

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Neuroscienze

Direttore Prof. Raffaele De Caro

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN  
ODONTOIATRIA E PROTESI DENTARIA

Presidente Prof.ssa Carla Mucignat

TESI DI LAUREA

Polifenoli: possibile alternativa più naturale per contrastare  
una farmacoresistenza sempre più in aumento

Relatore: Prof. Edoardo Stellini

Correlatrice: Dott.ssa Grazieli Dalmaschio

Laureanda: Sara Michelon

ANNO ACCADEMICO 2023/2024



INDICE	
RIASSUNTO	1
ABSTRACT	3
1.INTRODUZIONE	5
1.1 La farmacoresistenza	5
1.1.2 Tipi di resistenza	6
1.1.3 La resistenza batterica in odontoiatria	8
1.2 Il cavo orale	11
1.2.1 Popolazione batterica	11
1.2.2 La saliva	11
1.2.3 La saliva e guarigione delle ferite	16
2.CLOREXIDINA	19
2.1 Meccanismo d'azione	20
2.2 Effetti avversi della clorexidina	21
2.3 Ipersensibilità alla clorexidina e operatori sanitari	23
3.POLIFENOLI	25
3.2 Chimica dei polifenoli	25
3.3 Vie biosintetiche dei polifenoli	28
3.3.1 Via dello Shikimato	29

3.3.2 Sintesi e struttura dei fenilpropanoidi	29
3.4 Proprietà chimiche, fisiche e biologiche dei polifenoli	30
3.4.1 Proprietà chimiche	30
3.4.2 Proprietà fisiche	30
3.4.3 Proprietà biologiche	31
3.5 I polifenoli contenuti nel cibo	31
3.6 Assunzione dei polifenoli tramite la dieta	33
3.7 Attività antiossidante dei polifenoli	34
3.8 Attività anti-infiammatoria dei composti polifenolici contenuti nella frutta	34
3.9 Attività di protezione dai raggi UV dei polifenoli	35
3.10 Interazione tra i polifenoli e i componenti del cavo orale	37
4.LAVORO SPERIMENTALE	39
4.1 Obiettivo dello studio	39
4.2 Meccanismi di espletamento degli effetti dei polifenoli	39
4.2.1 Effetti dei polifenoli sulle proteine del cavo orale	39
4.2.2 Effetti dei polifenoli sui batteri	40
4.2.3 Effetti sui microrganismi parodontali	41
4.2.4 Effetti sui microrganismi pulpari	42

4.2.5 Effetti su alcuni virus	42
4.3 I prodotti derivati dall'uva e la salute del cavo orale	42
4.3.1 Effetti del vino rosso sulla pellicola salivare	44
4.4 Influenza dei polifenoli del tè sulla pellicola acquisita dello smalto dentale	45
4.4.1 Tè verde	46
4.4.2 Tè nero	46
4.4.3 Tè di cistus incanus	47
4.4.4 Tè di inula viscosa	48
4.5 Applicazioni endodontiche dei polifenoli del tè verde	48
4.6 Attività biologica di alcuni polifenoli applicati in materia odontoiatrica	49
4.7 Influenza dei polifenoli del mirtillo sulla carie dentale	50
4.8 Effetti dei polifenoli sull'interfaccia composito dentina in odontoiatria restaurativa	52
4.9 Effetti dei polifenoli sul cancro orale	53
4.10 Resvatrolo: usi e prospettive	55
4.10.1 Studi in vitro	58
4.10.2 Studi in vivo	59
4.10.3 Scaffold innovativi caricati con resvatrolo	62

4.10.4 Resvatrolo associato al PRP	63
4.10.5 Conclusioni sul resvatrolo	64
5.DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	67
6. BIBLIOGRAFIA	69

## RIASSUNTO

**INTRODUZIONE:** Questo studio vorrebbe valutare delle alternative naturali all'utilizzo della clorexidina come antisettico. La ricerca in questa direzione ha come scopo di bypassare le eventuali problematiche di farmaco resistenza che nel corso degli anni sono sempre più in aumento, ed eventuali effetti collaterali della clorexidina come l'ipersensibilità, la pigmentazione dello smalto e le reazioni allergiche.

**MATERIALI E METODI:** Per cercare una possibile sostanza di origine naturale che possa sostituire la clorexidina è stata svolta una ricerca su motori di ricerca come PubMed e Cochrane di articoli che argomentassero l'utilizzo dei polifenoli in campo odontoiatrico e le loro eventuali interazioni con i microrganismi del cavo orale. Sono stati esaminati 140 articoli, dai quali si è potuto ricavare informazioni riguardo alla loro struttura e alle loro proprietà benefiche per il nostro organismo; in particolare tra questi 140 articoli, sono stati presi in esame 42 studi in vitro e 9 studi in vivo, 1 in particolare sull'uomo.

**DISCUSSIONE E CONCLUSIONI:** Dall'analisi di questi articoli si è potuto ricavare informazioni riguardo le loro proprietà antibatteriche, antinfiammatorie e anti-carcinogeniche. Ad oggi, da questi studi, si è dimostrato che i polifenoli riescano ad apportare modifiche allo strato di pellicola orale ispessendola e rafforzandola, inoltre i polifenoli hanno mostrato un'efficacia nell'inibizione della crescita batterica, nell'adesione dei batteri alla superficie dentale e nell'inibizione della loro attività enzimatica. Tuttavia, nonostante la quantità di conoscenze accumulate, i meccanismi coinvolti

nell'attività in vivo dei polifenoli non sono ancora pienamente compresi e possono variare da un composto ad un altro. È necessario ancora molto lavoro per definire il loro preciso obiettivo biologico, la loro biodisponibilità o il ruolo del microbiota intestinale sul loro metabolismo. Nel prossimo futuro dovrebbero essere previsti progressi significativi grazie alle nuove tecniche analitiche e i nuovi approcci metodologici a nostra disposizione.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** This study would like to evaluate natural alternatives to the use of chlorhexidine as an antiseptic. Research in this direction aims to bypass any problems of drug resistance which are increasingly increasing over the years, and any side effects of chlorhexidine such as hypersensitivity, pigmentation of the enamel and allergic reactions.

**MATERIALS AND METHODS:** To search for a possible substance of natural origin that could replace chlorhexidine, a search was carried out on search engines such as PubMed and Cochrane for articles that discussed the use of polyphenols in the dental field and their possible interactions with microorganisms of the oral cavity. 140 articles were examined, from which it was possible to obtain information regarding their structure and their beneficial properties for our organism; in particular, among these 140 articles, 42 in vitro studies and 9 in vivo studies were examined, 1 in particular on humans.

**DISCUSSION AND CONCLUSIONS:** From the analysis of these articles it was possible to obtain information regarding their antibacterial, anti-inflammatory and anti-carcinogenic properties. To date, from these studies, it has been shown that polyphenols are able to make changes to the layer of oral film by thickening and strengthening it, furthermore polyphenols have shown effectiveness in the inhibition of bacterial growth, in the adhesion of bacteria to the surface dental and in the inhibition of their enzymatic activity. However, despite the amount of knowledge accumulated, the mechanisms involved in the in vivo activity of polyphenols are not yet fully understood and may vary from one compound to another. Much work is still needed to define their precise biological target, their bioavailability or the role of the intestinal

microbiota on their metabolism. Significant progress should be expected in the near future thanks to the new analytical techniques and new methodological approaches at our disposal.

# 1.INTRODUZIONE

## 1.1 LA FARMACORESISTENZA

È ormai noto come negli ultimi anni ci sia stato un aumento rapido della resistenza antimicrobica, da parte dei batteri verso i farmaci, a livello mondiale diventando un rischio per la salute pubblica talmente elevato da essere stato paragonato al rischio rappresentato dal cambiamento climatico e dal terrorismo. <sup>1</sup>

La causa principale di questo aumento è l'uso prolungato, ripetuto e molte volte inappropriato di un farmaco, anche da parte dei pazienti:

- Assunzione senza prescrizione medica
- Ridurre o aumentare la dose a piacimento
- Interrompere la terapia prescritta prima del dovuto
- Assunzione senza una reale necessità

Tutti questi comportamenti scorretti contribuiscono all'insorgere di una farmaco resistenza e/o una farmaco tolleranza.

La farmaco resistenza (nota anche come resistenza antimicrobica) è la capacità dei microbi, come virus, batteri, parassiti, di sopravvivere in presenza di un farmaco chimico che precedentemente era efficace nel bloccare la sua crescita o ucciderlo, con conseguente riduzione dell'efficacia di tale farmaco verso il trattamento di una patologia. Questa capacità dei microrganismi è ereditabile, ed è spesso determinata dalla mutazione di alcuni geni chiamati <<Resistomi>>.

Il concetto vero e proprio di farmaco resistenza è stato preso in considerazione quando alcuni batteri sono diventati resistenti a specifici antibiotici; da quel momento si sono sviluppati meccanismi simili anche in altre patologie come, ad esempio, il virus dell'HIV che

diventa resistente ai farmaci antiretrovirali o come alcune cellule tumorali che sviluppano resistenza ai farmaci chemioterapici.<sup>2</sup>

Esistono diversi meccanismi che portano ad acquisire la resistenza, tra i quali ricordiamo:

- Produzione di enzimi inattivanti
- Ridotta penetrazione dell'antibiotico
  - riduzione dei canali di entrata, con conseguente concentrazione troppo bassa del farmaco
  - pompe di efflusso, portano fuori i farmaci dalla cellula da specifiche proteine di membrana in maniera più veloce di quanto non riescano ad entrare; così facendo non si raggiungono i livelli tali da inibire le sintesi proteiche
- Modificazione della struttura del bersaglio con conseguente riduzione di affinità per il bersaglio
- Aumentata produzione di enzimi inibiti dall'antibiotico

### 1.1.2 TIPI DI RESISTENZA

Prendendo in considerazione i batteri si possono distinguere 3 tipi di resistenza ai farmaci: una intrinseca, una acquisita e una adattiva.

La resistenza intrinseca si può definire come una proprietà innata del batterio stesso, è legata alla natura stessa del microrganismo per cui questo non rientra nello spettro d'azione dell'antibiotico.

- La parete cellulare o la membrana citoplasmatica di un organismo possono essere impermeabili verso un antibiotico

- Può non esserci la struttura su cui l'antibiotico agisce (es. i micoplasmi sono privi della parete cellulare e quindi sono insensibili ai beta-lattamici)

La resistenza acquisita invece è più grave in quanto un batterio che precedentemente era sensibile verso un determinato farmaco acquisisce un meccanismo di resistenza verso di esso grazie a una mutazione o dall'acquisizione di materiale genetico nuovo da una fonte esogena (trasferimento genetico orizzontale). Questo processo può avvenire tramite 3 meccanismi principali:

- Trasformazione: frammenti di DNA libero da un batterio morto entrano in un batterio che funge da ricevente e vengono incorporati nel suo cromosoma, così facendo si crea una ricombinazione genetica.
- Trasduzione: il trasferimento del materiale genetico in questo caso avviene grazie a un batteriofago che lo trasporta da un batterio chiamato donatore a un batterio chiamato ricevente.
- Coniugazione: questo è il meccanismo più importante del trasferimento genico orizzontale. Il materiale genetico si trasferisce per contatto fisico diretto tra le due cellule batteriche. Si crea un pillo sessuale tra le due cellule che permette il trasferimento di un plasmide da una cellula donatrice a una ricevente.

Infine abbiamo la resistenza adattiva, che a differenza delle due precedentemente elencate, è transitoria; si tratta di una risposta molto rapida da parte dei batteri ed è indotta da uno specifico segnale ambientale (stress, stato di crescita, condizioni nutrizionali, pH etc). Generalmente una volta rimosso il segnale induttivo si ha un ritorno del batterio al suo stato originale.<sup>3</sup>

### 1.1.3 LA RESISTENZA BATTERICA IN ODONTOIATRIA

Nelle righe precedenti si è parlato della resistenza agli antibiotici da parte dei batteri, oltre a questa ne esiste un altro tipo nel nostro campo, quello odontoiatrico, molto meno discusso, e si tratta di quello verso gli antisettici orali, in particolare verso la clorexidina, che risulta essere tra quelli più diffusi; la possiamo trovare in diverse formulazioni come nei colluttori, nei gel, nei dentifrici ed anche nelle applicazioni topiche.

È importante ricordare che la bocca viene considerata come un probabile serbatoio di geni di resistenza verso gli antibiotici e gli antisettici. Questi geni hanno la capacità di diffondersi tra i vari microrganismi presenti nella placca batterica tramite la trasmissione genica orizzontale; questo processo sembra rivestire un ruolo importante nelle cause della resistenza ai farmaci. Per capire un po' meglio questo processo è il caso di fare un passo indietro e vedere come sia strutturato un batterio e come funziona.

I batteri sono cellule procariote, di dimensioni ridotte, grazie alla loro forma possono essere suddivisi in due grandi gruppi:

- Forma sferica nei cocci
- Cilindrica nei bacilli.

L'architettura di questo tipo di cellula è molto semplice, non troviamo compartimenti cellulari al suo interno divisi da membrane; la sua struttura cromosomica è immersa direttamente nel citoplasma, il quale è delimitato verso l'esterno da una membrana, chiamata membrana citoplasmatica; il tutto è protetto da una struttura rigida chiamata parete cellulare che presenta in superficie uno strato di natura polisaccaridica chiamato capsula.

La capsula riveste un ruolo importante per i batteri patogeni per alcune sue proprietà:

- Adesività, permette al batterio di colonizzare particolari superfici, come ad esempio, lo *Streptococcus mutans* che riesce ad aderire alla superficie dello smalto dentale
- Antifagocitaria
- Forma il biofilm, ovvero una formazione di strutture complesse composte da batteri e matrice di materiale capsulare. Queste possono invadere zone ampie di mucosa, di fasci connettivali intermuscolari, e di superfici di materiali introdotti a scopi terapeutici ( fili di sutura e vari impianti protesici). Un'altra cosa da ricordare è che i batteri all'interno del biofilm risultano essere un bersaglio più difficile per numerosi farmaci in quanto non riescono a diffondere in maniera efficace all'interno della spessa matrice capsulare.

Nel citoplasma non sono riconoscibili strutture più complesse come l'apparato del Golgi o i mitocondri, presenti invece nella cellula eucariote; è riconoscibile invece una enorme e singola molecola di DNA, strettamente raggomitolata su se stessa, non separata da membrane, che corrisponde dal punto di vista strutturale e funzionale a un cromosoma ed è facile trovarne più di uno all'interno della cellula batterica che contiene inoltre delle altre molecole di DNA ma più piccole, chiamate plasmidi. Torniamo ora al fenomeno dell'antibiotico-resistenza di cui parlavamo prima. Questo fenomeno è favorito, appunto, da questi plasmidi (elementi genetici di piccole dimensioni) che hanno la capacità di replicarsi in maniera autonoma. In essi si trovano dei geni accessori, ovvero dei geni che non sono di fondamentale importanza per la vita della stessa cellula, ma sono da ricordare in quanto rivestono un

ruolo importante per la virulenza del batterio in quanto servono per la codificazione di:

- Pili, appendici di origine proteica molto piccole che si proiettano fuori dagli involucri cellulari. Servono sia per il trasferimento orizzontale che alla formazione del biofilm, senza di essi non sarebbe possibile l'ingresso del DNA nella cellula batterica.
- Tossine
- Conferiscono resistenza a determinati antibiotici

Il trasferimento orizzontale non è altro che un passaggio di materiale genetico da una cellula all'altra grazie ai plasmidi, in particolare la cellula riesce a prelevare dall'ambiente circostante un frammento di DNA rilasciato da un'altra cellula, chiamata donatrice, e lo porta al suo interno grazie ai pili.<sup>4</sup>

Riguardo alla resistenza dei batteri verso gli antisettici sono stati scritti alcuni articoli a riguardo, uno in particolare ha attirato la mia attenzione: una Review sistematica di Ardila e Bedoya-Garcia dove hanno analizzato la resistenza dei batteri verso alcuni antisettici, tra cui la Clorexidina, il triclosan, il cloruro di cetilpiridinio (fanno parte dei biocidi) e formulazioni a base di piante medicinali.

Da questo studio si è potuto notare come alcuni batteri sviluppino una resistenza verso gli antisettici, in particolare lo *Streptococcus mutans* e il *Lactobacillus Acidophilus* hanno sviluppato una resistenza alla Clorexidina e al Triclosan che durante il corso dello studio è addirittura aumentata.

Lo *Streptococcus mutans*, fa parte della specie degli streptococchi viridans, è in grado di produrre glucani che favoriscono l'adesione a

superfici lisce come quella dello smalto dentale. Importante sottolineare che questo battere può essere causa di endocardite.

Il *Lactobacillus acidophilus* invece, fa parte della famiglia dei *Lactobacillaceae*, è un batterio gram-positivo che risulta essere in grado di produrre acido lattico dalla fermentazione del glucosio. A differenza dello *Streptococcus Mutans*, questo batterio porta notevoli benefici per la salute dell'uomo: aiuta nell'eliminazione delle tossine prodotte da batteri patogeni e produce dei composti che risultano essere inibitori per la crescita di microrganismi patogeni.

Nello studio sopra riportato è interessante notare invece che non sono state osservate invece resistenze per il Cloruro di cetilpiridinio e per le formulazioni a base di piante medicinali.<sup>5</sup> Questa ultima osservazione per me risulta essere di notevole rilevanza al fine di questa tesi, in quanto questa ricerca si pone come obiettivo di studiare e progettare un antisettico a base di molecole naturali per provare a contrastare questa minima parte della farmaco resistenza che riguarda il nostro campo.

## 1.2 IL CAVO ORALE

### 1.2.1 POPOLAZIONE BATTERICA

Abbiamo inquadrato un po' i batteri in maniera generale, facendo qualche piccolo accenno alla loro struttura, ora vediamo un po' più nel dettaglio la popolazione che ci interessa più da vicino, quella del cavo orale.

Il cavo orale risulta essere un habitat perfetto per una grande varietà di batteri, grazie alla presenza di residui alimentari, detriti epiteliali e secrezioni, insieme ad una temperatura costante ed a un elevato grado di umidità.

Nella sua numerosa e varia popolazione ricordiamo alcune specie:

- Streptococchi
- Lattobacilli
- Stafilococchi
- Actinomiceti
- Alcuni anaerobi obbligati come le spirochete anaerobie.
- Candida in condizioni di patogene

Nel microbiota orale in genere non si rileva la presenza di virus, ad eccezione ad esempio del Cytomegalovirus, dell'HHV-7 (virus della famiglia degli herpesviridae, che viene contratto di solito in infanzia causando la roseola chiamata anche febbre dei tre giorni), che possono essere presenti a fasi periodiche nella saliva dei soggetti infetti in maniera latente. Un altro virus che si può trovare in maniera occasionale è quello dell'Herpes Simplex che può essere eliminato attraverso la saliva all'inizio della fase infettiva, prima che compaiano i sintomi clinici. Si può trovare invece nella fase infettiva della malattia il virus della mononucleosi, o malattia del bacio, l'Epstein-barr.

La popolazione microbica del cavo orale non è sempre la stessa durante tutto l'arco della vita, ma subisce delle modificazioni in relazioni alle differenti età evolutive; al momento della nascita nel cavo orale sono presenti solamente i tessuti molli delle guance, delle labbra, della lingua e del palato, i quali sono mantenuti umidi dalle secrezioni salivari. Possiamo dire che al momento della nascita il cavo orale sia in una condizione di sterilità, mantenuta per un tempo davvero breve in quanto con l'inizio dell'allattamento al seno inizia la colonizzazione.

In questa fase evolutiva la specie dominante è rappresentata dallo *Streptococcus salivarius*, circa il 98%, fino all'eruzione dei denti (6-9 mesi d'età).

Con la presenza dei denti iniziano a comparire anche lo *Streptococcus mutans* e lo *Streptococcus sanguis* che necessitano di una superficie non desquamante (non epiteliale) sulla quale poter colonizzare e resteranno nel cavo orale finchè saranno presenti i denti.

Intorno alla fase della pubertà la popolazione microbica ha raggiunto un buon stato di complessità, comprendendo anche i *Bacteroides*, batteri Gram-negativi, che sono dei bacilli, e varie spirochete anaerobie.

Il microbiota orale contiene sia batteri gram-positivi che gram negativi, può essere quasi considerato come una “comunità” di microrganismi che vive in simbiosi anche se questa condizione di equilibrio risulta essere spesso instabile con conseguente diffusione e proliferazione di una specie rispetto ad un'altra. In questa popolazione di microrganismi troviamo batteri che possono essere potenzialmente patogeni causando patologie odonto-stomatologiche (come parodontiti e carie) ma sono anche in grado di causare danni di entità notevole anche in sedi extra-orali, specialmente se riescono ad accedere ai tessuti profondi o al circolo ematico; un esempio è dato dagli *Streptococchi* orali (specialmente gli streptococchi viridanti, come il *mutans*), che possono essere introdotti nel circolo sanguigno in seguito al trattamento di lesioni del parodonto e avulsioni/estrazioni dentali, e, in presenza di valvole cardiache già precedentemente lesionate o in stato di sofferenza, riescono ad aderire all'endocardio colonizzandolo provocando un'endocardite, spesso molto grave.<sup>6</sup>

### 1.2.2 LA SALIVA

Vediamo ora un'altra componente molto importante al fine del mantenimento della salute del cavo orale e delle sue strutture: la saliva.

Essa è un liquido che viene secreto da ghiandole salivari, organi a funzione specifica derivati dall'epitelio di rivestimento della cavità buccale, ognuna di esse è rivestita da una capsula fibrosa. La saliva prodotta dalle cellule, chiamate secernenti, viene trasportata attraverso una serie di sottili condotti verso un unico e più grande condotto escretore, che passa attraverso la capsula e sfocia sulla superficie della mucosa orale.

Queste ghiandole possono essere suddivise in due grosse categorie: ghiandole salivari maggiori e minori.

- Ghiandole salivari maggiori: ne fanno parte 3 grosse ghiandole pari che producono la maggior parte della saliva (93% del totale) e sono:
  - Parotidi: sono le più grandi tra le ghiandole salivari. Hanno forma di una piramide di base triangolare con apice rivolto inferiormente e base rivolta cranialmente. Sono contenute nella loggia parotidea, spazio di forma prismatico-triangolare limitato in avanti dal margine posteriore della mandibola e dal muscolo pterigoideo interno, indietro dalla mastoide con i muscoli sternocleidomastoideo e digastrico, in alto dal condotto uditivo esterno e dall'articolazione temporo-mandibolare. La secrezione di ogni ghiandola è drenata da un dotto principale, chiamato dotto di Stenone, che si porta in avanti e medialmente, attraversa il muscolo buccinatore della guancia e sbocca a livello della mucosa della guancia, all'altezza del secondo

molare superiore. Il suo secreto è di tipo principalmente sieroso e durante la notte si inattiva.

- Sottomandibolare: hanno la forma di un ovoide e si trovano nel pavimento della bocca, lungo le superfici mediali della mandibola, al di sotto della linea miloioidea. I suoi dotti sono chiamati anche dotti di Wharton, si aprono a livello dei due lati del frenulo linguale, subito dietro ai denti.
- Sottolinguali: comprende un complesso di piccole ghiandole, alcune delle quali sono provviste di propri condotti che sboccano ai lati del pavimento della lingua, più precisamente ai lati della caruncola linguale, altre invece confluiscono in un unico dotto escretore principale, il dotto del Bartolino, che sbocca a lato del dotto di Wharton. Ogni ghiandola è rivestita dalla mucosa che riveste il pavimento della bocca. Hanno una secrezione di tipo mucoso.
- Ghiandole salivari minori: le troviamo a livello della lingua, del palato, della guancia.

Ogni ghiandola salivare presenta una propria organizzazione cellulare e secerne un tipo di saliva con caratteristiche un po' differenti tra loro. Ad esempio, le ghiandole parotidi producono un secreto denso e sieroso, che contiene un enzima digestivo, l'amilasi salivare, importante per il processo digestivo soprattutto dei carboidrati complessi.

Nella saliva troviamo inoltre delle glicoproteine molto importanti che le conferiscono effetti lubrificanti, fondamentali durante i pasti perché contribuiscono alla prima fase digestiva, che avviene in bocca, dove il cibo viene inumidito e le sostanze chimiche vengono sciolte e vanno a stimolare i calici gustativi.<sup>7</sup>

Il suo pH è molto vicino allo stato di neutralità, ovvero oscilla tra i 6,5 e i 7,5.

Essa svolge numerose funzioni, la più importante è quella di difesa verso i patogeni orali, e possono essere riassunte in:

- Attività antimicrobica grazie alla presenza di enzimi come la lattoferrina, il lisozima, gli anticorpi specifici
- Effetto tampone
- Azione di detersione con lo scopo di allontanare i batteri che non sono ancora adesi

La riduzione o l'eliminazione della secrezione salivare porta a una condizione di squilibrio a livello di popolazione batterica nel cavo orale con conseguente possibili infezioni ricorrenti e all'erosione progressiva dei denti.

### 1.2.3 SALIVA E GUARIGIONE DELLE FERITE

Durante il corso della giornata la mucosa orale viene esposta continuamente a stress chimici e forze meccaniche, come semplici attività quotidiane come il masticare, il mangiare, il bere, il mordere; in queste situazioni la saliva, in particolare le mucine salivari, rivestono un ruolo fondamentale per la protezione della mucosa orale stessa. Esse costituiscono la parte principale degli strati di muco idrofilo che ricoprono i tessuti orali, che conferiscono alla mucosa lubrificazione proteggendola dalle forze di attrito.

La saliva riveste un ruolo nella guarigione delle ferite intraorali, che, come scritto nell'articolo di Brand e Veerman, fino ad ora ha ricevuto poca attenzione.

La guarigione delle ferite intraorali e quelle della pelle sono simili e si caratterizzano da diverse fasi:

- Subito dopo la comparsa della ferita abbiamo una fase di vaso-costrizione dei vasi sanguigni e l'inizio della cascata della coagulazione. Entrambi i processi hanno come scopo quello di limitare la perdita di sangue.
- Segue poi la fase infiammatoria, durante la quale i batteri e le cellule necrotiche vengono rimossi grazie ai macrofagi e altre cellule infiammatorie. Contemporaneamente le cellule dell'infiammazione rilasciano fattori che stimolano la divisione cellulare e la migrazione delle stesse, come le cellule epiteliali e i fibroblasti.
- Segue poi la fase proliferativa, in cui si susseguono diversi processi rigenerativi, tra i quali ricordiamo l'angiogenesi, la deposizione di matrice di collagene e la formazione del tessuto di granulazione. La ferita viene così ricoperta da tessuto epiteliale.
- Nell'ultima fase avviene il rimodellamento del collagene e tramite l'apoptosi vengono rimosse le cellule che hanno finito di svolgere la loro funzione e non sono più necessarie.

La guarigione totale della ferita per quanto riguarda la pelle può richiedere un tempo compreso tra un mese a più di due anni, mentre per la guarigione delle ferite della mucosa orale abbiamo una sostanziale differenza: questo tipo di ferite hanno un tempo di guarigione nettamente più breve (circa 14 giorni), e presentano una formazione di cicatrice minore.

Questo tempo di guarigione relativamente breve è reso possibile, in primo luogo, dal fatto che il turnover cellulare della mucosa orale è decisamente più alto rispetto a quello della pelle, rendendo possibile un processo riparativo più rapido. In secondo luogo, è facilitato dall'alta

vascolarizzazione della mucosa orale, questo comporta un maggior reclutamento delle cellule infiammatorie, dei fattori di crescita e dei nutrienti per la ferita.

Anche l'umidità dell'ambiente del cavo orale è un fattore che promuove il processo di guarigione impedendo la disidratazione delle cellule con conseguente morte, e favorendo il processo di ri-epitelizzazione in quanto la migrazione delle cellule dell'epitelio è favorita dalle superfici umide. Questo ambiente umido è reso possibile dalla saliva. <sup>8</sup>

## 2. CLOREXIDINA

Parliamo ora dell'antisettico più conosciuto e usato soprattutto nel nostro lavoro, la clorexidina, facendo qualche piccolo accenno a livello storico.

La clorexidina è stata scoperta quasi per caso negli anni '50 da un'azienda chiamata Imperial Chemical Industries mentre era alla ricerca di farmaci per la malaria, in particolare erano alla ricerca di analoghi del proguanil.<sup>12</sup>

Sin dal principio fu sviluppata e sintetizzata come antisettico della pelle, delle mucose e delle ferite o come conservante delle formulazioni farmaceutiche di tipo oftalmico.<sup>10</sup>

La clorexidina risulta essere un potente antisettico efficace contro batteri, funghi e virus, largamente usato sia nel settore sanitario, sia nella vita di tutti i giorni nelle case private.<sup>9</sup>

Per quando riguarda il nostro ambito, quello odontoiatrico, la troviamo in diverse formulazioni: gel orali, collutori, dentifrici e spray, questo ne facilita l'uso anche a livello domiciliare, in quanto, la clorexidina è riconosciuta come agente primario per il controllo della placca e quindi come un ottimo alleato nel mantenimento della salute del cavo orale nell'uso quotidiano.<sup>11</sup>

Un'altra sua proprietà che ci interessa molto da vicino è quella di facilitare il processo di guarigione delle ferite del cavo orale, limitandone la carica batterica, causate da:

- piccoli traumatismi chimici o fisici
  - protesi incongrue

- denti con bordi taglienti
- spazzolatura inadeguata
- da disturbi del sistema immunitari (come il pemfigo vulgaris, la stomatite aftosa ricorrente, il lichen planus)
- chemioterapia o radioterapia

Il processo di guarigione delle lesioni è influenzato dalle interazioni fisiologiche tra i microrganismi presenti nel cavo orale, il quale ospita dalle 800 alle 1000 specie batteriche diverse; se questo microbioma viene modificato da agenti o fattori esterni, può succedere che una specie batterica prevarichi su un'altra rendendo le lesioni suscettibili a processi infettivi con conseguente ostacolo al processo di guarigione andando a influire sulla cascata infiammatoria, sulla proliferazione e il rimodellamento dei tessuti.<sup>12</sup>

## 2.1 MECCANISMO D'AZIONE

La clorexidina agisce andando a colpire la membrana cellulare batterica, aumentandone la permeabilità e causandone un'alterazione strutturale a livello proteico provocando lisi della cellula e conseguente morte.

È importante evidenziare che la clorexidina a diverse concentrazioni può provocare effetti diversi: ad alte concentrazioni, almeno del 2%, ha un ruolo battericida, mentre, a basse concentrazioni ha un ruolo batteriostatico.

La molecola di clorexidina è attratta dalla superficie della cellula batterica che è carica negativamente, quando ne viene a contatto ne altera la struttura della membrana stessa e viene attratta dalla membrana cellulare interna; qui si lega ai fosfolipidi aumentandone la permeabilità

causando una perdita di ioni potassio che sono a basso peso molecolare. Questa fase è definita batteriostatica, ed è reversibile: dal momento in cui la clorexidina viene rimossa la cellula batterica riesce a tornare allo stato iniziale.<sup>11</sup>

L'effetto battericida invece è dovuto alla rottura della membrana cellulare, causato da elevate concentrazioni di Clorexidina, con conseguente inibizione dei processi respiratori e alla perdita di acidi nucleici; inibisce inoltre un'enzima vitale per il mantenimento della via metabolica, in particolare nella produzione del peptidoglicano del battere, il fosfoenolpiruvato fosfotransferasi.<sup>12</sup>

La clorexidina, come abbiamo già accennato, risulta essere un ottimo aiuto nel controllo della placca a livello domiciliare: a differenza di altri antisettici che hanno un effetto immediato sui microrganismi orali ma non permangono nella bocca una volta espettorati permettendo così alla placca di accumularsi nuovamente, la clorexidina in concentrazione dello 0,2% invece permane sulla superficie del dente, così facendo permane anche il suo effetto antibatterico, sia battericida (immediato al momento dell'applicazione), che batteriostatica (azione prolungata a seguito dell'attaccamento della clorexidina stessa al biofilm che riveste lo smalto).<sup>11</sup>

## 2.2 EFFETTI AVVERSI DELLA CLOREXIDINA

Come abbiamo già detto sopra, la clorexidina è un antisettico molto usato sia nell'ambito sanitario che nel privato, sebbene abbia un buon profilo di sicurezza, sono state riportate reazioni allergiche con frequenza crescente. Le reazioni possono variare da sintomi cutanei lievi a reazioni anafilattiche vere e proprie sino ad arrivare a reazioni che portano al decesso.

Se consideriamo però il rapporto tra le reazioni allergiche e l'uso molto diffuso della clorexidina, si può dire che queste siano abbastanza rare, ma rischiano di essere trascurate a causa della mancata conoscenza del suo potenziale allergenico.<sup>9</sup>

Nei primi anni '90 la clorexidina iniziò ad essere introdotta in alcuni dispositivi medici, come i cateteri endovenosi, e da questo momento in poi si è iniziato a notare e comprendere il suo potenziale nel poter dare reazioni di ipersensibilità.

Oltre a queste condizioni che possono essere più o meno gravi sono stati riscontrati alcuni casi di morte riconducibili a reazioni correlate alla clorexidina. Sono molto rari ma non sono da escludere ed è bene che i professionisti ne siano a conoscenza.

Nell'articolo di Pemberton e Gibson, dove vengono analizzate le reazioni di ipersensibilità verso la clorexidina, sono riportati due casi di morte avvenuti nel Regno Unito.

In entrambi i casi sembra ci sia stato un coinvolgimento della Clorexidina nel trattamento post-estrattivo; non sembra essere chiaro quanto l'applicazione dell'antisettico su una ferita aperta abbia condizionato la natura e l'entità delle reazioni allergiche che ne sono derivate, ma si ritiene molto probabile che questo abbia aumentato la quantità di Clorexidina assorbita nel flusso sanguigno rispetto ad una normale applicazione topica su mucosa orale intatta.

Nel primo caso si è verificata la morte di un paziente di sesso maschile di 63 anni, risalente al 2009, dove il medico legale ha messo come causa di morte : "morte accidentale a causa di una reazione allergica". In questo particolare caso, l'inchiesta ha ascoltato prove di esperti che dichiaravano che la reazione allergica fosse stata alla clorexidina con una

percentuale del 95%. Il paziente in questione ha avuto un arresto respiratorio ed è morto in ospedale.

La clorexidina in questo particolare caso era stata usata per irrigare un alveolo; altre cause di questa reazione anafilattica sono state escluse.

Il secondo caso riportato invece, tratta la morte di una paziente donna di 30 anni, risalente a febbraio 2011, dove il medico legale ha messo come causa di morte: “morte per disavventura medica, con la morte dovuta ad anafilassi, molto probabilmente a un collutorio dentale contenente clorexidina”. Anche in questo caso la clorexidina era stata usata per irrigare un alveolo post-estrattivo, giorni dopo che il dente era stato estratto.<sup>13</sup>

Come detto prima, questi due casi sono stati riportati in quanto estremi ma non impossibili.

### 2.3 IPERSENSIBILITÀ ALLA CLOREXIDINA E OPERATORI SANITARI

Grazie alla maggior consapevolezza delle infezioni che si possono acquisire in ambito ospedaliero si è verificato un aumento dell'uso della clorexidina notevole, come per le decontaminazioni delle mani tra gli operatori sanitari.

Come conseguenza a questo uso diffuso e alla presenza della stessa in molti dei prodotti utilizzati in ospedale si sta diffondendo la preoccupazione che l'incidenza dell'allergia verso questo antisettico possa aumentare in maniera parallela all'aumento dell'esposizione alla clorexidina. Si pensa che l'incidenza dell'allergia a quest'ultima possa essere simile alla storia epidemiologica dell'allergia al lattice.

Non è ben chiaro se l'incidenza dell'allergia sia in aumento solo nell'ambiente sanitario o nella popolazione generale, ma è chiaro che l'ipersensibilità a questo antisettico sia un fattore noto e concreto. Nel 2012 è stato pubblicato un aggiornamento sulla sicurezza dei farmaci per tutti gli operatori sanitari sul potenziale della clorexidina di indurre ipersensibilità dall'Agenzia di regolamento dei medicinali e dei prodotti sanitari del Regno Unito.

Ho voluto spendere qualche riga per cercare di sottolineare e portare un po' all'attenzione questo problema, in quanto la clorexidina è un prodotto di uso comune e diffuso in ambito Odontoiatrico e purtroppo risulta molto facile dimenticare e sottovalutare il fatto che tali prodotti di uso quotidiano hanno il potenziale di causare diverse reazioni avverse, dalle meno alle più gravi.<sup>13</sup>

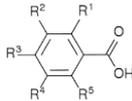
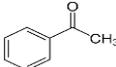
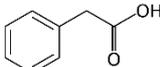
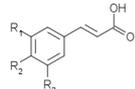
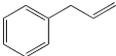
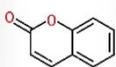
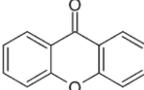
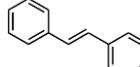
### 3. I POLIFENOLI

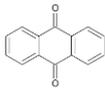
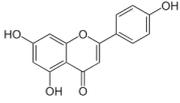
I polifenoli rappresentano un vasto gruppo eterogeneo di sostanze organiche naturali, seminaturali o sintetiche, provenienti dal regno vegetale: vengono, infatti, prodotti dal metabolismo secondario delle piante e costituiscono così parte integrante della dieta sia umana che animale. Nel corso del tempo è stato dimostrato che i polifenoli sono metaboliti essenziali per la fisiologia delle piante, in quanto contribuiscono alla loro pigmentazione, prendono parte alla loro crescita e le rendono resistenti ai patogeni e ai predatori.<sup>14</sup>

#### 3.2 CHIMICA DEI POLIFENOLI

E' stato riscontrato che, ad oggi, si riconoscono più di 8000 strutture fenoliche.<sup>15</sup> I fenoli sono costituiti da un anello aromatico benzenico con un gruppo ossidrilico<sup>16</sup>; nel momento in cui si hanno più cicli fenolici condensati, questi composti vengono definiti polifenoli.<sup>17</sup> I polifenoli naturali possono essere rappresentati da molecole semplici, come gli acidi fenolici, oppure da composti altamente polimerizzati, come i tannini. Le forme più comuni sono quelle coniugate, in cui vi è la presenza di uno o più residui di zucchero legati a gruppi ossidrilici oppure ci sono legami diretti tra l'unità di zucchero e un anello aromatico: tra gli zuccheri associati si possono ritrovare monosaccaridi, disaccaridi, ma anche oligosaccaridi. Il residuo di zucchero più presente è sicuramente il glucosio, ma si ritrovano anche galattosio, ramnosio, xilosio e arabinosio, così come si possono ritrovare l'acido glucuronico e galacturonico. Inoltre, si è visto che risultano comuni varie associazioni con altri composti, quali acidi carbossilici e organici, ammine, lipidi, nonché collegamenti con altri fenoli.<sup>14</sup> Le vie biosintetiche dei polifenoli sono due: la via dello shikimato e la via dell'acetato.<sup>18</sup>

JB Harborne è stato uno degli studiosi maggiori dei polifenoli e delle loro caratteristiche<sup>18</sup>: ha infatti evidenziato come in natura si possano riscontrare almeno 10 classi diverse di polifenoli, suddivise in base alla loro struttura chimica di base, come visibile nella tabella sottostante. (Tab. 1) Inoltre, i flavonoidi, ovvero la classe più importante, possono essere ulteriormente divisi in 13 sottoclassi, contenenti più di 5000 composti differenti.<sup>15</sup>

CLASSI	SCHELETRO DI BASE	STRUTTURA DI BASE
Fenoli semplici	C <sub>6</sub>	
Benzochinoni	C <sub>6</sub>	
Acidi fenolici	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	
Acetofenoni	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	
Acidi fenilacetici	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	
Acidi idrossicinnamici	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	
Fenilpropeni	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	
Cumarinici, isocumarinici	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	
Cromoni	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	
Naftochinoni	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	
Xantoni	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	
Stilbeni	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	

Antrachinoni	$C_6-C_2-C_6$	
Flavonoidi	$C_6-C_3-C_6$	
Lignani, neolignani	$(C_6-C_3)_2$	
Lignini	$(C_6-C_3)_n$	

Tab. 1: Classificazione polifenoli secondo Harborne

I flavonoidi rappresentano il gruppo maggiormente ampiamente di fenoli vegetali. La loro struttura di base è quella dei difenilpropani ( $C_6-C_3-C_6$ ), costituiti da due anelli aromatici collegati da tre carboni che di solito formano un eterociclo ossigenato. (Fig.1) L'anello A solitamente proviene da una molecola di resorcinolo o floriglucino sintetizzato nella via dell'acetato, mentre l'anello B deriva dalla via dello shikimato.

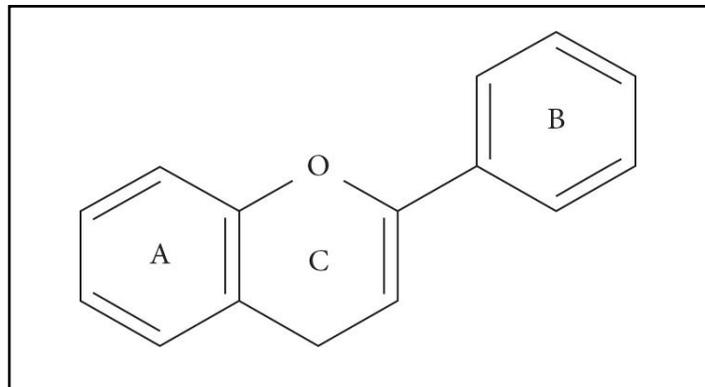


Fig. 1. Struttura di base dei difenilpropani

### 3.3 VIE BIOSINTETICHE DEI POLIFENOLI

Le piante possono sintetizzare un numero elevato di polifenoli attraverso vie metaboliche diverse: in particolare, possiamo riconoscere un metabolismo primario e uno secondario.<sup>19</sup>

Le vie associate al metabolismo primario, quali glicolisi, via del pentoso-fosfato, della proteina lipid-fosfato e biosintesi dell'acido nucleico, garantiscono la biosintesi dei metaboliti che risultano essere essenziali per la sopravvivenza della pianta stessa.<sup>20</sup> Le piante, inoltre, possiedono anche la capacità di generare vari metaboliti vegetali a partire dalla via metabolica secondaria: questi metaboliti risultano essere dei deterrenti naturali contro i parassiti. L'importante e vario numero delle sostanze generate dal metabolismo secondario deriva dalla molecola fenilpropanoide<sup>21</sup>, il cui nome deriva dall'amminoacido fenilalanina, che solitamente rappresenta il composto con cui inizia la biosintesi; diversamente dagli animali, infatti, le piante possiedono i meccanismi necessari per sintetizzare gli aminoacidi fenilalanina e triptofano.

Ad oggi si riconoscono due percorsi metabolici biosintetici: quello dell'acido mevalonico e quello dello shikimato; quest'ultimo rappresenta la via principale di sintesi all'interno del metabolismo delle piante superiori.<sup>22</sup>

### 3.3.1 VIA DELLO SHIKIMATO

E' stato riscontrato che la via dello metabolica dello shikimato viene effettuata da batteri, funghi e piante superiori: attraverso quest'ultima, la pianta provvede a convertire i due metaboliti primari fosfenolpiruvato e eritrosio 4-fosfato in acido corismico, mediante l'ausilio di sette enzimi differenti. La successiva reazione di condensazione tra eritrosio 4-fosfato e fosfoneolpiruvato produce il 3-deossi-arabinoeptulsonato-7-fosfato, il quale viene poi ossidato, defosforilato e ciclizzato dalla 3-deidroichinato-sintasi. La molecola risultante è rappresentata dal 3-deidrochinato, che viene poi disidratato e quindi ridotto a shikimato. La condensazione con un altro fosfoenolpiruvato determina la formazione del corismato, il quale rappresenta il precursore fondamentale per la formazione dei tre aminoacidi tirosina, fenilalanina e triptofano, nonché di altri composti aromatici.<sup>22-23</sup>

### 3.3.2 SINTESI E STRUTTURA DEI FENILPROPANOIDI

La sintesi dei polifenoli nelle piante solitamente prende origine dagli aminoacidi fenilalanina e tirosina. La produzione di acido gallico, però, e di conseguenza anche la sintesi degli ellagitannini e dei galletannini, rappresenta un'eccezione, in quanto è prodotto nella via dello shikimato in maniera diretta.<sup>24</sup> Ci sono, inoltre, alcuni fenoli vegetali la cui biosintesi deriva da un percorso metabolico definito via del polichetide.<sup>25</sup>

Per quanto riguarda la fenilalanina, quest'ultima viene sottoposta ad amminazione da parte dell'enzima fenilalanina ammoniacca liasi (PAL), il quale la converte in acido cinnamico-trans. La tirosina, invece, anche se in maniera molto meno frequente, viene sottoposta a metabolismo

attraverso l'enzima tirosina ammoniacasi (TAL), il quale la trasforma nell'acido p-cumarico.<sup>21</sup> L'acido cinnamico, dalla cui idrossilazione deriva l'acido p-cumarico, e tutti i suoi derivati rappresentano la base di partenza per la biosintesi di tutti i polifenoli.

### 3.4 PROPRIETÀ CHIMICHE, FISICHE E BIOLOGICHE DEI POLIFENOLI

#### 3.4.1 PROPRIETÀ CHIMICHE

La caratteristica struttura molecolare dei polifenoli è determinante per le loro proprietà antiossidanti.<sup>26</sup> All'interno dell'anello benzenico, gli atomi di carbonio sono monolegati tra loro, mentre i restanti sei elettroni risultano liberi di muoversi e quindi, essendo spaiati, possono essere delocalizzati e quindi utilizzati come radicali liberi. Inoltre, alcuni composti fenolici possiedono i gruppi ossidrilici che possono servire da chelanti del metallo.<sup>24</sup>

#### 3.4.2 PROPRIETÀ FISICHE

I composti fenolici purificati sono spesso rappresentati da solidi bianchi che hanno caratteristici odori aromatici, come vanillina, salicilato di metile e eugenolo.<sup>19</sup> In natura ci sono alcuni fenoli che risultano essere più idrofili, come i glucosidi dell'acido ossicinnamico, mentre altri sono più idrofobi, come i flavonoidi.<sup>27</sup> Mentre le molecole idrofobiche riescono ad essere assorbite all'interno della cellula tramite diffusione, ci sono vie differenti dal punto di vista sistemico per l'immissione nel corpo umano di composti idrofili.<sup>28</sup>

### 3.4.3 PROPRIETÀ BIOLOGICHE

Le sovraesposte proprietà chimiche e fisiche fanno in modo che la pianta stessa abbia alcuni vantaggi da un punto di vista biologico. La lignina, ad esempio, è un polimero complesso che è di aiuto nell'effettuare il trasporto meccanico dell'acqua, ma funge anche da barriera dell'acqua stessa.<sup>29</sup> In particolare, i flavoni e i flavonoli hanno dimostrato di svolgere un ruolo importante nella protezione contro i raggi UV, in funzione del loro spettro di assorbimento della luce.<sup>30</sup> Inoltre, è stato visto che i composti fenolici presentano un'attività antibatterica e antivirale, talvolta alcuni anche tossica,<sup>31</sup> il che è importante nel caso in cui la pianta debba difendersi da predatori e patogeni.<sup>24</sup> E' stato anche dimostrato che i tannini risultano essere i responsabili del sapore amaro, il che garantisce una notevole protezione contro i parassiti.<sup>32</sup>

### 3.5 I POLIFENOLI CONTENUTI NEL CIBO

I composti polifenolici si sono rivelati quasi onnipresenti negli alimenti di origine vegetale (cereali, legumi, verdure, frutta, frutta secca, ecc.) e nelle bevande (tè, vino, birra, sidro, ecc.). I loro livelli sono notevolmente variabili anche tra parti diverse della stessa pianta: ad esempio, la formazione di flavoni e flavonoli risulta essere dipendente dalla luce, perciò le più alte concentrazioni di questi composti sono generalmente localizzate nelle foglie, mentre se ne trovano basse nel sottosuolo. Sono moltissimi i fattori che influenzano il quantitativo di polifenoli contenuto nelle varie piante: fattori genetici, fattori ambientali, grado di maturazione, tipo di lavorazione e conservazione.<sup>33</sup> Ad esempio, si è visto che durante il processo di maturazione aumenta la concentrazione di antocianina, mentre la concentrazione di acido fenolico diminuisce.<sup>34</sup> Anche il processo di cottura degli alimenti può determinare cambiamenti nel

contenuto dei polifenoli all'interno degli alimenti stessi: ad esempio, le cipolle e i pomodori perdono circa il 75% del loro contenuto di quercetina durante il processo di cottura.<sup>35</sup>

I polifenoli sono parzialmente responsabili delle qualità nutrizionali e sensoriali degli alimenti di origine vegetale, come ad esempio l'amarrezza di alcuni cibi e bevande. Ad esempio, cambiamenti ossidativi come la doratura del cacao nel corso della sua lavorazione o la polimerizzazione ossidativa dei polifenoli del tè durante la produzione di tè nero determinano lo sviluppo di determinate caratteristiche organolettiche proprie di quel particolare cibo o bevanda. Viceversa, le reazioni di brunitura sia enzimatica che non enzimatica dei fenoli sono responsabili del colore e sapore sgradevoli di frutta e verdura.<sup>36</sup>

Il contenuto polifenolico all'interno degli alimenti di origine vegetale può variare notevolmente. Se consideriamo legumi e cereali, i principali polifenoli sono flavonoidi, acidi fenolici e tannini: il contenuto di polifenoli nei cereali è generalmente inferiore all'1 % della sostanza secca, mentre i legumi con maggiore contenuto polifenolico sono le varietà scure, come i fagioli rossi e neri. Si è visto che i legumi contengono anche isoflavoni, mentre le verdure sono composti principalmente da glicosidi flavonoidi, i quali si ritrovano principalmente nelle parti esterne della pianta;<sup>37</sup> le radici e i tuberi presentano, invece, concentrazioni molto basse di flavonoidi, ad eccezione di cipolle e liquirizia.<sup>38</sup> Le bacche presentano un alto contenuto di antocianine, mentre frutti come le mele e gli agrumi risultano ricchi di acidi fenolici e flavonoidi. Il composto fenolico predominante nella frutta è il flavonolo: si è visto che le concentrazioni più alte si riscontrano a livello della buccia.<sup>36</sup> Le noci sono ricche di tannini, l'olio di semi di acidi fenolici, mentre l'olio di oliva contiene sia acidi fenolici che tannini idrolizzabili.<sup>39</sup>

### 3.6 ASSUNZIONE DEI POLIFENOLI TRAMITE LA DIETA

Ad oggi non sono disponibili precise informazioni sull'assunzione alimentare di polifenoli; in letteratura sono disponibili pochi articoli che hanno cercato di stabilire una stima dell'intake di polifenoli con la dieta. Kühnau<sup>40</sup> ha stimato l'assunzione giornaliera media di flavonoidi negli Stati Uniti, la quale è risultata essere compresa tra 1 e 1,1 g/giorno, a seconda della stagione. Hertog et al.<sup>41</sup> ha invece calcolato l'assunzione di due tipi di flavonoidi, ovvero flavonoli e flavoni, nella dieta olandese e ha riscontrato che è di 23 mg/giorno, cifra significativamente più piccola rispetto alla stima di Kühnau di 115 mg/giorno per questi due flavonoidi, che però risulta presumibilmente inaffidabile a causa dei discutibili metodi analitici utilizzati durante il 1970.<sup>42</sup> Più recentemente, Leth e Justesen<sup>43</sup> hanno stimato che l'assunzione di flavoni, flavonoli e flavanoni in Danimarca risulta di 28 mg/giorno, simile a quanto riscontrato da Hertog et al. Questi studi, però, prendono in considerazione solamente l'assunzione di alcuni tipi di flavonoidi, senza considerare altre tipologie di composti fenolici. Inoltre, bisogna sottolineare che l'effettivo contenuto di polifenoli negli alimenti è di solito sottovalutato a causa dell'omissione dell'analisi dei polifenoli insolubili, che potrebbero risultare quantitativamente più importanti dei flavonoidi. Potremmo concludere, quindi, che una stima reale e accurata dell'assunzione totale dei polifenoli ad oggi non risulta disponibile.

### 3.7 ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE DEI POLIFENOLI

Il recente interesse per i composti fenolici contenuti negli alimenti è aumentato per via del loro ruolo come antiossidanti e antimutageni la loro implicazione nella prevenzione di patologie quali il cancro e le malattie cardiovascolari. Alcuni studi epidemiologici hanno dimostrato la presenza di una possibile correlazione tra un maggiore consumo di antiossidanti fenolici e un ridotto rischio di malattie cardiovascolari<sup>44</sup> e alcune tipologie di cancro.<sup>45</sup> In maniera simile, il consumo moderato di vino rosso, che risulta essere ricco di polifenoli, è stato associato ad un basso rischio di malattia coronarica.<sup>46</sup>

### 3.8 ATTIVITÀ ANTI-INFIAMMATORIA DEI COMPOSTI POLIFENOLICI CONTENUTI NELLA FRUTTA

Gli effetti dei prodotti e delle bevande che derivano dalla frutta hanno catturato l'interesse scientifico, in particolare a partire dall'azione protettiva del vino verso le patologie cardiache e successivamente andando a studiare le caratteristiche biologiche dei polifenoli del vino e dell'uva, nonché di altre tipologie di frutta.<sup>47</sup> I composti fenolici della frutta possono dare beneficio agli esseri umani attraverso diversi meccanismi.<sup>48</sup> Il meccanismo più noto è quello che sfrutta le loro proprietà antiossidanti e la modulazione dello stress ossidativo biologico per prevenire danni ai lipidi cellulari, alle proteine e al DNA. In maniera diretta, possono eliminare i superossidi e altre specie reattive dell'ossigeno (ROS) come idrossili e radicali perossidici; in maniera indiretta, invece, possono stimolare i sistemi di difesa antiossidante endogeni, come, ad esempio, fattore 2 correlato a NF-E2 (Nrf2), un fattore di trascrizione che controlla la produzione di enzimi antiossidanti come la catalasi e la glutazione perossidasi,<sup>49</sup> o, al contrario, possono inibire gli enzimi che

generano una notevole quantità di specie reattive dell'ossigeno come la xantina ossidasi e la NAD(P)H ossidasi.

Più recentemente, è stato studiato come i composti polifenolici abbiano una funzione nella segnalazione cellulare, in particolare nella modifica delle vie dell'infiammazione: alcune di queste azioni possono essere dirette, mentre altre sono secondarie e vanno a modificare l'equilibrio redox della cellula. La maggior parte delle azioni dirette riguardano il blocco o la down-regolazione dei recettori o la trascrizione di fattori che conducono all'espressione genica pro-infiammatoria, quali i recettori dell'interleuchina (IL) ed i Toll-like receptor (TLR) -4, il fattore nucleare kappa B (NF- $\kappa$ B), la proteina attivatrice (AP-1) e le chinasi c-Jun-N-terminal (JNK), oppure ancora i polifenoli possono agire come legante naturale per il recettore-gamma attivato dai proliferatori dei perossisomi (PPAR- $\gamma$ ), che a loro volta modulano l'espressione genica infiammatoria. I polifenoli possono anche aumentare positivamente la produzione di molecole anti-infiammatorie come IL-4, IL-10, IL-13 e l'adiponectina.<sup>50</sup>

Nel complesso, i composti fenolici ritrovati nella frutta hanno molteplici benefici per la salute umana, in particolare attraverso la loro azione di modifica degli eventi cellulari per favorire l'equilibrio tra stato infiammatorio e normale.

### 3.9 ATTIVITÀ DI PROTEZIONE DAI RAGGI UV DEI POLIFENOLI

Negli ultimi anni annualmente vengono messi in commercio moltissimi preparati cosmetici e/o dermatologici a base di estratti vegetali contenenti diverse tipologie di polifenoli, che dovrebbero avere una funzione di foto protezione, di prevenzione dei tumori della pelle, di anti-

invecchiamento, di guarigione delle ferite. Però, a causa delle loro proprietà fisiche, chimiche e biologiche, si è visto che i polifenoli in realtà potrebbero esercitare anche un'azione dannosa a livello della pelle stessa.<sup>51</sup> Gli effetti dannosi della luce UV a carico delle cellule della pelle si verificano sia attraverso un attacco diretto di molecole biologicamente importanti, come ad esempio il DNA, oppure attraverso la produzione di ROS (radicali liberi dell'ossigeno). Generalmente i raggi UV vengono in prima battuta assorbiti da cromofori endogeni, come la melanina, i chinoni e alcuni pigmenti vegetali,<sup>52</sup> di cui fanno parte ovviamente i polifenoli, i quali rappresentano quindi dei cromofori effettivi per i raggi UV. Dopo aver assorbito i raggi UV, le molecole cromofore si attivano e possono dissipare l'energia attraverso un processo esotermico che determina l'emissione di raggi infrarossi, giocando così un ruolo molto importante come filtro chimico per i raggi UV. In maniera alternativa, i raggi UV possono reagire direttamente con delle molecole target, che vengono poi trasformate nel radicale libero corrispondente.<sup>53</sup> Questi ROS possono indurre modifiche ossidative a livello lipidico, proteico e del DNA. Si è visto che i polifenoli partecipano alle reazioni fotochimiche e, in base alla loro struttura chimica e alla loro concentrazione, potrebbero diminuire o peggiorare il danno da raggi UV (polifenoli rispettivamente fotoprotettivi o fototossici). In particolare, la quercetina e molti altri composti polifenolici riescono a proteggere i cheratinociti dal danno prodotto dai raggi UV andando ad incrementare il potenziale antiossidante intracellulare, aumentando l'accumulo di Nrf2, un fattore di trascrizione per alcuni geni antiossidanti.<sup>54</sup> E' stato visto, però, che il resveratrolo, nonostante sia considerato un polifenolo fotoprotettivo,<sup>55</sup> può aumentare la produzione di 8-oxo-7,8-diidro-2-deossiguanosina, che rappresenta uno dei prodotti del danno al DNA indotto dalle radiazioni.<sup>56</sup> Considerando questo aspetto, l'applicazione

topica di prodotti contenenti resveratrolo sulla pelle esposta ai raggi del sole potrebbe determinare una potenziale azione tossica.

### 3.10 INTERAZIONE TRA I POLIFENOLI E I COMPONENTI DEL CAVO ORALE

Alcuni studi hanno dimostrato che i polifenoli prendono interazione con le componenti della saliva all'interno del cavo orale.<sup>57</sup> Le proteine salivari coinvolte nell'interazione con i polifenoli sono rappresentate da istatine e da proteine ricche di prolina (PrPs), le quali non sono altro che le proteine tipiche della pellicola,<sup>58</sup> ovvero quel film proteico che va a ricoprire i tessuti duri e molli del cavo orale.<sup>19</sup> E' stato riscontrato che l'epigallocatechina gallato (EGCG), facente parte del gruppo delle catechine, polifenoli presenti nel tè,<sup>19</sup> può aumentare il contenuto di proteine importanti all'interno della pellicola, quali le PrPs, proteine leganti il calcio e statine.<sup>59</sup> Uno dei principali meccanismi coinvolti nell'interazione tra PrPs e i tannini assunti con la dieta è la cosiddetta astringenza, la quale rappresenta una sensazione di raggrinzimento della bocca. L'astringenza e il gusto amaro del cibo sono fortemente collegati con il sapore caratteristico di una dieta a base di alimenti di origine vegetale.<sup>32</sup> Spesso i consumatori aggiungono latte alle bevande a base di tè per ridurre l'astringenza,<sup>60</sup> ma purtroppo così viene ridotta la biodisponibilità dei metaboliti vegetali secondari, a causa delle interazioni tra i polifenoli e le proteine del latte. Generalmente, l'astringenza è attribuita al processo di legame tra polifenoli e diverse classi di componenti salivari quali PrPs, statine e mucine.<sup>32</sup> Le PrPs risultano essere suddivise in basiche, glicosilate e acide e hanno la funzione di garantire l'omeostasi orale mediante la regolazione dell'equilibrio del calcio sulla superficie

del dente.<sup>61</sup> Le mucine sono i componenti principali della pellicola mucosa e agiscono come lubrificanti dello strato di pellicola acquisito dello smalto.<sup>62</sup> Le statine sono, invece, proteine salivari acide con un alto contenuto di tirosina, che permettono la regolazione dell'omeostasi del calcio e del fosfato e la remineralizzazione dello smalto.<sup>63</sup> L'interazione tra queste proteine e i composti polifenolici avviene attraverso forze molecolari, interazioni idrofobe e legami idrogeno.<sup>64</sup> Il legame tra i complessi polifenoli-proteine e la pellicola acquisita dello smalto avviene probabilmente tramite reazioni di crosslinking che determinano la formazione sulla superficie del dente di uno strato di pellicola resistente e difficile da rimuovere.<sup>65</sup>

Studi precedenti hanno inoltre dimostrato che i polifenoli possono denaturare le proteine della pellicola, determinando un'alterata interazione tra microrganismi e recettori batterici.<sup>66</sup> Si è visto che soprattutto i polifenoli derivanti dalle piante determinano modifiche a livello della pellicola, rendendola più elettrondensa e più spessa, come è stato visto in alcune scansioni TEM. Con l'aumento delle proteine legate alla pellicola, la pellicola stessa assume delle caratteristiche di maggiore protezione verso gli attacchi erosivi.<sup>67</sup> Inoltre, i polifenoli possiedono la capacità di inibire gli enzimi proteolitici salivari, le metalloproteinasi della matrice, le  $\alpha$ -amilasi e i GTF (fattori generali di trascrizione).<sup>68</sup> Infine, viene ridotta la formazione di glucano e risulta disponibile ai microrganismi cariogeni un minor numero di siti di legame.<sup>69</sup> Da ciò possiamo dedurre che una intenzionale interazione tra le sostanze di origine vegetale e la pellicola acquisita dello smalto rappresenta un approccio molto promettente per la profilassi della carie e la prevenzione dell'erosione dello smalto dentario.<sup>70</sup>

## 4. LAVORO SPERIMENTALE

### 4.1 OBIETTIVO DELLO STUDIO

L'obiettivo del nostro studio è stato quello di effettuare una revisione della letteratura sulle proprietà dei composti polifenolici e sugli eventuali vantaggi che potrebbe apportare un loro ipotetico utilizzo in ambito odontoiatrico. Ci siamo focalizzati sulle caratteristiche di alcuni composti fenolici e sulle loro interazioni con le strutture e i componenti della cavità orale.

### 4.2 MECCANISMI DI ESPLETAMENTO DEGLI EFFETTI DEI POLIFENOLI

#### 4.2.1 EFFETTI DEI POLIFENOLI SULLE PROTEINE DEL CAVO ORALE

E' stato riscontrato che i polifenoli esercitano un effetto sulle proteine della saliva e della pellicola, attraverso una denaturazione dei gruppi funzionali del recettore risultante in un'adesione batterica ostacolata.<sup>66</sup> I polifenoli influenzano, inoltre, gli enzimi dell'anabolismo e del catabolismo dei batteri: è stato dimostrato che l'enzima umano  $\alpha$ -amilasi e gli isoenzimi batterici glicosiltransferasi, che promuovono l'adesione batterica e la formazione di biofilm, sono inibiti dai polifenoli.<sup>69</sup> Si è visto che la formazione di glucano batterico si riduce in situ dopo il risciacquo con il tè di Hamamelis, il tè di *Fragaria vesca* e il tè di *Tormentilla*:<sup>71</sup> quindi, si presume che il risciacquo con bevande polifenoliche porti ad una riduzione dei siti di legame disponibili per l'aderenza dei batteri sulla superficie del dente.<sup>72</sup>

Si è visto, inoltre, che i polifenoli conducono a un mirato arricchimento proteico dello strato di pellicola, a partire da proteine derivanti dalla saliva, dal fluido crevicolare, dall'epitelio e dai batteri, garantendo così un

aumento del suo spessore e della sua densità e determinando effetti protettivi sulla superficie del dente, specialmente contro l'erosione.<sup>73</sup>

Inoltre, i componenti tipici della pellicola come gli istoni e le PrPs interagiscono con i polifenoli, andando a costituire diversi complessi sia nella saliva che nella pellicola,<sup>74</sup> in particolar modo aggregati insolubili con le proteine salivari, responsabili delle caratteristiche di astringenza.

#### 4.2.2 EFFETTI DEI POLIFENOLI SUI BATTERI

La maggior parte degli effetti antiaderenti e antibatterici dei composti polifenolici sono stati dimostrati in studi in vitro:<sup>75-69-76</sup> è stato visto, infatti, che i polifenoli riescono a rompere la barriera delle cellule batteriche e a interagire con la membrana intracellulare.<sup>77</sup> Inoltre, le caratteristiche chimiche dei polifenoli danno luogo a diversi complessi con gli ioni metallici, i quali, quindi, non risultano più disponibili per i microrganismi, determinando, così, una diminuzione dei batteri.<sup>78</sup> L'effetto dei polifenoli del tè sui batteri cariogeni è stato esaminato principalmente in vitro: Karygianni et al. (2014)<sup>79</sup> hanno rilevato le proprietà antibatteriche del tè di Inula viscosa contro ben nove microrganismi orali, quali *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus oralis*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* e *Parvimonas Micra*. Inoltre, Xiao et al., (2000) attraverso due diversi studi in vitro,<sup>80-76</sup> hanno dimostrato che i polifenoli del tè possono inibire l'aderenza all'idrossiapatite di batteri cariogeni come *Streptococcus mutans* e *Actinomyces viscosus*.

Farkash et al. (2019)<sup>81</sup> hanno cercato di valutare se i polifenoli estratti dal tè verde (PPFGT) e il Padma hepaten (PH), ovvero una combinazione di polifenoli che prende origine dalla medicina tradizionale Tibetana,

abbiano un effetto inibitorio sulla formazione del biofilm contenente *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* e se possano in qualche modo prevenire la candidosi e le carie sia nella popolazione generale che nei pazienti ortodontici. In un primo step, si è visto che non c'era inibizione nella crescita dei due microrganismi, indipendentemente dalla concentrazione di PH e PPFGT; dopodichè, è stato riscontrato che aumentando la concentrazione del PH si aveva una riduzione della crescita del biofilm di *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* in maniera dose-dipendente. L'aggiunta, invece, di 2,5 mg/mL di PPFGT ha determinato una maggiore inibizione rispetto a quella ottenuta con soli 0,625 mg/mL di PPFGT, suggerendo così un effetto combinato dei due polifenoli. In particolare, è risultato che la crescita combinata dei due microrganismi è stata inibita del 54% e la loro produzione di esopolisaccaridi dell'81%. E' stato quindi ipotizzato che questa abilità di inibire la crescita del biofilm da parte dei polifenoli potrebbe rappresentare il primo passo per lo sviluppo di nuovi farmaci orali, che potrebbero aiutare nello sconfiggere alcune patologie del cavo orale, senza creare dei microrganismi resistenti. E' stato anche visto che il PH e il PPFGT possono inibire la formazione del biofilm anche su altre superfici, come gli impianti dentali.

#### 4.2.3 EFFETTI SUI MICRORGANISMI PARODONTALI

*Porphyromonas gingivalis* è un batterio anaerobico Gram negativo che contribuisce allo sviluppo della malattia parodontale. E' stato visto che il tè nero presenta effetti antimicrobici sia contro le cellule plancton che contro il biofilm del batterio attraverso un meccanismo che va ad inibire la secrezione delle metalloproteinasi della matrice, che sono gli enzimi proteolitici prodotti dai fibroblasti gengivali che causano squilibri nella

sintesi e degradazione del collagene, determinando una distruzione tissutale.<sup>82</sup>

#### 4.2.4 EFFETTI SUI MICRORGANISMI PULPARI

E' stato riscontrato che l'epigallocatechina gallato (EGCG) contenuto nel tè inibisce efficacemente la formazione del biofilm di *Enterococcus faecalis*, uno dei patogeni opportunisti correlati alle infezioni dei canali radicolari: esso agisce andando a indurre la formazione intracellulare di radicali liberi e sopprimendo il gene della virulenza del batterio stesso.<sup>83</sup>

#### 4.2.5 EFFETTI SU ALCUNI VIRUS

Per quanto riguarda il virus dell'HIV, si è visto che l'EGCG riesce a inibire l'attività della trascrittasi inversa e delle polimerasi di DNA ed RNA, oltre che avere un'attività anti-proteasi per distruggere le particelle virali.<sup>84</sup> Se consideriamo, invece, il virus dell'Herpes simplex (HSV), il suo assorbimento sulle cellule può essere ridotto dall'EGCG che va a ridurre l'espressione di alcune glicoproteine.<sup>85</sup>

### 4.3. I PRODOTTI DERIVATI DALL'UVA E LA SALUTE DEL CAVO ORALE

Negli ultimi anni, come già detto, ci si è avvicinati all'utilizzo di prodotti di origine vegetale al fine di ridurre i rischi per molte tipologie di malattie, comprese quelle del cavo orale. A tal proposito, si pensa che i componenti antimicrobici derivati dalle piante potrebbero rappresentare una valida alternativa rispetto a ciò che viene comunemente utilizzato per il controllo della placca dentale e delle malattie del cavo orale, in quanto riescono a sopprimere alcuni fattori di virulenza e di crescita di alcuni

patogeni orali. In uno studio,<sup>86</sup> Christine D. Wu ha sviluppato nuove metodologie in laboratorio per lo screening, il frazionamento e l'identificazione di componenti antimicrobici di origine vegetale, cercando di identificare un nuovo approccio interdisciplinare che coinvolga l'odontoiatria, la microbiologia orale e la chimica dei prodotti naturali.<sup>87</sup> Tra gli alimenti che sono stati studiati riconosciamo: miele, tè, mirtilli, uvetta, prugne essiccate, semi d'uva ed altri.

Nello studio sopracitato, sono stati frazionati e identificati i composti antimicrobici presenti nell'uvetta che fossero capaci di sopprimere le proprietà di crescita e di virulenza dei patogeni orali. In particolare, è stata scelta l'uva sultanina in quanto la frazione esano-solubile dell'estratto grezzo di metanolo ha dimostrato di possedere un'attività inibitoria sulla crescita di due patogeni orali molto importanti, lo *Streptococcus mutans* e il *Porphyromonas gingivalis*. Attraverso il frazionamento, sono stati identificati diversi composti caratterizzati da un'attività di inibizione della crescita degli agenti patogeni orali, quali l'acido oleanolico, l'aldeide oleanolica, l'acido linoleico, l'acido linolenico, la betulina, l'acido betulinico e altri.<sup>88</sup> Si è visto che l'acido oleanolico è in grado di sopprimere in vitro l'aderenza del biofilm cariogenico dello *Streptococcus mutans*. Quando è stato esaminato l'effetto dell'acidogenicità di uva passa e cereali contenenti uva passa sulla placca dentale in vivo, si è riscontrato che l'uva passa non ha ridotto il calo del pH della placca sotto a un pH 6 nel periodo di prova di 30 minuti. Rispetto ai fiocchi di crusca commerciali o al cereale di semola di uva passa, è stato notato un maggiore calo del pH della placca nei soggetti che hanno consumato una miscela di uva passa e crusca senza aggiunta di zucchero ( $p < 0.05$ ). Si è visto inoltre che, l'estratto di semi d'uva, ad alto contenuto di proantocianidine, ha influenzato, in vitro, in maniera positiva i processi di demineralizzazione e/o remineralizzazione di lesioni

dovute a carie radicolari prodotte artificialmente, suggerendo il suo potenziale come agente naturale per la terapia non invasiva della carie radicolare. Si può concludere, quindi, che l'uvetta rappresenta una sana e valida alternativa agli snack zuccherati comunemente consumati dalla popolazione.

#### 4.3.1 EFFETTI DEL VINO ROSSO SULLA PELLICOLA SALIVARE

Carvalho et al<sup>89</sup> hanno recentemente studiato il potenziale del vino rosso nella modulazione della cinetica dell'erosione dentale in presenza o meno della pellicola salivare. Il vino rosso è ricco di polifenoli, ma ha anche un pH basso simile al succo d'arancia e al succo di mela (pH 3,4-3,7): quando queste sostanze acide entrano nella cavità orale, devono prima diffondere attraverso la pellicola acquisita e poi riescono a raggiungere la superficie del dente. Una volta che l'acido raggiunge la superficie del dente, gli ioni idrogeno (H<sup>+</sup>) iniziano a dissolvere il tessuto duro del dente, ammorbidendo gli strati più esterni di smalto, creando un aspetto a nido d'ape tipico dell'erosione dentale, e lasciando una superficie ruvida che riduce la riflettività dello smalto.<sup>90</sup> Anche se, da un lato, il pH basso può demineralizzare la superficie del dente, i polifenoli possono, dall'altra parte, interagire con la pellicola acquisita dello smalto andando a ridurre la demineralizzazione.<sup>91</sup>

Sono stati utilizzati campioni di smalto umano lucidato prelevati da molari estratti e poi divisi in due gruppi: presenza o assenza di pellicola acquisita dello smalto. Ognuno di questi due gruppi è stato poi ulteriormente suddiviso in base all'esposizione: vino rosso, succo d'arancia, succo di mela o acido citrico. I campioni sono stati incubati in saliva umana chiarificata (presenza di pellicola acquisita dello smalto) o in camera umida (assenza di pellicola acquisita dello smalto) per 2 ore a

37°C, successivamente nella sostanza in esame per 1 min, a 25 °C, sotto agitazione. Questo processo è stato ripetuto quattro volte. La durezza superficiale è stata misurata inizialmente e dopo ogni ciclo, mentre l'intensità della riflessione superficiale è stata misurata inizialmente e dopo tutti i cicli. Alla presenza della pellicola acquisita dello smalto, il vino rosso ha causato la minore perdita di durezza superficiale, seguita da succo d'arancia, succo di mela e acido citrico. E' stata inoltre osservata una perdita di intensità di riflessione superficiale significativamente inferiore per il vino rosso e il succo d'arancia rispetto al succo di mela e all'acido citrico. In assenza della pellicola acquisita dello smalto, il vino rosso e il succo d'arancia hanno causato una minore perdita di durezza superficiale rispetto al succo di mela e all'acido citrico. Il succo d'arancia mostrava la minore perdita di intensità di riflessione superficiale, seguita da vino rosso, acido citrico e succo di mela. In conclusione, le proprietà erosive del vino rosso differiscono da quelle di altre sostanze con simili pH e concentrazioni di ioni minerali e la presenza della pellicola acquisita dello smalto modifica la cinetica dell'erosione del vino rosso.

#### 4.4 INFLUENZA DEI POLIFENOLI DEL TÈ SULLA PELLICOLA ACQUISITA DELLO SMALTO DENTALE

E' stato riscontrato che il consumo di tè riesce a ridurre lo sviluppo di carie grazie al suo contenuto di fluoro;<sup>92</sup> successivamente, Liu e Chi (2000)<sup>93</sup> hanno anche dimostrato che l'indice di placca di un gruppo di persone a cui sono state somministrate compresse contenenti tè verde era molto più basso del gruppo controllo. Alcuni studi hanno notato come i polifenoli contenuti nel tè verde e nel tè nero possano inibire la

crescita dello *Streptococcus mutans*,<sup>94</sup> ma anche dello *Streptococcus sobrinus*.<sup>95</sup> In un ulteriore studio in vitro<sup>96</sup> è stato anche visto come la crescita del *Lactobacillus* fosse inibita dalla presenza di polifenoli ad una concentrazione di 8 mg/mL.

#### 4.4.1 TÈ VERDE

Hanning et al. (2009)<sup>97</sup> hanno esaminato l'influenza del tè verde sulla pellicola acquisita dello smalto: in particolare, hanno notato una notevole riduzione dell'iniziale adesione batterica dopo 30 e dopo 120 minuti dall'inizio della formazione della pellicola. L'epigallocatechina gallato è uno dei composti polifenolici contenuti nel tè verde che presenta una importante attività antiossidante: Rehage et al (2017)<sup>98</sup> hanno dimostrato che i risciacqui con l'EGCG determinano un immediato aumento dello spessore e della densità della pellicola.

#### 4.4.2 TÈ NERO

L'influenza del tè nero sulla pellicola acquisita dello smalto è stata invece studiata da Joiner et al. (2003),<sup>99</sup> i quali hanno dimostrato che l'assorbimento dei componenti del tè nero modifica la pellicola, che però in questo modo non può essere eluita da diverse soluzioni tampone. Di conseguenza, la rimozione, la dissoluzione e la sostituzione di questi componenti adsorbiti è stata fortemente ostacolata in vitro. Si presume che i polifenoli del tè nero portino alla formazione di legami cross-linking tra i composti polifenolici e la pellicola così come le proteine salivari, perciò si è visto che gli strati di pellicola modificata dai polifenoli risultano essere più resistenti alla rimozione rispetto agli strati non modificati. Questa modifica comporta un raddoppio del quantitativo totale di

proteine che si lega alla superficie di idrossiapatite in vitro. Si è notato, però, che la teofillina, l'epigallocatechina, e l'EGCG risultano avere degli effetti sulla pellicola acquisita meno forti rispetto al vero estratto di tè nero. Studi farmaceutici hanno dimostrato, inoltre, che, dopo 1 ora dall'esposizione, nella saliva erano ancora rilevabili alte concentrazioni di alcuni polifenoli del tè, come la teofillina;<sup>100</sup> quest'ultima, però, è in grado di scolorire la pellicola,, il che potrebbe anche portare a denti macchiati. Hanning et al (2009)<sup>97</sup> hanno osservato come, dopo risciacquo con tè nero, ci sia, in situ, una riduzione dell'iniziale adesione batterica alla superficie del dente dopo 30 e 120 minuti.

#### 4.4.3 TÈ DI CISTUS INCANUS

Wittpahl et al. (2015)<sup>101</sup> hanno studiato diversi tipi di tè di *Cistus incanus* tè e hanno rilevato che soprattutto quelle tipologie con alto contenuto di polifenoli presentavano un notevole effetto antibatterico in vitro. Abdollahzadeh et al. (2011)<sup>66</sup> avevano già in precedenza ipotizzato che gli effetti antibatterici in vitro del *Cistus incanus* contro lo *Streptococcus mutans* fossero principalmente attribuibili alla presenza di tannini idrolizzabili e di polifenoli a basso peso molecolare. Ancora prima, Naz et al. (2007)<sup>67</sup> avevano indicato i polifenoli come quercetina, muricetina e acido gallico come responsabili delle caratteristiche antibatteriche del *Cistus Incanus*, dopo che già Hamilton-Miller et al. (2001)<sup>102</sup> e Otake et al. (1991)<sup>62</sup> avevano ipotizzato che le catechine inibissero l'aderenza batterica alla superficie del dente. Lo studio di Wittpahl et al. (2015)<sup>101</sup> ha successivamente dimostrato che, in situ, l'effetto antiaderente di *Cistus Incanus* non può essere attribuito a singole frazioni dei composti polifenolici ma all'intero estratto del tè, attraverso il quale si ha un forte effetto antiaderente e antibatterico.

#### 4.4.4 TÈ DI INULA VISCOSA

Un recente studio in situ ha dimostrato che un risciacquo di circa 10 minuti con il tè di Inula Viscosa determina una significativa diminuzione della colonizzazione batterica iniziale sulla superficie del dente dopo una esposizione di 8 h: si è notato, infatti, un importante effetto antiaderente sugli streptococchi orali. Le sostanze polifenoliche attive nel tè di Inula Viscosa risultano essere l'apigenina, la naringenina e la luteolina, i cui effetti antibatterici sugli streptococchi del cavo orale sono stati osservati in molti studi in vitro.<sup>61</sup>

#### 4.5 APPLICAZIONI ENDODONTICHE DEI POLIFENOLI DEL TÈ VERDE

Le infezioni endodontiche per essere risolte richiedono una efficace rimozione dei microrganismi patogeni dal sistema canalare radicolare per avere una prognosi positiva a lungo termine.<sup>103</sup> E' riconosciuto che l'ipoclorito di sodio (NaOCl) sia ad oggi l'irrigante canalare più efficace, ma poiché potrebbe causare potenziali complicazioni a causa della sua tossicità la scienza è alla ricerca di nuove alternative.<sup>103</sup> Nel loro studio, Divia et al.<sup>104</sup> hanno confrontato l'efficacia antimicrobica della Morinda citrifolia (MC), dei polifenoli del tè verde e della Tripala con quella dell'NaOCl al 5% contro il batterio *Enterococcus faecalis*. In questo studio in vitro sessanta premolari umani estratti sono stati esposti ad *E. faecalis* per 48 h, al termine delle quali è stata valutata la popolazione batterica vitale contando il numero di unità formanti colonie (CFU) sulla piastra agar sangue. I campioni sono stati divisi in cinque gruppi: gruppo I (acqua distillata), gruppo II (NaOCl), gruppo III (MC), Gruppo IV (tripala) e gruppo V (polifenoli del tè verde). I campioni sono stati irrigati con agenti diversi e sono state registrate le CFU. E' stato eseguito il Kruskal-Wallis come test parametrico per confrontare diversi gruppi, mentre il

test t di Student è stato utilizzato per confrontare i valori medi tra i gruppi prima e dopo il trattamento con gli agenti di prova ( $p < 0,001$ ). L'NaOCl è stato l'irrigante più efficace nell'eliminazione di *E. faecalis*, rafforzandone così il ruolo di miglior irrigante attualmente disponibile e un gold standard per il confronto dei gruppi sperimentali. Il suo effetto antibatterico era paragonabile a quello della tripala. Tra i gruppi sperimentali, MC ha mostrato l'effetto antibatterico più basso. Da questo studio si può concludere che l'utilizzo in endodonzia di irriganti alternativi di origine vegetale potrebbe rivelarsi vantaggioso, soprattutto se consideriamo le diverse caratteristiche negative dell'NaOCl.

#### 4.6 ATTIVITÀ BIOLOGICA DI ALCUNI POLIFENOLI APPLICATI IN MATERIA ODONTOIATRICA

Hiroshi Sakagami<sup>105</sup> (2014) ha effettuato uno studio che ha permesso di valutare l'attività biologica di tre gruppi di polifenoli e la loro possibile applicazione in ambito odontoiatrico: i polifenoli presi in considerazione sono stati i complessi lignina-carboidrati, i tannini e i flavonoidi. È stato dimostrato che tutti e tre questi gruppi di composti polifenolici presentano una minore citotossicità tumore-selettiva nei confronti delle cellule del carcinoma squamocellulare orale rispetto alle cellule orali normali, quali fibroblasti gengivali e del legamento parodontale e cellule pulpari, se confrontati con i classici farmaci chemioterapici. Molti dei composti che hanno dimostrato una importante selettività tumorale non hanno indotto, però, una frammentazione del DNA intranucleare, che rappresenta un segnale biochimico distintivo di apoptosi, nelle linee cellulari del carcinoma orale.

È stato visto che i complessi lignina-carboidrati proteggono le cellule dall'effetto citopatico dell'infezione da HIV e dall'esposizione ai raggi

UV in maniera molto più efficace rispetto agli altri composti polifenolici, tanto che potrebbe notevolmente ridurre l'incidenza di tumori al collo e alla testa causati dall'esposizione ai raggi UV.<sup>106</sup> In particolare, la limitata digestione di questi complessi suggerisce che la frazione di lignina è coinvolta soprattutto nell'attività anti-HIV, mentre la frazione di carboidrati è coinvolta nell'attività di potenziamento immunitario attraverso un recettore cellulare di superficie. L'estratto alcalino delle foglie delle piante, il quale presenta un grosso contenuto di complessi lignina-carboidrati, ha dimostrato di avere un grande effetto anti-infiammatorio contro l'IL-1 $\beta$  simulata dai fibroblasti gengivali. Da ciò deriva che è consigliabile effettuare una applicazione locale dei complessi lignina-carboidrati attraverso la mucosa orale, proprio perché bisogna considerare che presentano un ridotto assorbimento intestinale.

#### 4.7 INFLUENZA DEI POLIFENOLI DEL MIRTILLO SULLA CARIE DENTALE

Nebu Philip et al<sup>107</sup> hanno dimostrato che i componenti polifenolici bioattivi del mirtillo, in particolare la specie *Vaccinium macrocarpon*, presentano alcuni effetti di attenuazione della virulenza nei confronti di diverse proprietà di alcuni microrganismi responsabili della patogenesi della carie dentale. In questo studio si è partiti dalla considerazione che c'è stato un crescente interesse globale per i potenziali usi terapeutici di prodotti naturali di origine vegetale per la prevenzione delle malattie orali. La fito-odontoiatria ha studiato come alcuni gruppi di persone che abitualmente consumano cibi ricchi di polifenoli presentino una salute orale significativamente migliore.<sup>108</sup> E' stato notato che l'utilizzo di biocidi orali sintetici come la clorexidina spesso determina l'insorgenza di reazioni allergiche e di resistenza microbica.<sup>109</sup> Si è visto, inoltre, che per alcune malattie biofilm-mediate come la carie risulta essere più

importante, per il controllo a lungo termine della malattia, invertire il microbioma responsabile della patologia piuttosto che eliminare semplicemente il biofilm della placca dentale.<sup>110</sup> Ad oggi, è già stato dimostrato che il mirtillo ha un effetto preventivo sulle infezioni del tratto urinario e sulle ulcere gastriche, in quanto le sue sostanze fitochimiche ad alto peso molecolare inibiscono l'adesione dell'*Escherichia coli* alla mucosa del tratto urinario e dell'*Helicobacter pylori* alla mucosa gastrica, rispettivamente:<sup>111</sup> queste proprietà anti-adesive sono uniche per il mirtillo e non si riscontrano in altre tipologie di frutta.<sup>112</sup> Tra le altre proprietà benefiche del mirtillo riscontriamo l'abbassamento del rischio di malattie cardiovascolari e neurologiche, la modulazione della risposta infiammatoria e l'inibizione della proliferazione di cellule tumorali.<sup>113</sup> Per quanto riguarda, invece, il cavo orale, studi in vitro hanno dimostrato che questa tipologia di frutta può dare effetti benefici sulla salute parodontale e gengivale, andando a inibire la risposta infiammatoria dell'ospite, riducendo sia la formazione del biofilm batterico che l'attività degli enzimi proteolitici perio-patogenetici.<sup>114</sup> Alcuni flavonoidi contenuti nei mirtilli riescono inoltre a distruggere i fattori chiave della virulenza responsabili della patogenesi della carie.<sup>115</sup>

E' stato riscontrato che il mirtillo contiene diverse classi di composti polifenolici. Da un confronto tra tre bacche di colore scuro, ovvero il mirtillo, il mirtillo selvatico e la fragola, è emerso che l'estratto di mirtillo presenta i migliori effetti contro la virulenza dello *Streptococcus mutans*. In particolare, le proantocianidine di tipo A e i flavonoli contenuti in questo frutto hanno dimostrato di possedere potenti effetti inibitori contro alcune caratteristiche proprie della virulenza cariogenica come l'acidogenicità batterica, l'acidurità, la sintesi del glucano e l'idrofobicità: si è visto che i fenoli contenuti nel mirtillo hanno la capacità di mettere un freno a queste proprietà di virulenza cariogenica senza essere

però battericida, il che risulta essere una qualità fondamentale per il mantenimento dei benefici del microbioma orale e per prevenire la formazione di microrganismi resistenti.<sup>107</sup>

#### 4.8 EFFETTI DEI POLIFENOLI SULL'INTERFACCIA COMPOSITO-DENTINA IN ODONTOIATRIA RESTAURATIVA

Come è stato riconosciuto da numerosi studi, l'adesione in odontoiatria si riferisce alle modalità con cui i materiali restaurativi si legano al substrato dentale: lo strato ibrido ideale è quello formato da legami continui e stabili tra il composito e la dentina.<sup>116</sup> Ovviamente la degradazione dello strato ibrido è la causa maggiore della durata del legame composito-dentina<sup>117</sup> e sembra essere associata alla degradazione idrolitica della resina adesiva e alla proteolisi delle fibrille di collagene<sup>118</sup> che restano esposta se c'è una incompleta penetrazione della resina all'interno della dentina demineralizzata. Quando la dentina viene mordenzata, il pH molto basso attiva gli enzimi proteolitici, come le MMPs (metalloproteinasi della matrice), i quali possono deteriorare il collagene esposto e non totalmente penetrato nello strato ibrido, andando così a determinare una riduzione della longevità del restauro adesivo.<sup>119</sup> L'utilizzo, quindi, di alcuni inibitori delle MMPs, come la clorexidina e gli agenti antiossidanti, è risultato essere una strategia efficace al fine di aumentare la durata dell'interfaccia adesiva<sup>120</sup> e aumentare la forza.<sup>121</sup> Recentemente, è stato dimostrato che anche i polifenoli presentano un'attività di inibizione nei confronti delle MMPs (23), in particolare la quercetina e il resveratrolo: nello studio di Porto et al.<sup>122</sup> si è pensato, quindi, di valutare gli effetti del pretrattamento della dentina con i polifenoli sulla forza del legame microtensile ( $\mu$ TBS) alla dentina stessa e

sulla stabilità delle fibrille di collagene. In particolare, è stato ipotizzato che il pretrattamento della dentina demineralizzata con quercetina o resveratrolo, prima dell'applicazione dell'adesivo, potrebbe da un lato conservare le fibrille di collagene non protette all'interno dello strato ibrido e dall'altro lato preservare la forza di legame dell'interfaccia resina-dentina.

Sono state applicate alla dentina mordenzata diverse concentrazioni (100, 250, 500 o 1000 µg/mL) di quercetina o resveratrolo, o una combinazione dei due, oppure acqua distillata o digluconato di clorexidina al 2%. Dopodichè prima del restauro in composito è stato applicato un adesivo two-step etch and rinse. Dai risultati di questo studio è emerso che il resveratrolo è risultato avere la migliore performance nel mantenere il legame tra dentina e composito a tutte le concentrazioni testate, mentre la quercetina ha mostrato risultati positivi con un aumento del µTBS alle concentrazioni di 100 e 500 µg/mL. Da ciò si può dedurre che il resveratrolo potrebbe rappresentare un composto importante per al fine di raggiungere la stabilità di legame desiderata e di ridurre il frequente rifacimento delle otturazioni in composito dovuto a distacco delle stesse.

#### 4.9 EFFETTI DEI POLIFENOLI SUL CANCRO ORALE

Come abbiamo già ampiamente esposto, i composti polifenolici contenuti nel tè hanno molteplici effetti benefici, compresi la riduzione del rischio di sviluppare malattie cardiovascolari e cancro e proprietà chemioprotettive.<sup>123</sup> Studi epidemiologici sul tè nero e il cancro sono ancora incerti, ma alcuni di questi hanno rivelato che il consumo di tè nero riduce l'incidenza dei tumori ovarico<sup>124</sup> e polmonare.<sup>125</sup> In precedenza altri studi hanno rivelato che i polifenoli del tè nero, i teaflavini, potrebbe

indurre apoptosi nelle cellule tumorali della prostata tramite una up-regulation dell'espressione di p53, una riduzione dell'attività trascrizionale del NF- $\kappa$ B e una inibizione dei livelli di fosforilazione della via della protein-chinasi mitogeno-attivata (MAPK).

I meccanismi d'azione delle catechine del tè, specialmente dell'ECGC, ovvero la forma più attiva e abbondante delle catechine, sono stati a lungo studiati. Nonostante sia abbastanza chiaro che il tè verde possa inibire la crescita di alcune tipologie di cancro, inducendo l'apoptosi delle cellule tumorali oppure liberando radicali liberi dell'ossigeno,<sup>126</sup> ci sono però pochi studi che riguardano il potenziale dell'estratto di tè nero nel ritardare l'invasione da parte delle cellule tumorali oppure nell'invertire la transizione epiteliale-mesenchimale (EMT). Quest'ultima è considerata un prerequisito per l'acquisizione da parte delle cellule tumorali di un fenotipo invasivo e sviluppare successive metastasi. Lo studio effettuato da Chang et al.<sup>123</sup> fornisce prove molecolari associate all'effetto antimetastatico degli estratti dei polifenoli del tè nero (BTE), che contengono polifenoli tra cui acido gallico, gallocatechina, catechina, epigallocatechina-3-gallato, epicatechin-3-gallato e teaflavina 3,3-digallato. Si è visto come in un sistema di coltura di cellule squamose orali i BTE abbiano dimostrato di poter determinare un'inibizione quasi completa sull'invasione ( $p < 0.001$ ) delle cellule SCC-4, un tumore maligno derivante da cellule squamose della lingua, tramite attività ridotte di MMP-2 ( $p < 0.001$ ) e u-PA ( $p < 0,001$ ). Questi risultati hanno suggerito che i BTE potrebbero ridurre l'invasione tumorale e la metastatizzazione invertendo l'EMT nelle cellule tumorali orali umane.

Da alcuni studi è emerso che i cheratinociti orali umani sono altamente sensibili ad alcuni farmaci antitumorali, come per esempio la doxorubicina. Il resveratrolo, l'epigallocatechina gallato e l'acido tannico sono composti polifenolici che hanno dimostrato di avere un effetto

cardioprotettivo quando sono combinati con la doxorubicina, ma non è noto se questi polifenoli potrebbero proteggere i cheratinociti orali umani dalla citotossicità indotta dalla doxorubicina senza indebolire però il suo potenziale citotossico contro le cellule tumorali orali. Nel loro studio Sheng et al.<sup>127</sup> hanno esaminato gli effetti dei tre composti polifenolici soprannominati sulla citotossicità indotta dalla doxorubicina nei cheratinociti orali umani, ma hanno anche studiato i loro effetti sulla potenza della doxorubicina nelle cellule orali del carcinoma a cellule squamose. In particolare, è stata valutata la vitalità cellulare, seguita dall'analisi dell'apoptosi e della necrosi; inoltre sono stati esaminati anche i cambiamenti nelle specie reattive intracellulari dell'ossigeno nella fase iniziale dopo il trattamento. I risultati di questo studio hanno messo in evidenza come il resveratrolo in combinazione con la doxorubicina aumenti la citotossicità della doxorubicina in entrambi i tipi di cellule. Tuttavia, l'epigallocatechina gallato e l'acido tannico ad una certa concentrazione hanno mitigato la tossicità dei cheratinociti indotta dalla doxorubicina, principalmente attraverso la necrosi indotta dalla doxorubicina nei cheratinociti orali umani senza però indebolire l'efficacia anticancro della doxorubicina. Il meccanismo esatto è ancora sconosciuto ma le specie reattive intracellulari dell'ossigeno potrebbero non essere l'unico fattore.

#### 4.10 RESVATROLO: USI E PROSPETTIVE

Il resveratrolo, un composto polifenolico di cui sono ricche piante e frutti, ha dimostrato di avere vari effetti biologici, tra cui antinfiammatorio, anti-carcinogenico, antiossidante, anti-invecchiamento e di protezione per il tessuto osseo e cardiovascolare.<sup>128</sup> E' particolarmente

presente nel vino rosso e in numerosi frutti quali l'uva, gli arachidi, i pistacchi, il cacao e le bacche.<sup>129</sup>

Il resveratrolo è stato studiato per i suoi numerosi effetti biologici e per il fatto che sembra essere un potenziale agente di prevenzione, ma anche coinvolto nel trattamento di un'ampia varietà di malattie croniche.<sup>130</sup> Questo polifenolo risulta essere protettivo contro i disturbi cardiovascolari ossidativi,<sup>131</sup> essendo in parte responsabile del "paradosso francese", il fenomeno che spiega una bassa incidenza di malattie cardiovascolari in pazienti con una dieta ricca di grassi associata al consumo contestualmente moderato di vino rosso.<sup>132</sup> Questo effetto sembra collegato alla sua proprietà antiossidante,<sup>133</sup> in quanto agisce come spazzino di una serie di radicali liberi già a basse dosi (10 M), modula il metabolismo dei lipidi, protegge le lipoproteine a bassa densità (LDL) contro l'ossidazione e il danno da parte dei radicali liberi e inibisce l'attivazione e l'aggregazione piastrinica.<sup>134</sup>

E' stato riscontrato che il resveratrolo è associato alla protezione e formazione dell'osso grazie alla sua azione contro l'osteoporosi e il riassorbimento osseo associato all'invecchiamento; inoltre, si è visto che inibisce la perdita ossea associata a carenza di estrogeni nei modelli animali trattati con resveratrolo.<sup>135</sup> Studi recenti hanno rivelato che le proprietà antiossidanti e antinfiammatorie del resveratrolo permettono una inibizione della risposta infiammatoria dei tessuti parodontali e la prevenzione della perdita ossea alveolare nei modelli di ratto, entrambe causate dall'infiammazione batterica.<sup>136</sup> Inoltre, il resveratrolo è noto per il fatto che è in grado di stimolare la proliferazione e la differenziazione degli osteoblasti, aumentando l'espressione della fosfatasi alcalina (ALP) e l'induzione della produzione delle proteine morfogenetiche dell'osso (BMP)-2;<sup>137</sup> dall'altro lato, esso inibisce l'attivatore del recettore del fattore nucleare kappa-B che induce la differenziazione degli

osteoclasti e induce l'apoptosi degli osteoclasti già differenziati.<sup>138</sup> Questi vari effetti del resveratrolo suggeriscono, quindi, che questo composto può modulare l'infiammazione derivante dall'infezione batterica e da una estrazione dentale traumatica e migliorare il processo di guarigione dell'alveolo post-estrattivo durante il processo di formazione dell'osso.

Anche se alcuni studi hanno evidenziato gli effetti del resveratrolo sulla formazione dell'osso, la maggior parte di questi ultimi si sono concentrati sulla perdita dell'osso alveolare in vitro o in modelli animali con parodontite indotta, senza però presentare risultati importanti dopo l'estrazione del dente.<sup>139</sup> Nello studio di Min et al (2020),<sup>140</sup> sono stati valutati attentamente gli effetti del resveratrolo sull'attività cellulare delle cellule del legamento parodontale (PDL) e delle cellule osteoblasto-like (MC3T3-E1), le quali hanno dimostrato di avere l'attività proteica dell'ALP, e successivamente si è cercato di evidenziare gli effetti sulla guarigione dell'alveolo post-estrattivo, compresa la nuova formazione ossea in vivo.

In questo studio il resveratrolo è stato applicato alle celle hPDL e MC3T3-E1 per individuare la proliferazione cellulare e l'attività della fosfatasi alcalina (ALP) attività; successivamente è stata utilizzata la PCR quantitativa in tempo reale (qPCR) per capire quale fosse il livello di espressione genica in vitro. Per lo studio in vivo, invece, 30 topi maschi di sei settimane del tipo C57BL/6, ovvero quello più usato per la ricerca, sono stati divisi casualmente in gruppo test (n = 15) e gruppo controllo (n = 15) e successivamente sono stati estratti i loro primi molari mascelari. I gruppi sperimentali hanno ricevuto 50- $\mu$ m resveratrolo nel sito post-estrattivo e si è successivamente analizzato il grado di nuova formazione ossea. Il trattamento delle cellule hPDL e MC3T3-E1 con resveratrolo ha aumentato la proliferazione cellulare e l'attività dell'ALP, oltre

ad aumentare l'espressione di ALP, BMP-2, BMP-4; inoltre il resveratrolo ha aumentato la nuova formazione ossea nella porzione linguale dell'alveolo post-estrattivo nei topi. I risultati di questo studio suggeriscono che il resveratrolo aumenta la fisiologia cellulare sia delle cellule del PDL sia degli osteoblasti, compresa la loro proliferazione e differenziazione, e può giocare un ruolo importante nella capacità di guarigione ossea dopo un'estrazione dentale.

Oltre allo studio sovracitato, sono stati effettuati numerosi studi sia in vitro che in vivo al fine di indagare le caratteristiche e i potenziali usi del resveratrolo.

#### 4.10.1 STUDI IN VITRO

Gli effetti dell'aggiunta del resveratrolo (RSV) sono stati testati su diverse linee cellulari. Tseng et al. hanno lavorato sui progenitori mesenchimali derivati da cellule staminali embrionali umane (EMPs), trovando che l'RSV promuove l'osteogenesi spontanea attraverso l'up-regulation dell'espressione dei geni RUNX2 e OCN, ma impedisce la formazione di adipociti sopprimendo i geni PPAR $\alpha$ .<sup>141</sup> Dai et al.<sup>142</sup> hanno studiato l'effetto in vitro dell'RSV sulla proliferazione cellulare e sulla maturazione osteoblastica nelle colture di cellule staminali mesenchimali derivate dal midollo osseo umano (HBMSCs) trattate con concentrazioni crescenti di RSV (10<sup>-8</sup>-10<sup>-4</sup> M). Hanno osservato un aumento dell'azione dell'ALP e della deposizione di calcio in HBMSCs, che ha significato un'aumentata proliferazione cellulare e una maggiore formazione di osteoblasti in un modo sia tempo- che dose-dipendente. Secondo Ornstorp et al.,<sup>143</sup> l'RSV sembra inibire la proliferazione e aumentare la differenziazione degli osteoblasti indipendentemente dallo stato infiammatorio. E' stato studiato se l'RSV influenzi la proliferazione e la

differenziazione di HBMSCs e se sia in grado di contrastare gli effetti negativi dell'infiammazione sullo sviluppo delle cellule: è stato quindi valutato l'effetto di una stimolazione con RSV (25  $\mu$ M) di breve (96 h) e lungo termine (21 giorni), sia in condizioni normali che infiammatorie (indotte da lipopolisaccaride, LPS). L'ALP, il propeptide N-terminale del collagene di tipo 1 (P1NP) e l'osteoprotegerina (OPG) sono stati considerati come marcatori di differenziazione osteoblastica, la lattato deidrogenasi (LDH) per valutare, invece, la morte cellulare, mentre le interleuchine IL-6 e IL-8 come marcatori infiammatori. Mentre la stimolazione a breve termine non ha avuto alcun impatto sulla proliferazione e differenziazione, quella a lungo termine sembrava influenzare il potenziale osteoblastogenico di HBMSCs, dato un aumento di tre volte dell'ALP e un piccolo aumento di P1NP e OPG, con conseguente forte diminuzione della proliferazione e aumento della differenziazione degli osteoblasti. A proposito dello stato infiammatorio, l'RSV non ha né influenzato la produzione di IL-6 e IL-8 in HBMSCs normali né ha impedito in modo significativo la comparsa dell'infiammazione in HBMSC-LPS-trattati.

#### 4.10.2 STUDI IN VIVO

Nella chirurgia orale, come sappiamo, una delle procedure più comuni è l'estrazione dentale, il cui processo di guarigione, spesso senza complicanze, può essere inadeguato nei pazienti che sono sottoposti a terapia immunosoppressiva, come con la ciclosporina (CsA). Al fine di valutare i potenziali effetti benefici degli agenti antiossidanti sulla salute ossea in questi pazienti, Ozcan-Kucuk et al. hanno studiato l'effetto dell'iniezione intraperitoneale di RSV (10 M/kg/die) sulla guarigione del sito post-estrattivo 14 o 28 giorni dopo l'estrazione dei denti nei ratti

normali e trattati con CsA. E' stato quindi valutato il processo di guarigione ossea e i risultati hanno mostrato livelli più elevati di marcatori di OCN e osteopontina, nonché un miglioramento della guarigione dell'alveolo sia nei ratti normali trattati con RSV sia in quelli trattati con RSV-CsA.<sup>144</sup> Per quanto riguarda il ruolo di RSV nel trattamento di parodontite, Bhattarai et al.<sup>136</sup> hanno studiato in vitro i meccanismi di risposta dei fibroblasti gengivali umani stimolati dal lipopolisaccaride (LPS) trattati con RSV. Inoltre, hanno studiato gli effetti del trattamento RSV in vivo, mediante iniezione sottocutanea giornaliera (5 mg/kg) in un modello sperimentale di parodontite indotta nei ratti attraverso delle legature molari contenenti LPS. Hanno osservato che il trattamento con RSV inibisce quasi completamente i risultati della stimolazione LPS, riduce i livelli di ROS e proteine associate all'infiammazione, la formazione di osteoclasti, proteggendo così i ratti contro la perdita ossea alveolare. Questi risultati hanno così dimostrato la capacità dell'RSV di inibire le risposte infiammatorie e stimolare i sistemi di difesa antiossidante nella malattia parodontale. Zhai et al.<sup>145</sup> hanno dimostrato che l'RSV può migliorare il flusso sanguigno locale nell'osso in un modello di coniglio sottoposto ad osteonecrosi indotta da steroidi (ON) sulla testa del femore. Grazie ai suoi effetti antinfiammatori, l'RSV protegge l'endotelio vascolare e riduce l'ipossia e la trombosi dei tessuti. Hanno valutato l'effetto di 4 mg/kg/die di RSV somministrato per via intraperitoneale per due settimane sulla prevenzione dell'ON. Il resveratrolo inibisce in maniera dose-dipendente i fattori di trascrizione NF-kB endoteliali e monocitario, oltre a ridurre l'espressione di LPS-, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ .

Tamaki et al.<sup>146</sup> hanno indagato l'attività di RSV sulla progressione della parodontite dimostrando la sua capacità di ridurre il riassorbimento osseo alveolare e lo stress ossidativo sistemico. Hanno indotto una parodontite sperimentale nei ratti, determinando anche il riassorbimento di

osso alveolare; poi, agli animali, sono stati somministrati per via orale 10 mg/kg/die di RSV. Gli studiosi hanno osservato che nel gruppo trattato con RSV aumentava l'attivazione della proteinchinasi attivata da adenosina monofosfato (AMPK) e le vie di difesa antiossidante, dimostrando che l'RSV potrebbe prevenire la progressione della parodontite e della perdita ossea alveolare. Gli effetti dell'RSV sulla guarigione ossea e la sua influenza sull'espressione genica dei marcatori osteogenici sono stati studiati anche da Casarin et al.<sup>147</sup> Nello studio, sono stati creati due difetti e un impianto in titanio a forma di vite è stato inserito nella tibia di ratti successivamente sottoposti a una somministrazione di 10 mg/kg/die di RSV mediante sonda gastrica per 30 giorni. L'analisi istomorfometrica ha determinato una riduzione del difetto nel gruppo RSV. Inoltre, la valutazione della forza di torque per la rimozione dell'impianto ha evidenziato che il trattamento con RSV ha positivamente influenzato la ritenzione biomeccanica dell'impianto in titanio. Inoltre, i risultati immunohistochimici hanno mostrato nel gruppo RSV un aumento dell'espressione di proteine morfogenetiche dell'osso (BMP)-2, BMP-7 e osteopontina (OPN). Questi risultati suggeriscono che l'assunzione a lungo termine di RSV potrebbe rappresentare un approccio terapeutico utile per la guarigione dell'osso e per la riabilitazione di pazienti con impianti dentali.

È stato, inoltre, studiato il potenziale effetto anti-invecchiamento di RSV per contrastare la perdita ossea legata all'età da Tresguerres et al.<sup>148</sup> I femori di ratti anziani sono stati analizzati in termini di massa ossea e proprietà biomeccaniche dopo l'integrazione alimentare con 10 mg/kg/die RSV per 10 settimane. Alla fine dello studio il volume osseo, il numero di trabecole ossee e lo spessore corticale sono stati migliorati negli animali trattati con RSV, considerando che la distanza tra le trabecole è stata ridotta. Inoltre, tutte le proprietà meccaniche e la

microstruttura ossea sono state migliorate. L'effetto del trattamento con RSV sulle ossa è stato valutato anche in uomini obesi affetti da sindrome metabolica, una malattia associata a un'inflammatione di basso grado, che può danneggiare le ossa.<sup>149</sup> Nello studio randomizzato, in doppio cieco, con i controlli sottoposti a placebo, i soggetti sono stati trattati con 1000 mg di RSV (RSVhigh) o 150 mg RSV (RSVlow) al giorno per 16 settimane e sono stati monitorati la densità minerale ossea, il contenuto minerale osseo e i parametri biochimici. I ricercatori hanno concluso che l'RSV agisce in maniera dose-dipendente e promuove la formazione o la mineralizzazione di osso direttamente, senza mediazione del processo antinfiammatorio.

#### 4.10.3 SCAFFOLD INNOVATIVI CARICATI CON RESVATROLO

Il resveratrolo è ben noto per la sua scarsa solubilità acquosa e per il rapido metabolismo ed escrezione; la scarsa biodisponibilità è uno dei principali svantaggi del farmaco. Diversi approcci sono stati utilizzati per migliorare la solubilità, la stabilità e la biodisponibilità di RSV attraverso la formulazione di sistemi di somministrazione di farmaci (DSSs) sotto forma di scaffold in grado di rilasciare RSV nel sito di perdita ossea per migliorare e ottimizzare la sua efficacia. Uno scaffold caricato con RSV è stato preparato innestando RSV all'acido poliacrilico (PAA, 1000 Da), PAA-RSV, e poi si è incorporato questo farmaco macromolecolare in un idrogel di atelocollagen (Coll) (Coll/PAA-RSV).<sup>150</sup> Lo scaffold è stato testato in vitro su condrociti e BMSC e in vivo su conigli con difetti ossei. I risultati in vitro hanno dimostrato che l'impalcatura potrebbe sostenere la crescita e mantenere la morfologia e il fenotipo di condrociti e BMSCs ed è in grado di proteggerli dalle specie reattive dell'ossigeno, dimostrando un'eccellente citocompatibilità. Dopo aver impiantato lo

scaffold di Coll/PAA-RSV per due, quattro e sei settimane nei conigli, i geni per la produzione di IL-1, metalloproteinasi-13 della matrice, cicloossigenasi (COX)-2 sono stati down-regulated mentre i geni correlati all'osso e alla cartilagine, quali SOX-9, aggrecano, Coll II e Coll I sono stati up-regulated con conseguente funzionalità anti-infiammatoria. Inoltre, dopo 12 settimane, i difetti osteocondrali sono scomparsi completamente e la neo-cartilagine era ben integrata con il tessuto circostante e l'osso subcondrale.

#### 4.10.4 RESVATROLO ASSOCIATO AL PRP

Negli ultimi anni, in chirurgia orale è stata introdotta una nuova procedura di rigenerazione ossea, basata sull'utilizzo di materiali emoderivati, come il PRP, ovvero il plasma ricco di piastrine. Di recente, molti autori hanno studiato l'applicazione di concentrati piastrinici autologhi per la prevenzione e il trattamento dell'osteonecrosi mascellare associata a farmaci (MRONJ).<sup>151</sup> I bifosfonati vengono spesso utilizzati per la terapia della perdita ossea osteoclasto-mediata, quindi spesso si viene a definire quella che è l'osteonecrosi dei mascellari correlata all'uso di bifosfonati (BRONJ).<sup>152</sup> Gli effetti in vitro dei fattori di crescita concentrati (CGF) e/o dell'RSV sulla proliferazione e la differenziazione degli osteoblasti umani, trattati o meno con bisfosfonati, sono stati studiati da Borsari et al.. La concentrazione piastrinica (chiamata anche CGF) è stata preparata centrifugando campioni di sangue con una macchina speciale che, alla fine del processo, formava tre frazioni: piastrine povere di plasma (PPP) nello strato superiore, globuli rossi liberi (RBC) nello strato inferiore e CGF nello strato intermedio, utilizzato per lo studio. È stato utilizzato resveratrolo a 10 µM di concentrazione. I risultati, ottenuti attraverso la valutazione di alcuni marcatori osteogenici con il test

ELISA (test di immunoassorbimento enzimatico) e attraverso un'analisi immunoistochimica, hanno rivelato che la proliferazione e la differenziazione dell'osteoblasto in vitro è promossa sia da CGF che da RSV, che aveva un ruolo protettivo sugli osteoblasti trattati con bifosfonati, in particolare con lo zoledronato. Questa attività è anche migliorata dal co-trattamento, rendendo questi risultati promettenti per la gestione clinica della BRONJ.

#### 4.10.5 CONCLUSIONI SUL RESVATROLO

L'utilizzo dell'RSV potrebbe, quindi, rappresentare un valido approccio terapeutico per i processi di guarigione ossea e nella riabilitazione di pazienti edentuli con impianti dentali, ma anche nel trattamento di malattie orali legate allo stress ossidativo. Inoltre, integrazione con l'RSV, migliorando la crescita, la proliferazione e la differenziazione di alcune cellule staminali, potenzialmente offre una serie di vantaggi rispetto all'uso delle cellule staminali da sole o all'uso degli scaffold o degli emocomponenti da soli, in termini di guarigione della parodontite, riempimento dei difetti ossei e ritenzione biomeccanica degli impianti in titanio. Infine, l'applicazione di RSV da solo o in associazione con nuovi scaffold e emocomponenti può aprire nuove prospettive per migliorare la gestione clinica di una vasta gamma di malattie del cavo orale tra cui l'osteonecrosi della mandibola legata al trattamento a lungo termine con bifosfonati. Ad oggi, l'uso clinico di RSV è stato limitato principalmente dalla sua scarsa solubilità nei fluidi fisiologici, con conseguente bassa biodisponibilità. La letteratura più recente riporta nuove nanotecnologie<sup>153</sup> in grado di superare questi inconvenienti, prospettando in un breve futuro il suo utilizzo nella pratica clinica per un'ampia gamma di

disturbi, grazie alle sue proprietà antinfiammatorie, antiossidanti e antitumorali.



## 5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I polifenoli sono, quindi, composti vegetali secondari che presentano proprietà antibatteriche, antinfiammatorie e anti-carcinogeniche. Ad oggi si è dimostrato che i polifenoli portano all'ispessimento e al rafforzamento dello strato di pellicola e al miglioramento del potenziale di protezione contro l'erosione delle pellicole. Inoltre, i polifenoli hanno mostrato un'efficacia nell'inibizione della crescita batterica, nell'adesione dei batteri alla superficie dentale e nell'inibizione dell'attività enzimatica.

Considerando tutti gli studi analizzati, questi descrivono una serie di attività caratteristiche dei polifenoli, tra cui antiossidante, antinfiammatoria, antitumorale, neuropreventiva, analgesica e antipiretica, estrogenico e antivirale.

Nel complesso, questo lavoro di tesi ha analizzato vari articoli che forniscono un supporto comprovato per la versatilità e il potenziale dei polifenoli al fine di utilizzarli come composti bioattivi per scopi nutrizionali, nutraceutici e farmacologici per la prevenzione o la mitigazione di una vasta gamma di condizioni metaboliche.

Tuttavia, nonostante la quantità di conoscenze accumulate, i meccanismi coinvolti nell'attività in vivo dei polifenoli non sono ancora pienamente compresi e possono variare da un composto ad un altro. E' ancora necessario molto lavoro per definire il loro preciso obiettivo biologico, nonché approfondire ulteriormente la comprensione di aspetti quali la biodisponibilità, il ruolo del microbiota intestinale sul metabolismo dei polifenoli e i conseguenti effetti o interazioni tra diversi composti fenolici e/o con componenti della matrice per accertare l'impatto dei polifenoli nell'organismo. Progressi significativi in tutti questi problemi dovrebbero essere previsti nel prossimo futuro, tenendo conto del

numero di studi che sono attualmente in corso in tutto il mondo insieme alle più potenti tecniche analitiche e nuovi approcci metodologici a nostra disposizione.

## BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization (WHO). Global action plan on antimicrobial resistance. Geneva, Switzerland: WHO; 2015.
2. Mun F.L., Hanafi A., *Molecular Mechanisms Responsible for Drug Resistance*, in “Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology”, 2018, p.1-6, University of Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia.
3. Christaki E., Marcou M., Tofarides A., *Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanism, Evolution, and Persistence*, in “Journal of Molecular Evolution”, 2019, p 2-3.
4. La Placa M., *Principi di Microbiologia Medica*, decima edizione, casa editrice Esculapio, pp73-122, (2005)
5. Ardila CM, Beyonda-Garcia JA, *Bacterial resistance to antiseptics in dentistry: A systematic scoping review of randomized clinical trials*, in “International Journal of Dental Hygiene”, 2023; 21: 141-148.
6. La Placa M., *Principi di Microbiologia Medica*, decima edizione, casa editrice Esculapio, pp753-756 (2005)
7. Ambrosi G., Cantino D., Castano P., Correr S., D’Este L., Donato R., Familiari G., Fornai F., Giulisano M., Iannello A., Magaudda L., Marceallo M., Martinelli A., Pacini P., Rende M., Rossi P., Sforza C., Tacchetti C., Toni R., Zummo G., *Anatomia dell’uomo*, seconda edizione, casa editrice Edi-Ermes, pp206-212, (2008)
8. Brand H.S., Veerman E.C.I., *Saliva and Wound Healing*, in “The Chinese Journal of Dental Research”, 2013, 16:1, 1-12.
9. Opstrup M.S., Jemec G.B.E., *Chlorhexidine Allergy: On the Rise and Often Overlooked*, in “Current Allergy and Asthma Reports”, (2019), 19:23, pp 1-10.
10. Seymour Stanton Block, *Disinfection, sterilization, and preservation*, Lippincott Williams & Wilkins, (2001), pp.321.
11. Jones G.C., *Chlorhexidine: is it still the gold standard?*, in “Periodontology 2000”, (1997), vol.15, pp 55-62.
12. Teixeira D.S., Figueiredo M.A.Z., Cherubini K., Oliveira S.D., Salum F.G., *The topical effect of chlorhexidine and povidone-iodine in the repair of oral wound. A review.*, in “Stomatologija, Baltic Dental and Maxillofacial Journal”, (2019), vol.21, no.2, pp 33-41.

13. Pemberton M.N., Gibson J., *Chlorhexidine and hypersensitivity reactions in dentistry*, in “British Dental Journal”, (2012), vol. 213, no.11, pp 547-550.
14. Bravo, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews* 56, 317–333 (2009)
15. Harborne, J. B. *The Flavonoids: Advances in Research since 1980*. (Springer, 2013).
16. He, H.-F. Research progress on theaflavins: efficacy, formation, and preparation. *Food Nutr Res* **61**, 1344521 (2017).
17. Kosuge, T. & Conn, E. E. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. I. Coumarin and o-coumaric acid. *J Biol Chem* **234**, 2133–2137 (1959).
18. Dey P.M., Harborne J.B., *Methods in plant biochemistry. Volume 1. Plant phenolics.*, casa editrice Academic Press, (2012).
19. Flemming, J. *et al.* Preventive Applications of Polyphenols in Dentistry—A Review. *IJMS* **22**, 4892 (2021).
20. Zhu, J.-J. & Jiang, J.-G. Pharmacological and Nutritional Effects of Natural Coumarins and Their Structure-Activity Relationships. *Mol Nutr Food Res* **62**, e1701073 (2018).
21. Morel, I. *et al.* Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochem Pharmacol* **45**, 13–19 (1993).
22. Foti, M., Piattelli, M., Baratta, M. T. & Ruberto, G. Flavonoids, coumarins, and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system. Structure-activity relationship. *J Agric Food Chem* **44**, 497–501 (1996).
23. Hollman, P. C., van Trijp, J. M., Mengelers, M. J., de Vries, J. H. & Katan, M. B. Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man. *Cancer Lett* **114**, 139–140 (1997).
24. Arder P., Grenacher B., Langguth P., Scharrer E., Wolfram S., *Cinnamate uptake by rat small intestine: transport kinetics and transepithelial transfer*, in “Experimental Physiology”, 81 (6): 943-55 (1996)
25. Vanholme R., De Meester B., Ralph J., Boerjan W., *Lignin biosynthesis and its integration into metabolism*, in “Current Opinion in Biotechnology”, 56: 230-239. (2019).
26. GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* **392**, 1789–1858 (2018).

27. Vitkov L., Singh J., Schauer C., Minnich B., Kronic J., Oberthaler H., Gamsjaeger S., Herrmann M., Jasmin K., Hanning M., *Breaking the Gingival Barrier in Periodontitis*, in “Int. J Mol Sci”, 24(5):4544. (2023)
28. Chagnot, C., Zorgani, M. A., Astruc, T. & Desvaux, M. Proteinaceous determinants of surface colonization in bacteria: bacterial adhesion and biofilm formation from a protein secretion perspective. *Front Microbiol* **4**, 303 (2013).
29. Morzel M., Siying T., Brignot H., Lherminier J., *Immunocytological detection of salivary mucins (MUC5B) on the mucosal pellicle lining human epithelial buccal cells*, in “Microscopy research and Technique, 77(6):453-7. (2014)
30. Ployon S., Morzel M., Belloir C., Bonnotte A., Briabd L., Bourillot E., Lesniewska E., Lherminier J., Aybeke E., Canon F., *Mechanisms of astringency: Structural alteration of the oral mucosal pellicle by dietary tannins and protective effect of bPRPs* in “Food Chemistry”, 1:253:79-87. (2018)
31. Hanning M., Joiner A., *The structure, function and properties of the acquired pellicle*, in “Monographs in Oral Science”, vol.19, pp 29-64. (2006).
32. Trautmann S., Barghash A., Fecher-Trost C., Schalkowsky P., Hanning C., Kirsch J., Rupf S., Keller A., Helms V., Hanning M., *Proteomic Analysis of the Initial Oral Pellicle in Caries-Active and Caries-Free Individuals*, in “Proteomics Clinics Application”, 13:1800143: 1-11. (2019)
33. Crozier, A. *et al.* Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages: measurements and bioavailability. *Biological Research* **33**, 79–88 (2000).
34. Nielsen, I. L. F. *et al.* Bioavailability is improved by enzymatic modification of the citrus flavonoid hesperidin in humans: a randomized, double-blind, crossover trial. *J Nutr* **136**, 404–408 (2006).
35. Kano, M., Takayanagi, T., Harada, K., Sawada, S. & Ishikawa, F. Bioavailability of isoflavones after ingestion of soy beverages in healthy adults. *J Nutr* **136**, 2291–2296 (2006).
36. Shahidi, F. and Naczk, M. (1995) *Food Phenolics Sources, Chemistry, Effects and Applications*. Technomic Publishing Co., Lancaster.
37. Herrmann, K. On the occurrence of flavonol and flavone glycosides in vegetables. *Z Lebensm Unters Forch* **186**, 1–5 (1988).
38. Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H. & Katan, M. B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**, 2379–2383 (1992).
39. Visioli, F. & Galli, C. The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutr Rev* **56**, 142–147 (1998).
40. Kühnau, J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* **24**, 117–191 (1976).

41. Hertog, M. G., Hollman, P. C., Katan, M. B. & Kromhout, D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer* **20**, 21–29 (1993).
42. Hollman, P. C. Bioavailability of flavonoids. *Eur J Clin Nutr* **51 Suppl 1**, S66-69 (1997).
43. Justesen, U., Knuthsen, P. & Leth, T. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* **799**, 101–110 (1998).
44. Hertog, M. G., Feskens, E. J., Hollman, P. C., Katan, M. B. & Kromhout, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* **342**, 1007–1011 (1993).
45. Hertog, M. G. *et al.* Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* **155**, 381–386 (1995).
46. Renaud, S. & de Lorgeril, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* **339**, 1523–1526 (1992).
47. Dohadwala, M. M. & Vita, J. A. Grapes and cardiovascular disease. *J Nutr* **139**, 1788S–93S (2009).
48. Quiñones, M., Miguel, M. & Aleixandre, A. Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacol Res* **68**, 125–131 (2013).
49. González-Gallego, J., Sánchez-Campos, S. & Tuñón, M. J. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutr Hosp* **22**, 287–293 (2007).
50. Scazzocchio, B. *et al.* Cyanidin-3-O- $\beta$ -glucoside and protocatechuic acid exert insulin-like effects by upregulating PPAR $\gamma$  activity in human omental adipocytes. *Diabetes* **60**, 2234–2244 (2011).
51. Korkina, L., De Luca, C. & Pastore, S. Plant polyphenols and human skin: friends or foes. *Ann N Y Acad Sci* **1259**, 77–86 (2012).
52. Galey, J. B. Potential use of iron chelators against oxidative damage. *Adv Pharmacol* **38**, 167–203 (1997).
53. Korkina L., Pastore S., De Luca C., Kostyuk V., *Metabolism of plant polyphenols in the skin: beneficial versus deleterious effects*, in “Current Drug Metabolism”, 9(8):710-29, (2008).
54. Kimura, S. *et al.* Essential role of Nrf2 in keratinocyte protection from UVA by quercetin. *Biochem Biophys Res Commun* **387**, 109–114 (2009).
55. Nichols, J. A. & Katiyar, S. K. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch Dermatol Res* **302**, 71–83 (2010).
56. Seve, M. *et al.* Resveratrol enhances UVA-induced DNA damage in HaCaT human keratinocytes. *Med Chem* **1**, 629–633 (2005).

57. Liu, Y. *et al.* Anthocyanin Biosynthesis and Degradation Mechanisms in Solanaceous Vegetables: A Review. *Front Chem* **6**, 52 (2018).
58. Flemming, H.-C. *et al.* Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* **14**, 563–575 (2016).
59. Pereira-Caro, G. *et al.* Bioavailability of orange juice (poly)phenols: the impact of short-term cessation of training by male endurance athletes. *Am J Clin Nutr* **106**, 791–800 (2017).
60. Swallah, M. S., Sun, H., Affoh, R., Fu, H. & Yu, H. Antioxidant Potential Overviews of Secondary Metabolites (Polyphenols) in Fruits. *Int J Food Sci* **2020**, 9081686 (2020).
61. Fourati, M. *et al.* Bioactive Compounds and Pharmacological Potential of Pomegranate (*Punica granatum*) Seeds - A Review. *Plant Foods Hum Nutr* **75**, 477–486 (2020).
62. Otake, S., Makimura, M., Kuroki, T., Nishihara, Y. & Hirasawa, M. Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. *Caries Res* **25**, 438–443 (1991).
63. Petti, S. & Scully, C. Polyphenols, oral health and disease: A review. *J Dent* **37**, 413–423 (2009).
64. Yamamoto, H. & Ogawa, T. Antimicrobial activity of perilla seed polyphenols against oral pathogenic bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**, 921–924 (2002).
65. Hannig, C., Spitzmüller, B., Hoth-Hannig, W. & Hannig, M. Targeted immobilisation of lysozyme in the enamel pellicle from different solutions. *Clin Oral Investig* **15**, 65–73 (2011).
66. Abdollahzadeh, Sh. *et al.* Antibacterial and Antifungal Activities of Punica Granatum Peel Extracts Against Oral Pathogens. *J Dent (Tehran)* **8**, 1–6 (2011).
67. Naz, S., Siddiqi, R., Ahmad, S., Rasool, S. A. & Sayeed, S. A. Antibacterial activity directed isolation of compounds from Punica granatum. *J Food Sci* **72**, M341-345 (2007).
68. Osawa, K. *et al.* Isoflavanones from the heartwood of Swartzia polyphylla and their antibacterial activity against cariogenic bacteria. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **40**, 2970–2974 (1992).
69. Koo, H. *et al.* Apigenin and tt-farnesol with fluoride effects on *S. mutans* biofilms and dental caries. *J Dent Res* **84**, 1016–1020 (2005).
70. Nasser M., Houshes S., Kourini A., Maala N., *Chemical Composition Of Essential Oil From Leaves and Flowers of Inula Viscosa*, in “International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research”, vol 5(12): 5177-5182.(2014).
71. Nobbs, A. H., Lamont, R. J. & Jenkinson, H. F. Streptococcus adherence and colonization. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**, 407–450, Table of Contents (2009).

72. Bar-Ya'akov, I., Tian, L., Amir, R. & Holland, D. Primary Metabolites, Anthocyanins, and Hydrolyzable Tannins in the Pomegranate Fruit. *Front Plant Sci* **10**, 620 (2019).
73. Kandra, L., Gyémánt, G., Zajácz, A. & Batta, G. Inhibitory effects of tannin on human salivary alpha-amylase. *Biochem Biophys Res Commun* **319**, 1265–1271 (2004).
74. Scalbert, A. & Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* **130**, 2073S–85S (2000).
75. Mazurek, S., Fecka, I., Węglińska, M. & Szostak, R. Quantification of active ingredients in *Potentilla tormentilla* by Raman and infrared spectroscopy. *Talanta* **189**, 308–314 (2018).
76. Smullen, J., Koutsou, G. A., Foster, H. A., Zumbé, A. & Storey, D. M. The antibacterial activity of plant extracts containing polyphenols against *Streptococcus mutans*. *Caries Res* **41**, 342–349 (2007).
77. Mudnic, I. *et al.* Cardiovascular effects in vitro of aqueous extract of wild strawberry (*Fragaria vesca*, L.) leaves. *Phytomedicine* **16**, 462–469 (2009).
78. Scalbert, A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* **30**, 3875–3883 (1991).
79. Karygianni, L. *et al.* High-level antimicrobial efficacy of representative Mediterranean natural plant extracts against oral microorganisms. *Biomed Res Int* **2014**, 839019 (2014).
80. Lee, S.-K., Lee, S.-W., Chung, S.-C., Kim, Y.-K. & Kho, H.-S. Analysis of residual saliva and minor salivary gland secretions in patients with dry mouth. *Arch Oral Biol* **47**, 637–641 (2002).
81. Farkash, Y., Feldman, M., Ginsburg, I., Steinberg, D. & Shalish, M. Polyphenols Inhibit *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* Biofilm Formation. *Dentistry Journal* **7**, 42 (2019).
82. Kong, L. *et al.* Theaflavins inhibit pathogenic properties of *P. gingivalis* and MMPs production in *P. gingivalis*-stimulated human gingival fibroblasts. *Arch Oral Biol* **60**, 12–22 (2015).
83. Hengge, R. Targeting Bacterial Biofilms by the Green Tea Polyphenol EGCG. *Molecules* **24**, 2403 (2019).
84. Harada, S. *et al.* Casein kinase II (CK-II)-mediated stimulation of HIV-1 reverse transcriptase activity and characterization of selective inhibitors in vitro. *Biol Pharm Bull* **22**, 1122–1126 (1999).
85. de Oliveira, A. *et al.* Inhibition of herpes simplex virus type 1 with the modified green tea polyphenol palmitoyl-epigallocatechin gallate. *Food Chem Toxicol* **52**, 207–215 (2013).
86. Christine, D. W. Grape Products and Oral Health. *The Journal of Nutrition* **139**, 1818S-1823S (2009).

87. Cai, L. & Wu, C. D. Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. *J Nat Prod* **59**, 987–990 (1996).
88. Rivero-Cruz, J. F., Zhu, M., Kinghorn, A. D. & Wu, C. D. Antimicrobial constituents of Thompson seedless raisins (*Vitis vinifera*) against selected oral pathogens. *Phytochemistry Letters* **1**, 151–154 (2008).
89. Carvalho, T. S., Pham, K. N., Niemeyer, S. H. & Baumann, T. The effect of red wine in modifying the salivary pellicle and modulating dental erosion kinetics. *European J Oral Sciences* **129**, e12749 (2021).
90. Carvalho, T. S. *et al.* Consensus report of the European Federation of Conservative Dentistry: erosive tooth wear--diagnosis and management. *Clin Oral Investig* **19**, 1557–1561 (2015).
91. Weber, M.-T., Hannig, M., Pötschke, S., Höhne, F. & Hannig, C. Application of Plant Extracts for the Prevention of Dental Erosion: An in situ/in vitro Study. *Caries Res* **49**, 477–487 (2015).
92. Parajas, I. L. Caries preventive effect of wild tea (tsaang-gubat) among school children. *J Philipp Dent Assoc* **47**, 3–13 (1995).
93. Liu, T. & Chi, Y. [Experimental study on polyphenol anti-plaque effect in human]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* **35**, 383–384 (2000).
94. Hattori, M., Kusumoto, I. T., Namba, T., Ishigami, T. & Hara, Y. Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **38**, 717–720 (1990).
95. Liu, Y. L., Feng, X. P. & Zhu, M. [Inhibitory effect of green tea polyphenols varnish on oral main cariogenic bacteria.]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* **4**, 198–200 (1995).
96. Huang, Z.-W., Zhou, X.-D., Xiao, Y., Liu, T.-J. & Li, J.-Y. [In vitro study of the effect of 11 kinds of natural drugs on the growth and acid production of *Lactobacillus*]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* **14**, 67–70 (2005).
97. Hannig, C., Spitzmüller, B. & Hannig, M. Characterisation of lysozyme activity in the in situ pellicle using a fluorimetric assay. *Clin Oral Investig* **13**, 15–21 (2009).
98. Tomczyk, M. & Latté, K. P. *Potentilla*--a review of its phytochemical and pharmacological profile. *J Ethnopharmacol* **122**, 184–204 (2009).
99. Lee, M.-J. *et al.* Delivery of tea polyphenols to the oral cavity by green tea leaves and black tea extract. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **13**, 132–137 (2004).
100. Takahashi, N. & Yamada, T. Acid-induced acid tolerance and acidogenicity of non-mutans streptococci. *Oral Microbiol Immunol* **14**, 43–48 (1999).

101. Wittpahl, G. *et al.* The Polyphenolic Composition of *Cistus incanus* Herbal Tea and Its Antibacterial and Anti-adherent Activity against *Streptococcus mutans*. *Planta Med* **81**, 1727–1735 (2015).
102. Hamilton-Miller, J. M. T. Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). *J Med Microbiol* **50**, 299–302 (2001).
103. Microorganism penetration in dentinal tubules of instrumented and retreated root canal walls. In vitro SEM study - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25383343/>.
104. Divia, A., Nair, M., Varughese, J. & Kurien, S. A comparative evaluation of *Morinda citrifolia*, green tea polyphenols, and Triphala with 5% sodium hypochlorite as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*: An in vitro study. *Dent Res J* **15**, 117 (2018).
105. Sakagami, H. Biological Activities and Possible Dental Application of Three Major Groups of Polyphenols. *J Pharmacol Sci* **126**, 92–106 (2014).
106. Kraft, S. & Granter, S. R. Molecular pathology of skin neoplasms of the head and neck. *Arch Pathol Lab Med* **138**, 759–787 (2014).
107. Philip, N. & Walsh, L. Cranberry Polyphenols: Natural Weapons against Dental Caries. *Dentistry Journal* **7**, 20 (2019).
108. Yoo, S., Murata, R. M. & Duarte, S. Antimicrobial traits of tea- and cranberry-derived polyphenols against *Streptococcus mutans*. *Caries Res* **45**, 327–335 (2011).
109. Moka, E., Argyra, E., Siafaka, I. & Vadalouca, A. Chlorhexidine: Hypersensitivity and anaphylactic reactions in the perioperative setting. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol* **31**, 145–148 (2015).
110. Philip, N., Suneja, B. & Walsh, L. J. Ecological Approaches to Dental Caries Prevention: Paradigm Shift or Shibboleth? *Caries Res* **52**, 153–165 (2018).
111. Howell, A. B. *et al.* A-type cranberry proanthocyanidins and uropathogenic bacterial anti-adhesion activity. *Phytochemistry* **66**, 2281–2291 (2005).
112. Johnson-White, B., Buquo, L., Zeinali, M. & Ligler, F. S. Prevention of nonspecific bacterial cell adhesion in immunoassays by use of cranberry juice. *Anal Chem* **78**, 853–857 (2006).
113. Pappas, E. & Schaich, K. M. Phytochemicals of cranberries and cranberry products: characterization, potential health effects, and processing stability. *Crit Rev Food Sci Nutr* **49**, 741–781 (2009).
114. Bodet, C. *et al.* Potential oral health benefits of cranberry. *Crit Rev Food Sci Nutr* **48**, 672–680 (2008).
115. Feng, G. *et al.* The specific degree-of-polymerization of A-type proanthocyanidin oligomers impacts *Streptococcus mutans* glucan-mediated adhesion and transcriptome responses within biofilms. *Biofouling* **29**, 629–640 (2013).

116. Wang, Y. & Spencer, P. Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. *J Dent Res* **82**, 141–145 (2003).
117. Carrilho, M. R. O. *et al.* Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J Dent Res* **86**, 90–94 (2007).
118. Liu, Y. *et al.* Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. *J Dent Res* **90**, 953–968 (2011).
119. Tjäderhane, L. *et al.* Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. *Dent Mater* **29**, 116–135 (2013).
120. Loguercio, A. D. *et al.* Influence of chlorhexidine digluconate concentration and application time on resin-dentin bond strength durability. *Eur J Oral Sci* **117**, 587–596 (2009).
121. Insights into chitosan hydrogels on dentine bond strength and cytotoxicity. <https://www.scirp.org/journal/paperinformation.aspx?paperid=29448>.
122. Porto, I. C. C. M. *et al.* Use of polyphenols as a strategy to prevent bond degradation in the dentin-resin interface. *Eur J Oral Sci* **126**, 146–158 (2018).
123. Chang, Y.-C. *et al.* Black Tea Polyphenols Reverse Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Suppress Cancer Invasion and Proteases in Human Oral Cancer Cells. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 8395–8403 (2012).
124. Baker, J. A. *et al.* Consumption of black tea or coffee and risk of ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* **17**, 50–54 (2007).
125. Sun, C.-L., Yuan, J.-M., Koh, W.-P. & Yu, M. C. Green tea, black tea and breast cancer risk: a meta-analysis of epidemiological studies. *Carcinogenesis* **27**, 1310–1315 (2006).
126. Weisburger, J. H. Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. *Food Chem Toxicol* **37**, 943–948 (1999).
127. Sheng, H., Ogawa, T., Niwano, Y., Sasaki, K. & Tachibana, K. Effects of polyphenols on doxorubicin-induced oral keratinocyte cytotoxicity and anticancer potency against oral cancer cells. *J Oral Pathol Med* **47**, 368–374 (2018).
128. Cecchinato, V. *et al.* Resveratrol-induced apoptosis in human T-cell acute lymphoblastic leukaemia MOLT-4 cells. *Biochem Pharmacol* **74**, 1568–1574 (2007).
129. Murgia, D., Mauceri, R., Campisi, G. & De Caro, V. Advance on Resveratrol Application in Bone Regeneration: Progress and Perspectives for Use in Oral and Maxillofacial Surgery. *Biomolecules* **9**, 94 (2019).
130. Pangeni, R., Sahni, J. K., Ali, J., Sharma, S. & Baboota, S. Resveratrol: review on therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* **11**, 1285–1298 (2014).

131. Cao, Z. & Li, Y. Potent induction of cellular antioxidants and phase 2 enzymes by resveratrol in cardiomyocytes: protection against oxidative and electrophilic injury. *Eur J Pharmacol* **489**, 39–48 (2004).
132. de la Lastra, C. A. & Villegas, I. Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: mechanisms and clinical implications. *Mol Nutr Food Res* **49**, 405–430 (2005).
133. Catalgol, B., Batirel, S., Taga, Y. & Ozer, N. K. Resveratrol: French paradox revisited. *Front Pharmacol* **3**, 141 (2012).
134. Ruivo, J., Francisco, C., Oliveira, R. & Figueiras, A. The main potentialities of resveratrol for drug delivery systems. *Braz. J. Pharm. Sci.* **51**, 499–513 (2015).
135. Liu, Z. P. *et al.* Effects of trans-resveratrol from *Polygonum cuspidatum* on bone loss using the ovariectomized rat model. *J Med Food* **8**, 14–19 (2005).
136. Bhattarai, G., Poudel, S. B., Kook, S.-H. & Lee, J.-C. Resveratrol prevents alveolar bone loss in an experimental rat model of periodontitis. *Acta Biomater* **29**, 398–408 (2016).
137. Mizutani, K., Ikeda, K., Kawai, Y. & Yamori, Y. Resveratrol stimulates the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **253**, 859–863 (1998).
138. Boissy, P. *et al.* Resveratrol inhibits myeloma cell growth, prevents osteoclast formation, and promotes osteoblast differentiation. *Cancer Res* **65**, 9943–9952 (2005).
139. Varoni, E. M., Lo Faro, A. F., Sharifi-Rad, J. & Iriti, M. Anticancer Molecular Mechanisms of Resveratrol. *Front Nutr* **3**, 8 (2016).
140. Min, K.-K. *et al.* Effects of resveratrol on bone-healing capacity in the mouse tooth extraction socket. *J Periodontal Res* **55**, 247–257 (2020).
141. Tseng, P.-C. *et al.* Resveratrol promotes osteogenesis of human mesenchymal stem cells by upregulating RUNX2 gene expression via the SIRT1/FOXO3A axis. *J Bone Miner Res* **26**, 2552–2563 (2011).
142. Dai, Z. *et al.* Resveratrol enhances proliferation and osteoblastic differentiation in human mesenchymal stem cells via ER-dependent ERK1/2 activation. *Phytomedicine* **14**, 806–814 (2007).
143. Ornstrup, M. J. *et al.* Resveratrol Increases Osteoblast Differentiation In Vitro Independently of Inflammation. *Calcif Tissue Int* **99**, 155–163 (2016).
144. Ozcan-Kucuk, A., Alan, H., Gul, M. & Yolcu, U. Evaluating the Effect of Resveratrol on the Healing of Extraction Sockets in Cyclosporine A-Treated Rats. *J Oral Maxillofac Surg* **76**, 1404–1413 (2018).
145. Zhai JL., Wheng X., Hong Wu Z., Guo SG., *Effect of Resveratrol on Preventing Steroid-induced Osteonecrosis in a Rabbit Model*, in “Chinese Medical Journal”, vol.129: 824-830. (2016)

146. Tamaki, N. *et al.* Resveratrol improves oxidative stress and prevents the progression of periodontitis via the activation of the Sirt1/AMPK and the Nrf2/antioxidant defense pathways in a rat periodontitis model. *Free Radic Biol Med* **75**, 222–229 (2014).
147. Casarin, R. C. *et al.* Resveratrol improves bone repair by modulation of bone morphogenetic proteins and osteopontin gene expression in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg* **43**, 900–906 (2014).
148. Tresguerres, I. F. *et al.* Resveratrol as anti-aging therapy for age-related bone loss. *Rejuvenation Res* **17**, 439–445 (2014).
149. Ornstrup, M. J., Harsløf, T., Kjær, T. N., Langdahl, B. L. & Pedersen, S. B. Resveratrol increases bone mineral density and bone alkaline phosphatase in obese men: a randomized placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* **99**, 4720–4729 (2014).
150. Wang, W., Sun, L., Zhang, P., Song, J. & Liu, W. An anti-inflammatory cell-free collagen/resveratrol scaffold for repairing osteochondral defects in rabbits. *Acta Biomater* **10**, 4983–4995 (2014).
151. Del Fabbro, M., Gallesio, G. & Mozzati, M. Autologous platelet concentrates for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw treatment and prevention. A systematic review of the literature. *Eur J Cancer* **51**, 62–74 (2015).
152. Borsani, E. *et al.* Beneficial Effects of Concentrated Growth Factors and Resveratrol on Human Osteoblasts In Vitro Treated with Bisphosphonates. *Bio-med Res Int* **2018**, 4597321 (2018).
153. Naves A., Martins S., Segundo M., Reis S., *Nanoscale Delivery of Resveratrol towards Enhancement of Supplements and Nutraceuticals*, in “Nutrients”, 8:131, 11-14. (2016).

