



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

**ANA BESSA MUNIZ TAIER**

**APLICAÇÃO DE LÍQUIDOS ATIVADOS COM PLASMA FRIO NA  
ENDODONTIA**

2024

**ANA BESSA MUNIZ TAIER**

**APLICAÇÃO DE LÍQUIDOS ATIVADOS COM PLASMA FRIO NA ENDODONTIA**

Tese 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 DOUTORA pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL.

Área: Microbiologia. Linha de pesquisa: Doenças Infecciosas de Interesse Médico-Odontológico

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Yumi Koga Ito

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Pessoa

São José dos Campos

2024

Taier, Ana Bessa Muniz

Aplicação de líquidos ativados com plasma frio na endodontia / Ana Bessa Muniz Taier. - São José dos Campos : [s.n.], 2024.  
79 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2024.

Orientadora: Cristiane Yumi Koga-ito

Coorientador: Rodrigo Sávio Pessoa

1. Endodontia. 2. Plasma atmosférico não-térmico. 3. Líquidos ativados por plasma. I. Koga-ito, Cristiane Yumi, orient. II. Pessoa, Rodrigo Sávio, 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

*Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* são os principais causadores de reinfecção dos canais radiculares após tratamento endodôntico, levando à necessidade de retratamento. Ambas as espécies demonstram alta patogenicidade e resistência aos tratamentos endodônticos convencionais. Além disso, os irrigantes convencionais apresentam limitações importantes, como a alta toxicidade aos tecidos do hospedeiro. Por isto, a determinação de novos procedimentos padrão e estratégias de desinfecção intracanal são necessárias. Os resultados deste estudo mostraram que a água ativada com plasma pode ser um potencial irrigante endodôntico, reduzindo significativamente os biofilmes mono e dual espécies formados por *C. albicans* e *E. faecalis*.

## POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

*Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* are the main causes of root canal reinfection after endodontic treatment, leading to the need for retreatment. Both species demonstrate high pathogenicity and resistance to conventional endodontic treatments. Furthermore, conventional irrigants have important limitations, such as high toxicity to host tissues. Therefore, the determination of new standards and strategies for intracanal disinfection are necessary. The results of this study showed that plasma-activated water can be a potential endodontic irrigant, significantly reducing mono- and dual-species biofilms formed by *C. albicans* and *E. faecalis*.

## **BANCA EXAMINADORA**

### **Professora Titular Cristiane Yumi Koga Ito**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

### **Professor Doutor João Carlos da Rocha**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

### **Professora Doutora Marianne Spalding**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

### **Professora Associada Flaviana Bombarda de Andrade**

Universidade de São Paulo (USP)

Campus de Bauru

### **Professora Doutora Fernanda Gonçalves de Oliveira**

Universidade Paulista

Instituto Ciências da Saúde

Campus Taubaté

São José dos Campos, 26 de julho de 2024.

Dedico este trabalho com muito amor a Deus, pois sem Ele nada é possível. À minha família, que é meu maior tesouro. Ao meu marido, que é meu companheiro em todas as jornadas, sempre me apoiando e cuidando de nós com tanto carinho. E à nossa filha, que já traz tanta alegria para nós, mesmo antes de nascer. Agradeço a Deus por nos abençoar com essa nova fase, cheia de amor e felicidade para todos nós.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pela força e sabedoria concedidas ao longo desta jornada. Sem a Sua presença este trabalho não teria sido possível.

À minha família, pelo amor, paciência e apoio constante desde minha infância. Aos meus pais, por sempre acreditarem em mim. Meu marido, por ser uma fonte constante de inspiração e apoio.

À minha orientadora Profa Tit. Cristiane Yumi Koga-Ito, expresso minha profunda gratidão. Sua orientação e dedicação foram essenciais para a realização deste trabalho. Admiro muito a sua capacidade de equilibrar o imenso conhecimento acadêmico com uma abordagem humana e acolhedora. Sua confiança em mim foi uma grande motivação ao longo deste percurso, e sua amizade tornou esta jornada ainda mais especial. Sua dedicação como orientadora é uma inspiração para mim.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Rodrigo Sávio Pessoa pela assistência na execução deste projeto, principalmente por ter sido o suporte em toda a parte experimental dos líquidos ativados com plasma.

À assistente de suporte acadêmico Clélia, gostaria de expressar minha sincera gratidão pela sua incrível ajuda, dedicação e contribuição com a parte experimental durante toda a pesquisa. Suas habilidades foram fundamentais para o sucesso deste estudo e sua amizade foi um grande presente na minha vida.

Aos meus amigos do laboratório, Lady Daiane, Mariana Vegian, Diego Moraes, Aline Sampaio, Victória Kelly e Noala Vicensoto, gostaria de expressar minha profunda gratidão pelo companheirismo, pela troca constante de conhecimento e pelo apoio inestimável ao longo desses anos. Cada um de vocês trouxe uma contribuição única para o nosso ambiente de trabalho no laboratório, enriquecendo não apenas o aspecto científico, mas também tornando nossos dias mais leves e agradáveis. Os momentos compartilhados, desde as longas horas no laboratório até as discussões sobre os resultados, foram fundamentais para meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço por cada conselho, por cada risada compartilhada e por cada momento de solidariedade em que estivemos juntos.

À minha amiga Ellen Bessa que conheci no início da pós graduação, gostaria agradecer por tudo que fez e faz por mim, você é um dos maiores presentes que já recebi na vida e estaremos sempre juntas (no tempo de plantar e tempo de colher).

Agradeço as agências de fomento CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro concedido ao longo do desenvolvimento deste trabalho. O suporte destas instituições foi fundamental para o desenvolvimento da minha pesquisa.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta tese, meu sincero agradecimento.

*" Confie no Senhor de todo o seu coração e não se apoie em seu próprio entendimento; reconheça o Senhor em todos os seus caminhos, e ele endireitará as suas veredas." (Provérbios 3:5-6)*

## RESUMO

MUNIZ, AB. Aplicação de líquidos ativados por plasma frio na endodontia [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2024.

O insucesso do tratamento endodôntico é decorrente principalmente da presença de microrganismos remanescentes no canal radicular decorrente da dificuldade de remoção de biofilmes e das limitações dos irrigantes convencionais. Por este motivo, há necessidade de novas alternativas para a desinfecção intracanal. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade inibitória de líquidos ativados por plasma frio sobre biofilmes de interesse endodôntico, além de caracterizar as condições para obtenção do líquido ativado e analisar a citotoxicidade dos líquidos. Biofilmes mono e dual espécies de 24 horas foram obtidos a partir de suspensões padronizadas de *Candida albicans* (ATCC 18804) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Os biofilmes foram expostos aos líquidos ativados, sendo estes água destilada, solução fisiológica e água mineral. Foram incluídos grupos de líquidos não ativados (controles negativos) e grupo controle de crescimento. Após 24 horas, os biofilmes foram expostos ao tratamento por 2 períodos, 1 minuto e 1,5 minutos. O número de células remanescentes foi determinado após semeadura da suspensão microbiana resultante em meios de cultura seletivos. A citotoxicidade dos líquidos ativados frente às células 3T3 foi avaliada. O teste *ex vivo* foi realizado em canais radiculares de dentes humanos, no qual totalizou 54 dentes humanos unirradiculares que foram preparados, instrumentados e esterilizados para receberem tratamentos com água destilada ativada. Os dados foram analisados pelo software GraphPad Prism, versão 6.01. As comparações foram feitas utilizando testes de análise de variância (ANOVA One-way), seguidas do post-hoc de Tukey, adotando-se o nível de significância de 5%. A exposição dos líquidos ativados por plasma frio levou a reduções significativas ( $p < 0.0001$ ) em todos os grupos quando comparados ao grupo controle de crescimento e com os grupos dos líquidos não ativados, tanto para biofilmes mono e dual espécies. A Água destilada ativada levou à maior redução em relação aos demais líquidos e o tempo de tratamento mais efetivo foi de 1,5 minutos. Os líquidos ativados não foram citotóxicos para células 3T3. No teste *ex vivo*, a água destilada ativada levou à redução da viabilidade dos biofilmes em 80% a 91%. Conclui-se os líquidos ativadas com plasma frio apresentaram ação inibitória sobre biofilmes mono e dual espécies formados por *C. albicans* e *E. faecalis*, tanto em modelo *in vitro* quanto *ex vivo*, com ausência de toxicidade para células 3T3.

Palavras-chave: Endodontia; Plasma atmosférico não-térmico; líquidos ativados por plasma.

## ABSTRACT

MUNIZ, AB. *Application of plasma-activated liquids in endodontics. [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2024.*

The failure of endodontic treatment is mainly due to the presence of remaining microorganisms in the root canal due to the difficulty in removing biofilms and the limitations of conventional irrigants. For this reason, there is a need for new alternatives for intracanal disinfection. The objective of this study was to evaluate the inhibitory effect of by cold plasma activated liquids on biofilms of endodontic interest, in addition to characterizing the conditions for obtaining the activated liquid and analyzing the cytotoxicity of the liquids. 24-hours mono- and dual-species biofilms were obtained from standardized suspensions of Candida albicans (ATCC 18804) and Enterococcus faecalis (ATCC 29212). The biofilms were exposed to the activated liquids, which were distilled water, saline solution and mineral water. Non-activated liquid groups (negative controls) and growth control group were included. After 24 hours, the biofilms were exposed to treatment for 2 periods, 1 minute and 1.5 minutes. The number of remaining cells was determined by plating method using selective culture media. The cytotoxicity of activated liquids on 3T3 cells was evaluated. The ex vivo assays were carried out in root canals of human teeth. A total of 54 single-rooted human teeth were prepared, instrumented and sterilized to receive treatments with activated distilled water. Data were analyzed using GraphPad Prism software, version 6.01. Comparisons were made using analysis of variance tests (One-way ANOVA), followed by Tukey's post-hoc test, adopting a significance level of 5%. Significant reduction of cell viabilities ( $p < 0.0001$ ) in all groups were observed after exposure to plasma activated liquids when compared to the growth control group and the non-activated liquid groups, both for mono and dual species biofilms. Activated distilled water led to the greatest reduction compared to other liquids and the most effective treatment time was 1.5 minutes. The activated liquids were not cytotoxic to 3T3 cells. In the ex vivo assay, activated distilled water led to a reduction in biofilm viability from 80% to 91%. It is concluded that plasma activated liquids showed inhibitory action on mono and dual species biofilms formed by C. albicans and E. faecalis, both in in vitro and ex vivo models, with no toxicity for 3T3 cells.

**Keywords:** Endodontic; Cold atmospheric plasma; plasma activated liquids.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Ilustração esquemática da montagem experimental para ativar os líquidos.<br>.....                                                                                                                                                              | 29 |
| Figura 2 – Esquema de divisão dos Grupos.....                                                                                                                                                                                                             | 35 |
| Figura 3 – Espectro óptico do jato de plasma gerado em um sistema gliding arc com<br>ar comprimido em diferentes fluxos de ar (1, 5 e 10 L/min).....                                                                                                      | 37 |
| Figura 4 – Espectros ópticos da interação do plasma com as águas: solução fisiológica<br>(a), destilada (b) e mineral (c) para fluxo de ar de 5 L/min .....                                                                                               | 40 |
| Figura 5 – Espectros de absorção UV-Vis das águas ativadas com plasma:<br>comparação entre água mineral, destilada e solução fisiológica.....                                                                                                             | 43 |
| Figura 6 – A Fitas colorimétricas para medição das concentrações aproximadas de<br>$H_2O_2$ , $NO^{3-}$ e $NO^{2-}$ nas diferentes águas ativadas analisadas. ....                                                                                        | 45 |
| Figura 7 – Resultados obtidos para avaliação de atividade antibiofilme de <i>C. albicans</i> ,<br>utilizando água destilada, solução fisiológica e água mineral ativada com plasma frio<br>por 1 minuto ou 1 minuto e 30 segundos. ....                   | 50 |
| Figura 8 – Resultados obtidos para avaliação de atividade antibiofilme frente a <i>E.</i><br><i>faecalis</i> , utilizando água destilada, solução fisiológica e água mineral ativada com<br>plasma frio por 1 minuto e 1 minuto e 30 segundos. ....       | 52 |
| Figura 9 – Atividade inibitória da água destilada ativada por plasma sobre biofilmes<br>dual espécies de <i>E. faecalis</i> e <i>C. albicans</i> em exposição de 1 minuto e 30 segundos.<br>.....                                                         | 53 |
| Figura 10 – Resultados obtidos para avaliação de atividade antimicrobiana frente a<br>biofilme dual espécie de <i>E. faecalis</i> e <i>C. albicans</i> , utilizando Solução Fisiológica por 1<br>minuto e 30 segundos com plasma frio. ....               | 54 |
| Figura 11 – Resultados obtidos para avaliação de atividade inibitória frente a biofilmes<br>dual espécies de <i>E. faecalis</i> e <i>C. albicans</i> após exposição à água mineral ativada por<br>plasma por 1 minuto e 30 segundos com plasma frio. .... | 55 |
| Figura 12 – Resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade, avaliando os efeitos<br>dos diferentes líquidos ativados sobre fibroblastos 3T3. ....                                                                                                       | 56 |

Figura 13 – Resultados obtidos para avaliação de atividade antibiofilme frente a biofilme dual espécie de *E. faecalis* e *C. albicans*, utilizando água destilada ativada por plasma por 1 minuto e 30 segundos com plasma frio no ensaio ex vivo..... 57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                               |                                                               |
|-------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| AD                            | Água Destilada                                                |
| ADA                           | Água Destilada Ativada                                        |
| AM                            | Água Mineral                                                  |
| AMA                           | Água Mineral Ativada                                          |
| ATCC                          | American Type Culture Collection                              |
| C.                            | <i>Candida</i> spp.                                           |
| CHX                           | Clorexidina                                                   |
| CO <sub>2</sub>               | Dióxido de Carbono                                            |
| DBD                           | Dielectric Barrier Discharge                                  |
| DMEM                          | Dulbecco's Modified Eagle's Medium                            |
| DMSO                          | Dimetil Sulfóxido                                             |
| DO                            | Densidade Óptica                                              |
| E.                            | <i>Enterococcus</i> spp.                                      |
| EDTA                          | Ácido Etilenodiaminotetracético                               |
| FBS                           | Soro Fetal Bovino                                             |
| FNS                           | Sistema De Fluxos Nitrogenados                                |
| FPS                           | Sistema De Primeira Ordem Positivo                            |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peróxido de Hidrogênio                                        |
| HNO <sub>2</sub>              | Ácido Nitroso                                                 |
| KHZ                           | Mil Kilohertz                                                 |
| ML                            | Mililitro                                                     |
| MTT                           | 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di-Fenil Brometo de Tetrazolina |
| NACL                          | Cloreto De Sódio                                              |
| N <sub>2</sub>                | Nitrogênio                                                    |
| NO                            | Óxido Nítrico                                                 |
| NO <sup>2-</sup>              | Nitrito                                                       |
| NO <sup>3-</sup>              | Nitrato                                                       |
| NTAP                          | Plasma Atmosférico Não Térmico                                |
| O <sub>3</sub>                | Ozônio                                                        |

|      |                                                         |
|------|---------------------------------------------------------|
| OH   | Emissão de Radical Hidroxila                            |
| PAW  | Água Ativada por Plasma                                 |
| PBS  | Solução Salina Tamponada com Fosfato                    |
| RONs | Espécies Reativas De Oxigênio e Nitrogênio              |
| SD   | Ágar Sabouraud Dextrose                                 |
| SF   | Solução Fisiológica                                     |
| SFA  | Solução Fisiológica Ativada                             |
| SPS  | Picos Associados Às Bandas Do Sistema De Primeira Ordem |
| YNB  | Base Nitrogenada de Levedura sem Aminoácidos            |

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                                       |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                                                                             | <b>17</b> |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                                                                                                                                                   | <b>22</b> |
| <b>2.1 Microbiologia endodôntica .....</b>                                                                                                                                            | <b>22</b> |
| <b>2.1.1 Irrigantes endodônticos convencionais .....</b>                                                                                                                              | <b>24</b> |
| <b>2.1.2 Vantagens da utilização do plasma na endodontia .....</b>                                                                                                                    | <b>24</b> |
| <b>3 PROPOSIÇÃO .....</b>                                                                                                                                                             | <b>27</b> |
| <b>3.1 Objetivo Geral .....</b>                                                                                                                                                       | <b>27</b> |
| <b>3.2 Objetivos Específicos .....</b>                                                                                                                                                | <b>27</b> |
| <b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                                                                                                                      | <b>28</b> |
| <b>4.1 Condições de obtenção e de padronização do líquido ativado por plasma</b>                                                                                                      | <b>28</b> |
| <b>4.1.1 Avaliação da atividade antibiofilme dos líquidos ativados.....</b>                                                                                                           | <b>32</b> |
| <b>4.1.2 Avaliação da citotoxicidade do líquido ativado por plasma .....</b>                                                                                                          | <b>33</b> |
| <b>4.1.3 Efeito da irrigação dos canais radiculares com água ativada com plasma sobre biofilmes dual espécies de <i>E. faecalis</i> e <i>C. albicans</i> em modelo <i>ex vivo</i></b> | <b>34</b> |
| <b>4.2 Análise Estatística .....</b>                                                                                                                                                  | <b>36</b> |
| <b>5 RESULTADO .....</b>                                                                                                                                                              | <b>37</b> |
| <b>5.1 Análise espectroscópica do plasma.....</b>                                                                                                                                     | <b>37</b> |
| <b>5.1.1 Identificação dos picos e bandas e efeito do fluxo de gás .....</b>                                                                                                          | <b>38</b> |
| <b>5.1.2 Efeito da interação do plasma com as águas: destilada, mineral e solução fisiológica.....</b>                                                                                | <b>39</b> |
| <b>5.1.3 Solução fisiológica .....</b>                                                                                                                                                | <b>41</b> |
| <b>5.2 Água destilada .....</b>                                                                                                                                                       | <b>41</b> |
| <b>5.2.1 Água mineral.....</b>                                                                                                                                                        | <b>42</b> |
| <b>5.2.2 Análise de Espectroscopia UV-Vis: Efeito da Interação do Plasma com os Líquidos: Solução fisiológica, água destilada e água mineral .....</b>                                | <b>43</b> |
| <b>5.2.3 Parâmetros Físico-Químicos das Líquidos ativados com Plasma.....</b>                                                                                                         | <b>46</b> |
| <b>5.3 Efeito da água ativada sobre os biofilmes microbianos – Testes <i>in vitro</i> .....</b>                                                                                       | <b>49</b> |
| <b>5.3.1 Efeito da água ativada sobre biofilmes de <i>Candida albicans</i> .....</b>                                                                                                  | <b>49</b> |
| <b>5.3.2 Efeito da água ativada sobre biofilmes de <i>Enterococcus faecalis</i>.....</b>                                                                                              | <b>51</b> |

|                                                                                                                                                                                       |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>5.3.3 Efeito da água ativada sobre biofilmes dual espécies de <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Candida albicans</i> .....</b>                                                     | <b>53</b> |
| <b>5.3.3.1 Avaliação da citotoxicidade da água ativada por plasma .....</b>                                                                                                           | <b>55</b> |
| <b>5.3.3.2 Efeito da irrigação dos canais radiculares com água ativada com plasma sobre biofilmes dual espécies de <i>E. faecalis</i> e <i>C. albicans</i> – Ensaio ex vivo .....</b> | <b>56</b> |
| <b>6 DISCUSSÃO .....</b>                                                                                                                                                              | <b>58</b> |
| <b>7 CONCLUSÃO .....</b>                                                                                                                                                              | <b>65</b> |
| <b>REFERÊNCIA .....</b>                                                                                                                                                               | <b>66</b> |
| <b>ANEXO .....</b>                                                                                                                                                                    | <b>76</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

No tratamento endodôntico, que engloba desde a abertura do dente até sua restauração, incluindo a remoção da polpa dentária, modelagem e desinfecção dos canais radiculares, a integridade da estrutura tratada não pode ser prejudicada, sendo estes fatores fundamentais para a sobrevivência dentária após o tratamento realizado (Gherardi, Tonini, Colombo, 2018; Fransson, Dawson, 2023). O sucesso do tratamento endodôntico depende do controle da infecção no sistema de canais radiculares, além da prevenção de uma possível reinfecção, já que a presença de micro-organismos patogênicos é considerada a principal responsável pelas doenças endodônticas, desde intrarradicular podendo até causar infecções extrarradicular (Paula et al., 2013; Prada et al., 2019). Nesse sentido, o insucesso é atribuído, em grande parte, à persistência de micro-organismos no interior dos canais radiculares.

Por um lado, a desinfecção total do complexo pulpo-dentário é um processo crítico e, por outro, é um desafio clínico contínuo, pois os métodos tradicionais não garantem a completa desinfecção, considerando a complexidade do sistema de canais radiculares (Habib et al., 2014). A microbiota presente nos sistemas de canais radiculares é estruturada e complexa que apresenta irregularidades e variações anatômicas nos canais radiculares, juntamente com a natureza do biofilme, representam um desafio significativo para alcance de uma desinfecção eficiente durante o tratamento endodôntico (Cavalcante et al., 2023).

Além disso, há que se considerar que as infecções endodônticas que são mediadas por biofilmes, os quais são estruturas muito organizadas e complexas, torna o tratamento ainda mais desafiador quando comparados com infecções que não apresentam esta conformação (Neelakantan et al. 2017; Siqueira, Rôcas, 2022). Além da estrutura que apresentam, a natureza multiespécies dos biofilmes e a complexidade e variedade do sistema de canal radicular fazem com que a desinfecção no tratamento endodôntico seja desafiadora (Neelakantan et al., 2017). Na prática, a identificação intracanal da composição exata do biofilme e do papel de cada espécie nos biofilmes específicos é muito difícil e poucas técnicas são capazes de fazê-lo (Neelakantan et al., 2017). *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* têm sido frequentemente isolados de casos de insucessos terapêuticos em endodontia

(Narayanan, Vaishnavi, 2010; Cavalcante et al., 2023). Ambas as espécies têm habilidade de formar biofilmes e mostram resistência aos tratamentos endodônticos convencionais (Duggan, Sedgley, 2007; Ran et al., 2015; Dubey et al., 2017; Godoi-Jr et al., 2023).

Pesquisas têm demonstrado que a presença de bactérias remanescentes após tratamento com as estratégias padrão de desinfecção intracanal pode variar entre 40% e 60% (Habib et al., 2014; Nouroloyouni et al., 2023), o que tem impacto sobre a ocorrência de sintomatologia dolorosa (Neelakantan et al., 2017).

Resultados de estudos clínicos apontaram 10% de falhas em tratamentos implementados por meio dessas estratégias tradicionais de desinfecção (Lu et al., 2009). A desinfecção dos canais radiculares, de modo geral, implica o uso de métodos como limpeza mecânica, irrigação, utilização de ultrassom, irradiação a laser e aplicação de compostos antibacterianos distintos (Lu et al., 2009; Neelakantan et al., 2017). Procedimentos de irrigação e medicação intracanal, podem ser feitos com diversas substâncias, como o gel de digluconato de clorexidina e hidróxido de cálcio. Porém, essas substâncias não são eficazes, de forma similar, frente a todos os micro-organismos. O hidróxido de cálcio não apresenta boa efetividade frente a *Enterococcus faecalis* e a algumas cepas de *Candida albicans* (Armand et al., 2019). Algumas substâncias também apresentam limitações, tais como desconforto, decorrente da toxicidade da substância (Armand et al., 2019). Além disso, há relatos de que produtos químicos usados como irrigadores na endodontia podem promover alterações na composição da dentina por ser substrato dinâmico e sujeito a continuados processos fisiológicos e patológicos em sua estrutura e composição (Pascon et al., 2012). Essas alterações são clinicamente relevantes para o sucesso do tratamento endodôntico no médio e longo prazo, pois podem influenciar a aderência dos materiais obturadores à dentina (Pascon et al., 2012).

A resistência aos antibióticos também tem atraído atenção com o desenvolvimento de técnicas de manejo antimicrobiano e de pesquisas voltadas para terapias alternativas de combate microbiano. Porém, a resistência aos antissépticos tem sido menos estudada. Vários patógenos tornam-se resistentes aos agentes convencionais de desinfecção e assepsia, como é o caso de compostos químicos, como os de amônio, cloro e outros utilizados pela área biomédica (Tsoukou et al., 2020). Tendo em vista as limitações dos métodos de desinfecção dos sistemas de

canais radiculares atualmente utilizados, a busca por novas tecnologias eficazes e seguras é necessária (Tsoukou et al., 2020).

Os irrigantes endodônticos convencionais são usados para desinfetar os canais radiculares durante o tratamento endodôntico. Embora sejam eficazes na eliminação de micro-organismos, esses agentes podem ter efeitos citotóxicos, ou seja, podem ser tóxicos para as células humanas (Sismanoglu et al., 2022). Entre as soluções irrigantes mais utilizadas na clínica endodôntica estão o hipoclorito de sódio (NaOCl) que está entre os mais empregados devido sua forte ação antimicrobiana e capacidade de dissolver matéria orgânica, mas este é o que apresenta maior citotoxicidade podendo causar danos aos tecidos periapicais caso haja extravasamento do material do canal radicular (Karkehabadi et al., 2018; Vouzara et al., 2016).

Nos últimos anos, plasmas frios atmosféricos têm se mostrado úteis para várias finalidades nas áreas médicas, inclusive na assepsia e desinfecção (Habib et al., 2014; Von Woedtke et al., 2020; Sampaio et al., 2022). O plasma é constituído de variadas espécies atômicas, moleculares, iônicas e radicais excitadas que coexistem com espécies reativas, como elétrons, íons positivos e negativos, radicais livres, gases, átomos e moléculas no estado fundamental ou excitado e radiação eletromagnética (Fridman, 2008; Bourke et al., 2017; Kerlikowski et al., 2020).

O plasma é referido como um dos estados da matéria e o plasma frio ou não-térmico é aquele formado em temperatura ambiente ou próximo a esta (Heimann et al., 2023; Zhao et al., 2023). Os gases frequentemente usados para produzir o plasma frio são: hélio, argônio, nitrogênio, ar ambiente ou a mistura deles (Kerlikowski et al., 2020). A tecnologia do plasma frio atmosférico passou a ter importância em decorrência de sua eficácia antimicrobiana, tendo sido aplicado, inicialmente, na desinfecção de dispositivos médicos e de produtos alimentares (Zhao et al., 2023).

A tecnologia dos plasmas frios evoluiu rapidamente como meio para a inativação microbiana e de outros tratamentos, resultantes da presença de radicais químicos e bioativos gerados, em sua maioria espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (Bourke et al., 2017). Há relatos do efeito inibitório do plasma frio sobre bactérias, fungos e vírus (Lu et al., 2009; Von Woedtke et al., 2020). Além do efeito antimicrobiano, o efeito anti-inflamatório, estimulador de reparo tecidual e no controle de células neoplásicas também foi relatado (Lima et al., 2021; Von Woedtke et al., 2020).

Na odontologia, pesquisas apontam para potencial aplicação do plasma frio no tratamento de diversas doenças infecciosas bucais (Habib et al., 2014; Tanaka et al., 2016; Borges et al., 2017; Doria et al., 2018). O plasma de pressão atmosférica não térmico pode ser utilizado de forma direta e indireta sobre alvos biológicos. O tratamento direto se refere à aplicação clínica do jato de plasma diretamente na área de interesse e o indireto, ao uso do plasma por meio de líquidos ativados por plasma (Tanaka et al., 2016). O uso indireto é decorrente da exposição prévia do líquido ao plasma e tem ampliado bastante o potencial de aplicações dessa tecnologia na medicina e na odontologia (Jha et al., 2017; Sakudo; Yagyu; Onodera, 2019; Kerlikowski et al., 2020). Investigações sobre a aplicação de líquidos ativados com plasma na área biomédica têm sido desenvolvidas com grande intensidade no mundo (Li et al., 2017; Subramanian et al., 2020; Xu et al., 2020; Muntaz et al., 2023).

Várias fontes de plasma são usadas para ativar a água, desde a corrente contínua, as descargas de baixa frequência, de radiofrequência, de barreira dielétrica e de micro-ondas, coronas pulsadas, jatos de plasma de pressão atmosférica e descarga de micro-ondas (Shen et al., 2016). As partículas criadas por ele entram em interação com as moléculas de água e desencadeiam reações químicas diversas. Tais reações promovem uma mistura única de reações bioquímicas e químicas que geram um produto denominado líquido ativado por plasma. Em decorrência das espécies reativas, o efeito antimicrobiano frente a várias espécies microbianas foi detectado e, em consequência, os líquidos ativados por plasma vêm ganhando atenção para a desinfecção e assepsia (Shen et al., 2016).

Suspensões de *Escherichia coli* foram expostas à água ativada por plasma durante 15 minutos ou 3 horas, em um período de 7 dias após sua obtenção eles utilizaram uma descarga de barreira dielétrica (DBD - Dielectric Barrier Discharge) para gerar o plasma. Nos dois tempos de exposição, a atividade antibacteriana inicial produzida na área correspondeu à redução de ~ 5 log na viabilidade celular. Observou-se redução gradual para 2,4 log ao longo dos 7 dias. A composição da solução variou significativamente, com redução nos níveis de peróxido de hidrogênio e nitrito em alguns dias. Nesses dias, houve redução da eficácia antibacteriana de exposições de 15 minutos, enquanto a exposição por 3 horas levou à redução de 5 logs ou mais. Esses resultados mostram a complexidade das soluções de água

ativada por plasma, pois componentes químicos distintos têm efeitos biológicos que variam em escalas diferentes de tempo (Traylor et al., 2011).

Tsoukou e Bourke (2020) também observaram redução de até 5-log após contato de *S. aureus* e *E. coli* com líquido ativado com plasma. Verificaram que após o congelamento a -20°C, o líquido ativado manteve o efeito antimicrobiano por até 15 dias. No líquido ativado armazenado a -80°C, o efeito desse manteve até 18 meses. Efeito antibiofilme sobre *Staphylococcus aureus* da água ativada por plasma foram investigados *in vitro*, com avaliação da viabilidade bacteriana, da capacidade metabólica, da integridade da membrana e da concentração de espécies. Os resultados mostraram que a aplicação da água ativada por 60 minutos teve efeito antibiofilme, reduzindo cerca de  $4,74 \pm 0,26 \log_{10}\text{-CFU / ml}$  (Xu et al., 2020).

Estudo sobre o efeito inibitório e os mecanismos de espécies reativas de oxigênio de dose ultrabaixa produzida por água ativada por plasma sobre *E. faecalis* em estado planctônico demonstraram que a água ativada por plasma teve efeito inibitório sobre esse micro-organismo, com redução na expressão de genes de virulência (Li et al., 2018). Um efeito inibitório de líquido ativado com plasma gerado a partir de ar atmosférico sobre suspensão de *C. albicans* foi relatado (Laurita et al., 2015).

Estudos preliminares sobre o efeito do líquido ativado com plasma sobre células planctônicas de *E. faecalis* (Li et al., 2018) e *C. albicans* (Laurita et al., 2015) mostraram sua atividade inibitória, ambos utilizaram DBD para a ativação, sendo os resultados promissores. Mesmo doses baixas foram capazes de regular os fatores de virulência para *E. faecalis*. Para *C. albicans* mesmo utilizando DBD em nanosegundos, observou-se inativação fúngica. Este estudo visa analisar diferentes líquidos ativados com plasma frio para avaliar a eficácia da ação antibiofilme em microrganismos associados a insucessos endodônticos, especificamente *E. faecalis* e *C. albicans*. As análises serão conduzidas de forma isolada para cada espécie e em condições de co-cultura, envolvendo ambas as espécies. Os biofilmes serão examinados tanto *in vitro* quanto *ex vivo*. Além disso, os líquidos testados também serão avaliados quanto à citotoxicidade em células 3T3. Este enfoque abrangente permitirá uma compreensão detalhada da eficácia dos tratamentos propostos, contribuindo para o avanço nas técnicas de combate a infecções endodônticas ainda não esclarecidas na literatura científica.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

A utilização de plasmas não-térmicos nas ciências biomédicas tem surgido como uma alternativa promissora em diversas áreas. Suas propriedades, principalmente relacionadas à geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio permitem a inibição microbiana, tornando o uso dessa tecnologia vantajosa para a esterilização de implantes e instrumentos médicos e odontológicos. Além das propriedades antimicrobianas, a utilização do plasma não-térmico tem demonstrado efeitos anti-inflamatórios, favorecendo a reparação tecidual (Mirpour et al., 2020). Diferentes trabalhos focados no tratamento do câncer também investigaram como uma ferramenta promissora para atuar como terapia adjuvante. Além disso, propriedades antifúngicas, antibacterianas, antiparasitárias e antivirais foram descritas recentemente na literatura (Rezaeinezhad et al., 2023; Rovetta-Nogueira et al., 2023; Milhan et al., 2022; Lima et al., 2021; Leite et al., 2021; Borges et al., 2019)

Tecido, células ou diversos materiais podem ser expostos ao plasma atmosférico não-térmico de duas maneiras diferentes: direta, quando é aplicado em um determinado substrato diretamente ou indireta, quando um líquido é ativado por plasma antes de sua aplicação no substrato. Ambos os métodos, diretos e indiretos, têm mostrado boas perspectivas em odontologia (Fridman et al., 2007).

### **2.1 Microbiologia endodôntica**

A principal causa relacionada ao insucesso endodôntico é a presença de micro-organismos que levam a infecções intra e extra-radiculares e tornam-se resistentes aos protocolos de desinfecção disponíveis atualmente. Embora fungos e vírus contribuam para a diversidade microbiana nas infecções endodônticas, as bactérias são os micro-organismos mais comuns presentes nessas infecções. Sua diversidade varia significativamente de acordo com o tipo de infecção. Além disso, diferentes níveis de penetração no espaço de invasão endodôntica podem ser observados em diferentes condições, como lesões de cárie, exposição pulpar traumática e fraturas (Siqueira et al., 2007).

As bactérias frequentemente associadas à infecção endodôntica persistente após o tratamento são Gram-positivas. Há uma distribuição igual de micro-organismos anaeróbios facultativos e obrigatórios, com prevalência de bactérias do gênero estreptococos e enterococos (Dioguardi et al., 2019). A espécie mais comumente envolvida na reinfecção apical é *Enterococcus faecalis*, que é responsável por 80% das infecções endodônticas em humanos. Sua patogenicidade pode ser atribuída à sua alta capacidade de sobrevivência dentro dos túbulos dentinários. Sua resistência deve-se a características como a capacidade da espécie em formar biofilmes e a capacidade de suportar pH elevado (Saleewong et al., 2018). Este patógeno tende a se destacar quando em uma microbiota multiespécie estável, tornando-se a espécie dominante (Dioguardi et al., 2019).

*Candida albicans* é a espécie mais frequentemente relacionada à reinfecção endodôntica. Esta levedura está presente em baixa proporção na infecção endodôntica (em torno de 10%). No entanto, *C. albicans*, apresenta baixa suscetibilidade aos desinfetantes intracanaais comumente usados, podendo sobreviver no interior dos túbulos dentinários devido à capacidade de formar biofilmes, podendo levar à reinfecção (Yoo et al., 2020).

Durante décadas, os microbiologistas pesquisaram o papel das bactérias na etiopatogenia da infecção endodôntica. No entanto, atualmente, a pesquisa neste campo demonstrou um interesse emergente em micro-organismos de outros reinos como vírus e fungos. No reino Fungi, as espécies de *C. albicans* são as mais frequentemente relacionadas à reinfecção endodôntica. Sua patogenicidade envolve a polpa dentária e as células do tecido perirradicular, principalmente em pacientes imunocomprometidos (Yoo et al., 2020).

*E. faecalis* tem se apresentado como o micro-organismo mais resistente, enquanto *E. coli* tem sido mais suscetível ao tratamento com plasma frio (Ying Long et al., 2015; Armand et al., 2019). *Streptococcus* e *Staphylococcus* spp. mostraram suscetibilidade intermediária. O plasma atmosférico não-térmico pode ser eficiente em biofilmes recém-formados e em maduras de *E. faecalis*. A vulnerabilidade pode ser atribuída a diferentes composições da parede celular. As bactérias Gram-positivas possuem uma camada de peptidoglicanos mais espessa em sua parede celular quando comparadas às bactérias Gram-negativas, o que pode atuar como uma proteção contra a ação do plasma (Armand et al., 2019).

### 2.1.1 Irrigantes endodônticos convencionais

A terapia endodôntica visa reduzir a carga microbiana, removendo o material necrótico e, principalmente, desinfetando o canal através do preparo químico mecânico e desinfecção com irrigantes e posterior medicação e obturação intracanal (Neelakantan et al., 2017). As soluções de desinfecção convencionais, como hipoclorito de sódio ou clorexidina e quelantes apresentam excelente desempenho durante a desinfecção (Simoncelli et al, 2015). Ademais, o hipoclorito de sódio é altamente tóxico e pode levar a um processo inflamatório nos tecidos vitais, levando à necrose tecidual devido ao alto potencial oxidativo do hipoclorito de sódio (Simoncelli et al, 2015).

Estudos recentes demonstram que altas concentrações de hipoclorito de sódio podem causar desintegração da parte orgânica da dentina, resultando em uma redução da microdureza e resistência do tecido dentinário (Ledernéz et al., 2019).

Embora altamente eficazes, as soluções de hidróxido de cálcio têm capacidade de penetração limitada na parte apical e nos túbulos dentinários, principalmente em dentes bi ou multirradiculares com anatomia intrarradicular mais complexa (Habib et al., 2014).

O plasma atmosférico não-térmico é atraente porque combina a eficiência do tratamento convencional com segurança apresentada por essa tecnologia. Diferentes fontes de geração podem estar relacionadas e demonstraram ser heterogêneas, principalmente devido às diferenças entre os parâmetros utilizados. Esses parâmetros incluem tempo de exposição, gás de trabalho e características da fonte de alimentação (Armand et al., 2019).

### 2.1.2 Vantagens da utilização do plasma na endodontia

As bactérias frequentemente associadas à infecção endodôntica persistente após o tratamento são geralmente Gram-positivas. Nesse sentido, uma técnica inovadora de plasma atmosférico não-térmico direto ou indireto pode representar uma alternativa ao tratamento convencional. Estudos relatam a eficácia do jato de plasma

contra biofilmes no interior do canal radicular, o que sugere que essa tecnologia pode ser útil como adjuvante nas terapias convencionais de desinfecção, buscando diminuir as limitações discutidas anteriormente. Uma das vantagens do plasma é sua capacidade de atingir micro-organismos alojados em nichos estreitos, além da baixa toxicidade às células eucarióticas (Ledernez et al., 2019).

Poucos estudos *in vitro* foram realizados com plasma na área endodôntica, mas também mostraram achados promissores com boas perspectivas para serem utilizados na área. Uma possível vantagem do uso dessa tecnologia é que o efeito antimicrobiano pode ser mantido por mais de um mês após sua geração, quando o líquido é armazenado em baixas temperaturas (Tsoukou et al., 2016). Dessa forma, os dentistas não necessitariam de adquirir o equipamento gerador de plasma para a clínica, o que pode ser uma limitação do uso do plasma em consultórios odontológicos. Além disso, a forma líquida poderia ser uma solução para a complexidade da anatomia do canal radicular, que também pode ser apontada como uma limitação da aplicação direta do plasma atmosférico-não térmico (Shen et al., 2016).

De acordo com Bessa et al. (2023), as vantagens do uso do plasma atmosférico não térmico (NTAP) na endodontia são várias, as quais incluem propriedades antimicrobianas, pois este é eficaz contra uma ampla gama de patógenos, capacidade de penetrar em áreas de difícil acesso dentro do sistema de canais radiculares, como túbulos dentinários, ramificações e áreas de istmo, que muitas vezes não são alcançadas por irrigantes e medicações intracanaís tradicionais, também demonstra eficácia na remoção de biofilmes microbianos, que são estruturas complexas e protegidas formadas por microrganismos, aumentando a efetividade do tratamento endodôntico, além de propriedades anti-inflamatórias, o que pode ajudar na redução da inflamação e na promoção da cicatrização de tecidos periapicais após o tratamento endodôntico, também é um tratamento que é seguro e tem boa compatibilidade biológica, causando mínima citotoxicidade às células humanas, isso é crucial para a segurança e eficácia dos tratamentos endodônticos. O plasma também pode ser usado em várias fases e momentos do tratamento endodôntico, incluindo durante a desinfecção inicial, entre sessões de tratamento e como um complemento à obturação final dos canais radiculares. Essas vantagens destacam o potencial do plasma atmosférico não térmico como uma ferramenta inovadora e eficaz na endodontia,

proporcionando melhor resultados no controle de infecções e na promoção da saúde oral.

### 3 PROPOSIÇÃO

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar a aplicabilidade do líquido ativado com plasma como irrigante endodôntico, visando a atividade antibiofilme sobre espécies microbianas relacionadas ao insucesso do tratamento endodôntico de dentes permanentes.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- a) Caracterizar *in vitro* as condições de obtenção do líquido ativado com plasma com efeito antimicrobiano;
- b) Analisar ação antimicrobiana de três líquidos ativados com plasma, verificando a ação antibiofilme mono e multiespécies, formados por *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*;
- c) Analisar a citotoxicidade do líquido ativado com plasma com efetividade antimicrobiana comprovada;
- d) Analisar o efeito da irrigação nos canais radiculares com plasma sobre biofilmes dual espécies compostos por *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* em modelo *ex vivo*.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

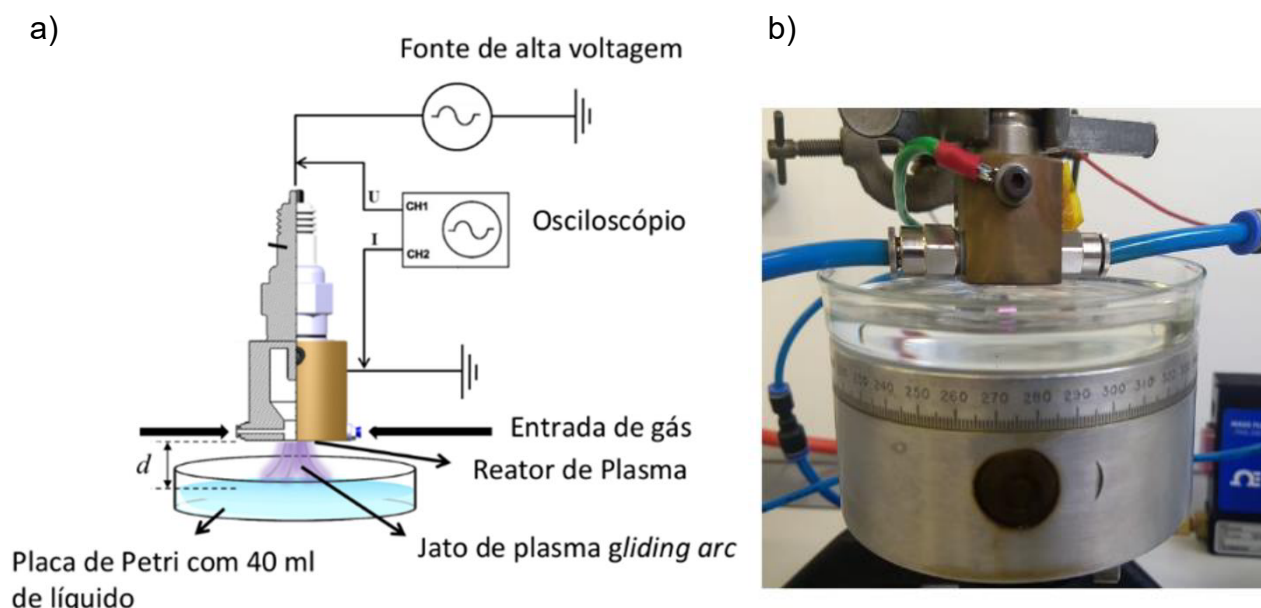
O protocolo do estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, sob protocolo número 5.179.994.

### **4.1 Condições de obtenção e de padronização do líquido ativado por plasma**

Os líquidos ativados por plasma foram avaliados em suas propriedades químico-físicas, concentrações de nitrito, nitrato e de peróxido de hidrogênio, além da condutividade elétrica.

A configuração experimental consiste em um reator de plasma, uma fonte de alimentação de alta tensão, um osciloscópio e um suporte de substrato (Figura 1). Um jato de plasma de arco deslizante é gerado em uma configuração Forward Vortex Flow Reactor e sua região externa compreende a pluma de plasma e as áreas pós-descarga. No presente estudo, o gás empregado é o ar comprimido, produzido por um compressor de ar (Schulz CSD 9/50, Joinville, SC, Brasil) com vazão de 5 L min<sup>-1</sup>. Este fluxo de ar foi selecionado para facilitar a formação de uma descarga de arco deslizante contínua com o menor fluxo possível, como demonstrado por Doria et al., (2015). O sistema é alimentado por uma fonte de alimentação de alta tensão (modelo Arternis 0215, Inergiae, Florianópolis, SC, Brasil), operando na frequência de 20 kHz.

Figura 1 – Ilustração esquemática da montagem experimental para ativar os líquidos.



Legenda: (a) Ilustração esquemática da montagem experimental (b) reator de arco deslizante utilizado para ativar os líquidos. Fonte: Pessoa, R.S. (2024).

As formas de onda de tensão e corrente da descarga GAPJ foram adquiridas utilizando uma sonda de alta tensão (Tektronix P6015A, Tektronix, Beaverton, OR, EUA) e uma sonda de corrente autoajustável (Agilent N2869B, Agilent, Santa Clara, CA, EUA). Os sinais elétricos foram capturados por um osciloscópio digital (Keysight DSOX1202A, Keysight, Santa Rosa, CA, EUA), com o sinal de corrente sendo diretamente inferido do eletrodo aterrado. A equação (1) e a Fig. 3c foram utilizadas para calcular a potência dissipada no plasma.

$$P_{dissip}(W) = \frac{1}{T_2 - T_1} \int_{T_1}^{T_2} V(t)I(t)dt \quad (1)$$

Onde,  $V(t)$  é a tensão,  $I(t)$  é a corrente elétrica e  $T_2 - T_1$  é o intervalo de tempo.

Os líquidos ativados por plasma (PAW) foram caracterizados por meio de um espectrofotômetro UV-Vis (Evolution 201/220, Thermo Fisher Scientific) foi empregado para detectar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS) na PAW. Este equipamento permite medir a absorbância óptica na faixa UV-Vis (190–900 nm)

com alta precisão instrumental (0,001) e uma resolução espectral de 0,2 nm. A velocidade de varredura foi configurada em 120 nm/min. As amostras foram colocadas em cubetas quadradas de quartzo de 3,5 mL, que têm um caminho óptico padrão de 10 mm e dois lados polidos. Para obter a curva de fundo, uma cubeta de quartzo vazia foi utilizada. A linha de base foi estabelecida utilizando uma cubeta de quartzo contendo 3,5 mL de água deionizada (pH = 6,7). Para preparação das amostras a obtenção da linha de base com a água deionizada, as cubetas foram limpas e alíquotas de PAW foram adicionadas. As amostras de PAW tinham diferentes pHs: 2,7, 3,1 ou 3,5. Para análise foram usados os espectros de absorção UV-Vis relativos de cada PAW foram adquiridos. O objetivo era identificar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio de longa duração, como peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e ozônio ( $\text{O}_3$ ). Para isso, foram utilizadas curvas de deconvolução, que são curvas ajustadas para separar e identificar os picos correspondentes a cada RONS. No processo de deconvolução, as funções gaussianas foram aplicadas nas curvas de deconvolução para obter melhores ajustes, representando os picos de cada espécie de RONS. A soma de todas as funções gaussianas que representam os respectivos RONS deve resultar em uma curva envelope que se ajuste aos dados experimentais obtidos. Essas condições e procedimentos foram empregados para caracterizar e analisar as propriedades da PAW, especialmente focando nas espécies reativas presentes e sua distribuição espectral na faixa UV-Vis.

Foram realizados testes para identificação do líquido ativado com maior atividade antibiofilme e menor toxicidade. Para tanto, foram avaliados diferentes líquidos: água mineral, solução fisiológica e água destilada.

Os grupos de biofilmes nos testes in vitro foram os líquidos ativados: 1) Água Destilada Ativada; 2) Solução Fisiológica Ativada; 3) Água Mineral Ativada. Os grupos controles com líquidos não ativados foram: 1) Água Destilada não ativada; 2) Solução Fisiológica Não Ativada; 3) Água Mineral não ativada; O grupo controle negativo foi solução fisiológica.

Neste estudo, utilizamos a técnica desenvolvida por Liu et al. [61] para determinar as concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{HNO}_2$  (Tabela 1). Esta abordagem é empregada para minimizar erros significativos na concentração calculada de RONS, já que as linhas de absorção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_2^-$  se sobrepõem entre 190 e 230 nm,

como pode ser observado nas deconvoluções apresentadas na Fig. 4 [Liu]. Os espectros UV-Vis representados na Fig. 4 foram utilizados para esta análise. Utilizando a equação (1), a matriz (2) foi estabelecida e, em seguida, resolvida simultaneamente para obter as concentrações de  $H_2O_2$ ,  $NO_3^-$  e  $NO_2^-$  em mg/L.

$$A_\lambda = \alpha[NO_3^-] + \beta[NO_2^-] + \varepsilon[H_2O_2] \quad (1)$$

$$\begin{pmatrix} [NO_3^-] \\ [NO_2^-] \\ [H_2O_2] \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \alpha(\lambda_1) & \beta(\lambda_1) & \varepsilon(\lambda_1) \\ \alpha(\lambda_2) & \beta(\lambda_2) & \varepsilon(\lambda_2) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A_{\lambda 1} \\ A_{\lambda 2} \end{pmatrix} / l \quad (2)$$

Onde  $\alpha, \beta$  e  $\varepsilon$  são os coeficientes de absorptividade molar e  $l$  é o comprimento do caminho ótico.

A solução simultânea foi realizada para os comprimentos de onda especificados em 230 nm, 235 nm e 250 nm. Utilizando a equação (3), a concentração de ácido nitroso ( $HNO_2$ ) foi determinada, pois, conforme afirmado por Tachibana et al. (2020) a composição de ácido nitroso ( $HNO_2$ ) e seu íon ( $NO_2^-$ ) depende do nível de pH da solução, sendo a constante de acidez do  $HNO_2$   $pK_a=3,38$  à temperatura ambiente.

$$[HNO_2] = \frac{[NO_2^-]}{10^{pH-pK_a}} \quad (3)$$

Os espectros UV-Vis na região entre 190 a 280nm. As curvas de deconvolução utilizadas para identificar RONS de longa duração, especificamente peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ácido nitroso ( $HNO_2$ ), nitrito ( $NO_2^-$ ), nitrato ( $NO_3^-$ ) e ozônio ( $O_3$ ), também estão ilustradas. Funções gaussianas foram empregadas para obter melhores ajustes nas curvas de deconvolução que representam os RONS. Todas as curvas exibem uma linha de base e um envelope. O objetivo principal é localizar os picos dos RONS usando funções gaussianas, e, por fim, a soma de todas as funções gaussianas que representam os respectivos RONS deve gerar uma curva envelope que se ajuste aos dados experimentais.

#### 4.1.1 Avaliação da atividade antibiofilme dos líquidos ativados

O efeito inibitório de líquidos ativados por plasma frio, obtidos em várias condições diferentes, foram avaliadas frente a biofilmes formados por *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*.

Os biofilmes de *C. albicans* foram obtidos de acordo com metodologia descrita por Silva et al. (2008). A cepa de *C. albicans* (ATCC 18804) foi cultivada por 24h a 37°C em ágar Sabouraud dextrose (SD). As suspensões contendo  $10^7$  células/mL em solução fisiológica esterilizada (NaCl 0,9%) foram padronizadas com auxílio de um espectrofotômetro, utilizando-se o comprimento de onda de 530 nm e densidade óptica (DO) de 0,381. Alíquotas de 250 µL das suspensões foram distribuídas nos poços de placas de 96 poços, as quais foram incubadas sob agitação (75 rpm) as 37°C por 1,5 horas. Após o referido período, os poços foram lavados com 250 µL de PBS e foi adicionado 250 µL de caldo yeast nitrogen base (YNB) enriquecido com 100 mM de glicose. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Para *E. faecalis* (ATCC 29212), foi utilizada a metodologia descrita por Li et al. (2015), com modificações. As suspensões foram padronizadas por espectrofotometria em solução fisiológica esterilizada (NaCl 0,9%) utilizando-se o comprimento de onda de 760nm por densidade óptica (DO). Os biofilmes foram formados em placas de 96 poços utilizando-se caldo triptico de soja. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Os biofilmes foram expostos ao líquido ativado por plasma por 1 minuto ou 1,5 minutos. Para a obtenção dos biofilmes dual espécies, volumes iguais das suspensões padronizadas dos microrganismos foram simultaneamente inseridos nos poços de placas de 96 poços com caldo triptico de soja, seguindo a incubação de 24 horas a 37 °C. Após, os biofilmes formados foram lavados 3 vezes com solução fisiológica esterilizada. Os biofilmes foram expostos ao líquido ativado por plasma em dois tempos, por 1 minuto ou 1,5 minutos.

Após o tratamento, os biofilmes foram submetidos à sonicação por 30 segundos e ressuspensos em solução fisiológica. As suspensões finais foram semeadas em meios de cultura seletivos e as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após o

período de incubação, foi realizada a contagem de colônias dos grupos tratamento e controle e calculado o número de unidades formadoras de colônia por biofilme (UFC/biofilme).

#### **4.1.2 Avaliação da citotoxicidade do líquido ativado por plasma**

A viabilidade celular foi realizada de acordo com a ISO 10993-5:2009 (2009). A linha celular utilizada foi de fibroblastos embrionários de camundongos (3T3), que foram cultivadas em meio modificado de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado com 1% de penicilina (100U/mL) / estreptomicina (100 mg/mL) e 10% de soro fetal bovino (FBS). As células foram crescidas a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. A densidade de  $8 \times 10^3$  células/poço foi semeada em placas de 96 poços. Placas de 96 poços foram incubadas por 24h a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> para promover a adesão celular.

Em seguida, as células foram expostas aos líquidos ativados na proporção de 1:1 (líquido/meio de cultura) por 1,5 minutos, que foi o maior tempo de contato durante o ensaio de atividade antimicrobiana.

Os testes foram realizados nos grupos com líquidos ativados por plasma: água destilada ativada (ADA), solução fisiológica ativada (SFA), água mineral ativada (AMA), os líquidos não tratados (controles negativos) foram: água destilada (AD), solução fisiológica (SF), água mineral (AM) e os controles de meio contendo apenas meio de cultura e o controle positivo contendo Hipoclorito de Sódio (1,0%)

Após 1,5 minutos de contato, as suspensões foram removidas. As células foram lavadas com Hanks's Balanced Salt Solution (HBSS), o meio de cultura foi substituído e as placas foram reincubadas a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h.

A viabilidade celular foi avaliada com o teste de citotoxicidade MTT. Após 24 h, 100 µL de 3-Brometo de (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) foi adicionado a cada poço. As placas foram incubadas por 1,5 h. Em seguida, Dimetil Sulfóxido (DMSO) foi adicionado a cada poço e colocados em um shaker por 15 min para dissolver os cristais de formazan. A densidade óptica resultante da solução foi medido a 570 nm em um espectrofotômetro. Os dados de absorbância foram normalizados para o grupo de controle negativo (=100%). Seis repetições foram

realizadas em dois experimentos independentes (n=12). A viabilidade celular final abaixo de 70% foi considerada como citotóxica.

#### **4.1.3 Efeito da irrigação dos canais radiculares com água ativada com plasma sobre biofilmes dual espécies de *E. faecalis* e *C. albicans* em modelo *ex vivo***

A eficácia do líquido ativado por plasma com maior atividade antibiofilme (obtida nos testes *in vitro*) foi avaliado como irrigante intracanal, frente a biofilmes formados por *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* no interior de canais radiculares de dentes humanos.

Para este propósito, foram obtidos 54 dentes humanos unirradiculares para o estudo, extraídos recentemente, sem presença de cáries ou fraturas. A metodologia utilizada foi baseada em Valera et al. (2009) e Valera et al. (2010).

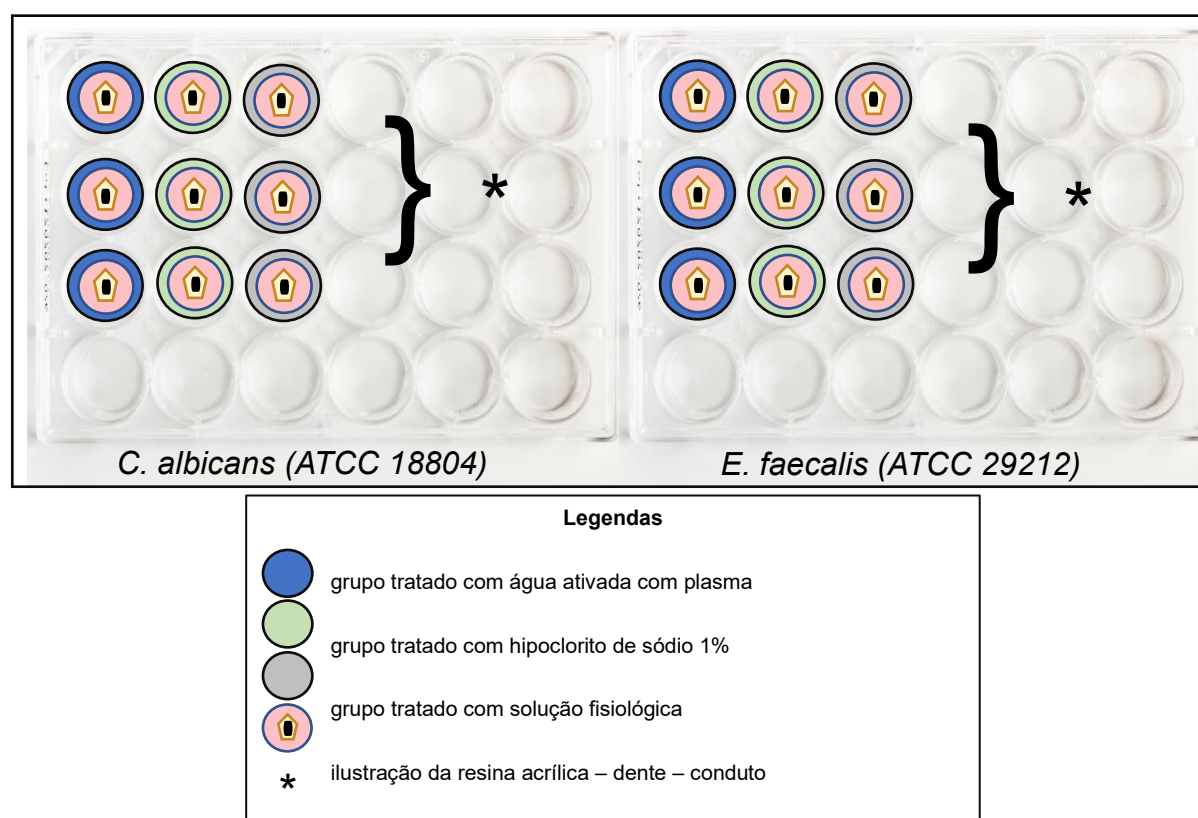
Os dentes foram desinfetados e os tecidos orgânicos foram retirados, raspando-se as superfícies externas das raízes com lâmina de bisturi. A seguir, as coroas foram removidas e o comprimento das raízes foi padronizado, considerando-se a distância do ápice ao bordo cervical. As raízes foram seladas externamente com 2 camadas de adesivo epóxi (Araldite, Brascola, São Paulo, Brasil), exceto a abertura cervical. Os espécimes foram colocados aleatoriamente em placas de cultura celular contendo 24 poços (Costar, New York, NY).

Os canais radiculares foram irrigados de forma contínua com água destilada durante todo o processo. A seguir, todos os dentes foram submetidos a banho ultrassônico por 10 min em EDTA 17% seguido de 10 min em banho de hipoclorito de sódio a 5,25%, a fim de eliminar a *smear layer* produzida no preparo inicial. Após, os dentes foram posicionados na posição vertical nos poços de placas de 24 poços, utilizando resina acrílica para fixá-los. Os conjuntos foram enviados para esterilização por radiação gama (20 KGy por 6 horas).

Suspensões padronizadas contendo  $10^7$  UFC/mL de *E. faecalis* (ATCC 29212) e *C. albicans* (ATCC 18804) foram obtidas com auxílio de espectrofotômetro. A seguir, alíquotas iguais das suspensões dos microrganismos foram transferidas para o interior dos canais radiculares para obtenção dos biofilmes para os testes *ex vivo*.

Os dentes foram divididos aleatoriamente de acordo com os tratamentos: a) água ativada com plasma; b) Hipoclorito de Sódio 1% (controle positivo) e c) solução fisiológica esterilizada (controle negativo). Foram utilizados 9 dentes para cada teste, totalizando n=54. Os testes foram realizados em placas de 24 poços, sendo 3 dentes para cada grupo teste (água ativada, hipoclorito e solução fisiológica), sendo uma placa para cada microrganismo (*C. albicans* e *E. faecalis*). Os testes foram realizados em triplicata, como demonstra o esquema de divisão dos grupos na figura 2.

Figura 2 – Esquema de divisão dos Grupos



Fonte: Elaborada pela Autora

Os dentes foram preparados realizando irrigação com as soluções teste a cada troca de instrumento. O preparo mecânico foi realizado para remover o tecido pulpar e tornar visível a ponta do forame apical e canais radiculares instrumentados em um comprimento padronizado de 16 mm. A instrumentação inicial do canal radicular foi feita em toda sua extensão utilizando limas tipo K (Dentsply Sirona, Ballaigues, Suíça),

sendo a instrumentação realizada na sequência #30, #35 e #40, sempre alternada de irrigação com 3 mL de solução fisiológica após cada instrumento.

No grupo hipoclorito, ao final da instrumentação, os canais radiculares foram lavados com tiosulfato de sódio 0,06% para a neutralização do NaOCl (1x) e a seguir, com solução fisiológica esterilizada. Nos demais grupos foram lavados 3 vezes com solução fisiológica. Os biofilmes remanescentes foram ressuspensos em solução fisiológica com auxílio de limas endodônticas. A suspensão final foi semeada em Ágar Sabouraud Dextrose e Agar Base m-Enterococcus e incubadas a 37°C por 24 horas, em aerobiose. Após o período de incubação, as colônias características foram contadas e obtido o valor de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

#### **4.2 Análise Estatística**

Os dados foram analisados estatisticamente por meio de técnicas descritivas, na forma de médias e desvios-padrão. Os testes apresentaram distribuição normal da amostra, as comparações por isto foram feitas utilizando testes de análise de variância (ANOVA One-way), seguidas do post-hoc de Tukey. As análises foram realizadas no software GraphPad Prism, versão 6.01. Para as conclusões das análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5%.

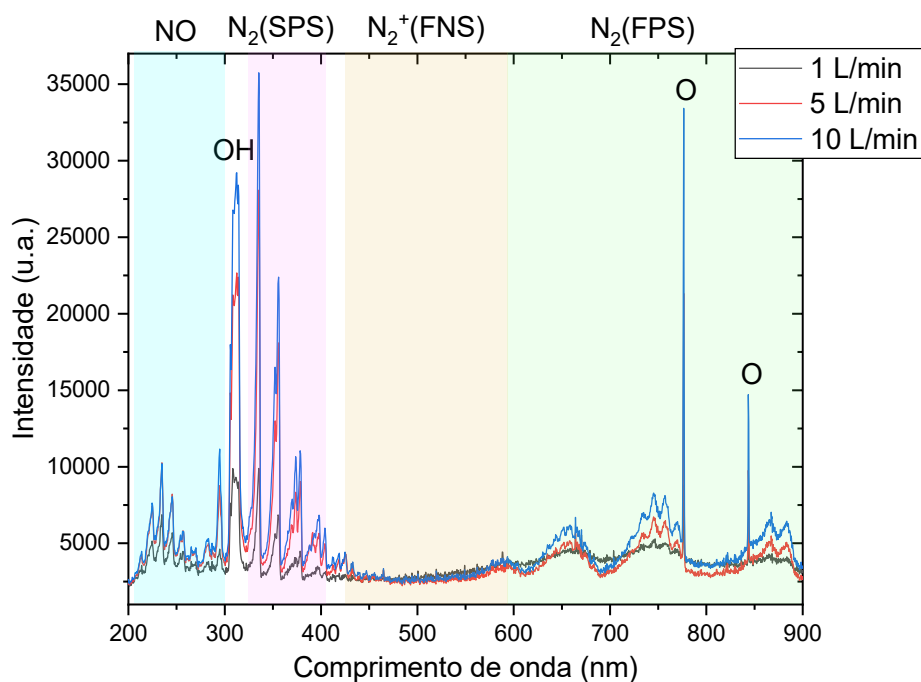
## 5 RESULTADO

### 5.1 Análise espectroscópica do plasma

#### 5.1.1 Identificação dos picos e bandas e efeito do fluxo de gás

O espectro óptico do jato de plasma gerado em um sistema gliding arc utilizando ar comprimido foi analisado para diferentes fluxos de ar: 1, 5 e 10 L/min (Figura 3). Este espectro revela informações sobre as espécies excitadas e ionizadas presentes no plasma, bem como suas respectivas transições eletrônicas.

Figura 3 – Espectro óptico do jato de plasma gerado em um sistema gliding arc com ar comprimido em diferentes fluxos de ar (1, 5 e 10 L/min).



Legenda: NO: óxido nítrico, OH: emissão do radical hidroxila, N<sub>2</sub>: nitrogênio, FNS: sistema de fluxos nitrogenados. FPS: sistema de primeira ordem positivo, SPS: picos associados às bandas do sistema de primeira ordem. Fonte: Elaborado pela Autora.

Na faixa de 200 a 300 nm, os picos observados podem ser majoritariamente atribuídos às emissões do NO (óxido nítrico), especificamente às bandas de emissão  $\beta$  (NO- $\gamma$ ), que correspondem às transições eletrônicas  $B^2\Pi \rightarrow X^2\Pi$ . Essas transições são proeminentes entre 200 e 280 nm, com múltiplos picos significativos nesta faixa devido à alta densidade de NO excitado no plasma. Além das bandas de NO, outras possíveis contribuições podem vir de transições eletrônicas de moléculas diatômicas como  $N_2$  e  $O_2$ , que são componentes principais do ar. Na faixa de 200 a 230 nm, podem aparecer picos associados ao sistema de Werner do  $O_2$  e ao sistema de Schumann-Runge do  $O_2$ , que envolvem transições de estados excitados de oxigênio molecular. Entre 280 e 300 nm, as emissões de NO continuam a dominar, mas também há a possibilidade de contribuições menores das transições do sistema de segunda positiva do  $N_2$  ( $C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$ ), embora estas sejam menos pronunciadas em comparação com as bandas de NO (Zaplotnik, Primic, Vesel, 2021).

Região de 308 a 320 nm (OH): Entre 308 e 320 nm, é comum encontrar bandas de emissão do radical hidroxila (OH), que são importantes indicadores de processos de formação de radicais livres no plasma. A banda de emissão mais proeminente do OH nesta região é a transição  $A^2\Sigma^+ \rightarrow X^2\Pi$  (sistema de primeira positiva de OH), que aparece tipicamente em torno de 308-309 nm. 308-309 nm: Este pico é devido à transição  $A^2\Sigma^+ \rightarrow X^2\Pi$  do OH, que é um importante marcador da presença de radicais hidroxila no plasma (Faze-Chen et al., 2016).

Faixa de 320 a 406 nm: Nesta faixa, podemos observar picos associados às bandas do sistema de primeira ordem do  $N_2$  ( $N_2$  SPS), particularmente as bandas de emissão C-B (segunda positiva), que são caracterizadas por transições vibracionais do nitrogênio molecular (Ji et al., 2015). Estas bandas são importantes para identificar a presença de  $N_2$  excitado no plasma e geralmente aparecem de forma distinta nesta região do espectro.

Faixa de 427 a 590 nm: Os picos nesta faixa podem estar relacionados às transições do  $N_2^+$  (primeiro sistema negativo) e outras transições do  $N_2$  (Qayyum et al., 2005). A presença de  $N_2^+$  indica a ionização significativa do nitrogênio no plasma, resultando em transições eletrônicas características que aparecem claramente no espectro.

A faixa de 590 a 800 nm inclui emissões das bandas de transição do sistema de primeira ordem do  $O_2$ , bem como possíveis transições de átomos excitados de

oxigênio (O) e nitrogênio (N). Estas bandas, menos intensas em comparação com aquelas em comprimentos de onda mais curtos, fornecem informações importantes sobre a composição e excitação no plasma. O sistema de primeira ordem positivo (FPS) de  $N_2$  pode ser observado com picos no espectro da Figura 3, atribuídos aos processos de excitação e ionização resultantes de colisões de elétrons com moléculas de  $N_2$  no estado fundamental (Zhou et al., 2018).

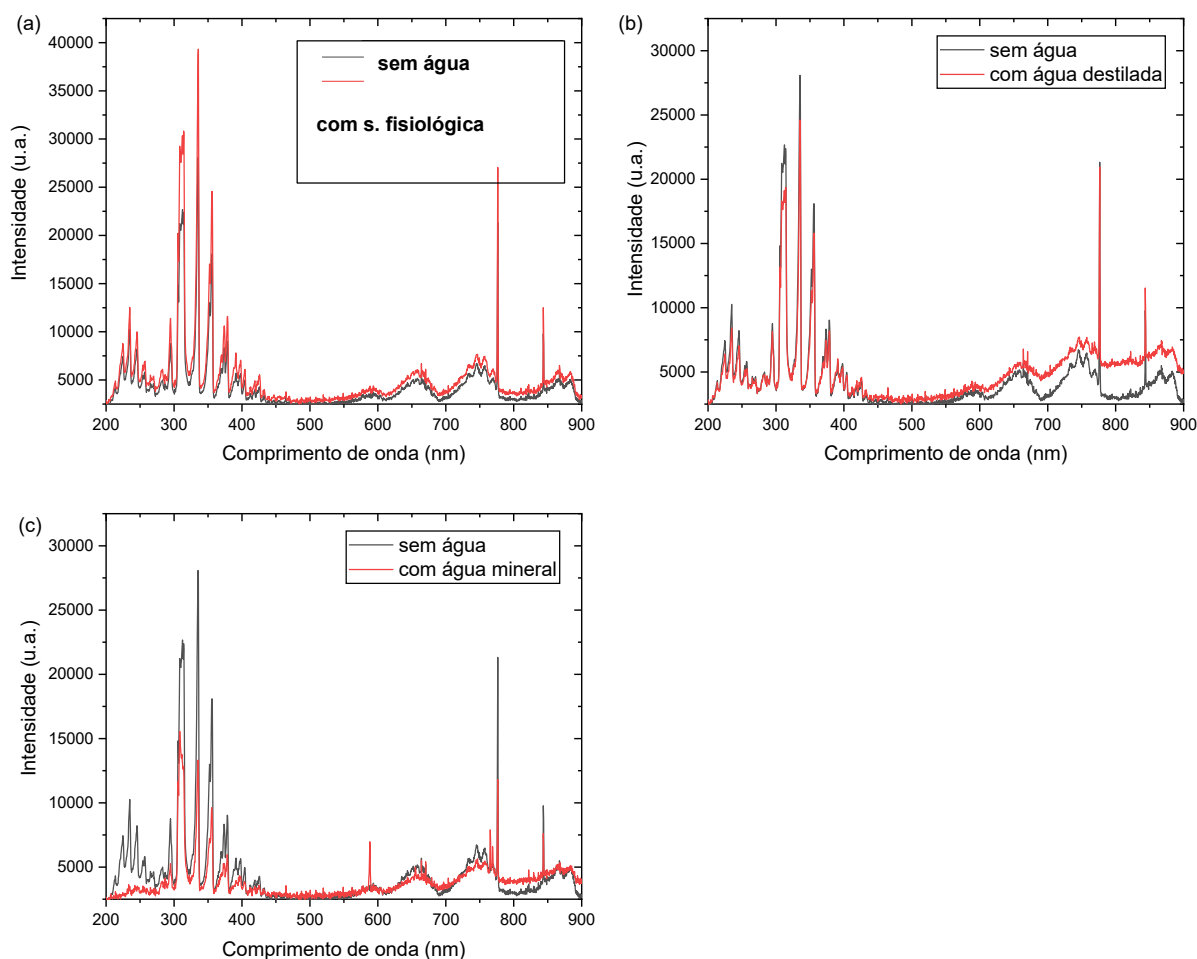
Picos acima de 800 nm: Os picos nesta região podem ser atribuídos à emissão de átomos excitados de oxigênio (O) ou nitrogênio (N). Estas emissões ocorrem em comprimentos de onda mais longos e são indicativas de espécies atômicas presentes no plasma em estados altamente excitados.

Ao comparar os espectros obtidos com diferentes fluxos de ar (1, 5 e 10 L/min), observa-se que a intensidade dos picos aumenta com o aumento do fluxo de ar. Isso sugere que um maior fluxo de ar resulta em uma maior densidade de espécies excitadas e ionizadas no plasma, devido ao aumento da taxa de entrada de ar e, conseqüentemente, maior número de colisões e processos de excitação e ionização. No entanto, pode haver um ponto de saturação onde o aumento do fluxo não resulta em um aumento proporcional na intensidade das emissões, possivelmente devido a efeitos de autoabsorção ou outras limitações intrínsecas ao sistema de plasma. Assim, escolhemos neste trabalho o fluxo de 5 L/min uma vez que este possui resultados relativamente próximos ao de 10 L/min.

### **5.1.2 Efeito da interação do plasma com as águas: destilada, mineral e solução fisiológica**

As Figuras 4a, 4b e 4c apresentam os espectros ópticos da interação do plasma com as águas: solução fisiológica, destilada e mineral, respectivamente.

Figura 4 – Espectros ópticos da interação do plasma com as águas: solução fisiológica (a), destilada (b) e mineral (c) para fluxo de ar de 5 L/min



Fonte: Elaborado pela Autora.

A interação do plasma gerado em um sistema *gliding arc* com diferentes tipos de água – solução fisiológica, destilada e mineral - provoca alterações significativas na composição e nas características do plasma, refletidas nos espectros ópticos obtidos.

### 5.1.3 Solução fisiológica

Ao comparar o plasma sem água com o plasma interagindo com solução fisiológica, observa-se um aumento na intensidade dos picos em várias regiões do espectro, especialmente entre 200 e 400 nm. Essa faixa inclui bandas associadas às transições de NO e N<sub>2</sub>. Além disso, há um aumento nos picos em torno de 590 nm e 820 nm, indicando a possível presença de átomos de sódio (Na), um componente significativo do sal dissolvido na solução fisiológica. Essa observação pode ser explicada pela dissociação dos íons Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> da solução fisiológica quando interagem com o plasma. O sódio, quando excitado, emite radiação característica em torno de 590 nm (Melo et al., 2022). A presença desses íons aumenta a condutividade do plasma, resultando em maior excitação e ionização de outras espécies presentes.

### 5.2 Água Destilada

A comparação entre o plasma sem água e com água destilada revela uma modificação nas intensidades dos picos em várias regiões do espectro. No espectro ótico apresentado, observamos uma redução na intensidade dos sinais na faixa de 200 a 400 nm quando a amostra contém água destilada em comparação com a amostra sem água. Essa redução pode ser atribuída à absorção ou interação da água destilada com os componentes presentes nessa faixa de comprimento de onda. Em contrapartida, a partir de 400 nm, há um aumento nas intensidades dos sinais na presença de água destilada. Este aumento é especialmente notável nos picos em torno de 777 nm e 840 nm, que são relativos ao oxigênio (O). Esse comportamento sugere que a água destilada influencia a formação de espécies ativas ou a intensificação de processos de emissão, possivelmente devido à interação da água com o plasma. A água destilada, por ser pura, não contém íons adicionais que poderiam alterar significativamente a condutividade do plasma. No entanto, a presença de H<sub>2</sub>O contribui para a formação de radicais OH, que são importantes para a química do plasma.

### 5.2.1 Água Mineral

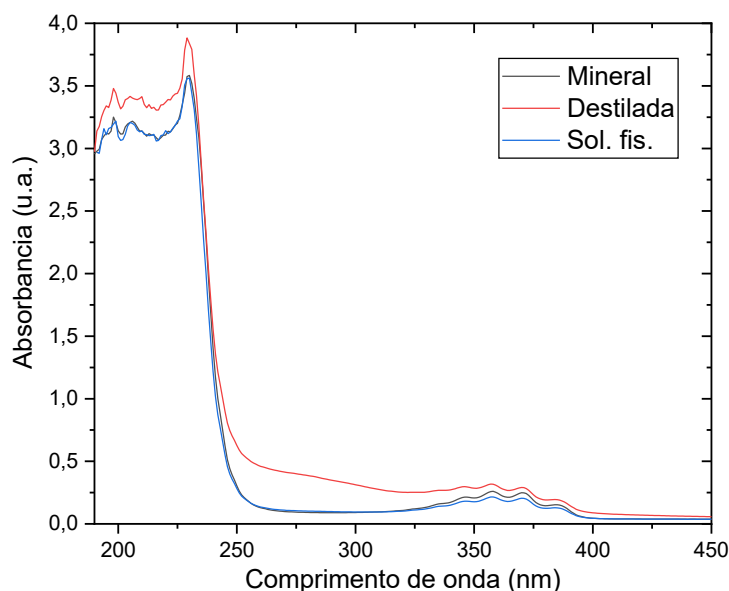
O espectro do plasma com água mineral mostra um padrão distinto ao plasma sem água, com algumas diferenças notáveis. Observamos uma redução na intensidade dos sinais na faixa de 200 a 400 nm, o que pode ser atribuído à absorção ou interação dos componentes presentes nessa faixa de comprimento de onda com a água mineral. A composição química da água mineral, que inclui íons como cálcio, magnésio, sódio, potássio, bicarbonato, sulfato e cloreto, pode modificar a química do plasma e, conseqüentemente, as características do espectro. A partir de 400 nm, há um aumento moderado nas intensidades dos sinais na presença de água mineral. Particularmente, o sódio (Na), presente na água mineral em torno de 1,0 mg/L, quando excitado, emite radiação característica em torno de 590 nm (Melo et al., 2022). Além disso, a presença de picos em regiões acima de 700 nm sugere a excitação de outros elementos traços presentes na água mineral, como cálcio (Ca) e magnésio (Mg).

Por fim, a interação do plasma com diferentes tipos de água resulta em modificações distintas no espectro óptico, refletindo a composição química e as características de cada tipo de água. A solução fisiológica aumenta significativamente a intensidade dos picos devido à presença de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , enquanto a água mineral modula as intensidades devido aos diversos minerais dissolvidos. A água destilada, embora pura, contribui para a geração de radicais OH, evidenciando a dissociação da água no plasma. Essas interações são fundamentais para entender a dinâmica e os efeitos químicos no plasma ao interagir com diferentes meios aquosos.

### 5.2.2 Análise de Espectroscopia UV-Vis: Efeito da Interação do Plasma com os Líquidos: Solução fisiológica, água destilada e água mineral

A interação do plasma gerado em um sistema gliding arc com diferentes tipos de líquidos – solução fisiológica, água destilada e água mineral - provoca alterações significativas nos espectros de absorção UV-Vis dos líquidos ativados (Figura 5). Utilizou-se espectroscopia no UV-Vis para analisar as águas ativadas com plasma durante 30 minutos, utilizando uma cubeta de quartzo com um caminho óptico de 30 mm. A análise UV-Vis fornece informações sobre a absorção de luz, indicando a presença de espécies reativas e produtos químicos formados durante a ativação com plasma.

Figura 5 – Espectros de absorção UV-Vis dos líquidos ativados com plasma: comparação entre água mineral, destilada e solução fisiológica.



Legenda: Sol. Fis.: solução fisiológica. Fonte: Elaborado pela Autora

A água mineral apresenta um perfil de absorção relativamente estável em toda a faixa analisada, com um leve aumento na absorbância em torno de 250 nm, seguido

de uma queda acentuada e uma região de absorbância quase constante entre 300 e 450 nm. A água destilada mostra um pico de absorção significativo em torno de 250 nm, seguido de uma queda acentuada, com um aumento leve e contínuo na absorbância entre 300 e 450 nm, indicando a formação de novas espécies químicas durante a ativação. A solução fisiológica apresenta um padrão de absorção similar à água destilada, mas com intensidades ligeiramente menores em algumas regiões, especialmente no pico de 250 nm, que é menos pronunciado do que na água destilada.

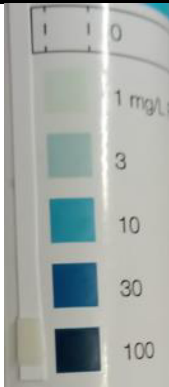
Para identificar as espécies específicas presentes nos espectros UV-Vis das águas ativadas, consideramos os seguintes padrões de absorção (Chipman, 2008; Liu et al., 2019): o íon nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) tem um pico de absorção característico em torno de 200-210 nm, e a presença de um pico forte nesta faixa nos espectros das águas ativadas indica a formação de nitrato (vide fita colorimétrica na Figura 6).

O íon nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) tem um pico de absorção característico em torno de 355 nm e uma absorção mais fraca em torno de 280 nm, e a presença de absorção na faixa de 280-355 nm pode indicar a formação de nitrito (Figura 5). O ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) tem picos de absorção característicos em torno de 350 nm e uma absorção significativa em torno de 280 nm, e absorção nesta faixa, especialmente um aumento em torno de 280 nm e 350 nm, pode indicar a presença de  $\text{HNO}_2$ .

A presença de um pico de absorção significativo em torno de 250 nm sugere a presença de radicais OH, que são comumente formados pela dissociação da água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) sob a ação do plasma. O peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) é um produto comum da reação entre radicais OH no plasma e apresenta absorção no UV, geralmente com um pico próximo de 260 nm, no entanto, conforme a Figura 6, sua concentração é mínima ou nula nas águas ativadas neste trabalho.

A presença de picos menores e mais estáveis entre 300 e 450 nm pode ser atribuída à presença de íons como  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , que estão naturalmente presentes na água mineral. A interação do plasma com  $\text{Cl}^-$  pode gerar hipoclorito ( $\text{OCl}^-$ ), que tem uma absorção característica no UV próximo de 292 nm.

Figura 6 – A Fitas colorimétricas para medição das concentrações aproximadas de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_2^-$  nos diferentes líquidos ativados analisados.

| PAW                 | $\text{H}_2\text{O}_2$                                                              | $\text{NO}_3^-$ e $\text{NO}_2^-$                                                     |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Solução fisiológica |    |    |
| Água Destilada      |   |   |
| Água Mineral        |  |  |

Legenda: PAW: água ativada por plasma.  $\text{H}_2\text{O}_2$ : Peróxido de Hidrogênio.  $\text{NO}_3^-$ : Nitrato.  
 Fonte: Elaborado pela Autora

Os resultados de OES mostraram diferentes padrões de emissão para os líquidos ativados, refletindo a interação do plasma com solução fisiológica, água destilada e mineral. A absorbância elevada em torno de 250 nm para todas as águas pode ser atribuída à presença de radicais OH e outras espécies reativas formadas durante a ativação com plasma. No espectro de emissão óptica, observamos um pico

significativo em torno de 308-309 nm, indicando a presença de OH no plasma. A absorvância na faixa de 300 a 450 nm é relativamente estável, mas com pequenos aumentos que podem indicar a presença de produtos secundários formados pela interação do plasma com os componentes dissolvidos nas águas.

### 5.2.3 Parâmetros Físico-Químicos das Líquidos ativados com Plasma

A ativação de diferentes tipos de líquidos (solução fisiológica, água destilada e água mineral) com plasma resulta em mudanças significativas nos parâmetros físico-químicos desses líquidos. A seguir, discutimos as alterações observadas com base nos dados físico-químicos coletados das águas antes e após a ativação, apresentando-os em tabelas para melhor organização e compreensão.

Solução Fisiológica: Antes e depois da ativação com plasma, os parâmetros físico-químicos da solução fisiológica mostraram mudanças notáveis (conforme demonstra a Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos da solução fisiológica (salina) antes e após o processo de ativação com plasma gerado em reator gliding arc.

| Parâmetro           | Sol. fisiológica | PAW Sol. fisiológica |
|---------------------|------------------|----------------------|
| pH                  | 6,01             | 2,84                 |
| Condutividade (k)   | 1279 mS/cm       | 1645 mS/cm           |
| Potencial Redox (U) | 429 mV           | 2346 mV              |
| TDS                 | 5125 mg/L        | 5545 mg/L            |
| Salinidade          | 7816             | 7333                 |
| O <sub>3</sub>      | -                | > 2 ppm              |

Fonte: Elaborado pela Autora

A solução fisiológica ativada com plasma (PAW salina) apresenta uma redução significativa no pH, indicando uma acidificação acentuada. A condutividade aumenta, sugerindo uma maior presença de íons dissolvidos, provavelmente devido à ionização de compostos presentes no líquido. O potencial redox aumenta drasticamente, refletindo um ambiente altamente oxidante, possivelmente devido à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo ozônio ( $O_3$ ). A TDS e a salinidade mostram aumentos moderados, indicando mudanças na composição iônica.

Água Destilada: A água destilada também sofreu alterações significativas após a ativação com plasma (conforme demonstra a Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros físico-químicos da água destilada antes e após o processo de ativação com plasma gerado em reator gliding arc.

| Parâmetro           | Água Destilada  | PAW Destilada   |
|---------------------|-----------------|-----------------|
| pH                  | 7,55            | 2,97            |
| Condutividade (k)   | 8909 $\mu S/cm$ | 9608 $\mu S/cm$ |
| Potencial Redox (U) | -288 mV         | 2263 mV         |
| TDS                 | 3564 mg/L       | 3832 mg/L       |
| Salinidade          | 48              | 451             |
| $O_3$               | -               | > 2 ppm         |

Fonte: Elaborado pela Autora

A água destilada ativada com plasma mostra uma redução significativa no pH, tornando-se altamente ácida. A condutividade aumenta, indicando uma maior presença de íons, resultado da ionização de moléculas de água e formação de novas espécies químicas. O potencial redox, que era inicialmente negativo, se torna altamente positivo, indicando a formação de um ambiente oxidante. A TDS e a salinidade aumentam ligeiramente, refletindo a formação de novas espécies químicas dissolvidas.

Água Mineral: A água mineral possui uma composição química específica, que inclui cálcio (Ca), magnésio (Mg), sódio (Na), potássio (K), bicarbonato ( $HCO_3$ ), sulfato

(SO<sub>4</sub>) e cloreto (Cl). Estes componentes influenciam significativamente as propriedades da água mineral ativada com plasma (Tabela 3). A água mineral ativada com plasma apresenta uma redução no pH, tornando-se mais ácida, embora menos pronunciada em comparação com as outras águas. A condutividade e o TDS diminuem, sugerindo que alguns íons podem ter precipitado ou reagido para formar compostos menos solúveis. O potencial redox aumenta, mas não tanto quanto nas outras águas, indicando um ambiente oxidante moderado. A presença de ozônio é detectada, mas em uma concentração menor do que nas outras águas. De um modo geral, a ativação com plasma induz mudanças significativas nos parâmetros físico-químicos da solução fisiológica, água destilada e mineral. Observa-se uma acidificação geral e um aumento no potencial redox, refletindo a formação de um ambiente altamente oxidante. A condutividade e o TDS aumentam ou diminuem dependendo da composição inicial da água, indicando a formação de novas espécies iônicas e reações químicas complexas. A presença de ozônio (O<sub>3</sub>) em todas as águas ativadas destaca a produção de espécies reativas de oxigênio como um efeito comum da ativação com plasma. Estas mudanças são fundamentais para entender os efeitos e as aplicações das águas ativadas com plasma em diversas áreas.

Tabela 3. Parâmetros físico-químicos da água mineral antes e após o processo de ativação com plasma gerado em reator gliding arc.

| Parâmetro           | Água Mineral | PAW Mineral |
|---------------------|--------------|-------------|
| pH                  | 5,80         | 3,05        |
| Condutividade (k)   | 4899 µS/cm   | 3564 µS/cm  |
| Potencial Redox (U) | 755 mV       | 222 mV      |
| TDS                 | 1921 mg/L    | 1442 mg/L   |
| Salinidade          | 27           | 173         |
| O <sub>3</sub>      | -            | 0,73 ppm    |

Legenda: Composição química da água mineral: Cálcio (Ca): 30 mg/L; Magnésio (Mg): 10 mg/L; Sódio (Na): 10 mg/L; Potássio (K): <1 mg/L; Bicarbonato (HCO<sub>3</sub>): 80 mg/L; Sulfato (SO<sub>4</sub>): 10 mg/L; Cloreto (Cl): 10 mg/L. Fonte: Elaborado pela Autora

### 5.3 Efeito da água ativada sobre os biofilmes microbianos – Testes *in vitro*

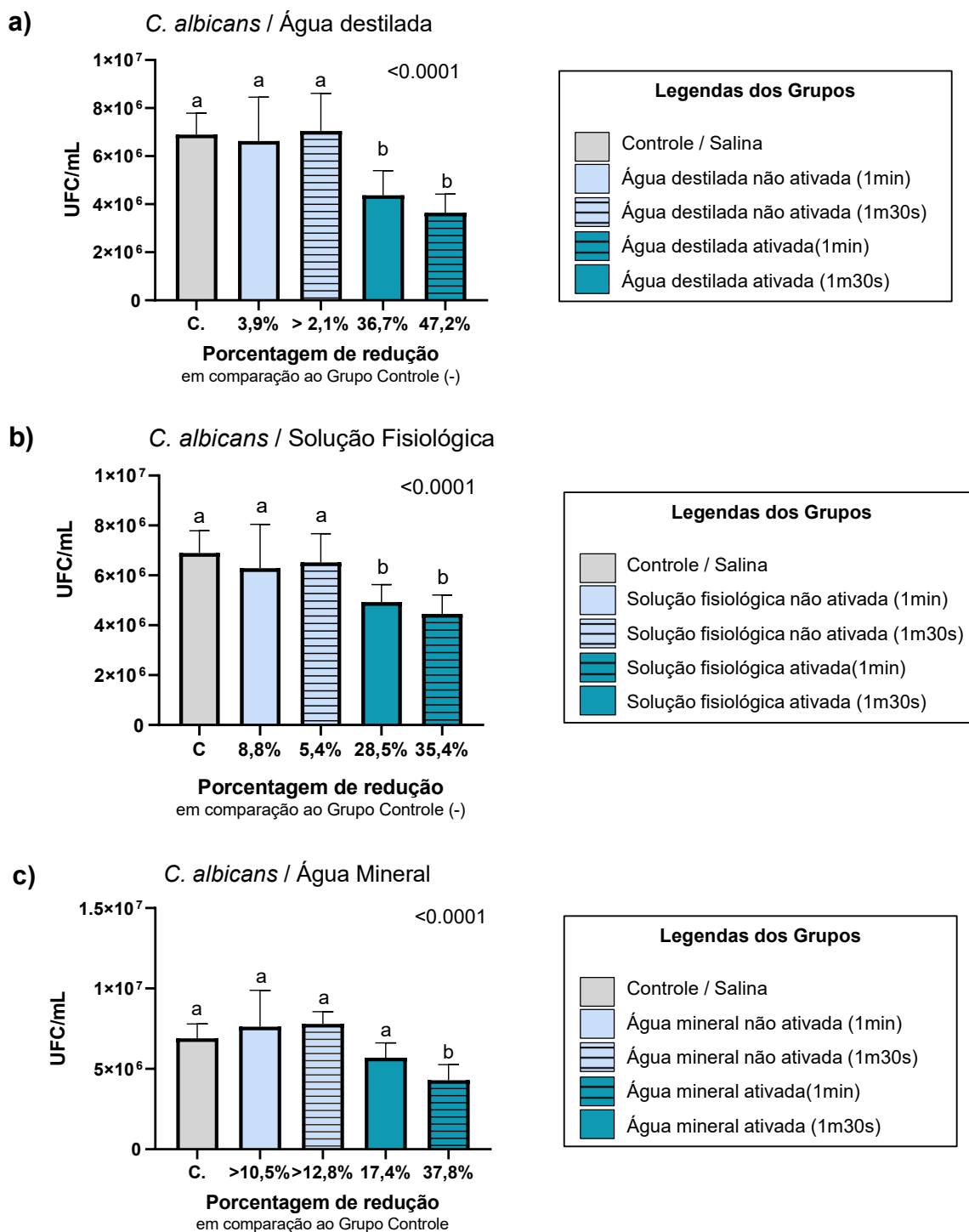
#### 5.3.1 Efeito da água ativada sobre biofilmes de *Candida albicans*

Os resultados dos testes nos grupos com Água Destilada frente a biofilmes de *C. albicans* estão apresentados na Figura 7 – a, onde os grupos com água destilada não ativada não apresentaram reduções significativas no número de células viáveis quando comparados ao grupo controle e em ambos os tempos de exposição. Houve redução de 3,9% após exposição por 1 minuto. Após 1,5 minutos, houve aumento na contagem de células viáveis de 2,1%. A exposição à água destilada ativada com plasma por 1 minuto levou à redução de 36,7%. Após exposição por 1,5 minutos, observou-se redução de 47,2%. Ambos os grupos de Água Destilada ativada apresentaram diferenças significativas na redução da viabilidade do biofilme quando comparado ao grupo controle tratado com solução fisiológica ( $p < 0.0001$ ).

Quanto aos grupos Solução Fisiológica frente a biofilmes de *C. albicans*, os resultados estão demonstrados a Figura 7 – b. Os grupos expostos à água destilada não ativada não apresentaram diferenças significativas quando comparados ao grupo controle nos dois tempos de exposição. A redução foi de 8,8% após 1 minuto de exposição e de 5,4% após 1,5 minutos. A solução fisiológica ativada com plasma, no tempo de tratamento de 1 minuto levou à redução de 28,5%. Após exposição por 1,5 minutos, observou-se redução de 35,4%. Ambos os grupos expostos à solução fisiológica ativada apresentaram diferenças significativas em relação ao controle negativo ( $p < 0.0001$ ).

Os resultados da Água Mineral frente a biofilmes de *C. albicans*, podem ser visualizados na Figura 7 – c, os grupos com água mineral sem ativação não apresentaram redução do biofilme, ao contrário apresentaram crescimento, no tempo de 1 minuto o crescimento foi de 10,5% e no tempo de 1 minuto e 30 segundos o crescimento foi de 12,8%. A água mineral ativada por plasma levou à redução de 28,5% após 1 minuto de exposição. Após exposição por 1,5 minutos, houve redução de 35,4%. Ambos os grupos de água mineral ativada apresentaram diferenças significativas quando comparado ao Grupo Controle ( $p < 0.0001$ ).

Figura 7 – Resultados obtidos para avaliação de atividade antibiofilme de *C. albicans*, utilizando água destilada, solução fisiológica e água mineral ativada com plasma frio por 1 minuto ou 1 minuto e 30 segundos.



Legendas: Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (One-way ANOVA/post hoc teste de Tukey). Fonte: elaborado pela autora.

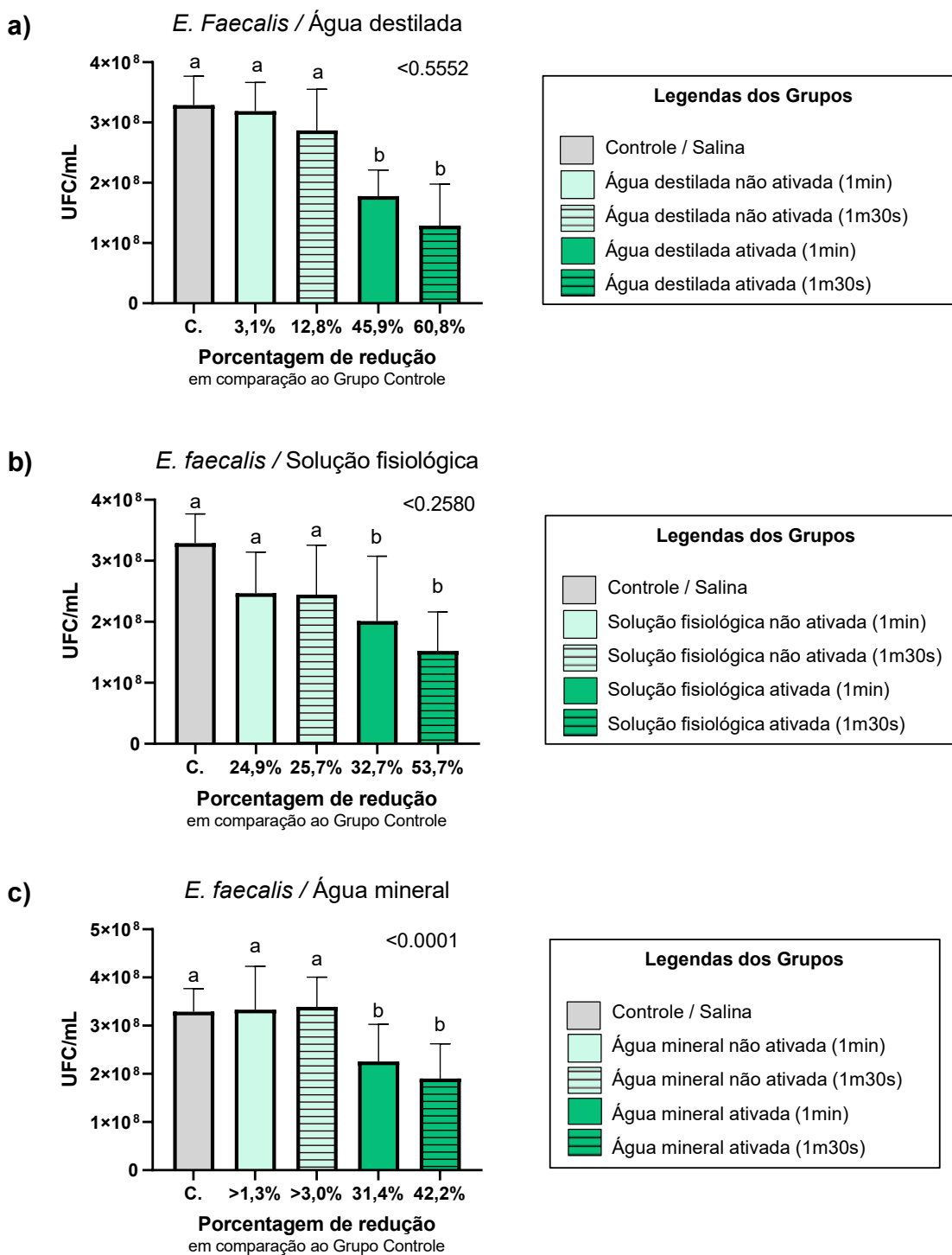
### 5.3.2 Efeito da água ativada sobre biofilmes de *Enterococcus faecalis*

Os resultados dos grupos com Água Destilada frente a biofilmes de *E. faecalis* estão demonstrados na Figura 8 – a. Os grupos com água destilada não ativada não levaram a reduções significativas nas contagens de células viáveis quando comparados ao grupo controle, observando-se redução de 3,1% após 1 minuto de exposição e de 12,8% após 1,5 minutos ( $p=0,5552$ ). A água destilada ativada, levou à redução de 45,9% no número de células viáveis após 1 minuto de exposição. No tempo de exposição de 1 minuto e 30 segundos, apresentou redução de 60,8%. Ambos os grupos de água Destilada ativada apresentaram diferenças significativas na redução do biofilme quando comparado ao grupo controle tratado com solução fisiológica ( $p<0.0001$ ).

Os resultados do grupo solução fisiológica frente a biofilmes de *E. faecalis*, estão apresentados na Figura 8 – b. Os grupos expostos à solução fisiológica não ativada não apresentaram diferenças significativas no número de células viáveis entre todos os grupos ( $p=0,2580$ ). Nos grupos com Solução fisiológica ativada, a redução foi de 32,7% no tempo de 1 minuto e 53,7% de redução no tempo de exposição de 1 minuto e 30 segundos. Houve diferença significativas entre os grupos tratados grupo controle negativo ( $p<0.0001$ ).

Os resultados dos grupos que analisaram Água Mineral frente a biofilmes de *E. faecalis* estão apresentados na Figura 8 – c. Os grupos com água mineral sem ativação não apresentaram redução na viabilidade do biofilme. A água mineral ativada, no tempo de tratamento de 1 minuto apresentou redução de 31,4% e no tempo de exposição de 1 minuto e 30 segundos, apresentou redução de 42,2%. Ambos os grupos de água mineral ativada apresentaram diferenças significativas quando comparado ao grupo controle ( $p<0.0001$ ).

Figura 8 – Resultados obtidos para avaliação de atividade antibiofilme frente a *E. faecalis*, utilizando água destilada, solução fisiológica e água mineral ativada com plasma frio por 1 minuto e 1 minuto e 30 segundos.



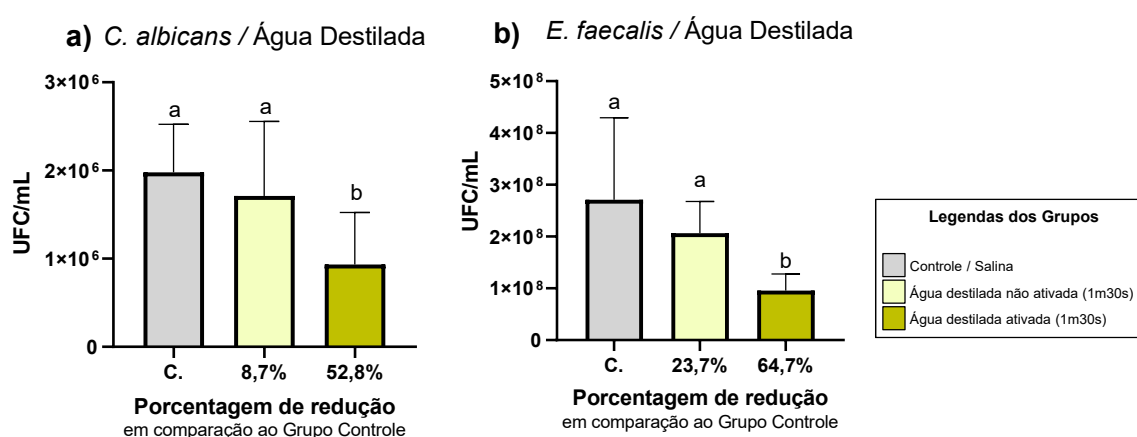
Legendas: Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (One-way ANOVA/post hoc teste de Tukey). Fonte: elaborado pela autora.

### 5.3.3 Efeito da água ativada sobre biofilmes dual espécies de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*

Os resultados do efeito da Água Destilada frente a biofilmes dual espécies de 24 horas compostos por *Enterococcus faecalis* (ATCC 2921) e *C. albicans* (ATCC 18804) estão demonstrados nas Figuras 9. A Figura 9 – a apresenta os resultados de *C. albicans*, 9 – b apresenta os resultados de *E. faecalis*.

As figuras 9 – a e 9 – b demonstram não apresentam diferenças estatísticas significativas nos valores de UFC/biofilme nos grupos de água destilada sem ativação ( $p=0,0085$  e  $p=0,0037$ , respectivamente). Quanto aos resultados da Água Destilada ativada, observou-se que houve redução de 52,8% no número UFC/biofilme de *C. albicans* e 64,7% de redução de UFC/biofilme de *E. faecalis*, quando comparados ao Grupo Controle ( $p<0.0001$ ).

Figura 9 – Atividade inibitória da água destilada ativada por plasma sobre biofilmes dual espécies de *E. faecalis* e *C. albicans* em exposição de 1 minuto e 30 segundos.

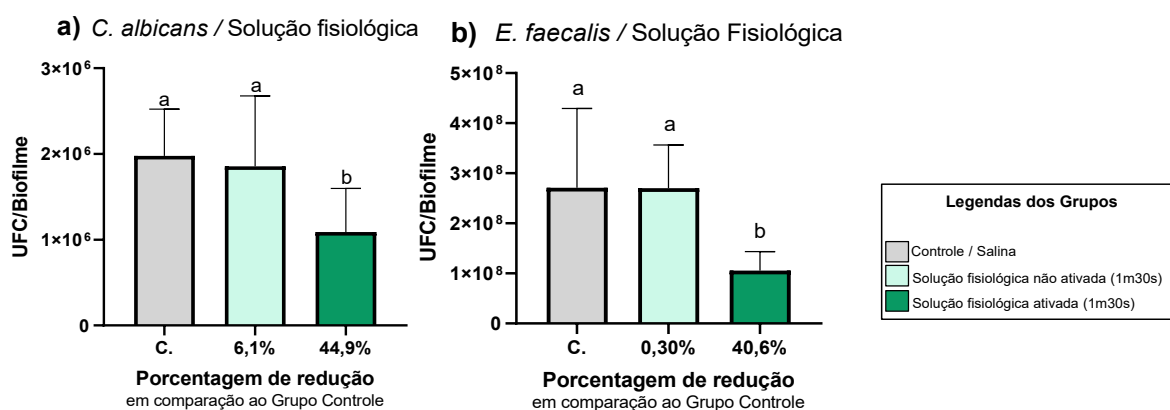


Legendas: Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (One-way ANOVA/post hoc teste de Tukey). Fonte: elaborado pela autora.

Os resultados dos grupos com Solução Fisiológica frente a biofilmes dual, os quais receberam tratamento de 1 minuto e 30 segundos, estão demonstrados na

Figura 10. As figuras 10 – a e 10 – b demonstram que não houve diferenças estatísticas significativas no número de células viáveis nos biofilmes ( $p=0,0143$  e  $p=0,0035$ , respectivamente). Após exposição à solução fisiológica ativada, houve redução de 44,9% no número de UFC/biofilme de *C. albicans* e 40,6% de redução de UFC/mL de *E. faecalis* quando comparados ao Grupo Controle ( $p<0.0001$ ).

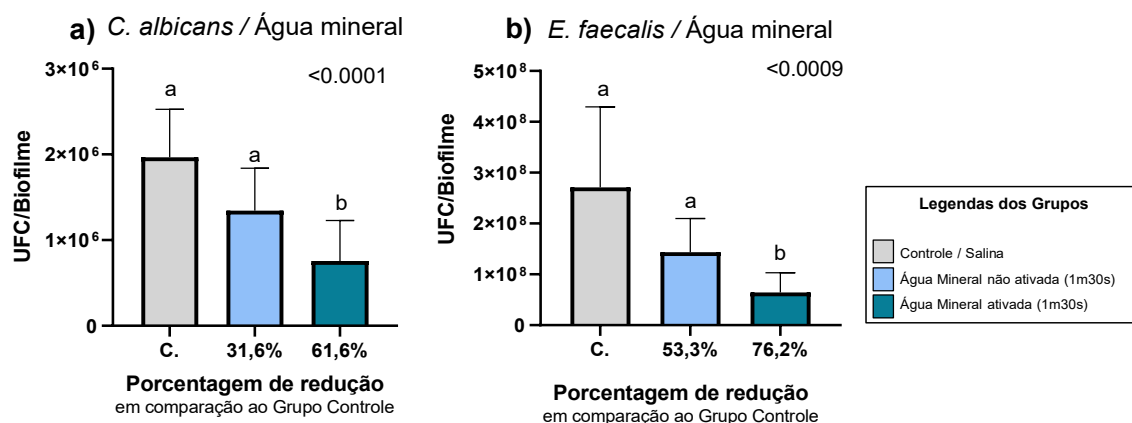
Figura 10 – Resultados obtidos para avaliação de atividade antimicrobiana frente a biofilme dual espécie de *E. faecalis* e *C. albicans*, utilizando Solução Fisiológica por 1 minuto e 30 segundos com plasma frio.



Legendas: Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (One-way ANOVA/post hoc teste de Tukey). Fonte: elaborado pela autora.

Os resultados dos grupos com água mineral frente a biofilmes dual, os quais receberam tratamento de 1 minuto e 30 segundos, estão demonstrados na Figura 11. As figuras 11 – a e 11– b demonstram que os biofilmes não apresentam diferenças estatísticas significativas ( $p=0,0143$  e  $p=0,0035$ , respectivamente) quanto a redução de quantidade de UFC/mL nos grupos de água mineral sem ativação, sendo a redução de 31,6% para *C. albicans* e 53,3% para *E. faecalis*. Quanto aos resultados da Água Mineral ativada, ambos levaram redução de 61,6% de UFC/mL de *C. albicans* e 76,2% de redução de UFC/mL de *E. faecalis* quando comparados ao grupo controle ( $p<0.0001$ ).

Figura 11 – Resultados obtidos para avaliação de atividade inibitória frente a biofilmes dual espécies de *E. faecalis* e *C. albicans* após exposição à água mineral ativada por plasma por 1 minuto e 30 segundos com plasma frio.

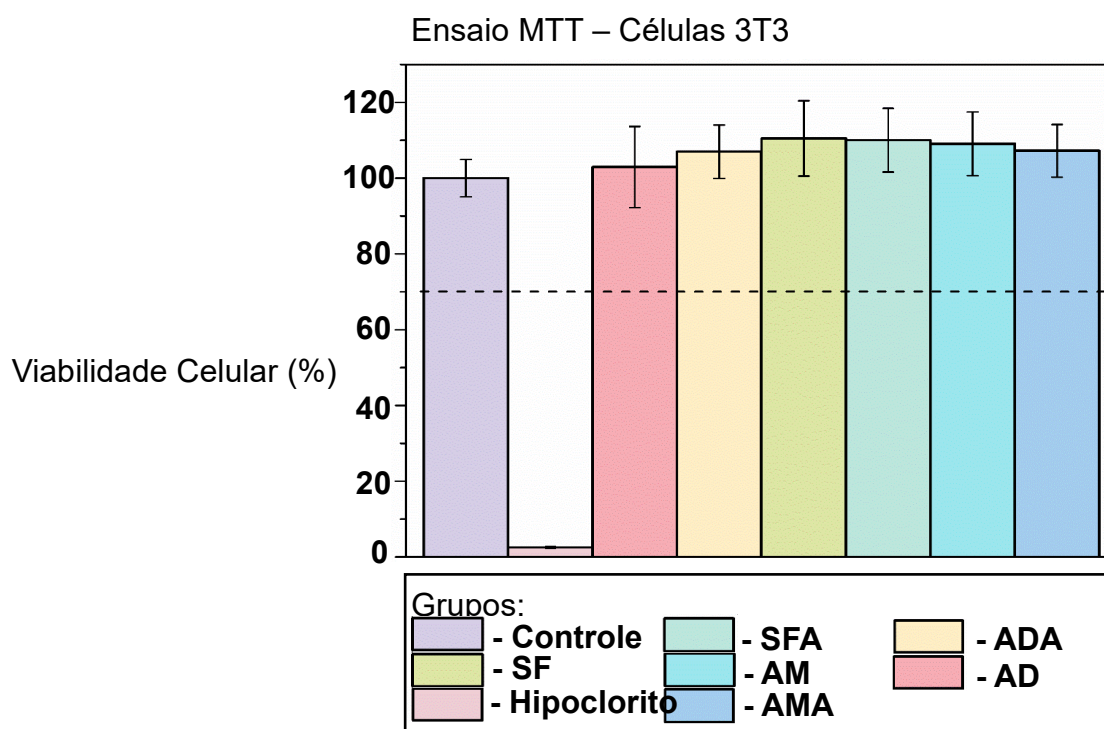


Legendas: Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (One-way ANOVA/post hoc teste de Tukey). Fonte: elaborado pela autora.

### 5.3.3.1 Avaliação da citotoxicidade da água ativada por plasma

Observou-se viabilidade celular final de 0,36% após a exposição ao hipoclorito de sódio 1% por 1,5 minutos, o que é considerada altamente citotóxica para células 3T3. Os demais grupos avaliados apresentaram viabilidade celular acima de 70%, sendo considerados não citotóxicos (Figura 12).

Figura 12 – Resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade, avaliando os efeitos dos diferentes líquidos ativados sobre fibroblastos 3T3.



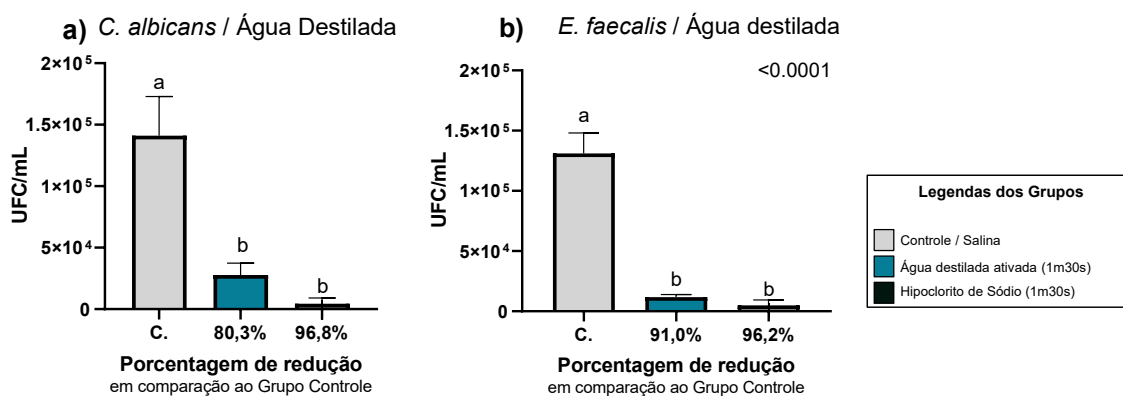
Legenda: (hipoclorito de sódio-hipoclorito, água destilada - AD, água destilada ativada - ADA, solução fisiológica - SF, solução fisiológica ativada - SFA, água mineral – AM e água mineral ativada - AMA) e hipoclorito de sódio 1% (controle) frente a células 3T3. Fonte: elaborado pela autora.

### 5.3.3.2 Efeito da irrigação dos canais radiculares com água ativada com plasma sobre biofilmes dual espécies de *E. faecalis* e *C. albicans* – Ensaio *ex vivo*

Os resultados da ação antibiofilme em modelos *ex vivo*, estão demonstrados na Figura 13, Reduções significativas de UFC/mL foram detectadas para ambas as espécies quando comparados ao grupo controle ( $p < 0.0001$ ).

A água destilada ativada levou à redução de UFC/mL de 80,3% para *C. albicans* e 91% para *E. faecalis*. A redução dada pelo Grupo controle positivo, no qual foi utilizado hipoclorito de sódio 1,0%, apresentou redução de 96,8% para *C. albicans* e 96,2% para *E. faecalis*.

Figura 13 – Resultados obtidos para avaliação de atividade antibiofilme frente a biofilme dual espécie de *E. faecalis* e *C. albicans*, utilizando água destilada ativada por plasma por 1 minuto e 30 segundos com plasma frio no ensaio ex vivo.



Legendas: Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (One-way ANOVA/post hoc teste de Tukey). Fonte: elaborado pela autora.

## 6 DISCUSSÃO

A água ativada por plasma (PAW) tem emergido como uma promissora ferramenta na odontologia, oferecendo uma abordagem inovadora para a desinfecção de superfícies e materiais odontológicos (Milhan et al., 2022). Estudos têm explorado a eficácia da PAW na inativação de patógenos orais e na redução de biofilmes em diferentes ambientes clínicos, destacando seu potencial como agente antimicrobiano como demonstra os estudos de Chen et al. (2019) e Miranda et al. (2024). Além disso, a pesquisa de Lee et al. (2020) investigou a aplicação da água ativada por plasma na esterilização de instrumentos odontológicos, evidenciando sua capacidade de eliminar micro-organismos e reduzir o risco de infecções cruzadas em ambientes odontológicos.

A utilização da água ativada por plasma na odontologia não se limita apenas à desinfecção de superfícies e instrumentos, mas também se estende à terapia antimicrobiana, regeneração tecidual e endodontia. Estudos como o de Kim et al. (2021) exploraram o potencial da PAW como um agente terapêutico para o tratamento de doenças periodontais, demonstrando sua capacidade de reduzir a carga bacteriana e promover a cicatrização periodontal. Além disso, Song et al. (2018) investigaram os efeitos da água ativada por plasma verificando a biocompatibilidade, destacando sua segurança e potencial para aplicações clínicas em procedimentos restauradores e de regeneração óssea. Esses estudos evidenciam a crescente relevância da água ativada por plasma na odontologia e sua diversidade de aplicações clínicas, oferecendo novas perspectivas para a prática odontológica moderna.

Cada irrigante endodôntico possui componentes específicos que contribuem para suas propriedades antimicrobianas e de limpeza do canal radicular. A escolha e combinação desses irrigantes durante o tratamento endodôntico visam maximizar a eliminação de microrganismos e detritos, promovendo um ambiente ideal para o sucesso do tratamento (Gomes, Aveiro, Kishen, 2023). O hipoclorito de sódio é um dos irrigantes endodônticos mais utilizados devido à sua potente ação antimicrobiana. Sua eficácia se deve à liberação de íons cloro e oxigênio, que são fortes agentes oxidantes, estes íons atacam e oxidam componentes celulares essenciais das bactérias, como proteínas e ácidos nucleicos, resultando na destruição das células

microbianas (Ruksakiet et al., 2020). Além disso, o NaOCl é capaz de dissolver matéria orgânica, incluindo tecido pulpar necrótico e biofilmes bacterianos, tornando-se um excelente agente de limpeza e desinfecção dos canais radiculares. Entretanto, sua alta citotoxicidade e potencial para causar irritação aos tecidos periapicais são considerações importantes no seu uso clínico (Coaguila-Llerena et al., 2023).

A clorexidina é um agente antimicrobiano de amplo espectro frequentemente utilizado em soluções de 0,2% a 2% na endodontia. A clorexidina atua interagindo com as membranas celulares das bactérias, levando à ruptura e aumento da permeabilidade celular, o que resulta na morte celular, também causa a precipitação de proteínas citoplasmáticas, inativando os microrganismos de forma eficaz (Pałka et al., 2022; Neelakantan et al., 2019). Embora o EDTA não tenha propriedades antimicrobianas diretas, ele desempenha um papel crucial na preparação do canal radicular para a ação de outros irrigantes, pois é um agente quelante que remove íons cálcio da dentina, desmineralizando-a e expondo os túbulos dentinários, essa desmineralização facilita a penetração e a ação antimicrobiana de outros irrigantes, como o hipoclorito de sódio e a clorexidina (Haapasalo et al., 2014).

O uso do peróxido de hidrogênio como irrigante endodôntico é vantajoso por sua capacidade de liberar radicais livres que exercem uma potente ação antimicrobiana como demonstra o estudo de Ibi e colaboradores (2017). Por outro lado, a solução fisiológica e a água destilada, apesar de não possuírem propriedades antimicrobianas intrínsecas, são essenciais no protocolo de irrigação, além disso, essas soluções são biocompatíveis e seguras, minimizando o risco de irritação ou danos aos tecidos periapicais (Wagner et al., 2017).

O presente estudo demonstrou eficácia antimicrobiana dos líquidos ativados frente a *C. albicans* e *E. faecalis*. Chiappim et al. (2021) utilizaram água de torneira ativada por plasma em seu estudo e demonstraram que a água de torneira ativada por plasma apresentou excelentes resultados na inativação de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, porém não apresentou atividade antimicrobiana significativa com a espécie *C. albicans*, divergindo dos resultados alcançados em nosso estudo, onde demonstramos atividade antifúngica para *C. albicans*. Esta diferença pode estar relacionada à utilização de diferentes líquidos neste estudo (água mineral, solução fisiológica e água mineral). As diferenças na composição química, origem e uso dos líquidos parecem influenciar os resultados para atividade antimicrobiana, mesmo que

todos sejam submetidos ao mesmo protocolo de ativação por plasma. De fato, os diversos líquidos possuem composições diferentes. A água mineral contém minerais e oligoelementos dissolvidos, como cálcio, magnésio, potássio e sódio, que variam conforme a fonte natural, nascentes ou poços profundos, o consumo deste líquido é devido ao seu conteúdo mineral e os benefícios que acarreta para saúde. A solução fisiológica é uma mistura de cloreto de sódio (NaCl) em água purificada, o que a torna isotônica em relação aos fluidos do corpo humano, sendo bastante utilizada em procedimentos médicos, como limpeza de feridas, hidratação intravenosa e lavagem ocular ou nasal, pois sua composição similar ao plasma sanguíneo evita irritações e desequilíbrios osmóticos. Já a água destilada é um líquido que passou por um processo de destilação, isto remove praticamente todas as impurezas, incluindo minerais, sais e micro-organismos, pois o aquecimento da água até a evaporação e, em seguida, condensação do vapor em um recipiente separado. Esse processo resulta em água pura e seu uso se dá exatamente em laboratórios e em formulações farmacêuticas, onde a pureza é essencial.

Guo e colaboradores (2018) demonstraram a capacidade que água ativada por plasma tem em inativar bacteriófagos, agindo na inativação de vírus. Estes estudos em conjunto com o presente trabalho, permitem inferir que a água ativada por plasma tem capacidade de atuar contra bactérias, fungos e vírus dentro e fora dos canais radiculares.

Ao evitar o uso excessivo de agentes irritantes como o hipoclorito de sódio, a PAW não apenas oferece uma abordagem mais segura para a desinfecção dos canais radiculares, mas também pode contribuir para a redução da citotoxicidade e para a promoção do reparo tecidual. Ao contrário do hipoclorito de sódio e da clorexidina que independente das formas que são utilizados na clínica endodôntica apresentam citotoxicidade, como relatado por Poppolo-Deus e Quanounou (2022) e que acarretam diversos efeitos adversos, como por exemplo, reações alérgicas, irritação e necrose de tecidos periapicais. O uso da PAW não levaria aos efeitos adversos citados pois, além da ausência de citotoxicidade, oferece benefícios adicionais na endodontia, como a promoção do reparo tecidual (Milhan et al., 2022).

Lim et al. (2019) avaliaram a biocompatibilidade da PAW em tecidos periapicais, destacando sua capacidade de reduzir a inflamação e promover a regeneração tecidual em modelos animais. Outras descobertas destacam a relevância

crescente da água ativada por plasma na endodontia, oferecendo uma abordagem segura e eficaz para a desinfecção dos sistemas de canais radiculares e a promoção da saúde periapical.

Choi et al. (2022) também relataram outros efeitos em que a PAW se mostra superior quando comparada aos métodos convencionais de irrigação. Esses autores investigaram os efeitos da água ativada por plasma na remineralização de dentina desmineralizada, sugerindo seu potencial na preservação da estrutura dentária após procedimentos endodônticos. Já a Clorexidina em uso prolongado pode causar descoloração dos dentes e das restaurações dentárias, além de manchas na língua e nas mucosas bucais.

Os biofilmes microbianos que se aderem a superfícies e estão envolvidos em uma matriz extracelular, com estruturas tridimensionais complexas, acarretando dificuldades quando a resistência aos antimicrobianos convencionais (Rather, Gupta, Mandal, 2021). Na endodontia, os biofilmes tornam a necessidade da desinfecção dos canais radiculares ainda maior. Há a necessidade de vários passos para a desinfecção físico-química, o que seria diferente se os micro-organismos estivessem em sua forma planctônica (Zhao et al., 2020). No preparo biomecânico, vários instrumentais são necessários para remover os biofilmes dos canais radiculares. Segundo Hamed, Shabayek e Hassan (2022), são necessárias quatro limas para a completa remoção dos biofilmes dos canais. Em nosso estudo *ex vivo*, realizado com dentes humanos, a água destilada ativada com plasma frio demonstrou ser um potencial antimicrobiano eficaz, reduzindo a viabilidade dos biofilmes em 80% a 91% quando utilizada durante o preparo biomecânico.

Em relação às soluções irrigadoras na Odontologia, o hipoclorito de sódio é usado em todo mundo e já demonstrou sua eficácia na desinfecção (Cai et al., 2023). Apesar de disso, o hipoclorito de sódio em certas concentrações não é biocompatível, o que foi confirmado no presente estudo onde foi detectada alta citotoxicidade para 3T3. Por outro lado, os líquidos ativados por plasma avaliados neste estudo (água destilada, água mineral e a solução fisiológica) ativadas ou não com o plasma, não foram citotóxicas.

Nossos resultados confirmam que a água ativada com plasma pode atuar como um antimicrobiano, pois em nossos testes *in vitro*, frente a *C. albicans*, as reduções da viabilidade de biofilmes monoespécies variaram de 35,4% a 47,2%.

Verificou-se que o líquido que promoveu a maior porcentagem de redução foi água destilada ativada por plasma. Por outro lado, a solução fisiológica ativada promoveu a menor redução. Para espécie *E. faecalis* em biofilme monotípico, as reduções de biofilmes variaram de 31,4% a 60,8%, sendo que o líquido que promoveu maior porcentagem de redução foi água destilada ativada, isto incluindo os dois tempos.

A água destilada ativada promoveu a maior redução e o tempo de tratamento mais efetivo foi de 1,5 minutos. Nos testes em biofilme tratados com diferentes líquidos ativados no tempo de 1,5 minutos, as reduções variaram de 44,9% a 61,6% para *C. albicans*, as reduções para *E. faecalis* variaram de 40,6% a 76,2%.

Líquidos ativados com plasma frio demonstraram ser um antimicrobiano frente a biofilmes dual espécies de *C. albicans* e *E. faecalis*. Nossos resultados reforçam as descobertas de estudos anteriores sobre o potencial antimicrobiano da água ativada por plasma, demonstrando reduções significativas nos biofilmes monoespécies de *C. albicans* e *E. faecalis*. Nos estudos já citados na literatura, o efeito antibacteriano sobre *Escherichia coli* (Rothwell et al., 2022), *Salmonella* spp. (Shah et al., 2023) e *Vibrio parahaemolyticus* (Zhang et al., 2024) e efeito antifúngico frente a *Candida albicans* (Rovetta-Nogueira et al., 2023; Leite et al., 2021) e *Trichophyton rubrum* (Borges et al., 2019) foram demonstrados. Porém, nosso estudo foi o inédito ao reunir espécie bacteriana e fúngica e demonstrar os resultados em biofilmes multiespécies.

A variação na eficácia dos diferentes líquidos ativados, com a água destilada mostrando consistentemente as maiores reduções, sugere a importância do tipo de líquido utilizado e do tempo de tratamento. Esses achados são consistentes com pesquisas anteriores que destacaram a eficácia água destilada mesmo que sem ativação em particular, podendo ser um como um agente antimicrobiano mesmo que em quantidades pequenas (Rajendran et al., 2018). Além disso, a observação de que o tempo de tratamento mais efetivo foi de 1,5 minutos reforça a necessidade de considerar a duração da exposição ao plasma na obtenção de resultados ótimos de desinfecção intracanal.

Os resultados dos testes em biofilmes tratados com diferentes líquidos ativados, especialmente aqueles realizados no tempo de 1,5 minutos, revelaram reduções expressivas na viabilidade de biofilmes dual espécies de *C. albicans* e *E. faecalis*. A maior eficácia dos líquidos ativados em comparação com o grupo controle demonstra claramente o potencial antimicrobiano dessas soluções. No entanto, a

variação na eficácia entre os diferentes líquidos ativados indica a importância de considerar não apenas a ativação do plasma, mas também a composição do líquido veicular. Eles oferecem fortes propriedades antimicrobianas, menor citotoxicidade e potencial para desagregar biofilmes, além de serem uma opção mais segura e ambientalmente amigável (Lee et al., 2022; Seo et al., 2019). Esses achados destacam a necessidade contínua de pesquisa para otimizar as formulações de líquidos ativados e desenvolver protocolos de tratamento endodôntico mais eficazes e seguros.

A investigação contínua é fundamental para avançar nosso entendimento sobre a aplicação da água ativada por plasma na endodontia. Embora nosso estudo forneça informações valiosas sobre a eficácia da PAW na redução de biofilmes endodônticos, ainda há assuntos que requerem investigação adicional. Por exemplo, estudos adicionais poderiam explorar os efeitos da PAW em biofilmes mais complexos, que podem incluir múltiplas espécies microbianas e interações entre micro-organismos. Além disso, a avaliação da eficácia da PAW em modelos mais próximos da condição clínica, como culturas tridimensionais ou modelos de biofilme *in vivo*, fornecerão informações adicionais sobre sua aplicação clínica (Rôças et al., 2020; Chávez de Paz et al., 2021).

Outra área de pesquisa promissora é a investigação dos efeitos a longo prazo da exposição à PAW em tecidos periapicais e células hospedeiras. Embora nosso estudo não tenha identificado evidências de citotoxicidade significativa da PAW, é essencial realizar estudos de acompanhamento para avaliar possíveis efeitos adversos a longo prazo. Além disso, estudos clínicos prospectivos são necessários para avaliar a eficácia da PAW em pacientes submetidos a tratamento endodôntico. Esses estudos podem ajudar a determinar a eficácia clínica da PAW em comparação com os métodos de irrigação convencionais e a identificar possíveis desafios na implementação da PAW na prática clínica diária (Haapasalo et al., 2018; Pizzo et al., 2021). Ao direcionar esforços de pesquisa para essas áreas, podemos continuar a avançar no desenvolvimento e na aplicação clínica da água ativada por plasma na endodontia.

Além disso, é crucial investigar a influência da água ativada por plasma no microambiente endodôntico e sua interação com outros procedimentos clínicos, como o uso conjunto com medicamentos intracanaís e materiais/técnicas de obturação.

Estudos como os de Ricucci et al. (2018) e Kocak et al. (2020) ressaltam a complexidade do ambiente endodôntico e a importância de considerar o impacto de intervenções terapêuticas adicionais na eficácia da desinfecção. Com uma abordagem abrangente que integra pesquisas *in vitro*, *in vivo* e clínicas, podemos avançar no desenvolvimento de protocolos de tratamento endodôntico mais eficazes e seguros, que aproveitem todo o potencial da água ativada por plasma para a melhoria dos resultados clínicos.

## 7 CONCLUSÃO

Os líquidos ativados com plasma frio demonstraram ação antimicrobiana e antibiofilme eficaz contra cepas padrão de *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*. Não foi observada citotoxicidade dos líquidos ativados. Tanto nos testes *in vitro* quanto nos experimentos *ex vivo*, os líquidos ativados com plasma frio promoveram redução significativa na viabilidade dos biofilmes quando comparados aos grupos tratados com líquidos não ativados. Embora todos os líquidos ativados tenham mostrado eficácia na ação antibiofilme, a água destilada ativada se destacou ao exibir um maior potencial antimicrobiano. Estes resultados fornecem uma base sólida para considerar a água ativada por plasma frio como uma alternativa promissora para a desinfecção intracanal na endodontia, sugerindo seu potencial para melhorar os resultados clínicos e promover uma abordagem mais segura e eficaz no tratamento endodôntico.

## REFERÊNCIAS

- Alonso-Coello P, Carrasco-Labra A, Brignardello-Petersen R, Neumann I, Akl EA, Vernooij RW, et al. Systematic reviews suffer from major limitations in reporting absolute effects. *J Clin Epidemiol*. 2015;S0895-4356(15)00505-3. doi: 10.1016/j.jclinepi.2015.11.002. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 26560992.
- Armand A, Khani M, Asnaashari M, Aliahmadi A, Shokr B. Comparison study of root canal disinfection by cold plasma jet and photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019;26:327-33.
- Birch K, Dove ES, Chiappetta M, Gürsoy UK. Biobanks in oral health: promises and implications of post-neoliberal science and innovation. *OMICS*. 2015 Nov 19. [Epub ahead of print]
- Borges AC, Nishime TMC, Kostov KG, Lima GMG, Gontijo AV, et al. Cold atmospheric pressure plasma jet modulates *Candida albicans* virulence traits. *Clin Plasma Med*. 2017;7(8):9-15.
- Borges AFS, Bittar RA, Pascon FM, Correr SL, Martin AA, Rontani RMP. NaOCl effects on primary and permanent pulp chamber dentin. *J Dent*. 2008;36:745-53.
- Bourke P, Ziuzina D, Han L, Cullen PJ, Gilmore BF. Microbiological interactions with cold plasma. *J Appl Microbiol*. 2017;123:308-24.
- Busato AL, Hernandez PA, Candido MS, Porto CL, Reichert LA, Macedo RP, et al. *Dentística: novos princípios restauradores*. São Paulo: Artes Médicas; 2004.
- 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. PMID: 36685672; PMCID: PMC9859704.
- Cavalcante CM, Lima LML, Nascimento JVM, Gomes FA, Vitoriano MM, Viana LCTMC, Gurgel Filho ED, Aguiar BA. Análise dos irrigantes endodônticos contra o biofilme de *Enterococcus faecalis*: uma revisão integrativa. *Braz J Health Rev*. 2023;6(1):3092-103. /doi.org/10.34119/bjhrv6n1-241.
- Chen TP, Liang J, Su TL. Plasma-activated water: antibacterial activity and artifacts? *Environ Sci Pollut Res Int*. 2018;25(27):26699-26706. doi: 10.1007/s11356-017-9169-0. Epub 2017 May 24. PMID: 28540555.
- Chiappim W, Sampaio AdG, Miranda F, Fraga M, Petraconi G, da Silva Sobrinho A, Kostov K, Koga-Ito C, Pessoa R. Antimicrobial effect of plasma-activated tap water on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Candida albicans*. *Water*. 2021;13:1480. doi: 10.3390/w13111480.

Chipman DM. Absorption spectrum of OH radical in water. *J Phys Chem A*. 2008;112:13372–81. <https://doi.org/10.1021/jp807399b>

Coelho MB. Expressão dos genes ALP e BSP frente aos extratos de UDMA, BisGMA, óleo de copaíba e polímero da mamona sobre fibroblastos da polpa dental [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2013.

Dioguardi M, Di Gioia G, Illuzzi G, Arena C, Caponio V.C.A, Caloro, G.A, Lo Muzio L. Inspection of the microbiota in endodontic lesions. *Dent. J*. 2019, 7, 47.

Doria A.C.O, Figueira F.R, Lima J.S.B, Castro A.H.R, Sismanoglu B.N. Petraconi, G. et al. Inactivation of *Candida albicans* biofilms by atmospheric gliding arc plasma jet: effect of gas chemistry/flow and plasma pulsing. *Plasma Research Express*, 2018. Disponível em: [www.researchgate.net](http://www.researchgate.net).

Doria ACO, Sorge CPC, Santos TB, Brandão J, et al. Application of post-discharge region of atmospheric pressure argon and air plasma jet in the contamination control of *Candida albicans* biofilms. *Res Biomed Eng*. 2015;31(4):358-62. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/2446-4740.01215>.

Dubey S, Saha SG, Rajkumar B, Dhole TK. Comparative antimicrobial efficacy of selected root canal irrigants on commonly isolated microorganisms in endodontic infection. *Eur J Dent*. 2017. Disponível em: [https://www.thieme-connect.de/products/ejournals/pdf/10.4103/ejd.ejd\\_141\\_16.pdf](https://www.thieme-connect.de/products/ejournals/pdf/10.4103/ejd.ejd_141_16.pdf).

Duggan J, Sendgley C. Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2007;33(4):815-8. Disponível em: [https://www.jendodon.com/article/S0099-2399\(07\)00185-9/fulltext](https://www.jendodon.com/article/S0099-2399(07)00185-9/fulltext).

Faze C, et al. Simultaneous and long-lasting hydrophilization of inner and outer wall surfaces of polytetrafluoroethylene tubes by transferring atmospheric pressure plasmas. *J Phys D Appl Phys*. 2016;49:365202. [doi.org/10.1088/0022-3727/49/36/365202](https://doi.org/10.1088/0022-3727/49/36/365202)

Fransson H, Dawson V. Tooth survival after endodontic treatment. *Int Endod J*. 2023 Mar;56 Suppl 2:140-153. doi: 10.1111/iej.13835. Epub 2022 Oct 2. PMID: 36149887.

Fridman G, Brooks A, Balasubramanian M, Fridman A, Gutsol A, Friedman G, et al. Comparison of direct and indirect effects of non-thermal atmospheric-pressure plasma on bacteria. *Plasma Process Polym*. 2007;4:370-5. Disponível em: <https://www.researchgate.net>.

Fridman G, Brooks AD, Balasubramanian M, Fridman A, Gutsol A, Vasilets VN, Friedman G. Comparison of direct and indirect effects of non-thermal atmospheric-pressure plasma on bacteria. *Plasma Process Polym*. 2007;4:370-5.

Gherardi M, Tonini R, Colombo V. Plasma in dentistry: brief history and current status. *Trends Biotechnol.* 2018;36(6):583-5. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/Acesso em: 6 fev. 2021>.

Godoi-Jr EP, Bronzato JD, Francisco PA, Bicego-Pereira EC, Lopes EM, Passini MRZ, De-Jesus-Soares A, Almeida JFA, Marciano MA, Ferraz CCR, Gomes BPF. Microbiological profile of root canals indicated for endodontic retreatment due to secondary endodontic infections or for prosthetic reasons. *Clin Oral Investig.* 2023;27(5):2049-64. doi: 10.1007/s00784-023-04947-x. Epub 2023 Mar 31. PMID: 37002440.

Guo L, Xu R, Gou L, Liu Z, Zhao Y, Liu D, Zhang L, Chen H, Kong MG. Mechanism of Virus Inactivation by Cold Atmospheric-Pressure Plasma and Plasma-Activated Water. *Appl Environ Microbiol.* 2018 Aug 17;84(17):e00726-18. doi: 10.1128/AEM.00726-18. PMID: 29915117; PMCID: PMC6102979.

Guzzo SC, Finkler M, Reibnitz Júnior C, Reibnitz MT. Ortodontia preventiva e interceptativa na rede de atenção básica do SUS: perspectiva dos cirurgiões-dentistas da Prefeitura Municipal de Florianópolis, Brasil. *Cien Saude Colet.* 2014;19(2):449-60.

Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Dent Clin North Am.* 2010;54(2):291-312. doi: 10.1016/j.cden.2009.12.001. PMID: 20433979.

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. PMID: 24651335.

Habib M, Hottel TL, Hong L. Antimicrobial effects of non-thermal atmospheric plasma as a novel root canal disinfectant. *Clin Plasma Med.* 2014;2:17-21. Disponível em: <http://www.elsevier.com/locate/cpme>.

Heimann RB. The nature of plasma spraying. *Coatings.* 2023;13(3):622. doi: 10.3390/coatings13030622.

Jentzen W, Richter M, Nagarajah J, Poeppel TD, Brandau W, Dawes C, et al. Chewing-gum stimulation did not reduce the absorbed dose to salivary glands during radioiodine treatment of thyroid cancer as inferred from pre-therapy (124)I PET/CT imaging. *EJNMMI Phys.* 2014 Dec;1(1):100. doi: 10.1186/s40658-014-0100-1.

Jha N, Ryu JJ, Choi EH, Kaushik NK. Generation and role of reactive oxygen and nitrogen species induced by plasma, lasers, chemical agents, and other systems in dentistry. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:7542540.

Ji SH, Kim T, Panngom K, Hong YJ, Pengkit A, Park DH, et al. Assessment of the Effects of Nitrogen Plasma and Plasma-Generated Nitric Oxide on Early Development of *Coriandum sativum*. *Plasma Process Polym.* 2015;12:1164–73. <https://doi.org/10.1002/ppap.201500021>

Kaushik NK, Ghimire B, Li Y, Adhikari M, Veerana M, Kaushik N, et al. Biological and medical applications of plasma-activated media, water and solutions. *Biol Chem*. 2018;400(1):39-62. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi>.

Kerlikowsk A, Mattes R, Pink C, Steffen H, Schlüter R, Holtfreter B, et al. Effects of cold atmospheric pressure plasma and disinfecting agents on *Candida albicans* in root canals of extracted human teeth. *J Biophotonics*. 2020. Disponível em: <https://www.biophotonics-journal.org>.

Lan R, Tzortzis S, Desfosses Y, Signoli M, Tardivo D. [Study of remains and dental wastes of a First World War German rest camp]. *Odontostomatol Trop*. 2014;37(148):13-24. French.

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;3:53-61.

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. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/>.

Ledernez L, Engesser F, Altenburger MJ, Urban GA, Bergmann ME. Effect of transient spark disinfection on various endodontics-relevant bacteria. *Plasma Med*. 2019;9:121-8.

Lee HR, Lee YS, You YS, Huh JY, Kim K, Hong YC, Kim CH. Antimicrobial effects of microwave plasma-activated water with skin protective effect for novel disinfectants in pandemic era. *Sci Rep*. 2022;8;12(1):5968. doi: 10.1038/s41598-022-10009-1. PMID: 35396389; PMCID: PMC8992786.

Leite LDP, Oliveira MAC, Vegian MRDC, Sampaio ADG, Nishime TMC, Kostov KG, Koga-Ito CY. Effect of Cold Atmospheric Plasma Jet Associated to Polyene Antifungals on *Candida albicans* Biofilms. *Molecules*. 2021;26(19):5815. doi: 10.3390/molecules26195815. PMID: 34641359; PMCID: PMC8510435.

Li N, Liu Z, Wang P, Suman K, Zhang J, Song Y. Effects of sodium hypochlorite treatment on the chlorophyll fluorescence in photosystem II of microalgae. *Sci Total Environ*. 2022;833:155192. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.155192. Epub 2022 Apr 12. PMID: 35421461.

Li Y, Sun K, Ye G, Liang Y, Pan H, Wang G, Zhao Y, Pan J, Zhang J, Fang J. Evaluation of Cold Plasma Treatment and Safety in Disinfecting 3-week Root Canal *Enterococcus faecalis* Biofilm In Vitro. *J Endod*. 2015 Aug;41(8):1325-30. doi: 10.1016/j.joen.2014.10.020. Epub 2015 May 28. PMID: 26027875.

Li Y, Ye G, Zhang Q, Wang J, Zhang J, Fang J. In vitro studies of the antimicrobial effect of non-thermal plasma-activated water as a novel mouthwash. *Eur J Oral Sci.* 2017;125(6):463-70. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/>.

Li Y, Pan J, Wu D, Tian Y, Zhang J, et al. 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.* 2018. Disponível em: <https://www.researchgate.net>.

Lima GMG, Borges AC, Nishime TMC, Santana-Melo GF, Kostov KG, Mayer MPA, Koga-Ito CY. Jato de plasma atmosférico frio como possível terapia adjuvante para doenças periodontais. *Moléculas.* 2021;26(18):5590. doi: 10.3390/moléculas26185590. PMID: 34577061; IDPM: PMC8470429.

Lin LM, Ricucci D, Saoud TM, Sigurdsson A, Kahler B. Vital pulp therapy of mature permanent teeth with irreversible pulpitis from the perspective of pulp biology. *Aust Endod J.* 2020;46(1):154-166. doi: 10.1111/aej.12392. Epub 2019 Dec 21. PMID: 31865629.

Liu Z, Zhou C, Liu D, He T, Guo L, Xu D, Kong MG. Quantifying the concentration and penetration depth of long-lived RONS in plasma-activated water by UV absorption spectroscopy. *AIP Adv.* 2019;9. <https://doi.org/10.1063/1.5037660>

Lu X, Cao Y, Yang P, Xiong Q, Xiong Z, Xian Y, Pan Y. An RC plasma device for sterilization of root canal of teeth. *IEEE Trans Plasma Sci.* 2009;37(5). Disponível em: <https://www.researchgate.net>.

Mai-Prochnow A, Zhou R, Zhang T, Ostrikov KK, Mugunthan S, Rice SA, Cullen PJ. Interactions of plasma-activated water with biofilms: inactivation, dispersal effects and mechanisms of action. *NPJ Biofilms Microbiomes.* 2021;7(1):11. doi: 10.1038/s41522-020-00180-6. PMID: 33504802; PMCID: PMC7841176.

Mansur Filho J, Almeida Júnior GL, Jorge JK, Sá Júnior SG, Renato J. Fat pulmonary embolism during orthopedic surgery monitored through transesophageal echocardiogram. *Arq Bras Cardiol.* 2005;85(4):289.

Meijide S, Hernández ML, Navarro R, Larreategui Z, Ferrando M, Ruiz-Sanz JI, et al. Glutathione S-transferase activity in follicular fluid from women undergoing ovarian stimulation: role in maturation. *Free Radic Biol Med.* 2014 Oct;75 Suppl 1:S41. PubMed PMID: 26461371.

Melo TFd, Rocha LC, Silva RP, Pessoa RS, Negreiros AMP, Sales Júnior R, Tavares MB, Alves Junior C. Plasma–Saline Water Interaction: A Systematic Review. *Materials.* 2022;15:4854. <https://doi.org/10.3390/ma15144854>

Meltzer OS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. The genetic basis of human cancer. New York: McGraw-Hill; 2002.

Milhan NVM, Chiappim W, Sampaio AdG, Vegian MRdC, Pessoa RS, Koga-Ito CY. Aplicações da Água Ativada por Plasma na Odontologia: Uma Revisão. *Revista Internacional de Ciências Moleculares*. 2022; 23(8):4131. <https://doi.org/10.3390/ijms23084131>

Mirpour S, Fathollah S, Mansouri P, Larijani B, Ghoranneviss M, Mohajeri TM, Amini MR. Cold atmospheric plasma as an effective method to treat diabetic foot ulcers: a randomized clinical trial. *Sci Rep*. 2020;10:10440.

Mumtaz S, Rana JN, Lim JS, Javed R, Choi EH, Han I. Effect of Plasma On-Time with a Fixed Duty Ratio on Reactive Species in Plasma-Treated Medium and Its Significance in Biological Applications. *Int J Mol Sci*. 2023;24(6):5289. doi: 10.3390/ijms24065289. PMID: 36982365; PMCID: PMC10049170.

Muzio L. Inspection of the microbiota in endodontic lesions. *Dent. J*. 2019;7:47

Narayanan L, Vaishnavi C. Endodontic microbiology. *J Conserv Dent*. 2010;13(4):233-9. Disponível em: <https://www.jcd.org.in/article.asp?issn=0972-0707;year=2010;volume=13;issue=4;spage=233;epage=239;aulast=Narayanan>.

Neelakantan P, Romero M, Vera J, Daood U, Khan AU, Yan A, Cheung GSP. Biofilms in endodontics—Current status and future directions. *Int J Mol Sci*. 2017;18:1748.

Neelakantan P, Herrera DR, Pecorari VGA, Gomes BPFA. Endotoxin levels after chemomechanical preparation of root canals with sodium hypochlorite or chlorhexidine: a systematic review of clinical trials and meta-analysis. *Int Endod J*. 2019;52(1):19-27. doi: 10.1111/iej.12963. Epub 2018 Jul 3. PMID: 29884999.

Nouroloyouni A, Moghaddam N, Nouroloyouni S, Salem M.A, Yavary H, Majidi A. Molecular Identification of *Candida albicans* in Endodontic Retreatment Cases by SYBR Green I Real-time Polymerase Chain Reaction and its Association with Endodontic Symptoms. *J Dent*. 2023. doi: 10.30476/dentjods.2023.91706.1786

Pałka Ł, Nowakowska-Toporowska A, Dalewski B. Is Chlorhexidine in Dentistry an Ally or a Foe? A Narrative Review. *Healthcare (Basel)*. 2022;10(5):764. doi: 10.3390/healthcare10050764. PMID: 35627901; PMCID: PMC9141996.

Pascon FM, Kantovitz RS, Soares LES, Santo AM. Morphological and chemical changes in dentin after using endodontic agents: Fourier transform Raman spectroscopy, energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry, and scanning electron microscopy study. *J Biomed Opt*. 2012;17(7). Disponível em: <https://www.repositorio.unicamp.br/>.

Paula VAC, Pinheiro RS, Pedro RL, Santos KRN, Primo LGS, Maia LC. Microorganisms involved in endodontic infection of permanent teeth: a systematic review. *Afr J Microbiol Res*. 2013;7(18):1819-26. Available from: <https://www.researchgate.net>

Poppolo DF, Ouanounou, A. Chlorhexidine in Dentistry: Pharmacology, Uses, and Adverse Effects. *Int Dent J*. 2022;72(3):269-277. doi: 10.1016/j.identj.2022.01.005. Epub 2022 Mar 12. PMID: 35287956; PMCID: PMC9275362.

Prada I, Micó-Muñoz P, Giner-Lluesma T, Micó-Martínez P, Collado-Castellano N, Manzano-Saiz A. Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2019;24(3):e364-e372. doi: 10.4317/medoral.22907. PMID: 31041915; PMCID: PMC6530959.

Qayyum A, Zeb S, Ali S, Waheed A, Zakaullah M. Optical emission spectroscopy of abnormal glow region in nitrogen plasma. *Plasma Chem Plasma Process*. 2005;25:551–64. <https://doi.org/10.1007/s11090-005-4999-9>

Ran S, Wang J, Jiang W, Zhu C, Liang J. Assessment of dentinal tubule invasion capacity of *Enterococcus faecalis* under stress conditions ex vivo. *Int Endod J*. 2014. Disponível em <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/iej.12322>.

Rather MA, Gupta K, Mandal M. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Braz J Microbiol*. 2021;52(4):1701-1718. doi: 10.1007/s42770-021-00624-x. Epub 2021 Sep 23. PMID: 34558029; PMCID: PMC8578483.

Rog-Zielinska EA, Craig MA, Manning JR, Richardson RV, Gowans GJ, Dunbar DR, et al. Glucocorticoids promote structural and functional maturation of foetal cardiomyocytes: a role for PGC-1 $\alpha$ . *Cell Death Differ*. 2014 Oct 31. doi: 10.1038/cdd.2014.181.

Rothwell JG, Alam D, Carter DA, Soltani B, McConchie R, Zhou R, Cullen PJ, Mai-Prochnow A. The antimicrobial efficacy of plasma-activated water against *Listeria* and *E. coli* is modulated by reactor design and water composition. *J Appl Microbiol*. 2022;132(4):2490-2500. doi: 10.1111/jam.15429.

Rovetta-Nogueira SM, Borges AC, Oliveira Filho M, Nishime TMC, Hein LRO, Kostov KG, Koga-Ito CY. Helium Cold Atmospheric Plasma Causes Morphological and Biochemical Alterations in *Candida albicans* Cells. *Molecules*. 2023;28(23):7919. doi: 10.3390/molecules28237919. PMID: 38067648; PMCID: PMC10707892.

Ruksakiet K, Hanák L, Farkas N, Hegyi P, Sadaeng W, Czumbel LM, Sang-Ngoen T, Garami A, Mikó A, Varga G, Lohinai Z. Antimicrobial Efficacy of Chlorhexidine and Sodium Hypochlorite in Root Canal Disinfection: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *J Endod*. 2020;46(8):1032-1041.e7. doi: 10.1016/j.joen.2020.05.002. Epub 2020 May 12. PMID: 32413440.

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. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/20/5216>.

Saleewong K, Wanachantararak P, Louwakul P. Efficacy of cold atmospheric pressure plasma jet against *Enterococcus faecalis* in apical canal of human single-rooted teeth: A preliminary study. In Proceedings of the International Conference on Materials Research and Innovation, Bangkok, Thailand, 17–21 December 2018.

Sampaio AD, Chiappim W, Milhan NV, Botan NB, Pessoa R, Koga-Ito CY. Effect of the pH on the antibacterial potential and cytotoxicity of different plasma-activated liquids. *Int J Mol Sci.* 2022;23(22):13893. doi: 10.3390/ijms232213893.

Seo H, Hong J, Kim T, Choi WL, Sung D, Moon E. Super-antibiofilm effect of N<sub>2</sub> plasma treated buffer (NPB) against plant pathogenic bacterium. *J Biol Eng.* 2019;13:94. doi: 10.1186/s13036-019-0222-z.

Shah U, Wang Q, Kathariou S, Salvi D. Optimization of Plasma-activated Water and Validation of a Potential Surrogate for Salmonella for Future Egg Washing Processes. *J Food Prot.* 2023;86(1):100029. doi: 10.1016/j.jfp.2022.100029. Epub 2022 Dec 15. PMID: 36916588.

Shen J, Tian Y, Li Ma, Zhang M, Qian, et al. Bactericidal effects against *S. aureus* and physicochemical properties of plasma activated water stored at different temperatures. *Scientific Reports*, 2016. Disponível em: [www.nature.com/scientificreports](http://www.nature.com/scientificreports).

Shetty SR, Al-Bayati SAAF, Narayanan A, Hamed MS, Abdemagyd HAE, Shetty P. Sodium hypochlorite accidents in dentistry. A systematic review of published case reports. *Stomatologija.* 2020;22(1):17-22. PMID: 32706342.

Sigurdsson A, Garland RW, Le KT, Woo SM. 12-month Healing Rates after Endodontic Therapy Using the Novel GentleWave System: A Prospective Multicenter Clinical Study. *J Endod.* 2016;42(7):1040-8. doi: 10.1016/j.joen.2016.04.017. PMID: 27325455.

Silva WJ, Seneviratne J, Parahitiyawa N, Rosa EAR, Samaranayake LP, Del AA. Improvement of XTT assay performance for studies involving *Candida albicans* biofilms. *Braz Dent J.* 2008;19:364-9. doi: 10.1590/S0103-64402008000400014.

Simoncelli E, Barbieri D, Laurita R, Liguori A, Stancampiano A, Viola L, Colombo V. Preliminary investigation of the antibacterial efficacy of a handheld Plasma Gun source for endodontic procedures. *Clin. Plasma Med.* 2015;3:77–86.

Siqueira J.F, Rôças I.N. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J. Dent. Res.* 2009, 88, 969–981.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Present status and future directions: Microbiology of endodontic infections. *Int Endod J.* 2022 May;55 Suppl 3:512-530. doi: 10.1111/iej.13677. Epub 2022 Jan 13. PMID: 34958494.

Sismanoglu S, Ercal P. The cytotoxic effects of various endodontic irrigants on the viability of dental mesenchymal stem cells. *Aust Endod J*. 2022;48(2):305-312. doi: 10.1111/aej.12570. Epub 2021 Sep 29. PMID: 34590392.

Silva WJ, Seneviratne J, Parahitiyawa N, Rosa EAR, Samaranayake LP, Del AA. Improvement of XTT assay performance for studies involving *Candida albicans* biofilms. *Braz Dent J*. 2008;19:364-9. doi: 10.1590/S0103-64402008000400014.

Smith C Jr, Milewski E, Martin MA. The effect of colonizing mice with laboratory and wild type strains of *E. coli* containing tumor virus genomes. *Recomb DNA Tech Bull*. 1985;8(2):47-51.

ISO. 10993-5:2009; Biological Evaluation of Medical Devices—Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2009. Available online: <https://www.iso.org/standard/36406.html>

Song YP, Lv JW, Zhang ZC, Qian QH, Fan YJ, Chen DZ, Zhang H, Xu FX, Zhang C, Huang Y, Wang H, Wei W, Xu DX. Effects of Gestational Arsenic Exposures on Placental and Fetal Development in Mice: The Role of *Cyr61m6A*. *Environ Health Perspect*. 2023;131(9):97004. doi: 10.1289/EHP12207.

Subramanian PSG, Jain A, Shivapuji AM, Sundaresan NR, Dasappa S, Rao L. Plasma-activated water from a dielectric barrier discharge plasma source for the selective treatment of cancer cells. *Plasma Process Polym*. 2020;17(8):1900260. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/>.

Tanaka H, Nakamura K, Mizuno MI. Non-thermal atmospheric pressure plasma activates lactate in Ringer's solution for anti-tumor effects. *Sci Rep*. 2016;6:36282. Disponível em: <https://www.nature.com>.

Thee S, Garcia-Prats AJ, Draper HR, McIlhannon HM, Wiesner L, Castel S, et al. The pharmacokinetics and safety of moxifloxacin in children with multidrug-resistant tuberculosis. *Clin Infect Dis*. 2014. pii: ciu868.

Traylor MJ, Karim S, Hait P, Sakyama Y, Clark DS, Graves DB. Long-term antibacterial efficacy of air plasma-activated water. *J Phys D Appl Phys*. 2011;44. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org>.

Tsoukou E, Bourke P, Boehm D. Temperature stability and effectiveness of plasma-activated liquids over an 18 months period. *Water*. 2020;12. Disponível em: [www.mdpi.com/journal/water](http://www.mdpi.com/journal/water).

Von T, Emmert SR, Metelmann HR, Rupf S, Weltmann KD. Perspectives on cold atmospheric plasma (CAP) applications in medicine. *Phys Plasmas*. 2020;27(7):070601. Disponível em: <https://aip.scitation.org/doi/full/10.1063/5.0008093>.

Xu D, Wang S, Li B, Qi M, Feng R, Li Q, et al. Effects of plasma-activated water on skin wound healing in mice. *Microorganisms*. 2020;8(7):1091. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/7/1091>.

Xu Z, Zhou X, Yang W, Zhang Y. In vitro antimicrobial effects and mechanism of air plasma-activated water on *Staphylococcus aureus* biofilm. *Plasma Process Polym*. 2020. Disponível em: [www.researchgate.net](http://www.researchgate.net).

Yinglong L, Ke S, Guopin Y, Yongdong L, Hong P, Guomin W, Yijiao Z, Jie P, Jue Z, Jing F. Evaluation of cold plasma treatment and safety in disinfecting 3-week root canal *Enterococcus faecalis* biofilm in vitro. *J Endod*. 2015;41(8):1325-30. doi: 10.1016/j.joen.2014.10.020.

Yoo YJ, Kim AR, Perinpanayagam H, Han SH, Kum KY. *Candida albicans* virulence factors and pathogenicity for endodontic infections. *Microorganisms*. 2020;8:1300.

Zhang H, Wei J, Xv H, Khan I, Sun Q, Zhao X, Gao J, Liu S, Wei S. Bactericidal efficacy of plasma-activated water against *Vibrio parahaemolyticus* on *Litopenaeus vannamei*. *Front Nutr*. 2024;11:1365282. doi: 10.3389/fnut.2024.1365282. PMID: 38515524; PMCID: PMC10954878.

Zhao YM, Patange A, Sun DW, Tiwari B. Plasma-activated water: Physicochemical properties, microbial inactivation mechanisms, factors influencing antimicrobial effectiveness, and applications in the food industry. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2020;19:3951-79.

Zhou R, Zhou R, Prasad K, Fang Z, Speight R, Bazaka K, Ostrikov K. Cold atmospheric plasma activated water as a prospective disinfectant: The crucial role of peroxynitrite. *Green Chem*. 2018;20:5276–84. <https://doi.org/10.1039/c8gc02800a>

## ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética

INSTITUTO DE CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA - CAMPUS DE  
SÃO JOSÉ DOS CAMPOS -  
UNESP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** APLICAÇÕES DE PLASMAS ATMOSFÉRICOS NÃO TÉRMICOS NA ENDODONTIA

**Pesquisador:** ANA BESSA MUNIZ

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 54062521.3.0000.0077

**Instituição Proponente:** Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.179.994

#### Apresentação do Projeto:

Texto extraído do doc Informações básicas do projeto: "O insucesso do tratamento endodôntico é frequentemente relacionado à presença de micro-organismos remanescentes, em decorrência da dificuldade para a eliminação de biofilmes e das limitações dos irrigantes convencionais. O plasma frio vem sendo sugerido para várias aplicações na área da saúde. Mais recentemente, o uso indireto do plasma, por meio de líquidos ativados, tem apresentado grande potencial de aplicação. O objetivo deste projeto é avaliar a aplicabilidade do líquido ativado por plasma como irrigador endodôntico e comparar com a aplicação direta do plasma, para promover a inibição de micro-organismos relacionados ao insucesso do tratamento endodôntico de dentes permanentes."

#### Objetivo da Pesquisa:

Segundo texto extraído do projeto, o objetivo geral do estudo é "Avaliar a aplicabilidade do líquido ativado com plasma no tratamento endodôntico e comparar com a aplicação direta do plasma não térmico, visando à redução de micro-organismos relacionados ao insucesso do tratamento endodôntico de dentes permanentes."

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo pesquisador: "Riscos: Ainda que o estudo utilize apenas dentes já extraídos (ex vivo) os dentes podem sofrer quebras e fraturas (principalmente os já fragilizados após a extração). Benefícios: A originalidade e benefícios desta proposta está na utilização de nova

**Endereço:** Av. Engº Francisco José Longo 777 - Ramal 9028

**Bairro:** Jardim São Dimas

**CEP:** 12.245-000

**UF:** SP

**Município:** SÃO JOSÉ DOS CAMPOS

**Telefone:** (12)3947-9078

**Fax:** (12)3947-9000

**E-mail:** ceph.ict@unesp.br

**INSTITUTO DE CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA - CAMPUS DE  
SÃO JOSÉ DOS CAMPOS -  
UNESP**



Continuação do Parecer: 5.179.994

tecnologia, o líquido ativado por plasma, no tratamento endodôntico, visando ao aumento de sua eficácia no controle das infecções dos canais radiculares. Os resultados podem reduzir o insucesso desse tratamento, registrado ao longo dos anos, e a perda de elementos dentários. Novas tecnologias, comprovadamente eficazes, seguras e acessíveis, podem ser adicionadas futuramente aos protocolos de tratamento endodôntico de dentes permanentes."

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Segundo informação do pesquisador, esta solicitação está vinculada ao Projeto temático (2019/05856-7). O projeto, como um todo, está apresentado adequadamente no sentido de apresentar detalhada e criteriosamente todas as partes textuais. Especificamente, o capítulo materiais e métodos descreve todos os procedimentos esclarecendo ou destacando a parte que cabe à análise do CEP. Também, cabe destacar texto do pesquisador sobre a originalidade do estudo: "...utilização de nova tecnologia, o líquido ativado por plasma, no tratamento endodôntico, visando ao aumento de sua eficácia no controle das infecções dos canais radiculares. Os resultados podem reduzir o insucesso desse tratamento, registrado ao longo dos anos, e a perda de elementos dentários. Novas tecnologias, comprovadamente eficazes, seguras e acessíveis, podem ser adicionadas futuramente aos protocolos de tratamento endodôntico de dentes permanentes."

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O pesquisador assinalou, provavelmente por equívoco, no documento Informações básicas do projeto, que não haveria dispensa do TCLE. No entanto, este documento não se faz necessário neste estudo, e não está, corretamente, inserido no projeto como anexo. O documento inserido corretamente é o Termo de cessão de material biológico, no caso dentes humanos recém extraídos. Este documento está devidamente apresentado e pontua que os termos de cessão devem estar nos prontuários dos pacientes, e que o CEP poderá solicitar cópias dos documentos corretamente preenchidos por cada doador ou seu representante legal.

**Recomendações:**

Não se aplica.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há pendências. O projeto "APLICAÇÕES DE PLASMAS ATMOSFÉRICOS NÃO-TÉRMICOS NA ENDODONTIA" está aprovado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Colegiado aprova o presente protocolo,

|                                                                 |                                       |                                  |  |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|--|
| <b>Endereço:</b> Av Engº Francisco José I. ngn 777 - Ramal 9028 |                                       |                                  |  |
| <b>Bairro:</b> Jardim São Dimas                                 | <b>CEP:</b> 12.245-000                |                                  |  |
| <b>UF:</b> SP                                                   | <b>Município:</b> SAO JOSE DOS CAMPOS |                                  |  |
| <b>Telefone:</b> (12)3947-9078                                  | <b>Fax:</b> (12)3947-9000             | <b>E-mail:</b> ceph.ict@unesp.br |  |

**INSTITUTO DE CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA - CAMPUS DE  
SÃO JOSÉ DOS CAMPOS -  
UNESP**



Continuação do Parecer: 5.179.994

O (a) pesquisador(a) irá receber e-mail da Secretaria do CEPH-ICT-CAMPUS DE SJCAMPOS-UNESP, para envio de relatórios parciais/final, para não incorrer na penalidade de não o fazendo, em não ter novas submissões avaliada pelo Comitê de Ética, até que sane a pendência de envio do relatório, na forma de notificação através do sistema da Plataforma Brasil. Obs:- No site <https://www2.ict.unesp.br/> – Sobre o ICT – Comissões e Comitês - Comitê de Ética Envolvendo Seres Humanos, encontrará o formulário para envio do Relatório parcial/final.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

| Tipo Documento                                            | Arquivo                                       | Postagem               | Autor           | Situação |
|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------|-----------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto                            | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1865078.pdf | 26/11/2021<br>13:12:15 |                 | Aceito   |
| Folha de Rosto                                            | folha.pdf                                     | 26/11/2021<br>13:11:29 | ANA BESSA MUNIZ | Aceito   |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | termodecessao.pdf                             | 25/11/2021<br>13:57:14 | ANA BESSA MUNIZ | Aceito   |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador                 | projeto_plasma.pdf                            | 24/11/2021<br>13:40:32 | ANA BESSA MUNIZ | Aceito   |

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO JOSE DOS CAMPOS, 20 de Dezembro de 2021

---

**Assinado por:  
Denise Nicodemo  
(Coordenador(a))**

**Endereço:** Av. Engº Francisco José Longo 777 - Ramal 9028  
**Bairro:** Jardim São Dimas **CEP:** 12.245-000  
**UF:** SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS  
**Telefone:** (12)3947-9078 **Fax:** (12)3947-9000 **E-mail:** ceph.ict@unesp.br