



HAL
open science

Caractérisation de biocéramiques et évaluation de leurs potentiels bioactifs

Naji Kharouf

► **To cite this version:**

Naji Kharouf. Caractérisation de biocéramiques et évaluation de leurs potentiels bioactifs. Médecine humaine et pathologie. Université de Strasbourg, 2021. Français. NNT: 2021STRAE027. tel-03621618

HAL Id: tel-03621618

<https://theses.hal.science/tel-03621618v1>

Submitted on 28 Mar 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ÉCOLE DOCTORALE 182
Laboratoire BioMatériaux et BioIngénierie UMR-S 1121

THÈSE présentée par :
Naji KHAROUF

Soutenue le : 17 Décembre 2021

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Sciences médicales-Odontologie

**Caractérisation de biocéramiques et évaluation
de leurs potentiels bioactifs**

THÈSE dirigée par :

Monsieur Haïkel Youssef PU-PH, université de Strasbourg

Monsieur Ball Vincent PU, université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Monsieur Frédéric Cuisinier PU-PH, université de Montpellier

Madame Brigitte Grosogeat PU-PH, université de Lyon 1

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Madame Fabienne Perez PU-PH, université de Nantes

Madame Adèle Carrado PU, université de Strasbourg

Monsieur Davide Mancino MCU-PH, université de Strasbourg

Caractérisation de biocéramiques et évaluation de leurs potentiels
bioactifs

Naji Kharouf

17/12/2021

Tables des matières

| | |
|--|----|
| Remerciements..... | 6 |
| Liste des publications..... | 7 |
| Liste des abréviations..... | 8 |
| Table des figures..... | 9 |
| Liste des tableaux..... | 13 |
| Introduction générale..... | 14 |
| Chapitre I : Revue bibliographique | 17 |
| 1.1. Introduction..... | 17 |
| 1.2. Les polyphénols utilisés dans le traitement dentaire..... | 18 |
| 1.2.1. Prétraitement dentinaire et stabilité de l'interface résine-dentine..... | 18 |
| 1.2.2. Reminéralisation, viabilité cellulaire et différenciation..... | 23 |
| 1.2.3. Activités antibactériennes, anti-inflammatoires et antioxydantes..... | 24 |
| 1.3. Conclusions..... | 30 |
| 1.4. Références..... | 30 |
| 1.5. La publication du chapitre I..... | 43 |
| Chapitre II : La modification du « Mineral Trioxide Aggregate » (MTA) par de l'acide tannique | 71 |
| 2.1. Introduction..... | 71 |
| 2.2. Matériels et méthodes..... | 72 |
| 2.2.1. Matériels et préparations..... | 72 |
| 2.2.2. Changement de couleur..... | 73 |
| 2.2.3. Mesures de pH..... | 73 |
| 2.2.4. Morphologie et composition chimique..... | 73 |
| 2.2.5. Temps de prise..... | 75 |

| | |
|--|------------|
| 2.2.6. Propriétés mécaniques..... | 75 |
| 2.2.7. Adsorption d'eau..... | 76 |
| 2.2.8. Tomographie aux rayons X..... | 77 |
| 2.2.9. Libération d'acide tannique dans l'eau | 78 |
| 2.2.10. Activités antibactériennes..... | 79 |
| 2.3. Résultats et discussion..... | 79 |
| 2.4. Conclusions..... | 89 |
| 2.5. Références..... | 90 |
| 2.6. La publication du chapitre II..... | 94 |
| Chapitre III : Modification du plâtre de Paris..... | 104 |
| 3.1. Introduction..... | 104 |
| 3.2. Matériels et méthodes..... | 106 |
| 3.2.1. Matériels et préparations..... | 106 |
| 3.2.2. Morphologie et composition chimique..... | 107 |
| 3.2.3. Propriétés mécaniques..... | 108 |
| 3.2.4. Diffractions des rayons X..... | 108 |
| 3.2.5. Adsorption d'eau..... | 109 |
| 3.2.6. Libération de polyphénols dans l'eau | 109 |
| 3.2.7. Mesures de pH | 110 |
| 3.2.8. Activités antibactériennes..... | 110 |
| 3.2.9. Activités antioxydantes..... | 113 |
| 3.2.10. Stabilité des composites dans l'eau..... | 113 |
| 3.3. Résultats et discussion..... | 114 |
| 3.4. Conclusions..... | 127 |
| 3.5. Références..... | 128 |

| | |
|---|------------|
| 3.6. La publication du chapitre III..... | 132 |
| Chapitre IV : Comparaison de l'effet de polyphénols sur le plâtre de Paris et le « Mineral Trioxide Aggregate » - conclusions et perspectives..... | 143 |
| Conclusion générale | 145 |
| Perspectives..... | 146 |

Remerciements

Ce travail de thèse a été financé par la société ITENA CLINICAL : je tiens à remercier Monsieur Mulhauser, Madame Elmam et Madame Gabelout pour ces échanges très fructueux. Sans leur support financier et intellectuel, ce travail n'aurait pas été possible.

Je tiens à remercier les membres du jury, la Professeure Brigitte Grosogeat, la Professeure Fabienne Perez et la Professeure Adèle Carrado et le Professeur Frédéric Cuisinier d'avoir accepté de lire et de juger ma thèse. Je leur adresse toute ma reconnaissance.

Je souhaite avant tout remercier très sincèrement mes directeurs de thèse, le Professeur Youssef Haïkel et le Professeur Vincent Ball pour m'avoir encadré de façon bienveillante durant mes années de doctorat. Merci à vous de m'avoir accompagné dans le monde de la recherche.

Je remercie la Professeure Nadia Bahlouli et toute l'équipe de l'ICUBE, Monsieur Hamdi Jmal et Monsieur Jihed Zghal. Je leur adresse toute ma reconnaissance. Je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance au Professeur Florent Meyer et à la Professeure Sybille Facca pour leur enthousiasme sans limite concernant ma thèse et ma vie professionnelle. Un grand merci à tous les membres de l'unité Inserm 1121 et en particulier à Sophie, Adrien, Christine et Annabelle.

De façon plus personnelle que professionnelle, je tiens à remercier mon ami et collègue Davide Mancino, pour son écoute et son soutien ; mon ami Youri Arntz pour ses conseils et son amitié ; mes amis et collègues Professeur Louis Hardan, Professeur Salvatore Sauro et Docteur Rim Bourgi.

Je remercie monsieur Joseph Hemmerlé et sa femme Michelle pour leur amitiés et leur soutien.

Je remercie mes amies Cynthia, Elodie, Morgane et Ludivine qui partagent avec moi les petits comme les grands moments de la vie. Je remercie mon amie Nadia Berrada, qui me soutient et me supporte malgré toutes les contraintes. Enfin, je remercie mes amis Tarek, Sleman et Ammar ; Sarah et Gida ; ma sœur Nadine, mes parents et mon beau-frère David, et ma tante Houda sans lesquelles rien ne serait pareil.

Liste des publications

Kharouf N, Haïkel Y, Ball V. Polyphenols in Dental Applications. *Bioengineering (Basel)*. 2020;7(3):72.

Kharouf N, Zghal J, Addiego F, Gabelout M, Jmal H, Haïkel Y, Bahlouli N, Ball V. Tannic acid speeds up the setting of mineral trioxide aggregate cements and improves its surface and bulk properties. *J Colloid Interface Sci*. 2021;589:318-326.

Kharouf N, Mancino D, Zghal, J, Helle S, Jmal H, Lenertz M, Viart N, Bahlouli N, Meyer F, Haïkel Y, Ball V. Dual role of Tannic acid and pyrogallol incorporated in plaster of Paris: morphology modification and release for antimicrobial properties. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021;112209.

Liste des abréviations

MEB : Microscope électronique à balayage

EGCG : epigallocatechine gallate

ECG : epicatechine-3-gallate

MR : mordaçage-rinçage

MMP : matrices métalloprotéinases

S. mutans : *Streptococcus mutans*

E. faecalis : *Enterococcus faecalis*

C. albicans : *Candida albicans*

TEGDMA : diméthacrylate de triéthylène glycol

MTA : mineral trioxide aggregate

AT : acide tannique

PY : pyrogallol

RS : resvératrol

EDX : microanalyse X

ATG : analyses thermogravimétriques

Table des figures

Figure 1. (a) Anatomie dentaire ; (b) Image de microscopie électronique à balayage (MEB) montrant la fraise diamantée ; (c) Image MEB montrant le matériau de restauration coronaire.

Figure 2. (a) Image MEB montrant l'instrument de la préparation canalaire ; (b) Coupe dans la racine dentaire montre le canal rempli avec du ciment d'obturation canalaire et de la gutta-percha ; (c) Image montrant l'apex ouvert de la racine dentaire ; (d) Photo de radiologie illustrant un cas d'apicectomie de la racine dentaire.

Figure 3. Les structures de différents polyphénols utilisés entre-autre dans le domaine dentaire. (a) Resvératrol ;(b) Quercétine ;(c) Acide tannique (AT) ;(d) Épigallocatechine gallate (EGCG) ;(e) Catéchine ;(f) Epicatechin gallate (ECG).

Figure 4. Image MEB montrant l'interface résine-dentine (x6000). (CO) composite dentaire ; (AD) adhésif dentaire ; (CH) couche hybride ; (D) dentine.

Figure 5. Image MEB montrant (a) la boue dentinaire ; (b) l'élimination de la boue dentinaire ; (c) les bactéries présentes dans le système canalaire ; (d) la désinfection du système canalaire.

Figure 6. Image MEB montrant le changement de morphologie de hydroxyapatite mise en contact avec des solutions contenant différentes concentrations en acide gallique (a) 0% ; (b) 0,05g/L ; (c) 1 g/L ; (d) 4 g/L [56].

Figure 7. Image MEB montrant la morphologie de biofilms de *C. albicans* et de *S. mutans* (a-c) groupe contrôle ; (d-f) groupe traité avec polyphénols de thé vert et de *Padma Hepaten* [103].

Figure 8. (a, b) Les matériaux utilisés ; (c) La préparation du MTA avec l'acide tannique.

Figure 9. (a) une image radiographique montrant les tubes vides ; (b) une image radiographique montrant les tubes remplis avec les composites MTA+AT ; (c) pH mètre.

Figure 10. (a) Les composites compactés dans des moules en téflon ; (b) Le métalliseur Hummer ; (c) Le microscope électronique à balayage (MEB) ; (d) Le mortier et pilon utilisés pour la préparation des différents composites broyés pour l'analyse thermogravimétrique.

Figure 11. (a) Le rhéomètre ; (b, c) Les différents composites entre les deux plateaux du rhéomètre.

Figure 12. (a) Les moules en téflon remplis avec les composites (3 mm de diamètre et 3,58 mm de hauteur) ; (b) Un exemple d'échantillon endommagé ; (c) Les échantillons entre les deux plateaux de la machine de compression avant le test ; (d) les échantillons après le test de résistance à la compression.

Figure 13. (a) Le goniomètre à angle de contact ; (b) La goutte d'eau distillée sur la surface de l'échantillon ; (c) Instantané photographique du profil de la goutte d'eau distillée (volume initial : 5 μ L).

Figure 14. (a) La courbe d'étalonnage de l'AT dans l'eau ; (b) Les solutions en contact avec les différents composites après 1 mois d'immersion.

Figure 15. (a) Changement de couleur du MTA dopé avec différentes fractions massiques en acide tannique ; (b) Changement du pH de l'eau en contact avec les différentes composites en fonction du temps.

Figure 16. (a) Micrographies électroniques par balayage montrant le changement de morphologie du MTA dopé avec différentes fractions massiques en acide tannique ; (b) : Variation de la composition chimique de différents composites obtenue par analyse élémentaire en MEB (EDX).

Figure 17. Cinétique de prise (mesurée par rhéologie) du MTA (noir et blanc, 2 expériences indépendantes) ; de MTA 87.5% ((bleu) et de MTA 75% (rouge).

Figure 18. Evolution des propriétés mécaniques (en compression) de différents composites (état sec). (a) La résistance à la compression ; (b) la compression maximale avant la rupture.

Figure 19. Evolution des propriétés mécaniques en compression de différents composites (état sec et état humide, ie en présence d'eau pendant 24h) : (a) résistance à la compression ; (b) : contrainte maximale à la rupture.

Figure 20. Tomographie aux rayons X. (a) MTA 100% ; (b) MTA 75% (conditions sèches) et (c) MTA 100%;(d) MTA 75% (en présence d'eau).

Figure 21. (a) Pourcentage d'AT libéré dans l'eau en contact avec les différents composites en fonction du temps de contact (1-72h). Deux séries d'expériences indépendantes ont été effectuées avec chaque composite comme indiqué dans l'insert ; (b) Profil d'une goutte d'eau distillée (5 μ l) déposée sur la surface de différents composites après 5s de dépôt.

Figure 22. La structure du (a) pyrogallol (PY) et (b) de l'acide tannique (AT).

Figure 23. Illustration schématique de la préparation des matériaux composites à base de plâtre avec de l'AT ou du PY.

Figure 24. Micrographies électroniques par balayage montrant (a) le changement de morphologie du plâtre dopé avec différentes fractions massiques en acide tannique et en pyrogallol ;(b) le changement de morphologie du plâtre dopé avec 50%PY après 24h d'immersion dans l'eau.

Figure 25. Evolution des propriétés mécaniques (en compression) de différents composites (a) plâtre+AT ; (b) plâtre+PY en fonction de la fraction massique de composé organique ajouté.

Figure 26. (a) Diffractogramme aux rayons X du plâtre vierge affiné par la méthode Rietvelt avec de la Bassanite et du Gypse ; (b) Diffractogramme aux rayons X du plâtre+AT ; (c) Abondance relative des phases en fonction de la quantité d'AT ajoutée, déterminée en affinant les diagrammes DRX avec la méthode de Rietveld ; (d) Diffractogramme aux rayons X du plâtre+PY ; (e) Diffractogramme aux rayons X du plâtre+50%PY comparé à celui du plâtre non modifié.

Figure 27. Profil d'une goutte d'eau distillée (5 μ l) déposée sur la surface de différents composites après 1s de dépôt.

Figure 28. (a) Photos des solutions en contact avec les différents composites après 72h d'immersion ; (b) Pourcentage de polyphénol libéré dans l'eau en contact avec les différents

composites (PY : carreaux bleu et blanc ; AT : cercles noir et blanc) en fonction du temps de contact (1-72h). Deux séries d'expériences indépendantes ont été effectuées avec chaque composite.

Figure 29. (a) Changement du pH de l'eau en contact avec les différentes composites en fonction du temps ; (b) Images du changement de couleur subi par une solution de DPPH avant et après 1min d'immersion des différents composites dans le DPPH.

Figure 30. Test de diffusion en milieu gélosé. (a) plâtre et plâtre + AT ; (b) solutions d'AT et de Chlorhexidine ; (c) plâtre et plâtre + PY ; (d) solutions de PY et de Chlorhexidine (sans plâtre).

Figure 31. (a) Résultats des tests de contact direct ; (b) Micrographie électronique à balayage (x10000) des biofilms de *S. aureus* sur les surfaces de plâtre vierge ou de plâtre + AT/PY. Les biofilms accumulés sur les surfaces sont indiqués par des flèches blanches.

Figure 32. Nombre d'UFC en fonction de la concentration molaire en unités PY. Les cercles bleus correspondent à l'AT et les carrés rouges correspondent au PY.

Figure 33. Résumé de l'étude en cours sur la modification de résine-époxy avec deux polyphénols différents ; RS : resvératrol ; PY : pyrogallol ; L'Obturys est un ciment d'obturation canalair à base de résine-époxy.

Liste des tableaux

Tableau 1. Les différentes fractions massiques d'acide tannique incorporées dans le MTA.

Tableau 2. Résultats quantitatifs obtenus après analyse des images de tomographie aux rayons X.

Tableau 3. Temps requis pour l'adsorption d'une goutte d'eau (5 μ l) dans les différents composites (en secondes).

Tableau 4. Les différentes fractions massiques d'acide tannique ou de pyrogallol incorporées dans le plâtre.

Tableau 5. Variation de la composition chimique de différents composites obtenue par analyse élémentaire en EDX.

Tableau 6. Variation de la solubilité de différents composites dans l'eau après 24 et 72h.

Tableau 7. Activités antioxydantes du plâtre dopé avec de l'AT ou du PY après 1min de contact avec la solution de DPPH à 10^{-4} M dans l'éthanol à 70%.

Tableau 8. Taille des zones d'inhibition du plâtre et du plâtre dopé avec de l'AT ou du PY ainsi qu'avec la chlorhexidine.

Tableau 9. Les effets de l'addition de polyphénols au plâtre de Paris et au (MTA).

Introduction générale

L'émail est la partie externe de la couronne, il recouvre la dentine qui est la partie interne de la dent et qui entoure la pulpe dentaire et le système canalaire (Fig. 1a).

La maladie la plus répandue de la dent est la carie. Les bactéries adhèrent à l'émail et peuvent déminéraliser les tissus dentaires suite à une sécrétion d'acides. Quand la carie atteint l'émail ou la dentine, on peut la traiter en enlevant les tissus infectés à l'aide de fraises (Fig. 1b) et les remplacer par des matériaux résine ou céramique (Fig. 1c).

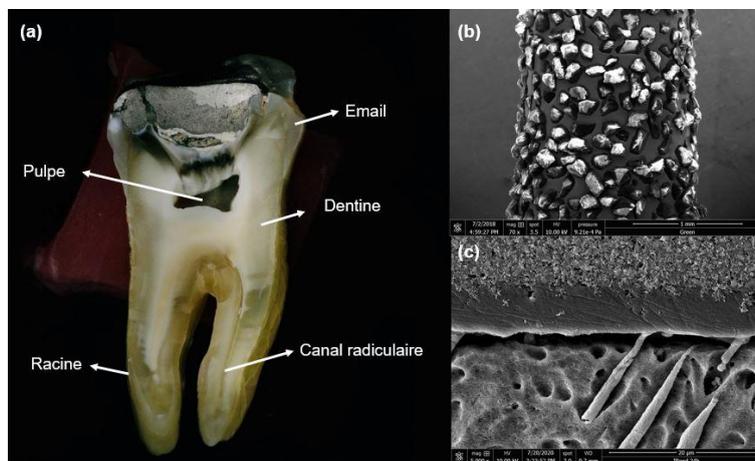


Figure 1. (a) Anatomie dentaire ; (b) Image de microscopie électronique à balayage (MEB) montrant la fraise diamantée ; (c) Image MEB montrant le matériau de restauration coronaire.

Une fois que la carie a envahi le système canalaire, on devra faire un traitement endodontique. Plusieurs éléments sont à prendre en considération dans le traitement endodontique : les instruments, les matériaux utilisés lors du traitement, la médication, le diagnostic, la digue, la cavité d'accès, la restauration finale, la désinfection et le système immunitaire du patient traité. Le chirurgien-dentiste commence le traitement en préparant une cavité d'accès à l'aide de fraises diamantées et d'ultrasons. Puis, on prépare les canaux avec les limes dentaires (Fig. 2a), on désinfecte avec des irrigants et à la fin on utilise un ciment d'obturation canalaire pour obturer et remplir le canal à l'aide d'un point de gutta-percha (Fig. 2b). Les ciments d'obturation canalaire sont fluides. On peut avoir des cas où on ne peut pas utiliser les ciments d'obturation canalaire car ils sont fluides et on doit utiliser des ciments de réparation canalaire qui sont plus

visqueux avant leur prise. Il existe plusieurs cas pour les ciments de réparation, comme par exemple des apex ouvert (Fig. 2c) où on ne peut pas utiliser un matériau fluide. Il existe également d'autres cas, comme la résorption, la perforation, la pulpotomie, le coiffage pulpaire et nous pouvons utiliser ces ciments dans les cas de l'apicectomie (Fig. 2d).

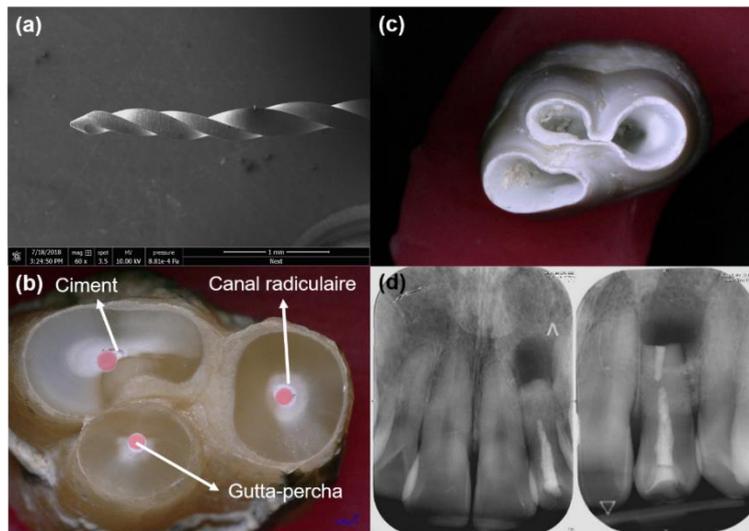


Figure 2. (a) Image MEB montrant l'instrument de la préparation canalaire ; (b) Coupe dans la racine dentaire montre le canal rempli avec du ciment d'obturation canalaire et de la gutta-percha ; (c) Image montrant l'apex ouvert de la racine dentaire ; (d) Photo de radiologie illustrant un cas d'apicectomie de la racine dentaire.

Ces matériaux doivent tous avoir une bonne résistance à la compression [1], une capacité antibactérienne, une forte biocompatibilité et ne pas être très soluble dans les fluides périapicaux. Mon sujet de thèse consiste à étudier ces ciments de réparation canalaire et notamment à améliorer leurs propriétés mécaniques et biologiques, notamment en termes de propriétés antimicrobiennes.

Ces ciments sont dérivés du ciment de Portland mélangé avec de l'oxyde de bismuth (composé radio-opacifiant) avec une limitation majeure : un temps de prise trop long (45-170 min) dans le cadre de la pratique dentaire [1-3]. La ligne directrice de ce travail de thèse consiste à rajouter des polyphénols dans l'eau utilisée pour la prise du ciment dans l'hypothèse que cette famille de molécules, connus pour leur capacité à s'adsorber sur la surface de tous types de matériaux [4], favorise des interactions interparticules au sein du ciment et qu'une partie reste disponible pour favoriser des effets biologiques.

Le premier chapitre de cette thèse est une revue décrivant les différentes utilisations des polyphénols dans la cavité buccale ainsi que les effets de l'incorporation des polyphénols dans les matériaux dentaires sur leurs propriétés physiques et biologiques.

Le deuxième chapitre est dédié à la modification de l'agrégat de trioxyde minéral ou "mineral trioxide aggregate" (MTA) avec l'acide tannique : nous avons analysé les effets de l'ajout de plusieurs fractions massiques de polyphénols sur les propriétés physico-chimiques et le temps de prise du MTA.

Le troisième chapitre présente la modification du plâtre de Paris avec différentes fractions massiques d'acide tannique et de pyrogallol afin de mieux comprendre les effets de l'addition de polyphénols sur les propriétés de ce matériau.

Enfin, le quatrième chapitre présente une comparaison entre les effets de l'addition de polyphénols dans la composition initiale du MTA et du plâtre de Paris, ainsi que les perspectives scientifiques après la fin de ce travail.

Références

- [1] Tanomaru-Filho M, Morales V, da Silva GF, et al. Compressive Strength and Setting Time of MTA and Portland Cement Associated with Different Radiopacifying Agents. *ISRN Dent.* 2012, 898051.
- [2] Islam I, Chng HK, Yap AU. Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and portland cement. *J Endod.* 2006, 32, 193-7.
- [3] Wang CW, Chiang TY, Chang HC, Ding SJ. Physicochemical properties and osteogenic activity of radiopaque calcium silicate-gelatin cements. *J Mater Sci Mater Med.* 2014, 25, 2193-203.
- [4] Sileika TS, Barrett DG, Zhang R, et al. Colorless multifunctional coatings inspired by polyphenols found in tea, chocolate and wine. *Angew. Chem. Int; Ed.* 2013, 52, 10766.

Chapitre I : Revue bibliographique

1.1. Introduction

L'équilibre entre les bactéries pathogènes et les bactéries commensales définit la santé bucco-dentaire. La perturbation de cet équilibre peut altérer la santé bucco-dentaire. Dans ce cas les bactéries pathogéniques seront prédominantes et induire des maladies buccales [1]. La carie dentaire est la maladie principale qui touche les tissus dentaires. La consommation excessive de produits alimentaires qui sont riches en carbohydrates peut altérer l'équilibre de la cavité buccale [2]. Par contre, plusieurs aliments contiennent des composants actifs qui ont des effets positifs sur la santé buccale en agissant sur les bactéries pathogènes. Parmi les principes actifs contenus dans ces aliments, les polyphénols. Ils sont contenus dans le thé, le vin, différentes épices et dans des plantes [3].

Les polyphénols consistent en une famille très hétérogène de molécules organiques caractérisée par la présence de deux ou plus de groupes phénoliques. Ils se composent d'un ou plusieurs cycles benzéniques comportant des groupements hydroxyles [4]. Ces polyphénols sont caractérisés par des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, antibactériennes et antimutagènes [5, 6]. Les plantes utilisées en Médecine contiennent des concentrations élevées en polyphénols [7].

Les flavonoïdes, les acides phénoliques et les polyphénols sont les 3 groupes les plus importants et les plus étudiés parmi les composés phénoliques alimentaires. Les avantages pour la santé et la prévention des maladies des composés phytochimiques phénoliques ont été beaucoup étudiés dans la littérature. Ces polyphénols (Fig. 3) ont été utilisés dans le domaine dentaire afin d'améliorer les propriétés biologiques des biomatériaux dentaires et les rendre bioactifs.

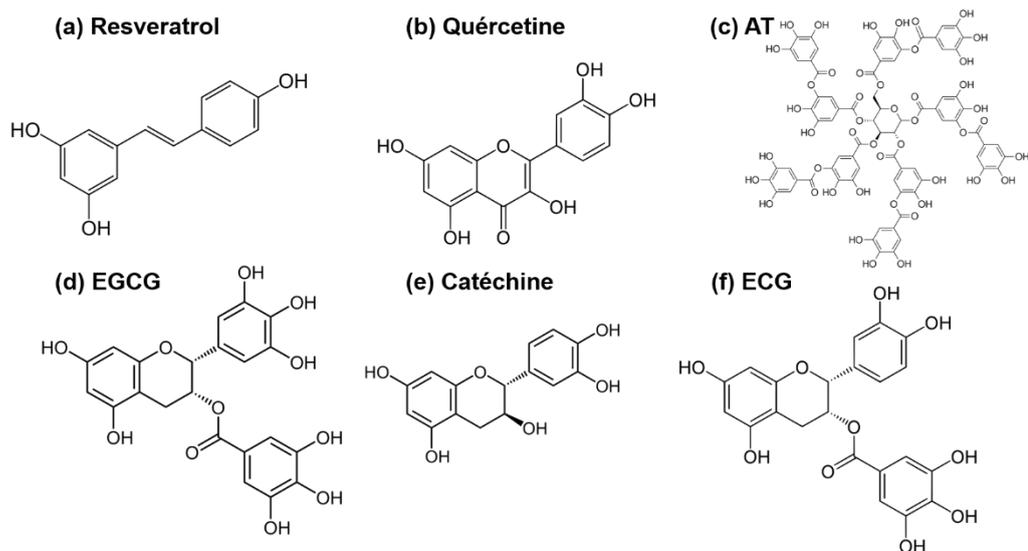


Figure 3. Les structures de différents polyphénols utilisés entre-autre dans le domaine dentaire. (a) Resvératrol ;(b) Quercétine ;(c) Acide tannique (AT) ;(d) Épigallocatechine gallate (EGCG) ;(e) Catéchine ;(f) Epicatechin gallate (ECG).

1.2. Les polyphénols utilisés dans le traitement dentaire

Les polyphénols sont utilisés dans le domaine de la santé bucco-dentaire et peuvent être incorporés dans les biomatériaux dentaire [3, 8, 9]. Cette revue bibliographique décrit les différentes applications des polyphénols et leurs effets sur les différentes tissus dentaires tels que, la dentine, l'émail, la pulpe, le système canalaire et la racine dentaire.

1.2.1. Prétraitement dentinaire et stabilité de l'interface résine-dentine

Le collage des adhésifs dentaires sur l'émail est devenu un traitement efficace grâce aux nouvelles résines dentaires à base de 10-Methacryloyloxydecyl Dihydrogen Phosphate (10-MDP), méthacrylates, éthanol et eau [10]. La dentine est une structure plus complexe que l'émail car elle contient des fibres de collagène avec une phase minérale composée essentiellement de cristaux d'hydroxyapatites. De plus c'est une structure poreuse contenant des canalicules dentinaires. La collagénase et d'autres enzymes (cystéine cathepsines et métalloprotéinases de la matrice extracellulaire) sont responsables de la dégradation de

collagène [11, 12]. L'adhésion d'un matériau dentaire à base de résine sur la dentine, passe par la formation d'une zone hybride (Fig. 4) [13]. Dans cette zone, la résine s'infiltré dans les fibrilles de collagène de la matrice dentinaire, ce qui forme un verrouillage micromécanique entre la résine et la matrice dentinaire [11-13]. Par conséquent, la stabilisation de l'interface résine-dentine et la couche hybride est possible par la prévention de la dégradation hydrolytique et enzymatique [9, 11-13].

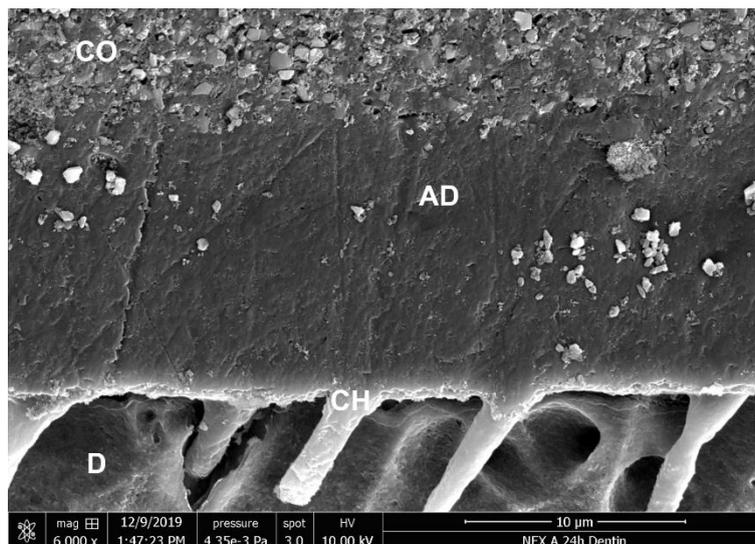


Figure 4. Image MEB montrant l'interface résine-dentine (x6000). (CO) composite dentaire ; (AD) adhésif dentaire ; (CH) couche hybride ; (D) dentine.

Les proanthocyanidines sont des polyphénols non hydrolysables issus du métabolisme secondaire des végétaux. Ils sont utilisés pour prétraiter et modifier la dentine, pour améliorer ses propriétés mécaniques et pour réduire la digestion du collagène [14, 15]. L'unité polyphénolique des proanthocyanidines interagit avec le collagène I par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes. Ces interactions peuvent résulter en une liaison stable entre la résine et la dentine. Ces interactions permettent aussi de réduire la biodégradation de la matrice dentinaire, *ie* une hydrolyse ralentie du collagène [16, 17]. À titre d'exemple, l'application d'extrait de pépins de raisins qui contient de la procyanidine B2 pendant une minute sur la dentine déminéralisée stabilise la dentine en réticulant le complexe dentine-collagène [18]. Les proanthocyanidines oligomériques permettent une augmentation du module élastique de la

dentine jusqu'à 80% [19]. L'epigallocatechine-3-gallate (EGCG) (Fig. 3) est le flavanol le plus abondant du thé et est connu pour être un antioxydant puissant. Ce polyphénol a été utilisé lors de prétraitements dentinaires avant d'application d'un système adhésif. Santiago et coll. ont traité la dentine avec des solutions contenant différentes concentrations en EGCG (0,02 ; 0,1 et 0,5% w/v) avant d'appliquer un adhésif mordantage/rinçage en trois étapes (MR3) [20]. Ils ont trouvé que toutes les concentrations en EGCG préservent la force d'adhésion de l'adhésif aux surfaces dentinaires 6 mois après le traitement. Les mêmes résultats ont été obtenus pour une concentration de 0,1% en EGCG dans l'étude de Singh et coll. [21]. L'EGCG a également été utilisé avant d'appliquer un système en deux étapes (MR2) [22]. Les résultats montrent que ce prétraitement ne préserve pas la force d'adhésion de cet adhésif aux surfaces dentinaires après 12 mois. Ce même polyphénol a été utilisé avant l'application d'un système auto-mordant [23] : les résultats montrent que ce prétraitement n'affecte pas la force d'adhésion de l'adhésif après 6 mois. Si on compare l'EGCG à la catéchine dans leur effet sur l'amélioration de l'adhésion d'un système auto-adhésif, il apparaît que l'EGCG permet de bien meilleures performances. Cela a été expliqué par un nombre plus élevé de groupes hydroxyles dans EGCG que dans la catéchine, permettant ainsi d'établir un plus grand nombre de liaisons hydrogène [24]. D'autres polyphénols, comme la quercétine et le resvératrol (Fig. 3), ont été utilisés pour le prétraitement de la dentine afin de déstabiliser la liaison résine-dentine [25]. Par conséquent, les mélanges de polyphénols utilisés dans cette étude ont démontré un effet protecteur sur la matrice de collagène dentinaire [25]. L'acide gallique, un polyphénol contenant un seul cycle aromatique peut améliorer l'inhibition des métalloprotéinases matricielles et des cystéines cathepsines avec une augmentation de la force de liaison entre une résine-adhésive et la dentine [15]. Les complexes de coordination acide gallique/ Fe^{+3} peuvent également diminuer l'hypersensibilité dentinaire [26]. Un matériau composite, le fluorure-acide tanin-lanthane-apatite, a été utilisé avec le même résultat [27]. L'amélioration de la rigidité de la dentine

déminéralisée et la réduction de la dégradation enzymatique du collagène ont été obtenues après un prétraitement dentinaire en utilisant des solutions à 10% et 20% (w/v) en acide tannique [28].

La réussite du traitement du canal radiculaire dépend de divers facteurs tels que le nettoyage approprié et le remplissage tridimensionnel de ce canal. L'élimination de la boue dentinaire (Figs. 5a et b) et la désinfection du système canalaire (Figs. 5c et d) sont d'une importance primordiale lors de la thérapie endodontique [29, 30].

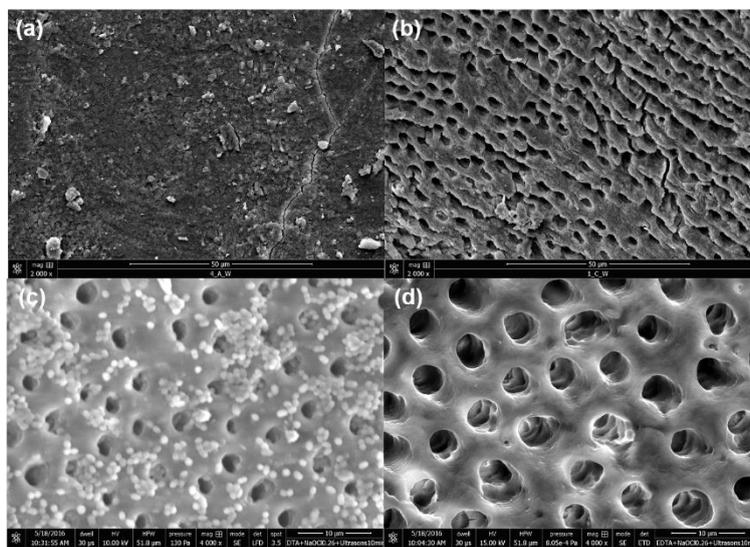


Figure 5. Image MEB montrant (a) la boue dentinaire ; (b) l'élimination de la boue dentinaire ; (c) les bactéries présentes dans le système canalaire ; (d) la désinfection du système canalaire.

Différents polyphénols ont été utilisés comme des irrigants lors du traitement endodontique. L'acide gallique, l'acide tannique et l'acide ascorbique ont été utilisés pour irriguer le système canalaire dans la racine dentaire [31]. L'application d'acide gallique (10% w/v) pendant 10 min a permis une meilleure pénétration du ciment en résine dans les tubules dentinaires. Des solutions d'acide tannique à différentes concentrations et pour différents temps d'application ont été utilisées pour traiter la boue dentinaire dans le système canalaire de la racine dentaire. Bitter [32] a analysé l'effet de l'utilisation de peroxyde d'hydrogène et d'hypochlorite de sodium suivi d'une solution contenant 25% (w/v) d'acide tannique comme solution finale d'irrigation dans le canal radiculaire dentaire. Cette étude a montré que l'utilisation d'acide tannique dans le fluide d'irrigation final a conduit à une diminution de la

rugosité de la surface de la chambre pulpaire. L'ajout d'acide tannique a permis une amélioration significative des résultats par rapport au mélange peroxyde d'hydrogène + hypochlorite de sodium utilisé sans polyphénol. De plus, Bitter [33] a montré que l'utilisation d'une solution à 25% (w/v) d'acide tannique en contact pendant 60 s élimine la couche de débris sans élargir l'orifice des tubules dentinaires, et élimine partiellement la matière organique des tubules dentinaires. En conséquence, Bitter et coll. [34] ont testé la perméabilité du bleu de méthylène dans des cavités dentinaires traitées avec des solutions contenant 25% (w/v) d'acide tannique pendant 15 s. Leurs résultats ont montré que ce traitement empêchait la pénétration du bleu de méthylène dans les tubules dentinaires. Takahashi et coll. [35] ont rapporté qu'une faible concentration en acide tannique (2 ou 5% (w/v)) appliquée pendant 60 s pourrait éliminer la boue dentinaire, laissant les orifices des tubules dentinaires obstrués. En revanche, une autre étude [36] a démontré que l'application de solutions contenant 15, 20 et 25% (w/v) d'acide tannique sur les surfaces dentinaires pendant 5, 10 ou 15 min ne pouvait pas éliminer totalement la boue dentinaire en raison de l'action astringente d'acide tannique. Cette action astringente contribue à la constriction des orifices des tubules dentinaires.

D'autre part, plusieurs polyphénols ont été incorporés dans des biomatériaux dentaires afin de leur conférer des effets antibactériens et antioxydants. Ces polyphénols peuvent changer la morphologie, les propriétés mécaniques et la force d'adhésion de biomatériaux aux tissus dentaires. A titre d'exemple, l'acide tannique incorporé dans le ciment polycarboxylate, ainsi que dans le fluorure de zinc, améliore la résistance du collagène dentinaire à la collagénase et aux enzymes protéolytiques [37].

Kharouf et coll. ont montré que l'incorporation d'acide tannique dans le ciment MTA (Mineral Trioxide Aggregate) améliore sa résistance à la compression [38]. Un verre ionomère mélangé avec 1,5% de tannin-fluorure a augmenté la force de liaison du verre ionomère à la dentine [39]. L'EGCG a été incorporé dans l'adhésif dentaire afin d'augmenter l'inhibition des

métalloprotéinases matricielles (MMP) et des cystéines cathepsines. Pour des concentrations de 0,5% et 1% (w/v), il a permis d'augmenter les valeurs de la force de liaison et la longévité du lien adhésif-dentine pendant 6 à 12 mois [40-43]. Neri et coll., ont montré que l'EGCG à 0,01 et 0,1% (w/v) diminue la solubilité de la résine adhésive dans l'eau [40]. Des ciments verre-ionomère ont également été mélangés avec 0,1% (w/w) d'EGCG afin d'améliorer leur activité antibactérienne et d'augmenter leur résistance à la flexion et leur dureté [44]. Gotti et coll. [45] ont analysé l'effet de l'ajout de quercétine à un système d'auto-mordantage en deux étapes et à un système d'auto-mordantage en une étape. Ils ont trouvé que la quercétine avait un effet positif sur la durabilité, la stabilité et la force d'adhésion de ses adhésifs sur les surfaces dentinaires, ainsi qu'un effet antibactérien (entre 20-40% sont tuées) tout en préservant la force de liaison et en inhibant l'activité de la collagénase [45, 46].

1.2.2. Reminéralisation, viabilité cellulaire et différenciation

L'EGCG et l'épicatéchine gallate (ECG) en tant qu'agent de réticulation du collagène n'affecte pas la viabilité cellulaire et induit un effet positif sur la prolifération et la différenciation des cellules pulpaires dentaires humaines [47, 48]. Trois flavonoïdes (quercétine, génistéine et baicaline) ont été utilisés afin de tester leur cytotoxicité et leur aptitude à différencier des ostéoblastes humaines. [49]. Le resvératrol a été aussi utilisé pour améliorer la viabilité cellulaire de la résine dentaire [50]. Ce polyphénol a aussi été utilisé pour réduire l'amplitude du mouvement des dents pendant le traitement orthodontique et pour réduire le taux de résorption radiculaire [51]. Concernant la reminéralisation, l'acide gallique a été utilisé pour réduire la gravité de la déminéralisation de l'émail induite par les bactéries. En effet, L'acide gallique peut inhiber la déminéralisation de l'émail en tant que chélateur des ions calcium et peut améliorer la reminéralisation de l'émail déminéralisé [52, 53]. L'acide gallique a également été utilisé pour reminéraliser l'émail carieux précoce, pour augmenter la micro-dureté de surface

et pour réduire la résistance à l'usure de l'émail [54]. L'acide gallique participe à la formation d'hydroxyapatite (Fig. 6), limite la croissance cristalline principalement le long de la direction [002] et modifie la morphologie et la taille des cristaux obtenus [55, 56].

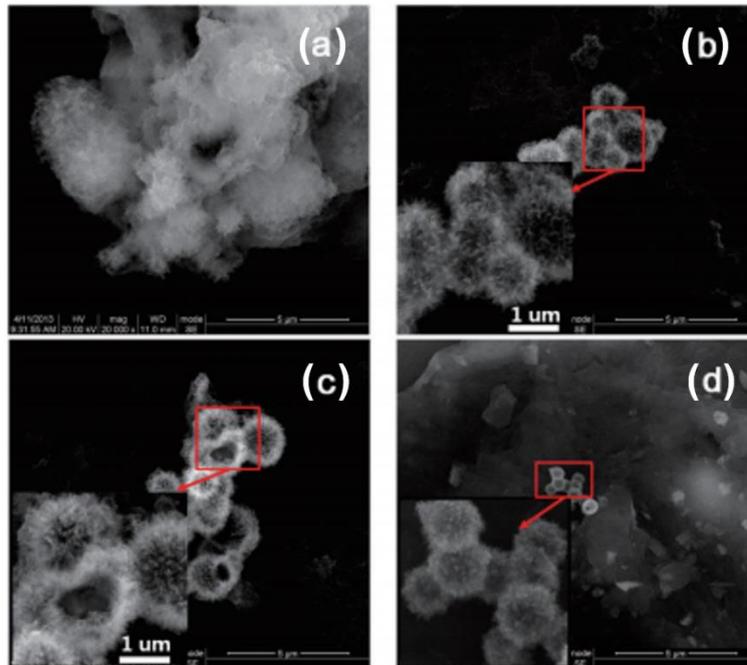


Figure 6. Image MEB montrant le changement de morphologie de hydroxyapatite mise en contact avec des solutions contenant différentes concentrations en acide gallique (a) 0% ; (b) 0,05g/L ; (c) 1 g/L ; (d) 4 g/L [56].

Des polyphénols de thé vert (TP) mélangés avec des particules nanométriques de phosphate de calcium ont été utilisés pour reminéraliser les lésions carieuses de l'émail [57]. Les résultats de cette étude ont également montré que l'ajout de polyphénols de thé aux particules de phosphate de calcium fournit un effet antibactérien et améliore le processus de reminéralisation. Les composés issus de *Galla chinensis* améliorent la reminéralisation des lésions radiculaires et inhibent également l'activité de la collagénase [58].

1.2.3. Activités antibactériennes, anti-inflammatoires et antioxydantes

La cavité buccale contient environ 750 types de bactéries dont de nombreuses sortes présentes au niveau de la plaque dentaire. Ces bactéries sont responsables de maladies dentaires telles que les caries dentaires [59]. Les caries dentaires ont été considérées comme les maladies les plus

polymicrobiennes de la cavité buccale [60]. *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) a été impliqué et considéré comme la cause principale et l'agent le plus cariogène des caries dentaires chez l'homme [61, 62]. Ces bactéries excrètent des glucides, tels que le glucose et le saccharose métabolisés en acides organiques par les glucosyltransférases et génèrent des biofilms stables, qui affectent les surfaces dentaires minéralisées [63, 64]. Xu et coll. [65] ont montré qu'une concentration de 31,25 µg/mL de gallate d'épigallocatechine du thé vert inhibe l'activité glucosyltransférase de *S. mutans* et 15,6 µg/mL de la même molécule inhibent 90% de la formation du biofilm de *S. mutans*. Les dérivés de la catéchine comme le gallate de gallocatéchine (0,32 mM) et le gallate d'épigallocatechine (0,31 mM) étaient capables d'inhiber les glucosyltransférases de *S. Mutans*. Melok et coll. [61] ont montré que l'utilisation d'épigallocatechine-3-gallate-stéarate à 250 µg/mL, un dérivé estérifié de l'épigallocatechine-3-gallate, pouvait complètement inhiber la croissance de *S. mutans* et la formation de biofilm. L'ajout de 700 µg/mL d'EGCG à des composites de restauration dentaire réduit la viabilité de *S. mutans* (plus que 90%) [66]. Une autre étude a montré que des solutions à 200 µg/mL et 300 µg/mL d'EGCG ont un effet inhibiteur sur la croissance de *S. mutans* tout en augmentant la force de liaison de la résine-adhésive à la surface de la dentine. Le gel Apacaries est un matériau contenant des composés polyphénoliques, comme l'acide gallique, qui pourrait jouer un rôle intéressant dans les activités antibactériennes [67]. L'EGCG a été utilisé comme agent antibactérien contre les biofilms d'*Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), qui sont associés à des infections persistantes du canal radiculaire [68]. La concentration minimale inhibitrice en EGCG contre *E. faecalis* était égale à 5 µg/mL. Kwon et coll. [69] ont comparé les effets de deux agents antibactériens (EGCG et glutaraldéhyde) sur la viabilité cellulaire. En présence des concentrations d'EGCG les plus élevées (10 à 100 µmol/L), la viabilité cellulaire était néanmoins réduite. Il a également été conclu que l'EGCG ne favorisait pas la différenciation odontogénique et la prolifération par lui-même, mais facilitait ces processus. Le collagène

réticulé en présence d'EGCG a montré une résistance à la compression plus élevée (contrôle = 0.5 MPa; 10 μ mol/L = 2.5 MPa) et une surface plus rugueuse (300 nm en comparant avec le contrôle « 100 nm »).

Les polyphénols sont dissous ou se trouvent sous forme colloïdale dans plusieurs boissons comme le thé ou différents vins. Ces polyphénols ont des activités antifongiques, des activités antibactériennes et antioxydantes ; et des effets inhibiteurs sur certains microorganismes pathogènes oraux comme *S. mutans* [59, 70-73]. Ferrazzano et coll. [74] ont comparé, dans une étude *in vivo*, l'effet antibactérien du bain de bouche à base de thé (1,6 g de feuilles de *Camellia sinensis* broyées ont été mises en suspension dans 40 mL d'eau distillée à 100 ° C pendant 3 min) et un bain de bouche placebo contre *S. mutans* et des lactobacilles. Quarante millilitres de chaque bain de bouche ont été utilisés 3 fois / jour pendant 7 jours. Une baisse significative des niveaux de *S. mutans* (60%) et une baisse significative des niveaux de lactobacilles (42,4%) ont été observées en utilisant un bain de bouche au thé vert par rapport au placebo. Les effets anticariogènes de 10% de polyphénol de thé, 0,05% (w/v), de fluorure à 0,05% (w/v), de chlorhexidine à 0,2% (w/v) et de chlorhexidine combiné avec 0,2% (p/v) de chlorhexidine ont été étudiés [75]. Cette étude a montré que tous les groupes avaient un effet anticariogène par rapport aux solutions salines, tandis que l'effet anticariogène du fluorure-chlorhexidine combiné était le plus élevé parmi ces groupes. Hambire et coll. [76] ont comparé l'effet d'une solution à 0,5% (w/v) de rince-bouche extrait de thé vert avec un rince-bouche commercial contenant 0,2% (w/v) de gluconate de chlorhexidine et un rince-bouche au fluorure de sodium (0,05 % w/v) sur la plaque, l'état gingival, l'état d'hygiène buccale et le pH salivaire. Ces chercheurs ont montré que le bain de bouche au thé vert jouait un rôle positif important sur les critères testés et aucun effet secondaire mesurable n'a été trouvé avec les autres bains de bouche testés. Chez les rats, des polyphénols de thé vert ajoutés à différentes concentrations (0,1-0,5% w/v) à l'alimentation ou à l'eau ont montré que l'activité carieuse était réduite [77].

Le thé Oolong, principalement consommé en Chine et à Taïwan, a été utilisé pour inhiber l'activité glucosyltransférase de *S. mutans* et pour diminuer le dépôt de plaque dentaire sur les dents [78-82]. Le café d'orge, contenant des anions fluorure, des cations zinc et des composés phénoliques, a un effet antibactérien sur *S. mutans* et ses biofilms [83, 84]. Plusieurs études *in vivo* [72, 85] ont démontré que deux fois moins de biofilms se développaient sur les dents des consommateurs buvant du vin, du thé ou du café par comparaison avec les consommateurs buvant de l'eau.

Le vin est l'une des boissons alcoolisées la plus fréquemment consommée par les humains. Il contient de nombreux composés biologiquement actifs, qui ont des effets bénéfiques pour la santé humaine lorsqu'il est consommé avec modération [86]. Les vins rouges et blancs contiennent des acides organiques et des polyphénols. Parmi ces acides organiques, les acides tartrique, citrique, succinique, malique, lactique et acétique pourraient contribuer à l'activité antibactérienne contre *S. mutans* et au traitement de maladies parodontales [12, 87, 88]. Plusieurs études ont analysé l'effet antibactérien de nombreuses plantes tel que Hop Bract, *Salvadora persica*, *Thymus lamiaceae*, *Perilla frutescens*, *Paullina cupana*, *Oenothera biennis*, *Sida urens* L. (Malvaceae), *Cistus incanus Herbal* (flavonols, flavonol glycosylé, catéchine, acide gallique), *Ziziphus jujuba* (quercitrine, catéchine, gallocatéchine) et *Trachyspermum ammi* (Ajwain) [89-100]. Ces plantes sont riches en polyphénols et peuvent être utilisées pour prévenir les caries dentaires.

Candida albicans est un colonisateur des caries dentaires chez les enfants et les adultes. Il joue un rôle important dans l'évolution des caries en raison de la production d'acides organiques et de sucres dans la plaque dentaire [101]. Les polyphénols de thé vert (1,25 µg/mL) et de *Padma Hepaten* (0,16 µg/mL) peuvent inhiber la croissance de *C. albicans* de plus de 88% et empêcher la formation de biofilms [102]. Une étude récente du même groupe [103] a montré la capacité des polyphénols du thé vert et de *Padma Hepaten* à inhiber les propriétés

cariées de *S. mutans* et *C. albicans* (Fig. 7). *Thymus capitatus* (TC) et *Citrus limon var. pompia* ont montré une capacité antimicrobienne contre *S. mutans* ; mais seul le TC était efficace comme composé fongicide contre *C. albicans*, capable de tuer 70% d'entre eux [104]. La canneberge, également riche en polyphénols, peut également inhiber les facteurs cariogènes de *S. mutans* et *C. albicans* biofilms en réduisant leur acidogénicité et leur activité métabolique [105].

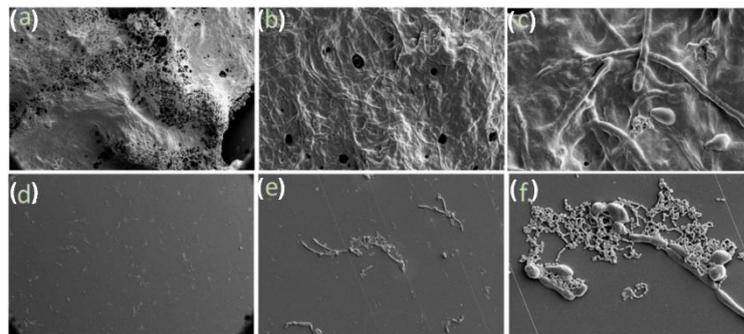


Figure 7. Image MEB montrant la morphologie de biofilms de *C. albicans* et de *S. mutans*. (a-c) groupe contrôle ; (d-f) groupe traité avec polyphénols de thé vert et de Padma Hepaten [103].

Les matériaux à base de résine métacrylate contiennent du diméthacrylate de triéthylène glycol (TEGDMA), qui induit l'expression de la cyclooxygénase-2. Cette enzyme induite par TEGDMA joue un rôle dans les maladies de la pulpe dentaire. L'activité cyclooxygénase-2 peut être supprimée en présence de 10 et 15 $\mu\text{mol/L}$ d'EGCG [106]. Les catéchines, y compris le gallate d'épicatéchine et le gallate d'épigallocatechine, ont été utilisées pour réduire la concentration des facteurs inflammatoires présents dans la pulpe inflammée [107, 108]. De même, l'EGCG et l'ECG (dissous à 20 et 50 $\mu\text{g/mL}$) ont réduit l'expression des facteurs de croissance endothéliaux vasculaires et de la cyclooxygénase-2 qui sont des cytokines pro-inflammatoires induites dans les cellules de la pulpe dentaire simulées avec le lipopolysaccharide (LPS), le peptidoglycane (PG), l'interleukine-1b (IL-1b), et le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) [109]. Wang et coll. [47] ont également démontré que l'activité anti-inflammatoire de l'ECG et de l'EGCG passe par l'inhibition de l'activité du facteur nucléaire kappa B (NF- κ B).

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) causées par les maladies de la pulpe et les agents de blanchiment dentaire génèrent un stress oxydatif [110] parce que ce sont des espèces radicalaires (contenant des électrons célibataires) très instables et réactives. Park et coll. [111] ont rapporté l'effet de l'EGCG (5–50 μM) contre la toxicité induite par l'oxyde nitrique au niveau des cellules de pulpe dentaire humaine. Les ROS peuvent également être désactivés par la butéine, qui est un polyphénol végétal et l'un des composés les plus actifs de la plante *Rhus Verniciflua* commune dans les pays d'Asie de l'Est [110]. Hashemi et coll. [112] ont démontré que la quercétine peut diminuer l'expression des cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine-6 et -1 β . La lutéoline (utilisée à 35 $\mu\text{mol /L}$) est un polyphénol de la famille des flavonols et a été associée à du pullulane phosphorylé pour diminuer la production de cytokines inflammatoires [113]. Le resvératrol inhibe l'interleukine IL-8 et -6 et inhibe la voie de signalisation c-Jun N-terminal Kinase (JNK) dans les cellules de la pulpe dentaire simulées par le facteur de nécrose tumorale α (TNF α). Le resvératrol peut être bénéfique pour diminuer les lésions pulpaires pendant la phase sévère de l'inflammation de la pulpe vitale [114]. Il augmente également l'activité de Sirtuin 1 (protéine désacétylase dépendante du nicotinamide adénine dinucléotide activée par le stress), qui est un médiateur des gènes immunitaires et de défense dans les cellules de la pulpe dentaire humaine [115]. En activant la fonction de Sirtuin 1 par le resvératrol, on peut favoriser la différenciation ostéogénique des cellules souches de la pulpe dentaire dans le microenvironnement inflammatoire via le signal Wnt / β -caténine [116]. Le resvératrol a été ajouté à des résines adhésives pour favoriser leur biocompatibilité et pour réduire le stress oxydatif des fibroblastes de souris L929 sans diminuer la force de liaison à la dentine [117, 118].

1.3. Conclusions

Il apparaît que les différentes classes de polyphénols (Fig. 3) ont été utilisées de manière différente selon leur structure et leurs propriétés. Les polyphénols condensés et hydrolysés ont trouvé une large gamme d'applications dans tous les domaines dentaires et surtout pour la modification, la reminéralisation de la dentine et pour des activités antimicrobiennes et antioxydantes. Différentes familles de polyphénols extraits de plantes ont été reportées pour leurs remarquables propriétés antimicrobiennes.

1.4. Références

- [1] He J, Li Y, Cao Y, et al. The oral microbiome diversity and its relation to human diseases. *Folia Microbiol (Praha)*. 2015, 60, 69-80.
- [2] Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res*. 2011, 45, 69-86.
- [3] Kharouf N, Haïkel Y, Ball V. Polyphenols in Dental Applications. *Bioengineering (Basel)*. 2020, 7, 72.
- [4] Guo Y, Sun Q, Wu FG, et al. Polyphenol-Containing Nanoparticles: Synthesis, Properties, and Therapeutic Delivery. *Adv Mater*. 2021, 19, e2007356.
- [5] Esmaeili S, Dayani L, Taheri A, et al. Phytochemical standardization, formulation and evaluation of oral hard gelatin capsules from *Pinus eldarica* bark extract. *Avicenna J Phytomed*. 2021, 11, 168-179.
- [6] Kharouf N, Mancino D, Zghal, J, et al. Dual role of Tannic acid and pyrogallol incorporated in plaster of Paris: morphology modification and release for antimicrobial properties. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021, 127, 112209.
- [7] Ferrazzano GF, Amato I, Ingenito A, et al. Plant Polyphenols and Their Anti-Cariogenic Properties: A Review. *Molecules*. 2011, 16, 1486-1507.

- [8] Forouzanfar F, Forouzanfar A, Sathyapalan T, et al. Curcumin for the Management of Periodontal Diseases: A Review. *Curr Pharm Des.* 2020, 26, 4277-4284.
- [9] Kharouf N, Eid A, Hardan L, et al. Antibacterial and Bonding Properties of Universal Adhesive Dental Polymers Doped with Pyrogallol. *Polymers.* 2021, 13, 1538.
- [10] Kharouf N, Mancino D, Rapp G, et al. Does Etching of the Enamel with the Rubbing Technique Promote the Bond Strength of a Universal Adhesive System? *J Contemp Dent Pract.* 2020, 21, 1117-1121.
- [11] Hardan L, Bourgi R, Kharouf N, et al. Bond Strength of Universal Adhesives to Dentin: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Polymers (Basel).* 2021, 13, 814.
- [12] Kharouf N, Rapp G, Mancino D, et al. Effect of etching the coronal dentin with the rubbing technique on the microtensile bond strength of a universal adhesive system. *Dent Med Probl.* 2019, 56, 343-348.
- [13] Kharouf N, Ashi T, Eid A, et al. Does Adhesive Layer Thickness and Tag Length Influence Short/Long-Term Bond Strength of Universal Adhesive Systems? An In-Vitro Study. *Applied Sciences.* 2021, 11, 2635.
- [14] Aguiar TR, Vidal CM, Phansalkar RS, et al. Dentin biomodification potential depends on polyphenol source. *J Dent Res.* 2014, 93, 417-422.
- [15] Vidal CM, Leme AA, Aguiar TR, et al. Mimicking the hierarchical functions of dentin collagen cross-links with plant derived phenols and phenolic acids. *Langmuir.* 2014, 30, 14887-14893.
- [16] Leme-Kraus AA, Aydin B, Vidal CM, et al. Biostability of the Proanthocyanidins-Dentin Complex and Adhesion Studies. *J Dent Res.* 2017, 96, 406-412.
- [17] Tang CF, Fang M, Liu RR, et al. The role of grape seed extract in the remineralization of demineralized dentine: micromorphological and physical analyses. *Arch Oral Biol.* 2013, 58, 1769-1776.

- [18] Liu Y, Bai X, Li S, et al. Molecular weight and galloylation affect grape seed extract constituents' ability to cross-link dentin collagen in clinically relevant time. *Dent Mater.* 2015, 31, 814-821.
- [19] Nam JW, Phansalkar RS, Lankin DC, et al. Subtle Chemical Shifts Explain the NMR Fingerprints of Oligomeric Proanthocyanidins with High Dentin Biomodification Potency. *J Org Chem.* 2015, 80, 7495-7507.
- [20] Santiago SL, Osorio R, Neri J.R, et al. Effect of the flavonoid epigallocatechin-3- gallate on resin-dentin bond strength. *J Adhes Dent.* 2013, 15, 535–540.
- [21] Singh P, Nagpal R, Singh UP. Effect of dentin biomodifiers on the immediate and long-term bond strengths of a simplified etch and rinse adhesive to dentin. *Restor Dent Endod.* 2017, 42, 188–199.
- [22] Fialho MPN, Hass V, Nogueira RP, et al. Effect of epigallocatechin-3- gallate solutions on bond durability at the adhesive interface in caries-affected dentin. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2019, 91, 398–405.
- [23] De Costa CAG, Passos VF, Neri JR, et al. Effect of Metalloproteinase Inhibitors on Bond Strength of a Self-etching Adhesive on Erosively Demineralized Dentin. *J. Adhes. Dent.* 2019, 21, 337–344.
- [24] Kalaiselvam R, Ganesh A, Rajan M, et al. Evaluation of bioflavonoids on the immediate and delayed microtensile bond strength of self-etch and total-etch adhesive systems to sound dentin. *Indian J. Dent. Res.* 2018, 29, 133–136.
- [25] Porto ICCM, Nascimento TG, Oliveira JMS, et al. Use of polyphenols as a strategy to prevent bond degradation in the dentin-resin interface. *Eur. J. Oral Sci.* 2018, 126, 146–158.
- [26] Oh S, Gu Y, Perinpanayagam H, et al. Dentinal tubule sealing effects of 532-nm diode-pumped solid-state laser, gallic acid/Fe³⁺ complex, and three commercial dentin desensitizers. *Lasers Med. Sci.* 2018, 33, 1237–1244.

- [27] Mukai Y, Tomiyama K, Okada S, et al. Dentinal tubule occlusion with lanthanum fluoride and powdered apatite glass ceramics in vitro. *Dent. Mater. J.* 1998, 17, 253–263.
- [28] Bedran-Russo AKB, Yoo KJ, Ema KC, et al. Mechanical properties of tannic-acid-treated dentin matrix. *J. Dent. Res.* 2009, 88, 807–811.
- [29] Mancino D, Kharouf N, Cabiddu M, et al. Microscopic and chemical evaluation of the filling quality of five obturation techniques in oval-shaped root canals. *Clin Oral Investig.* 2020, 26.
- [30] Kharouf N, Pedullà E, La Rosa GRM, et al. In Vitro Evaluation of Different Irrigation Protocols on Intracanal Smear Layer Removal in Teeth with or without Pre-Endodontic Proximal Wall Restoration. *J Clin Med.* 2020, 9, 3325.
- [31] Christopher SR, Mathai V, Nair RS, et al. The effect of three different antioxidants on the dentinal tubular penetration of Resilon and Real Seal SE on sodium hypochlorite-treated root canal dentin: An in vitro study. *J. Conserv. Dent.* 2016, 19, 161–165.
- [32] Bitter NC. A 25% tannic acid solution as a root canal irrigant cleanser: A scanning electron microscope study. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 1989, 67, 333–337.
- [33] Bitter NC. Tannic acid for smear layer removal: Pilot study with scanning electron microscope. *J. Prosthet. Dent.* 1989, 61, 503–507.
- [34] Bitter NC. The effect of 25% tannic acid on prepared dentin: A scanning electron microscope-methylene blue dye study. *J. Prosthet. Dent.* 1990, 64, 12–16.
- [35] Takahashi H, Okamoto Y, Fujinaka S, et al. A pilot study of exposure of the smear layer to tannic acid solutions. *J. Prosthet. Dent.* 1993, 70, 261–263.
- [36] Sabbak SA, Hassanin MB. A scanning electron microscopic study of tooth surface changes induced by tannic acid. *J. Prosthet. Dent.* 1998, 79, 169–174.
- [37] Okamoto Y, Shintani H, Yamaki M. A medicated polycarboxylate cement to prevent complications in composite resin therapy. *J. Prosthet. Dent.* 1990, 63, 37–40.

- [38] Kharouf N, Zghal J, Addiego F, et al. Tannic acid speeds up the setting of mineral trioxide aggregate cements and improves its surface and bulk properties. *J Colloid Interface Sci.* 2021, 589, 318-326.
- [39] Yamaga M, Koide T, Hieda T. Adhesiveness of glass ionomer cement containing tannin-fluoride preparation (HY agent) to dentin-An evaluation of adding various ratios of HY agent and combination with application diammine silver fluoride. *Dent. Mater. J.* 1993, 12, 36–44.
- [40] Neri JR, Yamauti M, Feitosa VP, et al. Physicochemical properties of a methacrylate-based dental adhesive incorporated with epigallocatechin-3-gallate. *Braz. Dent. J.* 2014, 25, 528–531.
- [41] Fonseca BM, Barcellos DC, da Silva TM, et al. Mechanical-physicochemical properties and biocompatibility of catechin-incorporated adhesive resins. *J. Appl. Oral Sci.* 2019, 27, e20180111.
- [42] De Macedo FAA, Souza NO, Lemos MVS, et al. Dentin bonding and physicochemical properties of adhesives incorporated with epigallocatechin-3-gallate. *Odontology* 2019, 107, 23–28.
- [43] Albuquerque N, Neri JR, Lemos M, et al. Effect of Polymeric Microparticles Loaded with Catechin on the Physicochemical Properties of an Adhesive System. *Oper. Dent.* 2019, 44, E202–E211.
- [44] Hu J, Du X, Huang C, et al. Antibacterial and physical properties of EGCG-containing glass ionomer cements. *J. Dent.* 2013, 41, 927–934.
- [45] Gotti VB, Feitosa VP, Sauro S, et al. Effect of antioxidants on the dentin interface bond stability of adhesives exposed to hydrolytic degradation. *J. Adhes. Dent.* 2015, 17, 35–44.
- [46] Yang H, Li K, Yan H, et al. High-performance therapeutic quercetin-doped adhesive for adhesive-dentin interfaces. *Sci. Rep.* 2017, 7, 8189.

- [47] Wang F, Han Y, Xi S, et al. Catechins reduce inflammation in lipopolysaccharide-stimulated dental pulp cells by inhibiting activation of the NF- κ B pathway. *Oral Dis.* 2020, 26, 815–821.
- [48] Lim E, Lim MJ, Min KS, et al. Effects of epicatechin, a crosslinking agent, on human dental pulp cells cultured in collagen scaffolds. *J. Appl. Oral Sci.* 2016, 24, 76–84.
- [49] Kim JG, Son KM, Park HC, et al. Stimulating effects of quercetin and phenamil on differentiation of human dental pulp cells. *Eur. J. Oral Sci.* 2013, 121, 559–565.
- [50] Atalayin C, Armagan G, Konyalioglu S, et al. The Protective Effect of Resveratrol against Dentin Bonding Agents-Induced Cytotoxicity. *Dental Materials Journal* 2015, 34, 766–773.
- [51] Liu XC, Wang XX, Zhang LN, et al. Inhibitory effects of resveratrol on orthodontic tooth movement and associated root resorption in rats. *Arch. Oral Biol.* 2020, 111, 104642.
- [52] Zhang J, Huang X, Huang S, et al. Changes in composition and enamel demineralization inhibition activities of gallic acid at different pH values. *Acta Odontol. Scand.* 2015, 73, 595-601.
- [53] Huang XL, Liu MD, Li JY, et al. Chemical composition of *Galla chinensis* extract and the effect of its main component(s) on the prevention of enamel demineralization in vitro. *Int. J. Oral Sci.* 2012, 4, 146-151.
- [54] Gao SS, Qian LM, Huang SB, et al. Effect of gallic acid on the wear behavior of early carious enamel. *Biomed. Mater.* 2009, 4, 034101.
- [55] Tang B, Yuan H, Cheng L, et al. Effects of gallic acid on the morphology and growth of hydroxyapatite crystals. *Arch. Oral Biol.* 2015, 60, 167–173.
- [56] Tang B, Yuan H, Cheng L, et al. Control of hydroxyapatite crystal growth by gallic acid. *Dent. Mater. J.* 2015, 34, 108–113.

- [57] He L, Deng D, Zhou X, et al. Novel tea polyphenol-modified calcium phosphate nanoparticle and its remineralization potential. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 2015, 103, 1525–1531.
- [58] Guo B, Que KH, Yang J, et al. Effect of *Galla chinensis* on the remineralization of two bovine root lesions morphous in vitro. *Int. J. Oral Sci.* 2012, 4, 152–156.
- [59] Li Y, Jiang X, Hao J, Zhang Y, Huang R. Tea polyphenols: Application in the control of oral microorganism infectious diseases. *Arch. Oral Biol.* 2019, 102, 74–82.
- [60] Cheng L, Li J, He L, Zhou X. Natural products and caries prevention. *Caries Res.* 2015, 49 (Suppl. 1), 38–45.
- [61] Melok AL, Lee LH, Mohamed Yussof SA, Chu T. Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-Gallate-Stearate Inhibits the Growth of *Streptococcus mutans*: A Promising New Approach in Caries Prevention. *Dent J.* 2018, 6, 38.
- [62] Babaeekhou L, Ghane, M. Antimicrobial activity of ginger on cariogenic bacteria: Molecular networking and molecular docking analyses. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2020, 1–12.
- [63] Kolahi J, Fazilati M, Kadivar M. Towards tooth friendly soft drinks. *Med. Hypotheses* 2009, 73, 524–525.
- [64] Veloz JJ, Alvear M, Salazar LA. Antimicrobial and Antibiofilm Activity against *Streptococcus mutans* of Individual and Mixtures of the Main Polyphenolic Compounds Found in Chilean Propolis. *BioMed Res. Int.* 2019, 7602343.
- [65] Xu X, Zhou XD, Wu CD. The tea catechin epigallocatechin gallate suppresses cariogenic virulence factors of *Streptococcus mutans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011, 55, 1229–1236.
- [66] Mankovskaia A, Lévesque CM, Prakki A. Catechin-incorporated dental copolymers inhibit growth of *Streptococcus mutans*. *J. Appl. Oral Sci.* 2013, 21, 203–207.

- [67] Juntavee A, Peerapattana J, Ratanathongkam A, et al. The Antibacterial Effects of Apacaries Gel on Streptococcus mutans: An in vitro Study. *Int. J. Clin. Pediatr. Dent.* 2014, 7, 77–81.
- [68] Lee P, Tan KS. Effects of Epigallocatechin gallate against Enterococcus faecalis biofilm and virulence. *Arch. Oral Biol.* 2015, 60, 393–399.
- [69] Kwon YS, Kim HJ, Hwang YC, et al. Effects of Epigallocatechin Gallate, an Antibacterial Cross-linking Agent, on Proliferation and Differentiation of Human Dental Pulp Cells Cultured in Collagen Scaffolds. *J. Endod.* 2017, 43, 289–296.
- [70] Friedman M. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Mol. Nutr. Food Res.* 2007, 51, 116–134.
- [71] Okubo S, Toda M, Hara Y, Shimamura T. Antifungal and fungicidal activities of tea extract and catechin against Trichophyton. *Nippon Saikingaku Zasshi* 1991, 46, 509–514.
- [72] Signoretto C, Burlacchini G, Bianchi F, et al. Differences in microbiological composition of saliva and dental plaque in subjects with different drinking habits. *New Microbiol.* 2006, 29, 293–302.
- [73] Ferrazzano GF, Amato I, Ingenito A, et al. Anti-cariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea). *Fitoterapia* 2009, 80, 255–262.
- [74] Ferrazzano GF, Roberto L, Amato I, et al. Antimicrobial properties of green tea extract against cariogenic microflora: An in vivo study. *J. Med. Food* 2011, 14, 907–911.
- [75] Jazaeri M, Pakdek F, Rezaei-Soufi L, et al. Cariostatic effect of green tea in comparison with common anticariogenic agents: An in vitro study. *J. Dent. Res. Dent. Clin. Dent. Prospect.* 2015, 9, 44–48.
- [76] Hambire CU, Jawade R, Patil A, et al. Comparing the antiplaque efficacy of 0.5% Camellia sinensis extract, 0.05% sodium fluoride, and 0.2% chlorhexidine gluconate mouthwash in children. *J. Int. Soc. Prev. Community Dent.* 2015, 5, 218–226.

- [77] Sakanaka S, Shimura N, Aizawa M, et al. Preventive Effect of Green Tea Polyphenols against Dental Caries in Conventional Rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1992, 56, 592–594.
- [78] Goenka P, Sarawgi A, Karun V, et al. *Camellia sinensis* (Tea): Implications and role in preventing dental decay. *Pharm. Rev.* 2013, 7, 152–156.
- [79] Matsumoto M, Hamada S, Ooshima T. Molecular analysis of the inhibitory effects of oolong tea polyphenols on glucan-binding domain of recombinant glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* MT8148. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003, 228, 73–80.
- [80] Ooshima T, Minami T, Matsumoto M, et al. Comparison of the cariostatic effects between regimens to administer oolong tea polyphenols in SPF rats. *Caries Res.* 1998, 32, 75–80.
- [81] Ooshima T, Minami T, Aono W, et al. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with mutans streptococci. *Caries Res.* 1993, 27, 124–129.
- [82] Ooshima T, Minami T, Aono W, et al. Reduction of dental plaque deposition in humans by oolong tea extract. *Caries Res.* 1994, 28, 146–149.
- [83] Papetti A, Pruzzo C, Daglia M, et al. Effect of barley coffee on the adhesive properties of oral streptococci. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 278–284.
- [84] Stauder M, Papetti A, Daglia M, et al. Inhibitory activity by barley coffee components towards *Streptococcus mutans* biofilm. *Curr. Microbiol.* 2010, 61, 417–421.
- [85] Signoretto C, Bianchi F, Burlacchini G, et al. Drinking habits are associated with changes in the dental plaque microbial community. *J. Clin. Microbiol.* 2010, 48, 347–356.
- [86] Daglia M, Papetti A, Grisoli P, et al. Antibacterial activity of red and white wine against oral streptococci. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 5038–5042.
- [87] Sánchez MC, Ribeiro-Vidal H, Esteban-Fernández A, et al. Antimicrobial activity of red wine and oenological extracts against periodontal pathogens in a validated oral biofilm model. *BMC Complement. Altern. Med.* 2019, 19, 145.

- [88] Di Lorenzo A, Bloise N, Meneghini S, et al. Effect of Winemaking on the Composition of Red Wine as a Source of Polyphenols for Anti-Infective Biomaterials. *Materials* 2016, 9, 316.
- [89] Tagashira M, Uchiyama K, Yoshimura T, et al. Inhibition by hop bract polyphenols of cellular adherence and water-insoluble glucan synthesis of mutans streptococci. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1997, 61, 332–335.
- [90] Shinada K, Tagashira M, Watanabe H, et al. Hop bract polyphenols reduced three-day dental plaque regrowth. *J. Dent. Res.* 2007, 86, 848–851.
- [91] Kholkhal W, Ilias F, Traore B, et al. *Salvadora persica*: A rich medicinal plant of polyphenols and alkaloids with biological activity. *Nat. Prod. Indian J.* 2010, 6, 136–142.
- [92] Khalil MA, El-Sabbagh MS, El Naggar EB, et al. Antibacterial activity of *Salvadora persica* against oral pathogenic bacterial isolates. *Niger. J. Clin. Pract.* 2019, 22, 1378–1387.
- [93] Schött G, Liesegang S, Gaunitz F, et al. The chemical composition of the pharmacologically active *Thymus* species, its antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and the antiadherent effects of *T. vulgaris* on the bacterial colonization of the in situ pellicle. *Fitoterapia* 2017, 121, 118–128.
- [94] Yamamoto H, Ogawa T. Antimicrobial activity of perilla seed polyphenols against oral pathogenic bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2002, 66, 921–924.
- [95] Yamaguti-Sasaki E, Ito LA, Canteli VCD, et al. Antioxidant capacity and in vitro prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*. *Molecules* 2007, 12, 1950–1963.
- [96] Matsumoto-Nakano M, Nagayama K, Kitagori H, et al. Inhibitory effects of *Oenothera biennis* (evening primrose) seed extract on *Streptococcus mutans* and *S. mutans*-induced dental caries in rats. *Caries Res.* 2011, 45, 56–63.

- [97] Konaté K, Zerbo P, Ouédraogo M, et al. Anti-nociceptive properties in rodents and the possibility of using polyphenol-rich fractions from *Sida urens* L. (Malvaceae) against of dental caries bacteria. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2013, 12, 14.
- [98] Wittpahl G, Kölling-Speer I, Basche S, et al. The Polyphenolic Composition of *Cistus incanus* Herbal Tea and Its Antibacterial and Anti-adherent Activity against *Streptococcus mutans*. *Planta Med.* 2015, 81, 1727–1735.
- [99] Damiano S, Forino M, Vitali LA, et al. Antioxidant and antibiofilm activities of secondary metabolites from *Ziziphus jujuba* leaves used for infusion preparation. *Food Chem.* 2017, 230, 24–29.
- [100] Dadpe MV, Dhore SV, Dahake PT, et al. Evaluation of antimicrobial efficacy of *Trachyspermum ammi* (Ajwain) oil and chlorhexidine against oral bacteria: An in vitro study. *J. Indian Soc. Pedod. Prev. Dent.* 2018, 36, 357–363.
- [101] Klinké T, Kneist S, De Soet JJ, et al. Acid production by oral strains of *Candida albicans* and lactobacilli. *Caries Res.* 2009, 43, 83–91.
- [102] Farkash Y, Feldman M, Ginsburg I, et al. Green Tea Polyphenols and Padma Hepaten Inhibit *Candida albicans* Biofilm Formation. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2018, 2018, 1690747.
- [103] Farkash Y, Feldman M, Ginsburg I, et al. Polyphenols Inhibit *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* Biofilm Formation. *Dent. J.* 2019, 7, 42.
- [104] Pinna R, Filigheddu, E, Juliano C, et al. Antimicrobial Effect of *Thymus capitatus* and *Citrus limon* var. *pompia* as Raw Extracts and Nanovesicles. *Pharmaceutics* 2019, 11, 234.
- [105] Philip N, Leishman SJ, Bandara H, Walsh LJ. Polyphenol-Rich Cranberry Extracts Modulate Virulence of *Streptococcus mutans*-*Candida albicans* Biofilms Implicated in the Pathogenesis of Early Childhood Caries. *Pediatr. Dent.* 2019, 41, 56–62.

- [106] Yang WH, Deng YT, Kuo MYP, et al. Epigallocatechin-3-gallate blocks triethylene glycol dimethacrylate-induced cyclooxygenase-2 expression by suppressing extracellular signal-regulated kinase in human dental pulp and embryonic palatal mesenchymal cells. *J. Endod.* 2013, 39, 1407–1412.
- [107] Hirao K, Yumoto H, Nakanishi T, et al. Tea catechins reduce inflammatory reactions via mitogen-activated protein kinase pathways in toll-like receptor 2 ligand-stimulated dental pulp cells. *Life Sci.* 2010, 86, 654–660.
- [108] Nakanishi T, Mukai K, Yumoto H, et al. Anti-inflammatory effect of catechin on cultured human dental pulp cells affected by bacteria-derived factors. *Eur. J. Oral Sci.* 2010, 118, 145–150.
- [109] Nakanishi T, Mukai K, Hosokawa Y, et al. Catechins inhibit vascular endothelial growth factor production and cyclooxygenase-2 expression in human dental pulp cells. *Int. Endod. J.* 2015, 48, 277–282.
- [110] Lee DS, Li B, Kim KS et al. Butein protects human dental pulp cells from hydrogen peroxide-induced oxidative toxicity via Nrf2 pathway-dependent heme oxygenase-1 expressions. *Toxicol In Vitro* 2013, 27, 874–881.
- [111] Park SY, Jeong YJ, Kim SH, et al. Epigallocatechin gallate protects against nitric oxide-induced apoptosis via scavenging ROS and modulating the Bcl-2 family in human dental pulp cells. *J. Toxicol. Sci.* 2013, 38, 371–378.
- [112] Mahmoud Hashemi A, Solahaye Kahnamousii S, Aghajani H, et al. Quercetin Decreases Th17 Production by Down-Regulation of MAPKTLR4 Signaling Pathway on T Cells in Dental Pulpitis. *J. Dent.* 2018, 19, 259–264.
- [113] Yonehiro J, Yoshida Y, Yamashita A, et al. Flavonol-containing phosphorylated pullulan may attenuate pulp inflammation. *Int. Endod. J.* 2013, 46, 119–127.

- [114] Wang FM, Hu Z, Liu X, et al. Resveratrol represses tumor necrosis factor α /c-Jun N-terminal kinase signaling via autophagy in human dental pulp stem cells. *Arch. Oral Biol.* 2019, 97, 116–121.
- [115] Lee SI, Min KS, Bae WJ, et al. Role of SIRT1 in heat stress- and lipopolysaccharide-induced immune and defense gene expression in human dental pulp cells. *J. Endod.* 2011, 37, 1525–1530.
- [116] Feng G, Zheng K, Song D, et al. SIRT1 was involved in TNF- α -promoted osteogenic differentiation of human DPSCs through Wnt/ β -catenin signal. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 2016, 52, 1001–1011.
- [117] Atalayin C, Armagan G, Konyalioglu S, et al. The protective effect of resveratrol against dentin bonding agents-induced cytotoxicity. *Dent. Mater. J.* 2015, 34, 766–773. [CrossRef]
- [118] Atalayin C, Tezel H, Ergucu Z, et al. The improvement of biocompatibility of adhesives: The effects of resveratrol on biocompatibility and dentin micro-tensile bond strengths of self-etch adhesives. *Clin. Oral Investig.* 2019, 23, 3213–3218.

Publication associée au chapitre I

« Polyphenols in Dental Applications »

Review

Polyphenols in Dental Applications

Naji Kharouf ¹, Youssef Haikel ^{1,2} and Vincent Ball ^{1,2,*}

¹ Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Strasbourg, 8 rue Sainte Elisabeth, 67000 Strasbourg, France; dentistenajikharouf@gmail.fr (N.K.); youssef.haikel@unistra.fr (Y.H.)

² Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche 1121, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg, France

* Correspondence: vball@unistra.fr; Tel.: +33-667-522-841

Received: 11 June 2020; Accepted: 3 July 2020; Published: 7 July 2020



Abstract: (1) Background: polyphenols are a broad class of molecules extracted from plants and have a large repertoire of biological activities. Biomimetic inspiration from the effects of tea or red wine on the surface of cups or glass lead to the emergence of versatile surface chemistry with polyphenols. Owing to their hydrogen bonding abilities, coordination chemistry with metallic cations and redox properties, polyphenols are able to interact, covalently or not, with a large repertoire of chemical moieties, and can hence be used to modify the surface chemistry of almost all classes of materials. (2) Methods: the use of polyphenols to modify the surface properties of dental materials, mostly enamel and dentin, to afford them with better adhesion to resins and improved biological properties, such as antimicrobial activity, started more than 20 years ago, but no general overview has been written to our knowledge. (3) Results: the present review is aimed to show that molecules from all the major classes of polyphenolics allow for low cost improvements of dental materials and engineering of dental tissues.

Keywords: polyphenols; interactions with collagen; dentin; enamel; dental resins; antibacterial activity

1. Introduction

The entry point for nutrients and food in the body is the oral cavity. Tea and some plants contain natural polyphenols [1]. Polyphenols are secondary metabolites defined by the presence of a minimal number of phenol groups [2,3]. Polyphenols play an interesting role in the oral cavity against many diseases, infections, and oral cancers [4]. This is because they have significant features such as antibacterial activities [5], antioxidant effects [6] in the oral cavity. More recently, many investigations have shown that polyphenols can serve as “processing cofactors” to improve mechanical and functional properties of biomaterials [7]. For the same reasons, they are used in many dental applications. In this study, we focus on the most important polyphenols used in dental applications as tannic acid, catechin, resveratrol, gallic acid, and epigallocatechin gallate (Figure 1). Our review is aimed to complete the article written by Catapano-Martinez et al., which described the benefit of polyphenols from food for the dental health [8]. Herein we will not only focus on antibacterial applications but also on the use of polyphenols to improve the adhesion between adhesives and dentin or enamel as well as their role in remineralization processes.

As a starting point, in addition to their structure dependent properties, many polyphenols spontaneously adhere to the surface of almost all known materials [9] allowing to use them in a vast repertoire of materials functionalization strategies. Those possible post-functionalizations rely on the chemical versatility of polyphenols able to undergo acid-base reactions, oxidation processes, chemical reactivity with nucleophiles in the oxidized state, and also chemical coordination with metallic cations [10]. In particular, polyphenols are able to interact with biological and synthetic macromolecules in either a non-covalent or a covalent manner [11]. We build our description of the

dental applications of polyphenols based on their well-accepted classification between condensed and hydrolysable polyphenols [10]. Concerning the different subsections describing the application of each class of polyphenols we rely mostly on the anatomy of the teeth and their contact area with saliva concerning their antibacterial activity.

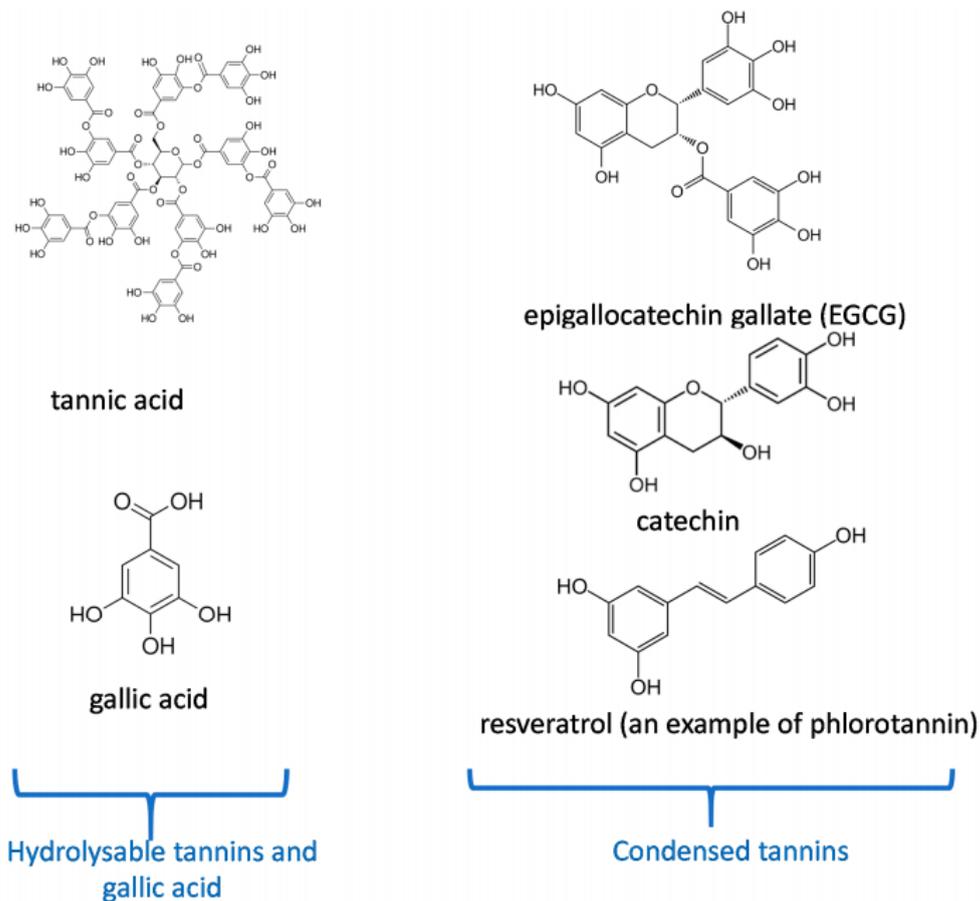


Figure 1. Chemical structure of the most important polyphenols used in dentistry according to their classification [10].

The purpose of this article is to review the literature in which polyphenols were used in dental treatments and engineering. Our literature review relies on PubMed to identify the articles with the following key search sentences: polyphenols from plants and drinking habits in dental caries, polyphenols in enamel, dentin, root canal and, dental pulp treatments, polyphenols in dental adhesives and cements. At purpose, the review is organized with respect to the different applications of polyphenols in the oral cavity and with respect to the big polyphenol families, each one having its chemical and biological specificities [10]. Condensed polyphenols are stable in water but contain a lower fraction of adjacent hydroxyl groups and are often less active for a given chemical interaction than their hydrolysable counterparts, dense in 1,2 diols, but prone to hydrolysis and, hence, fast degradation in water. We will also address the dental applications of polyphenol mixtures. However, it will be apparent that some investigations were devoted to study different kinds of the dental applications, rendering our classification arbitrary in some aspects. We decided to describe the major application of a given investigation in the subsection where the study gave the more pertinent results without neglecting to describe the other applications of the used polyphenol/polyphenol mixture.

2. Condensed Polyphenols

In this section, we will describe the different major dental applications of condensed polyphenols based on flavonoids and on phlorotannins, such as resveratrol, emphasizing on the mechanism of their action as well as on the effective concentration range.

2.1. Dentin Modifier, Dentin Pretreatment, Collagen Cross-Linking, and Resin-Dentin Stability

Dentin is the substance located under the enamel layer. It contains essentially hydroxyapatite crystals and a collagen matrix [12,13]. Collagenase and different protease enzymes (Cysteine cathepsins and matrix metalloproteinases) have been reported to cut collagen chains and are responsible for collagen degradation [14,15]. The adhesion of an adhesive-resin material to dentin depends on the formation and the stability of a hybrid zone (zone where the resin infiltrates into the collagen fibrils of the dentin matrix) that forms a micromechanical interlocking between the resin and the dentin matrix [16]. Therefore, the stabilization of collagen in dentin and in the hybrid layer is possible by preventing the hydrolytic and enzymatic degradation catalyzed by the matrix metalloproteinases and the Cysteine cathepsins.

Proanthocyanidins are secondary class of non-hydrolysable plant metabolites used to pretreat dentin, to enhance its mechanical properties and to reduce the collagen digestion. Thus, proanthocyanidins are a clinical agent for dentin bio-modification [17,18]. The monomeric polyphenolic unit in proanthocyanidins interacts with collagen I, essentially with proline residues, to provide a stable interaction between the resin and dentin for 12 months. The stability of this interaction with time is due to a reduced biodegradation of the dentin matrix with low collagen digestion [19]. Tang et al. [20] showed that the use of 15% "w/v" of grape seed extract (GSE), which contains proanthocyanidins, in contact with demineralized dentin protects the collagen matrix against degradation. They reported that using a solution with 15% of GSE for a 2 min treatment promotes the dentin remineralization rate and forms mostly hydroxyapatite crystals.

A comparison between three polyphenol solutions (at 50 g/L), quercetin, proanthocyanidins and baicalein, showed that the baicalein has the highest effect in the protection of the dentin matrix against collagenase digestion [21].

The formation of polyphenol induced cross-links in the collagen matrix provides cohesion and makes it more resistant to degradation [22].

Liu et al. [23] reported that using 1% "w/w" of grape seed extract ((+)-catechin, (-)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin, (-)-epicatechin gallate, (-)-epigallocatechin gallate, procyanidin B2, and a pCT-pCT dimer) for 1 min stabilizes the demineralized dentin and provides the cross-linked dentin-collagen complex.

The strong interactions with collagen have necessarily some effect on the mechanical properties of dental tissues: indeed oligomeric proanthocyanidins enhance the elastic modulus of dentin, [24,25]. Concerning the resistance of enamel to dental abrasion was made using mammals' teeth [26]. Using a hardness test (Vickers indenter), it was shown that saliva containing polyphenol compounds (0.1 M epigallocatechin gallate) in contact with the enamel surfaces showed a greater resistance against abrasion than the enamel put in contact with saliva without added polyphenols.

In addition to the intrinsic mechanical properties of dental tissues, their interaction with other materials, such as resins, needs to be improved. To that aim, dental restorations require tooth surface preparation, this preparation creating a layer of dentinal debris called the "smear layer". Acid conditioners of dentin are recommended to achieve a clean dentin surface to subsequently provide the required bond strength [27–29].

Epigallocatechin-3-gallate (ECGC) solutions with different concentrations (0.02, 0.1, and 0.5% w/v) were used in dentin pretreatment followed by etch-and-rinse adhesive [30]. The dentin treated with a concentration of 0.5% showed a lower bond strength for resins after one day than dentin treated with solutions at the other concentrations. In contrast, dentin treated with all the polyphenol concentrations preserves its bond strength values for resins during 6 months [30]. Accordingly, Singh et al. [31] reported

that dentin treated with ECGC at 0.1% *w/v* preserves the bond strength for 6 months in an etch-and-rinse adhesive system. Contrarily, different concentrations of EGCG (0.02, 0.2 and 0.5% *w/v*) followed by two-step etch-and-rinse adhesive system had not preserved the bond strength for 1 year of storage in water [32]. These authors reported that the pretreatment with ECGC could reduce the nanoleakage of the resin-dentin interface in time hence reducing the bond strength values. Costa et al. [33] compared the effect of 0.1% of ECGC and 2% *w/v* of chlorhexidine as dentin pretreatment to a self-etch system. They demonstrated that the ECGC did not affect the bond strength. The dentin having undergone chlorhexidine pretreatment showed lower values of bond strength after 24 h and 6 months of ageing in water. Another study compared the effect of 0.2 M ECGC and 0.2 M catechin as dentin pretreatment for 1 h in self-etch and rinse-and-etch systems [34]. ECGC treated samples revealed a higher bond strength compared with catechin treated samples due maybe to the higher number of hydroxyl groups in ECGC (Figure 1), thus the ability to establish more hydrogen bond interactions.

ECGC enhances the bond strength of fiber post (a direct restorative dental material) bonded with adhesive-resin and cemented with dual-cure composite resin cement to intraradicular dentin which was treated with sodium hypochlorite. In this study, a push-out test was used to evaluate the bond strength. The authors demonstrated that using an ECGC solution at 400 µg/mL for 1 min as the final irrigation in intraradicular dentin, treated with sodium hypochlorite, increased the push-out strength and bond stability of fiber post for a self-etching and an etch-and-rinse adhesive system [35]. Accordingly, in the study of Pheenithicharoenkul et al. [36], the use of a 1 mg/mL ECGC solution (for 10 min) or ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) at 17% *w/v* (for 5 min), followed by ECGC (for 5 min) as the final canal irrigation, demonstrated a higher bond strength than the use of EDTA alone or EDTA with sodium hypochlorite without ECGC in the final canal irrigation solution.

Bonding the dental restoration to the structure of the tooth becomes a routine in dental practice and requires various properties, such as a good sealing, high bonding strength to tooth surfaces, durability over time, low toxicity, and low degradation rate [37–39].

Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) is a polyphenol which has antibacterial and antioxidant activities [40,41] as will be described in Section 2.3. In addition to those properties, EGCG was incorporated in dental adhesive-resins for its inhibitory effects of matrix-metalloproteinases (MMPs) and cysteine cathepsins. Indeed, those proteins are major players in the degradation and perturbation of the resin-dentin interface [42,43].

At concentrations of 0.5% and 1% (*w/v*), EGCG incorporated in an adhesive resin could increase the bond strength values and the longevity of adhesive-dentin bond for 6–12 months [44,45]. In contrast to the previous investigation, the addition of 0.01 and 0.1% (*w/v*) of EGCG to adhesive-resin compounds did not affect the resin-dentin bond, but could reduce the solubility of the adhesive-resin in water [42]. Yu et al. [46] showed that EGCG, in addition to its antibacterial activity, increases the bond strength of root canal sealer to dentin. This result was obtained using a push-out test after a thermocycling procedure (5000 cycles).

The dental adhesive-resin incorporates many toxic compounds such as Bis-GMA, TEGDMA, and Bis-phenol A [47]. Fonseca et al. [43] demonstrated that the presence of 0.5–1% (*w/w*) of EGCG in the adhesive-resin could reduce the toxicity, reduce the solubility and the water sorption of this adhesive. These concentrations (0.5–1%) could maintain the hybrid layer and preserve the bond strength over time.

Glass ionomer cements were also blended with 0.1% (*w/w*) EGCG to improve their antibacterial activity and to increase their mechanical properties such as the flexural strength and the hardness [48].

Dental adhesive-resins were also modified with quercetin, which is known as an amphiphilic antioxidant. The addition of 500 µg/mL quercetin to dental adhesive could give an antibacterial effect and preserve its bond strength by inhibiting the collagenase activity [49].

Gotti et al. [50] analyzed the effect of the addition of 5% (*w/w*) quercetin to a two-step etch-and-rinse, two-step self-etch and one step self-etch adhesive system on bond strength durability to dentin surfaces after two storage periods in water (24 h and 6 months). They demonstrated a negative effect on the

bond strength of these adhesives after 24 h. In contrast, for a 6 months storage period, the two-step etch-and-rinse and the two-step self-etch adhesive systems incorporating quercetin increased the bond strength, whilst the one step self-etch adhesive incorporated with quercetin maintained the bond strength durability.

2.2. Remineralization, Cell Viability, and Differentiation

ECGC and epicatechin gallate (ECG) (10 mmol/L) did not affect the dental pulp cells viability [51].

Similarly, Lim et al. [52] reported that epicatechin (0.01, 0.05, or 0.1 mM) as a collagen cross-linker did not affect the cell viability and induced a positive effect on the proliferation and differentiation of human dental pulp cells.

Three flavonoids (quercetin, genistein, and baicalin) and phenamil -an osteoblast differentiation molecule- were used to test their cytotoxicity and their osteoblast differentiation activity on dental human cells [53]. The used concentrations, ranging from 1 to 25 μ M, did not alter the cell viability. Among the three tested polyphenols, phenamil had the strongest influence on alkaline phosphatase activity. In contrast, this in vitro study demonstrated that quercetin had a superior effect to phenamil in the osteogenic differentiation.

Osteoclasts and osteoblasts play an important role in orthodontic tooth movements. These movements could produce complications, such as root resorption. Liu et al. [54] used two doses of resveratrol (5 mg/kg/day and 10 mg/kg/day) to evaluate its effect on the orthodontic tooth movement and root resorption. This study, performed on rats, demonstrated that resveratrol could inhibit tooth movement during orthodontic treatment and reduce the rate of root resorption during orthodontic therapy as described in (Figure 2). This investigation also showed that resveratrol promotes the osteoblastic activity and reduces the osteoclastic activity during orthodontic therapy. Therefore, resveratrol application during orthodontic therapy could be used as a novel approach to prevent undesired tooth movement (anchorage or relapse).

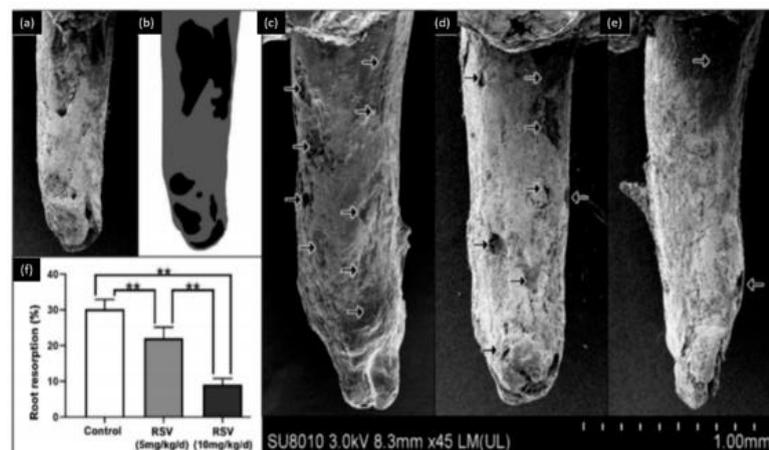


Figure 2. Observation of root resorption. (a) SEM image of the tooth, (b) root resorption area (black) and the total surface area (grey), (c) representative SEM pictures of the control group, (d) 5 mg/kg/d resveratrol group, (e) 10 mg/kg/d resveratrol group, (f) the resorption ratio of the three groups were calculated by dividing the surface of black area by the grey area. (** $p < 0.01$, $n = 6$). Modified from ref. [54] with authorization.

Tooth development may be perturbed during exposure to high-energy radiations. Barbosa et al. [55] used resveratrol, as a radioprotector, on rats to analyze its effect. Each rat received 100 mg/kg of resveratrol. Barbosa et al. concluded that this dose of resveratrol had no radioprotective effect on the dental tooth structure.

2.3. Antibacterial Activity

It has first to be emphasized that the antibacterial activity of polyphenols is related to a combination of mechanisms: implying the inhibition of enzymes implied in the bacterial metabolism as well as the change in the redox balance in the bacterial cell (owing the possible oxidation of catechol groups in quinones) and the reduction in the concentration of metallic cations due to complexation by polyphenolics [10].

Xu et al. [56] showed that a concentration of 31.25 µg/mL of epigallocatechin gallate from green tea inhibits the glucosyltransferase activity of *Streptococcus mutans* and 15.6 µg/mL of the same molecule inhibits 90% of *S. mutans* biofilm formation.

Among condensed polyphenols contained in tea, (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) binds to alpha-amylase, which is a salivary enzyme that catalyzes the breakdown of starch. EGCG could inhibit the activity of alpha-amylase by non-competitive inhibition. The antimicrobial activity of EGCG against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* was showed at concentrations higher than 0.5 mg/mL [57].

In the study of Feng et al. [58], the most abundant polyphenols isolated from green tea were catechin and 1,4,6-tri-O-galloyl-βD-glucose. Catechin derivatives as galocatechin gallate (0.32 mM) and epigallocatechin gallate (0.31 mM) were able to inhibit *S. mutans* glucosyltransferases.

Melok et al. [59] showed that the use of 250 µg/mL of epigallocatechin-3-gallate- stearate, which is an esterified derivative of epigallocatechin-3-gallate could completely inhibit *S. mutans* growth and biofilm formation. Using scanning electron microscopy, they evidenced the antibacterial effect of epigallocatechin-3-gallate-stearate after four days of treatment (Figure 3).

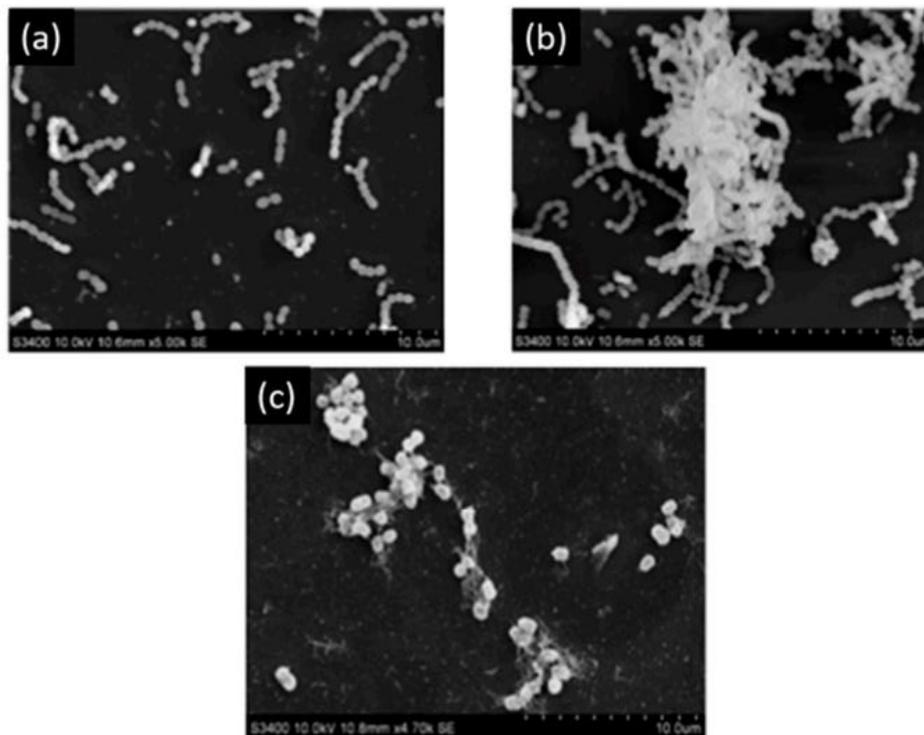


Figure 3. Scanning electron microscopy of *S. mutans*. (a) Control; (b) untreated *S. mutans* cells after 4 days; (c) *S. mutans* cells treated with 250 µg/mL of epigallocatechin-3-gallate-stearate after 4 days. Modified from Ref. [59] with authorization.

EGCG was used as an antibacterial agent against *Enterococcus faecalis* biofilms, which are associated with persistent root canal infections [60]. The minimum inhibitory concentration of EGCG against

E. faecalis was equal to 5 µg/mL. Lee et al. reported that a concentration of 500 µg/mL applied for 7 days completely eradicated the *E. faecalis* biofilm [60].

EGCG was added to dental restorative composites to afford this material with an antibacterial activity [61]. The addition of 700 µg/mL of EGCG reduces the viability of *S. mutans*.

To provide some comparative data, Kwon et al. [62] compared the effects of two antibacterial agents and of two cross-linkers (EGCG and glutaraldehyde) on cell viability, odontogenic differentiation, and proliferation of dental pulp cells, and antibacterial activity in collagen scaffolds. The results revealed that the cell viability is reduced in the presence of glutaraldehyde (0.1, 1, 10, and 100 µmol/L) compared with the presence of ECGC (0.1, 1, 10, and 100 µmol/L). In the presence of the highest ECGC concentrations (10–100 µmol/L), the cell viability was nevertheless reduced. It was also concluded that ECGC did not promote the odontogenic differentiation and proliferation by itself but facilitated these processes. The cross-linked collagen produced in the presence of ECGC showed a shorter setting time, a higher compressive strength and a rougher surface. Equal concentrations of ECGC and glutaraldehyde reduced the growth of *S. mutans*.

Another study showed that 200 µg/mL and 300 µg/mL of EGCG have an inhibitory effect on the growth of *S. mutans* (Figure 4) and increase the bond strength of the resin to dentin surface. EGCG also preserves the durability of the bond strength for six months [63]. Hence, this investigation is prototypical of the multi-functionality of EGCG in dental applications.

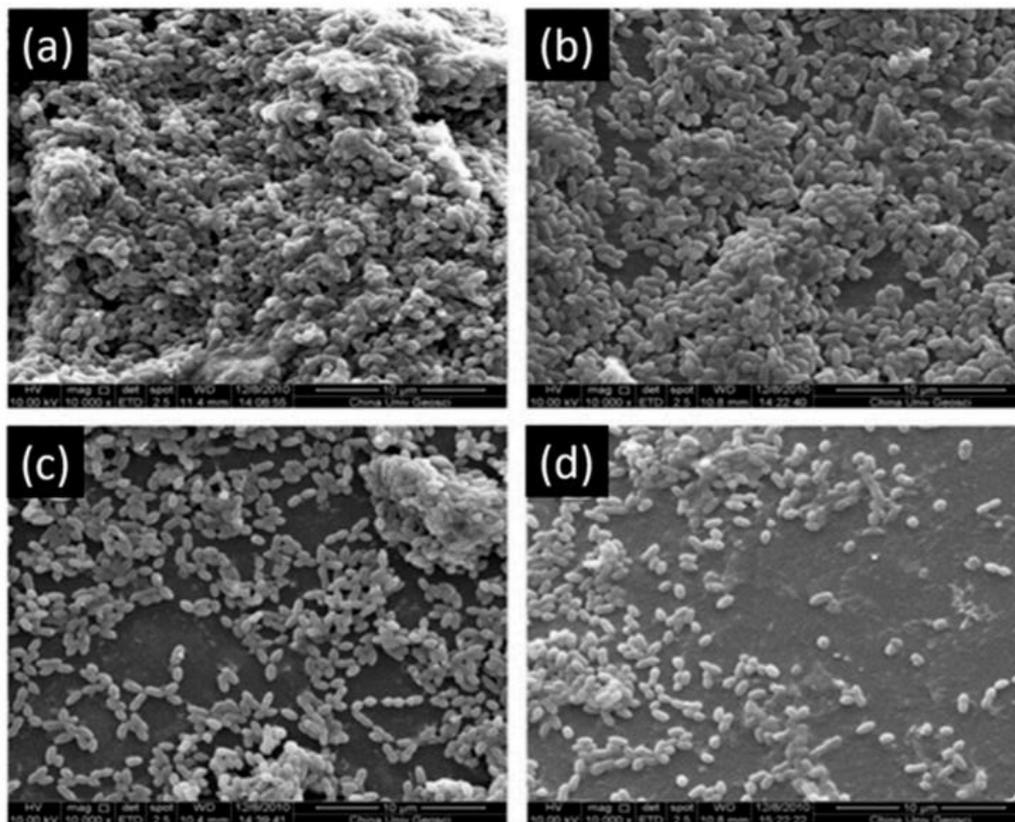


Figure 4. Scanning electron microscopy of *S. mutans* accumulation on specimens. (a) Adhesive resin surface without epigallocatechin-3-gallate (EGCG); (b) ECGC 100 µg/mL; (c) ECGC 200 µg/mL, (d) ECGC 300 µg/mL. Biofilms accumulated on (c) and (d) were not compact after 24 h incubation. Modified from ref. [63] with authorization.

2.4. Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity

Methacrylate resin-based materials contain triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA), which induces the expression of cyclooxygenase-2. This TEGDMA-induced cyclooxygenase-2 plays a role in dental pulp diseases and pulpitis. The cyclooxygenase-2 activity could be suppressed in the presence of 10 and 15 $\mu\text{mol/L}$ of ECGC [64].

Catechins, including epicatechin gallate and epigallocatechin gallate were used to reduce and inhibit the inflammatory factors, which are found in inflamed pulp [65]. In the study of Hirao et al., two catechin concentrations were used (10 and 50 $\mu\text{g/mL}$) to show that this polyphenol did not affect the viability of the human dental pulp fibroblast cells. Hence, catechins inhibited the effect of interleukins (IL-8 and -6), of monocyte-chemoattractant proteins and of prostaglandins which are receptors stimulating the pro-inflammatory mediators. Contrarily, high concentrations of epigallocatechin gallate (50 $\mu\text{g/mL}$) did not inhibit the production of prostaglandins in pathogen-associated molecular patterns simulated human dental pulp fibroblasts. Therefore, catechin has an anti-inflammatory effect due to its activity on the inhibition of the cytokines and chemokines in human dental pulp fibroblasts modified with caries-related *S. mutans*, *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus salivarius*, and pathogen-associated molecular patterns. Accordingly, Nakanishi et al. [66] showed the benefits of using epicatechin gallate (ECG) and epigallocatechin gallate (ECGC) to inhibit the expression of pro-inflammatory cytokines and adhesion molecules in human dental pulp cells.

Similarly, ECGC and ECG (dissolved at 20 and 50 $\mu\text{g/mL}$) reduced the up-regulated expression of vascular endothelial growth factors and cyclooxygenase-2 which are induced pro-inflammatory cytokines in dental pulp cells simulated with lipopolysaccharide (LPS), peptidoglycan (PG), interleukin-1b (IL-1b), or tumor necrosis factor- α (TNF- α) [67].

Wang et al. [51] also demonstrated that the anti-inflammatory activity of ECG and ECGC proceeds through the inhibition of the activity of nuclear factor-kappa B (NF- κB).

Reactive oxygen species (ROS) caused by pulp diseases and dental bleaching agents generate oxidative stress [68]. Park et al. [69] reported the effect of ECGC (5–50 μM) against nitric oxide-induced toxicity of human dental pulp cells which is driven by the ROS production. The Bcl-2 cell family contains anti- and pro-apoptotic proteins, which are important moderators in regulating cell death. In this context, ECGC scavenges the ROS and regulates the expression of the Bcl-2 family preventing the nitric oxide-induced apoptosis.

ROS can also be quenched by butein, which is a plant polyphenol and one of the most active compounds of the *Rhus Verniciflua* plant found in East Asian countries [68]. The study of Lee et al. demonstrated that butein quenches the ROS and suppresses the toxic effects of hydrogen peroxide, which is used as a bleaching agent. The concentrations of butein (2.5–20 μM) had no toxic effect on the dental pulp viability. The maximal heme oxygenase-1 protein expression and heme activity, which exhibit many cytoprotective effects and remove pro-oxidant heme molecules, were attained after 18 h of butein exposure to human dental cells. Nuclear accumulation of nuclear factor-E2 caused by butein treatment increased the promoter activity of antioxidant response elements. Therefore, butein can prevent functional dental cell death and could be used as a protective agent in dental pulp diseases.

Mahmoud Hashemi et al. [70] evaluated the effect of adding 0.5 mg/mL of quercetin to simulated T cells extracted from pulpitis with high mobility group box 1 (HMGB1). They demonstrated that quercetin can decrease pro-inflammatory cytokines such as interleukin-6 and -1 β with blocking high mobility group box 1 and inhibiting the mitogen activated protein kinase (MAPK) signaling pathway.

Luteolin (used at 35 $\mu\text{mol/L}$) is also a polyphenol from the flavonol family and was combined with phosphorylated pullulan to decrease the production of inflammatory cytokines [71]. It was reported that the combination of both compounds was less efficient than luteolin alone. This may be due to some strong interactions between both compounds reducing the concentration of available polyphenol.

Concerning resveratrol, a member of the phlorotannin subclass of condensed polyphenols (Figure 1), it was shown to inhibit interleukin (IL-8 and -6) and suppresses the c-Jun N-terminal Kinase (JNK) signaling pathway in dental pulp cells simulated by tumor necrosis factor α (TNF α).

TNF α is one of the cytokines that initiates the natural inflammatory response in the dental pulp. In contrast, resveratrol did not inhibit the degradation of I κ B α nor the phosphorylation and nuclear translocation of p65 NF- κ B in TNF α treatments. The results of this study allowed to hypothesize that resveratrol can be beneficial to decrease pulpal damage during the severe phase of inflammation in vital pulp [72]. Another study reported that using resveratrol at a concentration up to 50 μ M had no toxic effect on dental pulp stem cells [73]. Resveratrol raises the activity of Sirtuin 1 (stress-activated nicotinamide adenine dinucleotide-dependent protein deacetylase), which is a mediator of the immune and defense genes in human dental pulp cells [74]. Resveratrol (at 5 μ mol/L) activates the function of Sirtuin 1, which can promote the osteogenic differentiation of dental pulp stem cells in inflammation microenvironment through Wnt/ β -catenin signal [75].

Resveratrol was added to adhesive-resin materials to promote the biocompatibility of these adhesive-resins, and to reduce the oxidative stress of L929 mouse fibroblast cells without decreasing the bond strength to dentin [76,77].

3. Hydrolysable Tannins and Gallic Acid

3.1. Dentin Modifier, Dentin Pretreatment, Collagen Cross-Linking, and Resin-Dentin Stability

Four dentin bio-modifiers extracted from different plants were compared such as hydrolysable tannins from Aroeira, condensed tannins from grape seed with cardol and cardanol from cashew nut shell liquid. The results demonstrated that the four groups achieved cross-linking in dentin matrix after 1 min of treatment and the best bio-modifiers were cardol and cardanol [78].

Tannic acid forms stable cross-links with exposed collagen fibrils allowing to increase the resistance against their degradation process [79]. Bedran-Russo et al. [22] reported that solutions containing 10% and 20% (*w/v*) of tannic acid could increase the stiffness of demineralized dentin and reduce the enzymatic degradation of collagen most probably due to hydrogen bonds between the biopolymer and tannic acid (TA).

A successful dental root canal treatment depends on various factors such as proper cleaning, and tridimensional filling of the root canal system. The removal of the smear layer and the disinfection of the root canal system is of prime importance during the endodontic therapy [80,81].

Bitter [82] analyzed the effect of using hydrogen peroxide and sodium hypochlorite followed by a solution containing 25% (*w/v*) of tannic acid as the final irrigation solution in dental root canal. This study showed that using tannic acid in the final irrigation fluid revealed a smoother and cleaner pulp chamber surface compared with hydrogen peroxide and sodium hypochlorite treatment without tannic acid as final irrigation solution. In addition, Bitter [83] showed that using a 25% (*w/v*) solution of tannic acid in contact for 60 s removed the smear layer without broadening the orifice of dentinal tubules, and removed partially the organic material of the dentinal tubules.

The same group reported that dentin treated with tannic acid had an improved resistance to collagenase degradation [84]. In contrast, another study demonstrated that the application of solutions containing 15, 20, and 25% (*w/v*) of tannic acid on dentin surfaces for 5, 10, or 15 min could not totally remove the smear layer owing to the astringent action of tannic acid. They reported that tannic acid itself attached to collagen by means of hydrogen bonds [85]. Different concentrations of tannic acid (2, 5, 10, 15, 20, and 25% (*w/v*)) were applied on dentin surfaces for different times (15, 30 and 60 s) [86]. These researchers reported that a low concentration of tannic acid (2 or 5% (*w/v*)) applied for 60 s could remove the smear layer, leaving the orifices of dentinal tubules occluded. The dentinal surface that was treated with 20% or 25% (*w/v*) of tannic acid for 15s revealed incomplete removal of the smear layer and exposure of some of the dentinal tubules. Accordingly, Bitter [84] tested the permeability of methylene blue in 62 dentinal cavities treated with solutions containing 25% (*w/v*) of tannic acid for 15 s. Their results showed that 48 over 62 cavities did not allow for the penetration of methylene blue into the dentinal tubules.

A glass ionomer was blended with 1.5%, 5%, and 10% (*w/w*) tannin-fluoride preparation; the 1.5% preparation increased the bond strength of glass ionomer to dentin after one day. The bond strength of

glass ionomer modified with tannin-fluoride preparation did not reveal a significant difference after one month [87].

Tannic acid incorporated in polycarboxylate cement, as well zinc fluoride, enhances the resistance of dentinal collagen to collagenase and proteolytic enzymes [88].

The dentin fluid flow is the main cause of dentin hypersensitivity, which was reduced by using gallic acid/Fe⁺³ complexes (aqueous solutions of FeCl₃ (1.2 × 10⁻³ M) and gallic acid (0.47 × 10⁻³ M)), which performed for four repeated treatments each lasting over 60 s [89]. This kind of catechol-iron complex is able to deposit on the surface of all known materials [90]. Oh et al. [89] showed that the pyrogallol group of gallic acid binds to dentin and Fe⁺³ ions create stable cross-linked complexes in an aqueous environment. Their scanning electron microscopy observations showed that dentin treated with gallic acid/Fe⁺³ complexes create tight bridge like connections between adjacent peritubular dentin, which resulted in less outward flow. Another complex that is fluoride-tannin acid-lanthanum-apatite was used to reduce the dentinal hypersensitivity [79]. The surfaces of the treated samples were completely covered with fine spherical compounds, and the dentinal tubules were occluded with materials (Figure 5).

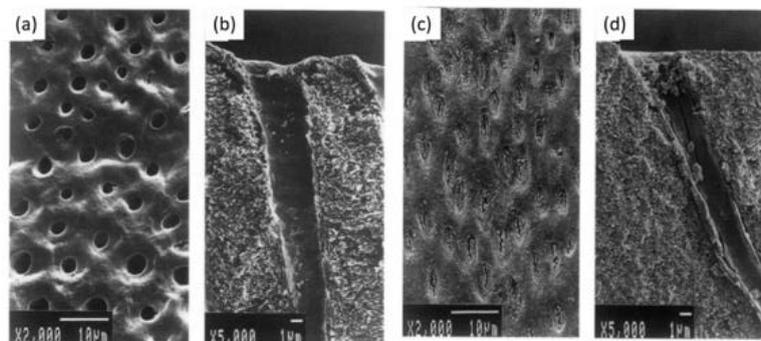


Figure 5. (a,b) Scanning electron micrographs of dentin hypersensitivity, (c,d) scanning electron micrographs of dentin treated with fluoride-tannin acid-lanthanum-apatite. Modified from ref. [79] with authorization.

Three different antioxidants (solutions containing 10% gallic acid, 10% tannic acid, and 10% ascorbic acid “w/v”) were used to irrigate the root canal and to evaluate the infiltration of resin sealer in dentinal tubules [91]. The application of gallic acid for 10 min showed the best penetration of resin sealer into dentinal tubules, maybe due to the presence of three vicinal hydroxyl groups in its structure (Figure 1).

Gallic acid, a polyphenol made from a single aromatic ring (Figure 1) improved its inhibitory effect on matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins to improve the durability of bond strength [18]. In contrast, it reduced the mechanical properties of adhesive-resin such as biaxial flexural strength and hardness values [92].

3.2. Remineralization, Cell Viability, and Differentiation

The structure of enamel is an essential portion of the tooth, which is exposed in the oral cavity. It is the hardest and most mineralized tissue of the body [93,94]. Salivary pellicles composed of adsorbed macromolecular compounds delivered from saliva, blood, gingival fluids, bacteria, molecules and particles from the diet [95], *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) and other oral bacteria adhere on the surface of enamel. All these substances and particles demineralize this surface resulting in the formation of dental caries [96–98]. To reduce the severity of such processes, gallic acid, present in various food and plants can inhibit the enamel demineralization as a calcium chelator and can enhance the remineralization of the demineralized enamel. Thus, gallic acid is a promising agent for enamel

remineralization and caries treatments [99,100]. Gallic acid was also used to re-mineralize the early carious enamel, to increase the surface microhardness and simultaneously to reduce the wear resistance of enamel [101].

Enamel is mostly composed of mineral, approximately 96% in weight. Owing to its strong chelation ability with Ca^{2+} cations, gallic acid (GA) was previously used to enhance the remineralization of demineralized enamel [99,100]. Gallic acid (4 g/L) was used to induce the formation of hydroxyapatite (HAP) [102]. It was shown that gallic acid participates in hydroxyapatite formation, limits the crystal growth mainly along the [002] direction and changes the crystal morphology and size. GA-HAP crystals were smaller than the HAP crystals obtained in the absence of polyphenol. The crystal morphology was observed by scanning electron microscopy (Figure 6). It was found that GA-HAP had an urchin-like shape, while loose needle-like crystals were found in HAP formed without additive.

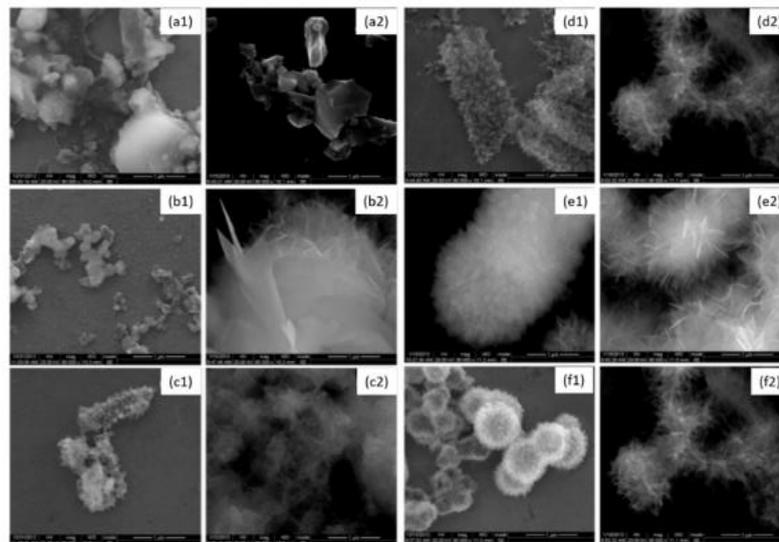


Figure 6. Morphology of hydroxyapatite (1) and hydroxyapatite + gallic acid (2) crystals at different times; (a) = 3 h, (b) = 12 h, (c) = 24 h, (d) = 3 days, (e) = 7 days, (f) = 14 days at 80,000× magnification. Modified from ref. [102] with authorization.

Accordingly, the same authors [103] investigated the morphology and the size changes of crystals as function of the GA concentration (0.05 to 4 g/L). They reported that increasing the concentration in GA reduced the crystal size from 40 to 25 nm. This is the result of gallic acid adsorption on specific crystal faces inhibiting further crystal growth.

3.3. Antibacterial Activity

Apacaries gel is a material containing polyphenols from mangosteen extracts and papain as an enzyme [104]. This gel, including polyphenolic compounds, such as gallic acid, which have antibacterial effects, could play an interesting role in the removal of various tissues.

3.4. Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity

In addition to its potent Ca^{2+} chelator activity, gallic acid is a very active phenolic acid with a high free radical scavenging activity [91].

Surprisingly, it appears that the antibacterial and anti-inflammatory activities of hydrolysable polyphenols were less investigated in the dental field than for their condensed counterparts. This may well be due to their instability in aqueous solutions.

4. Polyphenol Mixtures

4.1. Dentin Modifier, Dentin Pretreatment, Collagen Cross-Linking, and Resin-Dentin Stability

Quercetin and resveratrol or a mixture of both were used for dentin pretreatment to promote and stabilize the resin-dentin bond [105]. Different concentrations were used (100, 250, 500, or 1000 µg/mL) for 60 s followed by a two-step etch-and-rinse adhesive. The adhesion measurements were made after immersion in water for 1 day and four months, and revealed that the resveratrol and the 1:1 resveratrol-quercetin mixture had the best performance after 4 months. Resveratrol pretreatment showed lower bond strength values than quercetin after 1 day, due probably to its variety of antioxidative mechanisms. Therefore, the polyphenol mixtures used in this study demonstrated a protective effect on the dentin collagen matrix [105].

4.2. Remineralization, Cell Viability, and Differentiation

Green tea polyphenols (TP) mixed with nano-sized calcium phosphate particles (TP-CaP) were used in enamel caries lesions [106]. Various TP concentrations (0, 1.2, 12, 18, and 27 mg/mL) were used in the crystal syntheses. The highest concentration (12–27 mg/mL) changed the structure and the crystal size from microsized platelets with porous faces to nano-sized globular particles. The results of this study also showed that adding tea polyphenols to calcium phosphate particles provide an antibacterial effect and enhance the remineralization process. Therefore, this TP-CaP composite could be a promising additive in toothpastes.

Galla chinensis compounds are polyphenols exhibiting an antioxidant and antibacterial activity [107]. Their study compared the effect of 4000 mg/L of *Galla chinensis* extract with deionized water or a remineralizing solution on the subsurface root lesions and erosive root lesions. They demonstrated that the *Galla chinensis* extract enhances the remineralization of root lesions (Figure 7) more than deionized water or a remineralizing solution containing 1.5 mmol/L CaCl₂, 0.9 mmol/L KH₂PO₄, 130 mmol/L KCl, 1 mmol/L NaN₃, and 20 mmol/L HEPES buffer. The *Galla chinensis* extract also inhibits the activity of collagenase and protects the collagen fibers against enzymatic degradation [107].

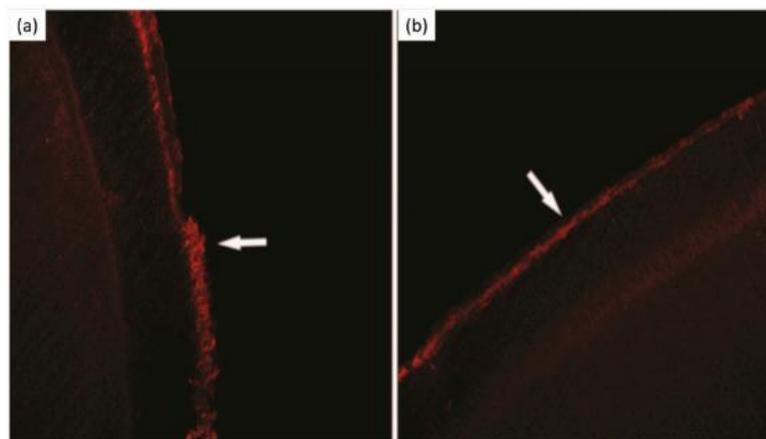


Figure 7. Laser scanning confocal microscopy micrographs. (a) Subsurface lesion, (b) subsurface lesion after *Galla chinensis* extract treatment. Modified from ref. [107] with authorization.

4.3. Antibacterial Activity

The oral cavity contains around 750 kinds of bacteria in dental plaques. These bacteria are responsible for dental diseases such as dental caries [108]. Dental caries have been considered the most polymicrobial diseases in the oral cavity [109]. Oral Streptococci, especially *Streptococcus mutans*

(*S. mutans*) have been implicated and considered as the main cause and the most cariogenic agent of dental caries in humans [59,96]. These bacteria excrete carbohydrates, such as glucose and sucrose metabolized in organic acids by glucosyltransferases and generate stable biofilms, which affect the mineralized dental surfaces [97,98]. Several studies analyzed the effects of different food components, drinks, and plants containing polyphenol groups in order to prevent the dental decay [109,110]. For instance, tea and cranberry are very rich in polyphenols [111].

Tea is the most popular drink in the world including black, green and oolong teas, which are produced from the plant *Camellia sinensis* [112]. Tea is rich in polyphenols, which have antifungal activities, antibacterial and antioxidant activities, and inhibitory effects on some oral pathogenic microorganisms and oral bacteria such as *S. mutans* [108,113–115]. Green tea is an unfermented product mostly containing a mixture of catechins. Fermented tea (black tea) and semi-fermented tea (oolong tea) contain a mixture of catechins, theaflavins, and polymeric thearubigins [112].

The anticariogenic effects of 10% tea polyphenol (10 g of green tea polyphenol extract in 100 mL of dimethyl sulfoxide), 0.05% (w:v) fluoride, 0.2% (w:v) chlorhexidine, and 1:1 solution of 0.2% (w/v) chlorhexidine and 0.05% (w/v) fluoride combined were analyzed [116]. This study showed that all the groups had an anticariogenic effect compared with saline, whilst the anticariogenic effect of fluoride-chlorhexidine combined was the highest among those groups.

Ferrazzano et al. [117] compared in an in vivo study the antibacterial effect of tea polyphenol mouthwash (1.6 g of pulverized *Camellia sinensis* leaves was suspended in 40 mL of distilled water at 100 °C for 3 min) and placebo mouthwash against *mutans streptococci* and lactobacilli. Forty milliliters of each mouthwash were used 3 times/day for 7 days. The results showed a significant lowering of the levels of *mutans streptococci* (60%) and a significant lowering of levels of lactobacilli (42.4%) using green tea mouthwash compared with the subjects using placebo mouth-rinse.

Hambire et al. [118] compared the effect of 0.5% (w/v) solution of green tea extracted mouthwash with a commercial 0.2% chlorhexidine gluconate mouthwash and 0.05% sodium fluoride mouthwash on the plaque, gingival status, oral hygiene status, and salivary pH. The study was conducted for a period of two weeks on children. The results showed that green tea mouthwash played an important positive role on the criteria tested and no measurable side effects were found with the others mouthwashes tested. Lee et al. [119] showed that chewing green and black tea leaves resulted in higher levels of catechin and theaflavins in the oral cavity than holding tea leaves. Another study demonstrated that tea polyphenols extracted from green and black teas showed, in the 1–10 mM concentration range, a potent (theaflavin) or a moderate (catechin and epicatechin) effect against glucosyltransferase from *S. mutans* [120].

Green tea polyphenols ((+)-catechin (2.9%), (–)-epicatechin (6.8%), (+)-gallocatechin (12.8%), (–)-epigallocatechin (16.5%), (–)-epicatechin gallate (6.6%), (–)-gallocatechin gallate (8.5%), and (–)-epigallocatechin gallate (21.3%) with other compounds such as caffeine (9.9%), sugars (5.1%), amino acids and peptides (2.7%), ash (0.3%), and moisture were added at different concentrations (0.1–0.5% (w/v)) to diet or water drinking in rats [121]. The results showed that the caries activity was reduced by adding tea polyphenols to the diet. Forty percent of dental caries lesions reduction was observed after a diet containing 0.1% (w/v) tea polyphenols as well as no toxic effects were observed on rats.

Oolong tea is mostly consumed in China and Taiwan [122]. An in vitro study demonstrated that Oolong tea polyphenols (monomeric and polymeric polyphenols, caffeine, and other components) could be used as antibacterial agents and are able to reduce glucan synthesis by inhibiting the glucosyltransferase activity of *S. mutans* [123]. Accordingly, several studies performed on rats demonstrated that the polymeric polyphenols in oolong tea are the main compounds, which reduce the dental plaque and prevent caries development. The mechanism consists again in the inhibition of glycosyltransferases of *S. mutans* and *Streptococcus sobrinus* [124,125]. The same authors reported that performing mouth rinse with 0.5 mg/mL of oolong tea extracts in 0.2% ethanol solutions, before and after each meal and before sleeping during four days, could reduce the plaque deposition on human teeth [126].

The prevention of dental caries and antibacterial activities of polyphenols in other drinks as cacao, wine, coffee, and barley coffee were studied [127,128]. Barley coffee contains fluoride, zinc ions and

phenolic compounds, and has an antibacterial effect on *S. mutans* by changing the hydrophobicity of bacterial cell walls and hence the adhesive capacity of bacteria on hydroxyapatite [129]. Accordingly, Stauder et al. [130] demonstrated the in vitro antibacterial and the in vitro antiadhesive effects of barley coffee against *S. mutans* biofilms and expressed the opinion that the addition of barley coffee compounds to oral health care materials could prevent the *S. mutans*-induced lesions in vivo. They showed that barley coffee contains low molecular mass polyphenols, zinc and fluoride ions and, above all, a high molecular mass melanoidin. After 24 h, barley coffee and the high molecular mass melanoidin fraction had an inhibitory effect (ranging from 82 to 93%), whilst the low molecular mass caused a biofilm reduction of only 36%.

An in vivo study [127] compared the effect of coffee, wine and water consumption on the microbial population of dental supra- and subgingival plaque by the separation of PCR-amplified fragments using the denaturing gradient gel electrophoresis technique. This study showed that the coffee (five cups a day “30 to 40 mL each”) and red wine consumers (couple of glasses a day “200 mL each”) had lower intensity bands observed in supra- and subgingival plaque than water consumers. An in vivo study [114] demonstrated that less biofilms developed on the teeth of consumers drinking higher volumes of wine, tea and/or coffee.

Wine is one of the alcoholic drinks, which is the most frequently consumed by humans. It contains numerous biologically active compounds, which have beneficial effects for the human health [131]. On one hand, several studies showed that wine can alter the tooth color and the long contact duration of this alcoholic beverage with its low pH could promote dental erosion [132,133]. However, on the other hand, red and white wines contain some organic acids and polyphenols; these organic acids such as tartaric, citric, succinic, malic, lactic, and acetic acids could be responsible for the antibacterial activity against *S. mutans*. Conversely, wine polyphenols-catechin and tannin-did not affect the microorganisms [131].

Similarly, wine has strong antibacterial activity against *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, and *Fusobacterium nucleatum*. Hence, the identified active compounds in wine could be used in the prevention and the treatment of periodontal diseases [5]. Resveratrol, flavonols, tannins, and gallic acid are the most represented polyphenols in red wine; these polyphenols and anthocyanins that are present in red wine could have the capacity to inhibit bacterial growth in the oral cavity [134].

Several studies analyzed the antibacterial effect of many polyphenols rich plants, which can be used to prevent dental caries. Hop Bract is a plant that contains a high molecular weight polyphenol, which can inhibit the adherence of the *S. mutans* and 80% of their glucosyltransferase activity at smaller concentrations than the polyphenols extracted from tea [135]. A recent in vivo study demonstrated that the use of 0.1% of Hop Bract polyphenol based mouth rinse (1 min, five times per day) reduces 25.4% of the dental plaque growth over 3 days without teeth discoloration [136]. *Salvadora persica* is a plant containing phenolic, flavonoid, tannins, and alkaloids [137]. The methanolic extracts from this plant contain some polyphenols, such as chrysin-8-c- β -D-glucopyranoside, gallic acid, and ferulic acid. Its total concentration (20 mg/mL) showed high antibacterial activity in vitro against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* sp. This antibacterial activity was close to or better than the antibacterial activity of ampicillin [138].

Thymus lamiaceae comprises more than 200 species. The essential oils of four *Thymus* species contain thymol, and polyphenolic compounds such as phenolic acids, labiate tannins, and flavonoids. They displayed antibacterial activities against *S. mutans*. This study noted that the polyphenols of *Thymus vulgaris* (one of the four species studied) do not have an antibacterial effect but can reduce the initial bacterial colonization on dental enamel in situ [139]. Yamamoto and Ogawa [140] studied the role of *Perilla frutescens* seed that contain various polyphenols such as luteolin, quercetin, gallic acid, and epigallocatechin gallate against different oral bacteria. They observed that the presence of a hydroxyl group at the 3' position in the flavonoid group of quercetin confers an antibacterial role and prevents the occurrence of dental caries.

The antioxidant and antibacterial effects of the polyphenols compounds contained in *Paullina cupana* (caffeine, epicatechin and catechin) [141], *Oenothera biennis* [142], *Sida urens* L. (Malvaceae) [143], *Cistus incanus* Herbal (flavonols, glycosylated flavonol, catechin, gallic acid) [144], *Ziziphus jujuba* (quercitrin, catechin, gallocatechin) [145], and *Trachyspermum ammi* (Ajwain) [146] showed that these plants could be used to inhibit activities of *S. mutans*; thus, in the prevention of dental caries.

Candida albicans is a colonizer of dental caries in children and adults. It has an important role in caries evolution due to the production of some organic acids and dietary sugars in the dental plaque [147]. Polyphenols of green tea (1.25 µg/mL) and Padma Hepaten (0.16 µg/mL) can inhibit the growth of *C. albicans* by 88% and prevent biofilm formation for orthodontic patients [148].

Farkash et al. [148] used scanning electron microscopy to observe the reduction in cell number and the morphology changes of *C. albicans* in the untreated group, in the group treated with green tea polyphenols and in the group treated with green tea polyphenols and Padma Hepaten. The group treated with both plant polyphenols affected *C. albicans* morphology that contains more yeast shaped cells and less hyphal cells (Figure 8).

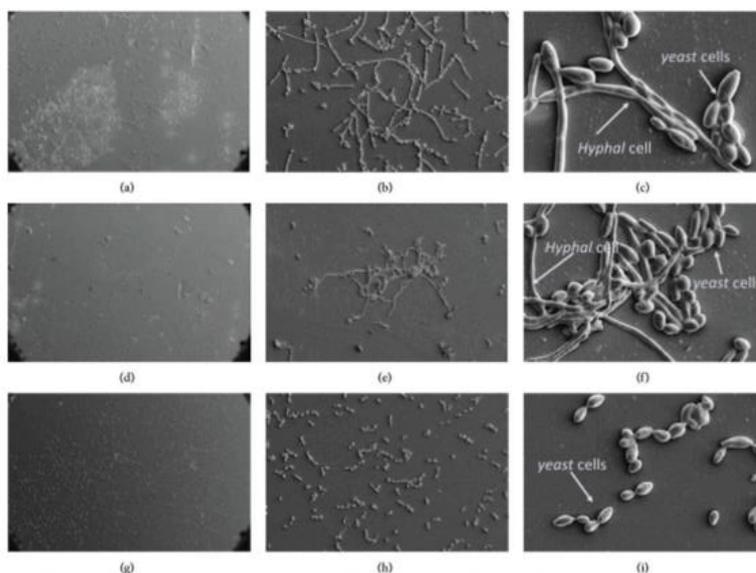


Figure 8. Morphology of the biofilm on orthodontic polyvinyl chloride using scanning electron microscopy at 200×, 1000× and 5000× magnifications, respectively. (a–c) Untreated group, (d–f) green tea polyphenols, (g–i) green tea, and Padma Hepaten polyphenols. Modified from ref. [148] with authorization.

Accordingly, a recent study from the same group [149] showed the ability of the polyphenols in green tea and Padma Hepaten in the inhibition of the caries-inducing properties of *S. mutans* and *C. albicans*.

Thymus capitatus (TC) and *Citrus limon var. pompia* showed antimicrobial capacity against *S. mutans*; but only TC was effective as a fungicidal compound against *C. albicans* able to kill 70% of them. TC is hence a promising plant to prevent caries lesions [150].

Polyphenol-rich cranberry could also inhibit the cariogenic factors of *S. mutans*–*C. albicans* biofilms by reducing its acidogenicity and metabolic activity [151].

Poly (methyl methacrylate) (PMMA) is a denture-based material that was blended with Curcumin, a polyphenol with potent biological effects. The results of Alawan et al. showed that 50 µg/mL of curcumin reduces the adhesion of *C. albicans* biofilms on dental materials [152].

Polyphenols contained in tea, such as tannins, catechin, and caffeine, as well as fluoride containing compounds, contribute to increase its resistance against acid solutions [153].

Some polyphenols extracted from many plants as *Thymus* species demonstrated an anti-adherent activity against oral bacteria on the enamel surfaces [139]. An in vitro study on enamel surface using an antioxidant rich-apple (essentially quercetin, epicatechin, procyanidin B2, vitamin C, phloretin, and chlorogenic acid) against *S. mutans* biofilms showed that its polyphenolic compounds decreased the demineralization rate of enamel which is produced by *S. mutans* biofilms [154].

A polyphenol containing mouth rinse bath is recommended for its ability to reduce bacterial colonization and adherence on the surface of enamel [155–157].

4.4. Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity

Biodegradable chitosan chips containing propolis was used in the treatment of vital pulpotomy [158]. The study of Balata et al. compared the effect of propolis polyphenols (caffeic acid, quercetin, rutin, and chrysin) and formocresol (the gold standard dressing agent in pulpotomy) in the inflammatory response and hard tissue formation. They demonstrated that the propolis samples induced mild or no inflammation compared with formocresol samples. Thus, formulation of propolis extract as chitosan biodegradable chips (3% propolis, 1.8% chitosan, 0.2% hydroxypropyl methylcellulose, 5% propylene glycol) can be used in pulpotomy and in the infected periodontal pockets. These results may be due to the anti-inflammatory activity of propolis, which is rich in polyphenols that inhibit the lipoxigenase pathway of arachidonic acid.

5. Summary of the Major Findings Reported in This Review

Taking into account the results discussed in the previous sections, it appears that the different classes of polyphenols have been used in a relatively different manner according to their structure and properties. As apparent from Table 1, summarizing the most relevant studies, -to our modest opinion- condensed polyphenols have found a broad range applications in all the considered fields whereas hydrolysable polyphenols were used preferentially in dentin modification and remineralization, but much less for their antimicrobial and anti-oxidant/inflammatory applications. This may be due to their intrinsic instability being subjected to hydrolysis as well as in the difficulty to obtain them in pure form. Polyphenol mixtures extracted from plants and beverages have been extensively used for their outstanding antimicrobial properties but also in relationship to their availability.

Table 1. Summary of the dental applications of the major classes of polyphenols.

| Condensed Polyphenols | | |
|---|---|--|
| Dentin Modifier, Dentin Pretreatment, Collagen Cross-Linking and Resin-Dentin Stability | | |
| Author | Polyphenol Used | Effect |
| Leme-Kraus [19] | Proanthocyanidins | Stable interaction for resin—dentin with low collagen digestion |
| Santiago [30] | Epigallocatechin-3-gallate | Preserve bond strength |
| Singh [31] | Epigallocatechin-3-gallate | Preserve bond strength |
| Kalishetvam [34] | Epigallocatechin gallate, catechin | Epigallocatechin gallate promotes higher bond strength |
| Yu [35] | Epigallocatechin gallate | Increase the bond strength of fiber post |
| Kwon [62] | Epigallocatechin gallate | Collagen cross-linked produced in short setting time and high compressive strength |
| de Macedo [44] | Epigallocatechin gallate | Increase and preserve the bond strength |
| Albuquerque [45] | Epigallocatechin gallate | Increase and preserve the bond strength |
| Zheng [21] | Flavonols: baicalein, quercetin | Protection of dentin against collagenase digestion |
| Yang [49] | Flavonols: quercetin | Inhibition the collagenase activity |
| Coth [50] | Flavonols: quercetin | Preserve the durability of bond strength |
| Atalayn [77] | Phlorotannins: resveratrol | Promote biocompatibility of adhesive material without alteration in bond strength |
| Remineralization, Cell Viability and Differentiation | | |
| Tang [20] | Proanthocyanidins | Protection for the collagen matrix and promote dentin remineralization |
| Lucas [26] | Epigallocatechin gallate | Enamel resistance against abrasion |
| Lim [52] | Epicatechin | Positive effects on the proliferation of pulp cells |
| Kim [53] | Flavonols: quercetin, genistein, baicalin | Osteogenic differentiation |
| Feng [75] | Phlorotannins: resveratrol | Promote osteoblastic activity |
| Liu [54] | Phlorotannins: resveratrol | Promote osteoblastic activity |
| Antibacterial Activity | | |
| Xu [56] | Epigallocatechin gallate | Inhibition of <i>S. mutans</i> biofilm activity |
| Hara [57] | Epigallocatechin gallate | Inhibition of alpha-amylase |
| Feng [58] | Gallocatechin gallate, epigallocatechin gallate | Inhibition of <i>S. mutans</i> glucosyltransferases |
| Melok [59] | Epigallocatechin-3-gallate | Inhibition of <i>S. mutans</i> growth |
| Lee [60] | Epigallocatechin gallate | Eradication of <i>Enterococcus faecalis</i> after 7 days |
| Du [63] | Epigallocatechin gallate | Inhibition of <i>S. mutans</i> growth and preserve the bond strength of resin-adhesive |
| Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity | | |
| Hirao [65] | Catechins | Inhibition of cytokines and chemokines |
| Nakanishi [66] | Epigallocatechin gallate, epicatechin gallate | Reduce of pro-inflammatory cytokines |
| Yang [64] | Epigallocatechin gallate | Suppression of the cyclooxygenase-2 |
| Mahmoud Hashemi [70] | Flavonols: quercetin | Reduce of pro-inflammatory cytokines |
| Yonehiro [71] | Flavonols: luteolin | Reduce of pro-inflammatory cytokines |
| Lee [68] | Flavonols: butein | Protective agent in dental pulp diseases |
| Wang [72] | Phlorotannins: resveratrol | Decrease pulpal damage |

Table 1. Cont.

| Hydrolysable Tannins and Gallic Acid | | |
|---|--|---|
| Author | Dentin Modifier, Dentin Pretreatment, Collagen Cross-Linking, and Resin-Dentin Stability | Effect |
| Bedran-Russo [22] | PolypHENOL Tannic acid | Increase dentin stiffness and reduce enzymatic degradation |
| Bitter [82] | Tannic acid | Smooth and clean pulp chamber |
| Bitter [83] | Tannic acid | Remove the smear layer and partially the organic material |
| Oh [89] | Gallic acid+FeCl ₃ | Reduce the dentin hypersensitivity |
| Mukai [79] | Fluoride-tannin acid-lanthanum-apatite | Reduce the dentin hypersensitivity |
| Christopher [91] | Tannic acid, gallic acid | Gallic acid shows more infiltration of resin in dental tubules |
| Remineralization, Cell Viability, and Differentiation | | |
| Zhang [99] | Gallic acid | Inhibition of enamel demineralization |
| Huang [100] | Gallic acid | Inhibition of enamel demineralization |
| Tang [102,103] | Gallic acid | Change the hydroxyapatite size and morphology |
| PolypHENOL Mixtures | | |
| Dentin Modifier, Dentin Pretreatment, Collagen Cross-Linking, and Resin-Dentin Stability | | |
| Author | PolypHENOL | Effect |
| Porto [105] | Quercetin and resveratrol mixture | Preserve bond strength and protect dentin matrix |
| Guo [107] | <i>Calla chinensis</i> | Enhance the remineralization of root lesions, protect the collagen fibers |
| Antibacterial Activity | | |
| Jazaeri [116] | Tea polyphenol | Anticariogenic effects |
| Ferrazzano [117] | Tea polyphenol | Using as mouthwash reduce <i>S. mutans</i> |
| Hattori [120] | Tea polyphenol | Reduce the effect of glucosyltransferase of <i>S. mutans</i> |
| Sakanaka [121] | Green tea polyphenols | Reduce caries activity |
| Ooshima [126] | Oolong tea extracts | Reduce the plaque deposition on teeth |
| Signoretto [127] | Coffee, wine | Effective on supra- and subgingival plaque |
| Shinada [136] | Hop Braet polyphenol | Reduce 25.4% of the dental plaque |
| Khalil [138] | <i>Sidastron Persica</i> | high activity against <i>S. aureus</i> and <i>Streptococcus</i> sp. |
| Farkash [148] | Green tea polyphenols and Padma Hepaten | Inhibition of <i>C. albicans</i> growth (88%) |
| He [106] | Green tea polyphenols mixed with nano-sized calcium phosphate particles | Antibacterial activity and increase the remineralization process |

6. Future Perspectives and Concluding Remarks

Polyphenolics whatever their classification as condensed polyphenols, hydrolysable tannins or mixtures thereof allow to easily modify the surface properties of dentin, mainly through interactions with collagen, and enamel affording them with better adhesive properties and antibacterial activity against a broad range of microorganisms present in the proximity of the teeth. All these properties are summarized in Figure 9 and detailed in Table 1.

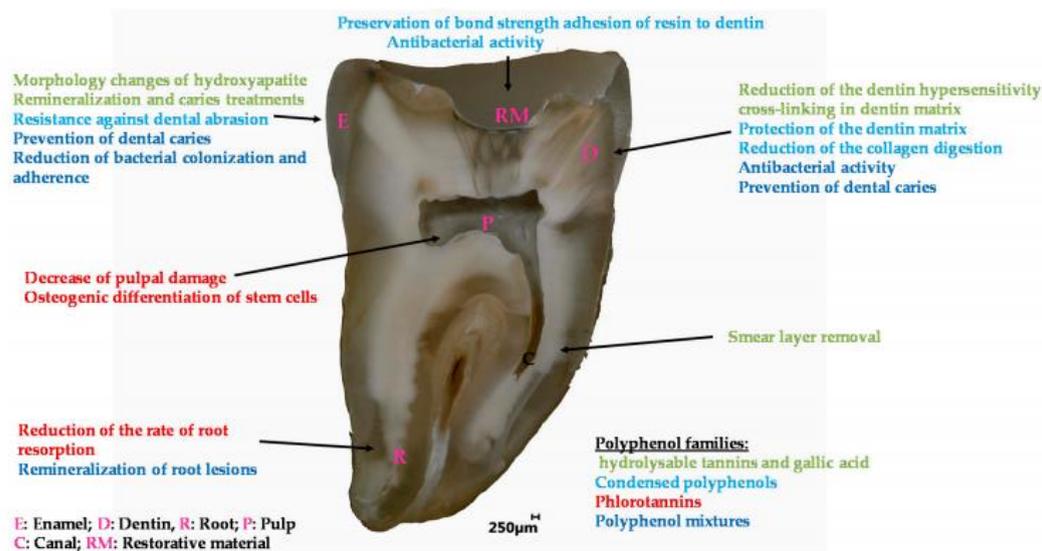


Figure 9. Overview of the applications of polyphenols in the engineering of dental materials.

Future investigations will aim to better understand, and master the use of polyphenols in dental remineralization processes, as they are also able to interact with phosphates.

Even if the literature, describing the use of polyphenols in dental material engineering is vast, as seen in this review, it seems important to develop combinatorial approaches to select the best possible candidates for a required application. The strong interactions between a vast majority of polyphenols and metallic cations, among which Ca^{2+} , should also be exploited for the protection and adhesiveness of dental materials. In particular, coatings made from polyphenol metallic cations mixtures [90] may offer some protective applications. The biocompatibility of such metallic–organic hybrid systems has been recently evidenced [159], and highlights the need to investigate them for dental applications.

Author Contributions: Conceptualization, N.K. and V.B.; methodology, N.K. and V.B.; resources, N.K. and V.B.; data curation, Y.H. and V.B.; writing—original draft preparation, N.K. and V.B.; writing—review and editing, N.K. and V.B.; visualization, Y.H. and V.B.; supervision, V.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Pérez-Jiménez, J.; Neveu, V.; Vos, F.; Scalbert, A. Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: An application of the Phenol-Explorer database. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2010**, *64* (Suppl. 3), S112–S120.
2. Handique, J.G.; Baruah, J.B. Polyphenolic compounds: An overview. *React. Funct. Polym.* **2002**, *52*, 163–188. [CrossRef]
3. Reitzer, F.; Allais, M.; Ball, V.; Meyer, F. Polyphenols at interfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2018**, *257*, 31–41. [CrossRef]

4. Petti, S.; Scully, C. Polyphenols, oral health and disease: A review. *J. Dent.* **2009**, *37*, 413–423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Sánchez, M.C.; Ribeiro-Vidal, H.; Esteban-Fernández, A.; Bartolomé, B.; Figuero, E.; Moreno-Arribas, M.V.; Sanz, M.; Herrera, D. Antimicrobial activity of red wine and oenological extracts against periodontal pathogens in a validated oral biofilm model. *BMC Complement. Altern. Med.* **2019**, *19*, 145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Fibach, E.; Ginsburg, I. The Antioxidant Effect of Fermented Papaya Preparation in the Oral Cavity. *Phytother. Res.* **2015**, *29*, 1317–1322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Shavandi, A.; Bekhit, A.E.-D.A.; Saeedi, P.; Izadifar, Z.; Bekhit, A.A.; Khademhosseini, A. Polyphenol uses in biomaterials engineering. *Biomaterials* **2018**, *167*, 91–106. [[CrossRef](#)]
8. Catapano-Martinez, D.; Boyce, M.; Garland, M. The Protective Role of Polyphenols in Oral Health. *Decis. Dent.* **2018**, 33–36.
9. Sileika, T.S.; Barrett, D.G.; Zhang, R.; Lau, K.H.A.; Messersmith, P.B. Colorless multifunctional coatings inspired by polyphenols found in tea, chocolate, and wine. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 10766–10770. [[CrossRef](#)]
10. Quideau, S.; Deffieux, D.; Douat-Casassus, C.; Pouységú, L. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *50*, 586–621. [[CrossRef](#)]
11. Le Bourvellec, C.; Renard, C.M.G.C. Interactions between polyphenols and macromolecules: Quantification methods and mechanisms. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2012**, *52*, 213–248. [[CrossRef](#)]
12. Marshall, G.W.; Marshall, S.J.; Kinney, J.H.; Balooch, M. The dentin substrate: Structure and properties related to bonding. *J. Dent.* **1997**, *25*, 441–458. [[CrossRef](#)]
13. Kharouf, N.; Rapp, G.; Mancino, D.; Hemmerlé, J.; Haikel, Y.; Reitzer, F. Effect of etching the coronal dentin with the rubbing technique on the microtensile bond strength of a universal adhesive system. *Dent. Mat. Probl.* **2019**, *56*, 343–348. [[CrossRef](#)]
14. Osorio, R.; Yamauti, M.; Osorio, E.; Ruiz-Requena, M.E.; Pashley, D.; Tay, F.; Toledano, M. Effect of dentin etching and chlorhexidine application on metalloproteinase-mediated collagen degradation. *Eur. J. Oral Sci.* **2011**, *119*, 79–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Toledano, M.; Osorio, R.; Osorio, E.; Aguilera, F.S.; Yamauti, M.; Pashley, D.H.; Tay, F. Effect of bacterial collagenase on resin-dentin bonds degradation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2007**, *18*, 2355–2361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Mazzoni, A.; Nascimento, F.D.; Carrilho, M.; Tersariol, I.; Papa, V.; Tjäderhane, L.; Di Lenarda, R.; Tay, F.R.; Pashley, D.H.; Breschi, L. MMP activity in the hybrid layer detected with in situ zymography. *J. Dent. Res.* **2012**, *91*, 467–472. [[CrossRef](#)]
17. Aguiar, T.R.; Vidal, C.M.P.; Phansalkar, R.S.; Todorova, I.; Napolitano, J.G.; McAlpine, J.B.; Chen, S.N.; Pauli, G.F.; Bedran-Russo, A.K. Dentin biomodification potential depends on polyphenol source. *J. Dent. Res.* **2014**, *93*, 417–422. [[CrossRef](#)]
18. Vidal, C.M.P.; Leme, A.A.; Aguiar, T.R.; Phansalkar, R.; Nam, J.-W.; Bisson, J.; McAlpine, J.B.; Chen, S.-N.; Pauli, G.F.; Bedran-Russo, A. Mimicking the hierarchical functions of dentin collagen cross-links with plant derived phenols and phenolic acids. *Langmuir* **2014**, *30*, 14887–14893. [[CrossRef](#)]
19. Leme-Kraus, A.A.; Aydin, B.; Vidal, C.M.P.; Phansalkar, R.M.; Nam, J.W.; McAlpine, J.; Pauli, G.F.; Chen, S.; Bedran-Russo, A.K. Biostability of the Proanthocyanidins-Dentin Complex and Adhesion Studies. *J. Dent. Res.* **2017**, *96*, 406–412. [[CrossRef](#)]
20. Tang, C.; Fang, M.; Liu, R.; Dou, Q.; Chai, Z.; Xiao, Y.; Chen, J. The role of grape seed extract in the remineralization of demineralized dentine: Micromorphological and physical analyses. *Arch. Oral Biol.* **2013**, *58*, 1769–1776. [[CrossRef](#)]
21. Zheng, K.; Wu, S.; Chen, B.; Liao, W.; Li, Y. [Effect of baicalein and quercetin on enzymatic resistance of dentin collagen]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* **2014**, *49*, 667–671. [[PubMed](#)]
22. Bedran-Russo, A.K.B.; Yoo, K.J.; Ema, K.C.; Pashley, D.H. Mechanical properties of tannic-acid-treated dentin matrix. *J. Dent. Res.* **2009**, *88*, 807–811. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Liu, Y.; Bai, X.; Li, S.; Liu, Y.; Keightley, A.; Wang, Y. Molecular weight and galloylation affect grape seed extract constituents' ability to cross-link dentin collagen in clinically relevant time. *Dent. Mater.* **2015**, *31*, 814–821. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Nam, J.-W.; Phansalkar, R.S.; Lankin, D.C.; Bisson, J.; McAlpine, J.B.; Leme, A.A.; Vidal, C.M.P.; Ramirez, B.; Niemitz, M.; Bedran-Russo, A.; et al. Subtle Chemical Shifts Explain the NMR Fingerprints of Oligomeric Proanthocyanidins with High Dentin Biomodification Potency. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 7495–7507. [[CrossRef](#)]

25. Phansalkar, R.S.; Nam, J.-W.; Chen, S.-N.; McAlpine, J.B.; Napolitano, J.G.; Leme, A.; Vidal, C.M.P.; Aguiar, T.; Bedran-Russo, A.K.; Pauli, G.F. A galloylated dimeric proanthocyanidin from grape seed exhibits dentin biomodification potential. *Fitoterpia* **2015**, *101*, 169–178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Lucas, P.W.; Wagner, M.; Al-Fadhlah, K.; Almusallam, A.S.; Michael, S.; Thai, L.A.; Strait, D.S.; Swain, M.V.; van Casteren, A.; Renno, W.M.; et al. Dental abrasion as a cutting process. *Interface Focus* **2016**, *6*, 20160008. [[CrossRef](#)]
27. Zhang, L.; Huang, L.; Xiong, Y.; Fang, M.; Chen, J.-H.; Ferrari, M. Effect of post-space treatment on retention of fiber posts in different root regions using two self-etching systems. *Eur. J. Oral Sci.* **2008**, *116*, 280–286. [[CrossRef](#)]
28. Kharouf, N.; Mancino, D.; Naji-Amrani, A.; Eid, A.; Haikel, Y.; Hemmerle, J. Effectiveness of Etching by Three Acids on the Morphological and Chemical Features of Dentin Tissue. *J. Contemp. Dent. Pract.* **2019**, *20*, 915–919. [[CrossRef](#)]
29. Gu, X.-H.; Mao, C.-Y.; Liang, C.; Wang, H.-M.; Kern, M. Does endodontic post space irrigation affect smear layer removal and bonding effectiveness? *Eur. J. Oral Sci.* **2009**, *117*, 597–603. [[CrossRef](#)]
30. Santiago, S.L.; Osorio, R.; Neri, J.R.; Carvalho, R.M.; Toledano, M. Effect of the flavonoid epigallocatechin-3-gallate on resin-dentin bond strength. *J. Adhes. Dent.* **2013**, *15*, 535–540.
31. Singh, P.; Nagpal, R.; Singh, U.P. Effect of dentin biomodifiers on the immediate and long-term bond strengths of a simplified etch and rinse adhesive to dentin. *Restor. Dent. Endod.* **2017**, *42*, 188–199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Fialho, M.P.N.; Hass, V.; Nogueira, R.P.; França, F.M.G.; Turssi, C.P.; Basting, R.T.; Amaral, F.L.B. Effect of epigallocatechin-3-gallate solutions on bond durability at the adhesive interface in caries-affected dentin. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2019**, *91*, 398–405. [[CrossRef](#)]
33. De Costa, C.A.G.; Passos, V.F.; Neri, J.R.; Mendonça, J.S.; Santiago, S.L. Effect of Metalloproteinase Inhibitors on Bond Strength of a Self-etching Adhesive on Erosively Demineralized Dentin. *J. Adhes. Dent.* **2019**, *21*, 337–344.
34. Kalaiselvam, R.; Ganesh, A.; Rajan, M.; Kandaswamy, D. Evaluation of bioflavonoids on the immediate and delayed microtensile bond strength of self-etch and total-etch adhesive systems to sound dentin. *Indian J. Dent. Res.* **2018**, *29*, 133–136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Yu, H.-H.; Zhang, L.; Xu, S.; Li, F.; Yu, F.; Liu, Z.-Y.; Huang, L.; Chen, J.-H. Effects of Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on the bond strength of fiber posts to Sodium hypochlorite (NaOCl) treated intraradicular dentin. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 4235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Pheenthicharoenkul, S.; Panichuttra, A. Epigallocatechin-3-gallate increased the push out bond strength of an epoxy resin sealer to root dentin. *Dent. Mater. J.* **2016**, *35*, 888–892. [[CrossRef](#)]
37. Frassetto, A.; Breschi, L.; Turco, G.; Marchesi, G.; Di Lenarda, R.; Tay, F.R.; Pashley, D.H.; Cadenaro, M. Mechanisms of degradation of the hybrid layer in adhesive dentistry and therapeutic agents to improve bond durability—A literature review. *Dent. Mater.* **2016**, *32*, e41–e53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Dutra-Correa, M.; Leite, A.A.B.V.; de Cara, S.P.H.M.; Diniz, I.M.A.; Marques, M.M.; Suffredini, I.B.; Fernandes, M.S.; Toma, S.H.; Araki, K.; Medeiros, I.S. Antibacterial effects and cytotoxicity of an adhesive containing low concentration of silver nanoparticles. *J. Dent.* **2018**, *77*, 66–71. [[CrossRef](#)]
39. Mishra, P.; Jaiswal, S.; Nikhil, V.; Gupta, S.; Jha, P.; Raj, S. Evaluation of marginal sealing ability of self-adhesive flowable composite resin in Class II composite restoration: An in vitro study. *J. Conserv. Dent.* **2018**, *21*, 363–368. [[CrossRef](#)]
40. Hong, J.-Y.; Yon, J.; Lee, J.-S.; Lee, I.-K.; Yang, C.; Kim, M.-S.; Choi, S.-H.; Jung, U.-W. Effects of epigallocatechin-3-gallate on the healing of extraction sockets with a periapical lesion: A pilot study in dogs. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2015**, *103*, 727–734. [[CrossRef](#)]
41. De Assis, J.S.; Lima, R.A.; Marques Lima, J.P.; Azevedo Rodrigues, L.K.; Santiago, S.L. Effect of epigallocatechin-3-gallate application for remaining carious dentin disinfection. *J. Conserv. Dent.* **2015**, *18*, 51–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Neri, J.R.; Yamauti, M.; Feitosa, V.P.; Pires, A.P.M.; Araújo, R.D.S.; Santiago, S.L. Physicochemical properties of a methacrylate-based dental adhesive incorporated with epigallocatechin-3-gallate. *Braz. Dent. J.* **2014**, *25*, 528–531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Fonseca, B.M.; Barcellos, D.C.; da Silva, T.M.; Borges, A.L.S.; das Neves Cavalcanti, B.; Prakki, A.; de Oliveira, H.P.M.; de Paiva Gonçalves, S.E. Mechanical-physicochemical properties and biocompatibility of catechin-incorporated adhesive resins. *J. Appl. Oral Sci.* **2019**, *27*, e20180111. [[CrossRef](#)]

44. De Macedo, F.A.A.; Souza, N.O.; Lemos, M.V.S.; De-Paula, D.M.; Santiago, S.L.; Feitosa, V.P. Dentin bonding and physicochemical properties of adhesives incorporated with epigallocatechin-3-gallate. *Odontology* **2019**, *107*, 23–28. [[CrossRef](#)]
45. Albuquerque, N.; Neri, J.R.; Lemos, M.; Yamauti, M.; de Sousa, F.; Santiago, S.L. Effect of Polymeric Microparticles Loaded with Catechin on the Physicochemical Properties of an Adhesive System. *Oper. Dent.* **2019**, *44*, E202–E211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Yu, H.H.; Zhang, L.; Yu, F.; Zhou, H.; Shen, L.J.; Chen, J.H. [Effects of epigallocatechin-3-gallate modification on the bonding stability of an etch-and-rinse adhesive to intraradicular dentin]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* **2017**, *52*, 114–119.
47. Hanks, C.T.; Strawn, S.E.; Wataha, J.C.; Craig, R.G. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J. Dent. Res.* **1991**, *70*, 1450–1455. [[CrossRef](#)]
48. Hu, J.; Du, X.; Huang, C.; Fu, D.; Ouyang, X.; Wang, Y. Antibacterial and physical properties of EGCG-containing glass ionomer cements. *J. Dent.* **2013**, *41*, 927–934. [[CrossRef](#)]
49. Yang, H.; Li, K.; Yan, H.; Liu, S.; Wang, Y.; Huang, C. High-performance therapeutic quercetin-doped adhesive for adhesive-dentin interfaces. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 8189. [[CrossRef](#)]
50. Gotti, V.B.; Feitosa, V.P.; Sauro, S.; Correr-Sobrinho, L.; Leal, F.B.; Stansbury, J.W.; Correr, A.B. Effect of antioxidants on the dentin interface bond stability of adhesives exposed to hydrolytic degradation. *J. Adhes. Dent.* **2015**, *17*, 35–44.
51. Wang, F.; Han, Y.; Xi, S.; Lu, Y. Catechins reduce inflammation in lipopolysaccharide-stimulated dental pulp cells by inhibiting activation of the NF- κ B pathway. *Oral Dis.* **2020**, *26*, 815–821. [[CrossRef](#)]
52. Lim, E.; Lim, M.-J.; Min, K.-S.; Kwon, Y.-S.; Hwang, Y.-C.; Yu, M.-K.; Hong, C.-U.; Lee, K.-W. Effects of epicatechin, a crosslinking agent, on human dental pulp cells cultured in collagen scaffolds. *J. Appl. Oral Sci.* **2016**, *24*, 76–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Kim, J.-G.; Son, K.M.; Park, H.C.; Zhu, T.; Kwon, J.H.; Yang, H.-C. Stimulating effects of quercetin and phenamil on differentiation of human dental pulp cells. *Eur. J. Oral Sci.* **2013**, *121*, 559–565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Liu, X.-C.; Wang, X.-X.; Zhang, L.-N.; Yang, F.; Nie, F.-J.; Zhang, J. Inhibitory effects of resveratrol on orthodontic tooth movement and associated root resorption in rats. *Arch. Oral Biol.* **2020**, *111*, 104642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. De Rezende Barbosa, G.L.; Pimenta, L.A.; de Almeida, S.M. Micro-CT evaluation of the radioprotective effect of resveratrol on the mandibular incisors of irradiated rats. *Braz. Oral Res.* **2016**, *30*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Xu, X.; Zhou, X.D.; Wu, C.D. The tea catechin epigallocatechin gallate suppresses cariogenic virulence factors of *Streptococcus mutans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 1229–1236. [[CrossRef](#)]
57. Hara, K.; Ohara, M.; Hayashi, I.; Hino, T.; Nishimura, R.; Iwaseki, Y.; Ogawa, T.; Ohyama, Y.; Sugiyama, M.; Amano, H. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate precipitates salivary proteins including alpha-amylase: Biochemical implications for oral health. *Eur. J. Oral Sci.* **2012**, *120*, 132–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Feng, L.; Yan, Q.; Zhang, B.; Tian, X.; Wang, C.; Yu, Z.; Cui, J.; Guo, D.; Ma, X.; James, T.D. Ratiometric fluorescent probe for sensing *Streptococcus mutans* glucosyltransferase, a key factor in the formation of dental caries. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 3548–3551. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Melok, A.L.; Lee, L.H.; Mohamed Yussof, S.A.; Chu, T. Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-Gallate-Stearate Inhibits the Growth of *Streptococcus mutans*: A Promising New Approach in Caries Prevention. *Dent. J.* **2018**, *6*, 38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Lee, P.; Tan, K.S. Effects of Epigallocatechin gallate against *Enterococcus faecalis* biofilm and virulence. *Arch. Oral Biol.* **2015**, *60*, 393–399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Mankovskaia, A.; Lévesque, C.M.; Prakki, A. Catechin-incorporated dental copolymers inhibit growth of *Streptococcus mutans*. *J. Appl. Oral Sci.* **2013**, *21*, 203–207. [[CrossRef](#)]
62. Kwon, Y.-S.; Kim, H.-J.; Hwang, Y.-C.; Rosa, V.; Yu, M.-K.; Min, K.-S. Effects of Epigallocatechin Gallate, an Antibacterial Cross-linking Agent, on Proliferation and Differentiation of Human Dental Pulp Cells Cultured in Collagen Scaffolds. *J. Endod.* **2017**, *43*, 289–296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Du, X.; Huang, X.; Huang, C.; Wang, Y.; Zhang, Y. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) enhances the therapeutic activity of a dental adhesive. *J. Dent.* **2012**, *40*, 485–492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Yang, W.-H.; Deng, Y.-T.; Kuo, M.Y.-P.; Liu, C.-M.; Chang, H.-H.; Chang, J.Z.-C. Epigallocatechin-3-gallate blocks triethylene glycol dimethacrylate-induced cyclooxygenase-2 expression by suppressing extracellular signal-regulated kinase in human dental pulp and embryonic palatal mesenchymal cells. *J. Endod.* **2013**, *39*, 1407–1412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

65. Hirao, K.; Yumoto, H.; Nakanishi, T.; Mukai, K.; Takahashi, K.; Takegawa, D.; Matsuo, T. Tea catechins reduce inflammatory reactions via mitogen-activated protein kinase pathways in toll-like receptor 2 ligand-stimulated dental pulp cells. *Life Sci.* **2010**, *86*, 654–660. [[CrossRef](#)]
66. Nakanishi, T.; Mukai, K.; Yumoto, H.; Hirao, K.; Hosokawa, Y.; Matsuo, T. Anti-inflammatory effect of catechin on cultured human dental pulp cells affected by bacteria-derived factors. *Eur. J. Oral Sci.* **2010**, *118*, 145–150. [[CrossRef](#)]
67. Nakanishi, T.; Mukai, K.; Hosokawa, Y.; Takegawa, D.; Matsuo, T. Catechins inhibit vascular endothelial growth factor production and cyclooxygenase-2 expression in human dental pulp cells. *Int. Endod. J.* **2015**, *48*, 277–282. [[CrossRef](#)]
68. Lee, D.-S.; Li, B.; Kim, K.-S.; Jeong, G.-S.; Kim, E.-C.; Kim, Y.-C. Butein protects human dental pulp cells from hydrogen peroxide-induced oxidative toxicity via Nrf2 pathway-dependent heme oxygenase-1 expressions. *Toxicol In Vitro* **2013**, *27*, 874–881. [[CrossRef](#)]
69. Park, S.Y.; Jeong, Y.J.; Kim, S.H.; Jung, J.Y.; Kim, W.J. Epigallocatechin gallate protects against nitric oxide-induced apoptosis via scavenging ROS and modulating the Bcl-2 family in human dental pulp cells. *J. Toxicol. Sci.* **2013**, *38*, 371–378. [[CrossRef](#)]
70. Mahmoud Hashemi, A.; Solahaye Kahnemouii, S.; Aghajani, H.; Frozannia, K.; Pournasrollah, A.; Sadegh, R.; Esmaeeli, H.; Ghadimi, Y.; Razmpa, E. Quercetin Decreases Th17 Production by Down-Regulation of MAPK-TLR4 Signaling Pathway on T Cells in Dental Pulpitis. *J. Dent.* **2018**, *19*, 259–264.
71. Yonehiro, J.; Yoshida, Y.; Yamashita, A.; Yoshizawa, S.; Ohta, K.; Kamata, N.; Okihara, T.; Nishimura, F. Flavonol-containing phosphorylated pullulan may attenuate pulp inflammation. *Int. Endod. J.* **2013**, *46*, 119–127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Wang, F.-M.; Hu, Z.; Liu, X.; Feng, J.Q.; Augsburger, R.A.; Gutmann, J.L.; Glickman, G.N. Resveratrol represses tumor necrosis factor α /c-Jun N-terminal kinase signaling via autophagy in human dental pulp stem cells. *Arch. Oral Biol.* **2019**, *97*, 116–121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Geng, Y.-W.; Zhang, Z.; Liu, M.-Y.; Hu, W.-P. Differentiation of human dental pulp stem cells into neuronal by resveratrol. *Cell Biol. Int.* **2017**, *41*, 1391–1398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Lee, S.-I.; Min, K.-S.; Bae, W.-J.; Lee, Y.-M.; Lee, S.-Y.; Lee, E.-S.; Kim, E.-C. Role of SIRT1 in heat stress- and lipopolysaccharide-induced immune and defense gene expression in human dental pulp cells. *J. Endod.* **2011**, *37*, 1525–1530. [[CrossRef](#)]
75. Feng, G.; Zheng, K.; Song, D.; Xu, K.; Huang, D.; Zhang, Y.; Cao, P.; Shen, S.; Zhang, J.; Feng, X.; et al. SIRT1 was involved in TNF- α -promoted osteogenic differentiation of human DPSCs through Wnt/ β -catenin signal. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **2016**, *52*, 1001–1011. [[CrossRef](#)]
76. Atalayin, C.; Armagan, G.; Konyalioglu, S.; Kemaloglu, H.; Tezel, H.; Ergucu, Z.; Keser, A.; Dagci, T.; Onal, B. The protective effect of resveratrol against dentin bonding agents-induced cytotoxicity. *Dent. Mater. J.* **2015**, *34*, 766–773. [[CrossRef](#)]
77. Atalayin, C.; Tezel, H.; Ergucu, Z.; Unlu, N.; Armagan, G.; Dagci, T.; Kose, T. The improvement of biocompatibility of adhesives: The effects of resveratrol on biocompatibility and dentin micro-tensile bond strengths of self-etch adhesives. *Clin. Oral Investig.* **2019**, *23*, 3213–3218. [[CrossRef](#)]
78. Moreira, M.A.; Souza, N.O.; Sousa, R.S.; Freitas, D.Q.; Lemos, M.V.; De Paula, D.M.; Maia, F.J.N.; Lomonaco, D.; Mazetto, S.E.; Feitosa, V.P. Efficacy of new natural biomodification agents from Anacardiaceae extracts on dentin collagen cross-linking. *Dent. Mater.* **2017**, *33*, 1103–1109. [[CrossRef](#)]
79. Mukai, Y.; Tomiyama, K.; Okada, S.; Mukai, K.; Negishi, H.; Fujihara, T.; Teranaka, T. Dentinal tubule occlusion with lanthanum fluoride and powdered apatite glass ceramics in vitro. *Dent. Mater. J.* **1998**, *17*, 253–263. [[CrossRef](#)]
80. Mancino, D.; Kharouf, N.; Hemmerlé, J.; Haïkel, Y. Microscopic and Chemical Assessments of the Filling Ability in Oval-Shaped Root Canals Using Two Different Carrier-Based Filling Techniques. *Eur. J. Dent.* **2019**, *13*, 166–171. [[CrossRef](#)]
81. Haapasalo, M.; Shen, Y.; Wang, Z.; Gao, Y. Irrigation in endodontics. *Br. Dent. J.* **2014**, *216*, 299–303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Bitter, N.C. A 25% tannic acid solution as a root canal irrigant cleanser: A scanning electron microscope study. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **1989**, *67*, 333–337. [[CrossRef](#)]
83. Bitter, N.C. Tannic acid for smear layer removal: Pilot study with scanning electron microscope. *J. Prosthet. Dent.* **1989**, *61*, 503–507. [[CrossRef](#)]

84. Bitter, N.C. The effect of 25% tannic acid on prepared dentin: A scanning electron microscope-methylene blue dye study. *J. Prosthet. Dent.* **1990**, *64*, 12–16. [[CrossRef](#)]
85. Sabbak, S.A.; Hassanin, M.B. A scanning electron microscopic study of tooth surface changes induced by tannic acid. *J. Prosthet. Dent.* **1998**, *79*, 169–174. [[CrossRef](#)]
86. Takahashi, H.; Okamoto, Y.; Fujinaka, S.; Shintani, H. A pilot study of exposure of the smear layer to tannic acid solutions. *J. Prosthet. Dent.* **1993**, *70*, 261–263. [[CrossRef](#)]
87. Yamaga, M.; Koide, T.; Hieda, T. Adhesiveness of glass ionomer cement containing tannin-fluoride preparation (HY agent) to dentin—An evaluation of adding various ratios of HY agent and combination with application diamine silver fluoride. *Dent. Mater. J.* **1993**, *12*, 36–44. [[CrossRef](#)]
88. Okamoto, Y.; Shintani, H.; Yamaki, M. A medicated polycarboxylate cement to prevent complications in composite resin therapy. *J. Prosthet. Dent.* **1990**, *63*, 37–40. [[CrossRef](#)]
89. Oh, S.; Gu, Y.; Perinpanayagam, H.; Yoo, Y.-J.; Lee, Y.; Kim, R.K.; Chang, S.W.; Lee, J.; Zhu, Q.; Kum, K.Y. Dentinal tubule sealing effects of 532-nm diode-pumped solid-state laser, gallic acid/Fe³⁺ complex, and three commercial dentin desensitizers. *Lasers Med. Sci.* **2018**, *33*, 1237–1244. [[CrossRef](#)]
90. Ejima, H.; Richardson, J.J.; Liang, K.; Best, J.P.; van Koevorden, M.P.; Such, G.K.; Cui, J.; Caruso, F. One-step assembly of coordination complexes for versatile film and particle engineering. *Science* **2013**, *341*, 154–157. [[CrossRef](#)]
91. Christopher, S.R.; Mathai, V.; Nair, R.S.; Angelo, J.M.C. The effect of three different antioxidants on the dentinal tubular penetration of Resilon and Real Seal SE on sodium hypochlorite-treated root canal dentin: An in vitro study. *J. Conserv. Dent.* **2016**, *19*, 161–165.
92. Oguz Ahmet, B.S.; Sayin Ozel, G.; Mutluay, M.M.; Tezvergil Mutluay, A. Effect of gallic acid addition on some mechanical properties of self-adhesive resin cements. *Braz. Oral Res.* **2019**, *33*, e053. [[CrossRef](#)]
93. Hu, J.C.-C.; Chun, Y.-H.P.; Al Hazzazzi, T.; Simmer, J.P. Enamel formation and amelogenesis imperfecta. *Cells Tissues Organs (Print)* **2007**, *186*, 78–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Lacruz, R.S.; Habelitz, S.; Wright, J.T.; Paine, M.L. Dental enamel formation and implications for oral health and diseases. *Physiol. Rev.* **2017**, *97*, 939–993. [[CrossRef](#)]
95. Hannig, M.; Hannig, C. The pellicle and erosion. *Monogr. Oral Sci.* **2014**, *25*, 206–214. [[PubMed](#)]
96. Babaekhou, L.; Ghane, M. Antimicrobial activity of ginger on cariogenic bacteria: Molecular networking and molecular docking analyses. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2020**, 1–12. [[CrossRef](#)]
97. Kolahi, J.; Fazilati, M.; Kadivar, M. Towards tooth friendly soft drinks. *Med. Hypotheses* **2009**, *73*, 524–525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Veloz, J.J.; Alvear, M.; Salazar, L.A. Antimicrobial and Antibiofilm Activity against *Streptococcus mutans* of Individual and Mixtures of the Main Polyphenolic Compounds Found in Chilean Propolis. *BioMed Res. Int.* **2019**, *2019*, 7602343. [[CrossRef](#)]
99. Zhang, J.; Huang, X.; Huang, S.; Deng, M.; Xie, X.; Liu, M.; Liu, H.; Zhou, X.; Li, J.; Ten Cate, J.M. Changes in composition and enamel demineralization inhibition activities of gallic acid at different pH values. *Acta Odontol. Scand.* **2015**, *73*, 595–601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Huang, X.-L.; Liu, M.-D.; Li, J.-Y.; Zhou, X.-D.; ten Cate, J.M. Chemical composition of *Galla chinensis* extract and the effect of its main component(s) on the prevention of enamel demineralization in vitro. *Int. J. Oral Sci.* **2012**, *4*, 146–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Gao, S.S.; Qian, L.M.; Huang, S.B.; Yu, H.Y. Effect of gallic acid on the wear behavior of early carious enamel. *Biomed. Mater.* **2009**, *4*, 034101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Tang, B.; Yuan, H.; Cheng, L.; Zhou, X.; Huang, X.; Li, J. Effects of gallic acid on the morphology and growth of hydroxyapatite crystals. *Arch. Oral Biol.* **2015**, *60*, 167–173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Tang, B.; Yuan, H.; Cheng, L.; Zhou, X.; Huang, X.; Li, J. Control of hydroxyapatite crystal growth by gallic acid. *Dent. Mater. J.* **2015**, *34*, 108–113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Juntavee, A.; Peerapattana, J.; Ratanathongkam, A.; Nualkaew, N.; Chatchiwattana, S.; Treesuwan, P. The Antibacterial Effects of Apacaries Gel on *Streptococcus mutans*: An in vitro Study. *Int. J. Clin. Pediatr. Dent.* **2014**, *7*, 77–81. [[CrossRef](#)]
105. Porto, I.C.C.M.; Nascimento, T.G.; Oliveira, J.M.S.; Freitas, P.H.; Haimeur, A.; França, R. Use of polyphenols as a strategy to prevent bond degradation in the dentin-resin interface. *Eur. J. Oral Sci.* **2018**, *126*, 146–158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

106. He, L.; Deng, D.; Zhou, X.; Cheng, L.; ten Cate, J.M.; Li, J.; Li, X.; Crielaard, W. Novel tea polyphenol-modified calcium phosphate nanoparticle and its remineralization potential. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2015**, *103*, 1525–1531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Guo, B.; Que, K.-H.; Yang, J.; Wang, B.; Liang, Q.-Q.; Xie, H.-H. Effect of *Galla chinensis* on the remineralization of two bovine root lesions morphous in vitro. *Int. J. Oral Sci.* **2012**, *4*, 152–156. [[CrossRef](#)]
108. Li, Y.; Jiang, X.; Hao, J.; Zhang, Y.; Huang, R. Tea polyphenols: Application in the control of oral microorganism infectious diseases. *Arch. Oral Biol.* **2019**, *102*, 74–82. [[CrossRef](#)]
109. Cheng, L.; Li, J.; He, L.; Zhou, X. Natural products and caries prevention. *Caries Res.* **2015**, *49* (Suppl. 1), 38–45. [[CrossRef](#)]
110. Slobodníková, L.; Fialová, S.; Rendeková, K.; Kováč, J.; Mučaji, P. Antibiofilm Activity of Plant Polyphenols. *Molecules* **2016**, *21*, 1717. [[CrossRef](#)]
111. Daglia, M.; Papetti, A.; Mascherpa, D.; Grisoli, P.; Giusto, G.; Lingström, P.; Pratten, J.; Signoreto, C.; Spratt, D.A.; Wilson, M.; et al. Plant and fungal food components with potential activity on the development of microbial oral diseases. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, *2011*, 274578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Friedman, M. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, *51*, 116–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Okubo, S.; Toda, M.; Hara, Y.; Shimamura, T. Antifungal and fungicidal activities of tea extract and catechin against Trichophyton. *Nippon Saikingaku Zasshi* **1991**, *46*, 509–514. [[CrossRef](#)]
114. Signoreto, C.; Burlacchini, G.; Bianchi, F.; Cavalleri, G.; Canepari, P. Differences in microbiological composition of saliva and dental plaque in subjects with different drinking habits. *New Microbiol.* **2006**, *29*, 293–302. [[PubMed](#)]
115. Ferrazzano, G.F.; Amato, I.; Ingenito, A.; De Natale, A.; Pollio, A. Anti-cariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea). *Fitoterapia* **2009**, *80*, 255–262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Jazaeri, M.; Pakdek, F.; Rezaei-Soufi, L.; Abdolsamadi, H.; Rafieian, N. Cariostatic effect of green tea in comparison with common anticariogenic agents: An in vitro study. *J. Dent. Res. Dent. Clin. Dent. Prospect.* **2015**, *9*, 44–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Ferrazzano, G.F.; Roberto, L.; Amato, I.; Cantile, T.; Sangianantoni, G.; Ingenito, A. Antimicrobial properties of green tea extract against cariogenic microflora: An in vivo study. *J. Med. Food* **2011**, *14*, 907–911. [[CrossRef](#)]
118. Hambire, C.U.; Jawade, R.; Patil, A.; Wani, V.R.; Kulkarni, A.A.; Nehete, P.B. Comparing the antiplaque efficacy of 0.5% *Camellia sinensis* extract, 0.05% sodium fluoride, and 0.2% chlorhexidine gluconate mouthwash in children. *J. Int. Soc. Prev. Community Dent.* **2015**, *5*, 218–226. [[CrossRef](#)]
119. Lee, M.-J.; Lambert, J.D.; Prabhu, S.; Meng, X.; Lu, H.; Maliakal, P.; Ho, C.-T.; Yang, C.S. Delivery of tea polyphenols to the oral cavity by green tea leaves and black tea extract. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2004**, *13*, 132–137. [[CrossRef](#)]
120. 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.* **1990**, *38*, 717–720. [[CrossRef](#)]
121. Sakanaka, S.; Shimura, N.; Aizawa, M.; Kim, M.; Yamamoto, T. Preventive Effect of Green Tea Polyphenols against Dental Caries in Conventional Rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1992**, *56*, 592–594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Goenka, P.; Sarawgi, A.; Karun, V.; Nigam, A.G.; Dutta, S.; Marwah, N. *Camellia sinensis* (Tea): Implications and role in preventing dental decay. *Pharm. Rev.* **2013**, *7*, 152–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Matsumoto, M.; Hamada, S.; Ooshima, T. Molecular analysis of the inhibitory effects of oolong tea polyphenols on glucan-binding domain of recombinant glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* MT8148. *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, *228*, 73–80. [[CrossRef](#)]
124. Ooshima, T.; Minami, T.; Matsumoto, M.; Fujiwara, T.; Sobue, S.; Hamada, S. Comparison of the cariostatic effects between regimens to administer oolong tea polyphenols in SPF rats. *Caries Res.* **1998**, *32*, 75–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Ooshima, T.; Minami, T.; Aono, W.; Izumitani, A.; Sobue, S.; Fujiwara, T.; Kawabata, S.; Hamada, S. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with *mutans streptococci*. *Caries Res.* **1993**, *27*, 124–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Ooshima, T.; Minami, T.; Aono, W.; Tamura, Y.; Hamada, S. Reduction of dental plaque deposition in humans by oolong tea extract. *Caries Res.* **1994**, *28*, 146–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Signoreto, C.; Bianchi, F.; Burlacchini, G.; Sivieri, F.; Spratt, D.; Canepari, P. Drinking habits are associated with changes in the dental plaque microbial community. *J. Clin. Microbiol.* **2010**, *48*, 347–356. [[CrossRef](#)]

128. Gaur, S.; Agnihotri, R. Green tea: A novel functional food for the oral health of older adults. *Geriatr. Gerontol. Int.* **2014**, *14*, 238–250. [[CrossRef](#)]
129. Papetti, A.; Pruzzo, C.; Daglia, M.; Grisoli, P.; Bacciaglia, A.; Repetto, B.; Dacarro, C.; Gazzani, G. Effect of barley coffee on the adhesive properties of oral streptococci. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 278–284. [[CrossRef](#)]
130. Stauder, M.; Papetti, A.; Daglia, M.; Vezzulli, L.; Gazzani, G.; Varaldo, P.E.; Pruzzo, C. Inhibitory activity by barley coffee components towards *Streptococcus mutans* biofilm. *Curr. Microbiol.* **2010**, *61*, 417–421. [[CrossRef](#)]
131. Daglia, M.; Papetti, A.; Grisoli, P.; Aceti, C.; Dacarro, C.; Gazzani, G. Antibacterial activity of red and white wine against oral streptococci. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 5038–5042. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Chikte, U.M.E.; Naidoo, S.; Kolze, T.J.; Grobler, S.R. Patterns of tooth surface loss among winemakers. *SADJ* **2005**, *60*, 370–374. [[PubMed](#)]
133. Borges, A.; Caneppele, T.; Luz, M.; Pucci, C.; Torres, C. Color stability of resin used for caries infiltration after exposure to different staining solutions. *Oper. Dent.* **2014**, *39*, 433–440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Di Lorenzo, A.; Bloise, N.; Meneghini, S.; Sureda, A.; Tenore, G.C.; Visai, L.; Arciola, C.R.; Daglia, M. Effect of Winemaking on the Composition of Red Wine as a Source of Polyphenols for Anti-Infective Biomaterials. *Materials* **2016**, *9*, 316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Tagashira, M.; Uchiyama, K.; Yoshimura, T.; Shirota, M.; Uemitsu, N. Inhibition by hop bract polyphenols of cellular adherence and water-insoluble glucan synthesis of *mutans streptococci*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1997**, *61*, 332–335. [[CrossRef](#)]
136. Shinada, K.; Tagashira, M.; Watarabe, H.; Sopapomorn, P.; Kanayama, A.; Kanda, T.; Ikeda, M.; Kawaguchi, Y. Hop bract polyphenols reduced three-day dental plaque regrowth. *J. Dent. Res.* **2007**, *86*, 848–851. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Kholkhal, W.; Ilias, F.; Traore, B.; Bekkara, F.A.; Bekhechi, C. *Salvadora persica*: A rich medicinal plant of polyphenols and alkaloids with biological activity. *Nat. Prod. Indian J.* **2010**, *6*, 136–142.
138. Khalil, M.A.; El-Sabbagh, M.S.; El Naggar, E.B.; El-Erian, R.H. Antibacterial activity of *Salvadora persica* against oral pathogenic bacterial isolates. *Niger. J. Clin. Pract.* **2019**, *22*, 1378–1387. [[CrossRef](#)]
139. Schött, G.; Liesegang, S.; Gaunitz, F.; Gleß, A.; Basche, S.; Hannig, C.; Speer, K. The chemical composition of the pharmacologically active *Thymus* species, its antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and the antiadherent effects of *T. vulgaris* on the bacterial colonization of the in situ pellicle. *Fitoterapia* **2017**, *121*, 118–128. [[CrossRef](#)]
140. Yamamoto, H.; Ogawa, T. Antimicrobial activity of perilla seed polyphenols against oral pathogenic bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2002**, *66*, 921–924. [[CrossRef](#)]
141. Yamaguti-Sasaki, E.; Ito, L.A.; Canteli, V.C.D.; Ushirobira, T.M.A.; Ueda-Nakamura, T.; Dias Filho, B.P.; Nakamura, C.V.; de Mello, J.C.P. Antioxidant capacity and in vitro prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*. *Molecules* **2007**, *12*, 1950–1963. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Matsumoto-Nakano, M.; Nagayama, K.; Kitagori, H.; Fujita, K.; Inagaki, S.; Takashima, Y.; Tamesada, M.; Kawabata, S.; Ooshima, T. Inhibitory effects of *Oenothera biennis* (evening primrose) seed extract on *Streptococcus mutans* and *S. mutans*-induced dental caries in rats. *Caries Res.* **2011**, *45*, 56–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Konaté, K.; Zerbo, P.; Ouédraogo, M.; Dibala, C.I.; Adama, H.; Sytar, O.; Brestic, M.; Barro, N. Anti-nociceptive properties in rodents and the possibility of using polyphenol-rich fractions from *Sida urens* L. (Malvaceae) against of dental caries bacteria. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **2013**, *12*, 14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Wittpahl, G.; Kölling-Speer, I.; Basche, S.; Hermann, E.; Hannig, M.; Speer, K.; Hannig, C. The Polyphenolic Composition of *Cistus incanus* Herbal Tea and Its Antibacterial and Anti-adherent Activity against *Streptococcus mutans*. *Planta Med.* **2015**, *81*, 1727–1735. [[CrossRef](#)]
145. Damiano, S.; Forino, M.; De, A.; Vitali, L.A.; Lupidi, G.; Tagliatalata-Scafati, O. Antioxidant and antibiofilm activities of secondary metabolites from *Ziziphus jujuba* leaves used for infusion preparation. *Food Chem.* **2017**, *230*, 24–29. [[CrossRef](#)]
146. Dadpe, M.V.; Dhore, S.V.; Dahake, P.T.; Kale, Y.J.; Kendre, S.B.; Siddiqui, A.G. Evaluation of antimicrobial efficacy of *Trachyspermum ammi* (Ajwain) oil and chlorhexidine against oral bacteria: An in vitro study. *J. Indian Soc. Pedod. Prev. Dent.* **2018**, *36*, 357–363.
147. Klinke, T.; Kneist, S.; de Soet, J.J.; Kuhlisch, E.; Mauersberger, S.; Forster, A.; Klimm, W. Acid production by oral strains of *Candida albicans* and lactobacilli. *Caries Res.* **2009**, *43*, 83–91. [[CrossRef](#)]
148. Farkash, Y.; Feldman, M.; Ginsburg, I.; Steinberg, D.; Shalish, M. Green Tea Polyphenols and Padma Hepaten Inhibit *Candida albicans* Biofilm Formation. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2018**, *2018*, 1690747. [[CrossRef](#)]

149. Farkash, Y.; Feldman, M.; Ginsburg, I.; Steinberg, D.; Shalish, M. Polyphenols Inhibit *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* Biofilm Formation. *Dent. J.* **2019**, *7*, 42. [[CrossRef](#)]
150. Pinna, R.; Filigheddu, E.; Juliano, C.; Palmieri, A.; Manconi, M.; D'hallewin, G.; Petretto, G.; Maioli, M.; Caddeo, C.; Manca, M.L.; et al. Antimicrobial Effect of Thymuscapitatus and Citruslimon var. pompia as Raw Extracts and Nanovesicles. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 234. [[CrossRef](#)]
151. Philip, N.; Leishman, S.J.; Bandara, H.; Walsh, L.J. Polyphenol-Rich Cranberry Extracts Modulate Virulence of *Streptococcus mutans*-*Candida albicans* Biofilms Implicated in the Pathogenesis of Early Childhood Caries. *Pediatr. Dent.* **2019**, *41*, 56–62.
152. Alalwan, H.; Rajendran, R.; Lappin, D.F.; Combet, E.; Shahzad, M.; Robertson, D.; Nile, C.J.; Williams, C.; Ramage, G. The Anti-Adhesive Effect of Curcumin on *Candida albicans* Biofilms on Denture Materials. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Yu, H.; Oho, T.; Xu, L.X. Effects of several tea components on acid resistance of human tooth enamel. *J. Dent.* **1995**, *23*, 101–105. [[CrossRef](#)]
154. Giacaman, R.A.; Contzen, M.P.; Yuri, J.A.; Muñoz-Sandoval, C. Anticaries effect of an antioxidant-rich apple concentrate on enamel in an experimental biofilm-demineralization model. *J. Appl. Microbiol.* **2014**, *117*, 846–853. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Hannig, C.; Spitzmüller, B.; Knausenberger, S.; Hoth-Hannig, W.; Hellwig, E.; Hannig, M. Detection and activity of peroxidase in the in situ formed enamel pellicle. *Arch. Oral Biol.* **2008**, *53*, 849–858. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Hannig, C.; Spitzmüller, B.; Hoth-Hannig, W.; Hannig, M. Targeted immobilisation of lysozyme in the enamel pellicle from different solutions. *Clin. Oral Investig.* **2011**, *15*, 65–73. [[CrossRef](#)]
157. Hannig, C.; Sorg, J.; Spitzmüller, B.; Hannig, M.; Al-Ahmad, A. Polyphenolic beverages reduce initial bacterial adherence to enamel in situ. *J. Dent.* **2009**, *37*, 560–566. [[CrossRef](#)]
158. Balata, G.F.; Abdelhady, M.I.S.; Mahmoud, G.M.; Matar, M.A.; Abd El-Latif, A.N. Formulation of Saudi Propolis into Biodegradable Chitosan Chips for Vital Pulpotomy. *Curr. Drug Deliv.* **2018**, *15*, 97–109. [[CrossRef](#)]
159. Guo, J.; Suàstegui, M.; Sakimoto, K.K.; Moody, V.M.; Xiao, G.; Nocera, D.G.; Joshi, N.S. Light driven fine chemical production in yeast biohybrids. *Science* **2018**, *362*, 813–816. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Chapitre II : La modification du « Mineral Trioxide Aggregate » (MTA) par de l'acide tannique

2.1. Introduction

Les ciments dentaires de réparation radiculaire doivent avoir plusieurs propriétés physiques, chimiques et biologiques [1]. Ces ciments sont utilisés dans plusieurs traitements endodontiques tel que l'apex ouvert, le coiffage pulpaire, la résorption de la racine dentaire, la pulpotomie et l'apicectomie [2-6]. Le temps de prise de ces ciments ne doit pas être long [1, 7], idéalement il ne devrait pas dépasser 30-60 min d'un point de vue empirique et clinique. Différents aditifs et plastifiants ont été utilisés afin de diminuer le temps de prise et faciliter la maniabilité de ces ciments [7, 8]. Plusieurs matériaux sont utilisés comme ciments de réparation canalaires avec plusieurs compositions chimiques à base de silicate de calcium, carbonate de calcium, plusieurs oxydes minéraux et ionomères de verre [9, 10]. Le « Mineral trioxide aggregate » (MTA) est un matériau utilisé dans plusieurs traitements endodontiques et il est considéré comme « gold standard material » grâce à ses propriétés physico-chimiques et biologiques [1, 8]. MTA est un matériau biocéramique dont la composition est basée sur des silicates de calcium [11]. La version traditionnelle de ce matériau contient de l'oxyde de bismuth, qui joue le rôle de radio-opacifiant. Cet oxyde de bismuth peut décolorer la dent et la gencive et altérer les propriétés physico-chimiques et biologiques de ce matériau [12-14]. Des nouvelles formulations de MTA ont été mises sur le marché dentaire en remplaçant l'oxyde de bismuth par le tungstate de calcium afin d'éviter les désavantages de l'oxyde de bismuth [7, 8]. De plus, l'eau permettant la prise du MTA est complétée par l'addition d'un plastifiant organique afin d'améliorer sa maniabilité [15]. Plusieurs additifs organiques, y compris les polyphénols, ont été utilisés dans le domaine dentaire afin d'améliorer les propriétés biologiques et physicochimiques des matériaux dentaires [16, 17]. L'acide tannique qui se

compose de composants poly-phénoliques naturels et qui a des rôles antigéniques, anti-inflammatoires, antibactériens et antioxydants, a été utilisé largement dans le milieu médical et l'industriel [18-20]. Le but de cette étude était de rajouter différentes fractions massiques d'acide tannique au MTA afin de raccourcir son temps de prise, et voir l'influence sur sa morphologie et ses propriétés physicochimiques.

2.2. Matériel et méthodes

2.2.1. Matériel et préparations

Le MTA (Itena Clinical, Paris, France) a été modifié par ajout d'acide tannique. La variable de l'étude étant la fraction massique en acide tannique (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) (Figs. 8a et b, Tableau 1).

| Groupes | MTA 100% | MTA 94% | MTA 87,50 | MTA 81,25 | MTA 75% |
|--------------|----------|---------|-----------|-----------|---------|
| MTA (mg) | 24 | 22,56 | 21 | 19,50 | 18 |
| AT (mg) | 0 | 1,44 | 3 | 4,50 | 6 |
| Liquide (µl) | 120 | | | | |

Tableau 1. Les différentes fractions massiques d'acide tannique incorporées dans le MTA.

La poudre d'acide tannique, issue du produit commercial sans purification a été mélangée avec le liquide du MTA pendant 1 min. Par conséquent, la solution d'acide tannique a été mélangée avec la poudre de MTA pendant 1 min en utilisant une spatule (Fig. 8c).

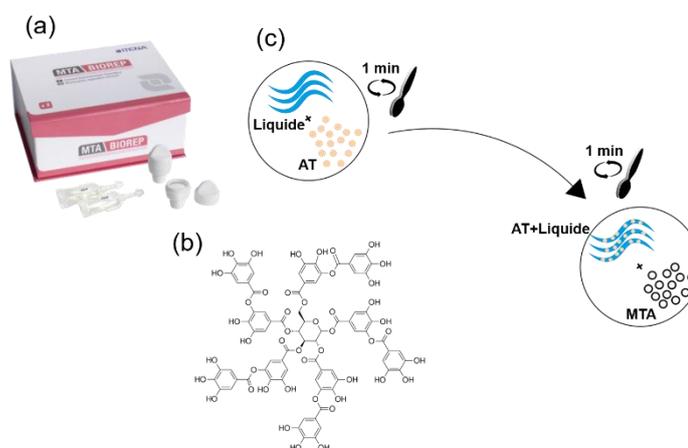


Figure 8. (a, b) Les matériaux utilisés ; (c) La préparation du MTA avec l'acide tannique.

2.2.2. Changement de couleur

Après avoir mélangé le MTA avec les solutions contenant de l'acide tannique, le mélange a été compacté dans des moules en téflon. Après 25 min, la photo du changement de couleur du mélange MTA+AT a été prise à l'aide d'un appareil photographique.

2.2.3. Mesures de pH

Immédiatement après le mélange entre MTA et l'AT, le ciment a été inséré dans des tubes de polyéthylène (diamètre de 1,6 mm et longueur de 10 mm) en utilisant une spatule et une lime endodontique (lime-K). Les tubes ont été examinés en utilisant une radiographie pour vérifier l'absence de vide (la qualité d'obturation) (Figs. 9a et b). Les échantillons sélectionnés ont ensuite été mis dans des petites bouteilles en verre contenant 10 mL d'eau distillée (pH=6.8). Le pH de l'eau qui est en contact avec les différents composites a été pris après 3, 24, 72 et 168 heures d'immersion avec un pH mètre (Fig. 9c).



Figure 9. (a) une image radiographique montrant les tubes vides ; (b) une image radiographique montrant les tubes remplis avec les composites MTA+AT ; (c) pH mètre.

2.2.4. Morphologie et composition chimique

Les composites incorporant différentes fractions massiques d'AT ont été compactés dans des moules en téflon (Fig. 10a). Après le temps de prise initial du MTA (15 min, selon le

fabriquant), les échantillons ont été montés sur des portes échantillons en aluminium. Ils ont ensuite été métallisés avec de l'or-palladium (20%/80%) en utilisant un métalliseur Hummer JR (Technics, CA, USA) (Fig. 10b). La morphologie de surface des différents composites a été visualisée par l'utilisation d'un microscope électronique à balayage (MEB ; FEI Company, Eindhoven, The Netherlands) avec un faisceau d'électrons accélérés sous une différence de potentiel de 10 kV (Fig. 10c). Lors des observations effectuées avec le MEB, des analyses chimiques de la surface ont été faites en utilisant le mode microanalyse X ; EDX. Toutes les analyses chimiques ont été faites en respectant une distance de travail de 10 mm entre l'échantillon et le détecteur et un temps d'acquisition de 60s.

Des analyses thermogravimétriques (ATG) ont été effectuées pour les échantillons de MTA sans acide tannique et pour l'échantillon MTA+25%AT. Ces deux échantillons ont été utilisés à l'état sec et immergés dans l'eau pendant 24h afin de mesurer le pourcentage d'eau et d'acide tannique. La température a été augmentée de 25°C jusqu'à 700°C sous un flux d'azote. Ces deux échantillons ont été broyés sous forme de poudre avant l'analyse en utilisant un mortier (Fig. 10d).

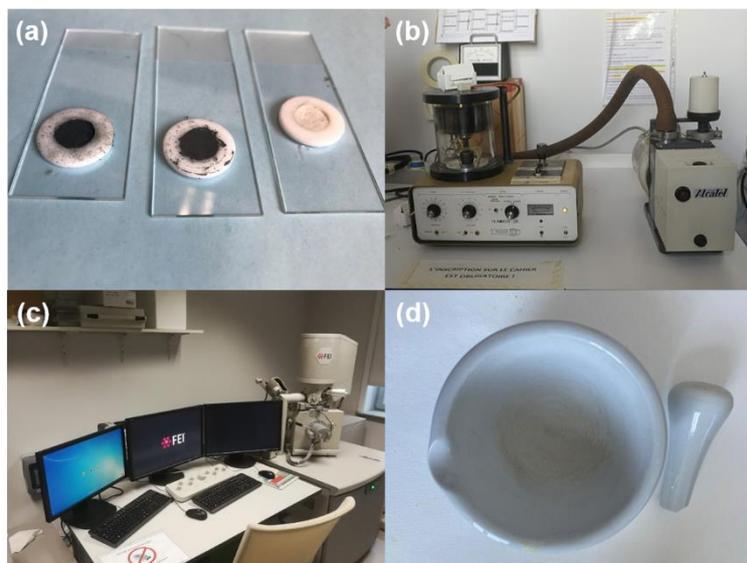


Figure 10. (a) Les composites compactés dans des moules en téflon ; (b) Le métalliseur Hummer ; (c) Le microscope électronique à balayage (MEB) ; (d) Le mortier et pilon utilisés pour la préparation des différents composites broyés pour l'analyse thermogravimétrique.

2.2.5. Temps de prise

Le temps de prise du MTA, des composites MTA+12,5%AT et MTA+25%AT a été mesuré à l'aide d'un rhéomètre dynamique (Malvern, UK) (Fig. 11a). La même quantité de chaque composite (24 mg) a été utilisée pour chaque expérience. Après une minute de mélange sur le plateau inférieur (en acier inox), le cône a été mis en contact avec le matériau étudié (4 cm de diamètre et 176° de l'angle) de manière à ce que la distance entre l'apex du cône et le plateau soit égale à 150 μm (Figs. 11b et c). La fréquence de mesure a été ajustée à 1 Hz pour une déformation de cisaillement constante et égale à 1%.

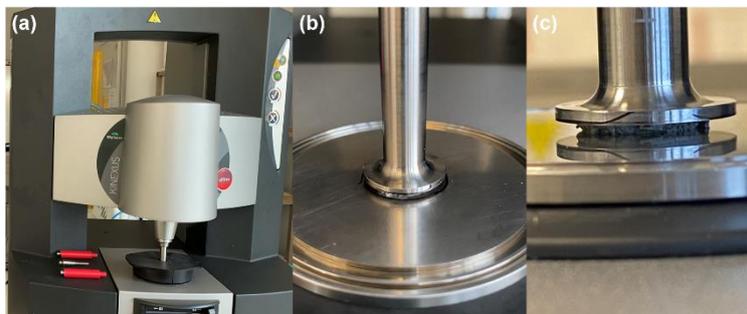


Figure 11. (a) Le rhéomètre ; (b, c) Les différents composites entre les deux plateaux du rhéomètre.

2.2.6. Propriétés mécaniques

La résistance à la compression des différents composites MTA + AT a été évaluée afin d'étudier l'influence du polyphénol. Des échantillons cylindriques (3 mm de diamètre et 3,58 mm d'hauteur) ont été préparés en utilisant des moules en téflon (Fig. 12a) au-dessus d'une lame de verre afin d'avoir des surfaces planes. Les échantillons ont été conservés à 37°C pendant 6h. Les cylindres des matériaux à étudier ont été sortis de leurs moules et ils ont été examinés au microscope pour éliminer les échantillons endommagés ou des échantillons contenant des vides (Fig. 12b). Les cylindres ainsi sélectionnés ont été testés dans deux différentes conditions : à sec et après immersion dans l'eau pendant 24h. Les échantillons ont été soumis à un essai de compression uni-axial afin de déterminer la rigidité du ciment et la charge maximale avant rupture (Figs. 12c et d). Ces essais ont été réalisés avec la machine de traction Instron 3345

(Norwood, MA, USA) instrumentée avec un dynamomètre limité à 1kN (Classe 0.5 selon ISO 7500-1) et avec un capteur de déplacement. Les essais ont été réalisés à une vitesse constante de compression égale à 0,5 mm/min. La déformation a été calculée à partir du déplacement de la traverse. Une caméra (Allied Vision, Stadroda, Allemagne) a été utilisée pour mesurer les dimensions de l'éprouvette afin d'éviter tout dommage initial qui pourrait être causé par les méthodes de mesure dimensionnelle standard. La contrainte de compression a été calculée selon la relation :

$$\sigma_c = \frac{4P}{\pi D_0^2}$$

où P est la charge enregistrée pendant l'essai et D_0 est le diamètre initial de l'échantillon. La déformation en compression a été calculée à l'aide de la relation suivante :

$$\varepsilon_c = \left| \frac{\delta L}{L_0} \right|$$

où δ est le déplacement enregistré de la traverse et L_0 est la hauteur initiale de l'échantillon.

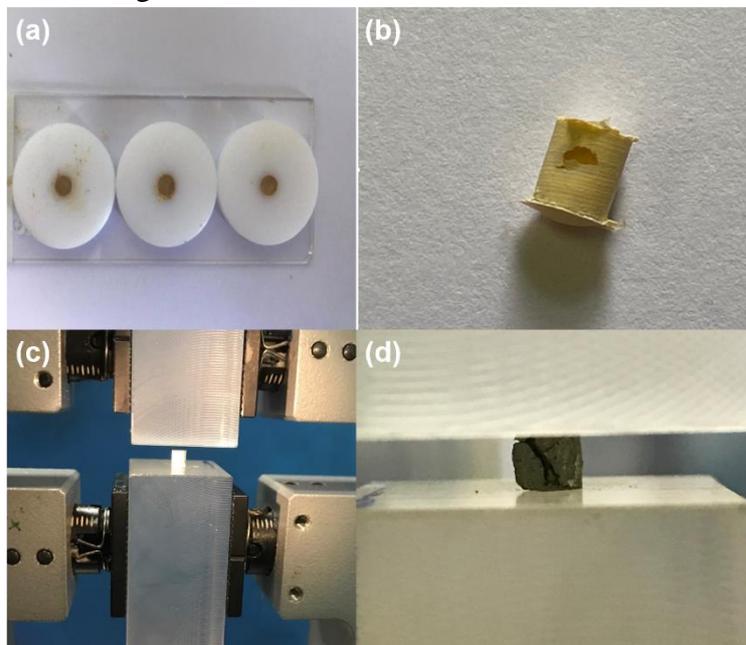


Figure 12. (a) Les moules en téflon remplis avec les composites (3 mm de diamètre et 3,58 mm de hauteur) ; (b) Un exemple d'échantillon endommagé ; (c) Les échantillons entre les deux plateaux de la machine de compression avant le test ; (d) les échantillons après le test de résistance à la compression.

2.2.7. Adsorption d'eau

Les composites MTA+AT ont été compactés dans des moules en téflon à l'aide d'une spatule sur une lame de verre afin d'avoir une surface plane. Les échantillons ont été conservés dans une boîte hermétique pendant 24h. L'angle de contact et l'adsorption d'une goutte de l'eau distillée (5 μ L) sur la surface de l'échantillon ont été mesurés à l'aide d'un goniomètre à angle de contact (Attention Theta, Biolin Scientific, Göteborg, Sweden) (Fig. 13a). La goutte a été déposée à l'aide d'une aiguille (0,7 mm de diamètre) sur la surface de l'échantillon (Fig. 13b). Une vidéo permettant de suivre le profil d'étalement de la goutte sur la surface (Fig. 13c) a été enregistrée et le temps nécessaire à l'adsorption complète de la goutte dans l'échantillon a été mesuré.

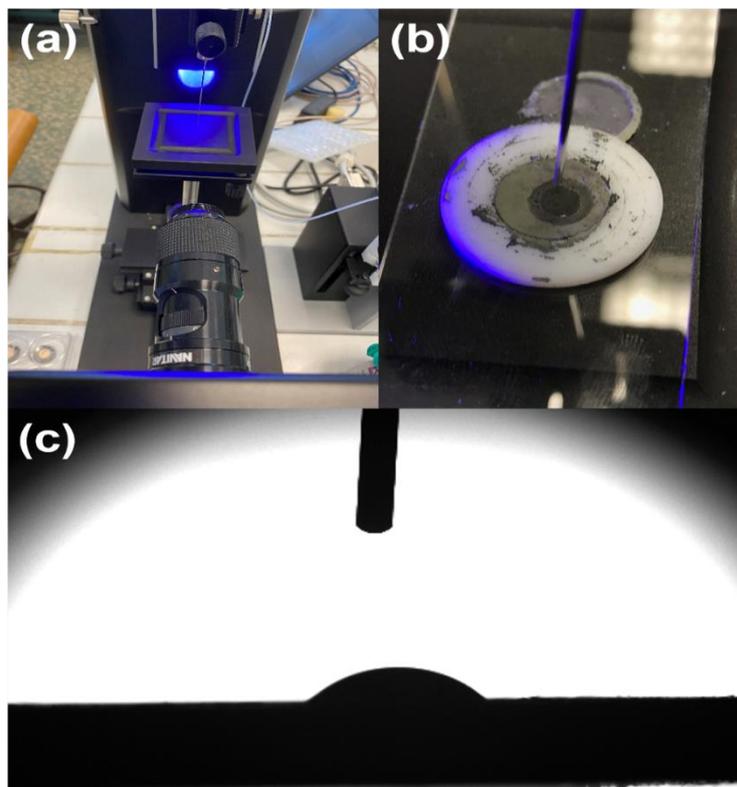


Figure 13. (a) Le goniomètre à angle de contact ; (b) La goutte d'eau distillée sur la surface de l'échantillon ; (c) Instantané photographique du profil de la goutte d'eau distillée (volume initial : 5 μ L).

2.2.8. Tomographie aux rayons X

Des échantillons (3 mm de diamètre et 3,58 mm d'hauteur) de MTA et d'un composite MTA+25%AT ont été préparés et conservés à sec ou dans l'eau à 37°C pendant 24h. La structure interne de l'échantillon a été analysée par un tomographe aux rayons X (μ CT, EasyTom 160, RX Solutions, Chavanod, France). Les analyses ont été faites avec des rayons à un voltage de 45 kV et sous un courant de 160 μ A en utilisant un tube de micro-focus équipé d'un filament de tungstène. La taille du voxel a été adaptée à 2,1 μ m. Le logiciel Xact64 (RX solutions, Chavanod, France) a été utilisé pour reconstituer les éléments de volume des composites après une série de traitements de données. Pour cela, le logiciel Avizo a été utilisé pour traiter l'image obtenue afin de :

- (i) : de débruirer les images avec un filtre médian ;
- (ii) : de segmenter l'intensité des images pour révéler les objets d'intérêt (pores ou inclusions) ;
- (iii) : d'enlever les petits objets insignifiants ;
- (iv) : de déterminer les propriétés géométriques 3D des objets (volume, diamètre équivalent, densité...) identifiés.

2.2.9. Libération d'acide tannique dans l'eau

Une courbe d'étalonnage reliant la concentration d'AT dans l'eau à l'absorbance de la solution (Fig. 14a) a été établie à partir d'une solution mère d'AT à 0,05 mg/mL dans l'eau distillée. Les mesures d'absorbance ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre mc² (SAFAS, Monaco) non seulement pour l'établissement de la courbe d'étalonnage mais aussi pour mesurer la fraction massique d'AT libérée de différents composites dans l'eau distillée en contact avec le composite. Des échantillons de différents composites (3 mm de diamètre et 3,58 mm d'hauteur) ont été immergés dans 10 mL d'eau distillée pendant 1, 2, 4, 18, 24, 48 et 72h (Fig. 14b). Un mL de chaque solution en contact avec les différents composites a été dilué 10 fois

dans l'eau distillée et l'absorbance de la solution diluée d'AT a été mesurée à la longueur d'onde de 274 nm correspondant au pic d'absorbance de l'AT.

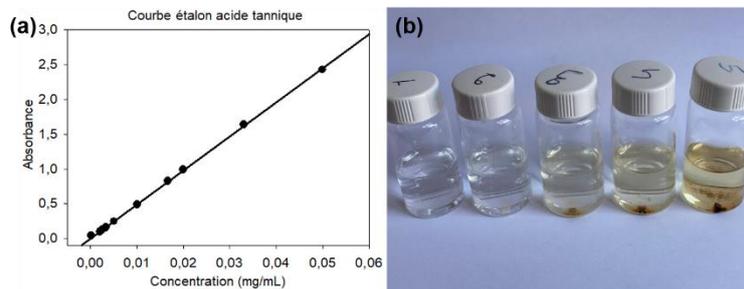


Figure 14. (a) La courbe d'étalonnage de l'AT dans l'eau ; (b) Les solutions en contact avec les différents composites après 72h d'immersion.

2.2.10. Activités antibactériennes

2.2.10.1. Les souches bactériennes

Enterococcus faecalis (*E. faecalis*) a été cultivé selon un protocole standard en utilisant le milieu Brain Heart Infusion "BHI". La turbidité du BHI contenant *E. faecalis* a été ajustée à une « densité optique » de 0,5 à la longueur d'onde de 600 nm.

2.2.10.2. Le test de contact direct

Des échantillons du MTA, du MTA + 12,5% en AT et du MTA + 25% en AT ont été placés dans des Eppendorfs de 2 mL. Un millilitre de milieu bactérien (*E. faecalis*) a été injecté dans chaque Eppendorf. Dans le contrôle, le milieu bactérien a été placé dans le tube Eppendorf sans aucun composite. Après cela, les tubes Eppendorf ont été incubés pendant 24 h à 37 °C sous agitation constante (450 rpm). Après la période d'incubation (24h), dix microlitres de chaque solution ont été prélevés et dilués en série 10 fois jusqu'à un facteur de 10^5 dans BHI, puis 100 μ L de la solution diluée ont été étalés de manière homogène sur une boîte de Pétri. Les plaques ont été incubées à 37 °C pendant 24 h. Après incubation, les colonies sur la plaque ont été comptées et leur UFC/mL a été déterminé.

2.3. Résultats et discussion

L'ajout d'acide tannique (AT) jusqu'à une fraction massique de 25% par rapport au MTA a permis de produire des composites compacts qui peuvent être utilisés comme ciments de réparation canalair. Les fractions massiques plus élevées en AT ne permettent pas de former un ciment compact, probablement en relation avec la réduction de la quantité d'eau disponible qui est utilisée simultanément pour dissoudre l'AT et faire durcir le ciment.

Les ciments à base de MTA préparés en présence d'AT subissent un changement de couleur (Fig.15a). Ce changement visuel dans les matériaux à base de MTA est dû à l'incorporation d'AT. Ce changement de couleur peut être un inconvénient pour des raisons esthétiques, ce n'est cependant pas car le MTA est incorporé dans la partie radiculaire des dents et n'est donc pas accessible à inspection visuelle. Tous ces ciments, lorsqu'ils sont mis en contact avec l'eau induisent une augmentation de pH (Fig.15b) comme d'autres ciments de composition proche de celle du MTA [21]. La chaux (CaO) contenue dans le MTA subit une réaction d'hydrolyse dans l'eau pour produire de l'hydroxyde de calcium hautement soluble et à l'origine de l'augmentation du pH [22]. Cependant, lorsque l'AT est incorporé en tant que composant du mélange initial, le pH de l'eau en contact avec le ciment est réduit par rapport à la valeur obtenue en présence de MTA seul. Ce résultat peut être lié à l'interaction de l'AT avec la surface des particules de CaO aussi bien qu'avec la surface de presque tous les matériaux connus y compris les métaux et les polymères [18]. Nous supposons que la forte diminution du pH du MTA dopé au AT est due à un effet protecteur du AT permettant de ralentir l'hydrolyse du CaO. Lorsque l'acide tannique est présent dans un environnement à pH élevé (Fig.15b) et en présence d'oxygène dissous agissant comme un oxydant, l'acide tannique subit un processus d'oxydation et un changement de couleur. Ce changement visuel dans les matériaux à base de MTA est clairement dû à l'incorporation d'AT (Fig.15a).

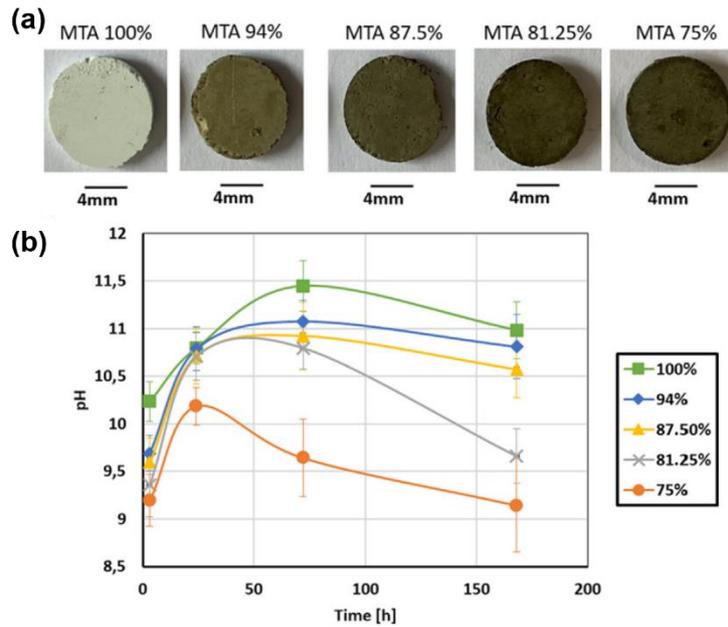


Figure 15. (a) Changement de couleur du MTA dopé avec différentes fractions massiques en acide tannique ; (b) Changement du pH de l'eau en contact avec les différents composites en fonction du temps.

En plus du changement de couleur et du pH de la solution en contact avec le matériau, la morphologie de surface de différents composites a été modifiée en présence d'AT. Une réduction de la taille moyenne des grains constituant le composite est observé (Fig. 16a).

De plus, une estimation semi-quantitative de la teneur en calcium et en carbone a été réalisée par analyse EDX. Une diminution presque linéaire de la teneur en Ca et une augmentation linéaire de la teneur en C lors de l'incorporation d'une fraction massique plus élevée en AT dans le mélange initial a été obtenue (Fig. 16b). Ces résultats, conformes aux espérances, signifient qu'une masse donnée de ciment MTA devrait avoir une capacité donnée à interagir avec l'AT et à modifier ses propriétés.

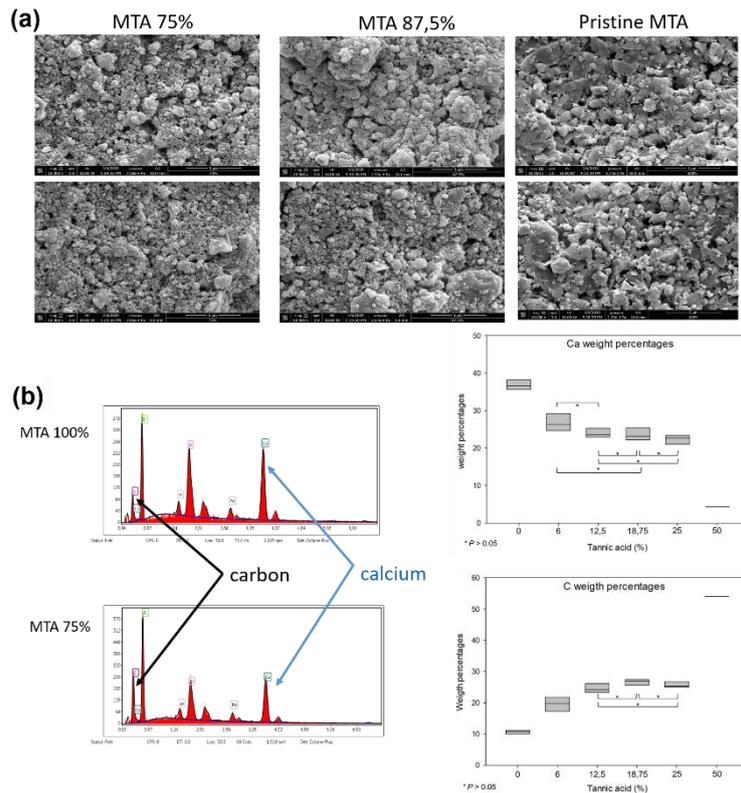


Figure 16. (a) Micrographies électroniques par balayage montrant le changement de morphologie du MTA dopé avec différentes fractions massiques en acide tannique ; (b) : Variation de la composition chimique de différents composites obtenue par analyse élémentaire en MEB (EDX).

Le temps de prise du ciment, déterminé par rhéologie sous cisaillement est significativement affecté par l'addition du polyphénol. La présence d'AT dans la formulation accélère le temps de prise des ciments MTA. En effet, en l'absence du polyphénol, la cinétique de prise présente une phase de latence typique d'une nucléation suivie d'un processus de croissance cristalline [23]. Cependant, en présence de 12,5% d'AT en masse (échantillons MTA 87,5%) et de 25% d'AT (échantillons MTA 75%), le début de prise du ciment est plus court que le temps nécessaire pour démarrer la mesure (2 min après la fin du mélange des différents composants) et une valeur palier du module de conservation est rapidement atteinte sans l'observation d'une phase de latence (Fig. 17). Cette accélération de la prise du ciment est d'un grand intérêt dans l'application dentaire de ciment. La diminution de la taille des grains quand la fraction massique en AT augmente peut affecter significativement les propriétés mécaniques du ciment. Un temps de prise plus court (Fig. 17) et un changement de la morphologie des grains (Fig. 16 a) sont de

fortes indications que l'addition du polyphénol entraîne une modification de surface des particules constituant le MTA. La présence d'AT et d'eau a été confirmée par analyse thermogravimétrique. Concernant le cas du MTA sec et des ciments hydratés, le pourcentage de perte de masse était de $(15,0 \pm 0,5) \%$ dans la plage de température comprise entre 25 et 700 °C alors que la perte de masse s'élevait à $(35,0 \pm 0,5) \%$ dans le cas des échantillons MTA 75 % secs et mouillés, indiquant la présence de molécules thermosensibles supplémentaires, à savoir l'AT.

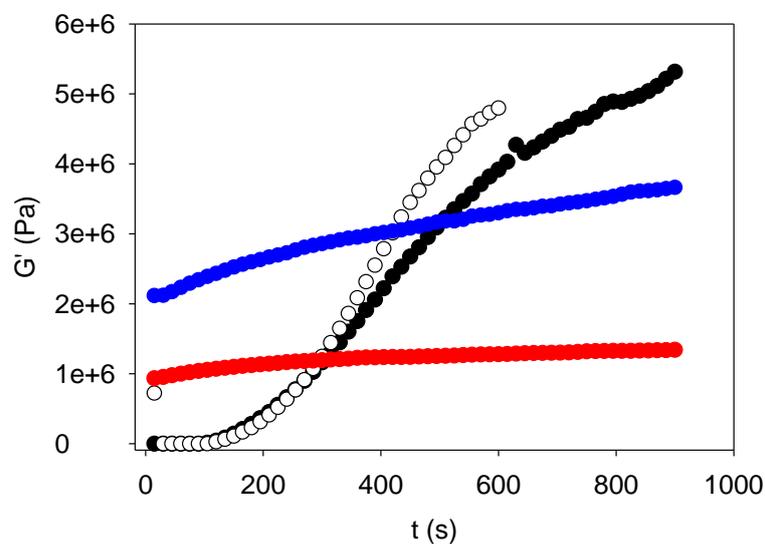


Figure 17. Cinétique de prise (mesurée par rhéologie) du MTA (noir et blanc, 2 expériences indépendantes) ; de MTA 87.5% (bleu) et de MTA 75% (rouge).

La résistance à la compression et la compression maximale avant la rupture, mesurées après un temps de prise de 6 h (à 37 °C) sont significativement affectées par la présence d'une quantité croissante d'AT. Pour les échantillons à sec, on peut distinguer deux sous-groupes (Fig. 18). Le premier est constitué du MTA sans modification et du MTA 94% (+ 6% d'AT), le second du MTA 87,5%, du MTA 81,25% et du MTA 75%, donc des échantillons riches en AT. En effet, une assez grande dispersion des valeurs des propriétés compressives a été observée pour le second groupe. Cette dispersion peut être liée à l'action de l'AT sur la prise du ciment et à la variation de la taille des grains. Cependant, même si les données sont plus dispersées pour des

teneurs en AT supérieures à 12,5 % dans la formulation initiale, par rapport aux données acquises pour des teneurs en AT plus faibles, le module de compression et la contrainte maximale sont significativement plus élevés (Fig. 18). Il est intéressant de noter qu'il n'y a pas de différence significative dans les propriétés de compression pour les échantillons MTA 87,5%, MTA 81,25% et MTA 75% pour lesquels un plateau apparent des propriétés compressives semble être atteint. À notre avis, la dispersion plus élevée des données de compression pour des compositions plus élevées en AT provient de la présence d'un nombre plus élevé de défauts dans le matériau composite. Néanmoins, lorsque la teneur en AT ajoutée dans le mélange augmente, les propriétés compressives augmentent nettement tant que le ciment composite est stocké à l'état sec. Cela suggère que l'AT présent à la surface des grains et en sous forme d'agrégats dans le volume poreux agit comme un liant. L'augmentation des valeurs des propriétés mécaniques peut aussi s'expliquer par le fait que l'ajout d'AT diminue la taille des grains et aussi par un éventuel rôle chimique joué par l'AT adsorbé à la surface [24] des particules et créant des liaisons hydrogène entre elles [25].

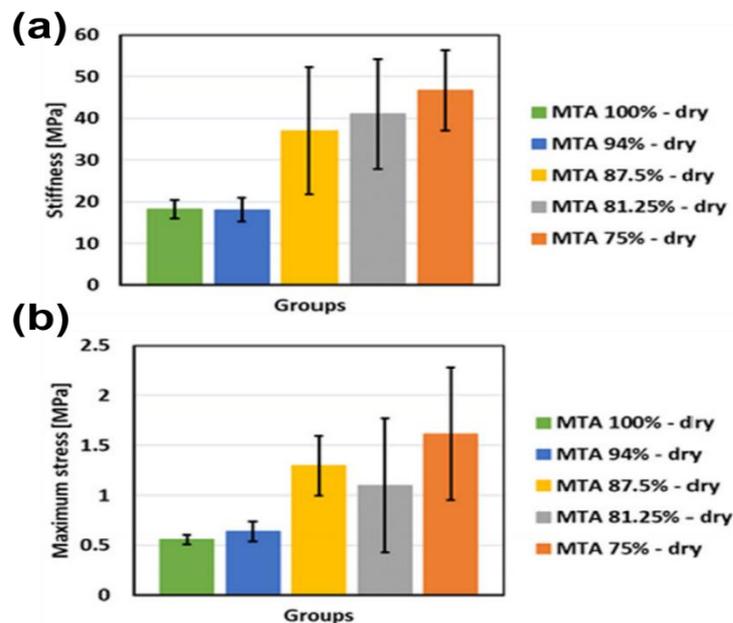


Figure 18. Evolution des propriétés mécaniques (en compression) de différents composites (état sec). (a) La résistance à la compression ; (b) la compression maximale avant la rupture.

Contrairement aux résultats obtenus à l'état sec, quand l'échantillon de MTA est immergé dans l'eau pour 24h, l'ajout d'AT a un effet négatif sur les valeurs des propriétés mécaniques en compression (Fig. 19). En revanche, en l'absence d'AT, le module de compression et la résistance maximale à la rupture augmentent lors de l'hydratation. Ceci peut être lié au processus de prise lente bien connu du MTA vierge [26]. En présence d'AT, à savoir pour les échantillons MTA 87,5%, MTA 81,25% et MTA 75%, après immersion dans l'eau pendant 24h, nous observons une diminution significative des propriétés mécaniques. Cette diminution des propriétés mécaniques peut s'expliquer par le fait que l'AT interagit avec l'eau (libération dans l'eau) et avec la surface des particules présentes dans le ciment. Cette fragilité est d'autant plus perceptible que le pourcentage massique d'AT est plus élevé.

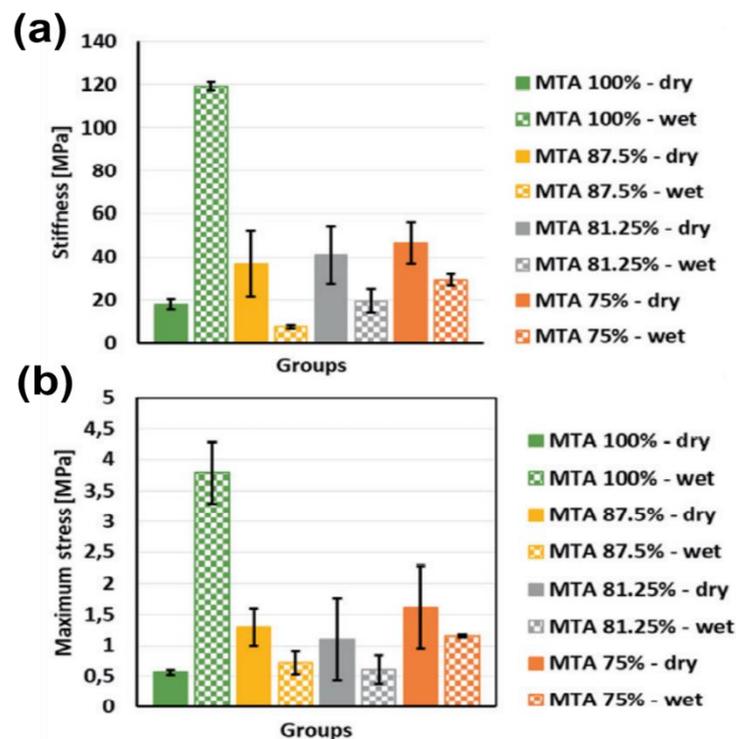


Figure 19. Evolution des propriétés mécaniques en compression de différents composites (état sec et état humide, ie en présence d'eau pendant 24h) : (a) résistance à la compression ; (b) : contrainte maximale à la rupture.

Afin de mieux expliquer les différences de la résistance à la compression des ciments MTA 100% et MTA 75% à l'état sec par rapport à l'état hydraté, il faut considérer l'influence éventuelle de l'AT sur la microstructure des ciments. Nous supposons qu'une partie de l'AT

initialement présent a été partiellement incorporée sous forme d'agrégats entre les grains de MTA, créant ainsi une porosité supplémentaire. Dans ce but, nous avons réalisé des expériences de tomographie aux rayons X dans le cas des deux compositions extrêmes (MTA 100% et MTA 75%) afin d'avoir un accès visuel à la distribution des pores et à leur connectivité. Lorsque l'on compare le MTA 100 % avec le MTA 75 % à l'état sec, aucune différence majeure n'apparaît concernant la taille moyenne des pores (Fig. 20 et tableau 2). Par conséquent, nous supposons que l'augmentation de la résistance à la compression pour les composites dopés avec de l'AT est due à l'adsorption d'AT sur les composants du ciment pendant le processus de prise conduisant à une cohésion accrue entre les particules décorées avec de l'AT ainsi qu'à une incorporation d'une partie de l'AT entre les grains de MTA. Cette hypothèse est compatible avec la capacité de revêtement universelle de l'AT [18]. Cependant, en comparant les échantillons dopés avec l'AT (sec et humide), il apparaît que la présence d'AT induit une nette augmentation de la connectivité entre les pores (Figs. 20b et d, tableau 2) après hydratation dans l'eau pendant 24h.

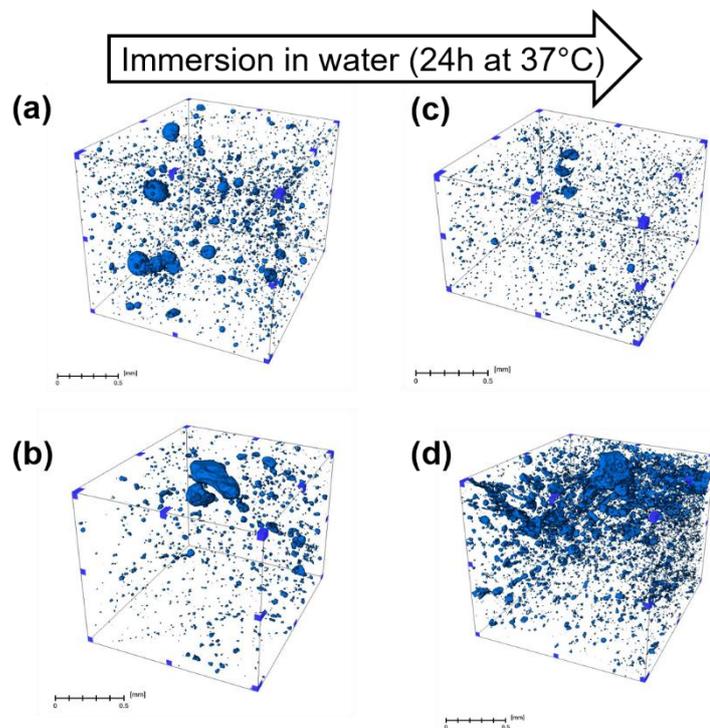


Figure 20. Tomographie aux rayons X. (a) MTA 100% ; (b) MTA 75% (conditions sèches) et (c) MTA 100%;(d) MTA 75% (en présence d'eau).

| Condition | Composite | Pore (mm) | Densité (%) | Nombre/mm³ |
|-------------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------------------|
| Sec | MTA 100% | 0.013 | 0.70 | 1303 |
| | MTA 75% | 0.017 | 2.83 | 496 |
| Humide (24h eau) | MTA 100% | 0.012 | 2.96 | 1745 |
| | MTA 75% | 0.013 | 1.7 | 2858 |

Tableau 2. Résultats quantitatifs obtenus après analyse des images de tomographie aux rayons X.

Nous avons également montré que l'AT sous forme oxydée est libéré dans l'eau à partir des échantillons dopés avec l'AT (Fig. 14b et Fig. 21a). Cette libération peut être à l'origine de l'augmentation de la connectivité des pores. Une telle augmentation de la connectivité des pores pourrait être à l'origine de l'apparition de plus de fissures et de fractures lors de l'essai de compression et donc d'une résistance à la compression réduite. De plus, l'AT non libéré et immobilisé en surface des grains pourrait jouer le rôle d'un lubrifiant influençant également les propriétés mécaniques.

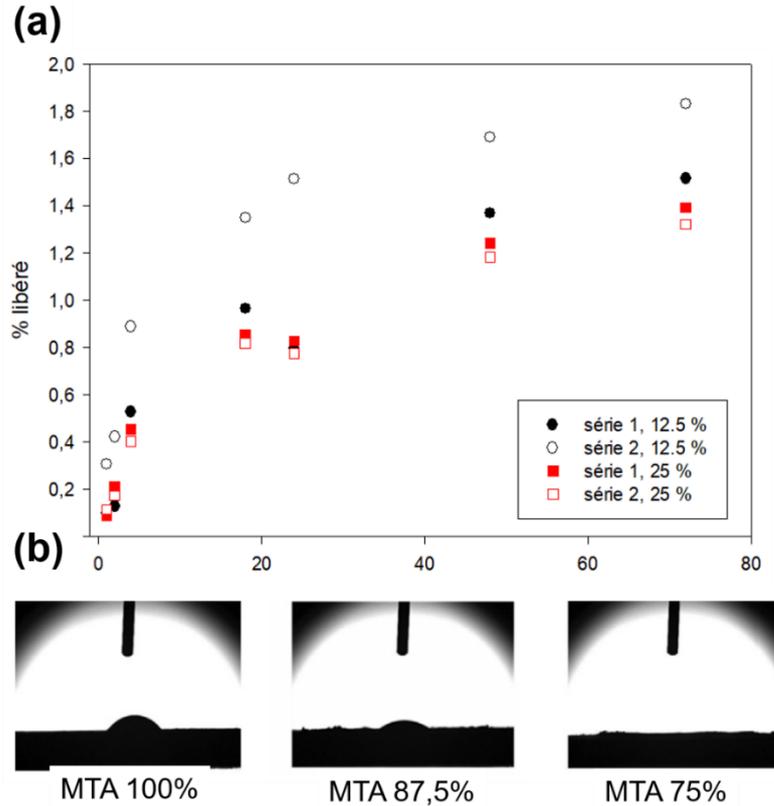


Figure 21. (a) Pourcentage d'AT libéré dans l'eau en contact avec les différents composites en fonction du temps de contact (1-72h). Deux séries d'expériences indépendantes ont été effectuées avec chaque composite comme indiqué dans l'insert ; (b) Profil d'une goutte d'eau distillée (5µl) déposée sur la surface de différents composites après 5s de dépôt.

La présence d'AT au sein des composites et dans l'espace compris entre ses grains constitutifs devrait également influencer l'interaction des ciments avec de l'eau ajoutée de l'extérieur. Une augmentation progressive de l'hydrophilie du ciment dopé avec l'AT a été corrélée à une augmentation de la teneur en AT (Fig. 21b, tableau 3). L'AT est une molécule fortement soluble dans l'eau, donc hydrophile mais cette observation peut être corrélée avec une modification de la connectivité des pores du ciment composite (tableau 2).

| Composite | Temps (s) |
|------------|-----------|
| MTA 100% | 45±5 |
| MTA 94% | 30±3 |
| MTA 87.5% | 13±2 |
| MTA 81.25% | 9±1 |
| MTA 75% | 0.5±0.2 |

Tableau 3. Temps requis pour l'adsorption d'une goutte d'eau (5 μ l) dans les différents composites (en secondes)

Concernant les tests de contact direct qui ont été faits pour évaluer les activités antibactériennes, le MTA a permis de tuer 50% des bactéries après 24h d'incubation par rapport au milieu bactérien sans composites. Le MTA modifié avec 12,5% et 25% d'AT, avaient le même développement bactérien que le groupe contrôle (milieu bactérien). L'effet inhibiteur du MTA est probablement dû au changement du pH (basique) et à la libération d'ions calcium dans le milieu bactérien. Ces deux facteurs peuvent jouer un rôle important dans les activités antibactériennes [22]. Concernant les échantillons dopés avec l'AT, le maximum d'AT libéré après 72h d'immersion dans l'eau était de moins de 2% de l'AT initialement présent dans le ciment (Fig. 21a). Cela signifie que la plupart des molécules d'AT fournies sont encapsulées dans le MTA et ils n'arrivent pas à passer en solution aqueuse pour jouer un rôle dans l'activité antibactérienne. En plus, les couleurs des composites dopés avec les différents pourcentages d'AT sont noires due à l'oxydation de l'AT présent dans le ciment. Nous supposons que les interactions attractives entre l'AT et le MTA ont rendu le composite inerte. Cependant, lorsque l'AT est en contact avec le MTA, tous les deux produits perdent leurs activités antibactériennes.

Prenant en compte les résultats des essais de compression, les résultats obtenus par tomographie aux RX et les données d'adsorption d'eau en fonction de la quantité initiale d'AT, celui-ci semble jouer un double rôle, se déposant à la surface des ciments et s'incorporant entre les grains pour modifier la porosité du composite. Le recouvrement des grains par une couche à base de polyphénols est à l'origine d'une augmentation du pH nettement plus faible lorsque le ciment est mis dans l'eau et pourrait également expliquer la cinétique de prise plus rapide du ciment. La présence mutuelle d'AT à la surface des grains et dans les pores explique l'augmentation de la résistance à la compression à l'état sec, car les molécules d'AT forment de fortes liaisons hydrogène intramoléculaires et des liaisons hydrogène/interactions ioniques avec la surface des grains de MTA. Cependant, lorsque les ciments composites sont mis en présence

d'eau, une partie de l'AT présent est libéré dans la solution ce qui produit une fragilisation des ciments composites. Une partie de l'AT présent dans les pores est partiellement ou totalement libérée en présence d'eau augmentant la densité des pores et leur connectivité et aussi la probabilité de propagation de fissures.

Contrairement au ciment vierge mis dans l'eau, aucun durcissement n'est observé car il reste de l'AT absorbé à la surface des grains constitutifs gelant ainsi leur coalescence et empêchant une évolution ultérieure dans l'eau.

2.4. Conclusions

L'ajout d'AT aux ciments MTA diminue nettement leur temps de prise et la taille moyenne des grains du ciment obtenu et augmente l'hydrophilie des matériaux composites. Concernant leurs propriétés mécaniques en compression, la présence d'AT augmente la résistance à la compression à l'état sec. Mais le fait que le polyphénol est fortement hydrophile avec une certaine libération dans l'eau, induit une diminution de la compression maximale à la rupture des composites dopés avec de l'AT par rapport au ciment MTA 100% hydraté. Cette observation n'est cependant pas préjudiciable pour son utilisation comme bouchon apical où les forces appliquées sont très faibles [27, 28]. Même si les propriétés mécaniques du composite dopé avec de l'AT sont significativement réduites en présence d'eau, cette réduction est acceptable pour des applications dentaires et est largement compensée par l'avantage d'une prise plus rapide ce qui est une exigence majeure pour les utilisations cliniques.

2.5. Références

[1] Cavenago BC, Pereira TC, Duarte MA, et al. Influence of powder-to-water ratio on radiopacity, setting time, pH, calcium ion release and a micro-CT volumetric solubility of white mineral trioxide aggregate. *Int Endod J.* 2014, 47, 120-126.

- [2] Ghahramani Y, Shafiei F, Jowkar Z, Kazemian S. The Effects of Various Restorative Techniques on the Fracture Resistance of Pulpotomized Permanent Premolars. *Int J Dent*. 2021, 5590911.
- [3] Pérez-Alfayate R, Mercadé M, Vera J. Relationship between internal root resorption and dens in dente. *J Clin Exp Dent*. 2020, 12, e800-e804.
- [4] Tabiyar K, Logani A. The Apical Extent of Mineral Trioxide Aggregate Apical Barrier Does not Influence the Treatment Outcome in a Nonvital Immature Permanent Anterior Tooth: A Split-Mouth Clinical Study. *Eur Endod J*. 2021, 6, 44-49.
- [5] Al Tuwirqi AA, El Ashiry EA, Alzahrani AY, et al. Tomographic Evaluation of the Internal Adaptation for Recent Calcium Silicate-Based Pulp Capping Materials in Primary Teeth. *Biomed Res Int*. 2021, 5523145.
- [6] Glera-Suarez P, Serra-Pastor B, Peñarrocha-Oltra D, et al. Periapical Microsurgery with an Endoscope and Microscope of Two Upper Central Incisors Already Subjected to Periapical Surgery 25 Years Ago. *Case Rep Dent*. 2020, 8885568.
- [7] Ber BS, Hatton JF, Stewart GP. Chemical modification of proroot mta to improve handling characteristics and decrease setting time. *J Endod*. 2007, 33, 1231-1234.
- [8] Ferreira CMA, Sassone LM, Gonçalves AS, et al. Physicochemical, cytotoxicity and in vivo biocompatibility of a high-plasticity calcium-silicate based material. *Sci Rep*. 2019, 9, 3933.
- [9] Do Nascimento AB, Fontana UF, Teixeira HM, Costa CA. Biocompatibility of a resin-modified glass-ionomer cement applied as pulp capping in human teeth. *Am J Dent*. 2000, 13, 28-34.
- [10] Chang SW. Chemical Composition and Porosity Characteristics of Various Calcium Silicate-Based Endodontic Cements. *Bioinorg Chem Appl*. 2018, 2784632.

- [11] Jiménez-Sánchez MDC, Segura-Egea JJ, Díaz-Cuenca A. MTA HP Repair stimulates in vitro an homogeneous calcium phosphate phase coating deposition. *J Clin Exp Dent*. 2019, 11, e322-e326.
- [12] Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod*. 2010, 36, 190-202.
- [13] Marciano MA, Costa RM, Camilleri J, Mondelli RF, Guimarães BM, Duarte MA. Assessment of color stability of white mineral trioxide aggregate angelus and bismuth oxide in contact with tooth structure. *J Endod*. 2014, 40, 1235-1240.
- [14] Hungaro Duarte MA, Minotti PG, Rodrigues CT, Zapata RO, Bramante CM, Tanomaru Filho M, Vivian RR, Gomes de Moraes I, Bombarda de Andrade F. Effect of different radiopacifying agents on the physicochemical properties of white Portland cement and white mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2012, 38, 394-397.
- [15] Marciano MA, Guimarães BM, Amoroso-Silva P, et al. Physical and Chemical Properties and Subcutaneous Implantation of Mineral Trioxide Aggregate Mixed with Propylene Glycol. *J Endod*. 2016, 42, 474-479.
- [16] Kharouf N, Haïkel Y, Ball V. Polyphenols in Dental Applications. *Bioengineering (Basel)*. 2020, 7, 72.
- [17] Kharouf N, Eid A, Hardan L, et al. Antibacterial and Bonding Properties of Universal Adhesive Dental Polymers Doped with Pyrogallol. *Polymers (Basel)*. 2021, 13, 1538.
- [18] Sileika TS, Barrett DG, Zhang R, et al. Colorless multifunctional coatings inspired by polyphenols found in tea, chocolate, and wine. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2013, 52, 10766-10770.
- [19] Lee HY, Hwang CH, Kim HE, Jeong SH. Enhancement of bio-stability and mechanical properties of hyaluronic acid hydrogels by tannic acid treatment. *Carbohydr Polym*. 2018, 186, 290-298.

- [20] Türkan F, Taslimi P, Saltan FZ. Tannic acid as a natural antioxidant compound: Discovery of a potent metabolic enzyme inhibitor for a new therapeutic approach in diabetes and Alzheimer's disease. *J Biochem Mol Toxicol*. 2019, 33, e22340.
- [21] Kang TY, Choi JW, Seo KJ, et al. Physical, Chemical, Mechanical, and Biological Properties of Four Different Commercial Root-End Filling Materials: A Comparative Study. *Materials (Basel)*. 2021, 14, 1693.
- [22] Kharouf N, Arntz Y, Eid A, et al. Physicochemical and Antibacterial Properties of Novel, Premixed Calcium Silicate-Based Sealer Compared to Powder-Liquid Bioceramic Sealer. *J Clin Med*. 2020, 9, 3096.
- [23] Mutaftchiev, Nucleation theory, in: D.T.J. Hurtle (ed.), *Handbook of Crystal Growth-1 Fundamentals*, North Holland, 1993.
- [24] Noh YS, Chung SH, Bae KS, et al. Mechanical properties and microstructure analysis of mineral trioxide aggregate mixed with hydrophilic synthetic polymer. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2015, 103, 777-782.
- [25] Erel I, Sukhishvili S. Hydrogen-Bonded Multilayers of a Neutral Polymer and a Polyphenol. *Macromolecules*. 2008, 41, 3962.
- [26] Camilleri J. Evaluation of selected properties of mineral trioxide aggregate sealer cement. *J Endod*. 2009, 35, 1412-1417.
- [27] Bernardi A, Bortoluzzi EA, Felipe WT, et al. Effects of the addition of nanoparticulate calcium carbonate on setting time, dimensional change, compressive strength, solubility and pH of MTA. *Int Endod J*. 2017, 50, 97-105.
- [28] Machado DF, Bertassoni LE, Souza EM, et al. Effect of additives on the compressive strength and setting time of a Portland cement. *Braz Oral Res*. 2010, 24, 158-164.

Publication associée au chapitre II

« Tannic acid speeds up the setting of mineral trioxide aggregate cements and improves its surface and bulk properties »



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Colloid and Interface Science

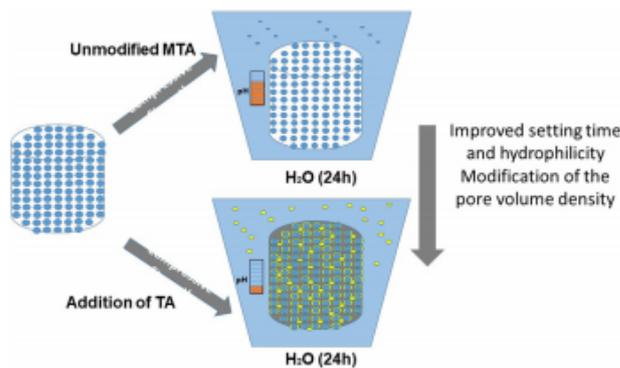
journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcis

Regular Article

Tannic acid speeds up the setting of mineral trioxide aggregate cements and improves its surface and bulk properties

Naji Kharouf^{a,b}, Jihed Zghal^{c,d}, Frédéric Addiego^e, Manon Gabelout^f, Hamdi Jmal^c, Youssef Haikel^{a,b}, Nadia Bahlouli^c, Vincent Ball^{a,b,*}^a Université de Strasbourg, Faculté de Chirurgie Dentaire, 8 rue Sainte Elisabeth, 67000 Strasbourg, France^b Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche 1121, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex, France^c ICube Laboratory, University of Strasbourg- CNRS, 2 rue Boussingault, 67000 Strasbourg, France^d ECAM Strasbourg Europe, 2 Rue de Madrid, 67300 Schiltigheim, France^e Luxembourg Institute of Science and Technology (LIST), Department Materials Research and Technology (MRT), ZAE Robert Steichen, 5 Rue Bommel, L-4940 Hautcharage, Luxembourg^f R&D/Innovation, ITENA CLINICAL, 31 Avenue Georges Clemenceau, 93420 Villepinte, France

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:
 Received 11 November 2020
 Revised 1 December 2020
 Accepted 29 December 2020
 Available online 8 January 2021

Keywords:
 Mineral trioxide aggregate
 Tannic acid
 Setting time

ABSTRACT

Hypothesis: The setting time and mechanical properties of cements are a major technical concern for a long time in civil engineering. More recently those practical problems became a major concern for biomedical applications -in bone surgery and in dentistry- in particular concerning the setting time which should be minimized. The possibility to add organic additives to interact with the different constituting ions in cements constitutes a way to modify the setting kinetics. We made the assumption that a hydrolysable polyphenol like tannic acid could modify the setting time and the physical properties of Mineral Trioxide Aggregate (MTA).

Experiments: Tannic acid is added in variable proportions to the water used to set MTA. The formation of the hybrid organic-mineral cements is investigated using a combination of structural, chemical and mechanical methods. X-ray tomography was also used to investigate the changes in porosity and pore

* Corresponding author at: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche 1121, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg, France.

E-mail address: vball@unistra.fr (V. Ball).

<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.12.115>

0021-9797/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

Natural additives
Mechanical properties
X-ray tomography

size distribution upon incorporation of tannic acid in MTA based cements. The hydrophilicity of the cements was evaluated by measuring the permeation kinetics of small water droplets.
Findings: We found that tannic acid allowed to reduce markedly the setting time of MTA based cements. The obtained cements have an increased hydrophilicity and display excellent resistance to compression. The number of pores but not the average pore size is also affected. The possible roles of tannic acid in modifying the cement properties are discussed.

© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The setting of concrete and of cements was and still remains a relevant technological problem during the two last millenaries. As the main control parameters are the water/cement ratio, the temperature at which the mixing is performed, the addition of additives allowing to speed up or to slow down the setting time of the cements, as well as less controlled parameters as the size distribution of the used oxide particles and the way of mixing [1]. Overall, the setting of concrete or cements for the building industry is a pretty slow process, considered to be achieved in 28 days. Fortunately, a full set of characterization methods and standards are now available to characterize, in a non-destructive manner, the time evolution of concrete and cements [2–4].

Besides their use in civil engineering, cements are also used for surgical and dental applications where they require a rapid setting and well controlled, reproducible characteristics to afford not only mechanical properties but also to control the interactions with biological tissues. Among those dental cements, Mineral Trioxide Aggregate (MTA) is a material considered as the gold standard for several endodontic treatments being a bioactive cement [5,6]. It was used in incomplete root formation [7], the treatment of perforations and resorptions [8,9], pulp capping [10], pulpectomy [11] and apical plug filling after apicoectomy [12]. MTA was developed and introduced in dental treatments in 1993 [13]. MTA cements are hydraulic and set in a moist medium. However, concerning their biomedical applications, these cements have a major limitation, namely their long setting time [14]. Ideally the setting should be achieved in a few tens of minutes.

Traditional MTA cements are tricalcium silicate-based materials related to Portland cement with the addition of the radiopaque bismuth oxide [5]. This bismuth oxide can be leached in time promoting discoloration of dental tissues and marginal gingiva [15]. Other MTA formulations without bismuth oxide were introduced as MTA Biorep (ITENA Clinical, Paris, France) and MTA Repair HP (Angelus, Londrina, Brazil). These MTA cements contain calcium tungstate as a radiopaque agent, which is more biocompatible than bismuth oxide [16]. Another main difference between these two MTA cements is that the liquid of the MTA Biorep formulation contains an organic plasticizer with distilled water in order to improve the handling, during the insertion of the material into the root canal and to provide greater plasticity to the material [17,18].

Appropriate physical and chemical properties are recommended for these dental cements such as low solubility, good sealing ability, high compressive strength, regeneration of periapical tissues, radiopacity and biocompatibility [5–7,14–20].

The solubility of these cements in tissue fluids plays a role in the sealing quality. In addition, the dissolution of this material creates micro-leaks that lead to a loss of adhesion with dental surfaces [21]. Several studies noted that there is a relation between the solubility and the initial porosity of dental cements, thus more porous materials are more likely to have higher solubility [22,23].

The wettability of these materials reflects their interactions with the contacting solvents and tissues. Therefore, fluid sorption

testing reflects the chemical quality of the thin surface layer of these cements [24].

The good compressive strength of cements is an essential factor when it comes to coronal treatments, for example, pulp capping. However, when applied as an apical plug where there are minimal applied forces, the cement's compressive strength will be of lower importance [20,25] than in coronal treatments. In addition to these properties, high pH values produced by these materials determines their antibacterial activity and their mineralization ability for calcium phosphates [26,27].

All these chemical and physical properties may affect the quality of endodontic dental treatments including the root canal retrograde and orthograde treatments. Simultaneous control of all those requirements is by far not yet achieved by recent cement formulations. Such control may be achieved by adding well suited additives to the cement.

Indeed, some additives in the composition of MTA cements were already used to modify their physicochemical properties. As typical examples, polyvinyl alcohol [28], methylcellulose [29], calcium chloride [30], calcium carbonate nanoparticles [30] and aluminium fluoride [31], rosin [32] were used as additives in MTA formulations. The aim of those additives is multifold. In order of decreasing priority, they are aimed to:

- (i) Speed up the setting process
- (ii) Reduce the dissolution of the cement
- (iii) To be able to modify the porosity and the overall hydrophilicity of the cement

All these attributes required by additives are aimed to modify the surface properties of the cements' grains which are essentially calcium silicates, calcium trisilicates and calcium oxide. It would hence be of interest to test the influence of an additive adsorbing in an almost undistinguishable manner to the surface of all these particulate materials.

Among possible candidates to fulfil such a requirement, Tannic acid (TA) is a natural polyphenolic compound of low cost which has been shown to adsorb on the surface of almost all known classes of materials [33]. TA is also largely used for industrial and biomedical applications [34,35]. It is an antioxidant, antiangiogenic, and anti-inflammatory factor. It has been used as a stabilizer and a cross-linker for collagen, elastin and gelatin [36–39].

Several studies [40–42] have analysed and evaluated the effect of different TA concentrations for different application times as a root canal irrigant cleanser. Bedran-Russo *et al.* [43] studied the collagen-dentin structure treated with TA solutions and noted that TA increases the stiffness of demineralized dentin and reduces the enzymatic degradation of collagen most probably due to hydrogen bonds between the biopolymer and TA.

However, the use of TA as an additive in cements is poorly described. Hence, in the present study, we investigate the effect of different TA concentrations on MTA Biorep in order to ameliorate its physicochemical properties, namely its setting time, its mechanical properties, its porosity and hydrophilicity. The choice of TA as an additive has been motivated by its low cost its high sol-

ability in water and its known interactions with metallic cations among them Ca^{2+} [44] which is a major constituent of MTA. We will call these composite materials MTA@TA but their composition referring to the formulation step will be noted MTA $x\%$ where x is the mass fraction of MTA, the remaining mass fraction of the solid being TA (at a constant added mass of water).

2. Materials and methods

Mineral trioxide aggregate “MTA Biorep” (Itena Clinical, Paris, France) has been modified with different weight percentages of tannic acid (TA, ref. 403040, Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). TA was used as received but stored in a closed bottle to avoid its progressive hydration, hydrolysis and oxidation. All groups of samples, called MTA@TA blends in the following, were mixed according to the manufacturer’s instructions: (120 ± 10) μL of liquid (water + plasticizer, both provided by the furnisher) for one cement capsule (24 mg of powder). The cements are called according to their composition MTA ($x\%$) where x is the mass fraction of MTA in the initial blend. For instance, MTA 75% describes a formulation in which 75% of the solid mass is MTA and hence 25% of the solid mass is TA. Note the sample size was different, for technical reasons, concerning each characterization technique. Therefore, we always specify the size and shape of the prepared MTA@TA samples.

2.1. Colour of the different MTA@TA samples

One sample of each cement concentration was mixed and compacted into a Teflon mould (10 mm in diameter and 3 mm in height) in order to observe the effect of the TA concentration on the cement colour. A camera (Nikon D5300, Tokyo, Japan) with ring flash was used to evaluate the colour changes for all the tested cements.

2.2. pH measurements of the aqueous solution in contact with the cement

Immediately after mixing the cement, 10 polyethylene tubes measuring 1.6 mm in diameter and 10 mm in height [45,46] were filled and compacted with freshly prepared samples of each cement group using a spatula and an endodontic K-file (Micro-Mega, Besançon, France). Cement residues were cleaned from the external walls. Radiographic images were taken for all the filled tubes with Vita scan (Durr Dental, Bietigheim, Germany) to verify that there is no void into the filled tubes. Each sample was immersed in a glass vial with 10 mL of distilled water (initial pH = 6.8) taken from a distilled water system Elix[®] Millipore (Merck Chimie SAS, Ile-de-France, France). The pH measurements were performed at (24 ± 2) °C after incubation at 37 °C for 3 h, 24 h, 72 h and 168 h. Before each pH measurement, the pH meter was calibrated with standard solutions at pH 4, 7 and 10 (Hanna Instruments, Lingolsheim, France). Before each individual pH measurement, the pH meter electrode was rinsed with distilled water for 30 s to eliminate the contamination from the previous solution.

2.3. Spectrophotometric characterization of the solutions in contact with the MTA cements

TA has been dissolved in distilled water in order to obtain a mother solution at $0.05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. One disc of pristine MTA (without tannic acid) was mixed and compacted into Teflon moulds as previously described with glass slides beneath (Knittel glass, Braunschweig, Germany). After the setting time (15 min), 1 mL of a TA solution was dropped onto the sample surface. After

25 min, 0.5 mL of the dropped solution and 0.5 mL of the mother solution were taken using a pipette and diluted 10 times with distilled water. Then, 1 mL of each diluted solution was analysed in the wavelength range between 200 and 700 nm using a mc^2 spectrophotometer (SAFAS, Monaco) in order to identify the changes undergone by TA in contact with an MTA cement. We performed this test in order to show that the colour change is due to the interaction between TA and the MTA cement both components being either directly mixed at the onset of the setting process or during subsequent contact between the cement and a TA containing solution.

In another set of experiments, one sample of each MTA@TA composite was prepared (3 mm in diameter and 3.58 mm in height) and immersed in 10 mL of distilled water for one month. After this duration, 1 mL of each solution was taken using a pipette and diluted 10 times with distilled water. Then, 1 mL of each diluted solution was analysed in the wavelength range between 200 and 700 nm using a mc^2 spectrophotometer to evaluate the release of TA from the cement.

2.4. Scanning electron microscope (SEM), thermogravimetric analysis (TGA) and energy dispersive x-ray (EDX) analysis

Thermogravimetric (TGA) analysis (Netzsch) was performed on MTA and MTA 75% samples after drying and also for the same samples immersed in water during 24 h in order to determine the water and TA weight fractions in the materials. Before TGA analysis, the samples were crushed into powder with a mortar. The temperature was increased from 25 to 700 °C under a nitrogen flow.

Concerning the samples for EDX analysis, three samples of each MTA or MTA@TA formulations were compacted using a spatula into cylindrical Teflon moulds—5 mm in diameter and 2 mm in thickness. After the setting time (15 min) as described in the manufacturer’s instruction, the disks were removed from their moulds and mounted onto aluminium SEM stubs. The samples were sputter-coated with 20 nm gold-palladium (20/80 atomic % respectively) using a Hummer JR sputtering device (Technics, CA, USA). 1 h later, the morphological and chemical characteristics of the MTA@TA samples were analysed using a Quanta 250 FEG scanning electron microscope (FEI Company, Eindhoven, The Netherlands) with an acceleration voltage of the electrons of 10 kV. Five SEM micrographs were taken for each sample. Five EDX analyses were performed for each MTA@TA sample with a working distance of 10 mm and an acquisition time of 60 s. The weight percentages of Ca, C, Si and Al of the specimen surfaces of the different MTA@TA blends were determined in a semi-quantitative manner from these experiments.

2.5. Setting time of the cements as evaluated by dynamic rheometry

The storage and loss moduli of the as prepared MTA and MTA @ TA formulations were measured in a cone plate geometry with a Kinexus Ultra rheometer (Malvern, Great Britten) at a constant frequency of 1 Hz and a shear strain of 1%. The upper plate had a diameter of 4 cm and an apex angle of 176°, the distance between the apex of the upper plate and the lower flat plate, both in stainless steel, was of 150 μm . The water, containing the desired amount of TA was mixed with the required mass of MTA on the lower plate of the rheometer, the upper plate was approached at the final separation, and the measurement started 1 min later, with a time resolution of 30 s.

2.6. Compression tests

The effect of tannic acid on the mechanical characteristics of the MTA based cements has been studied. For this purpose, the sam-

ples were prepared according to the following protocol: immediately after mixing with water, different cements (MTA or MTA@TA) were placed and compacted in a Teflon mould (3 mm in inner diameter and 3.58 mm in inner height) with glass slides underneath to provide a flat surface. The dimensions and preparation methods of these samples were based on Bernardi et al [46]. Then, the moulds were transferred into a chamber hold at 37 °C and a relative humidity of 95% for 6 h [47]. After that, the cylindrical cement samples were removed from their moulds and checked under 10X magnification using a Zumax microscope (Zumax medical, Suzhou New District, China) for the presence of an eventual void or a fractured edge. All damaged samples were discarded before further mechanical analysis. Part of samples were picked to be wet. They were immersed during 24 h in distilled water at 37 °C.

The samples were tested through a uniaxial compression test to determine the stiffness of the cement and the maximum load before rupture. These tests were performed on the universal electromechanical tensile Instron 3345 (Norwood, MA, USA) device instrumented with a 1 kN cell force (Class 0.5 following ISO 7500-1) and with a displacement sensor. The tests were performed at constant crosshead speed of 0.5 mm·min⁻¹. Deformation was calculated from the crosshead displacement. A camera (Allied Vision, Stadtroda, Germany) was used to measure the specimen dimensions to avoid any initial damage that could be caused by the standard dimensional measurement methods.

The engineer compressive stress was calculated according to the formula:

$$\sigma_c = \frac{4P}{\pi D_0^2} \quad (1)$$

where P is the recorded load during the test and D_0 is the initial sample diameter.

The engineer compressive strain was calculated using the following formula

$$\epsilon_c = \left| \frac{\delta L}{L_0} \right| \quad (2)$$

where δL is the recorded displacement of the crosshead and L_0 is the initial length of the sample.

2.7. Water sorption tests by the MTA@TA cements

Three samples of each group were prepared and compacted in Teflon moulds (16 mm in diameter and 3 mm in height) that were glued to a glass slide and stored in hermetic boxes for 24 h. These samples were larger than those used for other characterization techniques in order to allow for the deposition of a 5 μ L water drop. A contact angle measurement device (Attension Theta, Biolin Scientific, Göteborg, Sweden) was used to measure the adsorption time of a 5 μ L drop of distilled water into the cement surface. A drop of distilled water was dropped via a needle, 0.7 mm in diameter, onto the surface of each sample. A movie was recorded with a horizontal camera in order to track the profile of the water drop and the absorption time of the water drop until its disappearance into the cement surface. This measurement is a qualitative indication of the cement's hydrophilicity. Static water contact angle analysis could not be performed on the MTA@TA cements owing to their high roughness and porosity.

2.8. X-ray tomography

The internal structure of the MTA based materials was inspected in 3D by means of micro-computed x-ray tomography (μ CT) (EasyTom 160 from RX Solutions, Chavanod, France). For this

characterization, the as-processed material rod-identical to that used for the compression tests- was glued onto a graphite sample holder. Imaging was conducted at a voltage of 45 kV and a current of 160 μ A, using a micro-focused tube equipped with a tungsten filament. The source-to-detector distance (SDD) and the source-to-object distance (SOD) were adjusted in such a way to obtain a voxel size of around 2.1 μ m. The volume reconstruction was done with the software Xact64 (RX Solutions) after applying inherent treatments to the technique such as geometrical corrections and ring artefact attenuation. The image treatment was performed with the Avizo software that enabled to (i) de-noise the images with a median filter, (ii) segmentate the images intensity to reveal the objects of interest (pores or inclusions), (iii) remove insignificant small objects, and (iv) determine the 3D geometrical aspects of the objects (volume, equivalent diameter, density...).

3. Results and discussion

3.1. pH changes of water in contact with the cements

The addition of Tannic acid (TA) up to 25% (w/w) of the total mass of the solid fraction, in the presence of a given volume of water, allows to produce compact cements which can be manipulated with tweezers and by hands. However, higher weight fractions of TA do not allow to form a compact cement, most probably in relation to a reduction of the amount of available water which is used simultaneously to dissolve the highly hydrophilic TA and to set the cement. We nevertheless characterized the MTA 50% sample by means of EDX to determine its composition but the mechanical characterization of those samples was a non-sense because of the apparent brittleness of the obtained material.

All these cements, when put in contact with water, induce a pH increase (Fig. 1) as expected for MTA cements [19] containing CaO as a basic compound. CaO undergoes hydrolysis in water to produce highly soluble calcium hydroxide at the origin of the pH increase. However, when TA is incorporated as a compound of the initial blend, the pH of the water in contact with the cement is reduced, resulting in a pH reduction close to 2 units for the MTA 75% cement compared to the MTA 100% cement. This finding may be related to the interaction of TA with the surface of CaO as well as with the surface of almost all known materials including metals and polymers [33]. In the case of MTA this interaction may well be a complexation with the Ca²⁺ cations [44] slowing down the hydrolysis of CaO. Owing to an average pKa value of 8.5 (TA is in fact a weak polyacid with a distribution of pKa values)

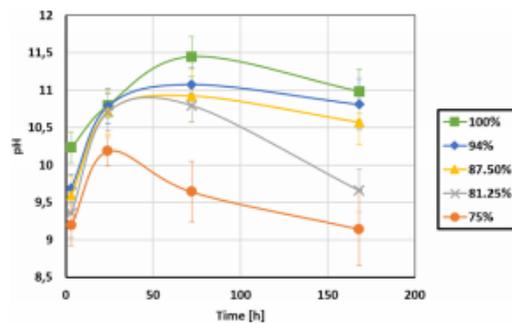


Fig. 1. pH changes of water in contact with MTA and MTA@TA materials (indicated in the inset where the mass percentage corresponds to MTA) as a function of time up to 1 week. Each point corresponds to the measurement on 10 independent MTA or MTA@TA samples and the error bars correspond to \pm one standard deviation.

[49] it is unlikely that TA can exert a buffering role for solutions having a pH higher than 9 as found in Fig. 1. We hence assume that the strong pH reduction of MTA doped with TA is due to a protecting effect of TA by slowing down the hydrolysis of CaO.

3.2. Colour change and composition

The MTA based cements prepared in the presence of TA undergo also a marked colour change (Fig. 2) as expected when TA is present in a high pH environment (Fig. 1) and in the presence of spontaneously dissolved oxygen acting as an oxidant.

This visual change in the MTA based materials is clearly due to the incorporation of TA. This colour change may be detrimental for aesthetic reasons, this is however not the case because MTA is never incorporated in the part of the teeth directly accessible to visual inspection.

The presence of TA and water was confirmed by means of TGA analysis: in the case of dry MTA and hydrated cements: the percentage of mass loss was of $(15.0 \pm 0.5)\%$ in the temperature range between 25 and 700 °C whereas the mass loss amounted to $(35.0 \pm 0.5)\%$ in case of both the dry and wetted MTA 75% samples, indicating the presence of additional thermosensitive molecules, namely TA. In addition, a semiquantitative quantification of the Ca and C content was performed by EDX analysis and confirmed, as expected, an almost linear decrease in the Ca content and an almost constant linear increase in the C content upon incorpora-

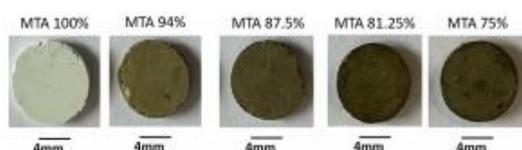


Fig. 2. visual changes of MTA and MTA@TA materials in contact with water for 24 h and dried before image capture.

tion of a higher mass fraction of TA in the initial blend (Fig. 1 in the Supplementary material file).

These results mean that a given mass of MTA cement should have a given capacity to interact with TA and to modify its properties.

3.3. Setting time and morphology

Among the properties modified upon the incorporation of TA, are the setting time, as investigated by shear rheology and the morphology as investigated by SEM (Fig. 3). It appears that the presence of TA in the formulation speeds up the setting time of MTA cements. Indeed, in the absence of the polyphenol, the setting kinetics displays a lag phase typical of a nucleation-followed by crystal growth- process [49]. However, in the presence of 12.5% weight percent of TA (the MTA 87.5% samples) and 25% of TA (the MTA 75% samples), the onset of cement setting is shorter than the time required to start the measurement (2 min. after mixing of the different compounds) and a plateau level in the storage modulus is rapidly reached without the observation of a lag phase (Fig. 3A). This acceleration of the cement setting is of great interest in dental applications of MTA cements as highlighted in the Introduction and was the major goal of this investigation.

The morphology of the cement after 1 h of setting is also dependent on the weight fraction of TA used in the initial blend (Fig. 3B) with a more granular morphology and an apparent, but hard to quantify, reduction in the average grain size (Fig. 3B). In fact, the reduction in grain size when the mass fraction of TA increases may significantly affect the mechanical properties of the cement. A shorter setting time and a change of the grain morphology are strong indications that the addition of TA acts as a surface modifier in the MTA cement.

3.4. Mechanical properties of the cements in the dry and wet states

The compressive stiffness and the maximum compressive stress, measured after a setting time of 6 h (at 37 °C) are signifi-

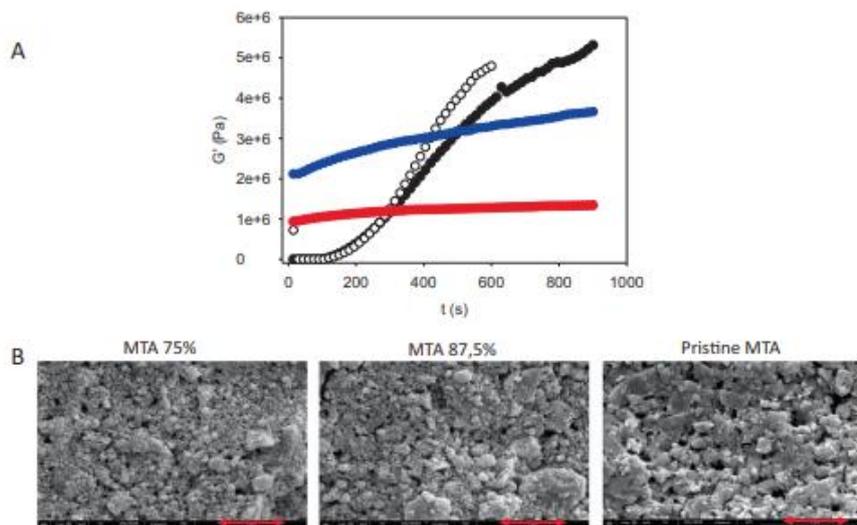


Fig. 3. A: Setting kinetics of the pristine MTA (○,● 2 independent experiments), of the MTA 87.5% (●) and of the MTA 75% (●) samples as measured by rheology. B: Morphology of the MTA 75%, the MTA 87.5% and of the MTA 100% sample after 1 h of setting. The scale bar (red double headed arrow) corresponds to 5 μm in all images. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

cantly affected by the presence of an increasing amount of TA. For dried samples, we can distinguish two subgroups (Fig. 4): the first one is constituted from the pristine MTA and MTA 94%, the second one from the MTA 87.5%, MTA 81.25% and MTA 75%, hence the TA rich samples. We observe an increased dispersion in the compressive properties in the second subgroup. In fact, this dispersion can be related to the action of TA on the setting of the cement (Fig. 3A) and to the variation of the grain size (Fig. 3B). However, even if the data are more dispersed for TA contents higher than 12.5% in the initial formulation, compared to the data acquired for lower TA contents, the compressive modulus and maximal stress are significantly higher. Interestingly, there is no significant difference in the compressive properties for the MTA 87.5%, the MTA 81.25% and the MTA 75% samples for which an apparent plateau in the compressive properties seems to be reached. In our opinion the higher dispersion of the compression data at higher compositions in TA originate from the presence of a higher number of defects in the composite material in which TA may not only cover the surface of the grains but also be present as clusters. Nevertheless, when the content of TA added in the blend increases, the compressive properties markedly increase as long as the composite cement is stored in the dry state. This suggests that TA present on the surface of grains (it adsorbs on the surface of all known materials, [33]) and as clusters in the porous volume (influenced by its own presence) acts as binder. Indeed, on the sole basis of the composition of the blend (our EDX data give the real, approximate, composition as a function of the provided mass fraction of TA during the preparation of the blend, Fig. 1 in the Supplementary material), one would expect a progressive reduction in the compressive properties upon a higher incorporation of the soft organic material. This is obviously not the case, in the dry state (Fig. 4).

The increase in mechanical properties may also be explained by the fact that the addition of TA decreases the grain size (Fig. 3B) and also by a possible chemical role played by TA adsorbing on the surface [28] of the particles and creating bonds—mostly hydrogen bonds—between them [48].

In opposition with the results obtained in the dry state, when the MTA based samples are immersed in water for 24 h, the addi-

tion of TA has a negative effect on their mechanical properties (Fig. 5). On the other hand, in the absence of TA, the compressive stiffness and the maximal compressive strength increases upon hydration (Fig. 5). This is related to the well-known slow setting process of pristine MTA [14]: this cement continues to harden in the presence of water. In contrast to this finding for MTA, in the presence of TA, namely for the MTA 87.5%, MTA 81.25% and the MTA 75% samples, after immersion, we observe a significant decrease in the compressive stiffness and in the maximum compressive stress. This decrease of the compressive mechanical properties can be explained by the fact that TA interacts with water and with the surface of the particles present in the cement. This brittleness is even more perceptible as the weight percent of TA is high.

3.5. Porosity and pore size distribution investigated by X-ray tomography

In order to explain the differences in the compressive behaviour of the MTA and MTA 75% cements in the dry versus the hydrated state, we have also to consider the influence of TA on the microstructure of the cements, recalling that we suspect part of TA to be partially incorporated as clusters between the MTA grains, thus creating some additional porosity. To that aim, we performed some X-Ray tomography experiments in the case of the two extreme compositions, namely MTA 100% and MTA 75%. We decided to use X-ray tomography instead of conventional porosity measurement techniques [50] not only to avoid perturbation of the pore structure upon solvent incorporation or evaporation but also to have visual access to the pore distribution and connectivity.

When comparing the MTA 100% with the MTA 75% in the dry state, no major differences do appear concerning the pore size (Figs. 6A and B, quantitative data in Table 1). Hence, we assume that the increase in compressive strength upon incorporation of TA is due to the adsorption of TA on the cement components during the setting process leading to an increased cohesion between the TA decorated particles as well as to an incorporation of part of the TA between the MTA grains. This assumption is compatible with the universal coating ability of TA [33]. However, when com-

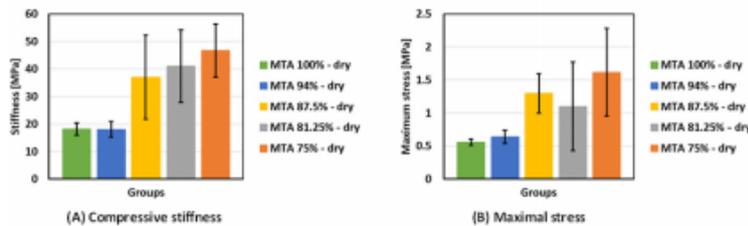


Fig. 4. Evolution of the mechanical properties of the dry MTA@TA cements (n = 6). (A): Compressive stiffness and (B): maximal stress at rupture.

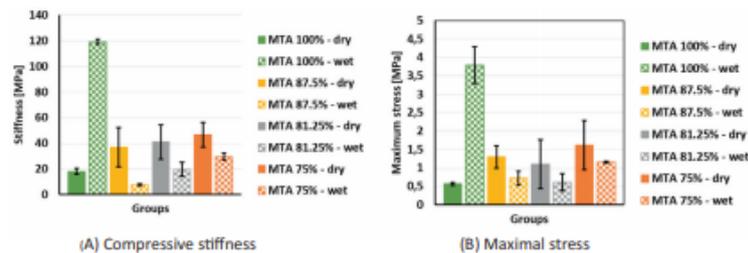


Fig. 5. Evolution of mechanical properties of wet MTA@TA cements (n = 6) compared to the dry ones.

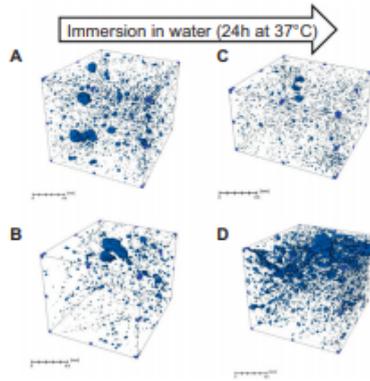


Fig. 6. Volume rendering of the segmented pores in: (A) MTA 100%, (B) MTA 75% dry samples; and (C) MTA 100%, (D) MTA 75% immersed samples in water for 24 h at 37 °C, obtained by X-ray tomography analysis. The scale bar corresponds to 0.5 mm in all cases.

Table 1
Quantitative results from the X-ray tomography experiments.

| Composite | Pore size (mm) | Density volume (%) | Number/mm ³ |
|----------------|----------------|--------------------|------------------------|
| MTA 100% (dry) | 0.013 | 0.70 | 1303 |
| MTA 75% (dry) | 0.017 | 2.83 | 496 |
| MTA 100% (wet) | 0.012 | 2.96 | 1745 |
| MTA 75% (wet) | 0.013 | 1.7 | 2858 |

paring the wet samples, it appears that the initial presence of TA induces a marked increase in connectivity (Fig. 6D versus Fig. 6B) of the pores after hydration even if the MTA 100% sample also undergoes some evolution in its pore size and pore size distribution (Table 1). We have also shown that some oxidized TA is released in water from the MTA@TA samples (Fig. 2 in the Supplementary Material file), this may be at the origin of the increased pore connectivity in this case. Such an increased pore connectivity could be at the origin of the appearance of more cracks during the compressive test and hence of a reduced compressive resistance. In addition, TA is still strongly adsorbed on the particles surfaces and could play the role of a lubricant also influencing the mechanical properties. The presence of TA should also influence the interaction of an as prepared cement with externally added water.

3.6. Water sorption capacity of the cements

As another marked influence of TA on the cement properties is the increased hydrophilicity, quantified as the time required, to totally engulf a 5 µL droplet of distilled water (Fig. 7 and Table 2).

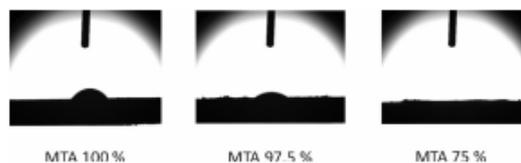


Fig. 7. Visual aspect of a water droplet (5 µL in initial volume) deposited onto different MTA@TA cement surfaces, 5 s after its deposition. Before these experiments, the cements were kept in an ambient atmosphere for 24 h after mixing the different components.

Table 2
Evolution of the time required for the MTA@TA cements to totally engulf a 5 µL water droplet.

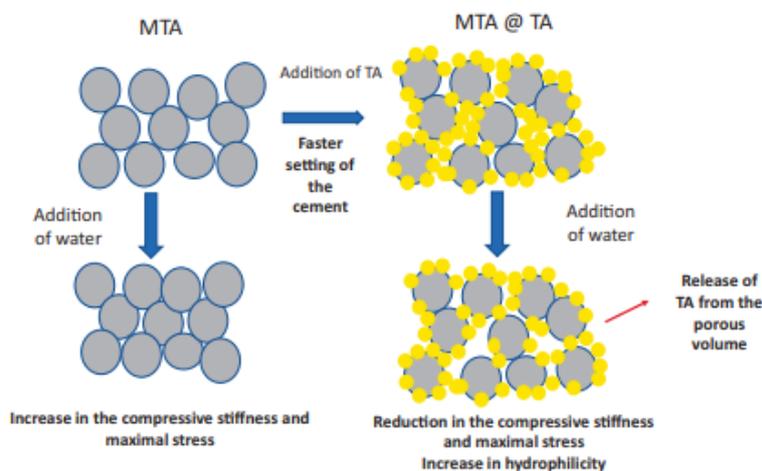
| Sample | t (s) |
|------------|-----------|
| MTA 100% | 45 ± 5 |
| MTA 94% | 30 ± 3 |
| MTA 87.5% | 13 ± 2 |
| MTA 81.25% | 9 ± 1 |
| MTA 75% | 0.5 ± 0.2 |

This increased hydrophilicity of the MTA@TA cements with the initial content of TA is obviously correlated with an increase in the TA content, a highly water-soluble molecule, but may also be correlated to a change in pore connectivity of the composite cement (Fig. 6).

Taking the results from the compressive tests, from the X-ray tomography data and from the water permeation data as a function of the initial content in TA into account, we propose a hypothetical model describing the role of TA in the structure of the composite MTA based cements (Scheme 1). TA may play a dual role, depositing on the surface of the grains (calcium oxide, calcium silicates and trisilicates) and incorporating between the grains to modify the porosity of the composite. The coverage of the grains by a polyphenol based layer is at the origin of a markedly lower pH increase when the cement is put in water (Fig. 1) and could also explain the faster setting kinetics of the cement (Fig. 3 A). The mutual presence of TA on the surface of the grains and in the pores explains the increase in the compressive stiffness and maximal compressive stress in the dry state, because TA molecules form strong intramolecular hydrogen bonds and hydrogen bonds/ionic interactions with the surface of the grains. However, when the composite cements are put in the water, part of the TA present, is released in the solution (Fig. 2 in the Supplementary material section) which produces a weakening of the composite cements (Fig. 5). Contrarily to the pristine cement put in the water, no hardening is observed because there remains some TA adsorbed on the surface of the constituting grains freezing their coalescence and hindering further positive evolution. Even if the mechanical properties of the MTA@TA composites are significantly reduced in the wet state compared to pure MTA cements, this reduction is acceptable for dental applications and is largely compensated by a faster setting process (Fig. 3A) which is a major requirement for clinical use.

4. Conclusions

The addition of TA to MTA cements decreases markedly the setting time and the grain size of the obtained cement and increases the hydrophilicity of the composite materials. All these findings give strong indications that TA modifies the surface of the cement's grains. Concerning the mechanical properties under compression, the presence of TA increases the compression modulus and maximal load before rupture in the dry state, but owing the high hydrophilicity of the polyphenol and some leaching in water, its presence in the composite has an opposite effect in the presence of water. However, the reduction of the maximal compressive stress by a factor of about 2 of the MTA@TA composites with respect to the hydrated MTA 100% cement is not detrimental for its use as an apical plug where there are minimal applied forces [20,25]. The simultaneous increase in hydrophilicity and in brittleness in the presence of water for the TA containing cements may be explained by a dual role played by the selected organic additive: part of it is incorporated in the pores between the particles and parts of it adsorbs on the surface of the different present particles playing the role of a binder and a lubricant. The TA filling part of



Scheme 1. Schematic representation of the influence of TA on the structure and the resulting properties (in bold characters) of the MTA@TA composites. This model relies on the presence of two populations in TA: adsorbed on the surface of the mineral grains and present in the porous volume of the cement which is by itself influenced by the addition of TA in increasing amounts.

the pores is partially or totally released in the presence of water increasing the pore density (Table 1) and hence the pore connectivity (Fig. 6D versus Fig. 6B) and also the probability of crack propagation.

As an additional -central- question is the possibility that TA not only adsorbs on the surface of the constituting particles and fills part of the pores but may also be incorporated in the obtained phases with a possible phase change. The occurrence of such a phenomenon, which we will investigate by means of X-ray diffraction, cannot be excluded on the basis of the known interaction between TA and Ca^{2+} cations.

In future investigations, we will test the influence of other polyphenols in the setting of dental cements which will allow to build a structure-property map for polyphenols as additives in biomedical cements. We will also study the influence of this kind of water-soluble molecules on the setting of more simple materials like plaster those components will not induce some pH increase in contact with water allowing hence to avoid the polyphenol oxidation. In such a composite TA will only act through complexation with Ca^{2+} cations. The oxidation of TA in the presence of MTA, inducing some marked darkening of the cement (Fig. 2), constitutes the only apparent drawback of our approach. However, MTA is never incorporated in the part of the teeth directly accessible to visual inspection and may not modify their aesthetic appearance. In addition, we cannot exclude that the TA modified cements display increased adhesion with resins and the dental tissues.

CRediT authorship contribution statement

Naji Kharouf: Investigation, Methodology. **Jihed Zghal:** Investigation. **Frédéric Addiego:** Investigation, Validation. **Manon Gabelout:** Resources, Validation. **Hamdi Jmal:** Investigation. **Youssef Haikel:** Validation. **Nadia Bahlouli:** Validation, Formal analysis. **Vincent Ball:** Conceptualization, Validation.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We acknowledge Platform IRIS/ICube, UMR 7357, FMST, Université de Strasbourg for the provision of experimental setups of mechanical characterization. We acknowledge Christophe Mèlart, from the Institut de Chimie et Procédés pour l'Énergie, l'Environnement et la Santé (ICPEES, CNRS Unité Mixte de Recherche 7515, Ecole de Chimie des Polymères et Matériaux) for the TGA experiments and their analysis.

Naji Kharouf was funded by ITENA and this project was performed using the funds from grant Conectus 19-INSERM-108.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.12.115>.

References

- [1] W. Fuller, S. Thompson, The laws of proportioning concrete, *Trans. Am. Soc. Civil Eng.* 59 (2) (1907) 67–143.
- [2] M. Azenha, F. Magalhães, R. Faria, A. Cunha, Measurement of concrete E-modulus evolution since casting: a novel method based on ambient vibration, *Cement Conc. Res.* 40 (2010) 1096–1105.
- [3] G. Batchelder, D. Lewis, Comparison of dynamic methods of testing concretes subjected to freezing and thawing, *Proc. Am. Soc. Testing Mater.* 53 (1953) 1053–1062.
- [4] R. Aguilar, E. Ramirez, V.G. Haach, M.A. Pando, Vibration-based nondestructive testing as a practical tool for rapid concrete quality control, *Const. Build. Mater.* 104 (2016) 181–190.
- [5] M. Parirokh, M. Torabinejad, Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review-part I: chemical, physical, and antibacterial properties, *J. Endod.* 35 (1) (2010) 16–27.
- [6] A.E. Dawood, P. Parashos, R.H.K. Wong, E.C. Reynolds, D.J. Manton, Calcium silicate-based cements: composition, properties, and clinical applications, *J. Investig. Clin. Dent.* 8 (2015) 10.
- [7] J.F. Reyes-Carmona, M.S. Felipe, W.T. Felipe, A phosphate-buffered saline intracanal dressing improves the biomineralization ability of mineral trioxide aggregate apical plugs, *J. Endod.* 36 (10) (2010) 1648–1652.
- [8] C. Main, N. Mirzayan, S. Shabahang, M. Torabinejad, Repair of root perforations using mineral trioxide aggregate: a long-term study, *J. Endod.* 30 (2) (2004) 80–82.
- [9] R.K. Subay, M.O. Subay, S.B. Tuzcu, Endodontic management of root perforating internal replacement resorption, *Eur. J. Dent.* 12 (3) (2018) 450–453.
- [10] C.J. Tomás-Catalá, M. Collado-González, D. García-Bernal, R.E. Oñate-Sánchez, L. Forner, C. Llana, A. Lorzano, J.M. Moraleda, F.J. Rodríguez-Lozano,

- Biocompatibility of new pulp-capping Materials NeomTA plus, MTA repair HP, and biodentine on human dental pulp stem cells, *J. Endod.* 44 (1) (2018) 126–132.
- [111] H. Bakhtiar, M.H. Nekoofar, P. Aminshakib, F. Abedi, F.N. Moosavi, E. Esnaashari, A. Azizi, S. Esmailian, M.R. Ellini, V. Mesgarzadeh, M. Sezavar, I. About, Human pulp responses to partial pulpotomy treatment with TheraCal as compared with biodentine and PROROOT MTA: a clinical trial, *J. Endod.* 43 (11) (2017) 1786–1791.
- [112] M. Torabinejad, M. Parirokh, P.M.H. Dummer, Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview - part II: other clinical applications and complications, *Int. Endod. J.* 51 (3) (2018) 284–317.
- [113] S.J. Lee, M. Monsef, M. Torabinejad, Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations, *J. Endod.* 19 (11) (1993) 541–544.
- [114] J. Camilleri, Evaluation of selected properties of mineral trioxide aggregate sealer cement, *J. Endod.* 35 (10) (2009) 1412–1417.
- [115] M.A. Marciano, R.M. Costa, J. Camilleri, R.F. Mondelli, B.M. Guimarães, M.A. Duarte, Assessment of color stability of white mineral trioxide aggregate angelus and bismuth oxide in contact with tooth structure, *J. Endod.* 40 (8) (2014) 1235–1240.
- [116] A.L. Gomes Corneio, L.P. Salles, M. Campos da Paz, J.A. Cirelli, J.M. Guerreiro-Tanomaru, M. Tanomaru Filho, Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: a cell death study, *J. Endod.* 37 (2) (2011) 203–210.
- [117] M.A. Marciano, B.M. Guimarães, P. Amoroso-Silva, J. Camilleri, M.A. Hungaro Duarte, Physical and chemical properties and subcutaneous implantation of mineral trioxide aggregate mixed with propylene glycol, *J. Endod.* 42 (3) (2016) 474–479.
- [118] L.T.A. Cintra, F. Benetti, L.O. de Azevedo Queiroz, J.M. de Araújo Lopes, S.H. Penha de Oliveira, G. Sivieri Araújo, J.E. Gomes-Filho, Cytotoxicity, biocompatibility, and biomimetic mineralization of the new high-plasticity MTA material, *J. Endod.* 43 (5) (2017) 774–778.
- [119] F.F.E. Torres, J.M. Guerreiro-Tanomaru, R. Bosso-Martelo, G.M. Chavez-Andrade, M. Tanomaru Filho, Solubility, porosity and fluid uptake of calcium silicate-based cements, *J. Appl. Oral Sci.* 26 (2018) e20170465.
- [120] A. Bernardi, E.A. Bortoluzzi, W.T. Felipe, M.C. Felipe, W.S. Wan, C.S. Teixeira, Effects of the addition of nanoparticulate calcium carbonate on setting time, dimensional change, compressive strength, solubility and pH of MTA, *Int. Endod. J.* 50 (1) (2017) 97–105.
- [121] G. De-Deus, M.Z. Scelza, P. Neelakantan, S. Sharma, A. Neves Ade, E.J. Silva, Three-dimensional quantitative porosity characterization of syringe- versus hand-mixed set epoxy resin root canal sealer, *Braz. Dent. J.* 26 (6) (2015) 607–611.
- [122] J. Camilleri, Evaluation of the effect of intrinsic material properties and ambient conditions on the dimensional stability of white mineral trioxide aggregate and Portland cement, *J. Endod.* 37 (2) (2011) 239–245.
- [123] L. Mutal, O. Gani, Presence of pores and vacuoles in set endodontic sealers, *Int. Endod. J.* 38 (10) (2005) 690–696.
- [124] V. Biočanin, D. Antonijević, S. Poštić, D. Ilić, Z. Vuković, M. Milić, Y. Fan, Z. Li, B. Brković, M. Đurić, Marginal gaps between 2 calcium silicate and glass ionomer cements and apical root dentin, *J. Endod.* 44 (5) (2018) 816–821.
- [125] D.F. Machado, L.E. Bertassoni, E.M. Souza, J.B. Almeida, R.N. Rached, Effect of additives on the compressive strength and setting time of a Portland cement, *Braz. Oral Res.* 24 (2) (2010) 158–164.
- [126] C.P. McHugh, P. Zhang, S. Michalek, P.D. Eleazer, pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro, *J. Endod.* 30 (4) (2004) 218–219.
- [127] V.A. Zanjani, K. Tabari, S.M. Sheikh-Al-Eslamian, A.N. Abrandabadi, Physicochemical properties of experimental nano-hybrid MTA, *J. Med. Life.* 11 (1) (2018) 51–56.
- [128] Y.S. Noh, S.H. Chung, K.S. Bae, S.H. Baek, K.Y. Kum, W.C. Lee, W.J. Shon, S.H. Rhee, Mechanical properties and microstructure analysis of mineral trioxide aggregate mixed with hydrophilic synthetic polymer, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 103 (4) (2015) 777–782.
- [129] O. Dianat, M. Naseri, S.F. Tabatabaei, Evaluation of properties of mineral trioxide aggregate with methyl cellulose as liquid, *J. Dent. (Tehran)* 14 (1) (2017) 7–12.
- [130] E.A. Bortoluzzi, N.J. Broon, C.M. Bramante, W.T. Felipe, M. Tanomaru Filho, R. M. Esberard, The influence of calcium chloride on the setting time, solubility, disintegration, and pH of mineral trioxide aggregate and white Portland cement with a radiopacifier, *J. Endod.* 35 (4) (2009) 550–554.
- [131] M.A. Marciano, J. Camilleri, R.L. Lucateli, R.M. Costa, M.A. Matsumoto, M.A.H. Duarte, Physical, chemical, and biological properties of white MTA with additions of AlF₃, *Clin. Oral Investig.* 23 (1) (2019) 33–41.
- [132] X. Fang, F. Winnefeld, P. Lura, Precipitation of anionic emulsifier with ordinary Portland cement, *J. Colloid Interf. Sci.* 479 (2016) 98–105.
- [133] T.S. Sileika, D.G. Barrett, R. Zhang, K.H.A. Lau, P.B. Messersmith, Colorless multifunctional coatings inspired by polyphenols found in tea, chocolate, and wine, *Angew. Chem. Int. Ed.* 52 (2013) 10766–10773.
- [134] H.Y. Lee, C.H. Hwang, H.E. Kim, S.H. Jeong, Enhancement of bio-stability and mechanical properties of hyaluronic acid hydrogels by tannic acid treatment, *Carbohydr. Polym.* 186 (2018) 290–298.
- [135] F. Türkan, P. Taslimi, F.Z. Saltan, Tannic acid as a natural antioxidant compound: discovery of a potent metabolic enzyme inhibitor for a new therapeutic approach in diabetes and Alzheimer's disease, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 33 (8) (2019) e22340.
- [136] R.R. Tintino, C.D. Oliveira-Tintino, F.F. Campina, R.L. Silva, M.D.S. Costa, L.R. Menezes, J.T. Calixto-Júnior, J.P. Siqueira-Junior, H.D. Coutinho, T.C. Leal-Balbino, V.Q. Balbino, Evaluation of the tannic acid inhibitory effect against the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*, *Microb. Pathog.* 97 (2016) 9–13.
- [137] J. Zhao, F. Pan, P. Li, C. Zhao, Z. Jiang, P. Zhang, X. Cao, Fabrication of ultrathin membrane via layer-by-layer self-assembly driven by hydrophobic interaction towards high separation performance, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 5 (24) (2013) 13275–13283.
- [138] V. Natarajan, N. Krithica, B. Madhan, P.K. Sehgal, Preparation and properties of tannic acid cross-linked collagen scaffold and its application in wound healing, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 101 (4) (2013) 560–567.
- [139] J.C. Isenbarg, D.T. Simionescu, N.R. Vyavahare, Elastin stabilization in cardiovascular implants: improved resistance to enzymatic degradation by treatment with tannic acid, *Biomaterials* 25 (16) (2004) 3293–3302.
- [140] N.C. Bitter, A 25% tannic acid solution as a root canal irrigant cleanser: a scanning electron microscope study, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 67 (3) (1989) 333–337.
- [141] N.C. Bitter, Tannic acid for smear layer removal: pilot study with scanning electron microscope, *J. Prosthet. Dent.* 61 (4) (1989) 503–507.
- [142] S.R. Christopher, V. Mathai, R.S. Nair, J.M. Angelo, The effect of three different antioxidants on the dentinal tubular penetration of Resilon and Real Seal SE on sodium hypochlorite-treated root canal dentin: an in vitro study, *J. Conserv. Dent.* 19 (2) (2016) 161–165.
- [143] A.K. Bedran-Russo, K.J. Yoo, K.C. Ema, D.H. Pashley, Mechanical properties of tannic-acid-treated dentin matrix, *J. Dent. Res.* 88 (9) (2009) 807–811.
- [144] E. Kaschak, A.C. Goedert, L. Igarashi-Mafra, M.R. Mafra, Effect of divalent cations on bovine serum albumin (BSA) and tannic acid interaction and its influence on turbidity and in vitro protein digestibility, *Int. J. Biol. Macromol.* 136 (2019) 486–492.
- [145] R.M. Qunitana, A.P. Jardine, T.R. Grechi, R. Graziotin-Soares, D.M. Ardenghi, R. K. Scarparo, F.S. Grecca, P.M.P. Kopper, Bone tissue reaction, setting time, solubility, and pH of root repair materials, *Clin. Oral Investig.* 23 (3) (2019) 1359–1366.
- [146] L.C. Souza, M. Yadlapati, S.O. Dorn, R. Silva, A. Letra, Analysis of radiopacity, pH and cytotoxicity of a new bioceramic material, *J. Appl. Oral Sci.* 23 (4) (2015) 383–389.
- [147] A. Bernardi, E.A. Bortoluzzi, W.T. Felipe, M.C. Felipe, W.S. Wan, C.S. Teixeira, Effects of the addition of nanoparticulate calcium carbonate on setting time, dimensional change, compressive strength, solubility and pH of MTA, *Int. Endod. J.* 50 (1) (2017) 97–105.
- [148] I. Erel-Unal, S.A. Sukhischvili, Hydrogen bonded multilayers of a neutral polymer and a polyphenol, *Macromolecules* 41 (2008) 3962–3970.
- [149] B. Mutaftchiev, Nucleation theory, in: D.T.J. Hurtle (ed.), *Handbook of Crystal Growth-1 Fundamentals*, North Holland, 1993.
- [150] J. Engstrand Unosson, C. Persson, H. Engqvist, An evaluation of methods to determine the porosity of calcium phosphate cements, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 103 (2015) 62–71.

Chapitre III : Modification du plâtre de Paris par de l'acide tannique ou du pyrogallol

3.1. Introduction

Le plâtre de Paris, le sulfate de calcium dihydraté, est fabriqué par hydratation contrôlée de l'hémihydrate de sulfate de calcium. C'est un matériau utilisé dans la construction des immeubles, l'immobilisation d'os fracturé et comme un matériau de réparation osseuse [1-7]. Ce matériau est utilisé dans plusieurs applications médicales et doit avoir plusieurs propriétés telles que la biocompatibilité, la facilité d'utilisation et la stabilité. De plus il est stérilisable et peu coûteux [7-9]. Ce matériau a été utilisé dans le domaine dentaire pour le comblement osseux dans les mâchoires, comme une greffe osseuse et dans les cas de perforations dentaires [10, 11]. Malgré son utilisation facile et sa biocompatibilité, le plâtre n'a aucune propriété antibactérienne intrinsèque. De telles propriétés sont indispensables pour l'application d'un matériau dans la cavité buccale. Plusieurs études ont modifié le plâtre de Paris avec des antibiotiques tel que la gentamicine, la tobramycine ou la vancomycine [12, 13]. Sun et coll. [12] ont démontré que l'addition de vancomycine au sulfate de calcium dans les cas de débridement chirurgical de l'ostéomyélite chronique de la mâchoire favorise la formation de tissus osseux. Par contre, au cours des dernières décennies, les antibiotiques perdent progressivement de leur efficacité en raison de l'adaptation des bactéries ciblées [14]. L'utilisation de molécules naturelles dérivées de plantes qui ont des activités biologiques telles que des effets antimicrobiens et antioxydants deviennent du plus haut intérêt [15]. Ces molécules, comme les polyphénols, ont été déjà utilisées dans la modification de matériaux dentaires à base de résines [16], de phosphates de calcium [17], d'hydroxyapatite [18] et dans le traitement de différents tissus dentaires. Les polyphénols ont aussi été utilisés pour la prévention de la déminéralisation de l'émail [19], pour la reminéralisation des racines dentaires

[20] et la prévention de caries dentaires [21]. L'acide tannique (AT) est un polyphénol naturel que l'on peut trouver et extraire du vin rouge et de diverses plantes, des feuilles de thé et de fruits [15, 22-23]. Il a été incorporé dans de nombreux matériaux en raison de ses propriétés antioxydantes et de son activité anticancéreuse et antibactérienne [24, 25]. *Staphylococcus aureus* (bactérie Gram-positif) est l'une des principales bactéries responsables de l'ostéomyélite et des infections osseuses [26]. Reitzer et coll. [27] ont démontré que l'AT est incorporé dans les gels de gélatine sous forme de 2 populations distinctes, l'une libre (agent antimicrobien) et l'autre interagissant avec le réseau de gélatine et fortement liée au gel. Les interactions responsables de cette association sont des liaisons hydrogène (forte densité de groupement hydroxyles sur l'acide tannique) et des interactions hydrophobes entre les 2 composants. La molécule d'AT est constituée d'une unité de glucose estérifiée par 10 molécules de pyrogallol (Fig. 22). La dégradation par hydrolyse de la molécule d'AT implique quelques étapes conduisant à la formation de glucose, d'acide gallique, de résorcinol et de pyrogallol [28]. Le pyrogallol (PY) (1,2,3-trihydroxybenzène) est un composé organique produit par les plantes [29]. Le pyrogallol a été utilisé comme nano-revêtement d'implants endo-osseux. Il a été conclu que pyrogallol libéré par le revêtement a réussi à réduire la croissance de bactéries planctoniques de manière significative [30]. Le groupe pyrogallol présent dans l'acide tannique a également joué un rôle dans le traitement de l'hypersensibilité dentaire [31].

Le but de cette étude était de comparer les effets antibactériens, les changements morphologiques et les propriétés mécaniques (en compression) du plâtre de Paris (le groupe contrôle) avec le même matériau modifié par l'addition de différentes fractions massiques d'acide tannique ou de pyrogallol.

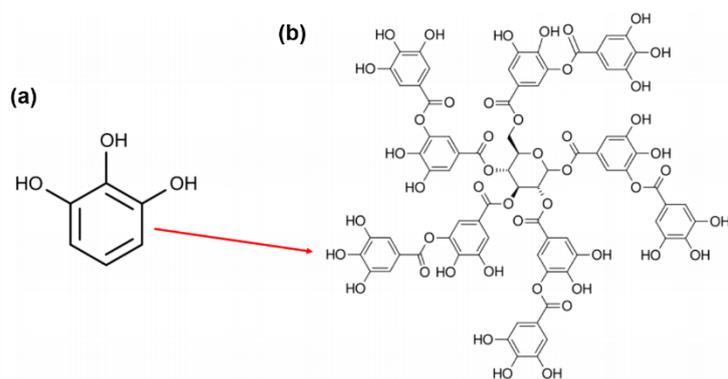


Figure 22. La structure du (a) pyrogallol (PY) et (b) de l'acide tannique (AT).

3.2. Matériel et méthodes

3.2.1. Matériel et préparations

Le sulfate de calcium hémihydraté (Fugi Rock EP Classic) a été modifié par l'ajout de différentes fractions massiques d'AT ou de PY à l'eau utilisée pour amorcer la prise du plâtre (Tableau 4).

| Groupes | Plâtre | Plâtre + 5% d'AT ou PY | Plâtre + 10% d'AT ou PY | Plâtre + 15% d'AT ou PY | Plâtre + 30% d'AT ou PY | Plâtre + 50% d'AT ou PY |
|------------|--------|------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Plâtre (g) | 5.00 | 5.00 | 5.00 | 5.00 | 5.00 | 5.00 |
| Eau (mL) | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| AT (g) | 0.0 | 0.05 | 0.10 | 0.15 | 0.30 | 0.50 |
| PY (g) | 0.0 | 0.05 | 0.10 | 0.15 | 0.30 | 0.50 |

Tableau 4. Les différentes fractions massiques d'acide tannique ou de pyrogallol incorporées dans le plâtre.

La méthode de préparation des différents composites à base de plâtre modifié avec le PY ou l'AT est illustrée dans la Fig. 23. La poudre d'AT ou de PY a été mélangée avec l'eau pendant 30s puis les solutions ont été mélangées avec le plâtre pendant 1 min. Le pourcentage d'AT et de PY correspond à la masse de soluté par rapport à la masse d'eau utilisée pour réaliser la prise d'une masse donnée de sulfate de calcium hémihydraté (Tableau 4). Les composites ont été préparés selon les instructions du fabricant, en gardant la même proportion relative de sulfate de calcium hémihydraté et d'eau (100 g/20 g). Des moules cylindriques en téflon de différentes dimensions ont été utilisés pour fabriquer les échantillons de plâtre+ AT ou PY pour les

observations au microscope électronique à balayage (MEB), l'analyse de la résistance à la compression et pour les différents tests antibactériens, y compris les tests de diffusion en gélose et de contact direct (3,0 mm de diamètre et 3,6 mm de hauteur). Des échantillons de plus grande dimension ont été fabriqués pour l'analyse par diffraction des rayons X et pour les tests de sorption de l'eau (20,0 mm de diamètre et 3,0 mm de hauteur). Enfin, des moules de 15,0 mm de diamètre et 8,0 mm de hauteur contenant 5,0 g de plâtre avec les différents pourcentages d'AT ou de PY ont été utilisés pour la libération de polyphénols à partir du plâtre dans l'eau. Tous ces essais ont été réalisés après un temps de prise de 40 min à température ambiante selon les instructions du fabricant.

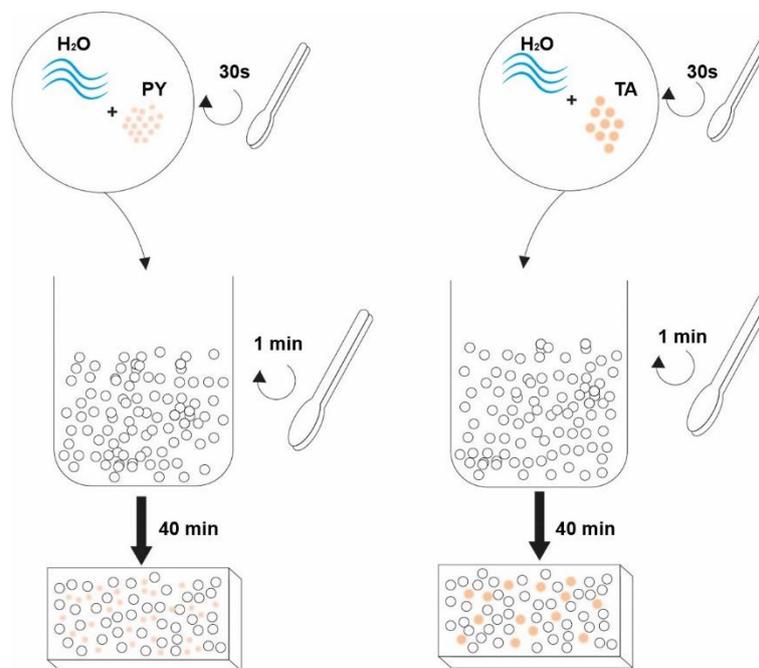


Figure 23. Illustration schématique de la préparation des matériaux composites à base de plâtre avec de l'AT ou du PY.

3.2.2. Morphologie et composition chimique

Après le temps de prise du plâtre (40 min), les échantillons ont été disposés sur des portes échantillons en aluminium. Ils ont ensuite été métallisés avec de l'or-palladium (20%/80%) en utilisant un métalliseur Hummer JR (Technics, CA, USA). La morphologie de surface du plâtre et du plâtre modifié avec l'AT ou le PY a été visualisée par l'utilisation d'un microscope

électronique à balayage (MEB, FEI Company, Eindhoven, The Netherlands). Lors des observations effectuées avec le MEB, des analyses chimiques de la surface ont été faites en utilisant le mode microanalyse X ; l'EDX. Ces expériences donnent lieu à la composition chimique, d'une manière semi-quantitative, sur une profondeur de quelques μm .

3.2.3. Propriétés mécaniques

La résistance à la compression des différents composites (plâtre, plâtre + 10%AT/PY, 30%AT/PY ou 50%AT/PY) a été évaluée avec la machine de traction Instron 3345 (Norwood, MA, USA) instrumentée avec un dynamomètre limité à 1kN (Classe 0.5 selon ISO 7500-1) et avec un capteur de déplacement. Les essais ont été réalisés à une vitesse constante de compression égale à 0,5 mm/min. Les échantillons ont été soumis à un essai de compression uni-axial afin de déterminer la rigidité du ciment et la charge maximale avant rupture. La contrainte de compression a été calculée selon la relation :

$$\sigma_c = \frac{4P}{\pi D_0^2}$$

où P est la charge enregistrée pendant l'essai et D_0 est le diamètre initial de l'échantillon. La déformation en compression a été calculée à l'aide de la relation suivante :

$$\varepsilon_c = \left| \frac{\delta L}{L_0} \right|$$

où δL est le déplacement enregistré de la traverse et L_0 est la hauteur initiale de l'échantillon.

3.2.4. Diffraction des rayons X

Les mesures de diffraction des rayons X ont été effectuées sur un diffractomètre à poudre (Bruker D8 Discover en géométrie Bragg-Brentano). Le diffractomètre était équipé d'un monochromateur frontal (longueur d'onde $\text{CuK}\alpha_1$, $\lambda = 0.154056 \text{ nm}$). Les échantillons ont été broyés sous forme de poudre avec un mortier et un pilon pour réduire la possibilité d'une

orientation préférentielle des cristallites dans les échantillons pressés. Les diagrammes de diffraction ont été affinés par la méthode de Rietveld en utilisant le logiciel Fullprof. La ligne de base a été modélisée comme une fonction polynomiale basée sur dix points expérimentaux, a été affinée. L'orientation préférentielle a été prise en compte en utilisant un modèle March. Les positions atomiques des structures cristallines ont été maintenues fixes. Les paramètres du réseau, la taille des cristallites, les facteurs isotropes de Debye-Waller ont été raffinés pour chaque phase, ainsi que leur facteur d'échelle. Ceci a permis de quantifier le rapport des différentes phases cristallisées présentes dans les composites à base de plâtre.

3.2.5. Adsorption d'eau

L'angle de contact et l'adsorption d'une goutte de l'eau distillée (5 μ L) sur la surface de l'échantillon (plâtre, plâtre+10%AT/PY et plâtre + 50%AT/PY) ont été mesurés à l'aide d'un goniomètre à angle de contact (Attention Theta, Biolin Scientific, Göteborg, Sweden). La goutte a été déposée à l'aide d'une aiguille (0,7 mm de diamètre) sur la surface de l'échantillon. Ces analyses de la surface de composites ont donné des indications sur l'hydrophilie de manière qualitative uniquement. Une vidéo permettant de suivre le profil d'étalement de la goutte sur la surface et le temps d'adsorption du volume d'eau a été enregistrée pour chaque échantillon.

3.2.6. Libération de polyphénols dans l'eau

Des courbes d'étalonnage reliant la concentration d'AT et de PY dans l'eau à l'absorbance de la solution ont été établies à partir d'une solution mère d'AT et de PY à 0,1 mg/mL dans l'eau distillée. Les mesures d'absorbance ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre mc^2 (SAFAS, Monaco) non seulement pour l'établissement de la courbe d'étalonnage mais aussi pour mesurer la fraction massique d'AT et de PY libérée à partir de différents échantillons dans l'eau distillée en contact avec les composites. Les échantillons de différents composites (5.00g)

ont été immergés dans 50 mL de l'eau distillée pendant 72h. Un mL de chaque solution en contact avec les différents composites a été récupéré après 1, 2, 4, 18, 24 et 72h. L'absorbance de ces solutions, après dilution d'un facteur 20 a été mesurée à la longueur d'onde de 274 nm pour l'AT et à la longueur d'onde de 267 nm pour le PY correspondant au maximum de leur spectre d'absorbance respectif.

3.2.7. Mesures de pH

Le pH de l'eau mise en contact avec les différents composites, qui ont été utilisés dans l'expérience de la libération de polyphénols dans l'eau, a été mesuré après 24 et 72 heures d'immersion avec un pH mètre, préalablement étalonné avec des solutions tampon à pH = 10.0, 7.0 et 4.0.

3.2.8. Activités antibactériennes

3.2.8.1. Les souches bactériennes

Staphylococcus aureus (*S. aureus*, ATCC 25923) a été cultivé selon un protocole standard en utilisant le milieu Muller-Hinton "MHB" (Le Pont de Claix, France). Dans tous les tests suivants, la turbidité du MHB contenant *S. aureus* (milieu bactérien) a été ajustée à une « densité optique » de 0,5 à la longueur d'onde de 600 nm.

3.2.8.2. Test de diffusion en milieu gélosé

Six boîtes de Pétri identiques remplies de gélose et contenant 25 ml de gélose Muller-Hinton ont été utilisées. Trois boîtes ont été utilisées pour évaluer l'activité antibactérienne des différents composites. 100 µL du milieu bactérien (*S. aureus*) ont été répartis de manière homogène sur les boîtes de Pétri. Quatre puits dans chaque boîte de Pétri, de 3,0 mm de diamètre et 3,0 mm de profondeur, ont été réalisés à l'aide d'un poinçon adapté en retirant la gélose. Les

trois premiers puits ont été remplis avec le plâtre, plâtre+10%AT ou PY et plâtre+50%AT ou PY. Le quatrième n'a pas été rempli pour servir de contrôle. Pour les trois autres plaques, le premier puits a été rempli de 21 μL de Chlorohexidine (CHX) à 20% (réf.18472510, Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Les deuxième et troisième puits ont été remplis avec 21 μL de solution à 10% AT ou PY et à 50% AT ou PY sans plâtre. Le quatrième puits n'a pas été rempli afin de servir de contrôle. Toutes les boîtes de Pétri en gélose ont été incubées à 37 °C pendant 24 h en conditions aérobies. Les zones d'inhibition après 24 h d'incubation ont été mesurées. La taille de ces zones d'inhibition a été déterminée comme étant la moitié du diamètre de la zone d'inhibition moins le diamètre du puits.

3.2.8.3. Le test de contact direct

Chaque échantillon de plâtre, plâtre + 10%AT ou PY et plâtre + 50%AT ou PY a été placé dans un Eppendorf de 2 mL. Un millilitre de milieu bactérien (*S. aureus*) a été injecté dans chaque Eppendorf. Dans le contrôle, le milieu bactérien a été placé dans le tube Eppendorf sans aucun composite. Après cela, les tubes Eppendorf ont été incubés pendant 24 h, puis pendant 72 h à 37 °C sous agitation constante (450 rpm). Après chaque période d'incubation (24h et 72h), dix microlitres de chaque solution ont été prélevés et dilués en série 10 fois jusqu'à un facteur de 10^5 dans MHB, puis 100 μL de la solution diluée a été étalée de manière homogène sur une boîte de Pétri. Les plaques ont été incubées à 37 °C pendant 24 h. Après incubation, les colonies sur la plaque ont été comptées et leur UFC/mL a été déterminé.

3.2.8.4. Test de contact direct avec des solutions d'AT et de PY

Ces tests ont été réalisés afin de comparer l'activité antibactérienne d'AT ($1702,0 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) et de PY ($126,1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) en fonction de la concentration molaire en unités de pyrogallol. Pour exprimer la concentration molaire de l'AT en termes d'unités PY, la concentration molaire d'AT

a été multipliée par 10 en raison de sa structure (Fig. 22). Une solution d'AT a été préparée en mélangeant 50 mg de poudre d'AT avec 50 mL d'eau distillée, ainsi qu'une solution de PY en mélangeant 3,70 mg de PY avec 50 ml d'eau distillée. Trois dilutions ($\times 10$, $\times 20$ et $\times 40$) de la solution initiale ont été réalisées afin d'analyser les effets antibactériens. 100 μL de la concentration initiale et de chaque solution diluée ont été ajoutés à 900 μL du milieu bactérien. Après cela, les Eppendorf ont été incubés pendant 24 h à 37 °C sous agitation constante. Après la période d'incubation, 10 μL de chaque solution ont été dilués en série de 10 fois jusqu'à une dilution finale de 10^5 dans MHB. 100 μL de chaque solution diluée ont ensuite été étalés de manière homogène sur une plaque. Les plaques ont été incubées à 37 °C pendant 24 h. Après l'incubation, les colonies bactériennes présentes sur la plaque ont été comptées et leur UFC.mL⁻¹ a été déterminée.

3.2.8.5. Accumulation de biofilms de *S. aureus* sur les surfaces des composites

Chaque disque de plâtre, plâtre +10%AT ou PY et plâtre +50%AT ou PY a été placé dans un puit d'une plaque à 24 puits. 20 μL de MHB contenant *S. aureus* ont été placés sur la surface de chaque échantillon. Après 1 h d'incubation à 37 °C, 2 mL de MHB ont été ajoutés à chaque puits. Après 24 h d'incubation, les disques ont été rincés délicatement avec de l'eau distillée pendant 10s. Les échantillons ont ensuite été fixés en utilisant une solution de glutaraldéhyde 0,05 M dans un tampon cacodylate à 4% pendant 8 h. Ensuite, les échantillons ont été rincés en utilisant un tampon cacodylate à 4% (opération répétée trois fois, 5 min chacune). Les échantillons ont été déshydratés dans des bains d'éthanol de fraction volumique croissante (35%, 50%, 70% et 95%) pendant 3 minutes à chaque étape. Après la série graduelle de solutions d'éthanol, les échantillons ont été séchés en utilisant un agent de séchage chimique, l'hexaméthylsilizane (HMDS). Pour cela, les échantillons ont été transférés de l'éthanol 95 % dans une solution 1:1 de HMDS pendant 10 minutes, puis transférés dans une solution 100 %

HMDS pendant deux fois de 10 minutes. Toutes les étapes de silanisation à l'HMDS doivent être effectuées sous la hotte chimique à cause de la volatilité et de la toxicité de ce composé. Finalement, les disques ont été métallisés avec de l'or-palladium (20%/80%) en utilisant un métalliseur et observés au MEB pour déterminer la densité, la morphologie et la capacité d'accumulation des biofilms de *S. aureus*.

3.2.9. Activité antioxydante

L'activité antioxydante des échantillons préparés a été évaluée par la décoloration du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH, réf. D9132 de Sigma Aldrich). Un échantillon de chaque matériau de plâtre, plâtre + 10%AT/PY, plâtre +30%AT/PY et plâtre +50%AT/PY a été immergé dans 15 mL de DPPH (10^{-4} mol/L dans l'éthanol à 70%). Après 5 min, 1 mL de chaque solution de surnageant au-dessus des composites a été prélevé (après agitation vigoureuse) à l'aide d'une pipette. Ensuite, le spectre d'absorption de 1 mL de chaque solution a été mesuré dans la gamme de longueurs d'onde entre 300 et 600 nm. La solution qui était en contact avec le plâtre de Paris sans AT ni PY, a été utilisée dans la cellule de référence. L'activité antioxydante se traduit par une décoloration du DPPH et la diminution d'absorbance à 525 nm permet une quantification de cet effet par rapport à la solution de DPPH en contact avec le plâtre non modifié. Cette référence permet de tenir compte de la décoloration lente du DPPH en contact avec l'oxygène dissous dans le milieu réactionnel. Des photos numériques de toutes les solutions de DPPH en contact avec les échantillons ont également été prises après 1 min de contact.

3.2.10. Stabilité des composites dans l'eau

Des moules en acier inoxydable (diamètre interne de $20 \pm 0,1$ mm et hauteur de $1,6 \pm 0,1$ mm) ont d'abord été nettoyés avec de l'acétone dans un bain à ultrasons pendant 15 min, puis pesés

trois fois (précision $\pm 0,0001$ g ; Ohaus, Pioneer® Analytical, N°anikon, Suisse) avant l'injection de composites, et la valeur moyenne a été enregistrée. Après 2 h, les moules remplis ont été pesés à nouveau 3 fois avant les périodes d'immersion dans l'eau. Après 24 et 72h d'immersion dans 50 mL d'eau distillée, les échantillons ont été enlevés de l'eau distillée et séchés à 37 °C pendant 24 heures. Ensuite, la masse de chaque disque a été évalué trois fois et la moyenne a été calculée. La différence de masse entre la valeur initiale (avant l'immersion) et la valeur finale a été enregistrée en pourcentage pour déterminer le degré de solubilité des composites plâtres ou plâtre + polyphénols.

3.3. Résultats et discussion

Dans cette étude, le plâtre de Paris a été modifié avec différentes fractions massiques d'AT ou de PY qui ont été rajoutés à l'eau avant la prise du plâtre. Il n'a pas été possible de préparer des composites dans lesquels les fractions d'AT ou de PY étaient supérieures à 50% par rapport à la masse d'eau car la quantité d'eau disponible n'était plus suffisante pour permettre la prise du plâtre qui restait alors sous forme de poudre. La prise du plâtre n'a pas été influencée de manière significative par l'ajout de 50% d'AT ou de PY. Pour des fractions de masse plus élevées, le plâtre est resté sous forme de poudre, probablement en raison de la nature hautement hydrophile de l'AT ou du PY, dont la solubilisation a réduit la quantité d'eau disponible pour la prise du plâtre.

L'addition d'AT ou de PY à l'eau a eu une influence marquée sur la morphologie du plâtre obtenu (Fig. 24a) à savoir une réduction perceptible de la taille des grains. La capacité de l'AT à modifier la morphologie du plâtre pourrait être liée à la capacité de chélation de l'AT vis-à-vis des cations Ca^{2+} [32]. Nous supposons que le PY peut jouer un rôle similaire que l'AT mais de manière moins prononcée. Un changement morphologique remarquable a été observé pour les échantillons de plâtre +50% AT/PY. Un aspect pseudo-fibrillaire a été détecté à la

surface et les particules de plâtre étaient recouvertes par cette structure. Cette structure pseudo-fibrillaire a été éliminée après l'immersion de l'échantillon dans l'eau pendant 24 h (Fig. 24b), ce qui suggère déjà qu'une partie du polyphénol incorporé peut être libérée dans l'eau.

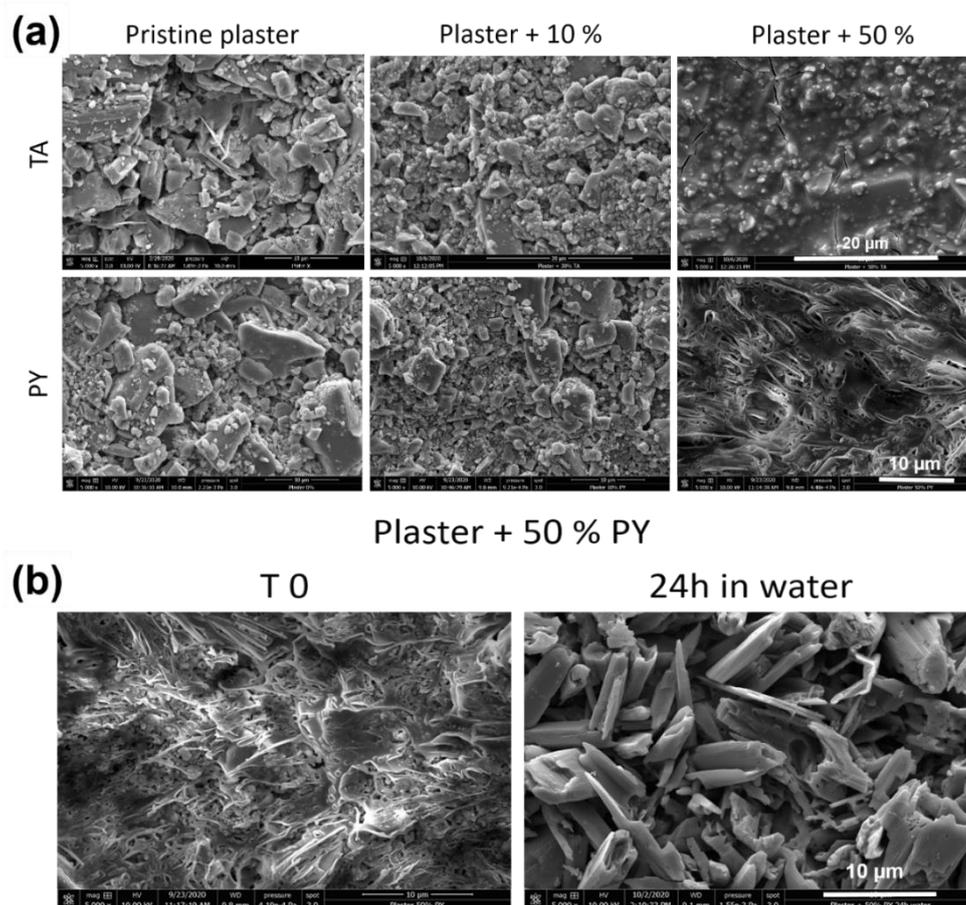


Figure 24. Micrographies électroniques par balayage montrant (a) le changement de morphologie du plâtre dopé avec différentes fractions massiques en acide tannique et en pyrogallol ;(b) le changement de morphologie du plâtre dopé avec 50%PY après 24h d'immersion dans l'eau.

L'incorporation d'AT ou de PY dans les mélanges a également conduit, comme prévu, à une augmentation marquée du contenu atomique en carbone (la signature chimique de l'AT et du PY par rapport au plâtre) avec une diminution résultante du contenu atomique en Ca et S (Tableau 5).

| Groupes | Plâtre | Plâtre + 10% AT | Plâtre + 10% PY | Plâtre + 50% AT | Plâtre + 50% PY |
|---------|----------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| C (%) | 5,6±0,6 | 10,4±4,2 | 10,6±2,3 | 30,1±7,4 | 26,5±5,5 |
| Ca (%) | 26,6±0,9 | 25±2,4 | 24,7±1,3 | 15,2±3,6 | 18±1,9 |
| S (%) | 20,2±1,5 | 20,4±1,7 | 22±4,5 | 12,4±1,3 | 15,6±2,7 |

Tableau 5. Variation de la composition chimique de différents composites obtenue par analyse élémentaire en EDX.

Les valeurs de résistance à la compression n'ont montré aucune différence statistiquement significative entre les valeurs du plâtre vierge (58 ± 5 MPa) et du plâtre +30%AT (48 ± 8 MPa) ($P > 0,05$). Cependant, des valeurs de résistance à la compression inférieures statistiquement significatives ont été observées pour le plâtre +10%AT (11 ± 3 MPa), le plâtre +50%AT (34 ± 7 MPa) et pour tous les groupes du plâtre+PY par rapport aux échantillons de plâtre vierge ($P < 0,05$) (Fig. 25). La valeur minimale de la contrainte de compression obtenue pour le composite plâtre + 10%AT est surprenante mais reproductible et pourrait être due à l'interaction entre AT et les cations Ca^{2+} induisant un changement de phase. La discontinuité observée dans la résistance à la compression du plâtre avec l'augmentation de l'AT incorporé pourrait bien être due à un rôle différent joué par le polyphénol. Pour une faible fraction massique d'AT (10%), une plus grande quantité d'AT pourrait être liée de manière irréversible au matériau inorganique que pour 30 et 50% d'AT. Mais pour les deux échantillons composites avec 30% et 50% d'AT, la quantité absolue de polyphénol incorporé est beaucoup plus élevée et une partie de celui-ci peut être adsorbée sur la surface des particules du plâtre via des liaisons hydrogène ou des interactions de coordination entre l'AT et le polyphénol. Ces liaisons pourraient renforcer le matériau et réduire la probabilité de la propagation des fissures. Quoiqu'il en soit, pour tous les échantillons contenant de l'AT, au-delà de 10% en AT, la résistance à la compression diminue avec l'augmentation de la fraction massique en AT ce qui est prévisible en ajoutant une charge organique à un matériau inorganique ayant une forte résistance à la compression. La discontinuité observée pour les composites plâtres+AT est spécifique à l'AT et ce phénomène n'est pas observé lorsque le PY est ajouté au plâtre. Nous nous sommes demandé si l'ajout d'AT dans le plâtre de Paris pouvait induire des changements de phase, en particulier en présence de 10% d'AT. Dans ce but, nous avons étudié les différents composites par diffraction aux rayons X.

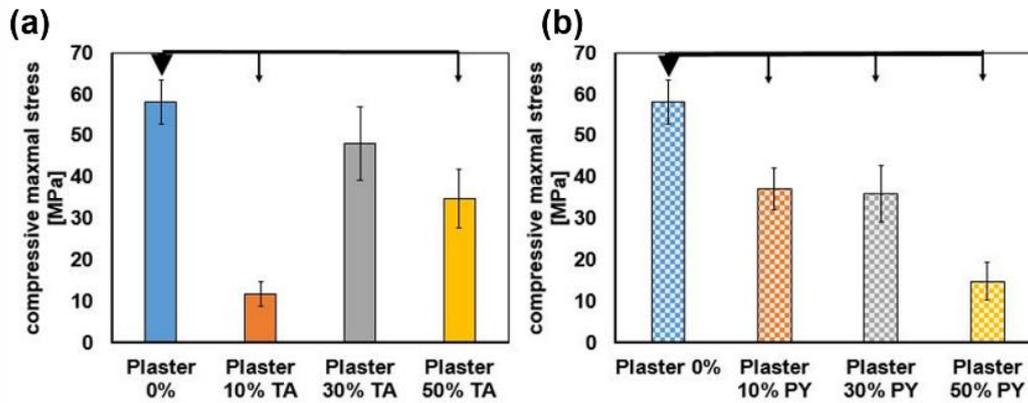


Figure 25. Evolution des propriétés mécaniques (en compression) de différents composites (a) plâtre+AT ; (b) plâtre+PY en fonction de la fraction massique de composé organique ajouté.

Le diagramme de diffraction des rayons X (DRX) du plâtre vierge peut être indexé avec deux phases de sulfate de calcium hydraté : la Bassanite ($2\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) et le Gypse ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Fig. 26a). Aucun pic ne reste non indexé indiquant qu'il n'y a pas d'autres phases cristallisées quelle que soit la teneur en AT ajoutée (Fig. 26b). Les diffractogrammes des composites du plâtre+AT sont très similaires à ceux du plâtre vierge. Chacun de ces diagrammes DRX a été affiné et le rapport entre le Gypse et la Bassanite est constant est égal à 3 à l'erreur expérimentale près de $\pm 10\%$ (Fig. 26c). La diffraction aux rayons X ne permet donc pas d'expliquer la plus faible résistance à la compression observée pour le composite plâtre+10% AT. On peut noter que les échantillons contenant du PY présentent des diagrammes DRX avec des pics supplémentaires (Figs. 26 d et e). Tous ces pics supplémentaires peuvent être indexés avec la référence 33. Hofer et coll. [33] n'ont pas été capables de proposer un réseau cristallin et nous non plus. La présence d'une structure cristalline inconnue conduit à une quantification peu fiable sur les échantillons de plâtre+PY.

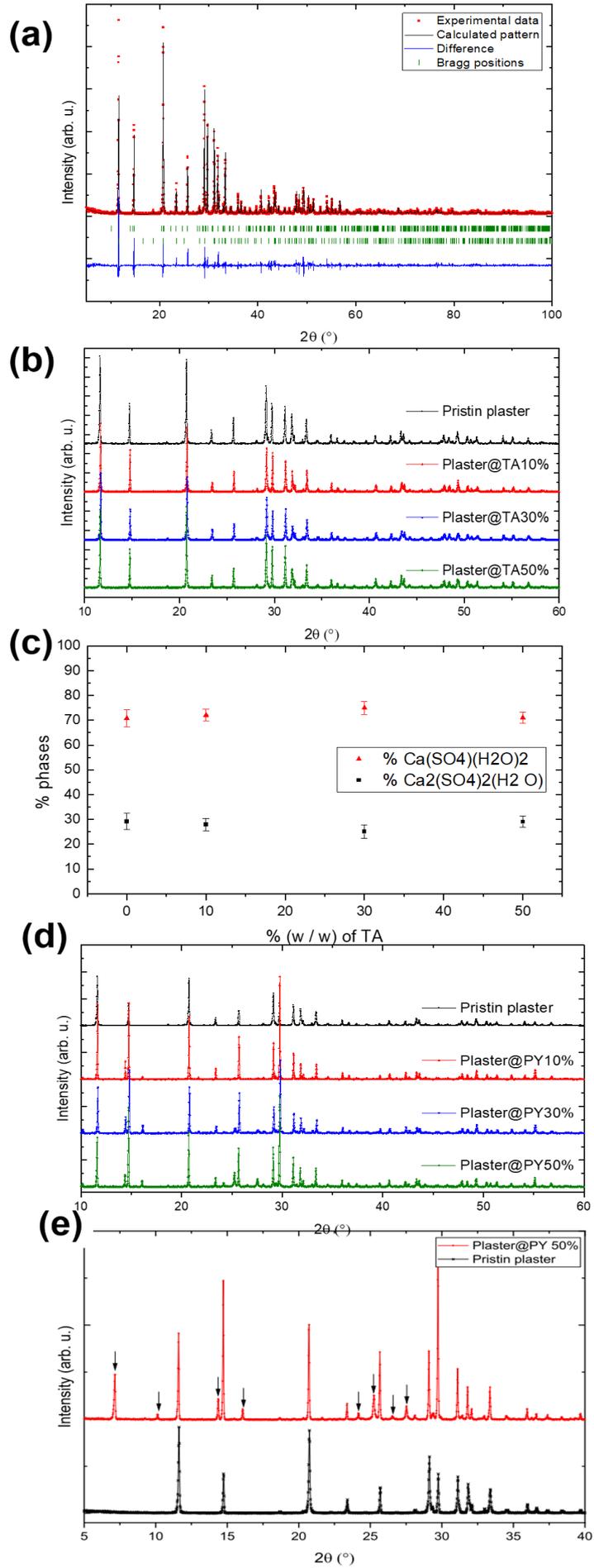


Figure 26. (a) Diffractogramme aux rayons X du plâtre vierge affiné par la méthode Rietveld avec de la Bassanite et du Gypse ; (b) Diffractogramme aux rayons X du plâtre+AT ; (c) Abondance relative des phases en fonction de la quantité d'AT ajoutée, déterminée en affinant les diagrammes DRX avec la méthode de Rietveld ; (d) Diffractogramme aux rayons X du plâtre+PY ; (e) Diffractogramme aux rayons X du plâtre+50%PY comparé à celui du plâtre non modifié.

La discontinuité observée dans la résistance à la compression du plâtre avec l'augmentation en AT incorporée ne peut donc pas être expliquée par l'apparition d'une nouvelle phase. Par contre cette discontinuité, en plus d'un rôle joué par le polyphénol, pourrait être expliquée par le changement de la porosité du composite car l'incorporation de PY ou d'AT dans le plâtre de Paris ne modifie pas seulement la morphologie du matériau mais peut également changer sa porosité et la distribution de la taille des pores, une propriété qui affecte les propriétés mécaniques et sa capacité à libérer les molécules organiques incorporées. Kharouf et coll. [23] ont montré un changement de porosité et de la distribution de pores dans le cas du ciment MTA dopé avec de l'AT (voir chapitre 2). Nous avons pensé étudier un éventuel changement de la distribution de la taille des pores lors de l'incorporation de PY ou d'AT en utilisant la sorption d'azote et l'analyse des données par la méthode Brunauer-Emmett-Teller (BET). Ceci n'est cependant pas possible avec un matériau fortement hydraté comme le sulfate de calcium déshydraté car la méthode BET nécessite un dégazage intensif du matériau avant d'effectuer la mesure. Un tel processus de dégazage induit une déshydratation et un changement de phase du sulfate de calcium hydraté au sulfate (Gypse) de calcium hémihydraté (Bassanite) avec un changement concomitant de la morphologie et de la distribution de la taille des pores. Nous aurions pu penser également à déterminer la porosité moyenne par flottabilité, mais cela n'est pas possible en raison de la libération de PY et AT dans l'eau et même dans d'autres solvants. Par conséquent, l'influence de la porosité et de la distribution de la taille des pores sur les propriétés des plâtres composites étudiés ici reste une question ouverte et pourrait être étudiée avec la tomographie aux rayons X dans l'avenir.

Même si la composition chimique (EDX) et la morphologie (MEB) du plâtre obtenu sont nettement affectées par l'ajout d'AT ou de PY, l'hydrophilie globale du matériau n'est pas

affectée (Fig. 27). L'hydrophilie indépendante de l'AT et du PY du plâtre a une importance pour ses applications biologiques, en particulier pour la libération de polyphénols qui pourraient conférer au plâtre des propriétés antimicrobiennes.

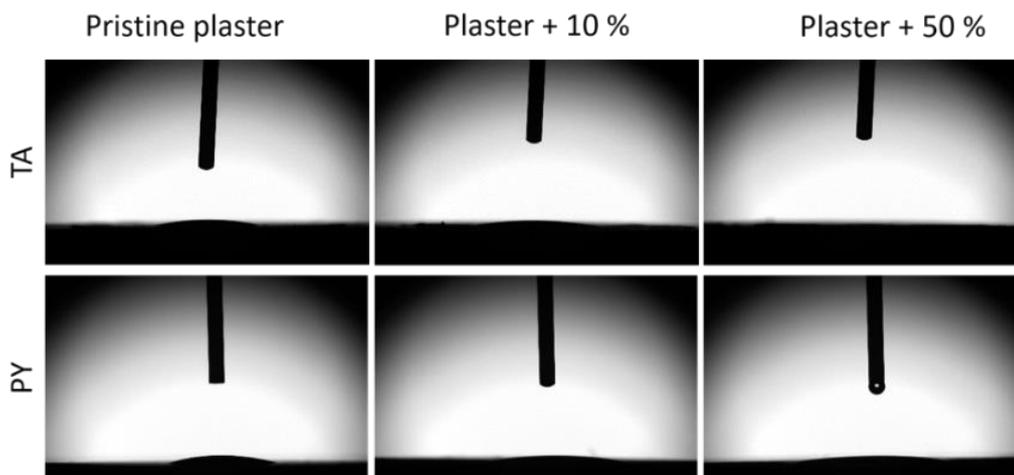


Figure 27. Profil d'une goutte d'eau distillée (5µl) déposée sur la surface de différents composites après 1s de dépôt.

Pour les applications médicales, même si le plâtre est destiné à assurer une libération progressive du calcium et à être remplacé par de l'os, il est important de contrôler sa résorption, surtout dans le cas de l'addition d'AT ou PY dans sa formulation initiale. Nous avons constaté que le plâtre vierge subit une légère augmentation de masse après 24 et 72 h et cela est principalement dû à l'infiltration d'eau dans les pores. Cependant, après 24 h, les plâtres dopés au PY et à l'AT subissent une légère diminution de masse qui est attribuée à une libération d'une partie de polyphénols dans l'eau. Néanmoins, dans tous les cas, une stabilité satisfaisante du matériau au contact de l'eau est assurée pendant au moins 72 h (Tableau 6).

| Groupes | Plâtre | Plâtre + 50% AT | Plâtre + 50% PY |
|---------|------------|--------------------|--------------------|
| 24h | +1,21±0,15 | -1,51±0,1 | -3,11±0,15 |
| 72h | +1,23±0,02 | -2,32±0,11 | -4,3±0,14 |

Tableau 6. Variation de la solubilité de différents composites dans l'eau après 24 et 72h.

Après mise en contact des échantillons composites dans l'eau, un changement de couleur de l'eau a été noté (Fig. 28a). Ce changement de couleur est attribué à l'oxydation des polyphénols libérés. La cinétique de libération des polyphénols dans l'eau est assez rapide et

est notable après seulement 1 h de contact avec l'eau (Fig. 28b). Les résultats montrent que plus la fraction d'AT incorporée initialement dans le composite est grande, plus la concentration de l'AT libérée dans l'eau est élevée (Fig. 28b). Le maximum d'AT libéré dans l'eau après 72h de contact est cependant inférieur à 6% de la fraction massique initiale d'AT dans le composite. En ce qui concerne le PY, une fraction beaucoup plus importante par rapport à l'AT, environ 50%, est libérée dans l'eau après 72 heures d'une manière presque indépendante de la fraction de polyphénol initialement incorporée (Fig. 28b). Cela signifie que les deux polyphénols incorporés dans le plâtre jouent un double rôle : une partie est fortement liée au plâtre ou incorporée dans sa structure et une autre fraction remplit les pores de la structure ou n'est que faiblement adsorbée à la surface des particules de plâtre. Ces molécules de polyphénols faiblement liées ou remplissant les pores restent disponibles pour une libération ultérieure et des applications biologiques. Ce double rôle de polyphénols, est similaire au rôle joué lorsqu'ils sont mélangés à de la gélatine [27]. La libération importante de PY (50%) dans l'eau en comparaison avec l'AT (6%) suggère également qu'il existe deux populations de PY incorporé, mais que la fraction fortement liée, non libérée dans l'eau de PY est plus petite par rapport à celle d'AT. Cette différence de la quantité du PY ou d'AT libéré peut être aussi liée à la taille beaucoup plus grande de l'AT par rapport au PY (Fig. 22) et à l'hypothèse que le PY implique des interactions plus faibles que l'AT à la surface du plâtre. Ceci implique que la plus grande partie de l'AT utilisé prend part en tant que composant structurel du composite obtenu. On pourrait aussi envisager que la libération du polyphénol est ralentie pour des raisons stériques.

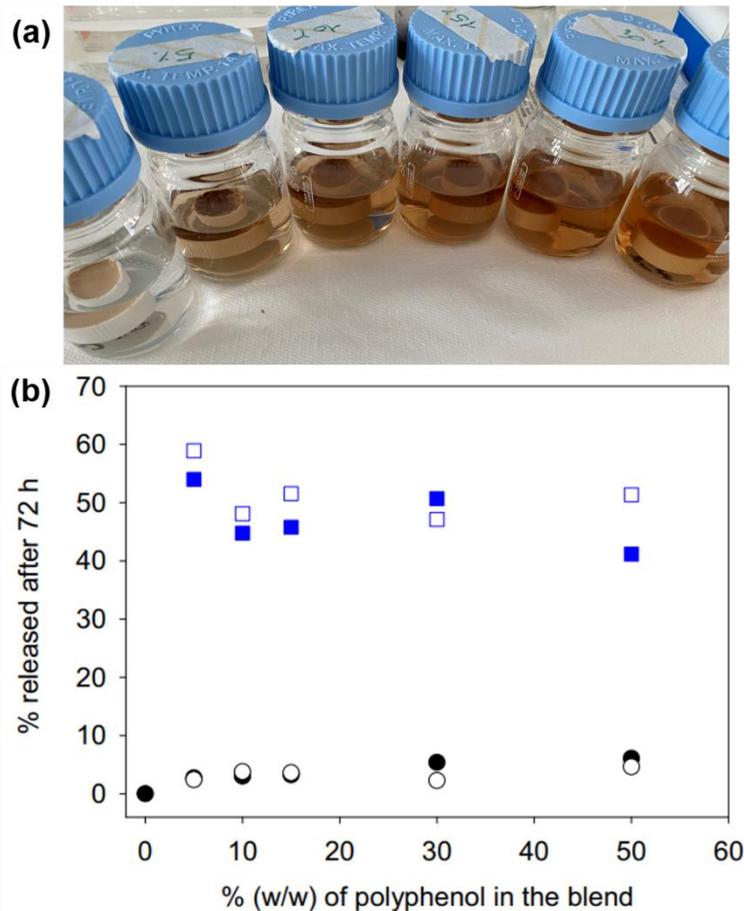


Figure 28. (a) Photos des solutions en contact avec les différents composites après 72h d'immersion ; (b) Pourcentage de polyphénol libéré dans l'eau en contact avec les différents composites (PY : carreaux bleu et blanc ; AT : cercles noir et blanc) en fonction du temps de contact (1-72h). Deux séries d'expériences indépendantes ont été effectuées avec chaque composite.

La libération de deux polyphénols dans l'eau a induit une légère diminution du pH par rapport au pH de l'eau en contact avec le plâtre vierge (Fig. 29a). L'acide tannique, en tant qu'acide faible [34], peut effectivement induire une légère diminution du pH de l'eau. En revanche, le changement de pH de l'eau en contact avec les mélanges plâtre + PY était plus limité en comparaison avec l'AT. Cette observation peut être rationalisée sur la base des valeurs de pKa des deux polyphénols. L'AT est caractérisée par une valeur moyenne de pKa de 8,5 [35] alors que les deux valeurs de pKa du PY sont de 9,02 et 11,2 [36]. Ceci montre que PY est un acide plus faible qu'AT.

Concernant l'effet antioxydant, le plâtre non modifié n'a aucun effet sur la couleur de la solution de DPPH (Fig. 29b). Mais l'incorporation de PY ou d'AT a montré un changement de

couleur après 1 min de contact entre la solution de DPPH avec les échantillons composites/polyphénols. Il semble que l'effet de l'AT soit légèrement plus important que celui du PY (Tableau 7). Cela peut être dû à la fraction intrinsèquement plus élevée de groupements hydroxyles réducteurs sur l'AT que le PY (Fig. 22).

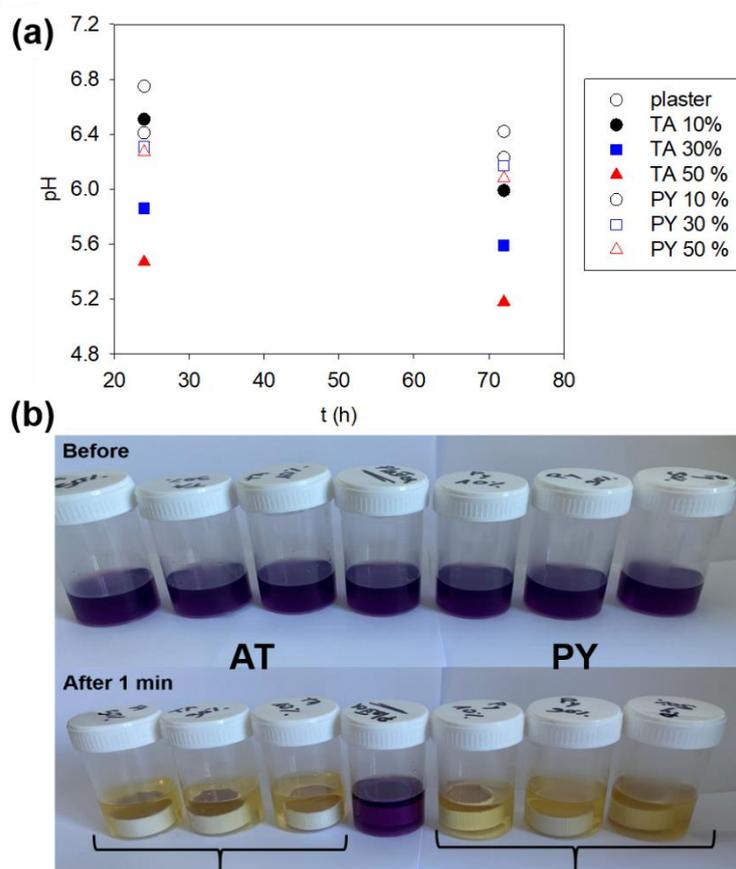


Figure 29. (a) Changement du pH de l'eau en contact avec les différents composites en fonction du temps ; (b) Images du changement de couleur subi par une solution de DPPH avant et après 1min d'immersion des différents composites dans le DPPH.

| | Plâtre + 10% AT | Plâtre + 30% AT | Plâtre + 50% AT | Plâtre + 10% PY | Plâtre + 30% PY | Plâtre + 50% PY |
|---------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 525_(nm) | -0,79 | -0,83 | -0,89 | -0,75 | -0,76 | -0,79 |

Tableau 7. Activités antioxydantes du plâtre dopé avec de l'AT ou du PY après 1min de contact avec la solution de DPPH à 10^{-4} M dans l'éthanol à 70%.

La libération d'une partie des polyphénols incorporés le plâtre (Fig. 28) devrait lui conférer une activité antibactérienne contre une bactérie comme *Staphylococcus aureus*. Concernant le test en gélose, le plâtre vierge ne permet pas de créer une zone d'inhibition sur les gels d'Agar (Fig. 30). Cependant le composite dopé avec l'AT présente une large zone

d'inhibition qui augmente avec l'augmentation de la concentration en AT (plus de libération) (Tableau 8). Les zones d'inhibitions du plâtre dopé avec le PY ont été plus importantes en comparaison avec du plâtre dopé à l'AT (Fig. 30, Tableau 8). Ces résultats vont dans le même sens que la quantité libérée de chaque polyphénol. En observant l'expérience des différentes solutions sans plâtre, des zones d'inhibitions plus importantes ont été trouvées par rapport à l'expérience de composites dopé avec PY/AT. Les zones d'inhibition, ainsi qu'une partie du gel, apparaissent brunes dans le cas du plâtre dopé avec AT/PY ainsi que pour les solutions contenant d'AT/PY. Cette coloration s'explique facilement par une oxydation partielle de l'AT/PY aux pH physiologiques auxquels les tests de diffusion en gélose ont été effectués.

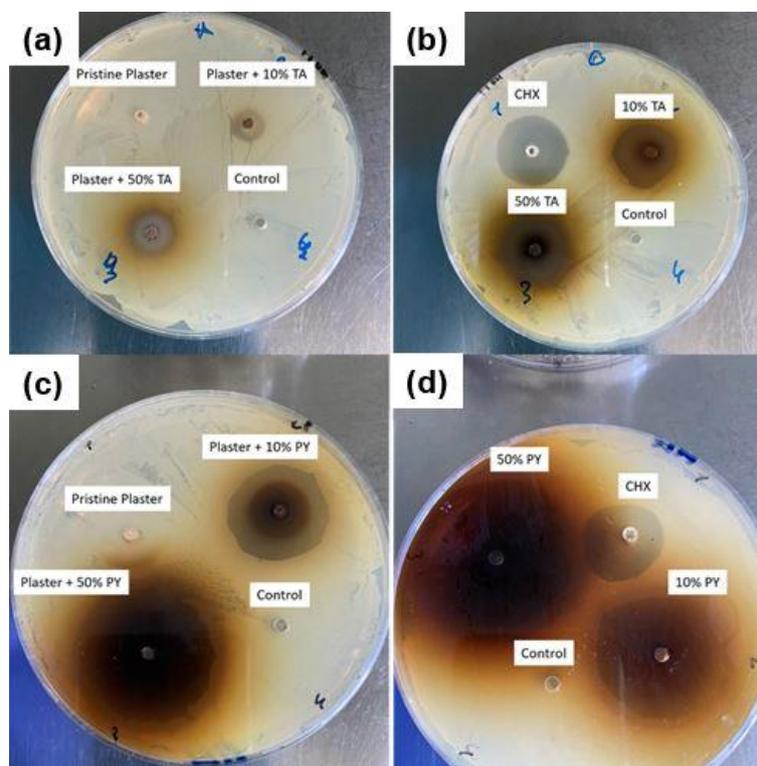


Figure 30. Test de diffusion en milieu gélosé. (a) plâtre et plâtre + AT ; (b) solutions d'AT et de Chlorhexidine ; (c) plâtre et plâtre + PY ; (d) solutions de PY et de Chlorhexidine (sans plâtre).

| | Plâtre | Plâtre + 10% AT | Plâtre + 50% AT | Plâtre + 10% PY | Plâtre + 50% PY | CHX |
|---------------------------------|--------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------|
| Zones d'inhibitions (mm) | 0 | 3,0±0,5 | 5,0±0,5 | 9,0±0,7 | 12,0±0,5 | 7,0±0,7 |

Tableau 8. Taille des zones d'inhibition du plâtre et du plâtre dopé avec de l'AT ou du PY ainsi qu'avec la Chlorhexidine.

Concernant les tests de contact direct, le plâtre a permis le même développement bactérien que le groupe contrôle (milieu bactérien) (Fig. 31a). Le composite plâtre+10%PY était plus efficace (tue 70 % des bactéries) que la même fraction d'AT (tue 50% des bactéries) incorporée dans le plâtre après 24 h. En outre, le plâtre dopé avec 50% de PY a permis l'éradication de plus de 98 % des bactéries après 24 heures et aucune colonisation bactérienne n'a été observée après 72 heures. Mais, de façon intéressante, pour des pourcentages d'AT supérieurs à 10%, la faible quantité d'AT libérée (Fig. 28) est suffisante pour inhiber fortement la prolifération de *Staphylococcus aureus*. L'effet inhibiteur du PY est même beaucoup plus fort ; ceci n'est pas dû à un effet inhibiteur intrinsèque plus élevé du PY mais à une libération plus importante.

Après l'observation qualitative de l'accumulation de biofilms sur la surface des différents composites, nous pouvons noter une accumulation dense de bactéries sur la surface de plâtre vierge, tandis que le plâtre à 10% d'AT/PY et le plâtre à 50% d'AT/PY présentent moins de bactéries accumulées (Fig. 31b).

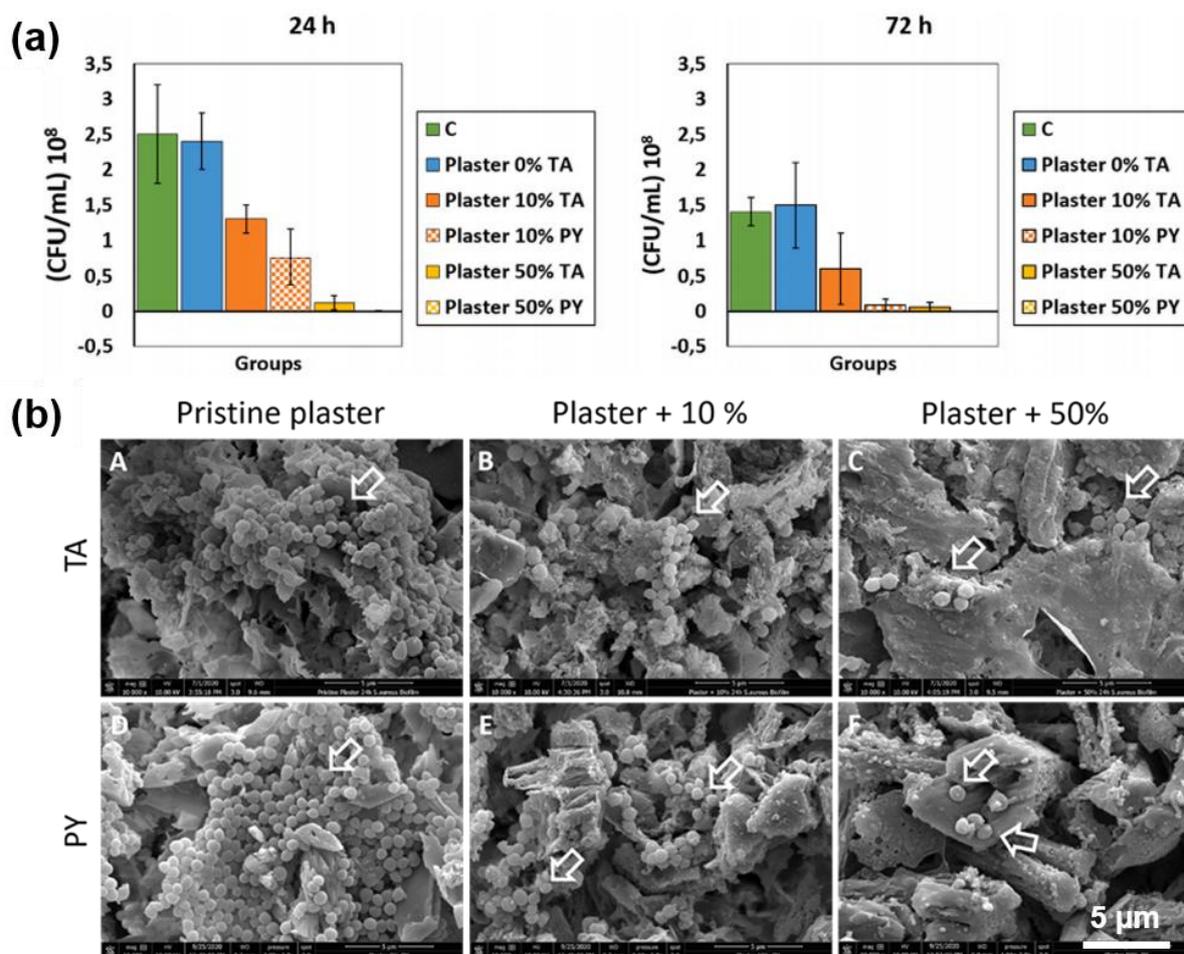


Figure 31. (a) Résultats des tests de contact direct ; (b) Micrographie électronique à balayage (x10000) des biofilms de *S. aureus* sur les surfaces de plâtre vierge ou de plâtre + AT/PY. Les biofilms accumulés sur les surfaces sont indiqués par des flèches blanches.

Lorsque le nombre d'unités formant des colonies (UFC) de *Staphylococcus aureus* en suspension est mesuré en fonction de la concentration molaire en unités PY, il apparaît que PY est de loin beaucoup moins efficace qu'AT contre *S. aureus* (Fig. 32). Ceci suggère fortement que les 10 unités PY de l'AT agissent en coopération dans son activité antimicrobienne. En conséquence, l'efficacité élevée du PY observé dans le test direct (Fig. 31a) et d'agar (Fig. 30c) est liée à une forte libération de ce polyphénol à partir des composites (Fig. 28), mais pas à une activité antimicrobienne intrinsèquement plus élevée que celle de l'AT (Fig. 32). Conformément à notre étude (Fig. 32), Cynthia et coll. [29] et Kyaw et coll. [37] ont montré que l'AT avait une activité antibactérienne intrinsèquement supérieure (en termes de valeur de MIC) à celle du PY contre *S. aureus*.

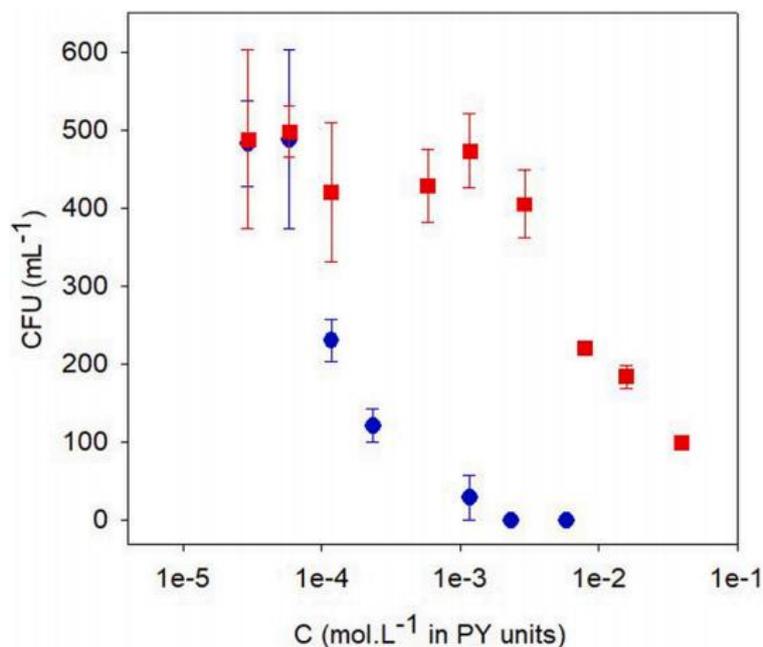


Figure 32. Nombre d'UFC en fonction de la concentration molaire en unités PY. Les cercles bleus correspondent à l'AT et les carrés rouges correspondent au PY.

3.4. Conclusions

Avec les limitations de cette étude, il a été démontré que l'incorporation d'AT ou PY dans des formulations initiales de plâtre de Paris permet de modifier la morphologie et les propriétés mécaniques du plâtre sans affecter son hydrophilie. Une grande partie de la quantité incorporée d'AT sert de composant structurel du composite obtenu mais une petite partie (jusqu'à 6%) peut être libérée dans l'eau. Cette quantité libérée est suffisante pour inhiber la prolifération de *S. aureus*. En ce qui concerne le PY, une libération beaucoup plus importante dans l'eau permet une activité antimicrobienne encore meilleure que celle observée pour l'AT. Ceci n'est cependant pas dû à une activité antimicrobienne intrinsèque plus élevée du PY mais à une libération plus importante de PY par rapport à l'AT. Dans l'ensemble, ce travail montre que l'incorporation de PY ou d'AT dans le plâtre fournit des effets antimicrobiens et antioxydants par la libération des molécules actives, mais sans engendrer une réduction importante de la résistance à la compression et sans un grand changement de la solubilité et donc de la stabilité chimique.

3.5. Références

- [1] Sharma H, Prabu D. Plaster of Paris: Past, present and future. *J Clin Orthop Trauma*. 2013, 4, 107-109.
- [2] Hernigou P. Plaster of Paris: the orthopaedic surgeon heritage. *Int Orthop*. 2016, 40, 1767-1779.
- [3] Alhadainy HA, Himel VT. An in vitro evaluation of plaster of Paris barriers used under amalgam and glass ionomer to repair furcation perforations. *J Endod*. 1994, 20, 449-452.
- [4] Dewi AH, Ana ID, Wolke J, Jansen J. Behavior of plaster of Paris-calcium carbonate composite as bone substitute. A study in rats. *J Biomed Mater Res A*. 2013, 101, 2143-2150.
- [5] Dewi AH, Ana ID, Wolke J, Jansen J. Behavior of POP-calcium carbonate hydrogel as bone substitute with controlled release capability: a study in rat. *J Biomed Mater Res A*. 2015, 103, 3273-3283.
- [6] Orsini G, Ricci J, Scarano A, et al. Bone-defect healing with calcium-sulfate particles and cement: an experimental study in rabbit. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2004, 68, 199-208.
- [7] Bahn SL. Plaster: a bone substitute. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1966, 21, 672-681.
- [8] Mackey D, Varlet A, Debeaumont D. Antibiotic loaded plaster of Paris pellets: an in vitro study of a possible method of local antibiotic therapy in bone infection. *Clin Orthop Relat Res*. 1982, 167, 263-268.
- [9] Thomas MV, Puleo DA. Calcium sulfate: Properties and clinical applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009, 88, 597-610.
- [10] Mittal M, Chandra S, Chandra S. An evaluation of plaster of Paris barriers used under various materials to repair furcation perforations (in vitro study). *J Endod*. 1999, 25, 385-388.

- [11] Laycock PA, Cooper JJ, Howlin RP, Delury C, Aiken S, Stoodley P. In Vitro Efficacy of Antibiotics Released from Calcium Sulfate Bone Void Filler Beads. *Materials (Basel)*. 2018, 11, 2265.
- [12] Sun HJ, Xue L, Wu CB, Zhou Q. Use of Vancomycin-Impregnated Calcium Sulfate in the Treatment of Osteomyelitis of the Jaw. *J Oral Maxillofac Surg*. 2017, 75, 119-128.
- [13] Pförringer D, Obermeier A, Kiokekli M, et al. Antimicrobial Formulations of Absorbable Bone Substitute Materials as Drug Carriers Based on Calcium Sulfate. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016, 60, 3897-3905.
- [14] Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspect Medicin Chem*. 2014, 6, 25-64.
- [15] Kharouf N, Haïkel Y, Ball V. Polyphenols in Dental Applications. *Bioengineering (Basel)*. 2020, 7, 72.
- [16] Kharouf N, Eid A, Hardan L, et al. Antibacterial and Bonding Properties of Universal Adhesive Dental Polymers Doped with Pyrogallol. *Polymers (Basel)*. 2021, 13, 1538.
- [17] He L, Deng D, Zhou X, et al. Novel tea polyphenol-modified calcium phosphate nanoparticle and its remineralization potential. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2015, 103, 1525-1531.
- [18] Tang B, Yuan H, Cheng L, et al. Effects of gallic acid on the morphology and growth of hydroxyapatite crystals. *Arch Oral Biol*. 2015, 60, 167-173.
- [19] Huang XL, Liu MD, Li JY, et al. Chemical composition of *Galla chinensis* extract and the effect of its main component(s) on the prevention of enamel demineralization in vitro. *Int J Oral Sci*. 2012, 4, 146-151.
- [20] Guo B, Que KH, Jing Yang, et al. Effect of *Galla chinensis* on the remineralization of two bovine root lesions morphous in vitro. *Int J Oral Sci*. 2012, 4, 152-156.

- [21] Cheng L, Li J, He L, Zhou X. Natural products and caries prevention. *Caries Res.* 2015, 49 Suppl 1, 38-45.
- [22] Türkan F, Taslimi P, Saltan FZ. Tannic acid as a natural antioxidant compound: Discovery of a potent metabolic enzyme inhibitor for a new therapeutic approach in diabetes and Alzheimer's disease. *J Biochem Mol Toxicol.* 2019, 33, e22340.
- [23] Kharouf N, Zghal J, Addiego F, et al. Tannic acid speeds up the setting of mineral trioxide aggregate cements and improves its surface and bulk properties. *J Colloid Interface Sci.* 2021, 589, 318-326.
- [24] Tintino SR, Morais-Tintino CD, Campina FF, et al. Tannic acid affects the phenotype of *Staphylococcus aureus* resistant to tetracycline and erythromycin by inhibition of efflux pumps. *Bioorg Chem.* 2017, 74, 197-200.
- [25] Le Z, Chen Y, Han H, et al. Hydrogen-Bonded Tannic Acid-Based Anticancer Nanoparticle for Enhancement of Oral Chemotherapy. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2018, 10, 42186-42197.
- [26] Maleki Dizaj S, Lotfipour F, Barzegar-Jalali M, et al. Ciprofloxacin HCl-loaded calcium carbonate nanoparticles: preparation, solid state characterization, and evaluation of antimicrobial effect against *Staphylococcus aureus*. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2017, 45, 535-543.
- [27] Reitzer F, Berber E, Halgand J, Ball V, Meyer F. Use of Gelatin as Tannic Acid Carrier for Its Sustained Local Delivery. *Pharm Front.* 2020, 2, e200002.
- [28] Bensalah N, Chair K, Bedoui A. Efficient degradation of tannic acid in water by UV/H₂O₂ process. *Sustainable Environment Research.* 2018, 28, 1-11.
- [29] Cynthia, Ignatia, F, Sutanto H, Darmawan A. Antibacterial and Antioxidant Activities of Pyrogallol and Synthetic Pyrogallol Dimer. *Res J Chem Environ.* 2018, 22, 39-47.

- [30] Geißler S, Gomez-Florit M, Wiedmer D, Barrantes A, Petersen FC, Tiainen H. *In Vitro* Performance of Bioinspired Phenolic Nanocoatings for Endosseous Implant Applications. *ACS Biomater Sci Eng.* 2019, 5, 3340-3351.
- [31] Oh DX, Prajatelista E, Ju SW, et al. A rapid, efficient, and facile solution for dental hypersensitivity: The tannin-iron complex. *Sci Rep.* 2015, 5, 10884.
- [32] Das S, Bhattacharyya DK, Ghosh M. Isolation of tannin as calcium salt (calcium tannate) and as free tannin from de-oiled seeds of *Shorea robusta* Gaertn And evaluation of its in vitro antioxidant properties. *Ind J Nat Prod & res.* 2015, 6, 283-287.
- [33] Hofer LJE, Peebles WC. X-Ray Diffraction Patterns of Phenols. *Anal Chem.* 1955, 27, 1852-1856.
- [34] Ball V. High loading capacity of Fe^{3+} cations in LBL films made from poly (ethylene imine) and tannic acid: an alternative to coordination driven multistep assembly using polyphenols and Fe^{3+} . *Colloid & Interface Sci Comm.* 2014, 3, 1-4.
- [35] Erel-Unal I, Sukhishvili SA. Hydrogen-bonded multilayers of a neutral polymer and a polyphenol. *Macromolecules.* 2008, 41, 3962-3970.
- [36] Slabbert NP. Ionization of some flavanols and dihydroflavonols. *Tetrahedron.* 1977, 33, 821-824.
- [37] Kyaw BM, Arora S, Win KN, et al. Prevention of emergence of fusidic acid and rifampicin resistance in *Staphylococcus aureus* using phytochemicals. *African Journal of Microbiology Research.* 2011, 5, 3684-3692.

Publication associée au chapitre III

« Dual Role of Tannic Acid and Pyrogallol Incorporated in Plaster of Paris: Morphology Modification and Release for Antimicrobial Properties »



Contents lists available at ScienceDirect

Materials Science & Engineering C

journal homepage: www.elsevier.com/locate/msec

Dual role of tannic acid and pyrogallol incorporated in plaster of Paris: Morphology modification and release for antimicrobial properties

Naji Kharouf^{a,b}, Davide Mancino^{a,b}, Jihed Zghal^{c,d}, Sophie Helle^b, Hamdi Jmal^c, Marc Lenertz^e, Nathalie Viart^e, Nadia Bahlouli^c, Florent Meyer^{a,b}, Youssef Haikel^{a,b}, Vincent Ball^{a,b,*}

^a Université de Strasbourg, Faculté de Chirurgie Dentaire, 8 rue Sainte Elisabeth, 67000 Strasbourg, France

^b Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche 1121, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex, France

^c ICube Laboratory, UMR 7357 CNRS, Mechanics Department, University of Strasbourg, 6700 Strasbourg, France

^d Laboratoire Energetique Mecanique Electromagnetisme, University of Paris Ouest, 50 rue de Sevres, 92410 Ville d'Avray, France

^e Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg, CNRS, Université de Strasbourg, 23 rue du Löss, F-67034 Strasbourg, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Plaster
Tannic acid
Antimicrobial composites
Staphylococcus aureus
Morphology change

ABSTRACT

The design of bioactive plasters is of major interest for the amelioration of dental and bone cements. In this article, a one pot and environmentally friendly strategy based on the addition of a cheap polyphenol-tannic acid (TA) or the main phenolic constituent of TA, namely pyrogallol (PY)- able to interact with calcium sulfate is proposed. Tannic acid and pyrogallol not only modify the morphology of the obtained plaster+TA/PY composites but a part of it is released and provides strong-up to twenty fold- antibacterial effect against *Staphylococcus aureus*. It is shown that the higher antibacterial efficiency of PY is related to a greater release compared to TA even if in solution the antibacterial effect of PY is lower than that of TA when reported on the basis of the molar concentration in PY units.

1. Introduction

In biomaterials science, plaster of Paris, obtained through the controlled hydration of calcium sulfate hemihydrate, is used as a material in the immobilization of bone fractures [1] and bone repair materials [2–6]. It is biocompatible, stable, easy to use, inexpensive, bioresorbable and sterilizable [7,8]. Overall plaster of Paris is an excellent material for medical applications [9].

In the past, plaster was used as a dental material to repair crestal perforations. On its own, plaster does not present any antimicrobial activity; however, several studies analyzed the effect of antibiotic loading in plaster for bone infection treatments. They demonstrated that plaster can be used as a filling and a bone grafting material [10–12]. Therefore, the addition of antibacterial and antibiotic agents to the plaster of Paris becomes an interesting and easy approach. Some antibiotics were used in the calcium sulfate formulations as gentamicin, vancomycin and tobramycin [13,14]. However, antibiotics are known to become progressively less efficient due to adaptation of the targeted bacteria. Hence, the use of natural molecules synthesized by plants as

potential antibacterial agents becomes of the highest interest. Tannic acid (TA) is a natural polyphenol that can be found in and extracted from red wine and various plants, tealeaves and fruits [15–17]. It has been incorporated within many materials due to its antioxidant properties, anticancer and antibacterial activity [18,19]. Reitzer et al. [20] added TA to formaldehyde crosslinked gelatin gels and proved the antibacterial activity of the obtained material against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), at the origin of many infections in the human body [21] and against *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus* (Gram-positive) is one of the major causative bacteria of osteomyelitis and bone infections [22,23]. Several studies [24,25] used some antibiotic agents (ampicillin, tetracycline, gentamicin ...) in order to modify the plaster of Paris to treat the periprosthetic joint and wound infections. They demonstrated that TA is incorporated in the gelatin gels under two distinct populations, one free and the other one stabilized by the gelatin network as expected on the basis of hydrogen bonds and hydrophobic interactions between both components [20]. The weakly bound fraction of TA can be released from the gel and serves as an antimicrobial agent.

When considering the structure of TA, it appears as a glucose unit

* Corresponding author at: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité Mixte de Recherche 1121, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg, France.
E-mail address: vball@unistra.fr (V. Ball).

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112209>

Received 24 February 2021; Received in revised form 1 May 2021; Accepted 22 May 2021

Available online 27 May 2021

0928-4931/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

ending with ten exposed pyrogallol molecules (Scheme 1). The degradation of TA molecule involves some steps containing the formation of glucose, gallic acid, resorcinol and pyrogallol [26]. Pyrogallol (PY) (1,2,3-trihydroxybenzene) is a polyphenol that is known for its antimicrobial properties [27,28]. The obtained results supported that the presence of its hydroxyl groups is responsible for its antibacterial activity [27].

The aim of this article is to compare PY and TA as organic additives to improve the antimicrobial properties of plaster without reducing its mechanical properties. Considering the need to produce antibacterial sealing materials, we investigated the incorporation of TA and PY in plaster or Paris. It is of interest to know if either individually added PY units or PY units linked on a central glucose unit would be more efficient with this respect. We focus our study on the antimicrobial properties of those new plasters and the consequences on the mechanical properties to insure their potential use as sealing material. Morphological changes (using scanning electron microscopy), compressive strength, compositional changes (using energy dispersive X ray analysis), and release kinetics of the active compounds from the plaster@TA and plaster@PY composites were investigated. The experimental variable was the weight percentage of TA/PY in the initial formulation, the amount of water being held constant. In vitro antibacterial activity of the cements was evaluated after 24 and 72 h of TA/PY release for an intermediate composition in TA/PY as well as for the most concentrated composite.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Calcium sulfate hemihydrate ("Fugit Rock EP Classic", GC Europe N. V., Leuven, Belgium) was stored in a closed vessel before its use, to avoid uncontrolled hydration and setting. It has been modified with the addition of different weight percentages of TA (ref. 403,040, Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France, molecular mass: 1702.0 g·mol⁻¹) or PY (ref. P0381-250G, Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France, purity ≥98% (HPLC), molecular mass: 126.1 g·mol⁻¹) to the water used to set the plaster. The antioxidant activity of the prepared plaster based samples was evaluated using the discoloration of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, ref. D9132 from Sigma-Aldrich).

2.2. Sample preparation

The different compositions of the composites, which were made from the plaster modified with PY or TA, are described in Table 1. The experimental procedure to prepare the plaster and its composites is

illustrated in the Supplementary data file (Scheme S1). All solutions of TA or PY were made from MilliQ water ($\rho = 18.2 \text{ m}\Omega\text{-cm}$, Millipore, Molsheim, France) just before setting of the plaster. Note that the % of TA and PY corresponds to the weight of polyphenol relative to the weight of water used to set a constant weight of calcium sulfate hemihydrate. All groups of samples, called plaster@TA and/or plaster@PY blends in the following, were mixed according to the manufacturer's instructions, keeping the same amount (g) of CaSO₄, 1/2 H₂O in the composition: namely a liquid/powder ratio (20 mL/100 g). Different dimensions of cylindrical teflon molds were used to make the plaster@TA and/or plaster@PY samples for scanning electron microscopy observations (SEM), compressive strength analysis and for the different antibacterial tests, including agar diffusion and direct contact tests (3.0 mm in diameter and 3.6 mm in height). Larger samples were made for X-ray diffraction analysis and water sorption tests (20.0 mm in diameter and 3.0 mm in height). Finally, molds of 15.0 mm in diameter and 8.0 mm in height containing 5.0 g of plaster with the different percentages of TA or PY and plaster were used for the release of TA/PY from the plaster in water. All these tests were performed after the setting time of 40 min at ambient temperature following the manufacturer's instructions.

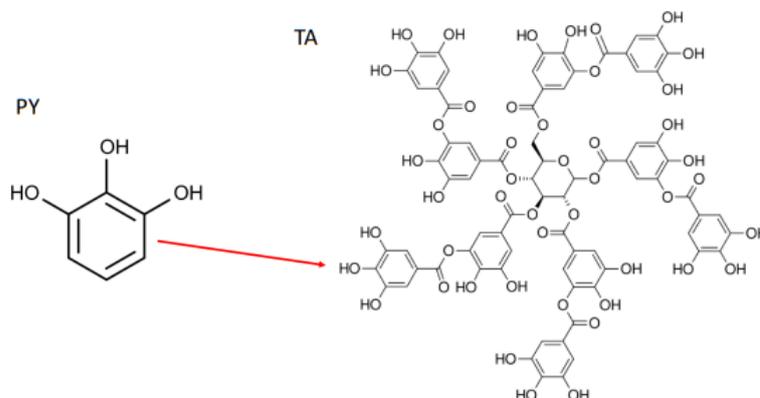
2.3. Scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive X-ray (EDX) analysis

Plaster's samples were mounted on aluminium SEM stubs. The samples were sputter-coated with gold-palladium alloys (20/80) using a Hummer JR sputtering device (Technics, CA, USA). Later on, the morphology (magnification: 5000×) was analyzed using a Quanta 250 FEG scanning electron microscope (FEI Company, Eindhoven, The Netherlands) functioning with a 10 kV acceleration voltage of the electrons.

The chemical compositions of the plaster@TA and plaster@PY samples were analyzed in a semi quantitative manner using the same device.

2.4. Compressive strength

The plaster powder with water or water with tannic acid (10%, 30% and 50%) or pyrogallol (10%, 30% and 50%) ($n = 15$ for each tested group) were removed from their molds and checked under 10× magnification using a Zumax microscope (Zumax medical, Suzhou New District, China) for the presence of an eventual void or a fractured edge. All damaged samples were discarded before further mechanical analysis. Then, the samples were stored into a closed box until testing. The samples were tested through uni-axial compression tests to determine



Scheme 1. Structure of PY and TA. The arrow is aimed to represent a typical PY ending group on TA.

Table 1

Proportions (w/w % with respect to water) of TA or PY used in the preparation of plaster@TA and plaster@PY composites.

| Samples | Pristine plaster | Plaster +5%TA or PY | Plaster +10%TA or PY | Plaster +15% TA or PY | Plaster +30%TA or PY | Plaster +50% TA or PY |
|---------------------------------|------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| Calcium sulfate hemihydrate (g) | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 |
| Water (mL) | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Tannic acid (g) | 0.0 | 0.05 | 0.10 | 0.15 | 0.30 | 0.50 |
| Pyrogallol (g) | 0.0 | 0.05 | 0.10 | 0.15 | 0.30 | 0.50 |

the stiffness of the cement and the maximum load before rupture. Those tests were performed on the universal electromechanical tensile Instron 3345 (Norwood, MA, USA) device instrumented with a 1 kN cell force (Class 0.5 following ISO 7500-1) and with a displacement sensor. The tests were performed at constant crosshead speed of 0.5 mm.min⁻¹. The engineer compressive strength was calculated in megapascals (MPa) according to the formula: $\sigma_c = 4P/\pi D^2$; where P is the recorded load during the test and D is the initial sample diameter. A One Way Analysis of Variance test was applied using Sigma plot (release 11.2, Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA) to determine whether significant differences existed in the compressive strength values between the different composites. In all tests, a statistical significance level of $\alpha = 0.05$ was adopted.

2.5. X-ray diffraction.

The XRD measurements were carried out on a D8 Discover Bruker powder diffractometer in the Bragg-Brentano geometry. The diffractometer was equipped with a front monochromator (CuK α 1 wavelength $\lambda = 0.154056$ nm). The samples were ground to powder to reduce preferential orientation of the crystallites observed in pressed samples. The diffraction patterns were refined by the Rietveld method using the Fullprof software [29]. The background, modelled as a polynomial function based on ten experimental points, was refined, as well as the zero shift. Preferential orientation was taken into account using a March model. The atomic positions of the crystal structures were kept fixed. The lattice parameters, crystallite sizes, isotropic Debye-Waller factors were refined for each phase, as well as their scale factor. This allowed to quantify the ratio of the different crystallized phases.

2.6. Water sorption tests by the plaster@TA and the plaster@PY composites

Three samples of pristine plaster, plaster with 10% TA and/or PY and plaster with 50% TA and or PY were used. They were dried in an oven at 37 °C for 24 h to reach the natural hydration of plaster, 2 water molecules per calcium sulfate unit. At higher temperatures the calcium sulfate dihydrate may transform in calcium sulfate hemihydrate.

Then, a contact angle measurement device (Attention Theta, Biolin Scientific, Göttenborg, Sweden) was used to measure the adsorption time of a 5 μ L drop of distilled water onto the cement surface. A drop of distilled water was dropped via a 0.7 mm diameter needle on the surface of each sample. A video was recorded (10 frames per second) by a horizontal camera in order to track the profile of the water drop and the absorption time of the water drop until its engulfment into the volume of the cement. This measurement is a qualitative indication of the cement's hydrophilicity.

Static contact angles could not be measured because of the absence of a steady state wetting.

2.7. Release kinetics of TA and of PY in water and pH measurement with of water in contact with the composites

Stock solutions of TA (0.1 mg.mL⁻¹) and PY (0.1 mg.mL⁻¹) were prepared in distilled water. These solutions were diluted gradually

between 2 and 100 times with distilled water. Their absorption spectra were then measured using a double beam mc² spectrophotometer (SAFAS, Monaco) to establish a calibration curve allowing the quantification of TA and PY release from the plaster@TA and the plaster@PY composites. The measurement cuvette (Quartz, 1 cm path length) was filled with the TA or PY solutions, whereas the reference cuvette was filled with distilled water.

Two samples of each plaster@TA and plaster@PY material (containing 5.0 g of plaster with the different percentages of TA or PY and plaster) were immersed in 50 mL of distilled water using a glass bottle. After 1, 2, 4, 18, 24 and 72 h, 1 mL of each supernatant solution above the composites was taken (after vigorous shaking) using a pipette. Then, the absorption spectrum of 1 mL of each diluted solution was measured in the wavelength range between 200 and 700 nm. The diluted solution of the plaster of Paris without TA or PY, was used in the reference cell. After each measurement, 1 mL of distilled water was added into each glass bottle to maintain a constant volume above the plaster@TA and plaster@PY composites.

The pH measurements were performed at 24 \pm 2 °C after incubation of the composites with water, in the same conditions as for the release experiments, for 24 h and 72 h. Before each pH measurement, the pH meter was calibrated with standard solutions at pH 4, 7 and 10 (Hanna Instruments, Lingolsheim, France).

2.8. Antimicrobial activity

2.8.1. Bacterial strain

Staphylococcus aureus (*S. aureus*, ATCC 25923) was cultured according to the manufacturer's instructions using Muller-Hinton broth "MHB" (Le Pont de Claix, France). In all the following tests, the turbidity of MHB containing *S. aureus* (bacterial medium) was adjusted to OD₆₀₀ (nm) = 0.5.

2.8.2. Agar diffusion tests

The agar diffusion test were performed similarly to ref. [30] using six identical agar filled petri dishes containing 25 mL of Muller-Hinton agar. Three plates were used to evaluate the anti-bacterial activity of the different plaster@TA and plaster@PY composites. 100 μ L of the bacterial medium were spread homogeneously onto the petri dishes. Four wells in each petri dish, 3.0 mm in diameter and 3.0 mm in depth, were made with an adapted punch by removing the agar. The first three wells were filled with the prepared samples (Part: 2.2.) of different plaster@TA and plaster@PY composites (pristine plaster, plaster +10% TA or PY and plaster +50% TA or PY) and the fourth wasn't filled to serve as a positive control. For the other three plates, the first well was filled with 21 μ L of 20% Chlorohexidine (CHX) (ref.18472510, Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). The second and third wells were filled with 21 μ L of 10% TA and 50% TA; 10% PY and 50% PY without plaster. The fourth well wasn't filled in order to serve as a control. All the agar petri dishes were incubated at 37 °C for 24 h under aerobic conditions. The same operator measured the inhibition zones after 24 h of incubation. The inhibition zones were determined as half the inhibition zone diameter minus the well diameter. The inhibition zone was measured in millimeters using a digital caliper (Dexter, Elkhart, Indiana, United States) and was recorded for each plaster@TA and plaster@PY

composite. The experiment was repeated three times.

2.8.3. Direct contact tests

Each sample plaster@TA and plaster@PY ($n = 3$) was put in a 2 mL Eppendorf tube (Trefflab, Degersheim, Switzerland). One milliliter of the bacterial medium was injected in each eppendorf. In the positive control, the bacterial medium was put into the Eppendorf tube without any composite. In the negative control, the Eppendorf tube was filled with 21 μL of 20% Chlorohexidine. After that, the Eppendorf tubes were incubated for 24 h and then for 72 h at 37 °C under constant stirring. After each incubation period, ten microliters from each Eppendorf tube were assessed by 10-fold serial dilution up to 10^5 in MHB and then 100 μL of the dilution was spread homogeneously onto a plate. The plates were incubated at 37 °C for 24 h. After incubation, colonies on the plate were counted and their CFU/mL were determined.

2.8.4. Direct contact tests of bacteria in solution in the presence of TA and PY

These tests were performed in order to compare the antibacterial activity of TA ($1702.0 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) and PY ($126.1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) as a function of the molar concentration in pyrogallol units. To express the molar concentration of TA in terms of PY units, its molar concentration was multiplied by 10 owing to its structure (Scheme 1). A TA solution was prepared by mixing 50 mg of TA powder with 50 mL of distilled water as well as a PY solution with 3.70 mg of PY powder with 50 mL of distilled water. Three dilutions ($\times 10$, $\times 20$ and $\times 40$) of the initial concentration were performed in order to analyze the antibacterial activity of both polyphenol solutions. In triplicate experiments, 100 μL of the initial concentration and each diluted solution were added to 900 μL of the bacterial medium which was adjusted to $\text{OD}_{600(\text{nm})} = 0.5$. After that, the Eppendorf tubes were incubated for 24 h at 37 °C under constant stirring. After the incubation period, 10 μL from each Eppendorf tube were assessed by 10-fold serial dilution up to 10^5 in MHB and then 100 μL of the dilution was spread homogeneously onto a plate. The plates were incubated at 37 °C for 24 h. After incubation, colonies on the plate were counted and their CFU $\cdot\text{mL}^{-1}$ were determined.

2.8.5. Biofilm accumulation of *S. aureus*

Three samples of each composite (pristine plaster, plaster +10% TA or PY and plaster +50% TA or PY) were compacted in teflon molds (8.0 mm in diameter and 1.0 mm in thickness) with glass slides underneath to provide a flat surface. After the setting time, each disc was placed in a well of a 24-well plate. 20 μL of MHB containing *S. aureus* ($\text{OD}_{600(\text{nm})} = 0.3$) was applied for each well which contained a specimen [31]. After 1 h of incubation at 37 °C, 2 mL of MHB were added to each well. After 24 h of incubation, the discs were rinsed gently with distilled water for 10s, then the samples were fixed by using a solution of 0.05 M glutaraldehyde in 4% cacodylate buffer for 8 h. After that, the samples were rinsed by using a 4% cacodylate buffer for three times, 5 min each. The samples were dehydrated in graded series of ethanol (35%, 50%, 70% and 95%) for 3 min each. After the graded series of ethanol solution, the samples were dried by using a chemical drying agent, Hexamethyldisilazane (HMDS). The samples were transferred from 95% ethanol into 1:1 solution of HMDS for 10 min, then transferred into 100% HMDS for two times, 10 min each. All HMDS steps need to be carried out in the fume hood overnight, owing to the high toxicity of this reagent.

After the dehydration and drying steps, the discs were sputter-coated with gold-palladium alloys (20/80) and observed by a SEM to determine the density, morphology and accumulation capacity of *S. aureus* biofilms on the different composites.

2.9. Antioxidant activity

One sample of each plaster@TA and plaster@PY material (containing 5.0 g of plaster with the different percentages of TA or PY and plaster) were immersed in 15 mL of DPPH (10^{-4} mol/L in 70% ethanol).

After 5 min, 1 mL of each supernatant solution above the composites was taken (after vigorous shaking) using a pipette. Then, the absorption spectrum of 1 mL of each solution was measured in the wavelength range between 300 and 600 nm. The solution which was in contact with the plaster of Paris without TA or PY, was used in the reference cell. Digital pictures of all DPPH solutions above the samples were also taken after 1 min of contact.

2.10. Stability of the plaster in the presence of water

Four specimens for each tested material were prepared as reported by Kharouf et al. [30] and analyzed by using the procedure described in ISO 6876:2001. Stainless steel ring molds (internal diameter of 20 ± 0.1 mm and a height of 1.6 ± 0.1 mm) were first cleaned with acetone in an ultrasound bath for 15 min and then weighed three times (accuracy ± 0.0001 g; Ohaus, Pioneer® Analytical, Nänikon, Switzerland) before sealer injection, and the mean value was recorded. They were placed on a glass plate, and the sealers were plugged into the molds avoiding air entrapment. After 2 h, the filled molds were weighed again 3 times (accuracy ± 0.0001 g) before aging immersion periods. After the two immersion periods (24 and 72 h) in 50 mL of distilled water, the specimens were removed from distilled water and dried at 37 °C for 24 h. Thereafter, the weight of each specimen was assessed three times, and the mean was recorded as the final weight. The difference of mass between the initial weight (before immersion) and the final weight was recorded as a percentage to determine the solubility percentage of each sealer.

3. Results

3.1. Scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive X-ray (EDX) analysis

The addition of TA or PY to water had a marked influence on the morphology of the obtained plaster (Fig. 1). A remarkable morphological changes was observed for the plaster +50% PY samples. A pseudo-fibrillar aspect was detected on the surface and the plaster particles were covered by this structure. This pseudo-fibrillar structure was eliminated after the immersion of the sample in water for 24 h (Fig. S1 Supplementary data) already suggesting that part of the incorporated polyphenol may be released in water.

The incorporation of TA or PY in the blends led also, as expected, to a marked increase in the carbon content - the chemical signature of TA and PY with respect to plaster - with a concomitant decrease of the Ca and S (due to sulfate anions) content (Table 2).

3.2. Compressive strength

Fig. 2 shows the compressive strength values of the pristine plaster and plaster@TA/PY (10, 30 and 50%). The compressive strength values showed no statistically significant difference between the pristine plaster values (58 ± 5 MPa) and plaster +30%TA (48 ± 8 MPa) ($P > 0.05$). However, statistically significant lower compressive strength values were observed for plaster +10%TA (11 ± 3 MPa), plaster +50%TA (34 ± 7 MPa) and all plaster@PY composites compared to the pristine plaster samples ($P < 0.05$) (Fig. 2).

The minimal compressive stress value obtained for the plaster 10% TA composite is surprising but reproducible (over 15 independent experiments) and could be due to the interaction between TA and Ca^{2+} cations inducing a phase change. To validate or to invalidate this assumption we performed some X-Ray diffraction experiments on all the investigated materials.

3.3. X-ray diffraction.

The X-ray diffraction pattern of pristine plaster can be indexed with

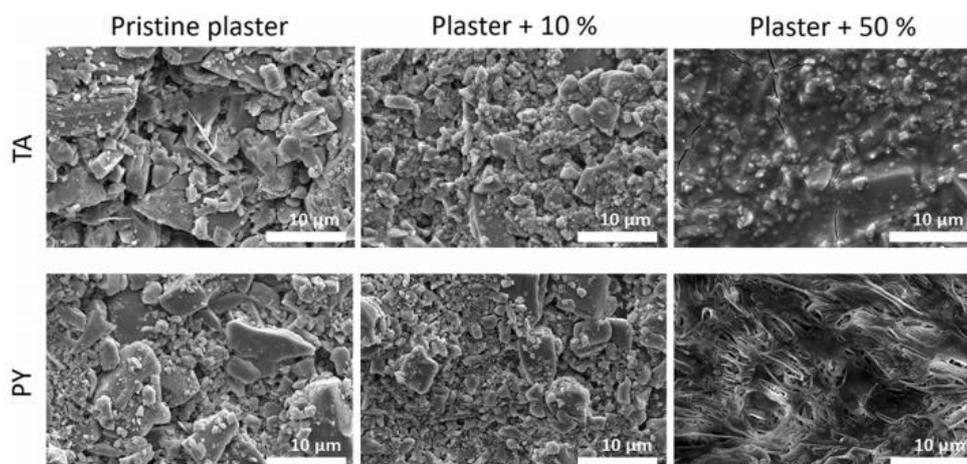


Fig. 1. Scanning electron micrographs of plaster set in the absence of TA or PY and for the plaster +10% of TA or PY and plaster +50% of TA or PY formulations.

Table 2

Relative composition of the obtained plaster samples as measured by means of EDX.

| Elements/ samples | Pristine plaster | Plaster +10% | | Plaster +50% | |
|----------------------|---------------------|--------------|------------|--------------|------------|
| | | TA | PY | TA | PY |
| C (%) | 5.6 ± 0.6 | 10.4 ± 4.2 | 10.6 ± 2.3 | 30.1 ± 7.4 | 26.5 ± 5.5 |
| Ca (%) | 25.6 ± 0.9 | 25.0 ± 2.4 | 24.7 ± 1.3 | 15.2 ± 3.6 | 18.0 ± 1.9 |
| S (%) | 20.2 ± 1.5 | 20.4 ± 1.7 | 22.0 ± 4.5 | 12.4 ± 1.3 | 15.6 ± 2.7 |

two calcium sulfate hydrate phases from the ICDD database: Bassanite $2\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (ICDD 04-011-1765) and Gypsum $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (ICDD 04-010-9409). No peak remains unindexed indicating that there are no other crystallized phases whatever the content in added TA (Fig. S2, S3 and S4 in the supplementary data file).

The diffractograms of the plaster@TA composites are very similar to those of the pristine plaster, and the same conclusions concerning the absence of any other phase than Bassanite or Gypsum, or amorphous phase can be withdrawn (Fig. S5 in the supplementary data file). Each of these XRD patterns has been refined and the ratio of Gypsum and Bassanite is constant within the error bar at a ratio around 1 to 3 (Fig. S5 in supplementary data).

One cannot therefore explain the weaker compressive strength

observed for the plaster-10%TA composite (Fig. 2A) by a peculiar modification of its structural properties with respect to the pristine plaster or plaster with other compositions in TA.

One can note that the samples containing PY present XRD patterns with additional peaks (Fig. 3 and Fig. S3 in the supplementary data file). All those additional peaks can be indexed with the ICDD PDF file 00-008-0611 [32]. Hofer et al. [32] were not able to propose a crystal lattice and neither could we. The presence of an unknown crystal structure leads to unreliable quantification, therefore such an analysis was not performed on the plaster@PY samples.

3.4. Water sorption tests by the plaster@TA and plaster@PY composites

Even if the composition and morphology of the obtained plaster is markedly affected by the addition of TA and PY, the overall hydrophilicity of the material is not affected since a 5 μL droplet of water is engulfed by the plaster in less than 1 s up to 50% (w/w) of TA and/or PY with respect to the used water (Fig. S6 in the Supplementary data file). The TA and PY independent hydrophilicity of the plaster is of main importance for its biological applications in particular for the release of weakly bound polyphenols which could then provide the composite plasters with antimicrobial properties.

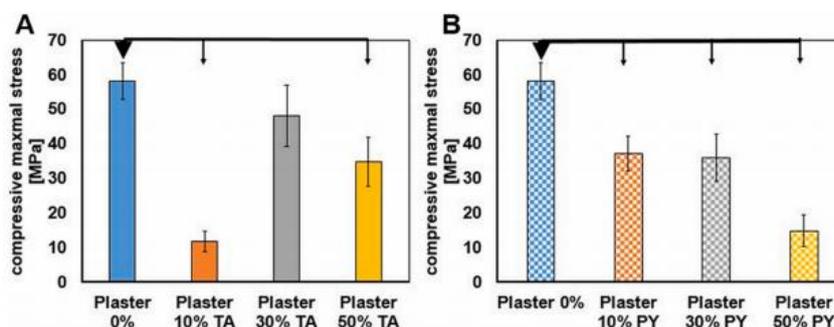


Fig. 2. Evolution of the maximal stress under compression for the pristine plaster, the plaster@TA (part A) and the plaster@PY (part B) composites. ($P < 0.05$ Bold arrows).

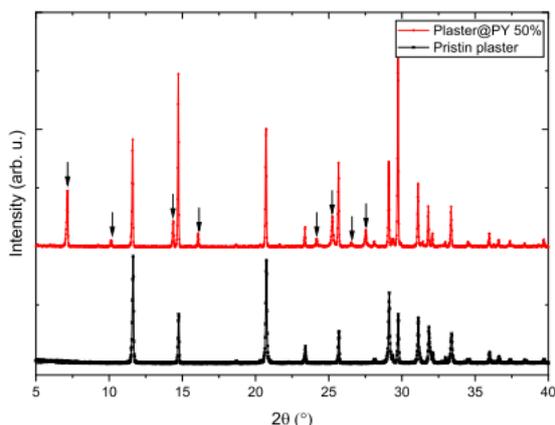


Fig. 3. XRD patterns of the pristine plaster (black) and plaster@PY50% (red). The black arrows emphasize the peaks only present in the PY composite, and which can be indexed with the ICDD 00-008-0611 PDF file. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3.5. Release of TA/PY from the plaster composites and pH changes of the water in contact with the composites

To investigate the release of TA or PY from the plaster blends, we first established a calibration curve by dissolving different concentrations of TA and PY (relying on weighing with an accuracy better than 0.5 mg) in water and measuring the UV–vis spectra of the obtained solutions. Water, with a slightly acidic pH was chosen as a medium because the auto-oxidation of TA and of PY (but to a lower extent) are limited in these conditions. An absorption peak is observed at $\lambda = 274$ nm for the TA solutions as described in the literature [33]; and at $\lambda = 267$ nm for the PY solutions. The absorbance versus concentration curves displayed a linear relationship up to $0.05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ with a linear correlation coefficient higher than 0.995 for both polyphenols (data not shown). Based on this calibration curve, we had to set-up an experimental design to measure the release of TA and of PY from the plaster@TA/PY blends in order not to reach concentrations higher than $0.05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Indeed, for samples containing 50 mg of TA (Table 1), if all the polyphenol would be released in 50 mL of water, one would reach a final concentration of $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in TA, far above the linearity limit of the obtained calibration curve. To that aim, we diluted the supernatant in contact with the plaster@TA or plaster@PY composites by a factor of 20 in water (as explained in the Materials and Methods section). In all cases, the absorbance never reached values higher than 2.4 (i.e. about $0.05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1} \times 48.9 \text{ mL}\cdot\text{mg}^{-1}$). The release kinetics was pretty fast, with a first initial burst of release occurring after 1 h of contact with water (data not shown).

The results show that the more TA is incorporated initially in the blend, the higher is the steady state concentration of TA released in water (Fig. 4). In all cases, only a pretty small fraction, less than about 6%, of the initially added TA is released in water. This means that the incorporated TA in plaster has a dual role: a large fraction of it is strongly bound to the plaster or incorporated in its structure (without changing the crystalline phases), and a lower fraction of TA fills either the pores of the structure or is only weakly adsorbed on the surface of the plaster particles, which are smaller upon an increase in incorporated TA (Fig. 1). This weakly bound or pore filling TA remains available for subsequent release and biological applications. This dual role of TA in its composites with plaster is similar to the role played by the same polyphenol when blended with gelatin [34]. Concerning PY, a much larger fraction than for TA, about 50%, is released in water after 72 h in an

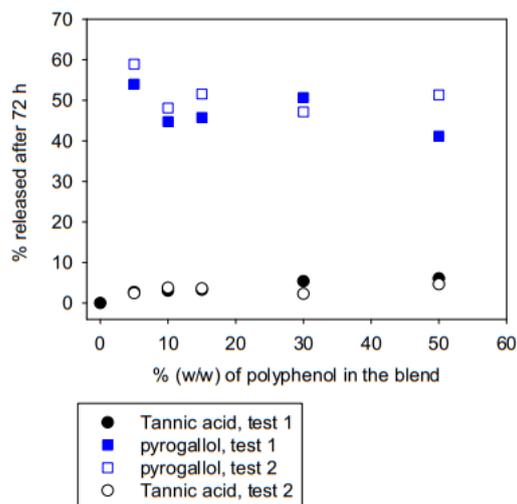


Fig. 4. Percentage of TA and PY released with respect to the TA/PY initially included in the blend after 72 h of contact with water. Two independent experiments were performed in each case as indicated in the inset.

almost independent manner on the fraction of initially incorporated polyphenol (Fig. 4). This suggests also that there are two populations of incorporated PY, but that the strongly bound fraction, not released in water after 72 h, is smaller. These findings point to a stronger interaction between TA and plaster than between PY and plaster. This is not so surprising knowing the much larger size of TA compared to PY (Scheme 1) allowing more interaction points with the surface of the calcium sulfate particles, perhaps in a cooperative manner considering TA as a decamer of PY at the first level of approximation.

The release of TA acid, as a weak acid, [33] induced a slight, decrease in the pH of water in contact with the plaster@TA blends. This reduction in pH was more pronounced than in the absence of added TA (Fig. S7 in the supplementary data file). In contrast the pH change of the water in contact with the plaster + PY blends was much more limited (Fig. S7 in the supplementary data file) This finding, a rather important pH decrease when TA is released in water and a much lower pH decrease when a higher amount of PY is released may be rationalized on the basis of the pKa values of both polyphenols. TA is characterized by an average pKa value of 8.5 [35] (only an approximation because it is a polyacid) whereas the two pKa values of PY amount to 9.02 and 11.2 [36]. This shows that PY is a weaker acid than TA and explains hence a smaller reduction in pH during its release in water put in contact with the composite.

3.6. Antimicrobial activity

The release of part of the TA or PY from the prepared composites allowed for an antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. The tests were performed both with Agar diffusion and direct contact tests.

3.6.1. Agar diffusion tests

The pristine plaster does not allow to create an inhibition zone on Agar gels, however the composite doped with 10%TA (with respect to the water amount added) already presents a large inhibition zone which increases when the highest doped composite is considered (Fig. S8-A). This is in probable relation with the higher concentration of TA released from the plaster +50% TA composite than for the plaster +10% TA composite (Table 3 and Fig. 4). Note that the inhibition zones, as well as part of the gel appear brown in the case of the plaster @TA/PY

Table 3
Size of the inhibition zones (mm) against *Staphylococcus aureus* as a function of the TA and PY contents in the composites.

| Sample | TA 10% | PY 10% | TA 50% | PY 50% | CHX | |
|----------------------|--------|---------|---------|---------|----------|---------|
| Inhibition zone (mm) | 0 | 3 ± 0.5 | 9 ± 0.7 | 5 ± 0.5 | 12 ± 0.5 | 7 ± 0.7 |

To confirm these encouraging but qualitative data, we also performed some direct contact tests.

composites (Fig. S8-A and Fig. S8-C) as well as for the TA/PY containing solutions (Fig. S8-B and Fig. S8-D). This is related to oxidation of the polyphenols in the growth media. Concerning the PY composites, the inhibition zones were more important than for the TA composites## (Fig. S8-5C versus Fig. S8-5A and Table 3).

3.6.2. Direct contact tests

The pristine plaster allowed for the same bacterial development as the positive control (Fig. 5). The composite doped with 10% of TA (w/w with respect to water) allowed to kill about half of the *Staphylococcus aureus* bacteria after 24 and 72 h. When considering a TA percentage of 50%, the inhibition of bacterial growth is 20 fold compared to the results of pristine plaster in Fig. 5. The plaster@10% PY composite was more effective (kills 70% of the bacteria) than the same fraction of TA incorporated in plaster after 24 h. In addition, the plaster@50% PY killed more than 98% of the bacteria after 24 h and no bacterial colonization was observed after 72 h.

3.6.3. Biofilm of *S. aureus* morphology and accumulation

The surface of the composite samples was observed by SEM at 10.000× magnification. After 24 h of incubation with the bacteria at 37 °C, we can observe a dense packing of bacteria on pristine plaster discs whilst, plaster @ 10% TA/PY and plaster @ 50% TA/PY display less accumulated bacteria and no compacted biofilm was observed on plaster@50% TA and on plaster@50% PY (Fig. S9).

3.6.4. Direct contact tests of bacteria in solution in the presence of TA and PY

When the number of colony-forming units (CFU) of *Staphylococcus aureus* in suspension is measured as a function of the molar concentration in PY units (Fig. 6) it appears that PY is by far much less efficient than TA with respect to its antimicrobial activity against *S. aureus*. This strongly suggests that the 10 PY units on TA act cooperatively in its antimicrobial activity.

The fact that the plaster @ PY composites appear more efficient in the inhibition of bacterial growth (Fig. S8 and Fig. 5) has then to be related to a higher release of PY from the blends as compared with TA (Fig. 4).

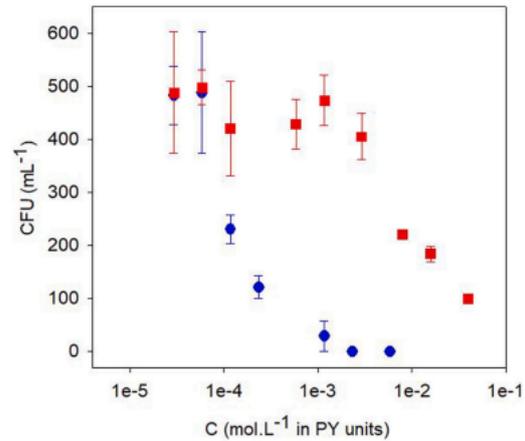


Fig. 6. Number of CFU as a function of the molar concentration in PY units (one TA molecule is equivalent to ten PY owing to its structure, Scheme 1). The blue circles correspond to TA and the red squares correspond to PY. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3.7. Antioxidant activity

As expected the pristine plaster sample had no effect on the colour of the DPPH solution, hence no antioxidant activity (Fig. S10). But the incorporation of either PY or TA provided this additional property to the composite sample (Fig. S10). After 1 min of contact between the DPPH solution and the composite samples, there seems to be a slightly larger effect of TA than of PY (Table 4) even if the release of TA is lower than that of PY at all time and for all weight fractions of the polyphenol (Fig. 4) in probable relation to an intrinsic higher fraction of antioxidant moieties (the hydroxyl groups on the aromatic rings) on TA. Note also that an increased fraction of the incorporated molecule, PY or TA, seems to have a beneficial effect (Table 4).

Table 4
Antioxidant activity of the plaster @ PY and plaster @ TA composites.

| | 10%TA | 30%TA | 50%TA | 10%PY | 30%PY | 50%PY |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 525 (nm) | -0.79 | -0.83 | -0.89 | -0.75 | -0.76 | -0.79 |

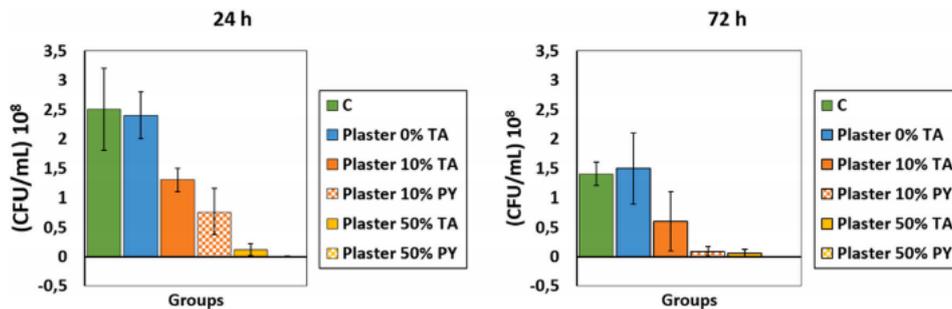


Fig. 5. Number of CFU of *Staphylococcus aureus* in the presence of pristine plaster and plaster @10% TA, plaster @ 50% TA; and plaster@10% PY and plaster@50% PY after 24 and 72 h of culture. C represents the control experiment, without any material.

3.8. Stability of the plaster and plaster composites in water

For medical applications, even if plaster is aimed to provide a progressive calcium release and to be replaced by bone, it is important to control its resorption. In particular here, it is important to evaluate the influence of PY and TA on its solubility in water. We found that pristine plaster undergoes a slight mass increase after 24 and 72 h. The same holds true for the composite plasters after prolonged exposure to water and is mainly due to water infiltration in the pores. However, after 24 h, the PY and TA doped plasters undergo a slight reduction in mass which is attributed to a release of the active molecule in water. Nevertheless, in all cases, satisfactory stability of the material in contact with water is ensured for at least 72 h (Table 5).

4. Discussion

In the present study, plaster of Paris was modified with different weight fractions of PY and TA. It was not possible to prepare composites in which the TA or PY fractions were higher than 50% with respect to the mass of water because in such samples the amount of available water was not sufficient anymore to set the plaster which then stayed in a powdered form. In all cases, however the setting of the plaster was not markedly influenced by the addition of either TA or PY, as long as its mass percentage with respect to water was not higher than 50%. For higher mass fractions, the plaster did remain in a powdered form most probably due to the highly hydrophilic nature of TA or PY which solubilization reduced the amount of available water for setting the plaster.

The incorporation of TA or PY in water used to prepare plaster of Paris allows a change in the plaster morphology, namely a perceptible reduction in the grain size. The ability of TA to modify the morphology of the plaster may well be related to the chelating ability of TA with respect to Ca^{2+} cations [37]. We assume that PY plays a similar role but in a less pronounced manner. The incorporation of PY or TA in the plaster of Paris not only changes the morphology of the material but may also change its porosity and its pore size distribution, a property which affects the mechanical properties and its ability to release the incorporated organic molecules. We thought to investigate an eventual change in pore size distribution upon incorporation of PY or TA using nitrogen sorption and data analysis using the Brunauer-Emmett-Teller method (BET). This is however not possible with a highly hydrated material like calcium sulfate dihydrate because the BET method requires intensive degassing of the material before performing nitrogen adsorption. Such a degassing process will induce dehydration and phase change from calcium sulfate dehydrate to calcium sulfate hemihydrate with a concomitant change in morphology and pore size distribution. We could have thought also to determine the average porosity by buoyancy, but this is not possible owing to the release of PY and TA in the water and even in other solvents. Hence the influence of porosity and pore size distribution on the properties of the composite plasters investigated herein remains an open question.

Even if the hydrophilicity of the plaster-based composites is not affected, they incorporate TA and part of it, less than 6%, is released in the presence of water. The release of PY from the plaster@PY composites in water is much more important, up to 50% of the initially incorporated organic material, and implies a weaker bond of this smaller polyphenol on the surface of plaster. This implies that most of the used TA takes part as a strong structural component of the obtained composite. The PY incorporated as a structural component appears much weaker. The

smaller fraction of released TA compared to PY is certainly not related to steric constraints because even if TA is significantly larger than PY, this increase in size should not inhibit the release of those molecules owing to the large pores (not quantified) of plaster (Fig. 1). But, interestingly, for TA percentages higher than 10% (with respect to the mass of water), the slow amount of released TA is sufficient to strongly inhibit the proliferation of *Staphylococcus aureus*. The inhibitory effect of PY is even much stronger; this is not due to a higher intrinsic inhibitory effect of PY but to a higher release.

Plaster modified with TA and PY presented an antibacterial activity in agar diffusion tests and colored part of the gel in brown. This coloration is easily explained by a partial oxidation of TA/PY at physiological pH values at which the agar diffusion tests were performed. This important antibacterial efficiency and the strong coloration could be explained by the important liberation of PY from the composites (Fig. 4). Regarding the direct contact test, both composites demonstrated an antibacterial activity after 24 and 72 h against the growth of *Staphylococcus aureus*. Cynthia et al. [27] and Kyaw et al. [38] determined the MIC of TA and PY against *S. aureus*. They reported that TA (MIC = 256 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, namely $1.50 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) had more antibacterial activity than PY (MIC = 512 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, namely $4.1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$). In accordance, our study shows that TA in solution was more effective against *S. aureus* than PY in solution when compared in their molar concentration (Fig. 6). The MIC values determined in this investigation are furthermore very close to the published data [27,38].

Our article shows that TA and PY release spontaneously from an inorganic porous material. It has been shown previously that TA can be released from TA crosslinked capsules with a similar release profile as the one found in this investigation [39,40]. The released PY and TA also provide some antioxidant properties to the as-prepared composite materials.

The observed discontinuity in the compression resistance of the plaster with the increase in incorporated TA (Fig. 2A) may well be due to a different role played by the polyphenol. At low TA mass fraction (plaster +10%TA) more TA could be irreversibly bound to the inorganic material than for plaster +30%TA and plaster 50%TA. But for both composite samples with 30% and 50% TA, the absolute amount of incorporated polyphenol is much higher and part of it may be adsorbed on the surface of the inorganic particles inducing some increased interactions between them, for instance via hydrogen bonds. These bonds could strengthen the material and reduce the probability of crack propagation. Anyway, for all TA containing samples, above 10% TA, the compressive strength decreases with an increase in the mass fraction of TA, as expected upon the addition of an organic filler to an inorganic material. The TA containing plasters display hence a reproducible discontinuity in their compressive strength at 10% in TA. Such a discontinuity is not found when PY is added to the plaster (Fig. 2B). In the future it may be of interest to investigate if the presence of PY or TA may change the behavior of plaster under compression tests or confined compression tests to reach the ductile behavior.

We wondered if the addition of TA in plaster of Paris could induce some phase changes in particular in the presence of 10% TA, which could explain the weaker compressive strength found at this particular concentration. To that aim, we systematically investigated the plaster@TA or plaster@PY blends by means of X-ray diffraction.

Anyway, the results obtained in this report are qualitatively comparable with those obtained previously in the case of gelatin@TA composites, namely that the polyphenol plays a double role: a structural

Table 5
Solubility of plaster and of plaster incorporating 5% of either PY or TA in contact with water for 24 or 72 h.

| Samples | 24 h | | | 72 h | | |
|----------------|--------------------|-----------------|-----------------|--------------------|-----------------|-----------------|
| | Unmodified plaster | Plaster + 50%PY | Plaster + 50%TA | Unmodified plaster | Plaster + 50%PY | Plaster + 50%TA |
| Solubility (%) | +1.21 ± 0.15 | -3.11 ± 0.15 | -1.51 ± 0.1 | +1.23 ± 0.02 | -4.3 ± 0.14 | -2.32 ± 0.11 |

additive and a partly releasable agent providing some additional biological activity to the as formulated biomaterial [34].

Further studies are required to evaluate the antibacterial activity of these composites when there are in contact with other strains of bacteria. Also, additional studies on different calcium based cements such as, mineral trioxide aggregate and calcium-silicate cements are necessary to confirm these latter outcomes. From a mechanical point of view, we found that the compressive strength of the plaster @ TA 10% composite displayed a marked reproducible but unexplained minimum. In the case of the PY containing composites, the compressive strength decreased monotonously with higher fraction of incorporated organic molecules, as expected.

5. Conclusions

It has been shown that the incorporation, in a one pot process, of TA or PY in plaster of Paris formulations allows to change the size distribution of the plaster particles up to a maximal load of 50% in polyphenol with respect to the amount of water without affecting the hydrophilicity of the plaster. A large part of the incorporated amount of TA serves as structural component of the obtained composite, but a small part of it up to 6% can be released in the ambient medium and is sufficient to inhibit the proliferation of *Staphylococcus aureus* in 20-fold manner after 72 h. Concerning PY, a much higher release in water allows for an even better antimicrobial activity when compared to TA. This is however not due to a higher intrinsic antimicrobial activity of PY. Indeed, when compared on a molecular basis of the number of provided PY units (10 per TA molecule) both polyphenols are almost undistinguishable in their inhibitory effect against *S. aureus*.

Overall, this article shows that the incorporation of either PY or TA in a one pot preparation manner provides some antimicrobial and antioxidant properties through a release of the active molecules but without an important reduction in the compression resistance and without an alteration of the chemical stability of the plaster.

The findings presented in this report may be interesting in providing bone sealing materials with antibacterial potential at a low cost owing to the high availability and low price of TA and PY.

CRedit authorship contribution statement

Conceptualization: Vincent Ball, Youssef Haikel and Naji Kharouf; Methodology: Vincent Ball, Naji Kharouf, Florent Meyer, Nadia Bahlouli and Nathalie Viart; Investigation: Sophie Helle, Naji Kharouf, Jihed Zghal, Hamdi Jmaland Mark Lenertz; Writing Original Draft: Naji Kharouf, Vincent Ball and Mark Lenertz; Writing Review & Editing: Davide Mancino, Florent Meyer, Vincent Ball, Davide Mancino and Nathalie Viart; Funding Acquisition: Youssef Haikel and Vincent Ball; Supervision: Vincent Ball and Youssef Haikel.

Funding

Naji Kharouf was funded by ITENA and this project was performed using the funds from grant Conectus 19-INSERM-108.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We acknowledge Platform IRIS/ICube, UMR 7357, FMST, Université de Strasbourg for providing experimental setups for the mechanical characterizations.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112209>.

References

- [1] H. Sharma, D. Prabu, Plaster of Paris: past, present and future, *J. Clin. Orthop. Trauma*. 4 (3) (2013) 107–109.
- [2] P. Hernigou, Plaster of Paris: the orthopaedic surgeon heritage, *Int. Orthop.* 40 (8) (2016) 1767–1774.
- [3] H.A. Alhadain, V.T. Himel, An in vitro evaluation of plaster of Paris barriers used under amalgam and glass ionomer to repair furcation perforations, *J. Endod.* 20 (9) (1994) 449–452.
- [4] A.H. Dewi, I.D. Ana, J. Wolke, J. Jansen, Behavior of plaster of Paris-calcium carbonate composite as bone substitute. A study in rats, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 101A (2013) 2143–2150.
- [5] A.H. Dewi, I.D. Ana, J. Wolke, J. Jansen, Behavior of POP-calcium carbonate hydrogel as bone substitute with controlled release capability: a study in rat, *J. Biomed. Mater. Res. A* 103 (10) (2015) 3273–3283.
- [6] G. Orsini, J. Ricci, A. Scarano, et al., Bone-defect healing with calcium-sulfate particles and cement: an experimental study in rabbit, *J. Biomed. Mater. Res B Appl. Biomater.* 68 (2) (2004) 199–208.
- [7] S.L. Bahn, Plaster: a bone substitute, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 21 (5) (1966) 672–681.
- [8] D. Mackey, A. Varlet, D. Debeaumont, Antibiotic loaded plaster of Paris pellets: an in vitro study of a possible method of local antibiotic therapy in bone infection, *Clin. Orthop. Relat. Res.* 167 (1982) 263–268.
- [9] M.V. Thomas, D.A. Puleo, Calcium sulfate: properties and clinical applications, *J. Biomed. Mater. Res B Appl. Biomater.* 88 (2) (2009) 597–610.
- [10] M. Mittal, S. Chandra, S. Chandra, An evaluation of plaster of Paris barriers used under various materials to repair furcation perforations (in vitro study), *J. Endod.* 25 (5) (1999) 385–388.
- [11] P.A. Laycock, J.J. Cooper, R.P. Howlin, Stoodley, et al., In vitro efficacy of antibiotics released from calcium sulfate bone void filler beads, *Materials (Basel)* 11 (11) (2018) 2265.
- [12] M.A. Benoit, B. Mousset, C. Delloye, et al., Antibiotic-loaded plaster of Paris implants coated with poly lactide-co-glycolide as a controlled release delivery system for the treatment of bone infections, *Int. Orthop.* 21 (6) (1997) 403–408.
- [13] H.J. Sun, L. Xue, C.B. Wu, et al., Use of vancomycin-impregnated calcium sulfate in the treatment of osteomyelitis of the jaw, *J. Oral Maxillofac. Surg.* 75 (1) (2017) 119–128.
- [14] D. Pförringer, A. Obermeier, M. Kökeklı, et al., Antimicrobial formulations of absorbable bone substitute materials as drug carriers based on calcium sulfate, *Antimicrob. Agents. Chemother.* 60 (7) (2016) 3897–3905.
- [15] F. Türkan, P. Taslimi, F.Z. Salkan, Tannic acid as a natural antioxidant compound: discovery of a potent metabolic enzyme inhibitor for a new therapeutic approach in diabetes and Alzheimer's disease, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 33 (8) (2019), e22340.
- [16] N. Kharouf, J. Zghal, F. Addiego, et al., Tannic acid speeds up the setting of mineral trioxide aggregate cements and improves its surface and bulk properties, *J. Colloid Interface Sci.* 589 (2021) 318–326.
- [17] N. Kharouf, Y. Haikel, V. Ball, Polyphenols in dental applications, *Bioengineering (Basel)*. 7 (3) (2020) 72.
- [18] S.R. Tintino, C.D. Morais-Tintino, F.F. Campina, et al., Tannic acid affects the phenotype of *Staphylococcus aureus* resistant to tetracycline and erythromycin by inhibition of efflux pumps, *Bioorg. Chem.* 74 (2017) 197–200.
- [19] Z. Le, Y. Chen, H. Han, et al., Hydrogen-bonded tannic acid-based anticancer nanoparticle for enhancement of oral chemotherapy, *ACS. Appl. Mater. Interfaces* 10 (49) (2018) 42186–42197.
- [20] F. Reitzer, E. Berber, J. Halgand, et al., Use of gelatin as tannic acid carrier for its sustained local delivery, *Pharm. Front.* 2 (2020), e200002.
- [21] H.F. Wertheim, D.C. Melles, M.C. Vos, et al., The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections, *Lancet. Infect. Dis.* 5 (12) (2005) 751–762.
- [22] M.A. Benoit, B. Mousset, C. Delloye, et al., Antibiotic-loaded plaster of Paris implants coated with poly lactide-co-glycolide as a controlled release delivery system for the treatment of bone infections, *Int. Orthop.* 21 (6) (1997) 403–408.
- [23] S. Maleki, F. Dizaj, M. Lotfipour, et al., Ciprofloxacin HCl-loaded calcium carbonate nanoparticles: preparation, solid state characterization, and evaluation of antimicrobial effect against *Staphylococcus aureus*, *Artif Cells Nanomed. Biotechnol.* 45 (3) (2017) 535–543.
- [24] C.H. Qin, C.H. Zhou, H.J. Song, et al., Infected bone resection plus adjuvant antibiotic-impregnated calcium sulfate versus infected bone resection alone in the treatment of diabetic forefoot osteomyelitis, *BMC Musculoskelet. Disord.* 20 (1) (2019) 246.
- [25] P. Merkatoris, J. Schleining, A. Krull, et al., In vitro elution of penicillin, ampicillin, tetracycline, tulathromycin, and florfenicol from plaster of Paris beads, *Front Vet Sci.* 30 (7) (2020) 423–585.
- [26] N. Bensalah, K. Chair, A. Bedoui, Efficient degradation of tannic acid in water by UV/H₂O₂ process, *Sustainable Environment Research* 28 (1) (2018) 1–11.
- [27] F. Ignatia Cynthia, H. Sutanto, A. Darmawan, Antibacterial and antioxidant activities of pyrogallol and synthetic pyrogallol dimer, *Res. J. Chem. Environ.* 22 (2018) 39–47.

- [28] V.N. Lima, C.D. Oliveira-Tintino, E.S. Santos, et al., Antimicrobial and enhancement of the antibiologic activity by phenolic compounds: gallic acid, caffeic acid and pyrogallol, *Microb. Pathog.* 99 (2016) 56–61.
- [29] J. Rodríguez-Carvajal, "Recent advances in magnetic structure determination by neutron powder diffraction," *Phys. B Condens. Matter*, 192 (1–2) (1993) 55–69.
- [30] N. Kharouf, Y. Arntz, A. Eid, et al., Physicochemical and antibacterial properties of novel, premixed calcium silicate-based sealer compared to powder-liquid bioceramic sealer, *J. Clin. Med.* 9 (10) (2020) 30–96.
- [31] X. Du, X. Huang, C. Huang, et al., Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) enhances the therapeutic activity of a dental adhesive, *J. Dent.* 40 (6) (2012) 485–492.
- [32] L.J.E. Hofer, W.C. Peebles, X-ray diffraction Patterns of phenols, *Anal. Chem.* 27 (1955) 1852–1856.
- [33] V. Ball, High loading capacity of Fe^{3+} cations in LBL films made from poly(ethylene imine) and tannic acid: an alternative to coordination driven multistep assembly using polyphenols and Fe^{3+} , *Colloid & Interface Sci. Comm.* 3 (2014) 1–4.
- [34] F. Reitzer, E. Berber, J. Halgand, et al., Use of gelatin as tannic acid carrier for its sustained local delivery, *Pharm Front.* 2 (2020), e200002.
- [35] I. Erel-Unal, S.A. Sukhishvili, Hydrogen-bonded multilayers of a neutral polymer and a polyphenol, *Macromolecules* 41 (11) (2008) 3962–3970.
- [36] N.P. Slabbert, Ionization of some flavanols and dihydroflavonols, *Tetrahedron* 33 (1977) 821–824.
- [37] S. Das, D.K. Bhattacharyya, M. Ghosh, Isolation of tannin as calcium salt (calcium tannate) and as free tannin from de-oiled seeds of *Shorea robusta* Gaertn. Anc. evaluation of its in vitro antioxidant properties, *Ind. J. Nat. Prod. & res.* 6 (4) (2015) 283–287.
- [38] B.M. Kyaw, S. Arora, K.N. Win, et al., Prevention of emergence of fusidic acid and rifampicin resistance in *Staphylococcus aureus* using phytochemicals, *Afr. J. Microbiol. Res.* 5 (22) (2011) 3684–3692.
- [39] N. Sahiner, S. Sagbas, N. Aktas, C. Silan, Inherently antioxidant and antimicrobial tannic acid release from poly(tannic acid) nanoparticles with controllable degradability, *Colloids. Surf. B. Biointerfaces.* 142 (2016) 334–343.
- [40] N. Sahiner, S. Sagbas, N. Aktas, Single step natural poly(tannic acid) particle preparation as multitalented biomaterial, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 49 (2015) 824–834.

Chapitre IV : Comparaison de l'effet de polyphénols sur le plâtre de Paris et le «Mineral Trioxide Aggregate» -

conclusions et perspectives

Suite à nos études et analyses qui ont été décrites dans les chapitres II et III, ce chapitre présente un petit résumé (sous forme d'un tableau) afin de comparer les effets de l'addition de polyphénols à un ciment à base du calcium simple (plâtre de Paris) et complexe (MTA).

| Tests | Plâtre de Paris | MTA |
|---|--|--|
| Changement de couleur | Changement léger | Noircissement |
| pH de la solution en contact avec le matériau | -pH neutre - légère diminution lors de l'addition de polyphénols | -pH basique à cause de la solubilité de l'hydroxyde de calcium -Abaissement de 2 unités lors de l'addition de polyphénols |
| Libération dans l'eau | -Une grande libération du PY a été mesurée (50%) -Une libération beaucoup moins importante a été mesurée (6%) pour l'AT | -Une très faible libération a été observée après 72h (2%) |
| Morphologie | Une réduction perceptible de la taille des grains et un aspect pseudo-fibrillaire a été détecté à la surface du plâtre | Une réduction de la taille moyenne des grains constituant le composite a été observée |
| Composition chimique | -Une augmentation du contenu en carbone et une diminution du contenu en calcium | -Une augmentation du contenu en carbone et une diminution du contenu en calcium |

| | | |
|--------------------------|--|--|
| Activité antibactérienne | -Le plâtre tout seul n'est pas antibactérien -L'addition de polyphénols rend le composite antibactérien contre <i>S. aureus</i> | -MTA a montré une activité antibactérienne contre l' <i>E. faecalis</i> -le composite est inerte après ajout d'AT |
| Propriétés mécaniques | La résistance à la compression diminue avec l'augmentation de la fraction massique de polyphénols par rapport au plâtre non-modifié qui a les valeurs les plus importantes | -L'AT a amélioré la résistance à la compression du MTA à l'état sec. -Le MTA hydraté dans l'eau montre une grande amélioration de la résistance à la compression. En revanche, les composites dopés avec l'AT perdent environ 50% de leur résistance à la compression après hydratation |
| Temps de prise | Non étudié | Accélération de prise lors de l'addition de polyphénols. En l'absence du polyphénol, la cinétique de prise présente une phase de latence typique d'une nucléation suivie d'un processus de croissance cristalline |
| Adsorption d'eau | Non marqué | Le MTA est beaucoup moins hydrophile que le composite dopé avec l'AT |

Tableau 9. Les effets de l'addition de polyphénols au plâtre de Paris et au (MTA).

Conclusion générale

L'ajout de polyphénols aux ciments MTA ou au plâtre de Paris (ciment simple à base de sulfate de calcium) permet de modifier la morphologie et les propriétés mécaniques de ces ciments. A l'état sec, les polyphénols permettent d'augmenter la résistance à la compression de composites à base de MTA, par contre, ils engendrent une diminution de la résistance à la compression des composites à base du plâtre. Le MTA donne lieu à une solution basique qui se traduit par une oxydation importante des polyphénols introduits dans le composite et une perte de leur activité biologique. Par contre la solution en contact avec le plâtre de Paris a un pH neutre qui autorise les polyphénols incorporées à se libérer sous forme non oxydée afin de jouer un rôle biologique (activités antibactériennes et antioxydantes). L'addition de polyphénols dans le MTA a permis de réduire le temps de prise et l'hydrophilie de ce matériau : propriétés importantes pour son utilisation clinique. En revanche, aucun changement du temps de prise n'a été marqué dans le cas du plâtre modifié avec de polyphénols.

Le pyrogallol est un polyphénol qui a une masse moléculaire beaucoup plus petite que celle de l'acide tannique, en conséquence, une libération beaucoup plus importante que celle de l'acide tannique a été mesurée à partir des composites à base de plâtre de Paris.

L'incorporation de molécules actives dans des composites à base de calcium pourrait donner un effet positif sur les propriétés mécaniques et les activités biologiques. Mais des études restent à mener avec d'autres polyphénols et d'autres matériaux composites.

Perspectives :

Comme dans les systèmes canaux infectés, les bactéries ne sont jamais totalement éliminées, l'obturation vise à limiter le nombre de bactéries résiduelles et leurs sous-produits. Pour fournir un joint tridimensionnel étanche dans le système canalaire, l'obturation du canal radiculaire implique l'utilisation d'un cône de gutta-percha en combinaison avec un ciment d'obturation canalaire [1, 2]. Par conséquent, il existe plusieurs types de ciments d'obturation canalaire, tels que les ciments verre-ionomère, les résines époxy, les résines à base de silicones, les ciments à base de silicate de calcium (chapitre II) et les ciments à base d'oxyde de zinc [2, 3]. Les ciments à base de silicate de calcium présentent une bonne capacité de remplissage (obturation tridimensionnelle) et une bonne activité antibactérienne [2, 4], mais ils sont encore trop chers [5]. Les ciments d'obturation canaux à base de résine-époxy, au contraire, ne sont pas chers mais ont une activité antibactérienne limitée ou nulle [6-8]. Plusieurs polyphénols ont été utilisés pour modifier divers matériaux dentaires afin d'améliorer leurs propriétés mécaniques, leur activité biologique et leur force d'adhérence aux tissus dentaires [9]. Le resvératrol (RS) (3,4,5-trihydroxystylbène) est un composé phénolique de la famille des stilbènes, a été incorporé dans les agents d'adhésion de la dentine (adhésif dentaire) pour aider à réduire leur cytotoxicité [10]. Le resvératrol a également été utilisé pour traiter la dentine avant l'application d'adhésifs dentaires et il a permis de préserver la liaison dentine-résine dans le temps [11]. Le pyrogallol (PY) (1,2,3-trihydroxybenzène) est un composé organique produit par les plantes [12]. Ce polyphénol a conservé son activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* lorsqu'il a été incorporé au plâtre de Paris [13]. Le groupe pyrogallol présent dans l'acide tannique a également joué un rôle dans le traitement de l'hypersensibilité dentaire [14]. Plusieurs études ont montré que le resvératrol et le pyrogallol ont une activité antibactérienne contre les bactéries Gram-positives [13, 15-17]. Comme mentionné précédemment, les ciments d'obturation canaux à base de résine-époxy ont des activités antibactériennes limitées ou

nulle. L'idée est d'incorporer un polyphénol ayant une activité antibactérienne dans ces ciments afin d'obtenir des effets antimicrobiens. Le but est d'essayer d'incorporer différents polyphénols dans des matériaux dentaires qui ne sont pas à base de calcium comme c'était déjà étudié dans les chapitres II et III ; et d'évaluer les changements physicochimiques et morphologiques, l'activité antibactérienne, la cytotoxicité et les propriétés mécaniques d'un ciment dentaire en résine-époxy modifié avec deux polyphénols différents, à savoir le pyrogallol et le resvératrol.

D'après nos résultats préliminaires (Fig. 33), on pourrait conclure que les deux polyphénols ont amélioré les propriétés mécaniques de la résine-époxy. Le PY a démontré de bien meilleures activités antioxydantes et antibactériennes que le RS, ce qui est associé à une libération plus élevée du PY. En revanche, le PY a une cytotoxicité plus élevée (envers des fibroblastes) que la résine-époxy et la résine-époxy dopée avec le RS. Les surfaces de ciment modifié par le PY sont apparues plus rugueuses avec une qualité d'absorption d'eau plus élevée que la résine-époxy dopé avec RS. Le resvératrol et le pyrogallol ont non seulement modifié la morphologie et les propriétés mécaniques de la résine-époxy, mais une partie de ces molécules a pu être libérée des composites et a augmenté leur activité antioxydante et leurs effets antibactériens contre *Enterococcus faecalis*.

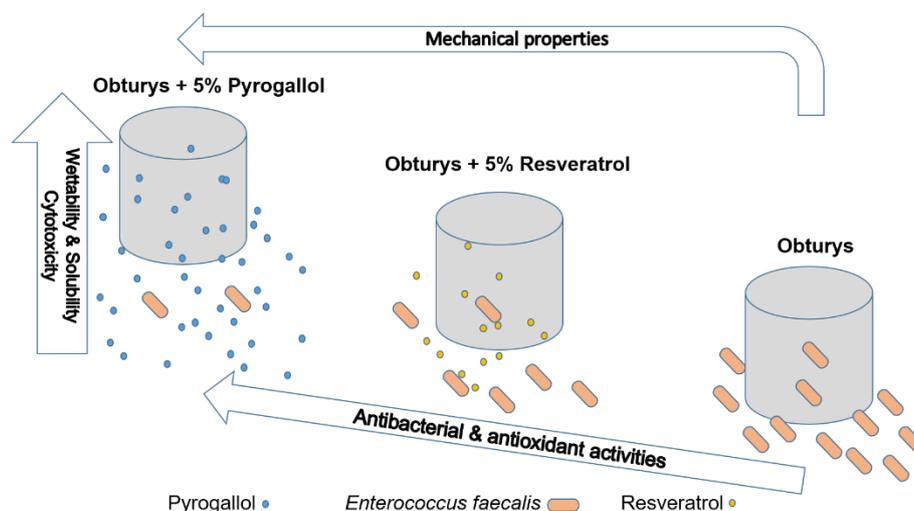


Figure 33. Résumé de l'étude en cours sur la modification de résine-époxy avec deux polyphénols différents ; RS : resvératrol ; PY : pyrogallol ; L'Obturys est un ciment d'obturation canalair à base de résine-époxy.

Références

- [1] Mancino D, Kharouf N, Hemmerlé J, Haïkel Y. Microscopic and Chemical Assessments of the Filling Ability in Oval-Shaped Root Canals Using Two Different Carrier-Based Filling Techniques. *Eur J Dent.* 2019, 13, 166–171.
- [2] Kharouf N, Arntz Y, Eid A, et al. Physicochemical and Antibacterial Properties of Novel, Premixed Calcium Silicate-Based Sealer Compared to Powder–Liquid Bioceramic Sealer. *J Clin Med.* 2020, 9, 3096.
- [3] Nicholson JW, Czarnecka B. Materials for root canal filling. In *Materials for the direct restoration of teeth*; Woodhead Publishing series in biomaterials; Woodhead Publishing: Amsterdam. 2016, 197–219.
- [4] Bose R, Ioannidis K, Foschi F, et al. Antimicrobial Effectiveness of Calcium Silicate Sealers against a Nutrient-Stressed Multispecies Biofilm. *J Clin Med.* 2020, 9, 2722.
- [5] Komabayashi T, Colmenar D, Cvach N, et al. Comprehensive Review of Current Endodontic Sealers. *Dent Mater J.* 2020, 39, 703–720.
- [6] Mickel A, Nguyen T, Chogle S. Antimicrobial Activity of Endodontic Sealers on *Enterococcus Faecalis*. *Journal of Endodontics.* 2003, 29, 257–258.
- [7] Slutzky-Goldberg I, Slutzky H, Solomonov M, et al. Antibacterial Properties of Four Endodontic Sealers. *Journal of Endodontics.* 2008, 34, 735–738.
- [8] Singh G, Gupta I, Elshamy FMM, et al. In Vitro Comparison of Antibacterial Properties of Bioceramic Based Sealer, Resin-Based Sealer and Zinc Oxide Eugenol Based Sealer and Two Mineral Trioxide Aggregates. *Eur J Dent.* 2016, 10, 366–369.
- [9] Kharouf N, Haïkel Y, Ball V. Polyphenols in Dental Applications. *Bioengineering.* 2020, 7, 72.
- [10] Atalayin C, Armagan G, Konyalioglu S, et al. The Protective Effect of Resveratrol against Dentin Bonding Agents-Induced Cytotoxicity. *Dental Materials Journal.* 2015, 34, 766–773.

- [11] Porto ICCM, Nascimento TG, Oliveira JMS, et al. Use of Polyphenols as a Strategy to Prevent Bond Degradation in the Dentin-Resin Interface. *Eur J Oral Sci.* 2018, 126, 146–158.
- [12] Cynthia, Ignatia F, Sutanto H, Darmawan A. Antibacterial and Antioxidant Activities of Pyrogallol and Synthetic Pyrogallol Dimer. *Res J Chem Environ.* 2018, 22, 39–47.
- [13] Kharouf N, Mancino D, Zghal J, et al. Dual role of Tannic acid and pyrogallol incorporated in plaster of Paris: morphology modification and release for antimicrobial properties. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2021, 127, 112209.
- [14] Oh DX, Prajateljia E, Ju SW, et al. A Rapid, Efficient and Facile Solution for Dental Hypersensitivity: The Tannin–Iron Complex. *Sci Rep.* 2015, 5, 10884.
- [15] Hu Y, Chen D, Zheng P, et al. The Bidirectional Interactions between Resveratrol and Gut Microbiota: An Insight into Oxidative Stress and Inflammatory Bowel Disease Therapy. *Biomed Res Int.* 2019, 5403761.
- [16] Alibi S, Crespo D, Navas J. Plant-Derivatives Small Molecules with Antibacterial Activity. *Antibiotics.* 2021, 10, 231.
- [17] Kharouf N, Eid A, Hardan L, et al. Antibacterial and Bonding Properties of Universal Adhesive Dental Polymers Doped with Pyrogallol. *Polymers.* 2021, 13, 1538.

Caractérisation de biocéramiques et évaluation de leurs potentiels bioactifs

Résumé

La ligne directrice de ce travail de thèse consiste à rajouter des polyphénols dans l'eau utilisée pour la prise du ciment dentaire de réparation canalair dans l'hypothèse que cette famille de molécules, connues pour leur capacité à s'adsorber sur la surface de tous types de matériaux, favorise des interactions interparticules au sein du ciment et qu'une partie reste disponible pour favoriser des effets biologiques. L'ajout d'acide tannique (AT) aux ciments « mineral trioxide aggregate » (MTA) diminue nettement leur temps de prise et la taille moyenne des grains du ciment obtenus et augmente l'hydrophilie des matériaux composites ainsi que leur propriétés mécaniques à l'état sec. Mais le fait que le polyphénol est fortement hydrophile avec une certaine libération dans l'eau, induit une diminution de la compression maximale à la rupture des composites dopés avec de l'AT par rapport au ciment MTA 100% hydraté. Pour mieux comprendre les effets de l'addition de polyphénols sur les propriétés de ce matériau, la modification du plâtre de Paris avec différentes fractions massiques d'acide tannique et de pyrogallol a été étudiée. L'incorporation de molécules actives dans des composites à base de calcium pourrait avoir un effet positif sur leurs propriétés mécaniques et leurs activités biologiques. Mais des études complémentaires restent à mener avec d'autres polyphénols et d'autres matériaux composites.

Mots clés : Polyphénols, « Mineral trioxide aggregate », Plâtre de Paris

Résumé en anglais

The guideline of this thesis is to add polyphenols to the liquid used for the setting of dental root canal repair cements with the assumption that this family of molecules, known for their ability to adsorb on the surface of all types of materials, promote interparticle interactions within the cement and a part remains available to promote biological effects. The addition of tannic acid (TA) to mineral trioxide aggregate (MTA) cements decreases their setting time, reduces the average grain size and increases the hydrophilicity of the composite materials as well as their mechanical properties in the dry state. But the fact that the polyphenol is strongly hydrophilic with a certain release in water, induces a decrease of the compression resistance at break of the composites doped with TA compared to the 100% hydrated MTA cement. To better understand the effects of polyphenol addition on the properties of this material, the modification of plaster of Paris with different mass fractions of tannic acid and pyrogallol was also studied. The incorporation of active molecules in calcium-based composites could have a positive effect on their mechanical and biological properties. But further studies are still needed with other polyphenols and other composite materials.

Keywords : Polyphenols, Mineral trioxide aggregate, Plaster of Paris