

UNIVERSITATEA "BABEȘ-BOLYAI" CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE FIZICĂ
SPECIALIZAREA BIOFIZICĂ ȘI FIZICĂ MEDICALĂ(BFM)

LUCRARE DE DISERTAȚIE

Coordonator științific
Conf. Dr. Maniu Dana

Absolvent
Poruțiu Alina-Mirela

2023

UNIVERSITATEA "BABEȘ-BOLYAI" CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE FIZICĂ
SPECIALIZAREA BIOFIZICĂ ȘI FIZICĂ MEDICALĂ(BFM)

LUCRARE DE DISERTAȚIE

**Studiul clinic și spectroscopic al unor agenți
revelatori de placă bacteriană**

Coordonator științific
Conf. Dr. Maniu Dana

Absolvent
Poruțiu Alina-Mirela

2023

Cuprins

Introducere

Capitolul I: Considerații teoretice..... pag.6

I.1 Sănătatea orală

I.2 Placa bacteriană

I.3 Formarea plăcii bacteriene

I.4 Revelatori de placă bacteriană

I.4.1 Mecanismul de acțiune al agentului de divulgare cu doua tonuri

I.5 Toxicitatea eritrozinei

Capitolul II: Studiul clinic..... pag.12

II.1 Informații despre participanții la studiu

II.2 Procesul de captare a biofilmului

II.3 Indicele de igienă O'Leary si Lindhe – HI

II.4 Interpretarea rezultatelor

Concluzii

Capitolul III: Studiul experimental..... pag.19

III.1 Prepararea soluțiilor

III.2 Absorbția UV-Vis a agenților de revelare a plăcii bacteriene

III.3 Emisia de fluorescență a agenților de revelare a plăcii bacteriene

Concluzii finale și perspective viitoare

Bibliografie

Abstract

Promoting and protecting oral health, contributes to the maintenance of general health and well-being and should therefore be improved and prioritized. The development and accumulation of dental plaque (biofilm) is one of the major causes of gum disease and tooth decay. Usually, the dental plaque is transparent, colourless and not visible. To remove plaque effectively, it must first be detected. Dental plaque can be detected with special dyes called plaque revealers. A plaque revealer is a material that, when applied to natural teeth, makes the biofilm visible by staining it.

In this work entitled "Clinical and spectroscopic study of some disclosing agents", two studies are presented: one clinical and the other experimental spectroscopic of revealing agents.

The study begins with an introduction to oral health and gives a general presentation of biofilm and plaque-revealing agents, especially double-staining agents, more precisely discusses their action and properties. This chapter also focuses on the toxicity of erythrosine (a dye often used in dentistry)

The clinical research aims to evaluate the distribution of microbial plaque on the dental surfaces is evaluates with the help of the bacterial plaque revealer with double coloring that does not contain erythrosin. The analysis was performed according to the clinical work protocol of the O'Leary and Lindhe hygiene index - HI. The values were grouped on the two arches (maxilla-mandible), on each type of surface (mesial, distal, vestibular, oral) and on the front and side areas on each arch

The last part of the work presents the spectroscopic analysis of two bacterial plaque revealers: one containing erythrosine (E127) and the other not.

Next, the absorption process is explained by characterizing the disclosing agents using UV-Vis spectroscopy to investigate the optical properties.

This chapter ends with the study of the fluorescence emission and the testing of the stability over time of the bacterial plaque revealing solutions.

The final presents the final conclusions of the presented work and potential future research directions.

Introducere

Protejarea și promovarea sănătății orale contribuie în mod decisiv la menținerea sănătății generale și a bunăstării și, prin urmare, ar trebui să fie prioritizate și îmbunătățite. Dezvoltarea și acumularea plăcii dentare (biofilmului) este una dintre cauzele majore ale cariilor dentare și ale bolilor gingiilor. De obicei, placa dentară este transparentă, incoloră și nu este prea ușor vizibilă. Pentru a fi îndepărtată placa bacteriană eficient, trebuie mai întâi detectată cu precizie. Biofilmul poate fi detectat cu coloranți speciali care se numesc revelatori de placă bacteriană. Un agent revelator de placă bacteriană este un material care, atunci când este aplicat pe dinții naturali, face vizibil biofilmul colorându-l.

În lucrarea de față, intitulată “Studiul clinic și spectroscopic al unor agenți revelatori de placă bacteriană” sunt prezentate 2 studii: unul clinic iar celalalt experimental spectroscopic a două tipuri de revelatori de placă bacteriană.

Lucrarea este structurată în 3 capitole. Primul capitol începe cu o introducere în sănătatea orală și face o prezentare generală a biofilmului și agenților revelatori de placă bacteriană, în special al agenților cu dublă colorație, mai exact discută acțiunea și proprietățile acestora. Acest capitol analizează și toxicitatea eritrozinei (un colorant des utilizat în stomatologie)

Al doilea capitol prezintă o cercetare clinică care are ca și scop să analizeze acumularea plăcii bacteriene de la nivelul suprafețelor dentare cu ajutorul revelatorului de placă bacteriană cu dublă colorație care nu conține eritrozină. Analiza s-a efectuat în conformitate cu protocolul clinic al indicelui de igienă O’Leary și Lindhe – HI. Valorile au fost grupate pe arcade (maxilar-mandibulă), pe fiecare tip de suprafață (mezial, distal, vestibular, oral) și pe zonele frontale și laterale pe fiecare arcadă de unde s-au dedus și concluziile finale ale acestui studiu.

Al treilea capitol se ocupă de analiza spectroscopică a doi revelatori de placă bacteriană: unul care conține eritrozină (E127) iar celalalt nu.

Este explicat procesul de absorbție prin caracterizarea soluțiilor revelatoare folosind spectroscopia UV-Vis pentru a investiga proprietățile optice și s-au identificat specrele corespunzătoare coloranților alimentari specifici fiecărui revelator.

Acest capitol se încheie cu studiul emisiei de fluorescență și testarea stabilității în timp a soluțiilor revelatoare de placă bacteriană.

La sfârșitul lucrării sunt prezentate concluziile finale și potențialele direcții de cercetare viitoare.

Capitolul I:

I.1 Sănătatea orală

Relația puternică și bidirecțională dintre sănătatea orală și sănătatea generală a corpului uman este acum dovedită [1] Protejarea și promovarea sănătății orale contribuie în mod decisiv la menținerea sănătății generale și a bunăstării și, prin urmare, ar trebui să fie prioritizate și îmbunătățite. Rolul furnizorilor de servicii medicale publice este crucial în acest efort. Oferirea de educație a publicului în legătură cu igiena orală la o vârstă fragedă se dovedește a fi deosebit de eficientă. [2]

Dezvoltarea și acumularea plăcii dentare (biofilmului) poate duce la carii dentare (distrugerea localizată a țesutului dentar de către acizii produși de degradarea bacteriană a zaharurilor fermentabile) precum și la probleme parodontale, cum ar fi gingivita (fig1) [3] și boala parodontală; Prin urmare, este important să o detectăm și să o îndepărtăm. Placa poate fi controlată și îndepărtată prin periaj adecvat zilnic, de două ori pe zi și prin utilizarea de ajutoare interdente, cum ar fi ața dentară și periute interdente. Igiena orală este importantă deoarece biofilmele dentare pot deveni acide, determinând dinții să se demineralizeze (cunoscute și sub numele de carii) sau să se întărească în tartru. Tartrul nu poate fi îndepărtat prin periaj sau ajutoare interdente, doar prin curățare profesională. [4]

Pentru a fi îndepărtată placa bacteriană eficient, trebuie mai întâi detectată cu precizie. Biofilmul poate fi detectat cu coloranți speciali care se numesc revelatori de placă bacteriană [5]. Acești revelatori se găsesc sub formă de tablete, soluții, plachete, sau apă de gură, colorând zonele cavității bucale în care este prezent biofilmul; intensitatea culorii depinde de grosimea plăcii. Utilizarea acestor agenți de dezvăluire este foarte eficientă. [6]



Fig I.1 Efectul plăcii bacteriene asupra gingiei [3]

I.2 Placa bacteriană

Placa bacteriană sau placa dentară este un biofilm de microorganisme (în mare parte bacterii, dar și ciuperci) care crește pe suprafețele din cavitatea bucală. Este un depozit lipicios incolor la început, dar când formează tartru, este adesea maro sau galben pal. Se găsește în mod obișnuit între dinți, în fața dinților, în spatele dinților, pe suprafețele de mestecat, de-a lungul liniei gingivale (supragingival) sau sub marginile cervicale ale liniei gingivale (subgingival). Placa dentară este cunoscută și sub denumirea de biofilm oral, placă microbială, biofilm dentar, biofilm de plăci bacteriene sau biofilm de plăci dentare. Placa bacteriană este una dintre cauzele majore ale cariilor dentare și ale bolilor gingiilor. [7]

Biofilmul este definit ca „comunități bacteriene care sunt încorporate într-o matrice autoprodusă de substanțe polimerice extracelulare” [8]

Placa bacteriană trebuie diferențiată de o structură care se formează în cavitatea bucală a persoanelor cu o igienă precară, numită materie albă.

Aceasta se compune din reziduri alimentare și se diferențiază de placă prin următoarele aspecte: aderență și structură. Acest strat este compus din unirea bacteriilor, celulelor epiteliale și leucocitelor, de la suprafața biofilmului sau de la suprafața dintelui de unde se poate îndepărta cu ușurință, datorită aderenței scăzute chiar prin spălare cu spray de apă. Placa dentară necesită periaj dentar corect efectuat și complet pentru a fi îndepărtată. [3]

I.3 Formarea plăcii bacteriene

Cantitatea plăcii bacteriene care se formează, precum și când și unde se formează, poate varia de la persoană la persoană și este determinată de mai mulți factori: cantitatea de salivă precum și calitatea ei, dieta, igiena orală, vârsta, aranjamentul pe arcade a dinților sau prezența afecțiunilor generale.

Formarea plăcii bacteriene se împarte în trei etape:

- Etapa formării membranei primare care acoperă dintele
- Etapa primară a colonizării bacteriene a biofilmului
- Etapa maturării plăcii bacteriene

Membrana primară semnifică stadiul inițial al dezvoltării plăcii dentare și toate structurile din cavitatea bucală sunt acoperite cu o membrană structurală organică compusă din lichid cervical, glicoproteine salivare, metabolite și resturi celulare. Ele sunt depuse în

porozitățile smaltului din cauza dezvoltării incomplete a smaltului dinților și sunt un substrat nutritiv pentru dezvoltarea bacteriilor. În primele ore, microorganismele sunt absente, dar colonizează rapid bacteriile pioniere. Colonizarea primară nu depinde de prezența zaharozii. Dezvoltarea de la membrană la placa dentară este un proces foarte rapid și are loc prin atașarea unui strat inițial de bacterii, celule polimorfonucleare și celule epiteliale. Durata aproximativă este de două ore pentru a se forma inițial placa dentară, iar după aceea se așează pe suprafețele ocluzale ale dinților. După două zile de la apariție, volumul plăcii se dublează, bacteriile devin coalescente, iar în 21 de zile colonia microbiană se stabilizează. Etapele de postcolonizare ale bacteriilor necesită prezența zaharozii ca substrat esențial pentru biosinteză. De îndată ce se formează o placă bacteriană, bacteriile secundare continuă să se colonizeze și să se maturizeze, astfel încât în cele din urmă să se acumuleze un număr foarte mare de germeni în cadrul structurii. Plăcile bacteriene mature apar în decurs de 30 de zile de la colonizarea microbiană a biofilmului primar. Pe lângă microorganisme, alte componente ale plăcilor bacteriene mature sunt: celule epiteliale, globule roșii, globule albe, particule de alimente, protozoare. Placa dentară matură poate metaboliza zaharoza alimentară rapid prin lanțuri glicolitice pentru a produce acizi organici care scad profund și persistent pH-ul plăcii. Astfel, activitatea cariogenă a plăcii nu este stimulată mai mult de aportul de zaharoză, ci mai mult de frecvența aportului.

Trebuie amintit că placa bacteriană se formează și se acumulează permanent pe dinți. Dacă placa nu este îndepărtată la timp, interfața dintre placă și dinte va scădea treptat valoarea pH-ului. Când se atinge un prag critic (aproximativ 5), începe procesul de demineralizare a smaltului. Prin urmare, este necesar să se îndepărteze în mod constant placa bacteriană din structurile orale respectând regulile de igienă și alimentație pentru a menține dinții sănătoși [3].

I.4 Revelatori de placă bacteriană

Îndepărtarea biofilmului din diferite zone ale cavității bucale este de mare importanță pentru prevenirea bolilor bucale și se realizează prin îndepărtarea regulată personală și profesională [9].

Pentru a îndepărta eficient placa bacteriană [10][5], aceasta trebuie mai întâi identificată cu precizie. Biofilmul poate fi detectat cu acuratețe folosind coloranți speciali numiți revelatori de placă bacteriană, în principal iod, violet de gențiană, eritrozină, fuchsin bazic, verde rapid, coloranți alimentari, fluoresceină [11][6]. Acești agenți se găsesc sub formă de tablete, soluții, plachete, sau apă de gură (fig 1.2), colorând zonele cavității

bucale în care este prezent biofilmul; intensitatea culorii depinde de grosimea plăcii. Utilizarea acestor agenți de dezvăluire este foarte eficientă. [12][6]



Fig I.2. Agenți revelatori de placă bacteriană [13][14][15][16]

Un agent revelator de biofilm este un material care, atunci când este aplicat pe dinții naturali, face vizibil biofilmul, concentrându-se pe zonele care au fost ratate în timpul periajului zilnic.

Utilizarea acestor agenți de dezvăluire este foarte eficientă, deoarece ajută la (a) stabilirea nivelului de igienă orală a utilizatorului, (b) conștientizarea necesității de îndepărtare a biofilmului, (c) furnizarea de instrucțiuni personalizate și stimulente pentru o mai bună igienă orală, (d) să faciliteze autoevaluarea utilizatorilor, (e) să măsoare eficacitatea igienei orale, (f) să evalueze programele de prevenire și formare pentru o mai bună igienă orală și (g) să permită studii privind identificarea biofilmului. [17]

În figura I.3 este prezentat procesul de colorare al agentului de relevare asupra cavității bucale, observăm ca acești agenți acționează prin schimbarea culorii plăcii dentare

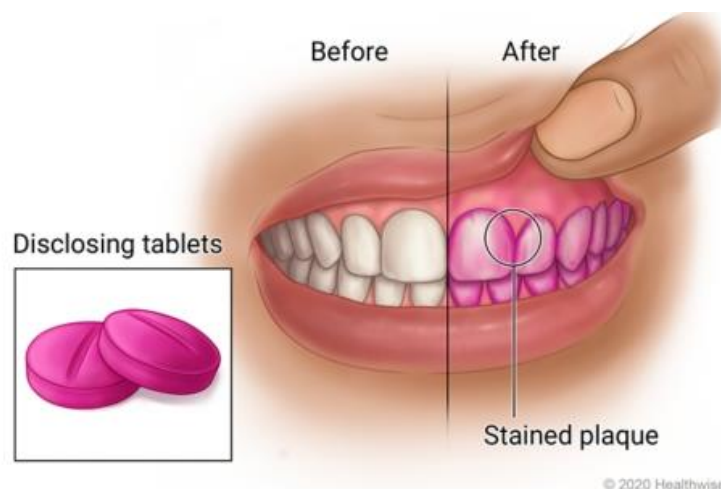


Fig I.3 Procesul de colorare al revelatorilor de placă bacteriană [18]

Observăm cum tabletele revelatoare colorează placa bacteriană care nu ar fi la fel de vizibilă fără ajutorul acestora

I.4.1 Mecanismul de acțiune al agentului de divulgare cu două tonuri

Soluțiile de dezvăluire funcționează prin schimbarea culorii plăcii dentare, astfel încât aceasta să contrasteze cu suprafața albă a dintelui. Placa dentară are capacitatea de a reține un număr mare de substanțe colorante care pot fi utilizate în scopuri de dezvăluire (fig I.4). Această proprietate este legată de interacțiune, din cauza diferenței de polaritate dintre componentele plăcii și coloranți. Particulele sunt legate de suprafață prin interacțiuni electrostatice (proteine) și legături de hidrogen (polizaharide). [19]

Gallagher și colaboratorii au efectuat teste in vivo și in vitro pentru a estima mecanismul fenomenului de colorare diferențială a agentului de dezvăluire în două tonuri (Dis-plaque). Rezultatele au demonstrat că colorarea diferențială a fost dependentă de grosime și nu este asociată cu factori bacterieni sau biochimici. Astfel, s-a ajuns la concluzia că metacromazia plăcii dentare colorată cu agent de dezvăluire bicolor (Dis-Plaque) a fost rezultatul unui fenomen de difuzie în care o componentă difuzează mai ușor decât alta din placă, mai degrabă decât din orice modificări chimice care ar putea apărea in vivo. [20]

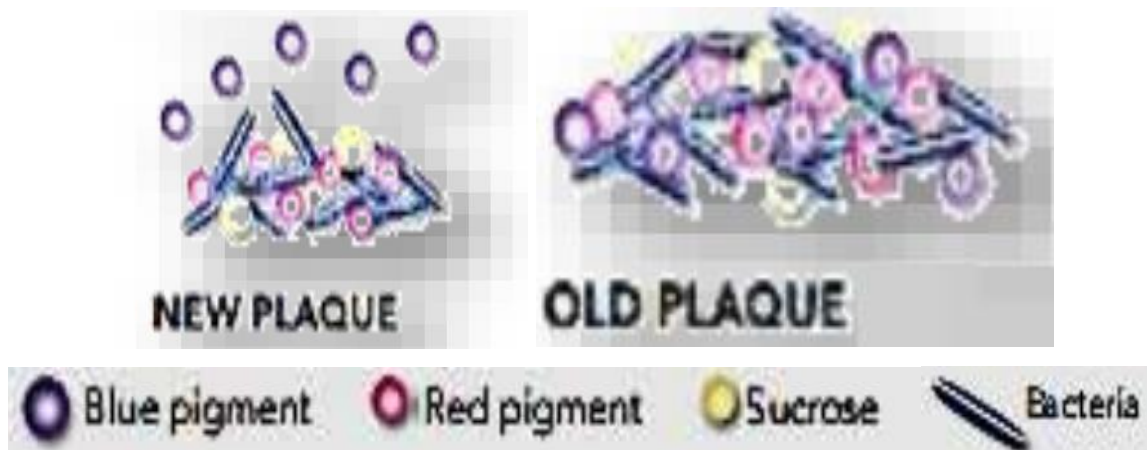


Fig. I.4 Acțiunea revelatorilor asupra biofilmului [21]

În imaginea I.4 observăm cum asupra plăcii bacteriene recente acționează doar pigmentul roșu iar pigmentul albastru nu acționează datorită dimensiunii în grosime mai mică a plăcii iar asupra plăcii mature a acționat atât pigmentul roz cât și cel albastru fiind vorba de o placă bacteriană de grosime mai mare

Vizualizarea în direct a suprafețelor colorate ale dinților facilitează înțelegerea diferitelor concepte teoretice și termeni medicali asociați cu acestea [22]. De asemenea, în ceea

ce privește educația experiențială a elevilor de școală, în ceea ce privește utilizarea instrumentelor de igienă orală, colorarea biofilmului permite o îndrumare mai bună și mai eficientă din partea instructorilor din domeniul sănătății. [23]

I.5 Toxicitatea eritrozinei

Eritrozina, cunoscută sub numele de Red No. 3, este un compus organo-iod și cel mai utilizat colorant în agenții de dezvăluire a plăcii dentare. Fluoresceina, care este observată sub lumină ultravioletă, este, de asemenea, utilizată ca agent de dezvăluire a plăcii dentare. În plus, sunt utilizate în general sisteme de colorare în două tonuri care amestecă eritrozina cu Fast Green sau Brilliant Blue. Conform Drug Safety Country, Sistemul de Informații Integrat Farmaceutic al Ministerului pentru Siguranța Alimentelor și Medicamentelor, Red No. 3 (eritrozina) este utilizat în gel dentar, suspensii orale, agent capsule tari și moi și alte produse orale în Coreea. Cu toate acestea, studiile au arătat că dozele mari cauzează cancer la șoareci, iar Administrația SUA pentru Alimente și Medicamente (FDA) a interzis parțial eritrozina în 1990 (FDA, 1990). S-a raportat că ingestia cronică de eritrozină provoacă stimularea cronică a tiroidei de către hormonul de stimulare a tiroidei (TSH), facilitând formarea cancerului tiroidian la șobolan (Jennings, Schwartz, Balter, Gardner și Witorsch, 1990). O interdicție completă a eritrozinei a fost implementată de FDA, dar este încă folosită în mod obișnuit în întreaga lume, în multe țări, incluzând Statele Unite. În 1986, citotoxicitatea agenților de dezvăluire dentară a fost raportată în celulele de mamifere cultivate (Watanabe și colab., 1986). Cu toate acestea, nu au existat rapoarte privind intervalul de vopsire a țesuturilor și mecanismul citotoxic al reactivilor de dezvăluire dentară. [24]

Capitolul II: Studiul clinic

Principalul obiectiv al studiului acesta este să examineze distribuția biofilmului de la nivelul suprafețelor dentare cu ajutorul agentului revelator de placă bacteriană care nu conține eritrozină.

II.1 Participanții

Datele au fost derivate dintr-o zonă urbană, din partea central-vestică a României. Studiul s-a desfășurat într-un cabinet stomatologic pe parcursul iernii a anului 2023. Au fost implicați pacienți selectați întâmplător. La studiu au participat 30 de pacienți cu vârste cuprinse între 21 și 45 ani. Pacienții cu dizabilități și nevoi speciale de asistență medicală au fost excluși, deoarece sunt mai vulnerabili la o gamă largă de probleme suplimentare de sănătate decât populația generală [25].

Pacienții au fost informați despre program și au autorizat participarea lor la acest studiu clinic. Studiul a fost realizat de către un cadru profesionist din domeniul sănătății (medic stomatolog) special instruit în prevenirea tulburărilor de sănătate orală, precum și în educația privind igiena orală.

Datele personale ale pacienților (nume și prenume) nu au fost înregistrate astfel ne raportam la un număr de 30 de pacienți anonimi.

II.2 Procesul de capturare a biofilmului

Examenul dentar a fost efectuat folosind truse de examinare sterile care conțin o oglindă, o pensă și o sondă. De asemenea, s-au folosit și mănuși (fig. II.1).



Fig II.1. Instrumentar steril pentru examenul dentar

Revelatoarele de placă bacteriană utilizate în acest experiment sunt 2-tones Zooby (fig. II.2). Acestea sunt soluții populare de divulgare în clinicile dentare; conținând un revelator sub formă de tabletă masticabilă în două tonuri, adică cu dublă colorare (roșu-albastru)



Fig II.2. Tablete indicatoare de placă bacteriană Zooby [26]

Toate substanțele chimice utilizate în acest studiu au fost de calitate analitică. Am ales acest revelator fiindcă este unul care nu conține eritrozină (cunoscând toxicitatea acesteia). Soluțiile au fost achiziționate de la DentStore

Substanța de evidențiere este compusă din coloranți alimentari temporari, inofensivi (fără eritrozină (E127)) care pot fi spălați cu ușurință de pe dinți. Coloranții sunt: betanină E162 și albastru patent 5.

Pacienții și-au efectuat igiena orală în ziua vizitei. Înainte de examenul clinic, pacienții au fost instruiți să-și clătească dinții pentru a îndepărta orice reziduri alimentare existente.



Fig II.3 Cavitate orală revelată cu indicatori de placă bacteriană

Apoi în cazul folosirii revelatorului de placă bacteriana sub formă de tabletă masticabilă, le-au fost date instrucțiuni despre cum să o utilizeze. Pacienții au fost rugați să mestecă tableta timp de 30-60 de secunde, asigurându-se că o transferă în toate părțile dinților folosind limba după care excesul de salivă colorată a fost scuipat. Tabletele administrate au fost ușor aromate pentru a încuraja utilizarea lor.

În figura II.3 pe suprafețele curate ale dinților, revelatorii de biofilm nu au fost absorbiți. Pe suprafețele cu placă bacteriană relativ subțire adică biofilm recent/tânăr de 2-3 zile, colorarea a fost de culoare deschisă (roșu), dar unde era o placă dentară mai groasă, indicând un biofilm mai vechi și mai rezistent de 9-18 zile, colorarea a fost mai opacă și mai închisă (albastru)



Fig.II.4 Cavitatea orală înainte și după acțiunea agenților revelatori de placă bacteriană

Am ales să facem acest studiu folosind revelatori de placă bacteriană fiindcă cu ochiul liber nu pot fi vizualizate cu precizie toate suprafețele acoperite cu placă bacteriană în special cele recente. Acest lucru se poate vizualiza în figură II.4

II.3 Indicele de igienă O'Leary și Lindhe – HI

Analiza s-a efectuat în conformitate cu protocolul clinic al indicelui O'Leary și Lindhe – HI de igienă

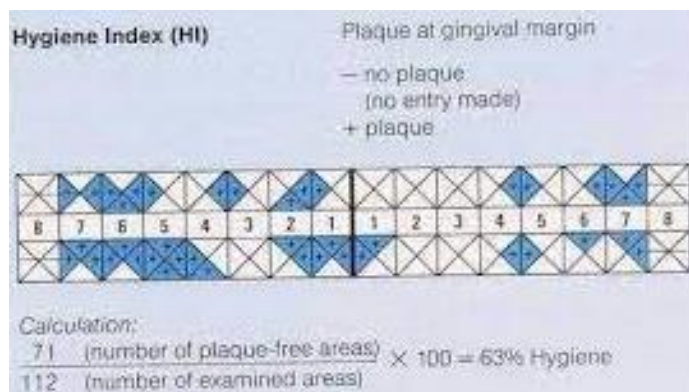


Fig. II.5 Diagrama indicelui de igienă O'Leary și Lindhe – HI [27]

Depunerea de placă bacteriană pe suprafețele dentare este înregistrată de indicele de igienă HI. Este un indice foarte precis. Se înregistrează prezența plăcii cu DA/NU pe toate părțile dintelui (mezial, distal, vestibular, oral). [27]

Prin hașurare, folosind o diagramă a arcadei dentare au fost marcate rezultatele (II.5). Au fost luate în calcul doar suprafețele dentare acoperite cu placă colorată aflate în apropierea marginii gingivale. Pe urmă a fost calculat indicele O'Leary pentru fiecare pacient. Acest indice este unul procentual calculat astfel: $((\text{numărul suprafețelor dentare cu placă} \times 100) / \text{numărul de suprafețe dentare examinate})$ [27].

II.4 Interpretarea rezultatelor

Am grupat valorile indicelui O'Leary calculate după revelarea plăcii bacteriene astfel: pe cele două arcade (Fig. II.6) și pentru fiecare tip de suprafață în parte (Fig. II.7).

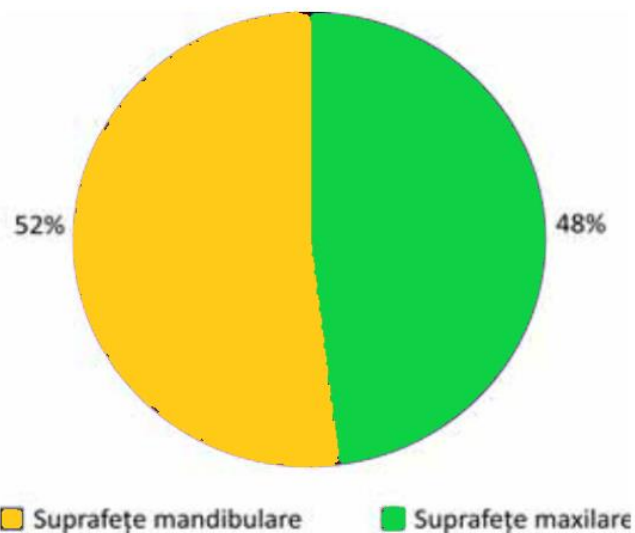


Fig. II.6 Procentul plăcii bacteriene dentare pe arcade

În diagrama distribuției procentuale a plăcii bacteriene dentare pe arcade se observa o placă bacteriană mai răspândită pe mandibulă în comparație cu maxilarul

De asemenea, au fost analizate datele privind distribuția plăcii bacteriene la mandibulă și maxilar pe tipurile de suprafețe (Fig. II.8) și pe arcade și tipuri de suprafețe în zona laterală (Fig. II.9) și zona frontală (Fig. II.10)

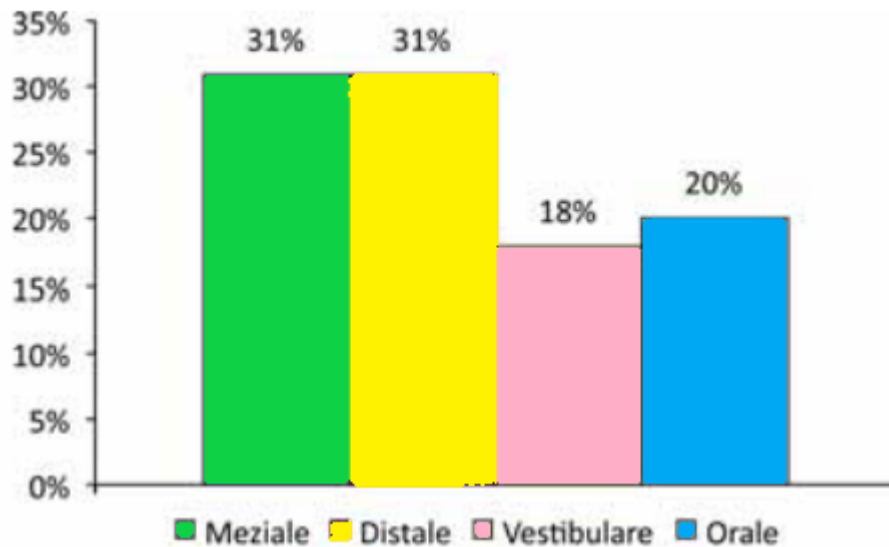


Fig. II.7 Procentul plăcii bacteriene pe tipurile de suprafețe

Legat de graficul procentual al plăcii bacteriene pe tipuri de suprafețe putem observa că placa bacteriană este mai răspândită pe suprafețele meziale și distale decât pe suprafețele vestibulare și orale. Mai mult decât atât, suprafața mezială și cea distală au același procent de biofilm acumulat.

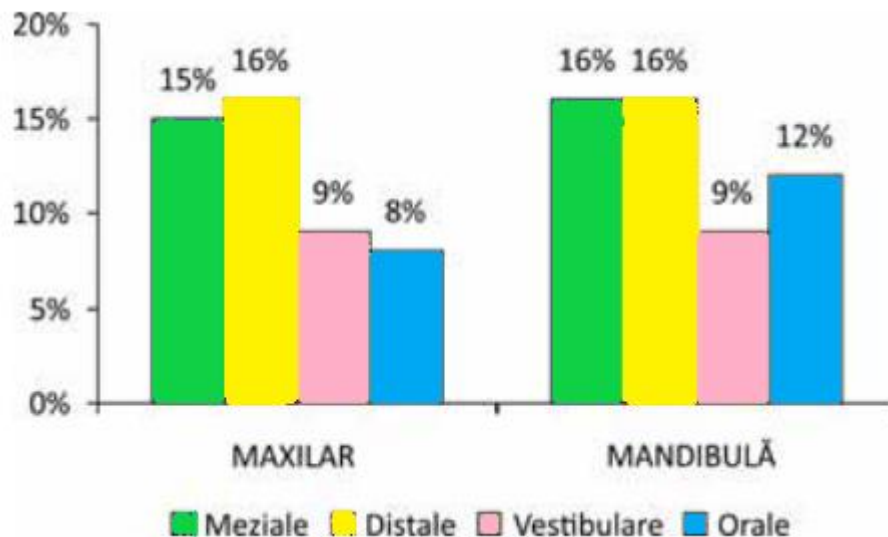


Fig. II.8 Procentul plăcii bacteriene pe tipurile de suprafețe și pe arcade

În diagrama distribuției procentuale a plăcii dentare pe tipurile de suprafețe și pe cele 2 arcade observăm tot un biofilm mai răspândit mezial și distal pe ambele arcade fie că e vorba de maxilar sau mandibulă cu același procent de depunere a plăcii bacteriene. Avem o creștere mai mare de depunere a biofilmului în zona oral-mandibulară față de cea maxilară

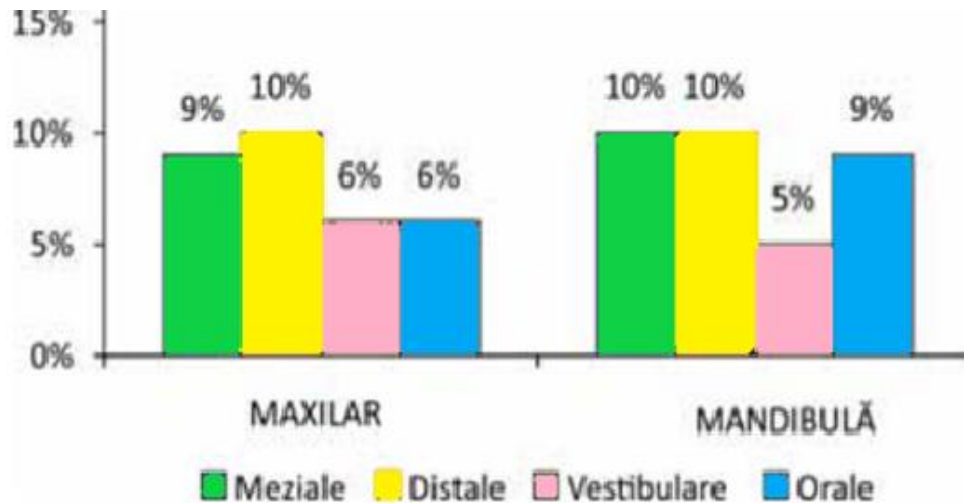


Fig II.9 Procentul plăcii bacteriene pe tipurile de suprafețe în zona lateral și pe arcade

În diagrama distribuției procentuale a plăcii bacteriene pe tipurile de suprafețe în zonele laterale și pe arcade observăm o creștere a biofilmului în zona oral-mandibulară față de zona oral-maxilară. Iar suprafețele meziale și distale rămân în continuare zonele cu cea mai mare cantitate de placă bacteriană

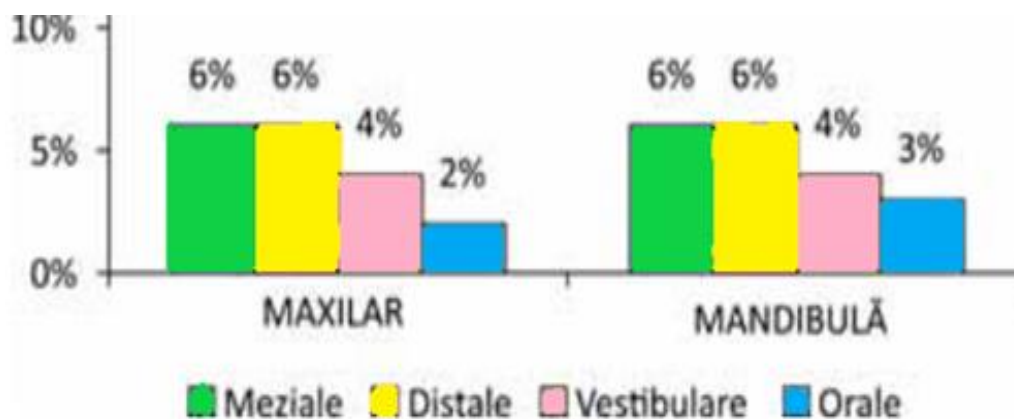


Fig. II.10 Procentul plăcii bacteriene pe tipurile de suprafețe în zonele frontale și pe arcade

Referitor la graficul procentual a plăcii bacteriene pe tipurile de suprafețe în zona frontal și pe arcade nu se văd diferențe semnificative între maxilar și mandibulă. Ce putem observa e o depunere mai mare a biofilmului mezial și distal pe ambele arcade.

În rezumat, placa este mai răspândită pe suprafețele dentare mandibulare, în special pe suprafețele interdentare, și este prezentă mai multă placă bacteriană decât pe suprafețele orale sau vestibulare.

Graficul de distribuție a plăcii a mai arătat că suprafețele orale ale dinților laterali mandibulari aveau acumulată placă mai multă decât alte suprafețe orale, probabil pentru că această zonă (orală laterală mandibulară) era mai dificil de igienizat de către pacienți. O concluzie similară a fost trasă și dintr-un studiu realizat pe un număr reprezentativ de elevi de gimnaziu din zona Bucureștiului, care a arătat că s-a observat o depunere mai mare de biofilm pe suprafețele bucale, mai ales pe molarii I și II mandibulari [28]. Din cauza igienei precare, aceste suprafețe au prezentat atât acumulări mari de biofilm, dar și valori mari de indice de sângerare, indicând un risc crescut de boala parodontala.

Trebuie să ținem cont că acumularea plăcii dentare depinde în mare măsură de alinierea dinților (iar datorită lipsei de spațiu se îngreunează igiena bucală), de carii dentare, tartru, obturații, aparate ortodontice sau alți factori care duc la reținerea în continuare a plăcii bacteriene în anumite zone.

Concluzii

Modelele de depunere a biofilmului includ în general dinții mandibulari din zona laterală. Mandibula are o acumulare de placă bacteriană mai mare decât maxilarul iar indiferent la care arcadă facem referire suprafețele meziale și distale sunt cele mai populate cu biofilm.

Având în vedere acest lucru, programele individuale de prevenire ar trebui să aibă în vedere acest tipar general, dar și factorii individuali de risc (spre exemplu, îngheșuri dentare, obturații, aparate ortodontice și alți factori care duc la reținerea în continuare a plăcii microbiene în anumite zone.).

III. Studiul experimental

Scopul acestui studiu este de a analiza spectroscopic și a compara 2 revelatori de placă bacteriană, dintre care unul conține eritrozina (E127) iar celalalt nu.

III.1 Prepararea soluțiilor

În paralel cu cercetarea clinică am efectuat și cercetare experimentală (în cadrul Facultății de Fizică) folosind două tipuri de revelatori de placă bacteriană cu dublă colorare pentru a identifica biofilmul. Aceștia sunt Rondells Blue și Zooby.

Rondells Blue este o soluție 2-Tone: eritrozina din componența ei colorează placa recentă în roșu iar albastru brilliant colorează placa veche în albastru.

- Eritrozina (fig. III.1), cunoscută și sub numele de Red No. 3, este un compus organoiod, în special un derivat al fluoronului. Este un colorant roz care este folosit în principal pentru colorarea alimentelor. Absorbanța sa maximă (Spectre UV) este la 530 nm într-o soluție apoasă și este supusă fotodegradării.

Sunt coloranți fluorescenți adică sunt produse chimice care emit lumină după fotoexcitare. Lungimea de undă a luminii emise este de obicei mai mare decât cea a luminii incidente. Fluorocromii sunt substanțe care provoacă fluorescență în alte materiale, adică coloranții utilizați pentru a marca sau eticheta alți compuși cu etichete fluorescente. [29][30]

Formula chimică: $C_{20}H_6I_4Na_2O_5$ (26,27)

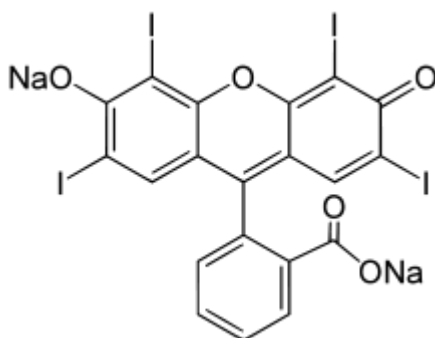


Fig III.1 Structura eritrozinei [29].

- Albastru brilliant FCF (fig. III.2) este un compus organic sintetic utilizat în principal ca și colorant albastru pentru alimente procesate, medicamente, suplimente

alimentare și produse cosmetice. Este clasificat colorant triarilmetan și este cunoscut sub diferite denumiri, precum FD&C Blue No. 1 sau acid blue 9

Este notat cu numărul E133. Are aspectul unei pulbere albastre fiind solubilă în apă și glicerol. Are o absorbție maximă la aproximativ 628 nanometri. Este unul dintre cei mai vechi aditivi de culoare aprobați de FDA și este în general considerat netoxic și sigur.

Datorită proprietăților sale netoxice, FCF albastru strălucitor a fost folosit ca și colorant biologic. Când este dizolvat într-un mediu acid, acest colorant a fost folosit pentru a colora pereții celulari, bacteriile și celulele fungice. Colorantul nu inhibă creșterea niciuneia dintre aceste specii.

Forma chimică este $C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_3$. [31][30]

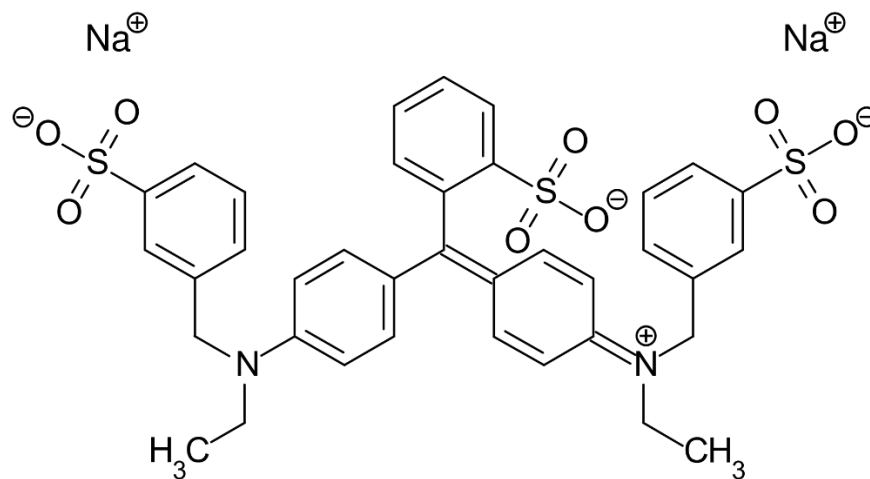


Fig III.2 Structura colorantului Albastru brilliant [31]

Zooby: conține betanina E162 și albastru patent 5 [26], doi coloranți alimentari temporari (fără eritrozină (E127)) care pot fi spălați cu ușurință de pe dinți.

- Betanina (E162) (fig III.3) este un aditiv de culoare roșie considerat sigur care are efect benefic asupra organismului uman. Acesta se extrage din sfecla roșie de aceea se mai numește și Roșu de Sfeclă. Colorantul este solubil în apă sau alcool. Aditivul se poate prezenta sub mai multe forme: de lichid, pudră, pastă sau solid roșu/roșu-închis. Absorbanta sa maximă (Spectre UV) este la 535-540 nm.

Formula chimică este: $C_{24}H_{26}N_2O_{13}$ [32][30]

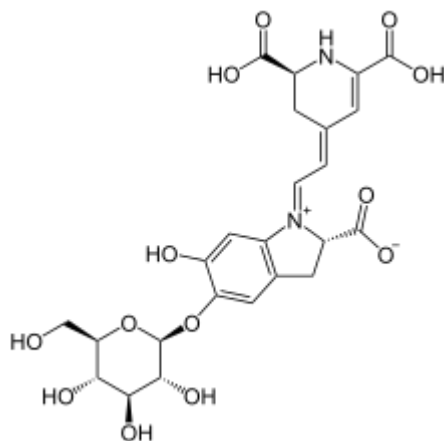


Fig. III.3 Structura Betaninei [32]

- Albastru patent V (Patent Blue V) (fig III.4), numit și Food Blue 5 este un colorant sintetic de trifenilmetan albastru deschis folosit ca și colorant alimentar. Ca aditiv alimentar, are numărul E131. Este o sare de sodiu sau de calciu.

Absorbanța sa maximă în apă este la 638 nm cu pH5.

Formula chimică: $C_{27}H_{31}N_2O_7S_2Ca_{1/2}$ [33][30]

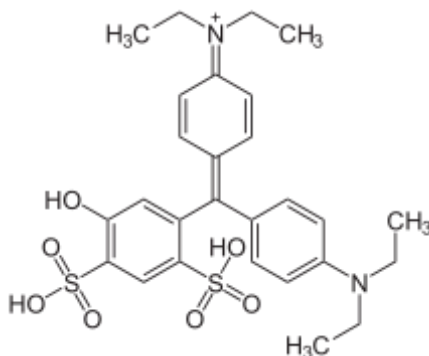


Fig. III.4 Structura Albastru patent 5 [33]

Revelatorul care conține erythrosine (E127) este notat în continuare "Rondele", iar celălalt care nu conține erythrosine (E127) este notat în continuare "Masticabil".

Pregătirea soluțiilor pentru măsurători de absorbție UV-Vis și emisie de fluorescență:

Am preparat două soluții stock (Fig. III.5) folosind fiecare tip de revelator (în 5 ml apă distilată am dizolvat fiecare tip de pastilă revelatoare). Pentru măsurători am realizat soluții mai diluate (2 ml apă distilată + 1 μ l soluție stock), pe care le-am pus în cuve și am efectuat măsurători. Această etapă a fost realizată la temperatura camerei și soluția a fost agitată energetic.



Fig III.5 Soluții preparate

În dreapta se află soluția “Rondele” cea care conține eritrozină, este de culoare mai rozalie iar în stânga se află soluția fără eritrozină, “Masticabil” de culoare mov-albastru.

III.2 Absorbția UV-Vis a agenților de revelare a plăcii bacteriene

Legea Beer-Lambert este cunoscută ca Legea Lambert-Beer sau Legea Beer-Lambert-Bouguer sau Legea Beer. Aceasta raportează atenuarea luminii de caracteristicile materialului prin care a trecut lumina; este deseori folosită în teste de analiză chimică și pentru a înțelege optica fizică a atenuării, pentru fotoni, neutroni și gaze rarefiate. Aceasta indică relația dintre absorbția luminii și proprietățile unui material traversat de lumină [34].

Pentru început, soluțiile de revelatori de placă bacteriană au fost caracterizate cu ajutorul spectroscopiei UV-Vis. Spectroscopia de absorbție se bazează pe tranzițiile electronice din starea fundamentală într-o stare excitată, cu energie mai mare, tranziții ce apar în urma absorbției radiației electromagnetice din acest domeniu. Acest tip de spectroscopie măsoară spectrul de extincție, practic răspunsul optic al soluțiilor la radiația incidentă (absorbție și împrăștiere), prin înregistrarea intensității fasciculului ce trece prin probă în funcție de lungimea de undă [35].

Au fost investigate spectrele de absorbție ale revelatorilor de placă bacteriană folosind un spectrofotometru CCD portabil T100 cu un interval de lungimi de undă de 380nm - 800 nm, prezentat în *Figura III.6*. Pentru măsurători a fost folosită o cuvă de 1x1 cm iar solventul folosit drept referință, în cazul de față este apă ultra pură.



Fig. III.6 Spectrofotometru CCD portabil T100 [36]

Principalele caracteristici ale spectrofotometru UV-Vis sunt:

Bateria portabilă, reîncărcabilă compactă, ușoară și de mare capacitate, încărcătorul extern și sursa de alimentare auto pot îndeplini pe deplin cerințele utilizării în laboratoare și pe teren.

- Funcții multiple: Scanarea spectrului, măsurători fotometrice, măsurare cantitativă, măsurare cinetică și selectare a vârfurilor(peak) etc.
- Măsurare de mare viteză: Receptorul NMOS PDA și spectrul complet afișat în 0,1 secunde fac posibilă măsurarea online.
- Rețea de difracție holografică concavă: asigură obținerea unui spectru de calitate.
- Sonda cu fibră optică imersată anticorozivă. Măsurarea on-line nu necesită tub colorimetric și cupă colorimetrică.
- Funcționare independentă Poate salva până la o sută de spectre și poate folosi PC-ul pentru a procesa date prin interfața RS232.
- Software cu aplicații multiple. [36]

Spectrele de extincție UV-Vis mediate ale celor doi agenți de relevare a plăcii dentare sunt date în figura III.7. Măsurătorile au fost efectuate imediat după prepararea soluțiilor. Ambele spectre au 2 benzi plasmonice corespunzătoare celor 2 coloranți din compoziția fiecăruia.

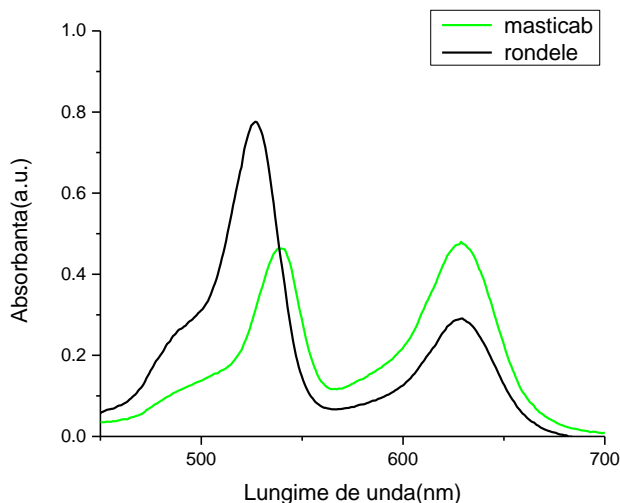


Fig III.7 Spectrele de extincție UV-Vis ale celor doi agenți de relevare a plăcii bacteriene în soluție apoasă

În cazul spectrului "rondele" observăm o bandă plasmonică la 528 nm corespunzătoare colorantului numit Eritrozină și o bandă în jurul valorii de 629 nm corespunzătoare colorantului Albastru strălucitor FCF

Iar în cazul spectrului "masticab" e prezentă o bandă plasmonică la 539 nm corespunzătoare colorantului betanină și o bandă la 629 nm datorată colorantului Albastru patent V

Fiecare spectru UV-Vis a fost înregistrat de 3 ori, neobservându-se diferențe semnificative statistic. (fig III.8)

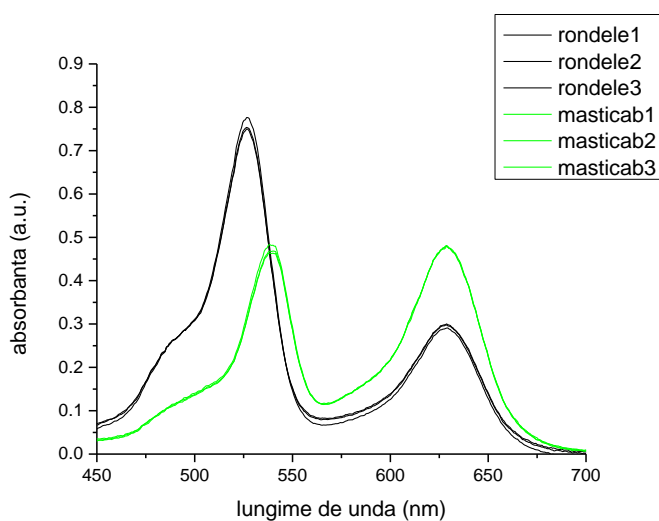


Fig III.8 Măsurători multiple ale spectrelor de extincție UV-Vis ale celor doi revelatori de placă bacteriană

Pentru a testa stabilitatea în timp a soluțiilor de relevator de placă bacteriană, am refăcut toate măsurătorile după o zi, după o săptămână și după o lună. (fig III.9, fig III.10)

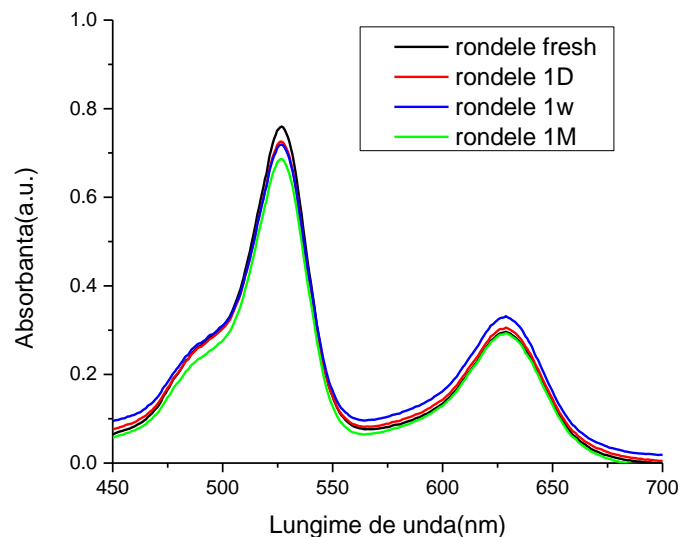


Fig III.9 Spectrele de extincție UV-Vis a soluției “rondele”: fresh (inițial), după o zi (1D), după o săptămână (1W) și după o lună (1M)

Se observă o scădere în timp a absorbantei benzii corespunzătoare colorantului Eritrozină și o stabilitate în timp a colorantului Albastru strălucitor FCF

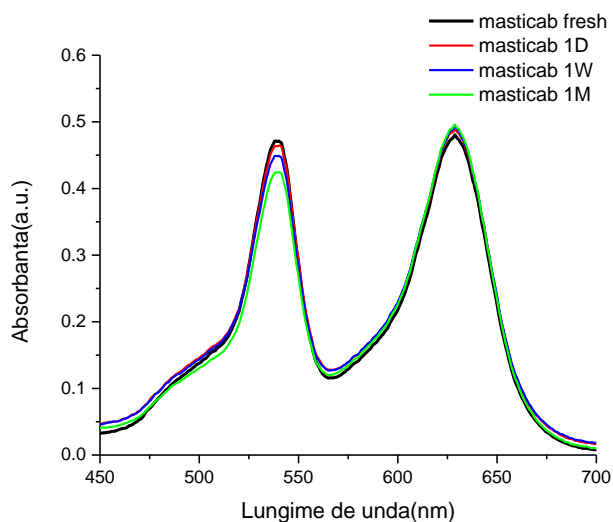


Fig III.10 Spectrele de extincție UV-Vis a soluției “masticab”: fresh (inițial), după o zi (1D), după o săptămână (1W) și după o lună (1M)

Se observă o scădere în timp a absorbantei benzii corespunzătoare colorantului Betaină și o stabilitate în timp a colorantului Albastru Patent 5.

Soluțiile au fost depozitate la întuneric și la temperatura camerei.

Astfel, am observat că atât pentru soluția de revelator de placă bacteriană ce conține Eritrozină cât și pentru soluția de revelator de placă bacteriană ce nu conține Eritrozină, maximul benzilor de absorbție cu colorant roșu a scăzut ușor după o zi de la preparare și și-a păstrat scăderea în timp pe parcursul lunii iar banda de absorbție corespunzătoare colorantului albastru nu s-a modificat în timp.

III.3 Emisia de Fluorescență a agenților de revelare a plăcii bacteriene

Spectroscopia de fluorescență este o metodă analitică folosită pentru a examina caracteristicile și interacțiunile moleculelor. Aceasta se bazează pe ideea că atunci când molecula absoarbe fotonul de lumină și devine excitată, transmite lumina la o lungime de undă mai mare. Acest fenomen e cunoscut sub numele de fluorescență. Lumina emisă poate să fie colectată și studiată pentru determinarea compoziției, structurii și dinamica moleculei. [37]

Emisia de fluorescență a celor două soluții s-a determinat folosind microspectrofluorimetru StellarNet (fig. III.11) pentru a determina emisia de fluorescență în cazul excitării cu mai multe lungimi de undă.

Aparatura experimentală: Micro-Spectro Fluorimetru Stellar Net:

Componente:

- Spectrometru BLACK-Comet-C-200,
- Sursa de lumină SL1-LED,
- Suport pentru cuvă CUV-F
- Fibră optica F600-Y-VISNIR

Inregistrarea spectrelor se face folosind programul SpectraWiz in modul "Scope"[38]

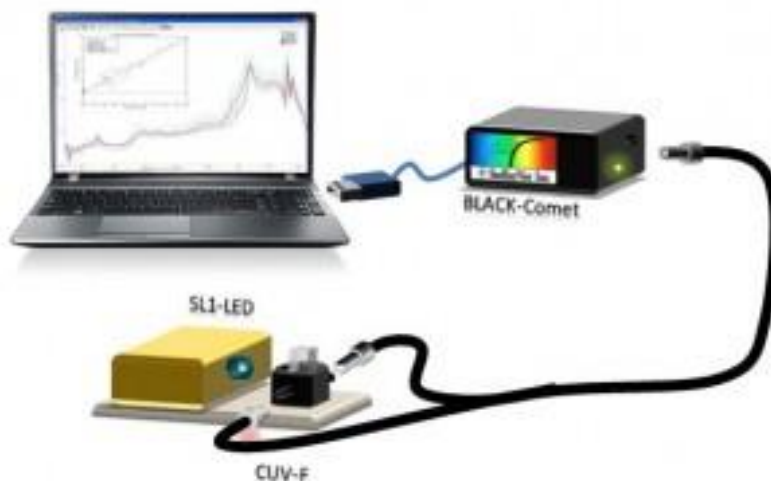
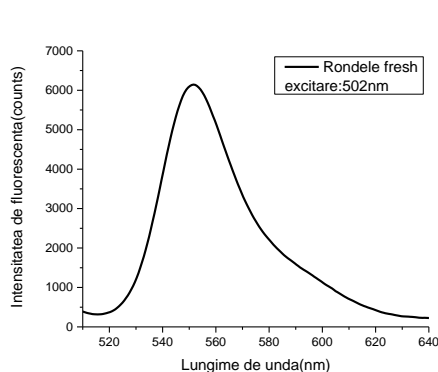
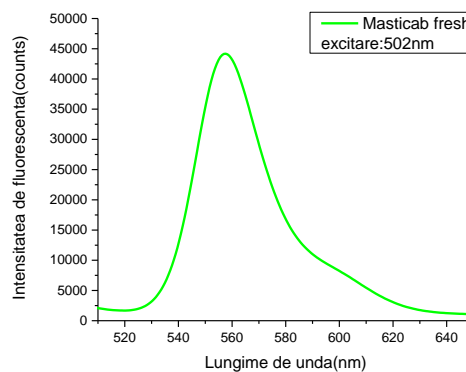


Fig III.11 Micro-spectro fluorimetru StellarNet [38]

Pentru excitarea spectrelor de fluorescență, Micro-spectro fluorimetrul StellarNet are disponibile următoarele LED-uri: 295 nm, 345 nm, 365 nm 390 nm, 470 nm, 502 nm, 590 nm, 660 nm [38].

Cele mai reușite spectre au fost cele obținute folosind ca excitare lumina provenită de la un LED verde (502 nm) (Fig. III.12 a; b) și de la un LED albastru (470 nm) (Fig. III.13 a; b). Am înregistrat spectre de fluorescență și cu celelalte LED-uri din dotarea microspectrofluorimetru (295 nm, 390 nm, 660 nm), dar nu am obținut emisie de fluorescență, sau am obținut un semnal foarte slab și zgomotos.

Fig III.12 a Spectru Rondele fresh (inițial)
cu excitare la 502 nmFig III.12 b Spectru Masticab fresh (inițial)
cu excitare la 502 nm

Pentru excitarea cu ledul verde de 502 nm se observă că soluția cu Eritrozină "Rondele" are un maxim cu intensitatea de fluorescență de 6000 counts centrat în jurul lungimii de undă de 551 nm. Iar soluției "Masticab", cea care nu conține colorantul Eritrozină, îi corespunde lungimea de undă de 557 nm și o intensitate de fluorescență de 45000

counts. Acest lucru denotă că soluția “Masticab” fără Eritrozină are o intensitate de fluorescență mult mai mare decât soluția “Rondele”.

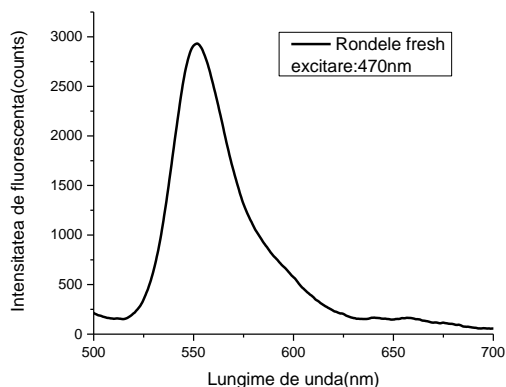


Fig III.13 a Spectru Rondele fresh (inițial)
cu excitare 470 nm

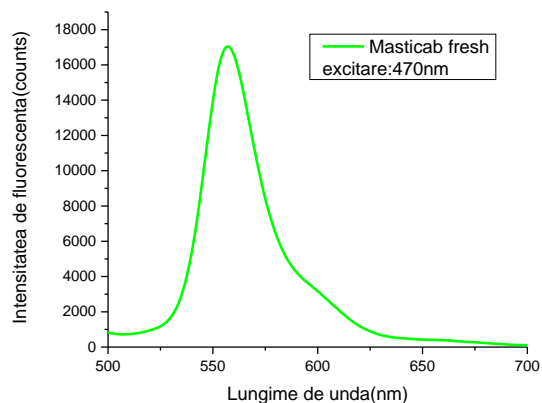


Fig III.13 b Spectru Masticab fresh (inițial)
cu excitare 470 nm

În cazul excitării cu ledul albastru de 470 nm, soluția “Rondele” se află la aceeași lungime de undă de 551 nm și o intensitate de fluorescență de 3000 counts, mai mică decât în cazul excitării cu ledul verde. Referitor la soluția “Masticab”, aceasta se află și ea bineînțeles la aceeași lungime de undă de 557 nm ca și în cazul anterior excitării cu ledul verde dar la o intensitate de fluorescență de 17000 counts, mai mica.

Prin comparația soluțiilor “Rondele” și “Masticab” pentru excitarea la 470 nm putem observa că “Masticab” are o intensitate de fluorescență mai mare decât soluția “Rondele”.

Și în cazul emisiei de fluorescență am testat stabilitatea în timp a soluțiilor de revelator de placă bacteriană. (Fig III.14, Fig. III.15, Fig III.16 Fig III.17). Astfel, am observat că intensitatea emisiei de fluorescență a fost mai mare în cazul soluțiilor proaspăt preparate.

Fiecare spectru a fost înregistrat de 3 ori, fără a se observa diferențe semnificative.

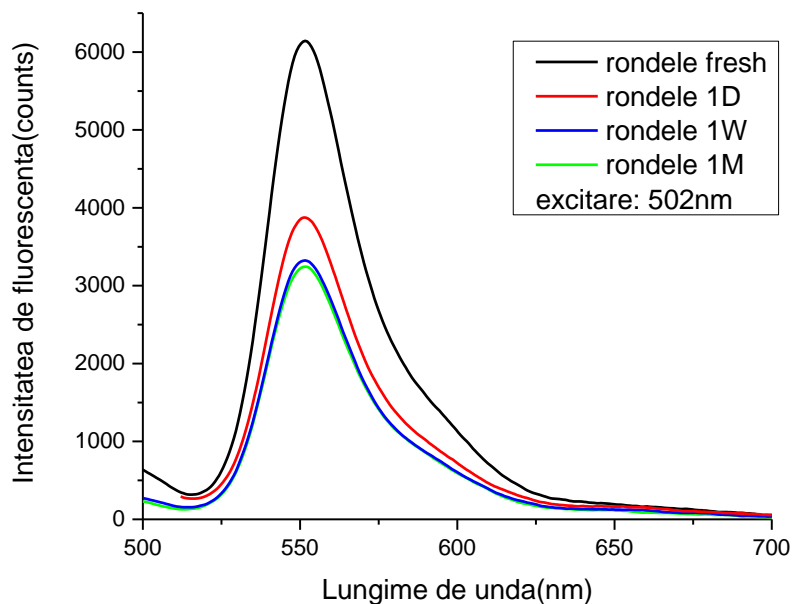


Fig III.14 Spectre de fluorescență pentru “rondele” cu excitare la 502 nm pentru mai multe intervale de timp

Spectrul de fluorescență initial (fresh) are o lungime de undă de 551nm și o intensitate de aprox. 6000 counts, după o zi(1D) scade în intensitate ajungând la 4000 counts urmând să scadă treptat în timp după o săptămână(1W) până la 3330 și după o lună (1M) încă puțin până la valoarea de 3230 counts

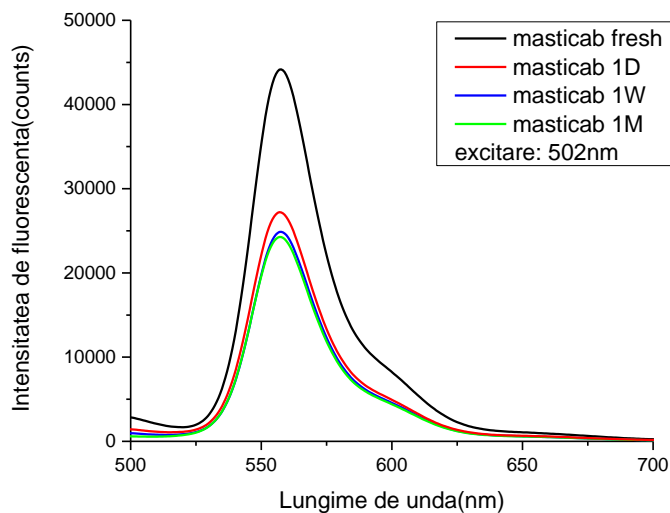


Fig III.15 Spectre de fluorescență pentru “masticab” cu excitare la 502 nm pentru mai multe intervale de timp

În figură sunt date spectrele de fluorescență pentru "masticab" cu excitare la 502nm a soluției fresh (inițială) înregistrată cu lungimea de undă de 557 nm și o intensitate de fluorescență de 45000 counts; a soluției după o zi(1D) unde se observă o scădere a intensității de fluorescență până la 27000 counts; a soluției după o săptămână(1W) unde a scăzut intensitatea și mai mult ajungând la 25000 counts și a soluției după o lună(1M) scăzând încă puțin din intensitate până la 24000 counts.

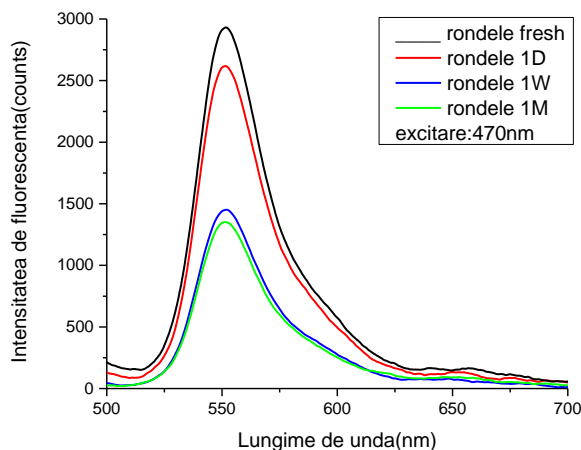


Fig III.16 Spectre de fluorescență pentru "rondele" cu excitare la 470nm pentru mai multe intervale de timp

Observăm că inițial spectrul (rondele fresh) de fluorescență are un maxim la 551 nm cu o intensitate maximă de fluorescență de aprox. 3000 counts. După o zi (1D) scade în intensitate ajungând la valoarea de 2600nm iar după o săptămână ajunge la 1450 counts și după o lună scade și mai mult în intensitate ajungând la valoarea de 1350 counts, păstrându-se lungimea de undă inițială de 551 nm.

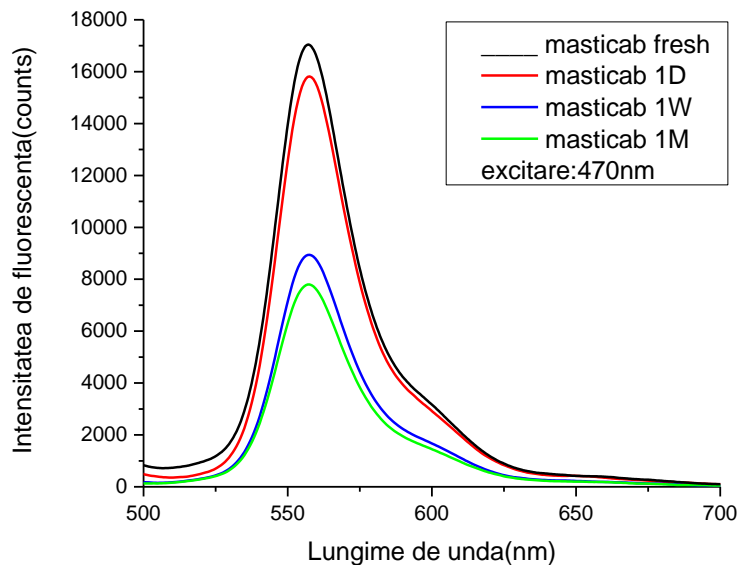


Fig III.17 Spectre de fluorescență pentru "masticab" cu excitare la 470 nm pentru mai multe intervale de timp

Conform figurii: inițial soluția (masticab fresh) avea un spectru de fluorescență cu un maxim la 557 nm și o intensitate maximă de fluorescență de 17000 counts, după o zi (1D), acesta și-a păstrat lungimea de undă corespunzătoare maximului, însă a scăzut în intensitate ajungând aprox la 16000 counts; după o săptămână (1W) se observă o scădere semnificativă de intensitate până la 9000 counts, iar după o lună continuă să scadă și mai mult în intensitate ajungând la 7800 counts. Lungimea de undă corespunzătoare maximului de fluorescență a rămas constantă în timp.

Se observă similiaritatea scăderii intensității de fluorescență în timp a celor două soluții preparate. Indiferent de excitare, fie ca e la 470 nm fie ca e la 502 nm, emisiile de fluorescență ale celor doi agenți de relevare a plăcii bacteriene, prezintă o scădere treptată a intensității odată cu trecerea timpului de la prepararea soluțiilor.

Diferența dintre ele este că soluția fără eritrozină "masticab" are o intensitate de fluorescență mult mai mare decât soluția cu eritrozină "rondele". Lungimea de undă la care se observă maximul emisiei de fluorescență a soluțiilor rămâne constantă în timp.

CONCLUZII

Am efectuat un studiu clinic despre evaluarea distribuției plăcii bacteriene a suprafețelor dentare cu ajutorul unui revelator de placă bacteriană care nu conține eritrozină. În urma studiului am observat că: dinții mandibulari din zona laterală sunt mai predispuși la acumulare de placă bacteriană; mandibula are o acumulare de placă bacteriană mai mare decât maxilarul; și indiferent la care arcadă facem referire suprafețele meziale și distale sunt cele mai populate cu biofilm.

Am înregistrat spectrele UV-Vis ale doi agenți revelatori de placă bacteriană. Am identificat spectrele corespunzătoare coloranților alimentari specifici fiecărui revelator. Am observat că atât pentru soluția revelatoare de placă bacteriană ce conține eritrozină cât și pentru soluția revelatoare ce nu conține eritrozină, maximumul benzilor de absorbție cu colorant roșu a scăzut ușor după o zi de la preparare și și-a păstrat tendința de scădere în timp.

Am înregistrat spectrele de fluorescență ale agenților revelatori folosiți în studiu, observând similaritatea de scădere în intensitate odată cu trecerea timpului. Și în acest caz, intensitatea emisiei de fluorescență a fost mai mare în cazul soluțiilor proaspăt preparate. Diferența dintre cei doi agenți revelatori e că emisia de fluorescență corespunzătoare fiecăruia, are intensități diferite: soluția "masticab" (cea fără eritrozină) are o intensitate de fluorescență mult mai mare decât soluția "rondele" (cu eritrozină) .

Ca și perspectivă, intenționez să determin dependența de Ph a emisiei de fluorescență a acestor agenți de revelare a biofilmului. Iar clinic s-ar putea investiga acumularea plăcii bacteriene în funcție de gen, fumător/nefumător etc

BIBLIOGRAFIE

- [1] Dörfer C., Benz C., Aida J., Campard G. Relația sănătății orale cu sănătatea generală și BNT: o scurtă trecere în revistă. *Int. Adâncitură. J.* 2017; 67 :14–18.)
- [2] Farokhi MR, Muck A., Lozano-Pineda J., Boone SL, Worabo H. Utilizarea educației interprofesionale pentru a promova alfabetizarea în domeniul sănătății orale într-o practică colaborativă facultăți-student. *J. Dent. Educ.* 2018; 82 :1091–1097.
- [3] <https://doctoruldedinti.info/placa-bacteriana/>
- [4] Larsen T., Fiehn NE Infecții cu biofilm dentare - o actualizare. *APMIS.* 2017; 125 :376–384.
- [5]. Dipayan D., Ramesh Kumar SG, Aswath Narayanan MB, Leena Selvamary A., Sujatha A. Disclosing solutions used in stomatologie. *World J. Pharmaceut. Res.* 2017; 6 :6.
- [6]. Zoya C., Ranjana M., Vandana S., Rohit R., Aruna D. Disclosing agents in parodontics: an update. *J. Dent. col. Azamgarh.* 2015; 1 :103–110.
- [7] (<https://doctoruldedinti.info/placa-bacteriana/>)
- [8]. Flemming HC, Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P., Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: o formă emergentă de viață bacteriană. *Nat. Rev. Microbiol.* 2016; 14 :563–575.
- [9] T. Larsen, N.E. Fiehn Dental biofilm infections - an update *PMIS*, 125 (2017), pp. 376-384
- [10]. P. G. Robinson, S.A. Deacon, C. Deery, M. Heanue, A. D. Walmsley, H.V. Worthington, *et al.* Manual versus powered tooth brushing for oral health *Cochrane Database Syst. Rev.* (2005), p. CD002281
- [11]. D. Dipayan, S.G. Ramesh Kumar, M.B. Aswath Narayanan, A. Leena Selvamary, A. Sujatha Disclosing solutions used in dentistry *World J. Pharmaceut. Res.*, 6 (2017), p. 6
- [12] C. Zoya, M. Ranjana, S. Vandana, R. Rohit, D. Aruna Disclosing agents in periodontics: an update *J. Dent. Coll. Azamgarh*, 1 (2015), pp. 103-110
- [13] https://makeup.ro/product/596112/?gclid=CjwKCAjws7WkBhBFEiwAli1681UreRXXDrcC5WSOxoUUCeuYolxG3aZE9OvWej7cK6awkgPoSapOShoC51oQAvD_BwE
- [14] https://greeno.ro/ro/consumabile-sanitare/401-solutie-indicator-dharma-research-garnet-revelator-placa-bacteriana-30ml.html?gclid=CjwKCAjws7WkBhBFEiwAli168wPXVUTWCpZD1LJCFJ4KoC30IIFVZPiaN540noJ2XUWd1rh0IAXHiBoCxWgQAvD_BwE
- [15] https://dentstore.ro/indicator-placa/97556-indicator-de-placa-bacteriana-sdi.html?utm_source=adwords&utm_medium=ppc&hsa_acc=3800237032&hsa_cam=17660213907&hsa_src=x&hsa_net=adwords&hsa_ver=3&gclid=CjwKCAjws7WkBhBFEiwAli168xJsWM1A-WxFbngRWB07zJtWqWSx_t8Y7MLF19DFqboqrEJcDiGj7RoCDpQQA_VD_BwE
- [16] <https://liki24.ro/p/solutie-de-clatire-a-dintilor-pentru-controlul-placii-bacteriene-miradent-plaque-agent-500-ml-hager-werken/?gclid=CjwKCAjws7WkBhBFEiwAli1683y4iFru4E9ynrZfdEtGiD7OIN372mF9FZ>

0FzqVeGQgfrOT-

VvGrRoCgdQQAvD_BwE&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=liki
_ro_PerformanceMax_cosmetic&utm_term=56414&utm_content=Cosmetic

[17] Y. Peng, R. Wu, W. Qu, W. Wu, J. Chen, J. Fang, C. Yangxi, F. Mauro, M. Li Effect of visual method vs plaque disclosure in enhancing oral hygiene in adolescents and young adults: a single-blind randomized controlled trial *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.*, 145 (2014), pp. 280-286

[18] <https://www.columbiadoctors.org/health-library/multimedia/disclosing-tablets-dental-plaque/>

[19] Viorica Chetruș, I.R. Ion, Dental Plaque – Classification, Formation, and Identification, *International Journal of Medical Dentistry*, April / June 2013; 3(2): 139-143.

[20] Gallagher IH, Fussell SJ, Cutress TW. Mechanism of action of a two-tone plaque disclosing agent. *J Peri- odontol*, 1977; 48: 395-396.

[21] file:///C:/Users/Alina/Desktop/master%20an%202/disertatie/disclosingagents-copy-170420212725.pdf

[22] F. Paranhos Hde, C.H. da Silva, G.C. Venezian, L.D. Macedo, R.F. de Souza Distribution of biofilm on internal and external surfaces of upper complete dentures: the effect of hygiene instruction *Gerodontology*, 24 (2007), pp. 162-168

[23] A. Sachdeo, A.D. Haffajee, S.S. Socransky Biofilms in the edentulous oral cavity *J. Prosthodont.*, 17 (2008), pp. 348-356

[24] Cytotoxicity of dental disclosing solution on gingival epithelial cells in vitro Im-hee Jung, Kyeong Ho Yeon, Hwi Rin Song, and Young Sun Hwang

[2] Alborz A., McNally R., Glendinning C. Access to healthcare for people with learning disabilities: mapping the issues and reviewing the evidence. *J. Health Serv. Res. Policy*. 2005:173–182

[26] https://www.ddi.ro/indicator-placa-bacteriana-copii-zooby-250-buc-zooby-usa?gclid=CjwKCAjws7WkBhBFEiwAli168yyxyyoo0IPriyt3n-F5hcYieuFo69nw6adBnLuJhbiLoyjGlriSeRoCbvAQAvD_BwE

[27] <https://www.scribd.com/doc/38772683/Indici>

[28] O'Leary T.J., Drake R.B., Naylor J.E. The plaque control record. *Journal of Periodontology* 1972; 43(1):38

[29]. <https://en.wikipedia.org/wiki/Erythrosine>

[30] REGULAMENTUL (UE) NR. 231/2012 AL COMISIEI din 9 martie 2012 de stabilire a specificațiilor pentru aditivii alimentari enumerați în anexele II și III la Regulamentul (CE) nr. 1333/2008 al Parlamentului European și al Consiliului

[31]. https://en.wikipedia.org/wiki/Brilliant_blue_FCF

[32]. <https://en.wikipedia.org/wiki/Betainin>

[33]. https://en.wikipedia.org/wiki/Patent_Blue_V

[34]. <https://microbiologynote.com/ro/legea-lambert-al-berii/>

[35]. D. A. Skoog, S. R. Crouch, and F. J. Holler, *Principles of instrumental analysis*. Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole, 2007.

[36] Suport de curs Conf. Dr. Maniu Dana Uv-Vis

[37]. <https://microbiologynote.com/ro/aplica%C8%9Bii-ale-spectroscopiei-de-fluorescen%C8%9B%C4%83/>

[38]. Suport de curs, Conf. Dr. Maniu Dana, Fluorescența