

RESSALVA

Atendendo a solicitação do(a) autor(a), o texto completo desse trabalho será disponibilizado no repositório a partir de 30/07/2027.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

VICTÓRIA KELLY FONSECA TAVARES

**EFETIVIDADE ANTIMICROBIANA DA ÁGUA ATIVADA POR PLASMA
DE DESCARGA POR BARREIRA DIELÉTRICA (DBD) COMO AGENTE
IRRIGANTE EM ENDODONTIA**

VICTORIA KELLY FONSECA TAVARES

**EFETIVIDADE ANTIMICROBIANA DA ÁGUA ATIVADA POR PLASMA DE
DESCARGA POR BARREIRA DIELÉTRICA (DBD) COMO AGENTE IRRIGANTE
EM ENDODONTIA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRA, pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL.

Área: Microbiologia e Imunologia. Linha de pesquisa: Agentes antimicrobianos e métodos de controle para infecção de interesse médico-odontológico.

Orientadora: Profa. Dra. Tit. Cristiane Yumi Koga-Ito

Coorientador: Prof. Dr. Felipe de Souza Miranda

São José dos Campos

2025

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2025]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Tavares, Victória Kelly Fonseca

Efetividade antimicrobiana da água ativada por plasma de descarga por barreira dielétrica (DBD) como agente irrigante em Endodontia / Victória Kelly Fonseca Tavares. - São José dos Campos : [s.n.], 2025.
110 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2025.

Orientadora: Cristiane Yumi Koga-ito

Coorientador: Felipe de Souza Miranda

1. Endodontia. 2. Cold plasma. 3. Descarga de barreira dielétrica. 4. Água ativada por plasma. 5. Antimicrobiano. I. Koga-ito, Cristiane Yumi, orient. II. Miranda, Felipe de Souza, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - UNESP. V. Universidade Estadual Paulista (UNESP). VI. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

As infecções endodônticas estão entre os principais motivos de atendimento odontológico. Estima-se que uma parcela significativa das falhas em tratamentos endodônticos esteja associada à persistência de microrganismos resistentes nos canais radiculares, o que representa um desafio clínico com impacto direto na saúde bucal e qualidade de vida dos pacientes. *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* destacam-se como os principais patógenos envolvidos nesses casos, devido à sua alta resistência aos irrigantes convencionais e à capacidade de formar biofilmes de difícil erradicação. Diante desse cenário, a presente pesquisa tem como objetivo avaliar a efetividade antimicrobiana da água ativada por plasma (PAW) de descarga por barreira dielétrica (DBD) como uma alternativa promissora adjuvante aos protocolos irrigantes já estabelecidos, com potencial para otimizar o controle microbiano, reduzir riscos e desconfortos ao paciente e ampliar as taxas de sucesso dos tratamentos endodônticos.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

Endodontic infections are among the leading causes of dental care visits. It is estimated that a significant portion of endodontic treatment failures is associated with the persistence of resistant microorganisms in the root canals, representing a clinical challenge with direct impact on oral health and patients' quality of life. *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* are among the main pathogens involved in these cases due to their high resistance to conventional irrigants and their ability to form difficult-to-eradicate biofilms. A promising alternative adjuvant to established irrigation protocols is plasma-activated water generated by dielectric barrier discharge (DBD), in the present study, which evaluates the antimicrobial effectiveness of plasma-activated water. By enhancing microbial control, reducing patient discomfort and risk, and increasing endodontic treatment success, these therapies can increase treatment's success rates.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Tit. Cristiane Yumi Koga-Ito (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Instituto de Ciências e Tecnologia

Campus São José dos Campos

Prof. Dra. Marianne Spalding

Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Instituto de Ciências e Tecnologia

Campus São José dos Campos

Dr. Fellype do Nascimento

Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Departamento de Física

Campus Guaratinguetá

São José dos Campos, 30 de julho de 2025.

DEDICATÓRIA

A Deus, fonte de toda sabedoria e força, por ter guiado cada passo desta jornada, sustentando-me nos momentos de incerteza e permitindo a realização deste mestrado. Nada desvia quando são planos escritos por Ele, e creio que em tudo há um propósito divino.

À minha família, meu alicerce.

Ao meu pai, Rodnei, pelo apoio e amor incondicional e por nunca medir esforços para me oferecer o suporte necessário.

À minha mãe, Noemi, por seu amor constante e por ser meu amparo nos dias mais difíceis.

Aos meus irmãos, Talita e Junior, e aos meus sobrinhos, Kauã e Giovanna, por cada palavra de incentivo, por acreditarem em mim e comemorarem cada conquista ao meu lado.

Que esta oportunidade de me tornar mestre também sirva como inspiração para os meus sobrinhos, para que saibam que, com fé, esforço e perseverança, é possível alcançar sonhos.

À minha avó Zanith, por seu carinho e orações.

Aos meus tios maternos e paternos, por cada oração, palavra de incentivo e demonstração de apoio ao longo desta caminhada.

Ao Guilherme Teodoro, meu “Papis microbiológico”, por todo apoio para seguir meu sonho de entrar no mestrado e por ser uma referência e inspiração para mim.

Ao Vinicius, meu companheiro, por sua presença, pelas palavras de motivação nos dias difíceis e pelo apoio. Sua parceria fez toda a diferença nessa caminhada.

Em especial, dedico esta conquista à memória dos meus avós Hildo e Venina, que agora descansam no Senhor. Tenho certeza de que seus corações se encheriam de alegria ao me ver alcançar o título de mestre. Esta vitória também é deles.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, campus São José dos Campos, ao Programa de pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal (CASB), ao corpo docente e colaboradores técnico administrativo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão inicial da bolsa de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por acreditar no potencial inovador deste trabalho e conceder a bolsa de mestrado (Processo FAPESP 2023/12059-1) e a realização também do mestrado sanduíche através da concessão da BEPE (Processo FAPESP 2024/06821-0) além do vínculo ao projeto temático (Processo FAPESP 2019/05856-7).

À Prof^a. Tit. Cristiane Yumi Koga-Ito, minha orientadora, por sua orientação firme e generosa, pela confiança depositada em mim, por acreditar desde o início no meu potencial e pelos ensinamentos científicos e humanos, e por sempre conduzir este trabalho com responsabilidade, dedicação e sensibilidade. Sua orientação foi essencial para meu crescimento acadêmico e pessoal. Obrigada!

Ao Dr. Felipe de Souza Miranda, meu coorientador, por sua valiosa contribuição neste trabalho, pelas discussões e sugestões criteriosas, por compartilhar seu conhecimento sobre plasma e incentivo a cada resultado obtido. Agradeço por sempre estar disponível, com paciência e atenção (enfrentar o trânsito da Dutra em horários de pico não foi nada fácil né?!) e por acreditar no meu potencial para o desenvolvimento desse estudo.

À técnica de laboratório Clélia, por toda ajuda, ensinamentos, carinho, conversas e desabafos, pelo abraço aconchegante e pelo horário do chá e pão de queijo na maioria das manhãs para recarregar as energias.

Aos meus amigos e colegas do laboratório Genoma — Aline Sampaio, Noala, Ana, Diego, Lady, Márcia, Thais, Larissa, Isabella e Gabriel pelas conversas, pela ajuda nos experimentos, pelas caronas e pelo companheirismo

que fez toda diferença. Foi um privilégio dividir o laboratório com pessoas tão legais. Em especial, quero agradecer a Lady por ser a primeira pessoa a me acolher e apresentar o laboratório no início do mestrado, por ensinar técnicas e ser uma dupla incrível de experimentos, conversas e de comer um “chocolatinho” pós almoço.

A todos os membros que compõe o Laboratório de Plasmas e Processos (LPP) do Instituto Tecnológico de aeronáutica (ITA) pela parceria e ao Técnico de Laboratório de Materiais e Processos da Divisão de Engenharia Mecânica, Filipe Caldato Dalan pela ajuda com as análises por Microscopia Eletrônica de Varredura.

Aos amigos Nádia, Amanda, Juci, Fabi, Tamires, Miriã, Kallani e Sena pelo carinho e escuta nos momentos em que mais precisei. A amizade de vocês foi abrigo e força ao longo desta jornada.

Aos amigos que conheci na França durante o período do mestrado sanduíche, Ritu Zende e Pradeep Murugesan, pelo acolhimento, amizade e pelas ricas trocas de experiências. Aprender com vocês e compartilhar diferentes culturas foi uma das vivências mais enriquecedoras desta etapa.

À minha psicóloga Josiane Arcari, por me ajudar a manter o equilíbrio emocional e por ter sido um suporte fundamental nos momentos de maior vulnerabilidade.

Aos meus orientadores da BEPE na França, Dr. Eric Robert e Dr. Augusto Stancampiano, por me receberem com tanta generosidade, pelo acompanhamento atento e pelas contribuições fundamentais para o desenvolvimento do projeto no exterior.e aos membros do laboratório GREMI da Université d'Orléans e do Centre National de la Recherche Scientifique, por me acolherem de forma tão receptiva e colaborativa.

Aos professores de inglês Wander Puttinato e Lygia Siqueira, pelo incentivo contínuo, pelas aulas e por me ajudarem a enfrentar com mais segurança os desafios do idioma na minha primeira experiencia no exterior.

Aos professores Matheus Salgado, Sonia Khouri e Anelise Doria, por serem verdadeiras inspirações acadêmicas e grandes incentivadores da minha trajetória.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que fosse possível a realização desse trabalho, meu muito obrigada.

“É preciso que eu suporte duas ou três lagartas se quiser conhecer as borboletas”.

"Il faut bien que je supporte deux ou trois chenilles si je veux connaître les papillons".

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

Tavares VKF. Efetividade antimicrobiana da água ativada por plasma de descarga por barreira dielétrica (DBD) como agente irrigante em endodontia [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2025.

Infecções endodônticas persistentes representam um desafio clínico relevante, frequentemente associadas à presença de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, microrganismos capazes de sobreviver em ambientes de escassez nutricional e formar biofilmes resistentes a ação dos irrigantes convencionais. A complexa anatomia do sistema de canais radiculares e a limitação dos protocolos atuais reforçam a necessidade de explorar terapias complementares eficazes, seguras e viáveis clinicamente. Nesse contexto, a água ativada por plasma (PAW), gerada por dispositivos de descarga de barreira dielétrica (DBD) do tipo coaxial tem se destacado como uma alternativa promissora devido à sua ação antimicrobiana de amplo espectro, baixa de citotoxicidade e potencial de personalização por meio do ajuste de parâmetros operacionais. Esta dissertação foi composta por três estudos experimentais. O primeiro estudo teve como objetivo avaliar a eficácia antimicrobiana da PAW frente a células planctônicas de *E. faecalis* e *C. albicans*, utilizando diferentes gases de trabalho (ar comprimido (PAW-Ca), argônio (PAW-Ar) e hélio (PAW-He)), e correlacionar os parâmetros físico-químicos com os efeitos microbiológicos. Os resultados demonstraram que a PAW-Ar e PAW-He foram mais eficazes resultando em reduções significativas das contagens de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) de *E. faecalis* em curtos tempos de exposição (45 segundos e 1 minuto), enquanto a PAW-Ca mostrou maior redução frente a *C. albicans* após 1 minuto e 30 segundos de contato. Todas as águas ativadas no teste de citotoxicidade preservaram a viabilidade da linhagem celular de fibroblastos 3T3, ao contrário do hipoclorito de sódio e da clorexidina. No segundo estudo, buscou-se avaliar o desempenho da PAW em condições mais próximas da prática clínica, por meio da aplicação em biofilmes mono e duo-espécie submetidos a exposições sucessivas (1, 2 e 3 exposições) de 1 minuto e 30 segundos, simulando irrigação endodôntica. A contagem de UFC/mL e as imagens por microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelaram que a PAW-Ca foi mais eficaz frente ao biofilme de *C. albicans*, enquanto a PAW-Ar foi mais eficaz frente ao biofilme de *E. faecalis*. No caso dos biofilmes duo-espécie, tanto PAW-Ca como PAW-Ar foram significativamente eficazes, induzindo desestruturação significativa da matriz biofilme e alteração na morfologia das células microbianas. Além disso, o uso de ar comprimido mostrou-se vantajoso por sua acessibilidade e baixo custo, reforçando o potencial translacional da PAW-Ca. O terceiro estudo teve como foco investigar o impacto da umidificação do gás de alimentação na composição e eficácia da PAW gerada com ar comprimido. Foram testados níveis de umidade de 0%, 20% e 80%, sendo observada maior produção de nitratos e nitritos com 20% de umidade e possível formação de espécies altamente reativas, como o ácido peroxinitroso, em 80%. A PAW gerada sob 20% de umidade por 20 minutos apresentou o melhor desempenho antimicrobiano contra *E. faecalis*, indicando que a umidade e o tempo de ativação são variáveis críticas para a modulação da solução. Com base nos

achados obtidos, conclui-se que a água ativada por plasma gerada por DBD coaxial apresenta eficácia antimicrobiana significativa contra formas planctônicas e biofilmes de microrganismos relacionados ao insucesso dos tratamentos endodônticos, sendo possível ajustar sua composição química de acordo com o gás, tempo de ativação e umidade do sistema. A ausência de citotoxicidade e a viabilidade operacional com ar comprimido reforçam a seu potencial na aplicação clínica como irrigante adjuvante em protocolos endodônticos. A PAW representa, portanto, uma ferramenta inovadora, versátil e com aplicabilidade clínica promissora no controle de infecções endodônticas resistentes.

Palavras-chave: Endodontia; Cold plasma; Descarga de barreira dielétrica; Água ativada por plasma; Antimicrobiano.

ABSTRACT

Tavares VKF. Antimicrobial effectiveness of dielectric barrier discharge (DBD) plasma activated water as an irrigating agent in endodontics [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (UNESP), Institute of Science and Technology; 2025.

Persistent endodontic infections represent a relevant clinical challenge, frequently associated with the presence of Enterococcus faecalis and Candida albicans, microorganisms capable of surviving in environments of nutritional scarcity and forming biofilms resistant to the action of conventional irrigants. The complex anatomy of the root canal system and the limitation of current protocols reinforce the need to explore effective, safe and clinically viable complementary therapies. In this context, plasma-activated water (PAW), generated by dielectric barrier discharge (DBD) devices, has emerged as a promising alternative due to its broad-spectrum antimicrobial action, low cytotoxicity and potential for customization through adjustment of operational parameters. This dissertation was composed of three experimental studies. The first study aimed to evaluate the antimicrobial efficacy of PAW against planktonic cells of E. faecalis and C. albicans, using different feed gases (compressed air (PAW-Ca), argon (PAW-Ar) and helium (PAW-He)), and to correlate the physicochemical parameters with the microbiological effects. The results demonstrated that PAW-Ar and PAW-He were more effective, resulting in significant reductions in the colony forming unit counts (CFU/mL) of E. faecalis in short exposure times (45 seconds and 1 minute), while PAW-Ca showed greater reduction against C. albicans after 1 minute and 30 seconds of contact. All activated waters in the cytotoxicity test preserved the viability of the 3T3 fibroblast cell line, unlike sodium hypochlorite and chlorhexidine. The second study sought to evaluate the performance of PAW under conditions closer to clinical practice, by applying it to mono- and dual-species biofilms subjected to successive exposures (1, 2 and 3 exposures) of 1 minute and 30 seconds, simulating endodontic irrigation. The CFU/mL count and scanning electron microscopy (SEM) images revealed that PAW-Ca obtained the best results against C. albicans biofilm, while PAW-Ar was more effective against E. faecalis biofilm. In the case of dual-species biofilms, both PAW-Ca and PAW-Ar were significantly effective, inducing significant disruption of the biofilm matrix and changes in the morphology of microbial cells. Furthermore, the use of compressed air proved to be advantageous due to its accessibility and low cost, reinforcing the translational potential of PAW-Ca. The third study focused on investigating the impact of feed gas humidification on the composition and efficacy of PAW generated with compressed air. Humidity levels of 0%, 20% and 80% were tested, and greater production of nitrates and nitrites was observed at 20% humidity and possible formation of highly reactive species, such as peroxyntrous acid, at 80%. PAW generated under 20% humidity for 20 minutes showed the best

antimicrobial performance against E. faecalis, indicating that humidity and activation time are critical variables for modulating the solution. Based on the findings obtained, it is concluded that plasma-activated water generated by coaxial DBD has significant antimicrobial efficacy against planktonic forms and biofilms of microorganisms related to the failure of endodontic treatments, and its chemical composition can be adjusted according to the gas, activation time and humidity of the system. The absence of cytotoxicity and operational viability with compressed air reinforce its potential for clinical application as an adjuvant irrigant in endodontic protocols. PAW therefore represents an innovative, versatile tool with promising clinical applicability in the control of resistant endodontic infections.

Keywords: Endodontics; Atmospheric cold plasma; Dielectric barrier discharge; Plasma-activated water; Antimicrobial.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 ARTIGO(S).....	21
2.1 Artigo – Victória Kelly Fonseca Tavares, Felipe de Souza Miranda, Diego Morais da Silva, Rodrigo Sávio Pessoa, Cristiane Yumi Koga-Ito. Efeito da água ativada por plasma com diversas propriedades físico-químicas sobre espécies microbianas relacionadas a infecções refratárias / <i>Effect of Plasma activated water with diverse physicochemical Properties on microbial species related to refractory infections</i>.....	21
2.2 Artigo – Victória Kelly Fonseca Tavares, Felipe de Souza Miranda, Rodrigo Sávio Pessoa, Cristiane Yumi Koga-Ito. Água ativada por plasma produzida por DBD Coaxial para irrigação endodôntica: Investigação de soluções com diferentes composições químicas em biofilmes mono e dual espécie de <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Candida albicans</i> / <i>Plasma activated water produced in a Coaxial DBD for endodontic irrigation: investigation of solutions with different chemical compositions on Enterococcus faecalis and Candida albicans mono and dual species biofilms*</i>	54
2.3 Artigo – Victória Kelly Fonseca Tavares, Felipe de Souza Miranda, Rodrigo Sávio Pessoa, Cristiane Yumi Koga-Ito, Augusto Stancampiano, Eric Robert. Otimização da água ativada por plasma para aplicações endodônticas: influência da umidade na formação de espécies reativas e atividade antimicrobiana contra <i>Enterococcus faecalis</i> / <i>Optimizing plasma- activated water for endodontic applications: Influence of humidity on reactive species formation and antimicrobial activity against Enterococcus faecalis*</i>	83
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS	102
REFERÊNCIAS.....	105

1 INTRODUÇÃO

Os canais radiculares e as cavidades pulpares oferecem um ambiente propício para o crescimento e proliferação microbiana. A microbiota endodôntica é composta por bactérias e fungos, que podem ser isoladas como células planctônicas e na forma de agregados aderidas principalmente às paredes dos canais radiculares, caracterizando a estrutura de biofilme (Neelakantan et al., 2017; Prada et al., 2019). Na infecção endodôntica, microrganismos patogênicos atingem a polpa dentária, e se estabelecem no canal radicular, desencadeando um processo inflamatório. A progressão da doença se dá com a necrose pulpar e formação de abscessos causando principalmente edema e dor intensa ao paciente e edema. A infecção pode se expandir para os tecidos circundantes levando a complicações tanto locais quanto sistêmicas (Gomes, Herrera, 2018; Niazi, Bakhsh, 2022).

Os micro-organismos quando em biofilme, apresentam capacidade de auto-organização, resistência às alterações do ambiente em que colonizam, sinergismo e a capacidade de responder às mudanças como uma unidade (Neelakantan et al., 2017). Para sobreviver nos canais radiculares, principalmente em regiões anatomicamente complexas, os micro-organismos têm de sobreviver frente as medidas de desinfecção intracanal (preparação quimio-mecânica e medicamentos intracanaís) e deve se adaptar a um ambiente com pouca disponibilidade de nutrientes. Sendo assim, somente algumas espécies que apresentam essas habilidades (Prada et al., 2019).

Nas infecções endodônticas classificadas como secundárias ou persistentes há presença de bactérias Gram-positivas anaeróbias estritas ou facultativas, sendo prevalentes os gêneros *Streptococcus* e *Enterococcus*. Além disso, fungos do gênero *Candida* também podem estar envolvidos (Medina-Palacios et al., 2021; Sakko et al., 2016; Zhang et al., 2018). Uma das principais causas de fracasso no tratamento endodôntico é a infecção persistente (Tabassum, Khan, 2016).

Enterococcus faecalis é a espécie bacteriana mais comumente envolvida. Trata-se de cocos Gram-positivos, anaeróbio facultativo, encontrado na cavidade oral e no trato gastrointestinal. São capazes de sobreviver dentro dos canais radiculares mesmo após procedimentos terapêuticos, em ambientes com altas concentrações de

cálcio e com pH ácido, além de apresentar capacidade de formar biofilmes e invadir profundamente os túbulos dentinários. Também pode apresentar resistência a períodos prolongados de privação nutricional e a vários medicamentos intracanaís e antibióticos sistêmicos (Ch'ng et al., 2019; Kim, Rosa, Min, 2020; Stuart et al., 2006).

Candida albicans é um fungo oportunista que coloniza vários nichos do corpo humano, como pele, cavidade oral, vagina e trato gastrointestinal. Indivíduos com sistema imunológico comprometido, como indivíduos HIV positivos, recém-nascidos e idosos, são mais suscetíveis à infecção por *C. albicans* (Du et al., 2022). Os biofilmes formados por *C. albicans*, podem conter células em forma de levedura, pseudo-hifas e hifas, embebidas por matriz extracelular, o que pode influenciar na sua virulência (Lohse et al., 2018; Wang, 2015).

A presença de *C. albicans* pode ser um fator significativo e com isso, as interações entre fungos e bactérias na cavidade oral têm atraído cada vez mais atenção, visto o contexto do impacto da virulência de biofilmes polimicrobianos e sua maior resistência antimicrobiana (Du et al., 2022). Estudos têm demonstrado que *C. albicans* pode coexistir com bactérias como *E. faecalis* em biofilmes complexos encontrados nos canais radiculares infectados, podendo promover interações entre esses micro-organismos, afetando a progressão da infecção e a resposta do hospedeiro (Alshanta et al., 2022; Du et al., 2022; Fiallos et al., 2022).

Ademais, sugere-se que a presença de *C. albicans* pode aumentar a resistência do biofilme bacteriano e influenciar a virulência de patógenos como *E. faecalis*, de modo que se pode inferir que *C. albicans* e *E. faecalis* podem favorecer o mesmo ambiente ecológico ou interagir de forma a apoiar a sobrevivência um do outro, potencializando assim os efeitos patogênicos na infecção endodôntica principalmente em casos persistentes e refratários (Alshanta et al., 2022). Sendo assim, controlar o crescimento desses dois patógenos é relevante na Endodontia, visto que a presença de ambos os microrganismos é frequentemente detectada em casos de infecção endodôntica.

Nos casos de infecção endodôntica, a intervenção terapêutica é necessária. O tratamento endodôntico é um procedimento o qual a polpa inflamada ou infectada é removida (Soares et al., 2007), diminuindo a carga microbiana para evitar a propagação da infecção para outros tecidos e sua evolução (Medina-Palacios et al., 2021). Os quadros de infecção endodôntica podem ser classificados em primária,

secundária e persistente. Sendo a primária uma infecção inicial que ocorre no sistema de canais radiculares, resultado de cáries profundas ou traumas dentais que permitem que microrganismos penetrem na polpa dental, causando inflamação e infecção. Já a secundária ocorre após um tratamento endodôntico falho, onde os micro-organismos continuam introduzidos no sistema de canais radiculares. Por fim, a infecção persistente ou refratária é uma infecção que persiste mesmo após retratamento devido à sobrevivência de microrganismos resistentes (Fiallos et al., 2022; Gomes, Herrera 2018; Moradi et al., 2019).

O tratamento endodôntico evoluiu significativamente ao longo dos anos. O tratamento endodôntico é amplamente utilizado para preservar principalmente o elemento dentário em posição, mantendo a sua estrutura e função mastigatória (Bergenholtz, 2016; Soares et al., 2007). Entretanto, ainda há desafios no que diz respeito a eficácia, devido à dificuldade de localizar canais radiculares complexos anatomicamente, a remoção completa de tecido necrosado e a necessidade de garantir um selamento eficaz (Bergenholtz, 2016). A falha do tratamento é causada principalmente por infecções microbianas persistentes e devido à complexidade e variabilidade do sistema de canais radiculares, os microrganismos invadem profundamente os túbulos dentinários, ramificações, istmos e outras posições e com isso, os instrumentos disponíveis utilizados para o desbridamento mecânico não conseguem acessar microrganismos ocultos necessitando também o uso de soluções químicas intracanaís com propriedades antimicrobianas (Gomes et al., 2023). Portanto, o desbridamento químico-mecânico de canais radiculares infectados é fundamental para a desinfecção eficaz do canal radiculares (Boutsioukis, Arias-Moliz, 2022; Zeng et al., 2018).

Embora o tratamento endodôntico seja seguro, pode haver ainda riscos de complicações como perfurações, infecções secundárias e persistente ou danos aos tecidos circundantes causados pelos produtos químicos utilizados como irrigantes e medicação intracanal, fazendo com que em alguns casos o tratamento não seja bem-sucedido (Bergenholtz, 2016; Dioguardi et al., 2021; Setzer, Kratchman, 2022; Prada et al., 2019).

O processo de irrigação é frequentemente considerada uma das partes mais importantes do tratamento endodôntico, principalmente no contexto de desinfecção dos canais radiculares promovendo a remoção do tecido necrótico e detritos gerados

durante a etapa mecânica, controle da infecção e eliminação de biofilme (Haapasalo et al., 2014). Dentre os irrigantes convencionais mais utilizados destacam-se o hipoclorito de sódio (NaOCl) e o digluconato de clorexidina (Drews et al., 2023).

O hipoclorito de sódio possui propriedades antimicrobianas e é capaz de dissolver tecidos orgânicos, incluindo a polpa dentária e detritos. Estudos relatam as concentrações empregadas na prática clínica variam de 0,5% a 6%, sendo a concentração de 2,5% a mais utilizada na rotina (Cai et al., 2023; Drews et al., 2023). À medida que as concentrações aumentam, maior é eficácia na desinfecção e dissolução de tecidos, entretanto, o risco de irritação tecidual devido ao seu alto potencial oxidativo, também aumenta, podendo se estender para fora dos canais radiculares, formar precipitados e causar lesões e desconforto para o paciente (Cai et al., 2023; Wright et al., 2017). Estudos demonstram que altas concentrações de hipoclorito de sódio também podem causar desmineralização da dentina, resultando em uma redução da microdureza e da resistência do tecido dentinário (Abuhaimed, Neel, 2017; Xu et al., 2022).

A clorexidina é um agente antimicrobiano de amplo espectro. Comumente aplicada em concentrações de 0,12% a 2%, sendo a concentração de 2% a mais utilizada na clínica (Gomes et al., 2013). Em comparação com o hipoclorito de sódio, possui menor toxicidade e efeito antimicrobiano em baixas concentrações. A clorexidina apresenta substantividade, proporcionando ação antimicrobiana prolongada, o que é benéfico em casos em que é necessário manter a desinfecção por um período mais longo e em casos de reinfecção (Patil et al., 2023). Contudo, há relatos de que seu uso pode causar manchas escuras no esmalte do dentário, além de não ser compatível com o hipoclorito de sódio, pois a combinação de ambos em altas concentrações principalmente de clorexidina pode resultar em um precipitado que pode conter em sua composição paracloroanilina, que é considerada prejudicial com efeitos genotóxicos para fibroblastos gengivais (Bueso et al., 2022; Drews et al., 2023; Jeong et al., 2021).

O plasma frio à pressão atmosférica (CAP) é considerado um estado da matéria composto por uma mistura de partículas ionizadas, incluindo elétrons, íons, radicais livres e outras espécies altamente reativas. É gerado a temperaturas relativamente baixas, o que o torna seguro para uso em aplicações biológicas. Essas características permitem que o CAP seja utilizado em diversos processos, como esterilização,

cicatrização de feridas e tratamento de superfícies, sem causar danos térmicos aos materiais ou tecidos tratados (Borges et al., 2021; Scholtz et al., 2015). Além disso, é uma tecnologia versátil podendo ser adaptado para diversas aplicações odontológicas, incluindo a possibilidade de aplicação de forma indireta com a ativação de líquidos, trazendo novas possibilidades de aplicação de seu potencial antimicrobiano, podendo colaborar para a eficiência de tratamentos convencionais, como o tratamento de infecções endodônticas (Muniz et al., 2023).

Diferentes sistemas de geração de plasma têm sido desenvolvidos com configurações distintas e que estão diretamente relacionadas às reações físico-químicas heterogêneas que proporcionam a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS) como de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila ($-OH$) e superóxido (O_2^-), óxido nítrico (NO), nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) em diferentes concentrações (Zhou et al., 2020; Liu et al., 2010). Os parâmetros operacionais incluem tipo de descarga (jato de plasma, *gliding arc*, tipo corona, descarga por barreira dielétrica (DBD)), tempo de ativação do líquido, tempo de tratamento no alvo, gás de trabalho (ar comprimido, oxigênio, hélio, argônio, nitrogênio e/ou misturas) e características da fonte de alimentação (Armand et al., 2019).

Dentre os sistemas geradores de plasma mais utilizados para ativação de líquidos se destaca o DBD, onde o plasma é gerado entre dois eletrodos, sendo um aterrado e outro de alta tensão, onde pelo menos um é coberto por material dielétrico. Quando uma tensão alternada é aplicada, o gás entre os eletrodos é ionizado, formando a descarga. A presença do material dielétrico impede a formação de arcos elétricos contínuos, resultando em uma descarga que se distribui uniformemente (Fridman et al., 2005; Kogelschatz 2003). Uma das vantagens é que esse tipo de sistema permite a utilização de uma variedade de gases e em relação a eficácia antimicrobiana, os líquidos ativados com plasma DBD possuem quantidade significativa de espécies reativas que são eficazes na inativação de microrganismos, proporcionando uma solução eficiente para desinfecção e esterilização (Brun et al., 2018; Thirumdas et al., 2018).

A água é um solvente universal, capaz de dissolver uma ampla variedade de substâncias. Isso permite que dentre os líquidos, a água seja uma escolha favorável para ativação por plasma, induzindo reações químicas benéficas e permitindo um transporte eficiente de RONS, aumentando assim sua eficácia antimicrobiana no

processo de desinfecção de alvos que necessitam (Thirumdas et al., 2018). Ademais, a água ativada por plasma (PAW) pode apresentar perfil oxidativo além de diminuição do pH devido justamente à formação de espécies reativas principalmente de oxigênio (Misra et al., 2018). Embora, haja diminuição do pH e a presença de RONS, a PAW tem se demonstrado segura, acessível e não tóxica, tanto para tecidos biológicos quanto para o meio ambiente, podendo minimizar os riscos associados ao manuseio de líquidos perigosos ou tóxicos, tornando o processo mais seguro para pacientes (Lu et al., 2017; Thirumdas et al., 2015; Wong et al., 2023). Outros líquidos como soluções salinas ou peróxido de hidrogênio também podem ser ativados por plasma, entretanto a água ainda oferece um perfil de segurança superior e menor risco de irritação ou toxicidade (Thirumdas et al., 2018). Na endodontia, uso de PAW pode reduzir a necessidade de produtos químicos tradicionais, que podem ser irritantes ou tóxicos (Muniz et al., 2023).

A ação antimicrobiana de PAW decorre principalmente de danos oxidativos aos componentes celulares microbianos, como componentes de membrana, proteínas e ácidos nucleicos (Sakudo et al., 2019; Wong et al., 2023). Laurita et al., (2015) obtiveram redução de 3-log UFC-mL⁻¹ para *C. albicans* após 5 minutos de contato da PAW com o fungo, sendo ativada com sistema de descarga de barreira dielétrica (DBD) e ar comprimido, o tempo das ativações foram de 5 e 10 min. Embora os resultados tenham sido promissores, os autores sugerem que os curtos tempos de latência da atividade antimicrobiana em temperatura ambiente devem ser levados em consideração, minimizando o tempo entre o preparo e a aplicação do PAW para maximizar o efeito antimicrobiano. Além disso, apontam a necessidade de explorar o efeito em células de mamíferos, a fim de avaliar o risco relacionado ao seu uso em tecidos biológicos. Julák et al., (2012) utilizaram PAW e Solução Tamponada com Fosfato (PBS) ativadas por plasma de descarga do tipo corona e observaram efeito antifúngico baixo sobre *C. albicans* e relatam que o efeito antifúngico pode ser mediado pela presença de ozônio e peróxido de hidrogênio, as quais não estavam presentes em concentrações suficientes nos líquidos ativados avaliados.

O efeito antimicrobiano da PAW frente a *Enterococcus faecalis* também tem sido explorado na literatura. Entretanto, as poucas evidências encontradas na literatura ainda não sustentam a aplicação clínica. Ademais, ainda há necessidade de estudos utilizando modelos mais complexos e próximos à realidade clínica, como os

de biofilmes multi-espécies. Hameed et al., (2023) obtiveram resultados promissores com redução de 8-Log UFC-mL⁻¹, entretanto, com tempos de exposição de 15, 20 e 25 minutos. Li et al. (2019), relatam que espécies reativas de oxigênio presentes em água ativada por sistema DBD reduziram significativamente a viabilidade de células planctônicas de *E. faecalis* a partir do tempo de contato de 45 segundos, além de reduzir a expressão de fatores de virulência.

Considerando as propriedades promissoras dos líquidos ativados por plasma, especialmente a água ativada por plasma (PAW), e seu potencial como solução irrigante para o controle de microrganismos resistentes frequentemente associados às falhas no tratamento endodôntico, como *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, este trabalho tem como objetivo geral caracterizar e avaliar a aplicabilidade antimicrobiana da PAW gerada por um sistema de descarga por barreira dielétrica (DBD) do tipo coaxial, ou seja, os eletrodos são concêntricos sendo que o eletrodo Interno possui um dielétrico (isolante). O eletrodo interno é o eletrodo de alta tensão e o externo é o eletrodo aterrado. Existe um "gap" entre os eletrodos por onde passa o gás de trabalho e nessa mesma região se forma o Plasma, como solução irrigante em Endodontia. Para isso, a dissertação foi estruturada em três estudos complementares. O primeiro investigou a atividade antimicrobiana da PAW produzida com diferentes gases de trabalho (ar comprimido, argônio e hélio) frente a células planctônicas de *E. faecalis* e *C. albicans*, correlacionando suas propriedades físico-químicas com os efeitos observados além de estudar o perigo de citotoxicidade. O segundo estudo avaliou a eficácia das diferentes PAWs frente a biofilmes mono e duo espécie desses patógenos, por meio de análises microbiológicas e morfológicas através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Já o terceiro estudo buscou compreender a influência de diferentes níveis de umidade do gás de alimentação do plasma na geração da PAW e seu impacto na atividade antimicrobiana contra *E. faecalis*. Ao integrar essas abordagens, o presente trabalho visa contribuir para o desenvolvimento de protocolos de aplicação da PAW na Endodontia, considerando fatores físico-químicos, microbiológicos e operacionais, com foco na otimização da eficácia antimicrobiana e segurança clínica.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A desinfecção dos sistemas de canais radiculares tem se consolidado como um dos principais desafios da endodontia contemporânea, especialmente frente à resistência de microrganismos como *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, frequentemente associados aos quadros de persistência da infecção e falhas terapêuticas frente aos tratamentos convencionais disponíveis e padronizados (Medina-Palacios et al., 2021). A limitação dos irrigantes convencionais, tanto em termos de ação antimicrobiana quanto de biocompatibilidade, tem motivado a pesquisa e o desenvolvimento de estratégias inovadoras capazes de unir eficácia microbiológica, segurança biológica e aplicabilidade clínica (Drews et al., 2023). Nesse contexto, a tecnologia do plasma frio de pressão atmosférica, especificamente, a água ativada por plasma (PAW), vem ganhando destaque por sua versatilidade em aplicações médico-odontológicas além do potencial translacional para o cenário clínico.

O primeiro estudo apresentado teve como objetivo a avaliação da atividade antimicrobiana da PAW gerada por um sistema DBD coaxial, utilizando diferentes gases (ar comprimido, argônio e hélio), frente a células planctônicas de *E. faecalis* e *C. albicans*. Além disso, aspectos físico-químicos das soluções obtidas foram analisados e correlacionados com os efeitos microbiológicos. Os resultados demonstraram que a composição química da PAW variou significativamente conforme o gás utilizado, resultando em diferentes perfis de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS). A PAW gerada com hélio e argônio mostrou maior eficácia contra *E. faecalis*, mesmo em tempos de exposição reduzidos (45 segundos e 1 minuto), enquanto a PAW produzida com ar comprimido apresentou desempenho superior frente a *C. albicans*, sobretudo após 1 minuto e 30 segundos de exposição. Esses achados destacam a importância da escolha do gás como fator determinante na eficiência da PAW, bem como a necessidade de ajustar o tempo de aplicação ao tipo de microrganismo-alvo, além de enfatizar que as espécies reativas produzidas atuam em conjunto influenciando a formações de novas espécies. Outro ponto relevante foi a ausência de citotoxicidade associada às diferentes soluções, indicando que, mesmo

ricas em RONS, as PAWs podem ser geradas e ainda preservar a integridade tecidual, oferecendo possibilidades reais para a aplicação clínica.

No segundo estudo, buscou-se avançar na complexidade dos modelos microbiológicos e na aproximação com a prática clínica. Para isso, a mesma PAW foi testada em biofilmes mono e duo-espécie de *E. faecalis* e *C. albicans*, utilizando um protocolo baseado em exposições sucessivas de 1 minuto e 30 segundos (melhor tempo de ação antimicrobiana encontrado no estudo anterior levando em consideração os diferentes gases e ambos os microrganismos). Essa abordagem foi explorada não somente nas análises microbiológicas quantitativas, mas também em avaliações morfológicas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados evidenciaram reduções significativas na carga microbiana, especialmente com a PAW gerada com ar comprimido (PAW-Ca), e maior desestruturação biofilme observada por MEV. O desempenho de PAW-Ca foi particularmente expressivo em biofilmes de *C. albicans*, enquanto o PAW-Ar apresentou maior eficácia frente a *E. faecalis*, indicando uma possível especificidade relacionada à composição química da água ativada e às características estruturais dos microrganismos. Além disso, o uso do ar comprimido como gás de alimentação se mostrou vantajoso do ponto de vista logístico e econômico, dado que se trata de um recurso amplamente disponível para utilização em consultórios odontológicos, ao contrário dos gases nobres como o argônio e o hélio, cuja acessibilidade e custo limitam sua aplicação rotineira. Assim, os dados do segundo estudo reforçam o potencial da PAW-Ca como adjuvante aos irrigantes tradicionais, sendo promissora para incorporação futura em protocolos clínicos.

O terceiro estudo é uma expansão do trabalho experimental, desenvolvido em colaboração internacional durante estágio no exterior (BEPE FAPESP), com o objetivo de explorar uma variável ainda pouco investigada: a influência da umidade em conjunto com o gás de alimentação. A hipótese central foi que a presença de umidade poderia interferir positivamente na geração e estabilidade das espécies reativas formadas durante a ativação do plasma. Os achados confirmaram que níveis moderados de umidade aumentaram a produção de espécies reativas e pode influenciar na produção de outras como ácido peroxinitroso e radicais hidroxila, potencializando os efeitos antimicrobianos da PAW frente a *E. faecalis*. Esses resultados demonstram que a umidade do gás não apenas modifica o perfil químico da solução, mas também influencia diretamente sua eficácia antimicrobiana,

demonstrando ser um parâmetro relevante para futuras otimizações e contribuindo para o avanço no entendimento da dinâmica de geração e composição química da PAW para aplicações terapêuticas em diferentes contextos clínicos.

Portanto, os achados apresentados permitem concluir que PAW por representa uma tecnologia inovadora, eficaz e versátil para a aplicação endodôntica. A caracterização das variáveis envolvidas em sua geração (parâmetros operacionais, tipo de gás, tempo de ativação e exposição, espécies reativas, umidade) e a demonstração de sua eficácia em diferentes modelos microbiológicos, incluindo biofilmes complexos com metodologia próxima a realidade clínica, reforçam sua aplicabilidade prática e possibilidade de uso. Além da eficácia antimicrobiana, a segurança biológica demonstrada nas PAWs testadas amplia ainda mais sua relevância como estratégia e recurso complementar aos irrigantes convencionais.

REFERÊNCIAS

- Abuhaimed TS, Abou Neel EA. Sodium hypochlorite irrigation and its effect on bond strength to dentin. *Biomed Res Int.* 2017;2017:1930360. doi: 10.1155/2017/1930360.
- Armand A, Khani M, Asnaashari M, AliAhmadi A, Shokri B. Comparison study of root canal disinfection by cold plasma jet and photodynamic therapy. *Photodiagn Photodyn Ther.* 2019;26:327-33. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.04.023.
- Alshanta OA, Albashaireh K, McKloud E, Delaney C, Kean R, McLean W, et al. *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* biofilm frenemies: When the relationship sours. *Biofilm.* 2022;4:100072. doi: 10.1016/j.bioflm.2022.100072.
- Bergenholtz G. Assessment of treatment failure in endodontic therapy. *J Oral Rehabil.* 2016;43(10):753-8. doi: 10.1111/joor.12423.
- Borges AC, Kostov KG, Pessoa RS, de Abreu GMA, Lima GDMG, Figueira LW, et al. Applications of cold atmospheric pressure plasma in dentistry. *Appl Sci.* 2021;11(5):1975. doi: 10.3390/app11051975.
- Brun P, Vono M, Venier P, Tarricone E, Deligianni V, Martines E, et al. Disinfection of ocular cells and tissues by atmospheric-pressure cold plasma. *PLoS One.* 2012;7(3):e33245. doi: 10.1371/journal.pone.0033245.
- Bueso V, Parikh N, Terlier TT, Holland JN, Sarmast ND, Jeong JW. Comparative evaluation of intermediate solutions in prevention of brown precipitate formed from sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *Clin Exp Dent Res.* 2022;8(6):1591-7. doi: 10.1002/cre2.654.
- Boutsioukis C, Arias-Moliz MT. Present status and future directions – irrigants and irrigation methods. *Int Endod J.* 2022. doi: 10.1111/iej.13739.
- Cai C, Chen X, Li Y, Jiang Q. Advances in the role of sodium hypochlorite irrigant in chemical preparation of root canal treatment. *Biomed Res Int.* 2023;2023:8858283. doi: 10.1155/2023/8858283.
- Ch'ng JH, Chong KKL, Lam LN, Wong JJ, Kline KA. Biofilm-associated infection by enterococci. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17(2):82-94. doi: 10.1038/s41579-018-0107-z.
- Dioguardi M, Arena C, Sovereto D, Aiuto R, Laino L, Illuzzi G, et al. Influence of sterilization procedures on the physical and mechanical properties of rotating endodontic instruments: a systematic review and network meta-analysis. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2021;26(12):1697-713. doi: 10.52586/5062.
- Drews DJ, Nguyen AD, Diederich A, Gernhardt CR. The interaction of two widely used endodontic irrigants, chlorhexidine and sodium hypochlorite, and its impact on the disinfection protocol during root canal treatment. *Antibiotics (Basel).* 2023;12(3):589. doi: 10.3390/antibiotics12030589.

- Du Q, Ren B, Zhou X, Zhang L, Xu X. Cross-kingdom interaction between *Candida albicans* and oral bacteria. *Front Microbiol.* 2022;13:911623. doi: 10.3389/fmicb.2022.911623.
- Fiallos NM, Ribeiro Aguiar AL, da Silva BN, Pergentino MLM, Rocha MFG, Sidrim JJC, et al. The potential of phenothiazines against endodontic pathogens: a focus on *Enterococcus-Candida* dual-species biofilm. *Antibiotics (Basel).* 2022;11(11):1445. doi: 10.3390/antibiotics11111445.
- Fridman A, Chirokov A, Gutsol A. Non-thermal atmospheric pressure discharges. *J Phys D Appl Phys.* 2005;38(2):R1-24. doi: 10.1088/0022-3727/38/2/R01.
- Gomes BPFA, Herrera DR. Etiologic role of root canal infection in apical periodontitis and its relationship with clinical symptomatology. *Braz Oral Res.* 2018;32(suppl 1):82-110. doi: 10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0069.
- Gomes BPFA, Aveiro E, Kishen A. Irrigants and irrigation activation systems in endodontics. *Braz Dent J.* 2023;34(4):1-13. doi: 10.1590/0103-6440202305577.
- Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Br Dent J.* 2014;216(6):299-303. doi: 10.1038/sj.bdj.2014.204.
- Hameed TA, Humud HR, Ali LF. Effect of plasma-activated water and direct plasma on *Enterococcus faecalis* bacteria for disinfection of tooth root canal. *Iraq J Sci.* 2023;64(6):2889-98. doi: 10.24996/ijs.2023.64.6.19.
- Jeong JW, Sarmast ND, Terlier TT, Holland JN, Parikh N. Assessment of the cytotoxic effects and chemical composition of the insoluble precipitate formed from sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *Int Endod J.* 2021;54(10):1892-901. doi: 10.1111/iej.13583.
- Julák J, Scholtz V, Kotúčová S, Janoušková O. The persistent microbicidal effect in water exposed to the corona discharge. *Phys Med.* 2012;28(3):230-9. doi: 10.1016/j.ejmp.2011.08.001.
- Kim MA, Rosa V, Min KS. Characterization of *Enterococcus faecalis* in different culture conditions. *Sci Rep.* 2020;10(1):22189. doi: 10.1038/s41598-020-78998-5.
- Kogelschatz U. Dielectric-barrier discharges: their history, discharge physics, and industrial applications. *Plasma Chem Plasma Process.* 2003;23:1-46. doi: 10.1023/A:1022470901385.
- Laurita R, Barbieri D, Gherardi M, Colombo V, Lukes P. Chemical analysis of reactive species and antimicrobial activity of water treated by nanosecond pulsed DBD air plasma. *Clin Plasma Med.* 2015;3(2):53-61. doi: 10.1016/j.cpme.2015.10.001.
- Li Y, Pan J, Wu D, Tian Y, Zhang J, Fang J. Regulation of *Enterococcus faecalis* biofilm formation and quorum sensing related virulence factors with ultra-low dose reactive species produced by plasma activated water. *Plasma Chem Plasma Process.* 2019;39(1):35-49. doi: 10.1007/s11090-018-9930-2.

Liu F, Sun P, Bai N, Tian Y, Zhou H, Wei S, et al. Inactivation of bacteria in an aqueous environment by a direct-current, cold-atmospheric-pressure air plasma microjet. *Plasma Process Polym.* 2010;7(3-4):231-6. doi: 10.1002/ppap.200900070.

Lohse MB, Gulati M, Johnson AD, Nobile CJ. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(1):19-31. doi: 10.1038/nrmicro.2017.107.

Lu P, Boehm D, Cullen P, Bourke P. Controlled cytotoxicity of plasma treated water formulated by open-air hybrid mode discharge. *Appl Phys Lett.* 2017;110(26):264102. doi: 10.1063/1.4990525.

Medina-Palacios SE, Vitales-Noyola M, López-González E, González-Amaro AM, Méndez-González V, Pozos-Guillén A. Root canal microorganisms and their antibiotic susceptibility in patients with persistent endodontic infections, with and without clinical symptoms. *Odontology.* 2021;109(3):596-604. doi: 10.1007/s10266-020-00580-2.

Misra NN, Pankaj SK, Segat A, Ishikawa K. Cold plasma interactions with enzymes in foods and model systems. *Trends Food Sci Technol.* 2016;55:39-47. doi: 10.1016/j.tifs.2016.07.001.

Moradi Eslami L, Vatanpour M, Aminzadeh N, Mehrvarzfar P, Taheri S. The comparison of intracanal medicaments, diode laser and photodynamic therapy on removing the biofilm of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in the root canal system (ex-vivo study). *Photodiagn Photodyn Ther.* 2019;26:157-61. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.01.033.

Muniz AB, Vegian MR, Leite LDP, Silva DM, Milhan NVM, Kostov KG, et al. Non-thermal atmospheric pressure plasma application in endodontics. *Biomedicines.* 2023;11(5):1401. doi: 10.3390/biomedicines11051401.

Neelakantan P, Romero M, Vera J, Daood U, Khan AU, Yan A, et al. Biofilms in endodontics: current status and future directions. *Int J Mol Sci.* 2017;18(8):1748. doi: 10.3390/ijms18081748.

Niazi SA, Bakhsh A. Association between endodontic infection, its treatment and systemic health: a narrative review. *Medicina (Kaunas).* 2022;58(7):931. doi: 10.3390/medicina58070931.

Patil R, Singh SV, Mandlik JS, Jadhav A, Handa A, Jadhav A. Evaluating the efficacy of certain intermediate irrigants in preventing precipitate formed due to sodium hypochlorite and chlorhexidine within the root canal system: an in vitro study. *Cureus.* 2023;15(6):e39871. doi: 10.7759/cureus.39871.

Prada I, Micó-Muñoz P, Giner-Lluesma T, Micó-Martínez P, Collado-Castellano N, Manzano-Saiz A. Influence of microbiology on endodontic failure. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2019;24(3):e364-72. doi: 10.4317/medoral.22907.

Prada I, Micó-Muñoz P, Giner-Lluesma T, Micó-Martínez P, Muwaquet-Rodríguez S, Alberio-Monteaquedo A. Update of the therapeutic planning of irrigation and intracanal

medication in root canal treatment: a literature review. *J Clin Exp Dent*. 2019;11(2):e185-93. doi: 10.4317/jced.55560.

Sakko M, Tjäderhane L, Rautemaa-Richardson R. Microbiology of root canal infections. *Prim Dent J*. 2016;5(2):84-9. doi: 10.1308/205016816819304231.

Sakudo A, Yagyu Y, Onodera T. Disinfection and sterilization using plasma technology: fundamentals and future perspectives for biological applications. *Int J Mol Sci*. 2019;20(20):5216. doi: 10.3390/ijms20205216.

Scholtz V, Pazlarova J, Souskova H, Khun J, Julak J. Nonthermal plasma—a tool for decontamination and disinfection. *Biotechnol Adv*. 2015;33(6):1108-19. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.01.002.

Setzer FC, Kratchman SI. Present status and future directions: surgical endodontics. *Int Endod J*. 2022;55(Suppl 4):1020-58. doi: 10.1111/iej.13783.

Soares CJ, Santana FR, Silva NR, Preira JC, Pereira CA. Influence of the endodontic treatment on mechanical properties of root dentin. *J Endod*. 2007;33(5):603-6. doi: 10.1016/j.joen.2007.01.016.

Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod*. 2006;32(2):93-8. doi: 10.1016/j.joen.2005.10.049.

Tabassum S, Khan FR. Failure of endodontic treatment: the usual suspects. *Eur J Dent*. 2016;10(1):144-8. doi: 10.4103/1305-7456.175682.

Thirumdas R, Kothakota A, Annapure U, Siliveru K, Blundell R, Gatt R, et al. Plasma activated water (PAW): chemistry, physico-chemical properties, applications in food and agriculture. *Trends Food Sci Technol*. 2018;77:21-31. doi: 10.1016/j.tifs.2018.05.007.

Thirumdas R, Sarangapani C, Annapure US. Cold plasma: a novel non-thermal technology for food processing. *Food Biophys*. 2015;10(1):1-11. doi: 10.1007/s11483-014-9382-z.

Wang Y. Looking into *Candida albicans* infection, host response, and antifungal strategies. *Virulence*. 2015;6(4):307-8. doi: 10.1080/21505594.2014.1000752.

Wong KS, Nicholas D, Low M, Tan MK. Plasma-activated water: physicochemical properties, generation techniques, and applications. *Processes*. 2023;11(7):2213. doi: 10.3390/pr11072213.

Wright PP, Kahler B, Walsh LJ. Alkaline sodium hypochlorite irrigant and its chemical interactions. *Materials (Basel)*. 2017;10(10):1164. doi: 10.3390/ma10101147.

Xu H, Ye Z, Zhang A, Lin F, Fu J, Fok ASL. Effects of concentration of sodium hypochlorite as an endodontic irrigant on the mechanical and structural properties of root dentine: a laboratory study. *Int Endod J*. 2022;55(10):1091-102. doi: 10.1111/iej.13800.

Zeng C, Meghil MM, Miller M, Gou Y, Cutler CW, Bergeron BE, et al. Antimicrobial efficacy of an apical negative pressure root canal irrigation system against intracanal microorganisms. *J Dent*. 2018;72:71-5. doi: 10.1016/j.jdent.2018.03.008.

Zhang Y, Wang X, Li H, Ni C, Du Z, Yan F. Human oral microbiota and its modulation for oral health. *Biomed Pharmacother*. 2018;99:883-93. doi: 10.1016/j.biopha.2018.01.146.

Zhou R, Zhou R, Wang P, Xian Y, Mai-Prochnow A, Lu X, et al. Plasma-activated water: generation, origin of reactive species and biological applications. *J Phys D Appl Phys*. 2020;53(30):303001. doi: 10.1088/1361-6463/ab81cf.