

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „IULIU
HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA**

Rezumatul tezei de doctorat

**Cercetări privind efectele remediilor naturale în
terapia afecțiunilor parodonțiului marginal**

**Conducător științific: Prof. Dr Angela Pop
Doctorand: Carola Pentelescu**

Cluj-Napoca 2012

CUPRINS

ABREVIERI	13
INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	17
1. Biofilmele orale și cercetarea acestora	19
1.1 Noțiunea de biofilm	19
1.2 Compoziția și structura biofilmelor	19
1.2.1 Matricea intercelulară	19
1.2.2 Componenta bacteriană a biofilmelor orale	20
1.2.3 Dinamica plăcii dentare	20
1.3 Metode și tehnici de evaluare a biofilmelor orale in vitro și in vivo	22
1.3.1 Tehnica cristal violet	23
1.3.2 Biofilm Ring Test®	23
2. Apele de gură ca mijloc complementar de igienă orală	24
2.1 Metode de îndepărtare a plăcii orale	24
2.2 Compușii chimici activi din apele de gură	26
3. Actualități privind implicațiile remediilor natural în terapia afecțiunilor parodontiului marginal	27
3.1 Agenții fitoterapici. Definiție și generalități	27
3.2 Principalele plante utilizate în tratamentul afecțiunilor parodontiului marginal și compușii fitochimici bioactivi ai acestora	28
3.2.1 Mușețelul	28
3.2.2 Gălbenelele	29
3.2.3 Salvia	29
3.2.4 Smirna	29
3.2.5 Menta	29
3.2.6 Cimbrul	30
3.2.7 Uleiul de arbore de ceai	30
3.2.8 Echinacea	31
3.2.9 Ceaiul verde	31
3.3 Compuși fitochimici bioactivi din plante	31
3.3.1 Compuși polifenolici de origine vegetală și efectele acestora pe bacteriile orale	31
4. Cătina o plantă complexă	34
4.1 Generalități și compoziția chimică	34
4.1.1 Compoziția chimică a fructelor de cătină	34
4.2 Domenii de utilizare a cătinii	36
4.2.1 Protecția mediului și prevenirea eroziunii solului	36
4.2.1 Industria alimentară	36
4.2.3 Industria cosmetică	36
4.2.4 Utilizarea cătinii în medicină	37
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	39
1. Ipoteza de lucru. Obiective	41
2. Studiul 1 Evaluarea efectului antimicrobian al unei ape de gură experimentale pe bază de cătină	43
2.1 Introducere	43
2.2 Ipoteza de lucru. Obiective	44
2.3 Material și metodă	45
2.3.1 Ape de gură luate în studiu	45
2.3.2 Sușe bacteriene luate în studiu	46
2.3.3 Metodologia de cercetare	46

2.3.4	Exprimarea rezultatelor și analiza statistică a datelor	49
2.4	Rezultate	50
2.5	Discuții	54
2.6	Concluzii	58
3.	Studiul 2 Studiu comparativ cu privire la efectul antibiofilm a trei ape de gură	59
3.1	Introducere	59
3.2	Ipoteza de lucru. Obiective	60
3.3	Material și metodă	60
3.3.1	Ape de gură luate în studio	60
3.3.2	Sușe bacteriene luate în studio	60
3.3.3	Metodologia de cercetare	61
3.3.4	Exprimarea rezultatelor și analiza statistică a datelor	63
3.4	Rezultate	64
3.4.1	Activitate antibiofilm	64
3.4.2	Efectul asupra biofilmelor constituite	73
3.5	Discuții	75
3.6	Concluzii	77
4.	Studiul 3 Studiu clinico-statistic cu privire la influența a două ape de gură pe bază de extracte vegetale asupra indicilor gingivali și de placă	79
4.1	Introducere	79
4.2	Ipoteza de lucru. Obiective	80
4.3	Material și metodă	80
4.3.1	Populația luată în studio	80
4.3.2	Parametrii clinici urmăriți și metodologia de examinare	81
4.3.3	Apele de gură luate în studio	83
4.3.4	Metodologia de cercetare	84
4.3.5	Exprimarea rezultatelor și analiza statistică a datelor	85
4.4	Rezultate	87
4.5	Discuții	93
4.6	Concluzii	99
5.	Studiul 4 Efectul cătinii ca aliment funcțional asupra gingivitei induse de placa bacteriană	101
5.1	Introducere	101
5.2	Ipoteza de lucru. Obiective	101
5.3	Material și metodă	102
5.3.1	Populația studiată	102
5.3.2	Parametrii clinici urmăriți	102
5.3.3	Preparatul active	102
5.3.4	Metodologia de cercetare	103
5.3.5	Exprimarea rezultatelor și analiza statistică a datelor	104
5.4	Rezultate	104
5.5	Discuții	108
5.6	Concluzii	109
6.	Discuții generale	111
7.	Concluzii generale	115
8.	Originalitatea și contribuțiile inovatoare ale tezei	117
	REFERINȚE	119
	ANEXE	131

Cuvinte cheie: gingivita indusă de placa bacteriană, cătina, compuși polifenolici din plante, biofilme orale, compuși anti-placă

INTRODUCERE

Biofilmul plăcii dentare constituie în prezent o problemă de sănătate publică, care afectează populația din toate țările indiferent de gradul de dezvoltare al acestora. Implicarea biofilmelor orale în apariția și evoluția cariei dentare și a bolii parodontale este astăzi o certitudine.

Incidența crescută a gingivitei induse de placa bacteriană în rândul populației și evoluția acesteia dacă nu este tratată spre boala parodontală, impun intervenția promptă din partea practicienilor în vederea tratării și prevenției acestei afecțiuni. În acest sens un rol primordial trebuie acordat controlului nivelului de placă bacteriană acumulat la nivelul cavității orale. Atenția medicului stomatolog este îndreptată frecvent spre îndepărtarea mecanică a factorului cauzal – placa și tartrul, aceasta fiind esențială pentru remiterea semnelor clinice. Dar un rol la fel de important îi revine pacientului prin mijloacele de igienă orală pe care acesta le aplică la domiciliu. Lipsa de motivare a pacienților în vederea efectuării igienei orale și dificultățile pe care le întâmpină majoritatea persoanelor în îndepărtarea eficientă a plăcii dentare sunt frecvent cauza reaparității inflamațiilor parodontiului marginal, care duc la o demotivare și mai mare a pacienților. Devine deci evidentă necesitatea suplimentării arsenalului terapeutic utilizat pentru combaterea acestei afecțiuni. O modalitate simplă și accesibilă este administrarea în completarea periajului dentar a unor substanțe antiseptice menite să reducă nivelul bacteriilor din cavitatea bucală și să prevină reinstalarea plăcii dentare. Deoarece majoritatea preparatelor dezvoltate ca agenți anti-placă se bazează pe substanțe chimice utilizarea acestora implică și unele efecte secundare. Pacienții din zilele noastre sunt din ce în ce mai informați și mai preocupați de compoziția, calitatea și raportul risc/beneficii legate de produsele pe care le utilizează. Se poate observa o tendință a acestora de a refuza preparate chimice fiind interesați în mod continuu de efectele nedorite care ar putea să apară.

Pornind de la aceste premise în lucrarea de față ne-am propus dezvoltarea unei ape de gură pe bază de extracte vegetale - produs original destinat igienei bucale.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Ipoteza de lucru. Obiective

Din flora spontană a țării noastre se distinge o plantă cu multiple efecte terapeutice și anume cătina. Aplicațiile în medicină sunt numeroase, această plantă dovedindu-și eficacitatea atât în bolile cardiovasculare^{108,123} cât și în combaterea ulcerului gastric și duodenal^{125,126} și în afecțiunile cutanate^{128,129}. Se remarcă prin efectele benefice pe care le induce asupra afecțiunilor mucoaselor și a pielii. Cu toate acestea cătina este foarte puțin studiată cu privire la efectele asupra afecțiunilor cavității orale. Luând în considerare mecanismele complexe prin care induce reepitelizarea și regenerarea tisulară^{126, 130,131} precum și caracterul puternic antioxidant și antibacterian al cătinii¹¹⁶ s-a realizat o apă de gură pe bază de ulei esențial de cătina. Prin aceasta s-a urmărit aprecierea efectelor cătinii *in vitro* asupra bacteriilor orale și *in vivo* asupra gingivitei induse de placa bacteriană, dată fiind frecvența acesteia.

Studiile microbiologice își propun ca și obiective:

1. evaluarea potențialului antimicrobian al apei de gură cu cătina asupra mai multor specii bacteriene și fungice orale
2. capacitatea apei de gură de a inhiba formarea biofilmelor orale
3. efectul apei de gură asupra biofilmelor deja constituite

Studiile clinice au ca și obiective:

1. evaluarea efectului apei de gură pe bază de cătină asupra indicilor de inflamație gingivală și indicelui de placă

2. compararea efectelor produsului original asupra parodontiului marginal superficial cu cele obținute de produse similare pe bază de extracte naturale, existente deja pe piață

3. testarea efectului cătinii administrat pe cale generală asupra gingivitei induse de placa bacteriană, luând în considerare potențialul de aliment funcțional al cătinii.

Studiul 1 Evaluarea efectului antimicrobian al unei ape de gură pe bază de cătină

Material și metodă. S-a determinat efectul antibacterian și antifungic al apei de gură pe bază de cătină asupra sușelor bacteriene *Streptococcus gordonii*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces viscosus* și respectiv *Candida albicans* utilizând procedurile standard impuse de Normele Europene EN-NF 1040 și 1725 pentru determinarea activității antibacteriene respectiv antifungice de bază a soluțiilor antiseptice și dezinfectante. Utilizând același protocol de lucru au fost cercetate și calitățile unei ape de gură pe bază de clorhexidină 0.12% și a unei ape de gură pe bază de extracte vegetale, cele trei produse fiind apreciate comparativ. *Rezultatele* au demonstrat un potențial 100% bactericid al produsului original asupra sușelor *S.gordonii* și *P.gingivalis*, aceeași eficacitate fiind observată și la produsul pe bază de clorhexidină 0.12% între cele două produse neexistând diferențe semnificative statistic ($p > 0.05$). Apa de gură pe bază de cătină prezintă însă doar un slab efect bacteriostatic asupra sușei *A.viscosus* și nu deține potențial antifungic, clorhexidina 0.12 % fiind puternic semnificativ statistic mai eficientă ($p < 0.05$) asupra speciilor *A.viscosus* și *C.ablicans* având efect bactericid de 100%. Apa de gură vegetală a avut eficiența cea mai ridicată asupra speciei *P.gingivalis* și efect antimicrobian redus pe restul sușelor bacteriene luate în studiu. *În concluzie* putem afirma că apa de gură pe bază de cătină prezintă un efect antimicrobian selectiv, fiind mai eficientă asupra sușelor bacteriene cu patogenitate crescută și mai puțin eficientă pe celelalte specii. Această caracteristică ar permite utilizarea acestui produs perioade mai îndelungate de timp fără a exista riscul inducerii unor dezechilibre în microbiota cavității orale.

Studiul 2 Studiu comparativ cu privire la efectul antibiofilm a trei ape de gură

Scopul studiului a constat în stabilirea efectului pe care trei ape de gură îl exercită asupra biofilmelor orale

Material și metodă. Produsele luate în studiu au fost: apa de gură experimentală pe bază de cătină, o apă de gură cu clorhexidină 0.12% care a fost considerată produsul de referință față de care ne-am raportat și o altă apă de gură pe bază de extracte vegetale, pentru a putea compara produsul autohton elaborat în această lucrare cu un produs similar. Sușele microbiene utilizate au fost aceleași cu cele din studiul 1. Metodologia de cercetare a biofilmelor a făcut uz de tehnica Biofilm Ring Test[®] (Saint Beuzire, Franța). Principiul metodei se bazează pe adăugarea la soluția bacteriană a unor bile magnetice cu diametrul de 5 micrometri. Soluția bacteriană va fi inoculată în barete de polistiren a câte 8 godeuri fiecare și incubată timpul necesar pentru formarea biofilmelor. Odată cu formarea biofilmelor bacteriile vor sintetiza matricea exopolizaharidică. Bilele magnetice adăugate la soluția bacteriană vor fi cuprinse în interiorul matricii exopolizaharidice fiind reținute astfel ferm în interiorul biofilmului. După perioada de incubare în godeuri se adaugă un lichid de contrast care va permite lecturarea baretelor de către un scanner special. După prima lectură baretele vor fi introduse într-un dispozitiv special de magnetizare și magnetizate timp de 1 minut. Bilele

care nu au fost reținute în matrice în timpul formării biofilmului vor fi atrase spre baza godeului formând un inel de culoare roșie. După magnetizare se va efectua o a doua lectură, datele fiind transmise unui calculator. Acesta va compara imaginile obținute între prima și cea de-a doua lectură pentru fiecare godeu și va calcula o valoare denumită Indice de Formare a Biofilmului (Biofilm Forming Index BFI). Dacă biofilmele sunt prezente numărul bilor magnetice atrase prin magnetizare va fi redus sau chiar absent. Un BFI egal sau mai mic de 2 indică formarea completă a biofilmului tradusă imagistic prin absența inelului roșu. Un BFI cuprins în intervalul 2-7 se interpretează ca un biofilm în curs de formare inelul roșu fiind puțin vizibil. Un BFI superior valorii de 7 reprezintă absența în totalitate a biofilmelor aspectul fiind al unui inel roșu format la baza godeurilor³⁸. Au fost cercetate două aspecte privitoare la efectele apelor de gură asupra biofilmelor orale și anume: 1. potențialul produselor de a inhiba adeziunea bacteriană și implicit formarea biofilmelor pe o suprafață, după ce aceasta a fost tratată în prealabil cu unul din produsele evaluate 2. Capacitatea apelor de gură de a detașa biofilmele orale de pe suprafețele pe care acestea s-au format. În studiul de față s-au utilizat biofilme mono-bacteriene, bi-bacteriene și biofilme complexe constituite din patru sușe bacteriene.

Rezultatele au relevat potențialul apelor de gură cu cătină și respectiv cu clorhexidină 0.12% de a inhiba complet formarea biofilmelor bacteriene pe suprafețele pretratate cu unul din aceste produse. Potențialul anti-biofilm al acestora a fost independent de numărul și tipul sușelor microbiene incluse în biofilme, între cele două produse neexistând diferențe semnificative statistic. Apa de gură pe bază de extracte vegetale nu a prezentat capacitatea de a inhiba formarea biofilmelor, între aceasta și celelalte produse luate în studiu existând diferențe puternic semnificative statistic.

Niciunul din produsele cercetate nu a prezentat un potențial cert de detașare a biofilmelor de pe suprafețele pe care acestea s-au format, între ele neexistând diferențe semnificative statistic. Doar apa de gură pe bază de cătină a prezentat o tendință de detașare a biofilmului constituit din *P.gingivalis*.

În concluzie apa de gură experimentală pe bază de cătină prezintă un potențial antibiofilm comparabil cu cel al clorhexidinei 0.12%, îmbinând acest efect cu beneficiile unui produs lipsit de aditivi și conservanți în compoziție.

Studiul 3 Studiu clinico-statistic cu privire la influența a două ape de gură pe bază de extracte vegetale asupra indicilor gingivali și de placă

Scopul studiului a constat în determinarea eficacității clinice a produsului experimental pe bază de cătină și compararea acestuia cu un alt produs pe bază de uleiuri esențiale (Listerine[®]) a cărui eficiență clinică și microbiologică a fost confirmată prin numeroase studii.

Material și metodă. S-a efectuat un studiu clinic controlat, randomizat, simplu orb și cu grupuri paralele care s-a derulat pe o perioadă de două săptămâni. Cercetarea s-a efectuat pe un lot de 60 de pacienți cu vârste cuprinse între 20-48 ani, cu un Indice Gingival Modificat (MGI) mai mare de 1.5 și un Indice de Placă (PI) mai mare de 1.75. Preparatele utilizate au fost apa de gură experimentală pe bază de cătină și apa de gură Listerine[®] și un preparat placebo. Subiecții au fost divizați randomizat în trei loturi, lotul E utilizând apa de gură cu cătină, lotul L apa de gură Listerine[®] și lotul C preparatul placebo timp de 14 zile de două ori pe zi. S-au determinat MGI, Indicele de Sângerare Sulculară (SBI) și PI inițial și după cele 14 zile de tratament. Eficacitatea produselor s-a determinat atât ca și diferența dintre valorile parametrilor clinici măsurati inițial și la finalul perioadei de tratament cât și ca și valori ale reducerii procentuale după formula impusă de Asociația Dentară Americană ca și standard în determinarea clinică a eficacității produselor destinate igienei dentare. Analiza statistică s-a efectuat utilizând testul t Student pentru eșantioane independente pentru a compara valorile parametrilor clinici inițiali și finali și analiza

ANOVA pentru a compara eficacitatea produselor.

Rezultatele au arătat scăderi semnificative statistic ale valorilor MGI și PI după 14 zile de tratament la toate trei loturile. SBI a înregistrat scăderi semnificative statistic la loturile E și L, pentru lotul C scăderea nefiind semnificativă statistic. Calculul reducerii procentuale și analiza statistică au demonstrat că nu există diferențe semnificative statistic între apele de gură cu cătină și Listerine® în reducerea MGI și PI, însă Listerine® este semnificativ statistic mai eficientă în ceea ce privește reducerea SBI.

În concluzie studiul clinic a demonstrat o eficacitate a apei de gură pe bază de cătină similară cu cea a produsului Listerine® în ceea ce privește reducerea indicilor de placă și gingivali.

Studiul 4 Efectul cătinii asupra gingivitei induse de placa bacteriană

Acest ultim studiu are drept scop evaluarea efectului cătinii administrat pe cale generală asupra inflamației gingivale. Cătina considerată o polivitamină naturală produce tonifierea organismului, iar studiul de față a dorit cercetarea impactului pe care îl are starea generală a organismului asupra evoluției și tratamentului gingivitei induse de placa bacteriană.

Material și metodă. Preparatul activ utilizat în acest studiu a fost un aliment funcțional pe bază de cătină sub formă de jeleuri, produs de Centrul de Biotehnologii Vegetale Aplicate, PROPLANTA (Cluj-Napoca, Romania). S-a efectuat un studiu clinic controlat, randomizat, dublu orb, cu grupuri paralele care s-a desfășurat pe o perioadă de 30 de zile, pe un lot de 60 de pacienți cu vârste cuprinse între 20-50 de ani. Pacienții au fost distribuiți randomizat în trei grupuri. Grupul S1 a cuprins pacienții care au utilizat doar preparatul pe bază de cătină. Pacienților din grupul S2 li s-a efectuat igienizare profesională și au utilizat preparatul pe bază de cătină. Pacienții din grupul P au consumat un preparat placebo. S-au determinat MGI și SBI inițial și după 30 de zile de tratament.

Rezultate. Parametrii clinici au înregistrat scăderi semnificative statistic atât la grupul S1 cât și la grupul S2. Diminuarea cea mai importantă a apărut la grupul S2 fiind semnificativ statistic mai importantă decât cea apărută la grupul S1 și respectiv P.

În concluzie putem considera drept benefic consumul de cătină asupra statusului gingival, dar eficacitatea cea mai importantă apare prin îmbinarea mijloacelor de igienizare locale cu consumul de cătină.

Discuții generale

Coroborarea rezultatelor studiilor microbiologice și clinice permite conceperea unei scheme terapeutice noi. Astfel considerăm că rolul pivotal în tratamentul gingivitei induse de placă le revine mijloacelor mecanice de îndepărtare a plăcii dentare și tartrului, precum și motivării pacienților în vederea menținerii unei igiene bucale corecte. Dar asocierea acestora cu produse suplimentare de igienă orală este benefică așa cum arată studiul clinic, apa de gură pe bază de cătină reprezentând un produs eficient. Schema terapeutică trebuie să prevadă și un mijloc de tonifiere a organismului, preparatele pe bază de cătină dovedindu-se a fi foarte eficiente în acest sens.

Produsul original pe bază de cătină dezvoltat în această lucrare constituie prin urmare o alternativă viabilă la produsele deja existente pe piață, reprezentând pentru pacienți un produs atractiv datorită provenienței naturale a compușilor din compoziția acestuia și a lipsei aditivilor și conservanților.

Concluzii generale:

1. Apa de gură pe bază de cătină prezintă o bună activitate antibacteriană asupra speciilor *S.gordonii* și *P.gingivalis*, comparabilă cu cea a apei de gură pe bază clorhexidină 0.12%, dar un efect antifungic redus.

2. Preparatul pe bază de cătină prezintă capacitatea de a inhiba complet formarea biofilmelor mono- sau poli-bacteriene pe suprafețele tratate în prealabil cu acest produs.

3. Niciunul din preparatele utilizate în cercetarea de față pentru tratarea biofilmelor deja constituite nu a prezentat un potențial cert de detașare a acestora.

4. Apa de gură Etera prezintă o bună eficacitate în combaterea inflamației gingivale și a plăcii dentare ducând la scăderi semnificative statistic ale Indicelui Gingival Modificat, Indicelui de Sângerare Sulculară și Indicelui de Placă după o perioadă de 14 zile de tratament.

5. Efectele obținute prin utilizarea apei de gură Etera în tratarea gingivitei și controlul plăcii dentare sunt comparabile cu cele ale produsului Listerine®.

6. Efectele secundare care au apărut consecutiv utilizării produselor luate în studiu, au fost de mică intensitate și tranzitorii, fiind mai exprimate pentru produsul Listerine® și mai reduse în cazul produsului Etera.

7. Cătină administrată general sub diverse forme și preparate poate reprezenta un adjuvant în tratamentul gingivitei alături de mijloacele terapeutice locale oferind pacienților cu afecțiuni gingivale un suport în sensul tonifierii generale a organismului, favorizând vindecarea și îmbunătățind reactivitatea organismului.

8. Rezultatele obținute în lucrarea de față referitoare la potențialul anti-biofilm foarte ridicat al extrasului de cătină, similar cu cel al clorhexidinei 0.12%, precum și eficiența cătinii în reducerea inflamației gingivale și a plăcii dentare comparabile cu produsul Listerine® propun cătina ca un nou și potențial agent anti-placă și anti-gingivită.

Bibliografie selectivă

1. Gunsolley J. A meta-analysis of six month clinical studies of anti-plaque and anti-gingivitis agents. J Am Dent Assoc. 2006 Dec; 137(12):1649-1657
2. Barnett M. The rationale for the daily use of an antimicrobial mouthrinse. J Am Dent Assoc. 2006 Nov;137(Suppl 3):16S-21S
3. Fine D, Listerine: past, present and future – A test of thyme. J of Dentistry. 2010 July; 38(S1):S2-S5
4. Donlan M, Costerton WJ. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms, Clin Microbiol Rev. 2002 Apr; 15(2):167–193
5. Thomas J C, Lindsay A, Nakaishi B S. Managing the complexity of a dynamic biofilm. J Am Dent Assoc. 2006 Nov; 137(Suppl3):S10-S15
6. Marsh P . Dental Plaque as a Microbial Biofilm. Caries Res. 2004 Jun; 38(3):204–211
Newman M.G, Takei H, Caranza F. Caranza's Clinical Periodontology. Philadelphia:Saunders Company;2003
7. Chavant P, Gaillard-Martinie B, Talon R, Hébraud M, Bernardi T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. J Microbiol Methods. 2007 Mar; 68(3):605-612
8. Loe H, Theilande E, Jensen B, Schiott C . Experimental gingivitis in man. J Period Res. 1967 Aug; 2(4):282-289
9. Baehni P, Takeuchi Y. Anti-plaque agents in the prevention of biofilm- associated oral diseases. Oral Diseases. 2003 Jun; 9 (Suppl. 1): S23–S29
10. Petersilka G, Ehmke B, Flemmig T. Antimicrobial effects of mechanical debridement. Periodontology 2000. 2002 Jan; 28(1): 56–71
11. McCracken G, Janssen J, Heasman L, Stacey F, Steen N, deJager M, Heasman P.

- Assessing adherence with toothbrushing instructions using a data logger toothbrush. *Br Dent J.* 2005 Jan; 198(1):29-32;
12. Mager DL, Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky S. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J Clin of Period* 2003 Jul; 30(7):644–654.
 13. Charles CH, Mostler KM, Bartels LL, Mankodi SM: Comparative antiplaque and antigingivitis effectiveness of a chlorhexidine and an essential oil mouthrinse: 6-month clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2004 Oct; 31(10): 878–884
 14. Schiött C, Briner W, Kirkland J, Loe H. Two year oral use of chlorhexidine in man. III. Changes in sensitivity of the salivary flora. *J. Peridontal Res.* 1976 Jun; 11(3):153–157.
 15. Fine D, Furgang D, Lieb R, Korik I, Vincent J, Barnett M. Effects of sublethal exposure to an antiseptic mouthrinse on representative plaque bacteria. *J Clin Periodontol.* 1996 May;23(5):444-451.
 16. Li T, Beveridge T, Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*)- Production and utilization. Ottawa: NRC Research Press;2003
 17. Rați V.I., Rați L. Cătina albă în exploatații agricole, Agenția Națională de Consultanță Agricolă; 2003
 18. Muntean LS. *Tratat de plante medicinale cultivate și spontane.* Cluj-Napoca: Risoprint; 2007
 19. Zeb A. Chemical and Nutritional Constituents of Sea Buckthorn Juice, *Pak Journ of Nutr.* 2004; 3(2):99-106
 20. Kallio H, Yang BR, Peippo P. Effects of different origins and harvesting time on vitamin C, tocopherols, and tocotrienols in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) berries. *J Agri Food Chem,* 2002 Sep; 50(21): 6136-6142
 21. Yang B, Kallio H. Composition and physiological effects of sea buckthorn (*Hippophae*) lipids. *Trends Food Sci Tech.* 2002 May; 13(5):160-167
 22. Barnett M. The role of therapeutic antimicrobial mouthrinses in clinical practice Control of supragingival plaque and gingivitis. *J Am Dent Assoc.* 2003; 134:699-704
 23. Gunsolley J. Clinical efficacy of antimicrobial mouthrinses. *J Dent.* 2010 Jul; 38(Suppl1):S6-S10
 24. Santos A: Evidence-based control of plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol* 2003; 30 (Suppl. 5): 13–16
 25. Acceptance Program Guidelines Council on Scientific Affairs July 2008 Chemotherapeutic Products for Control of Gingivitis.American Dental Association. 7.01.2008. sursa electronic www.ada.org

**UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY
„IULIU HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA**

Abstract of the doctoral thesis

**Research on the effects of natural remedies in the
therapy of diseases affecting the marginal
periodontium**

Scientific advisor: Prof. Dr Angela Pop

Doctoral candidate: Carola Pentelescu

Cluj-Napoca 2012TABLE OF CONTENTS

ABBREVIATIONS	13
INTRODUCTION	15
CURRENT STAGE OF KNOWLEDGE	17
1. Oral biofilms and their research	19
1.1 Definition of biofilm	19
1.2 Composition and structure of biofilms	19
1.2.1 Intercellular matrix	19
1.2.2 Bacterial composition of biofilms	20
1.2.3 Dynamics of biofilm formation	20
1.3 Methods and techniques for assessing oral biofilms in vitro and in vivo	22
1.3.1 Crystal violet Technique	23
1.3.2 Biofilm Ring Test [®]	23
2. Mouthwashes as a complementary measure of oral hygiene	24
2.1 Methods of removing oral plaque	25
2.2 Active chemical compounds in mouthwashes	26
3. Current implications on natural remedies for the treatment of periodontal diseases marginal	28
3.1 Phytotherapeutic agents. Definition and general features.	28
3.2 Main plants used in the treatment of periodontal diseases and their bioactive phytochemicals	28
3.2.1 Chamomile	28
3.2.2 Callendula	28
3.2.3 Savory	29
3.2.4 Myrtle	29
3.2.5 Peppermint	29
3.2.6 Thyme	30
3.2.7 Tea tree oil	30
3.2.8 Echinaceea	31
3.2.9 Green tea	31
3.3 Bioactive phytochemicals in plants	31
3.3.1 Polyphenolic compounds of plant origin and their effects on oral bacteria	32
3.3.1.1 Polyphenolic compounds in cranberries	32
3.3.1.2 Polyphenolic compounds in green tea	33
3.3.1.3 Polyphenolic compounds in other plant	33
4. Seabuckthorn a complex plant	35
4.1 General features and chemical composition	35
4.1.1 Chemical composition of sea buckthorn fruit	35
4.2 Uses of seabuckthorn	37
4.2.1 Environmental protection and prevention of soil erosion	37
4.2.1 Food Industry	37
4.2.3 Cosmetics industry	37
4.2.4 Medical uses of seabuckthorn	38
PERSONAL CONTRIBUTION	41
1. Working hypothesis. Objectives	43
2. Study 1 Evaluation of the antimicrobial effect of an experimental mouthwash based on sea buckthorn essential oil	45
2.1 Introduction	45
2.2 Working hypothesis. Objectives	46
2.3 Materials and methods	46
2.3.1 Mouthwashes included in the study	46
2.3.2 Bacterial strains used	47
2.3.3 Research Methodology	48
2.3.3.1 Preparation of bacterial and fungal inoculum	48
2.3.3.2 Determination of antibacterial activity	48

2.3.3.3	Determination of antifungal activity	49
2.3.4	Statistical analysis of data	51
2.4	Results	51
2.5	Discussion	56
2.6	Conclusions	59
3.	Study 2 Comparative study concerning the antibiofilm effect of three mouthwashes	61
3.1	Introduction	61
3.2	Working hypothesis. Objectives	62
3.3	Materials and methods	62
3.3.1	Mouthwashes used in the study	62
3.3.2	Bacterial strains studied	62
3.3.3	Research methodology	63
3.3.4	Statistical analysis of data	65
3.4	Results	66
3.5	Discussion	77
3.6	Conclusions	79
4.	Study 3 Clinical study on the influence of two mouthwashes based on plant extracts on gingival and plaque indices	81
4.1	Introduction	81
4.2	Working hypothesis. Objectives	82
4.3	Material and Methods	82
4.3.1	Study population	82
4.3.2	Clinical parameters followed	83
4.3.3	Mouthwashes studied	85
4.3.4	Research methodology	86
4.3.5	Statistical analysis of data	87
4.4	Results	89
4.5	Discussion	94
4.6	Conclusions	100
5.	Study 4 Effect of seabuckthorn as functional food on plaque-induced gingivitis	101
5.1	Introduction	101
5.2	Working hypothesis. Objectives	101
5.3	Materials and methods	102
5.3.1	Study population	102
5.3.2	Clinical parameters followed	102
5.3.3	Active product used	102
5.3.4	Research methodology	103
5.3.5	Statistical analysis of data	104
5.4	Results	104
5.5	Discussion	108
5.6	Conclusions	109
6.	General discussion	111
7.	General conclusions	115
8.	Originality and innovative contributions of the thesis	117
	REFERENCES	119
	Keywords: plaque-induced gingivitis, seabuckthorn, plant polyphenolic compounds, oral biofilms, anti-plaque agents	

INTRODUCTION

Dental plaque biofilm is now a public health problem that affects people of all countries regardless of the level of development. Oral biofilm involvement in the development and evolution of dental caries and periodontal disease is now a certainty.

The increased incidence of plaque-induced gingivitis among the population and its development towards periodontal disease, if not treated, require prompt intervention measures for the prevention and treatment of this condition. In this matter the central role falls on controlling the accumulated plaque level in the oral cavity. The dentist's attention is directed frequently on the mechanical removal of plaque and calculus, which is essential for the resolution of clinical signs. But an equally important role plays the patient by the at home measures of oral hygiene that one applies. Lack of motivation on patients side to carry out oral hygiene and difficulties faced by most people in efficient removal of dental plaque are frequently cause of recurrence of periodontal inflammation. It becomes obvious the need to supplement the therapeutic arsenal for fighting this disease. One simple and accessible way is the use of antiseptic substances in addition to tooth brushing in order to reduce the bacterial burden in the mouth and to prevent dental plaque formation. Since most preparations developed as anti-plaque agents are based on chemicals their use involve also some side effects. Patients today are becoming more aware and more concerned about the composition, quality and risk / benefits ratio of the products they use. One can observe a tendency among patients to refuse the use of chemical preparations because of the undesirable side effects that might occur.

Based on these assumptions in this paper we proposed the development of a new mouthrinse, based on plant extracts - an original product for oral hygiene.

PERSONAL CONTRIBUTION

Working hypothesis. Objectives

Sea buckthorn is a plant belonging to the Romanian natural biodiversity. It has multiple applications in medicine, proving effectiveness in preventing cardiovascular diseases, treating gastric and duodenal ulcer and skin disorders. It also induces beneficial effects on mucosa and skin. However sea buckthorn is very little studied with respect to its effectiveness in treating oral cavity diseases. Considering the complex mechanisms responsible for tissue regeneration and the powerful antioxidant and antibacterial potential of sea buckthorn we developed a mouthwash based on sea buckthorn essential oil. In this manner we assessed the effects of sea buckthorn on oral bacteria *in vitro* and on plaque-induced gingivitis *in vivo*.

Aims of the microbiological studies were:

1. evaluation of the antimicrobial potential of the sea buckthorn mouthwash on several oral bacterial and fungal species
2. the ability of the experimental mouthrinse to inhibit oral biofilms formation
3. the effect of the sea buckthorn mouthrinse on already established oral biofilms

Clinical studies had as objectives:

1. to evaluate the effectiveness of sea buckthorn mouthwash on gingival index and plaque index
2. to compare the effects of the original product on superficial marginal periodontium with the results of similar products based on natural extracts, already on the market
3. to test the effects of sea buckthorn administered orally on plaque-induced gingivitis, taking into account the potential of sea buckthorn as functional food.

Study 1 Evaluation of the antimicrobial effect of a sea buckthorn based mouthwash

Material and method

Aim of this study was to determine the antibacterial and antifungal activity of a sea buckthorn based mouthrinse on the bacterial strains *Streptococcus gordonii*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces viscosus* and *Candida albicans*. The research methodology followed the standard procedures required by European standards EN-NF 1040 and 1725 used to assess basic antibacterial and antifungal activity of antiseptic and disinfectant solutions. Using the same protocol we investigated the antimicrobial properties of a chlorhexidine 0.12% based mouthwash and another mouthrinse based on plant extracts.

The results demonstrated a 100% bactericidal activity of the original product on strains *S.gordonii* and *P.gingivalis*. The same efficacy was observed for the chlorhexidine 0.12% product. Between the two products no statistically significant differences were found ($p > 0.05$). Sea buckthorn based mouthwash showed only a weak bacteriostatic effect on strain *A.viscosus* and had no antifungal potential. 0.12% chlorhexidine was statistically significant more effective ($p < 0.05$) on species *A.viscosus* and *C.ablicans* having a 100% bactericidal effect on these strains. The plant based mouthwash had the highest efficiency on the species *P.gingivalis* and a reduced antimicrobial effect on the remaining bacterial strains studied.

In conclusion we might consider that the sea buckthorn based mouthwash presents a selective antimicrobial effect, being more effective on bacterial strains with increased pathogenicity and less effective on other oral bacterial species. This feature would allow the use of this product over long periods of time without the risk of inducing imbalances in the oral microbiome.

Study 2 Comparative study on the antibiofilm effect of three mouthwashes

The aim of the study was to establish the antibiofilm effect of three mouthwashes on oral biofilms

Materials and methods.

The products studied were: the sea buckthorn experimental mouthwash, a mouthwash based on chlorhexidine 0.12% which was considered the reference product and another mouthrinse containing a mixture of plant extracts. Microbial strains used were the same as in Study 1. The research methodology used the Biofilm Ring Test[®] technique (Saint Beuzire, France). The principle of this method is based on the addition of paramagnetic beads of 5 microns diameter, to the bacterial solution. This mix is then inoculated into 96 wells polystyrene strips and incubated the required time for biofilm formation. Bacteria are synthesizing the exopolysaccharide matrix during biofilm formation, retaining firmly the magnetic beads inside the biofilm. After incubation a contrast fluid is added in the wells and a first lecture is performed with a special scanner. Then the strips are placed in a special magnetic block and magnetized for 1 minute. The beads that were not retained in the matrix during biofilm formation will be attracted to the bottom of the well forming a red ring. After magnetization a second lecture will be performed. From there by comparing the images resulted from the two lectures a special software will calculate a Biofilm Forming Index (BFI). If biofilms are present the number of beads attracted by magnetization will be reduced or even absent. A $BFI < 2$ indicates the complete formation of biofilm and the image is showing the absence of the red ring. A BFI in the range 2-7 should be considered as an emerging biofilm, the red ring is less visible. A $BFI > 7$ is showing the complete absence of a biofilm, traduced by the presence of the red ring at the bottom of the wells. We investigated two aspects regarding the effects of mouthrinses on oral biofilms, namely: 1. the potential of the products to inhibit bacterial adhesion and biofilm formation on the surfaces pretreated with one of the evaluated products, 2. the potential of the mouthwashes to detach already

installed biofilms from a surface.

In this study we used mono-bacterial biofilms, bi-bacterial biofilms and complex biofilms consisting of four bacterial strains.

Results.

The results revealed the potential of the mouthwashes based on sea buckthorn and chlorhexidine 0.12% respectively to inhibit completely biofilm formation on a surface pretreated with one of these products. Their anti-biofilm potential was independent of the number and type of microbial strains included in biofilms. Between the two products no statistically significant differences were found. The mouthrinse based on plant extracts revealed no ability to inhibit biofilm formation, between this and the other two products highly statistically significant differences were found.

None of the products showed a clear potential to detach already installed biofilms from a surfaces. There were no statistically significant differences between them. Although the sea buckthorn mouthwash presented a tendency to detach *P.gingivalis* single strain biofilms.

Conclusions

The experimentally developed sea buckthorn mouthwash showed an antibiofilm potential comparable with that of 0.12% chlorhexidine, combining this effect with benefits of a product without additives and preservatives in the composition.

Study 3 Clinical study on the influence of two mouthwashes based on plant extracts on gingival and plaque indices

Aim of this study was to determine the clinical efficacy of the experimentally developed sea buckthorn product and to compare it with another product based on essential oils (Listerine®) whose clinical and microbiological efficacy has been confirmed by numerous studies.

Material and method

A single blind, controlled, randomized, clinical trial was conducted over a period of two weeks. The research involved a population of 60 patients aged 20-48 years with a Modified Gingival Index (MGI) greater than 1.5 and a Plaque Index (PI) greater than 1.75

Preparations used were the sea buckthorn mouthwash, Listerine® and a placebo mouthwash. Subjects were randomly divided into three groups, group E used sea buckthorn mouthwash, group L Listerine® and group C the placebo mouthrinse for 14 days, twice a day. We determined MGI, Sulcular Bleeding Index (SBI) and PI at baseline and after 14 days of treatment. Efficacy of the products was first calculated as the difference between the clinical parameters measured at baseline and at end of treatment and second as the percentage reduction following the formula indicated by the American Dental Association as the standard for determining clinical efficacy of dental hygiene products in clinical trials. Statistical analysis was performed using Student t test for independent samples to compare the initial and final values of clinical parameters and ANOVA analysis to compare the efficacy of the products.

The results showed statistically significant reductions in MGI and PI values after 14 days of treatment in all three groups. SBI showed statistically significant reductions in groups E and L, in group C the reduction was not statistically significant. Calculation of percentage reduction and statistical analysis demonstrated no statistically significant differences between sea buckthorn and Listerine® mouthrinses in reducing MGI and PI, but Listerine® was significantly more effective in reducing SBI.

In conclusion the clinical trial demonstrated an efficacy of the sea buckthorn mouthrinse similar to that of Listerine® in reducing plaque and gingivitis indices.

Study 4 Effect of sea buckthorn administered orally on plaque-induced gingivitis

This last study aims to assess the effect of sea buckthorn taken orally on gingival inflammation. Sea buckthorn is considered a natural polyvitamin, its intake increases the body resistance. This research wanted to assess the impact of the overall health condition of the body on the evolution and treatment of plaque-induced gingivitis.

Materials and methods

Active preparation used in this study was a functional food a sea buckthorn candy, produced by the Center for Applied Plant Biotechnology, PROPLANTA (Cluj-Napoca, Romania). A controlled, randomized, double-blind, clinical trial was performed over a period of 30 days, on a sample of 60 patients aged 20-50 years. Patients were randomly distributed into three groups. S1 group included patients who used only the basic preparation of sea buckthorn. On the patients in group S2 scaling and professional cleaning were performed and in addition they used the sea buckthorn functional food. Patients in group P consumed a placebo. SBI and MGI were determined at baseline and after 30 days of treatment.

Results

Clinical parameters showed statistically significant decreases of the clinical parameters in both groups S1 and S2. Largest decrease occurred in group S2 and was significantly greater than that occurring in group S1 and P.

Conclusions

Sea buckthorn consumption improved the gingival status, but the most important effectiveness was reached by combining local hygiene measures with sea buckthorn consumption.

General Discussion

The results from the microbiological and clinical studies allowed the design of new therapeutic regimens. So we consider that the central role in the treatment of plaque-induced gingivitis is played by the mechanical removal of plaque and calculus and the motivation of patients to maintain a correct oral hygiene. But their association with additional oral care products is recommended. In this direction the sea buckthorn based mouthwash represents an effective product. The new therapy we propose should also include a preparation that increases the body resistance and the sea buckthorn as functional food proved to be very effective in this regard.

The original sea buckthorn mouthrinse developed in this work is therefore a viable alternative to products already on the market, representing for the patients an attractive choice because of the naturally occurring compounds and the lack of additives and preservatives in its composition.

General conclusions:

1. The sea buckthorn based mouthwash showed strong antibacterial activity on *S.gordonii* and *P.gingivalis* species, comparable with that of chlorhexidine 0.12%, but reduced antifungal effect.

2. The sea buckthorn mouthrinse has the ability to inhibit completely mono-or poly-species biofilm formation on surfaces previously treated with this product.

3. None of the preparations used in the present research showed a clear potential in biofilm detachment.

4. The experimental mouthwash revealed a good efficacy in fighting dental plaque and gingival inflammation resulting in statistically significant reductions of Modified Gingival Index, Sulcular Bleeding Index and Plaque Index after a period of 14 days of treatment.

5. The effects obtained by using sea buckthorn mouthwash to control the plaque levels and to treat gingivitis are comparable to those of Listerine®.

6. Side effects that occurred after using the studied products were of reduced intensity and transient, being more expressed for Listerine® and lower for the Etera product.

7. The oral intake of sea buckthorn in various forms and preparations may represent an adjunctive in the treatment of gingivitis in association with local therapeutic measures providing patients with gum disease an overall body toning in order to promote healing.

8. The results obtained in this paper concerning the high antibiofilm potential of the sea buckthorn extract, similar to that of 0.12% chlorhexidine and its effectiveness in reducing gingival inflammation and plaque levels comparable with that of Listerine®, propose sea buckthorn as a new potential anti-plaque and anti-gingivitis agent.

Selective references:

1. Gunsolley J. A meta-analysis of six month clinical studies of anti-plaque and anti-gingivitis agents. *J Am Dent Assoc.* 2006 Dec; 137(12):1649-1657
2. Barnett M. The rationale for the daily use of an antimicrobial mouthrinse. *J Am Dent Assoc.* 2006 Nov;137(Suppl 3):16S-21S
3. Fine D, Listerine: past, present and future – A test of thyme. *J of Dentistry.* 2010 July; 38(S1):S2-S5
4. Donlan M, Costerton WJ. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms, *Clin Microbiol Rev.* 2002 Apr; 15(2):167–193
5. Thomas J C, Lindsay A, Nakaishi B S. Managing the complexity of a dynamic biofilm. *J Am Dent Assoc.* 2006 Nov; 137(Suppl3):S10-S15
6. Marsh P . Dental Plaque as a Microbial Biofilm. *Caries Res.* 2004 Jun; 38(3):204–211
Newman M.G, Takei H, Caranza F. Caranza’s Clinical Periodontology. Philadelphia:Saunders Company;2003
7. Chavant P, Gaillard-Martinie B, Talon R, Hébraud M, Bernardi T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J Microbiol Methods.* 2007 Mar; 68(3):605-612
8. Loe H, Theilande E, Jensen B, Schiott C . Experimental gingivitis in man. *J Period Res.* 1967 Aug; 2(4):282-289
9. Baehni P, Takeuchi Y. Anti-plaque agents in the prevention of biofilm- associated oral diseases. *Oral Diseases.* 2003 Jun; 9 (Suppl. 1): S23–S29
10. Petersilka G, Ehmke B, Flemmig T. Antimicrobial effects of mechanical debridement. *Periodontology 2000.* 2002 Jan; 28(1): 56–71
11. McCracken G, Janssen J, Heasman L, Stacey F, Steen N, deJager M, Heasman P. Assessing adherence with toothbrushing instructions using a data logger toothbrush. *Br Dent J.* 2005 Jan; 198(1):29-32;
12. Mager DL, Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky S. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J Clin of Period* 2003 Jul; 30(7):644–654.
13. Charles CH, Mostler KM, Bartels LL, Mankodi SM: Comparative antiplaque and antigingivitis effectiveness of a chlorhexidine and an essential oil mouthrinse: 6-month clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2004 Oct; 31(10): 878–884
14. Schiött C, Briner W, Kirkland J, Loe H. Two year oral use of chlorhexidine in man. III. Changes in sensitivity of the salivary flora. *J. Peridontal Res.* 1976 Jun; 11(3):153–157.
15. Fine D, Furgang D, Lieb R, Korik I, Vincent J, Barnett M. Effects of sublethal exposure to an antiseptic mouthrinse on representative plaque bacteria. *J Clin Periodontol.* 1996 May;23(5):444-451.
16. Li T, Beveridge T, Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*)- Production and utilization. Ottawa: NRC Research Press;2003

17. Rați V.I., Rați L. Cătina albă în exploatații agricole, Agenția Națională de Consultanță Agricolă; 2003
18. Muntean LS. Tratat de plante medicinale cultivate și spontane. Cluj-Napoca: Risoprint; 2007
19. Zeb A. Chemical and Nutritional Constituents of Sea Buckthorn Juice, Pak Journ of Nutr. 2004; 3(2):99-106
20. Kallio H, Yang BR, Peippo P. Effects of different origins and harvesting time on vitamin C, tocopherols, and tocotrienols in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) berries. J Agri Food Chem, 2002 Sep; 50(21): 6136-6142
21. Yang B, Kallio H. Composition and physiological effects of sea buckthorn (*Hippophae*) lipids. Trends Food Sci Tech. 2002 May; 13(5):160-167
22. Barnett M. The role of therapeutic antimicrobial mouthrinses in clinical practice Control of supragingival plaque and gingivitis. J Am Dent Assoc. 2003; 134:699-704
23. Gunsolley J. Clinical efficacy of antimicrobial mouthrinses. J Dent. 2010 Jul; 38(Suppl1):S6-S10
24. Santos A: Evidence-based control of plaque and gingivitis. J Clin Periodontol 2003; 30 (Suppl. 5): 13–16
25. Acceptance Program Guidelines Council on Scientific Affairs July 2008 Chemotherapeutic Products for Control of Gingivitis. American Dental Association. 7.01.2008. sursa electronic www.ada.org

**UNIVERSITÉ DE MÉDECINE ET PHARMACIE
"IULIU HATIEGANU" CLUJ-NAPOCA**

Résumé de la thèse

**Recherche sur les effets des remèdes naturels
dans le traitement des maladies parodontales**

Coordinateur scientifique: Prof. Dr. Angela Pop

PhD: Carola Pentelescu

Cluj-Napoca 2012

TABLE DES MATIÈRES

ABREVIATIONS	13
INTRODUCTION	15
RECHERCHE SUR LA LITTÉRATURE	17
1. Les biofilms oraux et leur recherche	19
1.1 Définition d'un biofilm	19
1.2 Composition et structure des biofilms	19
1.3 Méthodes et techniques d'évaluation des biofilms buccaux <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	22
1.3.1 Technique cristal violet	23
1.3.2 Biofilm Ring Test [®]	23
2. Les bains de bouche, un aide complémentaire pour l'hygiène buccale	24
2.1 Méthodes d'élimination de la plaque dentaire	25
2.2 Des produits actifs dans les bains de bouche	26
3. Implications actuelles sur les remèdes naturels pour le traitement des maladies parodontales marginales	28
3.1 Les agents phytothérapeutiques. Définition et généralités	28
3.2 Les principaux plants utilisés dans le traitement des maladies parodontales et leurs composés phytochimiques bioactifs	29
3.3 Substances phytochimiques bioactives dans les plantes	31
3.3.1 Composés polyphénoliques d'origine végétale et leurs effets sur les bactéries orales	32
3.3.1.1 Composés polyphénoliques dans les canneberges	32
3.3.1.2 Composés polyphénoliques du thé vert	33
3.3.1.3 Autres composés polyphénoliques des plantes	33
4. L'argousier - plante complexe	35
4.1 Généralités et composition chimique	35
4.1.1 Composition chimique des fruits de l'argousier	35
4.2 Applications de l'argousier	37
4.2.1 Protection de l'environnement et prévention de l'érosion des sols	37
4.2.1 Industrie alimentaire	37
4.2.3 Industrie cosmétiques	37
4.2.4 L'emploi de l'argousier en médecine	38
CONTRIBUTION PERSONNELLE	41
1. Hypothèse de travail. Objectifs	43
2. Étude 1: Evaluation de l'effet antimicrobien d'un bain de bouche expérimentale a base d'argousier	45
2.1 Introduction	45
2.2. Hypothèse de travail. Objectifs	46
2.3 Matériaux et méthodes	46
2.3.1 Bains de bouche inclus dans l'étude	46
2.3.2 Souches bactériennes étudiées	47
2.3.3 Méthodologie de recherche	48
2.3.3.1 Préparation de l'inoculum bactérien et fongique	48
2.3.3.2 Détermination de l'activité antibactérienne	48
2.3.3.3 Détermination de l'activité antifongique	49
2.3.4 Expression des résultats et l'analyse statistique des données	51
2.4 Résultats	51
2.5 Discussion	56
2.6 Conclusions	59

3. Etude 2 Etude comparative sur l'effet anti-biofilm des trois bains de bouche	61
3.1 Introduction	61
3.2. Hypothèse de travail. Objectifs	62
3.3 Matériaux et méthodes	62
3.3.1 Bains de bouche inclus dans l'étude	62
3.3.2 Souches bactériennes étudiées	62
3.3.3 Méthodologie de recherche	63
3.3.3.1 Principe de la méthode	63
3.3.3.2 Matériel de laboratoire utilisé	63
3.3.3.3 Préparation de l'inoculum bactérien et fongique	64
3.3.3.4 Détermination du potentiel inhibiteur du bain de bouche sur la formation des biofilms oraux	64
3.3.3.5 Détermination de l'effet des bains de bouche sur les biofilms oraux formés	65
3.3.4 Expression des résultats et l'analyse statistique des données	65
3.4 Résultats	66
3.5 Discussion	77
3.6 Conclusions	79
4. Étude 3 Recherche clinique sur l'influence de deux bains de bouche à base d'extraits de plantes sur les indices gingivaux et de la plaque	81
4.1 Introduction	81
4.2. Hypothèse de travail. Objectifs	82
4.3 Matériel et méthodes	82
4.3.1 Population incluse dans la recherche	82
4.3.2 Paramètres cliniques suivi et méthodologie d'examen	85
4.3.3 Bains de bouche inclus dans l'étude	85
4.3.4 Méthodologie de recherche	86
4.3.5 Expression des résultats et analyse statistique des données	87
4.4 Résultats	89
4.5 Discussion	94
4.6 Conclusions	100
5. Étude 4 Effet de l'argousier comme aliment fonctionnel sur la gingivite induite par la plaque dentaire	101
5.1 Introduction	101
5.2 Hypothèse du travail. Objectifs	101
5.3 Matériels et méthodes	102
5.3.1 Population incluse dans la recherche Population étude	102
5.3.2 Paramètres cliniques suivis	102
5.3.3 Préparation active	102
5.3.4 Méthodologie de la recherche	103
5.3.5 Expression des résultats et analyse statistique	104
5.4 Résultats	104
5.5 Discussion	108
5.6 Conclusions	109
6. Discussion générale	111
7. Conclusions générales	115
8. Originalité et contributions novatrices de la thèse	117
RÉFÉRENCES	119
Mots-clés: gingivite induites par la plaque dentaire, les composés polyphénoliques des plantes, l'argousier, biofilms buccaux, composés anti-plaque	

INTRODUCTION

Le biofilm de la plaque dentaire représente à présent un problème de santé publique qui touche la population de tous les pays quel que soit leur niveau de développement. L'implication des biofilms oraux dans le développement et l'évolution de la carie dentaire et des maladies parodontales est maintenant une certitude.

L'augmentation de l'incidence de la gingivite induite par la plaque dentaire parmi la population et son développement, si elle n'est pas traitée, vers la maladie parodontale, impose l'intervention rapide des praticiens en vue de la prévention et du traitement de cette maladie. En ce sens on doit conférer un rôle essentiel au contrôle du niveau de la plaque bactérienne dans accumule dans la cavité buccale. L'attention du chirurgien dentiste est dirigée régulièrement vers l'élimination mécanique du facteur causal – la plaque et le tartre, cela étant essentiel pour la résolution des signes cliniques. Un rôle de la même importance revient toutefois au patient, par les mesures d'hygiène bucco-dentaire qu'il applique au domicile. Le manque de motivation des patients pour maintenir une l'hygiène buccale correcte et les difficultés rencontrées par la plupart des gens concernant l'élimination efficace de la plaque dentaire sont souvent la cause d'une récurrence de l'inflammation du parodonte marginal. Ainsi la nécessité d'enrichir l'arsenal thérapeutique employé dans le combat contre cette affection est de plus en plus évidente. Une façon simple et accessible est l'administration au cours du brossage des substances antiseptique destinées à diminuer les bactéries dans la bouche et de prévenir la réinstallation de la plaque dentaire. Puisque la plupart des préparations développées comme agents anti-plaque est basée sur des substances chimiques leur emploi implique de certains effets secondaires. Les patients d'aujourd'hui sont de plus en plus conscients et plus préoccupés par le contenu, la qualité et le rapport risques / avantages des produits qu'ils utilisent. On peut observer la tendance de ceux-ci de refuser des préparations chimique étant intéressés en permanence par des effets indésirables qui puissent apparaître.

A partir de ces prémisses dans cette thèse on se propose de développer un bain de bouche basé sur des extraits naturels un produit original destine a la hygiène orale.

CONTRIBUTION PERSONNELLE

Hypothèse de travail. Objectifs

Dans la flore spontanée de notre pays il y a une plante à multiples effets thérapeutiques. Les applications dans la médecine sont nombreuses, cette herbe prouvant son efficacité dans les maladies cardiovasculaires, dans la prévention et traitement de l'ulcère gastrique et duodénal et des troubles cutanés. Il se remarque par les effets bénéfiques qu'il induit sur les maladies des muqueuses et de la peau. Malgré ca l'argousier est très peu étudié concernant ses effets sur les maladies de la cavité buccale. En tenant compte de la complexité des mécanismes qui induisent la régénération des tissus et la réépithélisation ainsi que le caractère fortement antioxydant et antibactérien on a développé un rince-bouche à base d'huile essentielle d'argousier. Par cela on a suivi l'évaluation des effets de l'argousier in vitro sur les bactéries buccales et in vivo sur la gingivite induite par la plaque.

Les études microbiologiques ont comme objectifs:

1. l'évaluation du potentiel antimicrobien du bain de bouche à base d'argousier sur plusieurs espèces bactériennes et fongiques orales
2. la capacité du bain de bouche à base d'argousier à inhiber la formation de biofilms oraux
3. l'effet du bain de bouche sur les biofilms déjà établi

Les études cliniques ont pour objectifs:

1. l'évaluation de l'effet du bain de bouche à base d'argousier sur l'indice gingival et l'indice de plaque
2. la comparaison des effets du produit original sur le parodonte marginal superficiel avec les résultats des produits similaires à base d'extraits naturels, déjà sur le marché
3. tester l'administration d'argousier par voie générale sur la gingivite induite par la plaque bactérienne, en tenant compte du potentiel des aliments fonctionnels de l'argousier.

Etude 1 Evaluation de l'effet antimicrobiens d'un bain de bouche à base d'argousier

Matériel et méthodes. Pour déterminer l'effet antibactérien et antifongique d'un bain de bouche à base d'argousier à partir des souches bactériennes *Streptococcus gordonii*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces viscosus* et *Candida albicans* on a utilisées les procédures standard requises par les normes européennes EN-NF 1040 et 1725 à déterminer l'activité antibactérienne antifongique de base des solutions antiseptiques et désinfectantes. Tout en employant le même protocole de travail on a étudié les qualités d'un bain de bouche à base de chlorhexidine 0.12% et un à base d'extraits de plantes, les trois produits étant appréciées d'une manière comparative.

Les résultats ont démontré un potentiel 100% bactéricide du produit original sur les souches *S.gordonii* et *P.gingivalis*, la même efficacité étant observée dans le produit à base de chlorhexidine à 0,12%, entre les deux produits il n'y a pas de différences statistiquement significatives ($p < 0,05$). Le bain de bouche à base d'argousier présente un faible effet bactériostatique sur *A.viscosus* et n'a aucun potentiel antifongique, la chlorhexidine 0,12% est fortement statistiquement significative meilleure ($p < 0,05$) sur l'espèce *A.viscosus* et *C.ablicans* ayant un effet 100% bactéricide. Le produit à base d'extraits végétaux a eu la plus grande efficacité sur l'espèce *P.gingivalis* et un potentiel antimicrobien réduit sur le reste des souches bactériennes étudiées.

Pour conclure on peut affirmer que le bain de bouche à base d'argousier présente un effet antimicrobien sélectif étant le plus efficace sur des souches bactériennes avec pathogénicité augmentée et moins efficace sur d'autres espèces. Cette fonction permettrait l'utilisation de ce produit pendant de longues périodes de temps sans présenter le risque de l'induction des déséquilibres dans la microbiote de la cavité buccale.

Etude 2 Etude comparative sur l'effet antibiofilm des trois bains de bouche

Le but de cette étude était d'établir l'effet des trois bains de bouche sur les biofilms buccaux.

Matériel et méthodes. Les produits étudiés sont les suivants: bain de bouche expérimentale à base d'argousier, un rince-bouche à base de chlorhexidine 0.12% qui a été considéré comme le produit de référence et un autre bain de bouche à base d'extraits végétaux pour comparer le produit développé dans ce travail avec un produit similaire. Les souches microbiennes utilisées étaient les mêmes que dans l'étude 1. La méthodologie de recherche a utilisé la technique Biofilm Ring Test[®] (Saint Beuzire, France). Le principe est basé sur l'adjonction dans la solution bactérienne des billes magnétiques ayant un diamètre de 5 microns. La solution bactérienne est inoculée dans des barrettes de polystyrène de 8 puits chacune et incubée le temps nécessaire pour la formation du biofilm. Pendant la formation du biofilm les bactéries synthétisent la matrice exopolysaccharidique. Les billes magnétiques ajoutées à la solution bactérienne seront incorporées dans la matrice et retenues fermement à l'intérieur du biofilm. Après incubation un liquide de contraste qui permette la lecture des barrettes par un scanner spécial est ajouté dans les puits. Après une première lecture les barrettes sont placées dans un block magnétique spécial et elles sont aimantées pendant 1 minute. Les billes qui n'ont pas été retenues dans la matrice lors de la formation des biofilms

seront attirées vers le fond des puits formant un anneau rouge. Après aimantation une deuxième lecture est effectuée et les données sont transmises à un ordinateur. Il permettra de comparer les images obtenues entre la première et la deuxième lecture dans chaque puits et de calculer une valeur appelée indice de formation de biofilm (BFI Biofilm Forming Index). Si les biofilms sont présents, le nombre des billes attirés par aimantation au fond des puits sera réduit, voire absente. Un BFI plus égale ou inférieure à 2 indique la formation complète d'un biofilm traduit par une image d'absence d'un anneau rouge. Un BFI dans la gamme 2-7 doit être interprétée comme un biofilm en cours de formation, l'image montre un anneau rouge moins visible. Une valeur de BFI plus élevée de 7 signifie une absence totale de l'apparition du biofilm et une image montrant un anneau rouge au fond des puits. On a étudié deux aspects concernant les effets des bains de bouche sur les biofilms buccaux, c'est à dire: 1. le potentiels des produits d'empêcher l'adhérence bactérienne et la formation du biofilm sur une surface prétraitée avec un des produits évalués 2. la capacité des bains de bouche de détacher les biofilms buccaux des surfaces sur lesquelles ils ont été formés.

Dans cette étude, nous avons utilisé des biofilms mono-bactériennes, bi-bactériens et des biofilms complexes constitués de quatre souches bactériennes.

Les résultats ont révélé que les bains de bouche à base de chlorhexidine 0.12% et respectivement d'argousier ont le potentiel d'inhiber complètement la formation de biofilms bactériens sur les surfaces prétraitées avec un de ces produits. Leur potentiel anti-biofilm est indépendant du nombre et du type de souches microbiennes incluses dans les biofilms entre les deux produits il n'y a pas de différences statistiquement significatives. Le bain de bouche à base d'extraits végétaux n'a montré aucune capacité à inhiber la formation de biofilms, entre ceci et d'autres produits étudiés il y a des différences statistiquement significatives.

Aucun des produits étudiés ne présente pas de potentiel évident de détacher les biofilms des surfaces sur lesquelles ils ont été formés, il n'y pas de différences statistiquement significatives entre eux. Sève le bain de bouche a base d'argousier a montré une tendance de détachement du biofilm constitué de *P.gingivalis*.

Enfin le bain de bouche expérimentale à base d'argousier a un potentiel antibiofilm comparable avec la chlorhexidine 0.12%, en combinant cet effet avec les avantages d'un produit sans additifs et conservateurs dans la composition.

Étude 3 Recherche clinique sur l'influence des deux bains de bouche à base d'extraits de plantes sur les indices gingivaux et la plaque

Le but de cette étude était de déterminer l'efficacité clinique du produit expérimental à base d'argousier et de la comparer à l'efficacité d'un autre produit à base d'huiles essentielles (Listerine®) dont l'efficacité clinique et microbiologique a été confirmée par de nombreuses études.

Matériel et méthodes. Nous avons effectué une recherche clinique contrôlée, randomisée, en simple aveugle, avec des groupes parallèles, qui a été menée sur une période de deux semaines. La recherche a été menée sur un échantillon de 60 patients âgés de 20-48 ans avec un indice gingivale modifiée (MGI) supérieur à 1.5 et un indice de plaque supérieur à 1.75 carte

Les préparations utilisées étaient le bain de bouche à base d'argousier, Listerine® et un bain de bouche placebo. Les sujets ont été répartis au hasard en trois groupes, le groupe E en utilisant le bain de bouche avec argousier, le groupe L le bain de bouche Listerine® et la préparation placebo groupe C pendant 14 jours, deux fois par jour. On a déterminée le MGI, PI et l'index de saignement sulculaire (SBI) au départ et après 14 jours de traitement. L'efficacité des produits a été calculée en tant que la différence entre les paramètres cliniques mesurés au début et à la fin du traitement et aussi bien que la réduction de pourcentage du valeurs par la formule exigée par l'American Dental Association en tant que norme pour déterminer l'efficacité clinique des produits d'hygiène dentaire. L'analyse statistique a été

réalisée en utilisant le test t Student sur des échantillons indépendants pour comparer les valeurs initiales et finales des paramètres cliniques et analyses ANOVA pour comparer l'efficacité des produits.

Les résultats ont montré une réduction statistiquement significative de la valeur des MIG et PI après 14 jours de traitement dans les trois groupes. SBI a montré une réduction statistiquement significative dans les groupes E et L, dans le groupe C la réduction n'était pas statistiquement significative. L'évaluation de réduction procentuelle et de l'analyse statistique n'a montré aucune différence statistiquement significative entre le bain de bouche à base d'argousier et Listerine® concernant la réduction de MIG et PI, mais Listerine® est significativement plus efficace dans la réduction de SBI.

En conclusion l'essai clinique a démontré une efficacité du produit à base d'argousier analogue à celle de Listerine® pour réduire les indices du plaque dentaire et de la gingivite.

Étude 4 Effet de l'argousier sur la gingivite induite par la plaque bactérienne

Cette dernière étude vise à évaluer l'effet de l'argousier administré comme un aliment fonctionnel par l'inflammation gingivale. L'argousier considéré une ployvitamine naturelle induit la croissance de tonique général du corps. On a voulu étudier l'impact de l'état général de l'organisme sur le développement et le traitement de la plaque induite par la gingivite.

Matériel et méthodes. La préparation active utilisée dans cette étude était un aliment fonctionnel, un gelée à base d'argousier, produit par le Centre de Biotechnologie Végétale Appliquée, PROPLANTA (Cluj-Napoca, Roumanie). Nous avons effectué un essai clinique contrôlé, randomisé, en double aveugle, avec des groupes parallèles, déroulé pendant une période de 30 jours, sur un échantillon de 60 patients âgés de 20-50 ans. Les patients ont été répartis au hasard en trois groupes. Le groupe S1 comprenait des patients qui ont utilisé seulement la préparation à base d'argousier. Les patients du groupe S2 ont été traités par hygiénisation professionnelle et administration de produit à base d'argousier. Les patients du groupe P avait consommé un placebo. On a déterminé le SBI et MGI au début et après 30 jours de traitement.

Résultats. Les paramètres cliniques ont montré une diminution statistiquement significative dans les groupes S1 et S2. La diminution la plus importante a été enregistrée dans le groupe S2, diminution significativement supérieure à celle observée dans le groupe S1 et P.

En conclusion, nous estimons que la consommation d'argousier est bénéfique à l'état de la gencive, mais la plus efficace est la combinaison de l'hygiène locale avec la consommation d'argousier.

Discussion générale

Les résultats des études microbiologiques et cliniques permettent de concevoir de nouveaux régimes thérapeutiques. Ainsi, on considère que le rôle central dans le traitement de la gingivite induite par la plaque bactérienne se trouve dans les techniques mécaniques d'enlèvement de la plaque et du tartre et dans la motivation des patients pour maintenir une bonne hygiène bucco-dentaire. Mais leur association avec des produits complémentaires d'hygiène buccale est bénéfique, le bain de bouche à base d'argousier représentant un produit efficace comme montre l'essai clinique. Le schéma thérapeutique doit fournir aussi un moyen de tonifier le corps, les produits à base d'argousier montrent très efficaces en cet égard.

Le produit original à base d'argousier développée au cours de ce travail représente donc une alternative viable aux produits existants déjà sur le marché, ce qui représente un produit attrayant pour les patients, parce que dans sa composition se trouvent des composés naturels et non pas d'additifs et des conservateurs.

Conclusions générales:

1. Le bain de bouche à base d'argousier a une bonne activité antibactérienne sur les espèces *S.gordonii* et *P.gingivalis*, comparable au bain de bouche à base de chlorhexidine

0.12%, mais un effet antifongique réduit.

2. La préparation à base d'argousier a la capacité d'inhiber complètement la formation de biofilms mono-ou poly-bactérienne sur les surfaces prétraitées en préalablement avec ce produit.

3. Aucune des préparations utilisées dans la présente étude pour traiter le biofilm déjà établie n'a montré quelque potentiel évident de les détacher.

4. Le bain de bouche à base d'argousier a une bonne efficacité dans la lutte contre la plaque dentaire et l'inflammation gingivale en résultant des réductions statistiquement significatives de MGI, SBI et PI après une période de 14 jours de traitement.

5. Les effets obtenus en utilisant le bain de bouche à base d'argousier pour le traitement de la gingivite et pour le contrôle du niveau de la plaque dentaire sont comparables à celles du produit Listerine®.

6. Les effets indésirables survenus consécutivement à l'utilisation des produits étudiés étaient d'intensité faible et transitoire, étant plus exprimés pour le produit Listerine® et inférieurs pour le produit original.

7. L'argousier, généralement administré sous diverses formes et préparations peut représenter un complément dans le traitement de la gingivite associée avec les moyens thérapeutiques locales, fournissant aux patients avec des maladies de la gencive un support dans la tonification corporelle, tout en promouvant la guérison et l'amélioration de la réactivité du corps.

8. Les résultats obtenus au cours de cette recherche sur le très fort potentiel anti-biofilm de l'extrait d'argousier sont comparables à la chlorhexidine 0.12%, l'efficacité de l'argousier dans la réduction de l'inflammation des gencives est comparable à l'efficacité du Listerine®, cela recommandant l'argousier pour en nouveau potentiel agent anti-plaque et anti-gingivite.

Références sélectives:

1. Gunsolley J. A meta-analysis of six month clinical studies of anti-plaque and anti-gingivitis agents. *J Am Dent Assoc.* 2006 Dec; 137(12):1649-1657
2. Barnett M. The rationale for the daily use of an antimicrobial mouthrinse. *J Am Dent Assoc.* 2006 Nov;137(Suppl 3):16S-21S
3. Fine D, Listerine: past, present and future – A test of thyme. *J of Dentistry.* 2010 July; 38(S1):S2-S5
4. Donlan M, Costerton WJ. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms, *Clin Microbiol Rev.* 2002 Apr; 15(2):167–193
5. Thomas J C, Lindsay A, Nakaishi B S. Managing the complexity of a dynamic biofilm. *J Am Dent Assoc.* 2006 Nov; 137(Suppl3):S10-S15
6. Marsh P. Dental Plaque as a Microbial Biofilm. *Caries Res.* 2004 Jun; 38(3):204–211
Newman M.G, Takei H, Caranza F. *Caranza's Clinical Periodontology.* Philadelphia:Saunders Company;2003
7. Chavant P, Gaillard-Martinie B, Talon R, Hébraud M, Bernardi T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J Microbiol Methods.* 2007 Mar; 68(3):605-612
8. Loe H, Theilande E, Jensen B, Schiott C. Experimental gingivitis in man. *J Period Res.* 1967 Aug; 2(4):282-289
9. Baehni P, Takeuchi Y. Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. *Oral Diseases.* 2003 Jun; 9 (Suppl. 1): S23–S29
10. Petersilka G, Ehmke B, Flemmig T. Antimicrobial effects of mechanical debridement. *Periodontology 2000.* 2002 Jan; 28(1): 56–71
11. McCracken G, Janssen J, Heasman L, Stacey F, Steen N, deJager M, Heasman P. Assessing adherence with toothbrushing instructions using a data logger toothbrush.

- Br Dent J. 2005 Jan; 198(1):29-32;
12. Mager DL, Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky S. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J Clin of Period* 2003 Jul; 30(7):644–654.
 13. Charles CH, Mostler KM, Bartels LL, Mankodi SM: Comparative antiplaque and antigingivitis effectiveness of a chlorhexidine and an essential oil mouthrinse: 6-month clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2004 Oct; 31(10): 878–884
 14. Schiött C, Briner W, Kirkland J, Loe H. Two year oral use of chlorhexidine in man. III. Changes in sensitivity of the salivary flora. *J. Peridontal Res*. 1976 Jun; 11(3):153–157.
 15. Fine D, Furgang D, Lieb R, Korik I, Vincent J, Barnett M. Effects of sublethal exposure to an antiseptic mouthrinse on representative plaque bacteria. *J Clin Periodontol*. 1996 May;23(5):444-451.
 16. Li T, Beveridge T, Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*)- Production and utilization. Ottawa: NRC Research Press;2003
 17. Rați V.I., Rați L. Cătina albă în exploatații agricole, Agenția Națională de Consultanță Agricolă; 2003
 18. Muntean LS. Tratat de plante medicinale cultivate și spontane. Cluj-Napoca: Risoprint; 2007
 19. Zeb A. Chemical and Nutritional Constituents of Sea Buckthorn Juice, *Pak Journ of Nutr*. 2004; 3(2):99-106
 20. Kallio H, Yang BR, Peippo P. Effects of different origins and harvesting time on vitamin C, tocopherols, and tocotrienols in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) berries. *J Agri Food Chem*, 2002 Sep; 50(21): 6136-6142
 21. Yang B, Kallio H. Composition and physiological effects of sea buckthorn (*Hippophae*) lipids. *Trends Food Sci Tech*. 2002 May; 13(5):160-167
 22. Barnett M. The role of therapeutic antimicrobial mouthrinses in clinical practice Control of supragingival plaque and gingivitis. *J Am Dent Assoc*. 2003; 134:699-704
 23. Gunsolley J. Clinical efficacy of antimicrobial mouthrinses. *J Dent*. 2010 Jul; 38(Suppl1):S6-S10
 24. Santos A: Evidence-based control of plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol* 2003; 30 (Suppl. 5): 13–16
 25. Acceptance Program Guidelines Council on Scientific Affairs July 2008 Chemotherapeutic Products for Control of Gingivitis.American Dental Association. 7.01.2008. sursa electronic www.ada.org

