the counts. (Pereira-Cenci, 2008; Nett et al., 2010; Salerno et al., 2011; Silva et al., 2011). The selected images were chosen from the patients with the highest biofilm weight.

The vast majority of the studies found in the literature are *in vitro* models, performed under ideal standards and conditions, unlike the present study, performed *in situ* with the use of intraoral appliances by the volunteers and, depending on their collaboration. These appliances are exposed to the oral environment, where there is a high variability of microorganisms, under the action of the saliva and the temperature of the oral cavity. Moreover, in the *in situ* model a plastic screen that protects the biofilm and prevents the mechanical removal of the biofilm covers the enamel slabs. This biofilm, exposed to a high cariogenic challenge (8X / day), without mechanical action, protected by the plastic screen, can be structured in such a way that the treatments did not have the effect observed by many authors in *in vitro* studies

Conclusion

The results observed in the present study, suggest that the use of *Stevia* infusion in situations of high cariogenic challenge had no effect on a set of cariogenic dental biofilm and enamel demineralization. More studies in different situations of cariogenic challenge are necessary to evaluate possible modifications in the biofilm with the use of *Stevia* infusion.

Acknowledgement

The authors would like to thank the volunteers for their valuable participation in this study.

Disclosure statement

The authors declare they do not have any conflict of interests.

Author contributions

S.L.H and R.A.A. conceived and designed the experiments. M.M.N., E.F.F., S.L.H. and R.A.A. performed the experiments. M.M.N., E.F.F., S.L.H. performed the SEM analysis. M.M.N. and S.L.H. analyzed the data. M.M.N., E.F.F., S.L.H. and R.A.A. wrote this paper.

References

- Abdul Razak F, Baharuddin BA, Akbar EF, Norizan AH, Ibrahim NF, Musa MY. Alternative sweeteners influence the biomass of oral biofilm. *Arch Oral Biol.* 2017 Aug.; 80:180–4.
- Ajagannanavar SL, Shamarao S, Battur H, Tikare S, Al-Kheraif AA, Al Sayed MS. Effect of aqueous and alcoholic Stevia (*Stevia rebaudiana*) extracts against *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus* in comparison to chlorhexidine: an in vitro study. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2014 Dec;4(2):116–21.
- Chatsudthipong V, Muanprasat C. Stevioside and related compounds: therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacol Therapeut.* 2009;121(1):41–54.
- Chedid SJ. Efeitos dos adoçantes: steviosideo, aspartame, xilitol e sacarina sobre a fermentação e síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis pelo *Streptococcus mutans* G55 E LM7 e pela placa dentária in vitro [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 1990.
- Contreras S. Anticariogenic properties and effects on periodontal structures of Stevia rebaudiana Bertoni: narrative review. *J Oral Res.* 2013 Oct; 2(3):158-66.
- Cury JA. Controle químico da placa dental. In: Kriger L, editor. ABOPREV: Promoção de saúde bucal. São Paulo: Artes Médicas; 1997. p. 129-40.
- Cury JA, Rebelo MA, Del Bel Cury AA, Derbyshire MT, Tabchoury CP. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Res.* 2000 Nov./Dec.; 34(6):491–7.
- Debnath M. Clonal propagation and antimicrobial activity of an endemic medicinal plant stevia rebaudiana. *J Med Plants Res.* 2008 Jan.; 2(2):245–51.
- Demiante IM, Wosiakci G, Czelusniak C, Nogueira A. Determinação de açúcares redutores e totais em alimentos: comparação entre método colorimétrico e titulométrico. *Publicatio UEPG: exact and soil sciences, agrarian sciences and engineering.* 2002;8(1):65-78.
- Dubois M, Grilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analyt Chem.* 1956 Jul.; 28(3):350–6.
- Ferrazzano GF, Cantile T, Alcidi B, Coda M, Ingenito A, Zarrelli A, et al. Is stevia rebaudiana Bertoni a non cariogenic sweetener: a review. *Molecules.* 2015 Dec.; 21(1):1-12.
- Fejerskov O, Nyvad B, Kidd EA. Pathology of dental caries. In: Fejerskov O, Nyvad B, Kidd EAM, editors. *Dental caries: the disease and its clinical management.* 3rd ed. Oxford (UK): Wiley Blackwell; 2015. p. 7–9.
- Gamboa F, Chaves M. Antimicrobial potential of extracts from Stevia rebaudiana leaves against bacteria of importance in dental caries. *Acta Odontol Latinoam.* 2012; 25(2):171-5.

Giacaman RA, Campos P, Muñoz-Sandoval C, Castro RJ. Cariogenic potential of commercial sweeteners in an experimental biofilm caries model on enamel. *Arch Oral Biol.* 2013 Sep.; 58(9):1116-22.

Goodson J, Cugini M, Floros C, Roberts C, Boileau A, Bell M. Effect of a Truvia™ rebiana on plaque pH. In: Abstract presented at the International Association for Dental Research General Sessions, Barcelona; 2010 Jul. p. 14-17.

Grenby TH. Dental aspects of the use of sweeteners. *Pure Appl Chem.* 1997;69(4):709-14.

Hara AT, Queiroz CS, Paes Leme AF, Serra MC, Cury JA. Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine in situ. *Caries Res.* 2003 Sep./Oct.;37(5):339-44.

Hashino E, Kuboniwa M, Alghamdi AS, Yamaguchi M, Yamamoto R, Cho H, et al. Erythritol alters microstructure and metabolomic profiles of biofilm composed of *Streptococcus gordonii* and *Porphyromonas gingivalis*. *Mol Oral Microbiol.* 2013 Dec.; 28(6):435-51.

Henz SL, Arthur RA, Colvara BC, Severo R, Felten V. Atividade antimicrobiana de *Stevia rebaudiana* Bertoni e de adoçantes não calóricos sobre bactérias cariogênicas: estudo in vitro. *RFO UPF.* 2018 jan/abr; 23(1):37-41.

Ikeda T, Okada A, Motada R. Effects of stevioside on certain metabolism of streptococcus mutans. *J Nihon Univ Sch Dent.* 1978; 4:24-7.

Kim NC, Kinghorn AD. Highly sweet compounds of plant origin. *Pharm Res.* 2002 Dec.; 25(6):725-46.

Kishta-Derani M, Neiva GF, Boynton JR, Kim YE, Fontana M. The antimicrobial potential of stevia in an in vitro microbial caries model. *Am J Dent.* 2016 Apr.; 29(2):87-92.

Koo H, Xiao J, Klein MI. Extracellular polysaccharides matrix: an often forgotten virulence factor in oral biofilm research. *International Journal of Oral Science.* 2009 Dec.; 1(4):229–34.

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 Chem.* 2012 Jun;132(3):1121-32.

Loveren CV, Broukal Z, Oganessian E. Functional foods/ingredients and dental caries. *Eur J Nutr.* 2012 Jul.; 51(2):15–25.

Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes?. *Microbiology.* 2003 Feb.;149(2):279-94.

Marsh, PD. Contemporary perspective on plaque control. *Br Dent J.* 2012 Jun.; 212(12):601-6.

Marshall TA. Chairside diet assessment of caries risk. *J Am Dent Assoc.* 2009 Jun.; 140(6):670–4.

- Mohammadi-Sichani M, Karbasizadeh V, Aghai F, Mofid MR. Effect of different extracts of *Stevia rebaudiana* leaves on *Streptococcus mutans* growth. *J Med Plants Res.* 2012 Sep.; 6(32):4731–4.
- Nett JE, Marchillo K, Spiegel CA, Andes DR. Development and validation of an in vivo *Candida albicans* biofilm denture model. *Infection and Immunity.* 2010 Jul.; 78(9):3650–9.
- Newbrun E. *Cariologia.* São Paulo: Livraria Editora Santos; 1988.
- Paes Leme AF, Dalcico R, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Cury JA. In situ effect of frequent sucrose exposure on enamel demineralization and on plaque composition after APF application and F dentifrice use. *J Dent Res.* 2004 Jan.; 83(1):71–5.
- Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation - new insight. *J Dent Res.* 2006 Oct.; 85(10):878-87.
- Pereira-Cenci T. Avaliação da formação de biofilme de espécies de *Candida* sobre a superfície de resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses removíveis. [Tese]. Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba; 2008.
- Pól J, Hohnová B, Hyötyläinen T. Characterization of *Stevia rebaudiana* by comprehensive two-dimensional liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2007 May.; 1150(1-2):85-92.
- Pinheiro CE, Oliveira SS, Silva MSMB, Poletto MIF, Pinheiro CF. Efeito dos extratos de guaraná e de *Stévia rebaudiana* Bertoni (folhas) e do esteviosídeo, sobre a fermentação e a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis da placa dentária. *Rev Odontol USP.* 1987 out./dez.; 1(4):9-13.
- Rezende G, Grando D, Arthur RA, Hashizume L: Cariogenic potential of sucrose associated or not with maltodextrin on dental enamel. *Caries Res.* 2017 Mar.; 51(2):129–35.
- Rölla G. Why is sucrose so cariogenic: the role of glucosyltransferase and polysaccharides. *Scand J Dent Res.* 1989 Apr; 97(2):115-9.
- Ruiz-Ruiz JC, Moguel-Ordoñez YB, Segura-Campos MR. Biological activity of *Stevia rebaudiana* Bertoni and their relationship to health. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017 Oct; 57(12):2680-90.
- Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, et al. *Candida*-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal Valencia.* 2011 Mar.; 16(2):139-43.
- Sanchez AY, Oliveira CL, Negrini TC, Hashizume LN, Hara AT, Maltz M, et al. In situ effect of arginine-containing dentifrice on plaque composition and on enamel demineralization under distinct cariogenic conditions. *Caries Res.* 2018 Nov.; 52(6):588-97.

Sapuyes GRV, Vargas SE, Jaimes FOG, Bolaños NC, Scarpetta RAG. Actividad inhibitoria de *Stevia rebaudiana* Bertoni sobre *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus mutans*. Rev Nal de Odo UCC. 2010 Jun.; 6(10):57-64.

Schwendicke F, Frencken JE, Bjørndal L, Maltz M, Manton D, Ricketts D, et al. Managing carious lesions: consensus recommendations on carious tissue removal. Adv Dent Res. 2016 May.; 28(2):58–67.

Silva HF, Martins-Filho PRS, Piva MR. Denture-related oral mucosal lesions among farmers in a semi-arid northeastern region of Brazil. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2011 Sept; 16(6):740-4.

Slavutzky SMB. Stevia and sucrose effect on plaque formation. J Verbr Lebensm. 2010 Feb; 5(2):213-6.

Thylstrup A, Fejerskov O. Tratado de cariologia, Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica Ltda.; 1988.

Welsh J, Dietz W. Sugar-sweetened beverage consumption is associated with weight gain and incidence of type 2 diabetes. Clin Diabetes. 2005 Oct.; 23(4):150-2.

4 CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo sugerem que a utilização de uma infusão de *Stevia rebaudiana* Bertoni em situações de alto desafio cariogênico não teve efeito sobre a modificação da cariogenicidade do biofilme dental, nem a capacidade de inibir a desmineralização do esmalte dentário. Nesse estudo *in situ*, não foi possível observar os efeitos antimicrobianos e anticariogênicos da *Stevia* descritos na literatura, provavelmente, devido ao alto desafio cariogênico realizado.

5 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente estudo foi realizado através de um modelo *in situ*, que depende da colaboração e comprometimento do voluntário em utilizar o aparelho intraoral durante o dia e a noite. O uso do aparelho intraoral pode favorecer o crescimento de certas espécies de microrganismos. Também existe a variabilidade da dieta e da microbiota de cada indivíduo.

Estudos clínicos e com diferentes situações de desafios cariogênicos são necessários para avaliar um possível efeito anticariogênico da *Stevia rebaudiana* Bertoni sobre o biofilme dentário e esmalte dental.

REFERÊNCIAS

- AJAGANNANAVAR, S. L. *et al.* Effect of aqueous and alcoholic Stevia (*Stevia rebaudiana*) extracts against *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus* in comparison to chlorhexidine: an in vitro study. **J Int Soc Prev Community Dent.**, v. 4, n. 2, p. 116–121, Dec. 2014.
- CHATSUDTHIPONG, V.; MUANPRASAT, C. Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. **Pharmacol Ther.**, v. 121, n. 1, p. 41-54, Jan. 2009.
- CONTRERAS, S. Anticariogenic properties and effects on periodontal structures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Narrative review. **J Oral Res.**, v. 2, n. 3, p. 158-166, Oct. 2013.
- CURY, J. A. *et al.* Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. **Caries Res.**, v. 34, n. 6, p. 491-497, Nov./Dec. 2000.
- CURY, J. A.; TENUTA, L. M. A. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? **Braz Oral Res.**, v. 23, n. 1, p. 23–30, May. 2009. Supl. 1.
- CURY, J. A.; TENUTA, L. M. A. How to maintain a cariostatic fluoride concentration in the oral environment. **Adv Dent Res.**, v. 20, n. 1, p. 13–16, Jul. 2008.
- DAS, K.; DANG, R.; GUPTA N. Comparative antimicrobial potential of different extracts of leaves of *Stevia rebaudiana* Bert. **Int J Nat Eng Sci.**, v. 3, n. 1, p. 65–68, 2009.
- DAS, S. *et al.* Evaluation of the cariogenic potential of the intense natural sweeteners stevioside and rebaudioside A. **Caries Res.**, v. 26, n. 5, p. 363-366, Mar. 1992.
- DAWES, C. What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? **J Can Dent Assoc.**, v. 69, n. 11, p. 722-724, Dec. 2003.
- DEBNATH, M. Clonal propagation and antimicrobial activity of an endemic medicinal plant *Stevia rebaudiana*. **J Med Plants Res.**, v. 2, n. 2, p. 45–51, Feb. 2008.
- FEJERSKOV, O.; MANJI, F. Risk assessment in dental caries. *In*: Bader, J. D. Risk assessment in dentistry. Chapel Hill: University of North Carolina Dental College, 1990.
- FEJERSKOV, O.; THYLSTRUP, A. Different concepts of dental caries and their implications. *In*: Textbook of clinical cariology. 2nd ed. Copenhagen: Munksgaard, 1994.
- FERRAZZANO, G. F. *et al.* Is stevia rebaudiana Bertoni a non cariogenic sweetener? A review. **Molecules.** v. 21, n. 1, p. 1-12, Dec. 2015.
- GAMBOA, F.; CHAVES, M. Antimicrobial potential of extracts from *Stevia rebaudiana* leaves against bacteria of importance in dental caries. **Acta Odontol Latinoam.**, v. 25, n. 2, p. 171-175, 2012.
- GIACAMAN, R. A. *et al.* Cariogenic potential of commercial sweeteners in an experimental biofilm caries model on enamel. **Arch Oral Biol.**, v. 58, n. 9, p. 1116-1122, Sep. 2013.

- GOODSON, J. *et al.* Effect of a Truvia™ Rebiana on plaque pH. *In: Abstract presented at the International Association for Dental Research General Sessions; Barcelona; p. 14-17, Jul. 2010.*
- GOSH, S.; SUBUDHI, E.; NAYAK, S. Antimicrobial assay of Stevia rebaudiana Bertoni leaf extracts against 10 pathogens. **Int. J. Integrat. Biol.**, v. 2, n. 1, p. 27–31, Jan./Feb. 2008.
- GROSS, L. *et al.* Increased consumption of refined carbohydrates and the epidemic of type 2 diabetes in the United States: an ecologic assessment. **Am J Clin Nutr.**, v. 79, n. 5, p. 774-779, May. 2004.
- GUPTA, P. *et al.* Role of sugar and sugar substitutes in dental caries: a review. **ISRN Dentistry**, v. 2013, n. 519421, Dec. 2013.
- GUPTA, E. *et al.* Nutritional and therapeutic values of Stevia rebaudiana: a review. **J Med Plants Res.**, v. 7, n. 46, p. 3343-3353, Nov. 2013.
- HENZ, S. L. *et al.* Atividade antimicrobiana de Stevia rebaudiana Bertoni e de adoçantes não calóricos sobre bactérias cariogênicas: estudo in vitro. **RFO UPF.**, v. 23, n. 1, p. 37-41, jan./abr. 2018.
- JAYARAMAN, S.; MANOHARAN, M. S.; ILLANCHEZIAN, S. In vitro antimicrobial and antitumor activities of Stevia rebaudiana (Asteraceae) leaf extracts. **Trop J Pharm Res.**, v. 7, n. 4, p. 1143-1149, Dec. 2008.
- JOHANSSON, I.; BIRKHED, D. A dieta e o processo cariogênico. *In: THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. Cariologia clínica.* 2 ed. São Paulo: Santos. 1995.
- KHAN, J. A.; MISHRA, S. K.; VANDANA, K. Screening of antibacterial properties of Stevia rebaudiana. **International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences.**, v. 1, n. 10, p. 1517-1523, 2012.
- KISHTA-DERANI, M. *et al.* The microbial potential os stevia in na in vitro microbial caries model. **Am J Dent.**, v. 29, n. 2, p. 87-92, Apr. 2016.
- LEMUS-MONDACA, R. *et al.* Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: a comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. **Food Chem.**, v. 132, n. 3, p. 1121-1132, Jun. 2012.
- LOHNER, S.; TOEWS, I.; MEERPOHL, J. J. Health outcomes of non-nutritive sweeteners: analysis of the research landscape. **Nutr J.**, v. 16, n. 1, p. 55-75, Sep. 2017.
- MARSH, P. D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? **Microbiology.**, v. 149, n. 2, p. 279-294, Feb. 2003.
- MENAKER, L. **Cáries dentarias: bases biológicas.** 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1984.

- OLIVEIRA, S. S. *et al.* Influência do guaraná, da *Stevia rebaudiana* Bertoni e do esteviosídeo na incidência de cárie em ratos. **Estomatol Cult.**, v. 15, n. 3, p. 16–19, jul./set. 1985.
- PAES LEME, A. F. *et al.* Effects of sucrose on the extracellular matrix of plaque-like biofilm formed in vivo: studied by proteomic analysis. **Caries Res.**, v. 42, n. 6, p. 435-443, Oct. 2008.
- PAES LEME, A. F. *et al.* The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation: new insight. **J Dent Res.**, v. 85, n. 10, p. 878-887, Oct. 2006.
- PINHEIRO, C. E. *et al.* Efeito dos extratos de guaraná e de *Stévia rebaudiana* Bertoni (folhas) e do esteviosídeo, sobre a fermentação e a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis da placa dentária. **Rev Odontol USP.**, v. 1, n. 4, p. 9-13, out./dez. 1987.
- PÓL, J.; HOHNOVÁ, B.; HYÖTYLÄINEN, T. Characterization of *Stevia rebaudiana* by comprehensive two-dimensional liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. **J Chromatogr A.**, v. 1150, n. 1-2, p. 85-92, May. 2007.
- PURI, M.; SHARMA, D.; TIWARI, A. Downstream processing of stevioside and its potential applications. **Biotechnol Adv.**, v. 29, n. 6, p. 781-791, Nov./Dec. 2011.
- RÖLLA, G. Why is sucrose so cariogenic? The role of glucosyltransferase and polysaccharide. **Scand J Dent Res.**, v. 97, n. 2, p. 115-119, Apr. 1989.
- RUIZ-RUIZ, J. C.; MOGUEL-ORDOÑEZ, Y. B.; SEGURA-CAMPOS, M. R. Biological activity of *Stevia rebaudiana* Bertoni and their relationship to health. **Crit Rev Food Sci Nutr.**, v. 57, n. 12, p. 2680-2690, Oct. 2017.
- SAKAMOTO, N. *et al.* Dietary risk factors for inflammatory bowel disease: a multicenter case-control study in japan. **Inflamm Bowel Dis.**, v. 11, n. 2, p. 154-163, Feb. 2005.
- SAPUYES, G. R. V. *et al.* Actividad inhibitoria de *Stevia rebaudiana* Bertoni sobre *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus mutans*. **Rev Nal de Odo UCC.**, v. 6, n. 10, p. 57-64, Jun. 2010.
- SILVA, A. C. B. *et al.* Detection of oral streptococci in dental biofilm from caries-active and caries-free children. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 648–651, Oct./Dec. 2008.
- SIRAJ, E. S.; PUSHPANJALI, P.; MANORANJITHA, B. S. Efficacy of stevioside sweetener on pH of plaque among young adults. **Dent Res J (Isfahan)**, v. 16, n. 2, p. 104–109, Mar./Apr. 2019.
- SLAVUTZKY, S. M. B. *Stevia* and sucrose effect on plaque formation. **J Verbr Lebensm.**, v. 5, n. 2, p. 213-216, Feb. 2010.
- SUWANNAWONG, S. *et al.* Effects of stevia extract on caries-inducing properties of *Streptococcus sobrinus*. In: **Reunião Científica Anual**, 19ª Associação Internacional de Pesquisa Dentária: Divisão do Sudeste Asiático e 13ª Associação do Sudeste Asiático para Educação Dentária. Tailândia. 2004.

THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cariologia Clínica**. 2. ed. São Paulo: Santos. 2001.

TRIRATANA, T. *et al.* Inhibitory effect of xilitol and stevia extract on *Streptococcus sobrinus*. **Caries Res.**; v. 40, p. 340, Jun./Jul. 2006.

VANDANA, K. *et al.* Effectiveness of stevia as a mouthrinse among 12–15-year-old schoolchildren in Nellore district, Andhra Pradesh: a randomized controlled trial. **J Indian Soc Periodontol.**, v. 21, n. 1, p. 37-43, Jan./Feb. 2017.

WELSH, J.; DIETZ, W. Sugar-sweetened beverage consumption is associated with weight gain and incidence of type 2 diabetes. **Clin Diabetes**, v. 23, n. 4, p. 150-152, Oct. 2005.

YADAV, A. K. *et al.* A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. **Can J Plant Sci.**, v. 91, n. 1, p. 1-27, Aug. 2011.