

EFICIENȚA UTILIZĂRII SUBSTANȚELOR FITOCHIMICE ÎN PREVENIREA CARIEI DENTARE ÎN CONDIȚII EXPERIMENTALE

Aurelia SPINEI, conf. univ., dr. hab. șt. med.

Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova

Rezumat.

Studiile preclinice constituie o etapă importantă pentru aprecierea eficienței noilor metode de tratament, control al cariei dentare și de identificare a procedeeleor terapeutice care vor fi utilizate ulterior în studiile clinice. Scopul prezentului studiu a fost modelarea cariei dentare experimentale și evaluarea eficienței substanțelor fitochimice extrase din struguri și frunze de stevie în prevenirea cariilor dentare la animalele de laborator. Studiul a fost efectuat pe un eșantion de 150 de șobolani albi (*Rata albicans*) în conformitate cu standardele etice. Modelul experimental a inclus 3 serii de experiențe, în fiecare lot au fost incluși câte 30 de animale. Impactul modelării experimentale și eficiența măsurilor cariopreventive au fost evaluate prin determinarea ratei cariilor dentare și a indicelui de reducere a cariilor dentare în raport cu lotul de control, numărul de cavități sau zone afectate de carii dentare pentru fiecare animal. Microstructura și morfologia smalțului dentar au fost studiate utilizând metoda de microscopie electronică cu scanare (SEM). Rugozitatea suprafeței eșantioanelor de smalț a fost analizată prin microscopie cu forță atomică (MFA). Ca urmare a aplicării topice a substanțelor fitochimice extrase din struguri și frunze de stevie la animalele de laborator, numărul cavităților carioase a fost semnificativ scăzut și s-a observat o reducere a gradului de rugozitate a smalțului în comparație cu grupul martor. Aceste rezultate justifică implementarea în continuare a acestei metode în condiții clinice.

Cuvinte-cheie: prevenirea cariilor dentare, carii dentare experimentale, smalț dentar, substanțe fitochimice.

Summary. The efficiency of the phytochemicals for use in preventing dental caries in experimental conditions

Preclinical studies are an important stage for assessing the effectiveness of new methods of treatment and control of dental caries. They are also usefull for identifying therapeutic procedures, that will later be used in clinical trials. The aim of the study was modeling experimental dental caries and evaluating the efficiency of the phytochemicals extracted from grapes and stevia leaves in preventing dental caries in a rat model. The study was conducted on a sample of 150 white rats (*Rata Albicans*) in accordance with the ethical standards. The experimental model that included 3 series of experiments, were included in each batch of 30 animals. The impact of the experimental modeling and the efficiency of

preventive measures were evaluated by determining the rate of dental caries and the dental caries reduction index relative to the control group, the number of cavities or areas affected by dental caries for each animal. The microstructure and morphology of enamel were studied by using the method of scanning electron microscopy (SEM). The surface roughness of the enamel samples was analyzed by means of atomic force microscopy (AFM). As a result of the topical application of the phytochemicals extracted from grapes and stevia leaves in laboratory animals, the number of carious cavities was significantly reduced, and there was observed a reduction of the enamel roughness degree in comparison to the control group. These results justify the further implementation of this method in clinical conditions.

Key-words: dental caries prevention, experimental dental caries, dental enamel, phytochemicals.

Резюме. Эффективность использования фитохимических веществ в профилактике кариеса зубов в условиях эксперимента

Доклинические исследования являются важным шагом в оценке эффективности новых методов лечения, борьбы с кариесом зубов и в определении терапевтических процедур, которые будут использоваться в клинических исследованиях. Целью настоящего исследования было моделирование экспериментального кариеса зубов и оценка эффективности фитохимических веществ, экстрагируемых из винограда и листьев стевии, в профилактике кариеса зубов у крыс. Исследование проводилось на выборке из 150 белых крыс (*Rata albicans*) в соответствии с этическими стандартами. Экспериментальная модель включала 3 серии экспериментов, в каждую группу было включено по 30 животных. Влияние экспериментального моделирования и эффективность кариопротективных мер оценивали путем определения прироста кариеса зубов и индекса редукции кариеса зубов по сравнению с контрольной группой, количества полостей или поверхностей, пораженных кариесом зубов для каждого животного. Микроструктуру и морфологию эмали изучали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Шероховатость поверхности образцов эмали анализировали с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ). Вследствие местного применения фитохимических веществ, экстрагируемых из винограда и листьев стевии у лабораторных животных, было отмечено достоверное уменьшение количества кариозных полостей и шероховатости эмали по сравнению с контрольной группой. Полученные результаты обосновывают дальнейшее изучение данного метода профилактики кариеса зубов в клинических условиях.

Ключевые слова: профилактика кариеса зубов, экспериментальный кариес, зубная эмаль, фитохимические вещества.

Introducere

Studiile preclinice constituie o etapă importantă pentru aprecierea eficienței noilor metode de control al cariei dentare care, eventual, ar putea fi utilizate ulterior în studii clinice. Modelarea experimentală a proceselor patologice, inclusiv a cariei dentare este utilizată frecvent în cercetările actuale biomedicale, având avantajul unor explorări la nivel de țesut și structuri subcelulare. Conform viziunii mai multor autori, modelarea experimentală a cariei dentare prin influența celor mai frecvenți factori de risc (numărul mare a bacteriilor acidogene în biofilmul dentar, nerespectarea igienei orale și alimentația bogată în carbohidrați rafinați) creează în condiții de laborator circumstanțe similare evoluției cariei dentare [1, 2, 17, 18, 24]. Luând în considerație că factorul microbial are un rol primordial și esențial în inițierea și evoluția procesului carios, actualitatea cercetării oportunităților de utilizare a produselor naturale bioactive cu efect antimicrobial este indiscutabilă și indubitabilă.

Antocianii sunt cei mai importanți pigmenți ai plantelor vasculare, posedă numeroase proprietăți benefice, inclusiv: antioxidante, imunomodulatoare, anticancerigene, antiinflamatorii, antivirale și antimicrobiene ș.a. [4, 5, 19]. S-a demonstrat că extractul antocianic inhibă sinteza glucanilor insolubili din zaharoză și perturbază producerea de acizi de către

Streptococcus mutans. Mai mult, antocianii determină o scădere a proprietăților hidrofobe ale suprafeței celulare și de agregare a mai multor streptococi: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii* și *Streptococcus sanguinis* [8-10, 14-16].

Steviol glicozidele se conțin în frunze de Stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*), sunt utilizați tot mai frecvent și devin o alternativă eficientă a îndulcitorilor artificiali (care în cazul utilizării excesive pot fi nocivi pentru organismul uman). Studiile clinice efectuate au arătat că, spre deosebire de îndulcitorii artificiali, steviol glicozidele se pot utiliza cu succes la pacienții cu diabet zaharat și la cei cu fenilketonurie. S-a demonstrat că steviosidele, rebaudiosidele A, steviolul și isosteviolul prezintă și beneficii terapeutice, ele fiind caracterizate de acțiuni antihiperglicemice, antihipertensive, antiinflamatoare, antitumorale, și imunomodulatoare [3]. Extractul de stevie și compușii săi polifenolici, steviosidele și rebaudiosidele A, sunt necariogene. Steviosidele reduc rata de formare a biofilmului dentar, producerea de acizi de *Streptococcus mutans* și *Lactobacilli* [3, 6, 7].

Astfel, analiza datelor literaturii relevă că atât extractul de stevie, cât și antociani conțin polifenoli care exercită un efect antibacterian, provocând diminuarea ratei de formare și creșterea a biofilmului dentar și pro-

ducerii de acizi de *Streptococcus mutans* și *Lactobacilli*, reducerea aderenței celulelor bacteriene la suprafața dintelui, inhibarea glucoziltransferazei (GTF) și amilazei. Substanțele fitochimice extrase din struguri și frunze de stevie, pe lângă utilizarea în industria alimentară în calitate de pigment alimentar și îndulcitor, ar putea fi incluse și în componența formulelor pentru controlul cariilor dentare. Cu toate acestea, doar un număr limitat de compuși din produsele naturale sunt disponibili pentru utilizare clinică, preponderent din cauza lipsei datelor concludente despre efectul cariopreventiv al acestora și fezabilității economice a producerii lor [21-23]. În prezenta lucrare ne-am propus să studiem în condiții experimentale oportunitățile de aplicare clinică a extractelor de antociani și stevie în prevenirea cariei dentare.

Obiectivul lucrării: evaluarea eficienței utilizării substanțelor fitochimice extrase din struguri și frunze de stevie în prevenirea cariei dentare în condiții experimentale.

Materiale și metode

În conformitate cu obiectivele de cercetare propuse, studiul a fost efectuat pe un eșantion de 150 de șobolani albi (*Rata albicans*). A fost elaborat modelul experimental care a inclus 3 serii de experiențe (Tabelul 1). În fiecare lot au fost incluși câte 30 de șobolani, ceea ce constituie numărul minim necesar pentru a realiza obiectivele trasate și a obține rezultate statistice semnificative.

În prima serie de experiențe la animalele din lotul 2 s-a modelat caria dentară prin administrarea zilnică a unui rațion alimentar special care conține 54% glucide rafinate [18]. Pentru a majora efectul cariogen, șobolanii au primit sol. zaharoză de 10% *ad libitum* [24]. În decursul primelor trei zile consecutive, animalele au fost infectate pe cale orală cu suspensie care conține *Streptococcus mutans* după metoda descrisă de Muller, K. P. și coaut., 2007 [17]. Dieta cariogenă a fost administrată în loturile 2 - 5 pe parcursul între-

gului experiment. Animalele din toate loturile experimentale, cu excepția Lotului 1 au fost deprivat pe toată perioada studiului de alimentele care favorizează autocurățirea dinților (boabe de grâu, fructe și legume) și suplimentele administrate în cadrul vivariului pentru prevenirea cariei dentare. În seriile II și III de experiențe a fost modelată caria dentară și testată eficiența aplicării topice a substanțelor fitochimice extrase din struguri și frunze de stevie în prevenirea cariei dentare. La șobolanii din Lotul 3 săptămânal a fost aplicat topic prin tamponament ușor 0,5 ml de extract antocianic 5,0% obținut din produse vinicole din biomasa reziduală [21-23], iar la animalele din Lotul 4 – 0,5 ml extract de stevie 1,0% (II serie de experiențe). În seria III de experiențe, la animalele din Lotul 5 săptămânal a fost aplicat topic prin tamponament ușor 0,5 ml amestec din extract antocianic 5,0% și extract de stevie 1,0% în proporție de 1:1.

Experimentele au fost conduse în conformitate cu recomandările Comitetului de Etică a Cercetării USMF „Nicolae Testemițanu”, fiind respectate „principiul celor 3R” (*replacement, reduction and refinement*) care exprimă preocupările cercetătorilor din toată lumea privind standardizarea experiențelor pe animale [13]. Pe întreaga durată a studiului animalele au fost întreținute în vivariul USMF „Nicolae Testemițanu”. Spațiile vivariului permit separarea activităților: întreținerea, carantina și realizarea procedurilor experimentale. Animalele au fost întreținute în condiții standard, hrana (cu excepția celor enumerate mai sus) și apa au fost accesibile *ad libitum*.

Impactul modelării cariei dentare și eficiența preventivă a utilizării topice a substanțelor fitochimice extrase din struguri și frunze de stevie au fost evaluate prin estimarea indicelui de frecvență a cariei dentare (IF), numărului cavitațiilor și suprafețelor afectate de carie per animal și determinarea rugozității de suprafață a smalțului dentar. S-a estimat indicele de reducere (IR) a cariei dentare în loturile de cercetare (Loturile 3-5) în raport cu martorul (Lotul 2). Pentru

Tabelul 1.

Metodologia efectuării serilor de experiențe pe animale de laborator

Seria experienței	Lotul	Modelarea cariei dentare	Metodologia efectuării experiențelor
	Lotul 1	-	Lotul non-experimental: rația alimentară standard a vivariului
I	Lotul 2	+	Lotul de control: administrarea dietei cariogene și infectarea cu tulpine cariogene – zilnic
II	Lotul 3	+	Lot experimental: aplicarea topică a 0,5 ml extract antocianic 5,0% – 1/săptămână
	Lotul 4	+	Lot experimental: aplicarea topică a 0,5 ml extract de stevie 1,0% – 1/săptămână
III	Lotul 5	+	Lot experimental: aplicarea topică a 0,5 ml amestec din extract antocianic 5,0% și extract de stevie 1,0% – 1/săptămână

Tabelul 2.

Gradul de afectare prin caria dentară și rugozitatea smalțului dentar a animalelor de laborator în rezultatul modelării cariei dentare și aplicării topice a substanțelor fitochimice extrase din struguri și frunze de stevie

Loturile de studiu	Frecvența cariei dentare P±ES%	Nr cavități carioase / animal, M±ES	Nr suprafețe cariate/ animal, M±ES	Rugozitatea (μm), M±ES
L ₁	3,33±3,28	0,03±0,033	0,03±0,033	1,17±0,084
L ₂	93,33±4,55***	4,10±0,366***	5,2±0,530***	6,47±0,481***
L ₃	83,33±6,80****	2,53±0,317****	3,47±0,469***	3,43±0,446****
L ₄	86,67±6,21****	2,07±0,235****	2,67±0,363****	3,03±0,360****
L ₅	76,67±7,72****	1,97±0,262****	2,51±0,361****	2,66±0,317****

Notă:

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul de control, L₀: *p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Veridicitatea diferențelor comparativ cu lotul martor, L₁: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

studiul microstructurii și morfologiei smalțului molarilor animalelor de laborator, au fost folosite metodele de microscopie electronică cu scanare (SEM) cu utilizarea echipamentului VEGA TESCAN TS 5130 MM. Pentru evaluarea demineralizării smalțului s-a analizat rugozitatea de suprafață a probelor de smalț, efectuând scanarea tridimensională prin metoda de microscopie cu forțe atomice (MFA), rezultatele fiind exprimate ca valoare a rugozității pătratice. Cercetările SEM și MFA au fost efectuate în baza Centrului Național de Cercetare și Testare a Materialelor a Universității Tehnice a Moldovei. Studiul a fost aprobat de Comitetul de Etică a cercetării a USMF „Nicolae Testemițanu” (aviz pozitiv din 14. 11. 2011). Analiza datelor a fost realizată utilizând funcțiile și modulele software Epi Info și MS EXCEL (Microsoft, USA).

Rezultate

În *tabelul 2* sunt prezentate rezultatele studiului experimental. După 60 de zile de observație la 96,67±3,28% din șobolanii din Lotul 1 (non-experimental) nu s-au depistat cavități carioase sau zone de demineralizare a smalțului dentar. În urma modelării cariei dentare prin administrarea dietei cariogene și infectarea cavității orale cu suspensia care conține cultură de tulpini cariogene, după 60 de zile, la majoritatea animalelor s-au depistat zone de smalț dentar demineralizat sau cavități carioase. Astfel, frecvența cariei dentare la animalele din Lotul 2 a constituit 93,33±4,55% spre deosebire de depistarea a unei singure cavități (IF=3,33±3,28%) la unul din șobolanii din Lotul 1.

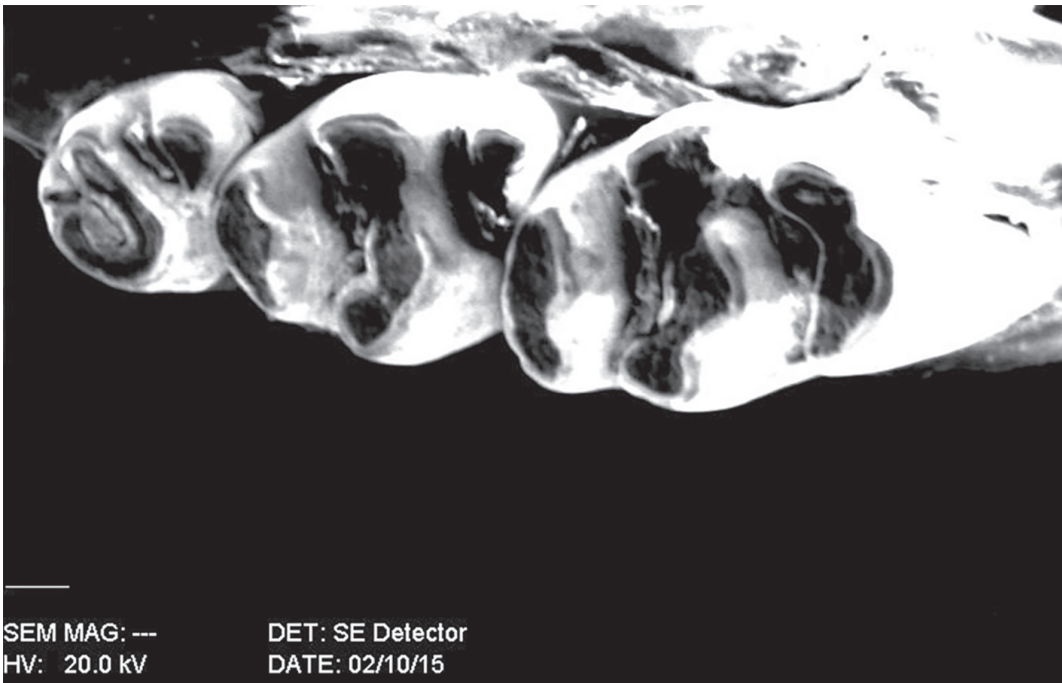


Figura 1. Imagine SEM a suprafețelor masticatorii a molarilor intacti

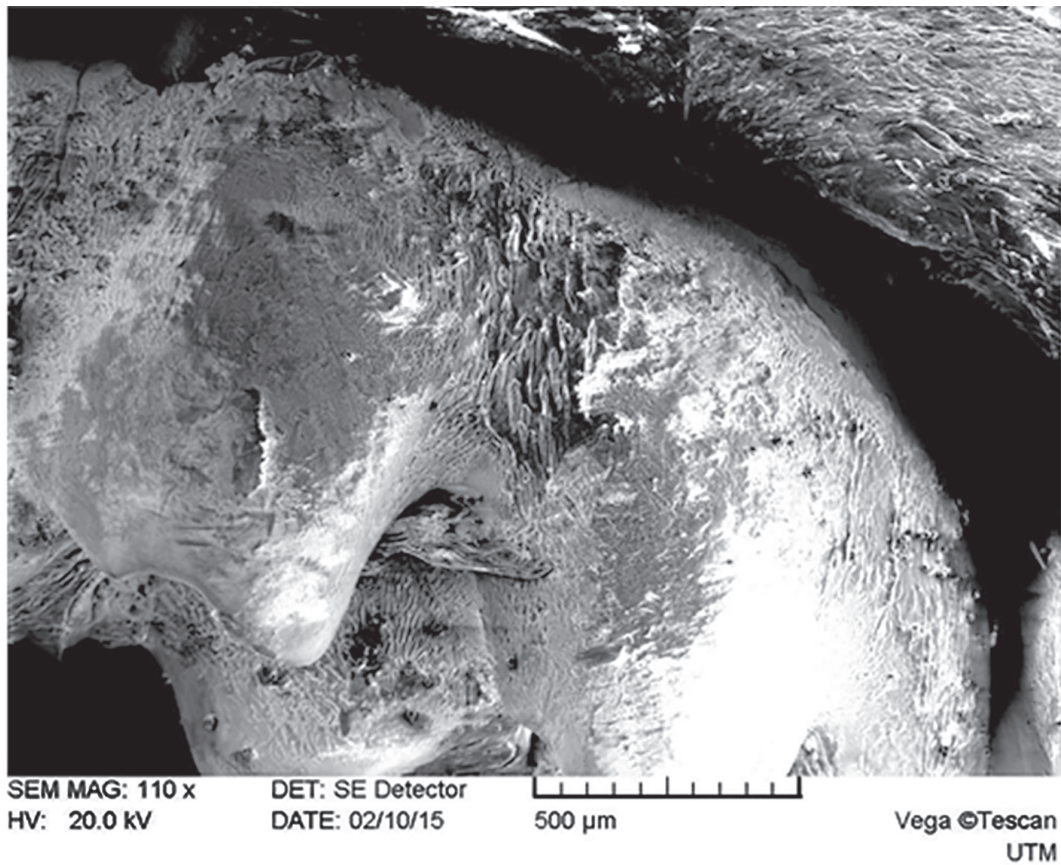


Figura 2. Imagine SEM. Zona de demineralizare a smalului unui molar



Figura 3. Imagine SEM. Afectarea prin carie a suprafețelor masticatorii și proximale ale molarilor

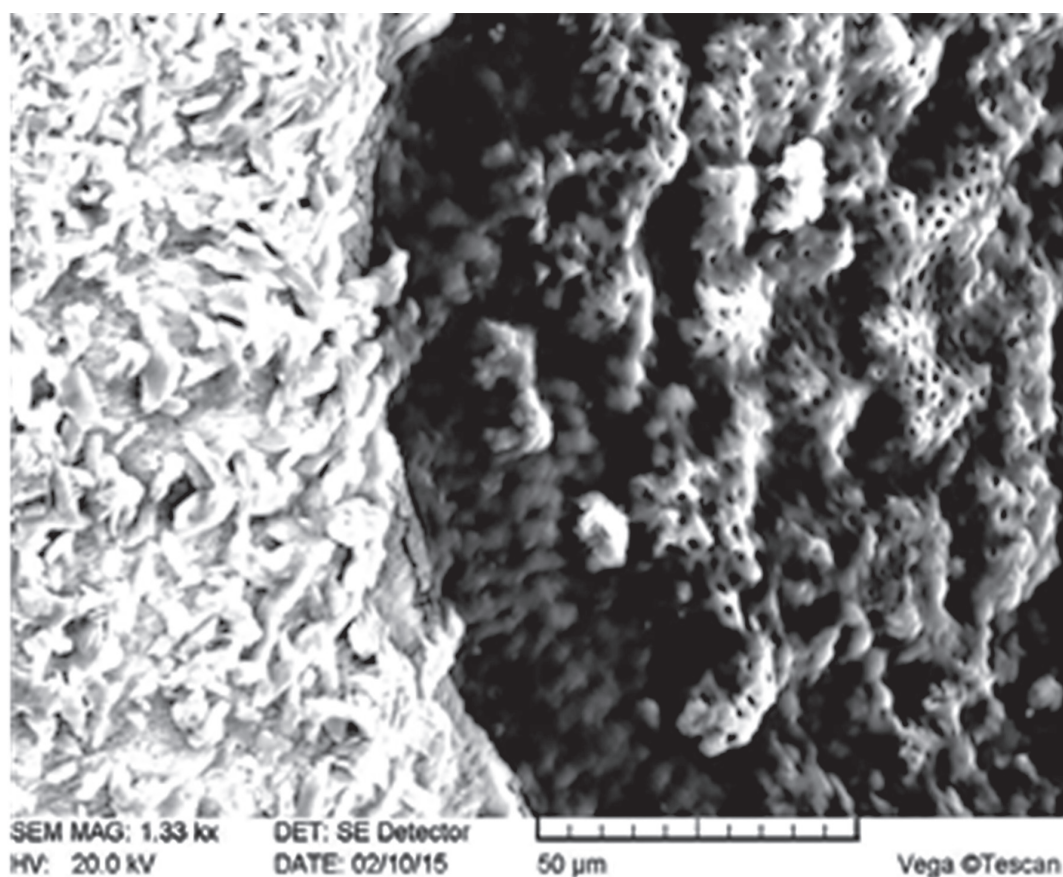


Figura 4. Imagine SEM. Leziune carioasă a unui molar

Suprafața smalțului dentar la animalele din Lotul 1 corespunde normei (*Figura 1*), la cercetarea electronoaptică fiind depistat un relief granulos slab evidențiat. Pe unele sectoare se determină microcratere, microprotuberanțe, microfisuri, cristale de formă și dimensiuni diferite. În unele cazuri, s-au observat

microcratere și protuberanțe izolate sau grupate, care corespund capetelor prismelor de smalț.

În probele de smalț prelevate de la animalele din Lotul 2 s-au depistat multiple zone de smalț demineralizare, care au un relief neregulat, caracterizat de prezența în abundență a microporilor și dezorga-

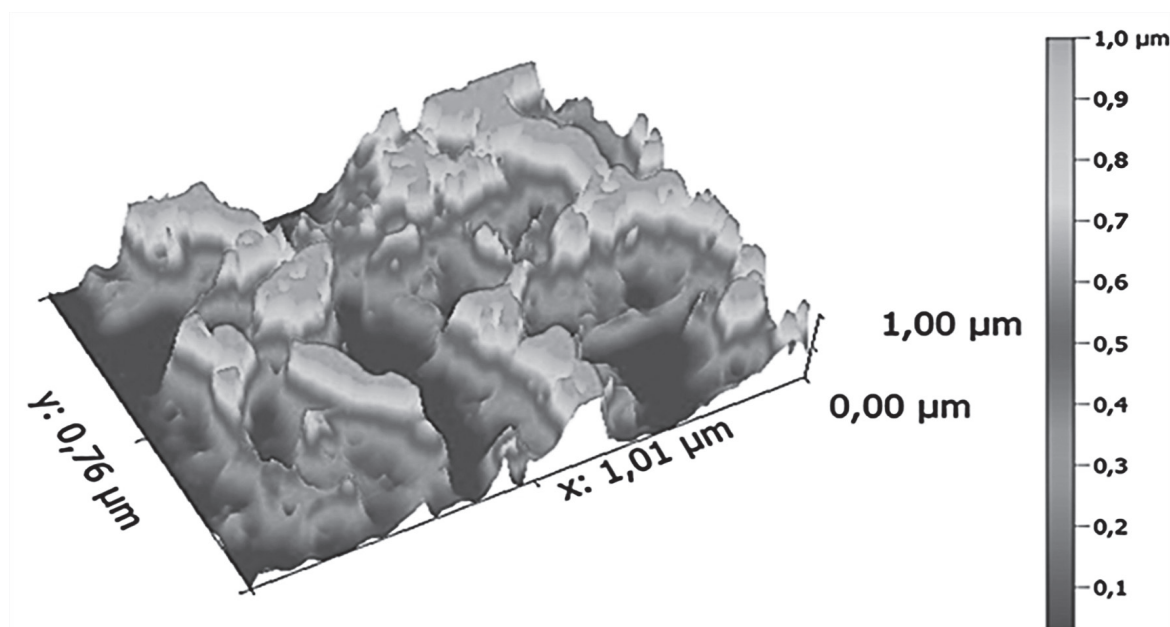


Figura 5. Imagine MFA. Zona de demineralizare a smalțului unui molar

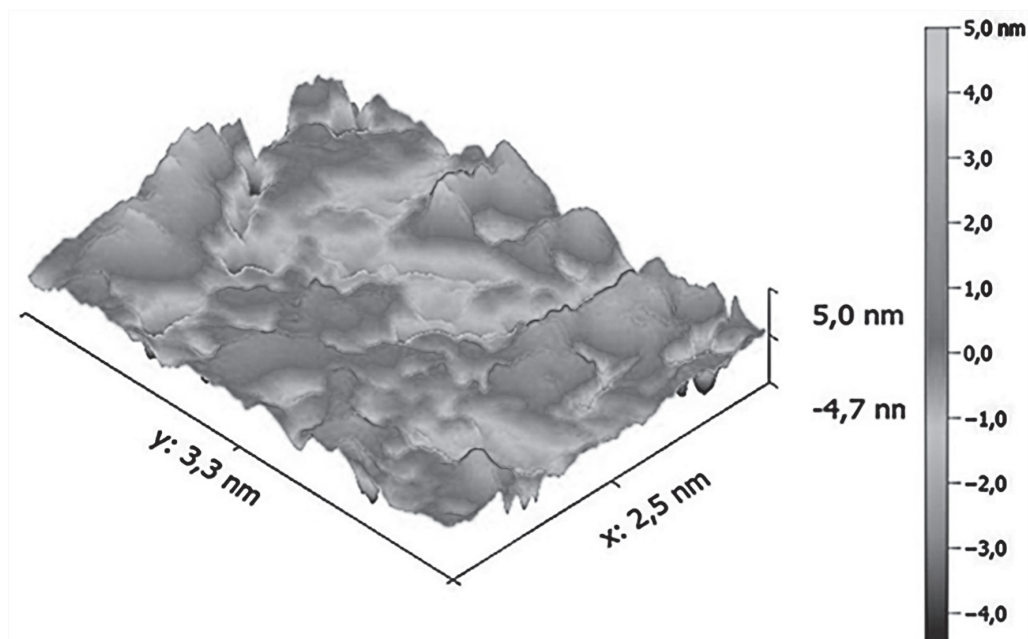


Figura 6. Imagine MFA. Carie incipientă a unui molar

nizarea cristalelor de hidroxiapatită (Figura 2), pe unele electronograme se observă creșterea numărului de cratere, fapt care ilustrează majorarea porozității smalțului (Figurile 3, 4). La scanarea tridimensională a probelor de smalț s-a constatat creșterea semnificativă a rugozității de suprafață (Figurile 5, 6). Astfel, de la o medie a valorilor rugozității de $1,17 \pm 0,084 \mu\text{m}$ în Lotul 1, în Lotul 2 acestea au crescut la $6,47 \pm 0,481 \mu\text{m}$ ($p < 0,001$).

Modelarea experimentală a cariei dentare a avut un impact cariogen semnificativ, numărul de cavități carioase per animal în Lotul 2 fiind de $4,10 \pm 0,366$,

$p < 0,001$, iar numărul de suprafețe cariate/animal – $5,2 \pm 0,530$, $p < 0,001$, spre deosebire de Lotul 1 (Tabelul 2). Conform opiniei mai multor autori modelarea cariei dentare a avut un impact cariogen suficient în cazul când frecvența cariei dentare în lotul de animale depășește 80%-85% [17, 24]. Astfel, gradul înalt de afectare prin carie dentară estimat la animalele din Lotul 2 (IF=93,33±4,55%) este echivalat cu riscul carios extrem și suficient pentru a compara eficiența metodelor cariopreventive studiate în seriile experimentale ulterioare.

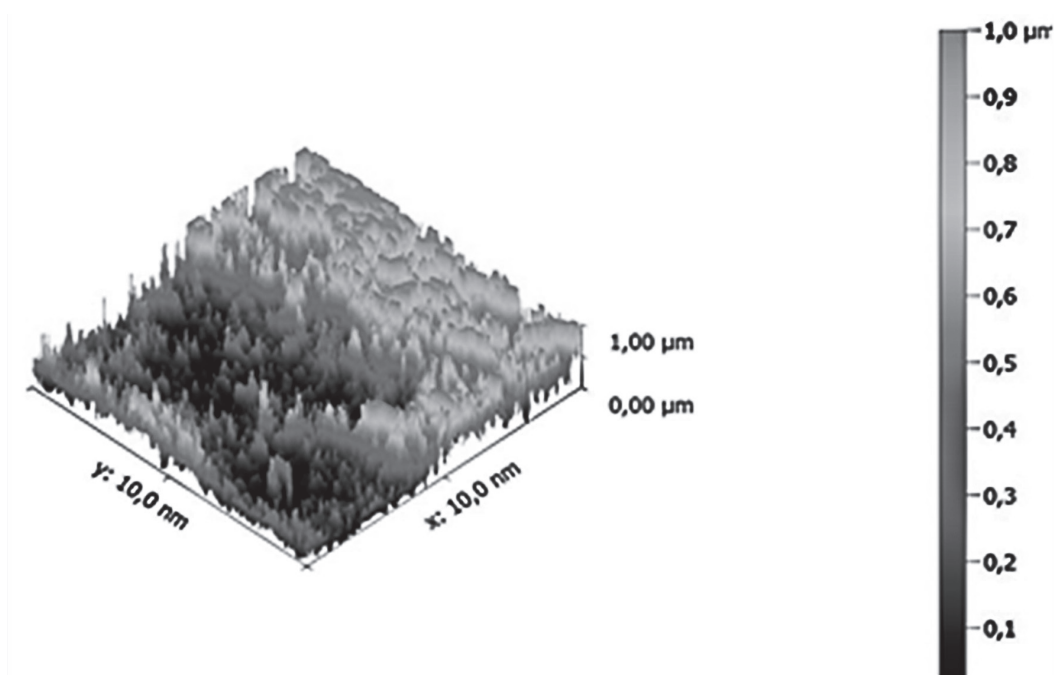


Figura 7. Imagine MFA. Suprafața smalțului dentar a unui molar intact

În seria II de experiențe, la toate animalele a fost modelată caria dentară prin metoda expusă anterior și a fost evaluată eficiența cariopreventivă a substanțelor fitochimice extrase din struguri și frunze de stevie aplicate topic. În Lotul 3 de animale, după 60 de zile de observație, frecvența cariei dentare a constituit $83,33 \pm 6,80\%$. În rezultatul aplicării topice a extractului antocianic 5,0% obținut din produse vinicole din biomasa reziduală, numărul cavităților carioase s-a redus semnificativ, de 1,62 ori ($p < 0,01$) în raport cu Lotul 2. Frecvența cariei dentare la animalele din Lotul 4 a fost de $86,67 \pm 6,21\%$. În urma aplicării topice a extractului de stevie 1,0% numărul cavităților carioase s-a redus semnificativ, de 1,98 ori ($p < 0,001$) în raport cu Lotul 2. La cercetarea electronoptică SEM și prin scanarea tridimensională MFA, nu s-au depistat modificări specifice a suprafeței smalțului dentar în urma aplicării topice a extractului antocianic și stevie.

În seria III de experiențe, aplicarea topică, o dată în săptămână, a amestecului din extract antocianic 5,0% și stevie 1,0% la animalele din Lotul 5 a avut un efect cariopreventiv superior, comparativ cu rezultatele obținute în seria II de experiențe. După 60 de zile frecvența cariei a fost de $76,67 \pm 7,72\%$, numărul cavităților carioase a fost redusă semnificativ, de 2,08 ($p < 0,001$) în raport cu Lotul 2. Scanarea tridimensională a probelor de smalț (Figura 7) a evidențiat reducerea semnificativă a rugozității de suprafață, de 2,43 ori ($p < 0,001$) comparativ cu Lotul 2.

Eficiența cariopreventivă a aplicării topice a substanțelor fitochimice extrase din struguri și frunze de stevie la animalele de laborator în seriile experimentale II și III a fost evaluată prin estimarea indicelui de reducere (IR) a cariei dentare în raport cu lotul martor (Lotul 2). Astfel, un efect cariopreventiv suficient, a fost estimat în loturile experimentale Lotul 3 și Lotul 4. IR fiind de 38,29% și 49,52%. Un efect cariopreventiv semnificativ s-a depistat la animalele din Lotul 5, în urma aplicării topice a amestecului din extract antocianic 5,0% și stevie 1,0% indicele de reducere a cariei dentare în raport cu lotul martor fiind de 51,95%.

Discuții

Conform opiniei unui număr mare de autori, caria dentară este o boală infecțioasă, guvernată de o complexitate de factori etiologici, la originea procesului carios fiind interacțiunea a trei factori, după Krichevsky și Keyes, 1969: susceptibilitatea dintelui (terenul) și mediul bucal; biofilmul cavității orale și substratul alimentar fermentabil. Carbohidrații, în principal mono- și dizaharidele, sunt absorbiți în placa dentară și scindați în acizi organici de către microorganisme.

Câteva specii de streptococi orali prezente în biofilm sunt capabile să inițieze formarea plăcii dentare, care joacă un rol decisiv în dezvoltarea cariei dentare. Cei mai importanți factori etiologici sunt considerați a fi doi streptococi α -hemolitici, *Streptococcus mutans* și *Streptococcus sobrinus*, care sunt agenți cariogeni puternici, deși, de asemenea, în inițierea procesului carios pot fi implicate și alte tipuri de bacterii (în special lactobacili și Actinomyces) [1, 2, 7, 14, 17, 18, 21].

Este cunoscut faptul că biofilmul dentar este o comunitate complexă de bacterii, compoziția căreia este condiționată de un șir de factori cum ar fi aderarea celulară, agregarea, creșterea și supraviețuirea în mediu înconjurător [12, 17]. *Streptococcus mutans* produce trei tipuri de glucoziltransferaze: A, C și D (GTFB, GTFC și GTFD), care polimerizează fragmentul glucozil din sucroză și amidon în glucani $\alpha 1,3$ - și $\alpha 1,6$ - [7-10, 15, 16]. Aderarea bacteriilor la suprafețele dinților, adeziunea inter-bacteriană și acumularea biofilmelor sunt asigurate de glucanii extracelulari adezivi, legarea glucanilor de proteinele (GbpA, -B, -C și -D) și de GTF [4, 5, 18, 19]. Astfel, glucoziltransferazele, împreună cu glucanii extracelulari adezivi, constituie pentru *Streptococcus mutans* mijlocul (dependent de zaharoză) de aderare la suprafața dinților și sunt de o importanță centrală în constituirea biofilmelor cariogene [17, 19, 24], în care acumularea de acizi duce la decalcifierea localizată a suprafeței smalțului. Substraturile carbohidraților pot deveni disponibile, fie direct (glucide ingerate din alimente sau băuturi), sau pot fi derivate din amidonul alimentar prin acțiunea amilazei bacteriene sau salivare, sau prin ambele căi. În multe studii s-a dovedit că polifenolii atât la animale, cât și la oameni influențează în mod specific fiecare dintre procesele descrise mai sus [2, 7, 12, 13, 20].

În condiții *in vitro* s-a demonstrat că extractele polifenolice au inhibat glucoziltransferaza (GTF) produsă de *Streptococcus mutans*. Extractele de flavonoli și proantocianidinele, utilizate separat sau în combinație, au inhibat GTF adsorbită de suprafață și activitatea F-ATP-azei, precum și producerea de acid de *Streptococcus mutans* [10]. Flavonolii și proantocianidinele, au inhibat moderat activitatea GTF adsorbită de suprafață și au perturbat producția de acid de către celulele *Streptococcus mutans* fără a le distruge. Combinația din trei flavonoide – quercetin-3-arabinofuranozid, miricetină și procianidină au manifestat efecte biologice accentuate asupra tulpinilor de *Streptococcus mutans*, sugerând că activitatea bactericidă ar putea fi rezultatul unor efecte sinergice ale flavonoidelor [14-16, 18-20]. Unele studii au con-

firmat că polifenolii exercită un efect de reducere a proprietăților hidrofobe, de formare a biofilmelor și de multiplicare a *Streptococcus mutans* [24].

Compușii polifenolici inhibă sinteza glucanilor insolubili din zaharoză de GTFază produsă de *Streptococcus mutans* MT8148R și *Streptococcus sobrinus* 6715. Mai mult, acești compuși au determinat o scădere a proprietăților hidrofobe ale suprafeței celulare și de agregare a mai multor streptococi: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis* și *Streptococcus gordonii* [10]. Catechina și epicatechina s-au dovedit a fi inhibitori puternici ai sintezei glucanilor aderenți insolubili în apă din zaharoza catalizată de glucoziltransferază, enantiomerii lor au fost moderat activi, iar esterii acidului galic (epicatechina, epigallocatechina și galocatechina) au exercitat activități sporite de inhibare a sintezei glucanilor insolubili [12, 16].

O varietate mare de compuși polifenolici, capabili să controleze cariile dentare, au fost studiați minuțios, cu toate acestea doar un număr limitat de compuși din produsele naturale ar fi disponibili pentru aplicațiile clinice, preponderent din cauza stabilității limitate, mirosului, gustului neplăcut și a fezabilității economice limitate [21]. Din această cauză, până în prezent, nici unul dintre compușii polifenolici nu a fost inclus în formula apelor de gură sau a pastelor de dinți. Un compus polifenolic eligibil ar trebui să combine retenția la nivelul biofilmului dentar cu activitatea antibacteriană, asigurând astfel un efect anticariogen prelungit.

În prezentul studiu a fost modelată caria dentară experimentală și evaluată eficiența utilizării în prevenirea cariei dentare a substanțelor fitochimice extrase din struguri și frunze de stevie, care conțin compușii polifenolici. Ca urmare a aplicării topice a extractului antocianic, de stevie și amestecului din extractele de antociani și stevie la animalele de laborator s-a redus semnificativ gradul de afectare prin carie dentară și rugozitatea smalțului dentar în raport cu lotul martor, fiind depistate, totodată, și diferențe semnificative a indicatorilor menționați în raport lotul non-experimental.

Eficiența cariopreventivă a aplicării topice a extractelor de antociani și stevie la animalele de laborator a fost evaluată prin estimarea indicelui de reducere (IR) a cariei dentare în raport cu lotul martor (Lotul 2), care a constituit 38,29% în Lotul 3 și 49,52%, în Lotul 4, fapt care indică un efect cariopreventiv suficient. Totodată, utilizarea amestecului din extractele de antociani și stevie a avut un efect superior, IR fiind de 51,95%. Presupunem că acest rezultat se datorează unor efecte antibacteriene sinergice asupra microorganismelor cariogene exercitate de diferite tipuri de

polifenoli care se conțin în extractele de antociani și stevie.

În ultimii ani, un interes deosebit pentru cercetători prezintă substanțele fitochimice bioactive, non-toxice și nonpoluante, fiind totodată o sursă ieftină de polifenoli, cu efecte benefice polivalente, care ar putea reprezenta o sursă nouă de substanțe antimicrobiene eficiente de control al biofilmului dentar. Astfel, substanțele fitochimice extrase din produsele vinicole și frunze de stevie ar putea fi utilizați la un cost rezonabil pentru prepararea remediilor de igienizare a cavității orale, la elaborarea unor metode și remedii cariopreventive eficiente, care ar reduce capacitatea cariogenă a biofilmului dentar și nu ar produce efecte adverse, reducând astfel prevalența și incidența principalelor afecțiuni stomatologice. Prin urmare, sunt necesare studii suplimentare în vederea cercetării oportunităților de creștere a eficienței măsurilor preventive care să asigure un efect carioprotector maxim.

Concluzii

Utilizarea prin aplicații topice a extractulelor de antociani și stevie cu efecte benefice polivalente reprezintă un pas important în reducerea factorilor de risc și a controlului cariilor dentare. Totodată, sunt necesare studii suplimentare în vederea cercetării oportunităților de creștere a eficienței măsurilor preventive care să asigure un efect carioprotector superior în condiții clinice.

Bibliografie

1. Baptista A., Kato I. Prates R., Suzuki L., Raele M., Freitas A., Ribeiro M. *Antimicrobial photodynamic therapy as a strategy to arrest enamel demineralization: a short-term study on incipient caries in a rat model*. Photochemistry and Photobiology. 2012; 88: 584–589.
2. Bowen W., Lawrence R. *Comparison of the cariogenicity of cola, honey, cow milk, human milk, and sucrose*. Pediatrics. 2005; 116: 921–926.
3. Bulearca A.M., Badea F.I., Romului I.S. *Stevia – zaharul verde sau zaharul sănătos, îndulcitor natural noncaloric utilizat în nutriția umană*. Laboratoarele Remedia. 2014; 06(16). <https://laboratoareleremedia.ro/2014/06/16/stevia-zaharul-verde-sau-zaharul-sanatos-indulcitor-natural-noncaloric-utilizat-in-nutritia-umana/>
4. Chanoca A., Kovinich N., Burkel B., et al. *Anthocyanin Vacuolar Inclusions Form by a Microautophagy Mechanism*. The Plant Cell. 2015; 27(9): 2545–2559.
5. Durga M., Nathiya S., Devasena T. *Immunomodulatory and antioxidant actions of dietary flavonoids*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2014; 6: 50–56.
6. Ferrazzano G.F., Cantile T., Alcidi B., Coda M., Ingenito A., Zarrelli A., Fabio G., Pollio A. *Is Stevia rebaudiana Bertoni a Non Cariogenic*

- Sweetener? *Molecules*. 2016; 21: 38. doi:10.3390/molecules21010038 www.mdpi.com/journal/molecules
7. Ferrazzano, G.F.; Cantile, T.; Roberto, L.; Ingenito, A.; Catania, M.R.; Roscetto, E.; Palumbo, G.; Zarrelli, A.; Pollio, A. *Determination of the in vitro and in vivo antimicrobial activity on salivary Streptococci and Lactobacilli and chemical characterisation of the phenolic content of a Plantago lanceolata infusion*. *Biomed. Res. Int.* 2015; 286817. doi: 10.1155/2015/286817.
 8. Furiga A., Roques C., Badet C. *Preventive effects of an original combination of grape seed polyphenols with amine fluoride on dental biofilm formation and oxidative damage by oral bacteria*. *J. Appl. Microbiol.* 2014; 116: 761–771.
 9. Hannig C., Sorg J., Spitzmüller B., Hannig M., Al-Ahmad A. *Polyphenolic beverages reduce initial bacterial adherence to enamel in situ*. *J. Dent.* 2009; 37: 560–566.
 10. Hrynash H., Pilly V., Mankovskaia A., et al. *Anthocyanin Incorporated Dental Copolymer: Bacterial Growth Inhibition, Mechanical Properties, and Compound Release Rates and Stability by ¹H NMR*. *International Journal of Dentistry*. 2014: 289401. doi:10.1155/2014/289401.
 11. JECFA: Steviol glycosides. *Combined Compendium of Food Additive Specifications, 68th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, FAO/JECFA Monograph. 2007; 4: 61–64 (<http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/monograph4/additive-442-m4.pdf>).
 12. Jeon, J.G.; Rosalen, P.L.; Falsetta, M.L.; Koo, H. *Natural products in caries research: Current (limited) knowledge, challenges and future perspective*. *Caries Res.* 201; 45: 243–263.
 13. Johnson P., Besselsen D. *Practical aspects of experimental design in animal research*. *ILAR Journal*. 2002; 43: 202–206.
 14. Karygianni L., Al-Ahmad A., Argyropoulou A., Hellwig, E., Anderson A., Skaltsounis A. *Natural antimicrobials and oral microorganisms: a systematic review on herbal interventions for the eradication of multispecies oral biofilms*. *Frontiers in Microbiology*. 2015; 6: 1529. doi:10.3389/fmicb.2015.0152.
 15. Kim D., Hwang G., Liu Y., et al. *Cranberry Flavonoids Modulate Cariogenic Properties of Mixed-Species Biofilm through Exopolysaccharides-Matrix Disruption*. *PLoS ONE*. 2015; 10(12): e0145844. doi:10.1371/journal.pone.0145844.
 16. Koo H., Duarte S., Murata RM, Scott-Anne K., Gregoire S., Watson G., Singh A., Vorsa N. *Influence of cranberry proanthocyanidins on formation of biofilms by Streptococcus mutans on saliva-coated apatitic surface and on dental caries development in vivo*. *Caries Research*. 2010; 44: 116–126.
 17. Muller K., Rodrigues C.R., Nunez S.C, Rocha R., Jorge A.O., Ribeiro M.S. *Effects of low power red laser on induced-dental caries in rats*. *Arch. Oral Biol.* 2007; 52: 648–654.
 18. Nakahara Y., Sano T., Kodama Y., Ozaki K., Matsuura T. *The effect of food hardness on the development of dental caries in alloxan-induced diabetic rats*. *Journal of Diabetes Research*. 2013; 787084. doi:10.1155/2013/787084.
 19. Rinaldo A., Cavallini E., Jia Y., et al. *A Grapevine Anthocyanin Acyltransferase, Transcriptionally Regulated by VvMYBA, Can Produce Most Acylated Anthocyanins Present in Grape Skins*. *Plant Physiology*. 2015; 169 (3): 1897–1916. doi:10.1104/pp.15.01255.
 20. Sheiham, A.; James, W.P.T. *A reappraisal of the quantitative relationship between sugar intake and dental caries: The need for new criteria for developing goals for sugar intake*. *BMC Public Health*. 2014; 14: 863.
 21. Spinei A. *Eficiența metodelor exogene de prevenire a cariei dentare la animalele de laborator*. În: *Medicina Stomatologică*. Chișinău. 2016; 4 (41): 7–16.
 22. Sturza A., Deseatnicova O. *Optimization of the extract of polyphenols from grape seeds*. *J. of Food and Environment Safety of the Suceava University, Food Engineering*. 2010; 3: 59–65.
 23. Sturza A. *Sweet products with grape anthocyanins extracts use as a natural food colorant*. *Journal of Food and Packaging Science, Technique and Technologies*. 2012; 1: 37–41.
 24. Thurnheer T., Giertsen E., Gmu R., Guggenheim B. *Cariogenicity of soluble starch in oral in vitro biofilm and experimental rat caries studies: a comparison*. *Journal of Applied Microbiology*. 2008; 105: 829–836.