

Raport Științific al Etapei 3 – August 2022

Rezumatul etapei

În această etapă s-a urmărit: Aplicarea optimizărilor realizate pe modelul de hidroxiapatita asupra esantioanelor de smalt natural pentru verificarea eficienței acestora *in vitro*, în ceea ce privește capacitatea de fluorurare și modularea a biofilmului bacterian în urma tratamentului cu plasmă.

Activitățile propuse și realizate în această etapă sunt:

III.1. Aplicarea tratamentelor cu plasmă optimizate și a variantelor experimentale (fluorurare prin aplicare de gel fluorurat/ fluorurare cu gaze fluorurate) pentru fluorurarea smalțului dentar (probe din dinți naturali): selectarea și procesarea probelor de dinți/smalt, aplicarea parametrilor optimați de generarea a tratamentelor cu plasmă pentru fluorurarea smalțului dentar.

III.2. Caracterizarea morfologică, compozițională și a umectabilității probelor de smalț dentar (tratate și netratate cu plasmă) prin Microscopie electronică de baleiaj (SEM), Spectroscopie de fotoelectroni cu raze X (XPS), Spectroscopie de raze X cu dispersie de energie (EDX), analiza unghiului de contact, IR.

III.3. Analiza dezvoltării biofilmelor microbiene pe probele de smalț dentar, după tratament cu plasmă prin aplicarea modelelor microbiene și a metodelor optimizate în etapa anterioară (analiza SEM și numărare colonii viabile).

III.4. Participarea la conferințe științifice și simpozioane în domeniu (cel puțin 1 participare la conferința/simpozion).

III.5. Scrierea și publicarea de lucrări științifice în reviste de prestigiu în domeniu (cel puțin 1 articol ISI).

Rezultate

III.1. Aplicarea tratamentelor cu plasmă optimizate și a variantelor experimentale (fluorurare prin aplicare de gel fluorurat/ fluorurare cu gaze fluorurate) pentru fluorurarea smalțului dentar (probe din dinți naturali): selectarea și procesarea probelor de dinți/smalt, aplicarea parametrilor optimați de generarea a tratamentelor cu plasmă pentru fluorurarea smalțului dentar.

Pentru această activitate au fost efectuate un prim set de experimente în condițiile identificate anterior pentru hidroxiapatita (HAP). În funcție de rezultatele obținute, au fost optimizați parametrii cum ar fi distanța de tratament, puterea injectată în plasmă, timpul de tratare sau numărul de scanări. Datele experimentale de tratament rafinate pentru HAP au fost ulterior folosite pentru tratamentul esantioanelor de dinte natural, ce conțin smalțul dentar pe cel puțin una dintre laturi.

Bucățile de dinți furnizate de partenerul P3_UMF, au fost scoase din serul fiziologic și supuse unui tratament de sonicare (15 minute în alcool etilic + încă 15 minute în apă bidistilată). După procesul de sonicare, bucățile de dinți (vezi figura 1) au fost transferate în godeuri ale unei plăci sterile cu 24 godeuri.

Godeurile cu bucățile de dinți au fost uscate o perioadă de 20 de ore în etuvă la o temperatură de 37°C. Bucățile/feliile de dinte au fost denumite după denumirea flacoanelor cu dinți (D1- D8), iar feliile din acești dinți au fost notate cu D1.1-..D1.4; D2.1-D2.4; D3.1-...etc. Ulterior, în urma

masuratorilor de XPS am observat ca aceste felii/bucati de dinte erau prea mari si gazau si a fost necesara sectionarea lor in bucati mult mai mici astfel au rezultat noi denumiri de tipul DSP1-DSP3 (DSP = reprezinta un dinte sectionat in mai multe bucati). Atat probele initiale cat si cele tratate au fost investigate ulterior prin SEM, EDX, IR, XPS si unghi de contact.

In timpul experimentelor pe feliile de dinti, aceste bucati au fost fixate cu banda adeziva (scoci) de Cu pentru a nu fi deplasate de către fluxurile de gaz in care se generează plasma (cu atât mai mult bucățile mici din DSP).

Intr-un prim set de experimente, s-au folosit conditiile stabilite anterior pentru HAP, inclusiv distantele dintre sursa de plasma si pastile (0.8mm pentru plasma DBD si 14 mm in cazul plasmei DBE in care am introdus SF₆). Ulterior am observat ca in cazul tratamentului cu plasma in care am injectat SF₆, distanta era mica si am putut observa o usoara ingalbenire a bucatilor de dinte, dar si o contaminare cu materiale din duza si electrodul sursei de plasma. Astfel, pentru ultimele seturi de probe tratate cu SF₆ am ales o distanta de 2,4 cm (am indepartat suportul superior de prindere al probeleor -figura 3c)- si proba a fost fixat direct cu scoci de Cu).

III.2. Caracterizarea morfologică, compozițională și a umectabilității probelor de smalț dentar (tratate și netratate cu plasma) prin Microscopie electronica de baleiaj (SEM), spectroscopie de fotoelectroni cu raze X (XPS), Spectroscopie de raze X cu dispersie de energie (EDX), analiza unghiului de contact, IR.

Microscopie electronica de baleiaj (SEM)

In urma investigărilor SEM nu am observat modificări majore ale morfologiei, in condițiile unor tratamente „blânde” cu plasma, asa cum se poate observa din figurile 4 si 5. Aceste imagini SEM sunt asemanatoare cu raportarile din literatura de specialitate [i, ii, iii]

In imaginile SEM pentru primul set de tratamente cu SF₆ (170W si distanta mica de 14 mm), figura 4 d) si e), putem observa aparitia unor cratere, si smaltul are aspect de fagure, dar aceste formatiuni pot aparea si pe un dinte netratat, pe unul ultrasonicat, demineralizat sau in cazul uscarii dupa o perioada lunga de timp [iv].

In cazul tratamentelor cu gel, imaginile SEM indica aparitia unui film subtire care acopera smaltul dentar. Pentru tratamentele cu SF₆ la puteri mai mici, nu se mai vad acele cratere, chiar si la mariri de 5000X.

Analizele EDX pe primul set de probe de dinți si dinți tratați cu plasma de SF₆ au fost realizate in mai multe zone din proba, iar rezultatele prezentate in continuare indica o medie a procentului atomic. Pentru primul set de experimente se observa o incorporare in material a unui procent mare de F, dar si o contaminare cu elemente din duza si electrodul sursei (Hf, Ni, Cu). Pentru a reduce contribuția acestor elemente, a fost realizat un set II de probe tratate in SF₆ la o distanta mai mare si o putere injectata in plasma mai mica (140 W fata de setul I, unde au fost folosiți 170W)

Pentru o mai simpla observare a evoluției procentul de fluor din probele investigate, am ales prezentarea doar a mediei procentului de fluor (rezultat din măsurarea in 3 zone a Fluorului).

Metoda EDX este una calitativa, mai putin precisa mai ales pentru elementele ușoare si gaze cum ar fi oxigenul. De aceea s-a apelat la metoda XPS (vezi mai jos).

Au fost situații cand pe acelasi dinte s-au gasit procente foarte diferite de fluor (chiar si probele initiale/netratate s-au dovedit a fi neuniforme compozitional), o posibila explicatie ar fi ca sunt neuniforme pe inaltime sau dintr-o eroare au fost masurate pe fata plana (unde a fost taiata). O alta posibila explicatie ar fi variatia in timp a procentului de fluor din cauza aparitiei carbonului de contaminare ce apare pe probe in timpul stocarii. De curand am identificat un articol [v] in care

spuneau ca este posibila variatie in timp a cantitatii de fluor, cantitatea de fluor scazand de la ~6% la 0.6% dupa o saptamana asa cum voi prezenta in sectiunea XPS de mai jos.

De exemplu, in cazul probei provenite din dintele D5, diferenta intre mediile procentuale din felia D5.1 si D5.2 este destul de mare (de la 2.67% la respectiv 0.97%), in schimb se vede clar o evolutie crescatoare a procentului de fluor in urma tratamentului cu SF₆ in cazul probelor D5.1-SF₆ , D 1.1 tratat SF₆ si D 2.1 tratat SF₆ cu 11% F (cel mai mare procent detectat din toate probele).

Daca se face o medie a procentului de F pe probele initiale (medie pe procentul de F pe dinti netratați set II), putem observa o crestere a mediei procentului de F de la o valoare de 1.6%, la peste 1.9% in cazul tratarii cu gel sau plasma-gel (activare in plasma urmata de tratament cu gel), si clar un continut net crescut in cazul plasmei in care am introdus SF₆.

Analiza XPS

Pe langa elementele constituinte ale smaltului dentar, am mai identificat procente mici de Cu si Hf, care provin din electrozii sursei de plasma (contaminanti care pot fi eliminati in cazul folosirii unor puteri RF scazute si timpi mici de tratament), mai pot aparea procente mici Na si Cl din serul fiziologic daca proba nu este clatita si sonicata corespunzator.

In literatura de specialitate raportarile prezinta procente de fluor de ordinul a cateva procente (1-3%), dar exista si raportari in care in compozitia smaltului dentar raportata nu exista fluor [vi]. Analiza XPS a aratat ca care probele din smalt dentar (initial/netratat) nu contin cantitati detectabile de fluor, in schimb dupa un tratament cu plasma al smaltului se poate vedea prezenta F (F1s la 284 eV) in spectrele XPS. Investigarile mai amanuntite din acest caz au pus in evidenta faptul ca procentul de F1s scade in timp de o saptamana de la 6% la 0%, dupa ce suprafata probei este acoperita de carbon contaminant din mediul ambiant.

Cel mai important, prin alegerea parametrilor corespunzatori setului II de experimente cu SF₆, a fost eliminata impurificarea cu elemente provenind de la electrodul sursei DBE.

S-a observat ca dintele DSP3 - initial nu contine fluor detectabil in XPS. Asa cum aminteam si mai sus, e posibil ca sa fie un dinte imbatranit, fara fluor la suprafata [v].

Chiar daca initial am crezut ca in zona C1s apar si grupari C-F pentru peak-ul mai mic de la ~288,6 eV nu este de tip CF, pentru ca acest tip de legatura apare si in mostrele de dinte initial. Toti autorii din literatura spun ca Fluorul se leaga de Calciu si nu de carbon. Daca nu avem legaturi de tip CF in zona carbonului atunci aceste legaturi CF trebuia identificate si in zona fluorului. In zona fluorului avem legaturi de tip CaF₂ la ~ 684.8 eV.

Conform figurii 11b1, unde am reprezentat o comparatie la tratamentele cu SF₆ (set I si II) se poate vedea ca acel peak de la 288.6 este C=O (apare si in dintele initial, curba neagra nDSP2). O mica urma ar putea fi la D2.1-SF₆ dupa 290 eV, oricum dupa ajustarea conditiilor (DSP2-SF₆) nu mai avem nici un dubiu sa apara fluorocarbon. Probele din set I -in zona carbonului probele par mai „curatate” o posibila indepare a carbonului organic cu multe feluri de legaturi de tip C-O (dispare cel de al doilea peak al carbonului).

Masuratori de unghi de contact

Un review de literatura recent care dezbate umectibilitatea smaltului dentar dar, sugereaza ca aceasta poate varia in limite largi in functie de diverse tratamente aplicate pe dinte [vii]. Raportarile din literatura referitoare la smaltul dentar prezinta unghiuri de 65 de grade [viii], care scad odata cu tratamentul in plasma. Un alt exemplu [ix] raportează unghiuri de contact de ~84°, dar si scăderea acestor unghiuri de contact odată cu tratamentul cu plasma de He.

Măsurătorile de unghi de contact au arătat ca probele de dinte netratate au un unghi de contact de ~ 78 grade și scade în cazul tratamentului cu gel la un unghi de 53.6° și la 49.1° pentru o proba tratată cu plasma+gel, în schimb, dintele devine hidrofob după tratamentul în plasma de SF₆ în cazul probei D1.2-SF₆ -cu un unghi de 107.8° . Dacă în cazul tratamentului cu plasma de SF₆-dentina devine hidrofoba, tratamentul de hidrofobizare nu este valabil și în cazul tratării în SF₆ a hidroxiapatitei HAP-SF₆ (un tratament similar în plasma de SF₆ în aceleași condiții cu proba D1.2-SF₆).

Microscopia in Infrarosu (IR)

IR permite o cartografiere din punct de vedere al distribuției grupelor funcționale pe suprafața de caracterizat. Analiza a fost realizată cu ajutorul echipamentului Nicolet iN10 MX FT-IR (Thermo Scientific) echipat cu un detector MCT răcit cu azot lichid. Spectrele pe baza cărora s-au construit hărțile IR au fost înregistrate în domeniul $4000-700\text{ cm}^{-1}$. Aproximativ 250 de spectre au fost înregistrate pentru construirea hărților IR.

Probele analizate au fost D7.2, D8.2 – ce reprezintă mostre de dinți fără tratament, și D1+SF₆, D7.1 p+g – ce reprezintă mostre de dinți cu tratament în plasma în diverse combinații. Analizând spectrele prezentate, în toate cele 4 variante experimentale, 2 controale și 2 probe supuse tratamentului cu plasma în diverse combinații cu fluor, se observă prezența grupărilor PO₄²⁻ prin benzile caracteristice înregistrate la valorile 1176 cm^{-1} și 1087 cm^{-1} . Prezența fluorului prin IR nu a fost posibilă, deoarece acesta a fost prezent pe suprafața dinților în concentrație aflată sub limita de detecție a echipamentului. În ceea ce privește hărțile IR realizate, intensitatea absorbantelor monitorizate (1176 cm^{-1}) este proporțională cu variațiile de culoare, începând cu albastru (intensitate joasă) și crescând gradual la verde, galben și roșu (ce reprezintă intensitatea cea mai ridicată). În cele 4 variante experimentale, se observă prezența grupării fosfat pe întreaga suprafață scanată.

III.3. Analiza dezvoltării biofilmelor microbiene pe probele de smalț dentar, după tratament cu plasma prin aplicarea modelelor microbiene și a metodelor optimizate în etapa anterioară (analiza SEM și numărare colonii viabile).

Doa tulpini bacteriene model, ce prezintă capacitatea de a forma biofilme, selectate în etapa anterioară au fost utilizate în acest studiu, și anume: bacterii gram-pozitive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) și bacterii gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). Microorganismele au fost stocate pe bulion glicerol la -80°C . Culturi proaspete pentru fiecare tulpină au fost obținute pe geloză nutritivă în plăci Petri. Coloniile dezvoltate într-un interval de 18-20 h la 37°C au fost utilizate pentru a obține suspensii 0,5 Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC (unități formatoare de colonii)/mL), suspensii ce au fost utilizate pentru toate experimentele. Toate probele de smalț au fost sterilizate prin expunere la UV (20 min pe fiecare parte) înainte de efectuarea testelor antimicrobiene.

Viabilitatea și aderența microorganismelor

Pentru evaluarea viabilității și a aderenței bacteriene în prezența probelor de smalț cu diferite tratamente, un volum de $50\mu\text{L}$ din suspensia 0,5 Mc Farland a fost adăugat peste fiecare probă. Această etapă a fost urmată de incubarea esanțioanelor tratate într-o cameră umedă la 37°C până la 24 h. Viabilitatea microorganismelor a fost evaluată după 12 și la 24 h de incubare, prin introducerea aseptică a probelor de smalț tratat, în tuburi Eppendorf ce conțin 1 mL de tampon fosfat salin (TFS). Tuburile au fost vortexate timp de 20 s în scopul desprinderii bacteriilor aderate

pe suprafețele de smalt. Suspensiile au fost ulterior supuse unor diluții seriale zecimale în TFS și însămânțate în triplicat pe plăci de geloză nutritivă apoi incubate pentru 24 h la 37 °C. UFC (unitățile formatoare de colonii)/mL au fost calculate și reprezentate grafic. După 24 h de incubare nicio celulă nu mai era viabilă, motiv pentru care rezultatele obținute pentru 12 h de incubare au fost cele mai relevante pentru evaluarea viabilității microorganismelor în prezența probelor de smalt fluorurate sau tratate cu plasmă. Acest rezultat se corelează perfect cu rezultatele obținute anterior pe probele de HAP (raportarea aferentă etapei 2).

Rezultatele au indicat faptul că microorganismele adera și supraviețuiesc mai puțin de 24 h pe suprafețele de smalt fluorurate sau tratate cu plasmă, viabilitatea fiind afectată semnificativ după 12 h de incubare în comparație cu proba control, netratată (ctrl).

Rezultatele testelor indică eficiența tratamentelor cu gelul fluorurat disponibil comercial în ceea ce privește scăderea viabilității bacteriene. Aceste efecte pot fi îmbunătățite semnificativ printr-o etapă de activare cu plasmă, cel mai probabil datorită creșterii conținutului de fluor pe suprafața tratată. Valorile UFC/mL obținute pentru tratamentele cu gaz fluorurat (SF₆) ilustrează efectul antimicrobian foarte susținut al acestui tip de tratament, viabilitatea fiind redusă în acest caz cu 2, respectiv 3 logaritmi pentru tulpinile de *S.aureus* și *P.aeruginosa* testate. Aceste date susțin rezultatele obținute în urma analizelor EDX și XPS, raportate în etapa anterioară, care indică o fluorurare mai mare în comparație cu tratamentele cu gel fluorurat.

Testele au scos în evidență și efectele antibacteriene ale gelului fluorurat aplicat pe probe de smalt (probe notate *gel*), scăderea CFU/mL fiind de aproximativ 2 log pentru *P. aeruginosa*, comparativ cu valorile obținute pentru control. Activarea cu plasmă a esanțioanelor de smalt (*gel+DBDp*) determină o scădere mai mare a viabilității microorganismelor prin raportare la valorile CFU/mL obținute pentru proba de smalt control, scăderile fiind de: 1 log pentru *S. aureus*, și 2 log *P. aeruginosa*.

Creșterea culturilor planctonice

Capacitatea de creștere a microorganismelor planctonice în prezența probelor de smalt tratate a fost analizată în bulion nutritiv, într-o placă sterilă cu 24 de godeuri. Peste probele de smalt s-a adăugat 1 mL de mediu lichid (bulion nutritiv) și 10 μL de suspensie microbiană de densitate 0.5 McFarland. Probele au fost incubate la 37 °C timp de 24 h. După incubare, 150 μL de cultură (celule planctonice) au fost transferați în plăci sterile cu 96 de godeuri, iar densitatea optică a culturilor microbiene (absorbantă, Abs 600 nm) a fost măsurată spectrofotometric.

Rezultatele au arătat că, creșterea culturilor planctonice nu este afectată semnificativ în prezența probelor de smalt tratate cu gel fluorurat, însă rezultate evidente în ceea ce privește inhibiția creșterii au fost obținute pentru probele tratate cu gel și plasmă. O inhibiție semnificativă a creșterii a fost observată pentru probele de smalt tratate cu *gel+DBDp*, dar și pentru probele tratate cu SF₆, aspect evident atât la *S.aureus*, cât și la *P.aeruginosa*. Aceste rezultate indică faptul că proprietățile antibacteriene ale gelului fluorurat aplicat pe smaltul dentar sunt îmbunătățite în urma activării cu plasmă.

Capacitatea de formare a biofilmelor

Formarea biofilmelor a fost analizată în bulion nutritiv, utilizând un model static de formare al biofilmelor la 24 h, descris anterior. Probele de smalt au fost introduse aseptice în plăci sterile cu

24 de godeuri ce conțineau 1 mL de de bulion nutritiv. Experimentul a fost lucrat în duplicat. Peste acestea, 10 μ L de suspensie 0,5 McFarland au fost adăugați în fiecare godeu, iar plăcile au fost incubate timp de 24 h la 37° C. După perioada de incubare, fiecare probă de smalt a fost spălată cu apă fiziologică sterilă în scopul desprinderii celulelor neatașate. Ulterior, probele au fost introduse în tuburi Eppendorf ce conțineau 1 mL de apă fiziologică sterilă (AFS), vortexate timp de 20 s și ultrasunete timp de 10 s pentru desprinderea bacteriilor din biofilmele dezvoltate pe suprafețele probelor de HAP. Suspensiile microbiene obținute au fost supuse unor diluții seriale zecimale ce au fost inoculate pe plăci de agar, în triplicat. Plăcile au fost incubate timp de 24 h la 37°C pentru a permite dezvoltarea coloniilor, ce au fost utilizate pentru obținerea valorilor UFC/mL. Aceste valori sugerează cantitatea de celulele viabile recuperate din biofilmele dezvoltate pe probele de smalt utilizate.

Rezultatele au aratat ca dezvoltarea biofilmelor monospecifice este semnificativ redusă de tratamentul cu plasmă și gel+plasma a substraturilor. În cazul probelor de smalt tratate cu gel+DBDp, inhibiția biofilmelor este crescută, cu scăderi ale valorilor CFU/mL de aproximativ 2 log pentru *S. aureus*, și 3 log pentru *P. aeruginosa*. De asemenea, diferențe semnificative în ceea ce privește inhibiția formării biofilmelor au fost observate între probele de smalt tratate cu gel și cele tratate cu gel+plasma DBDp, diferențele fiind de 1,5 log pentru *S. aureus*, 1.2 pentru *P. aeruginosa*. Dezvoltarea biofilmelor monospecifice este cel mai mult afectată în cazul probelor tratate cu gaz fluorurat (SF_6), cu scăderi ale valorilor CFU/mL de aproximativ 4 log pentru *S. aureus* și 4.3 log pentru *P. aeruginosa*, față de valorile obținute pentru controlul netratat.

Determinarea capacității plasmei de a îndepărta/ inactiva biofilme formate pe smalt dentar

Experimentele de îndepărtare/ inactivare a biofilmelor dezvoltate pe esantioane de smalt au fost efectuate cu sursa de plasmă DBD. Plasma a fost generată în Ar, la fluxul de 2000 sccm, puterea RF de 20 W și distanța sursă-probă a fost de aproximativ 1 mm, în timp ce numărul de 10 scanări scanări a fost selectat, conform rezultatelor de îndepărtare a biofilmelor cu plasma optimizată în etapa anterioară.

Și în acest caz, o bacterie gram-pozitivă (*S. aureus*) și una gram-negativă (*P. aeruginosa*) au fost selectate. Biofilmele au fost dezvoltate pe suprafețe timp de 24 h înaintea aplicării tratamentelor cu plasmă.

Viabilitatea celulelor incluse în biofilme este redusă cu aproximativ 4 log la *S.aureus* și cu peste 6 log la *P.aeruginosa*, după 10 scanări compete cu sursa de plasma DBDp dezvoltată.

Evaluarea aspectului biofilmelor prin Microscopie Electronică de Balaj (SEM)

Efectul tratamentului cu plasma asupra biofilmelor bacteriene preformate pe esantioane de smalt dentar a fost evaluat și cu ajutorul analizei SEM. Esantioanele de smalt ce contin biofilme monospecifice dezvoltate în condiții standard (timp de 24h la 37°C în bulion nutritiv, sistem static) au fost spălate cu 1mL AFS, apoi probele au fost fixate prin imersare în metanol rece timp de 1 minut. Probele uscate la temperatura camerei au fost ulterior analizate la SEM.

Rezultatele analizei microscopice au aratat ca în urma tratamentului cu plasma al biofilmelor preformate, numărul celulelor și al agregatelor celulare (microcolonii) este semnificativ redus pe suprafața smaltului dentar. Pentru biofilmele de *S.aureus*, se poate observa absența totală a celulelor bacteriene pe esantioanele de smalt analizate. În probele control se observa coci grupați în gramezi sau ciorchine, aspect caracteristic *S.aureus*. Arhitectura celulelor este menținută intactă, observându-se structuri sferic-ovalare.

Biofilmele de *P.aeruginosa* au fost de asemenea alterate semnificativ de tratamentul cu plasma. Micrografiile SEM ilustreaza clar o reducere semnificativa atat a numarului de celule aderente si incluse in biofilme, cat si o alterare profunda a structurii acestora. In imaginile obtinute in probele control (netratate cu plasma), se observa celule si agregate celulare aderente de *P.aeruginosa* cu arhitectura tipica, celulele avand aspect bacilar (indicat de sagetile galbene). De cealalta parte, imaginile SEM obtinute pentru esantioanele de smalt dupa tratamentul cu plasma al biofilmelor au aratat un numar mult mai redus de celule bacteriene, acestea avand un aspect alterat. Celulele isi pierd integritatea membranara si forma bacilara, capatand aspect neregulat. Aceste aspecte sugereaza distrugerea invelisurilor celulare cu pierderea arhitecturii bacteriilor dupa tratamentul cu plasma, fapt ce poate explica viabilitatea foarte redusa a acestora, evidentiata in experimentul anterior (UFC/mL).

III.4. Participarea la conferințe științifice și simpozioane în domeniu (cel puțin 1 participare la conferinta/simpozion).

1). Holban, A.M.*, Joia, A., Zarif, M., Vizireanu, S., Grumezescu, A.M., Birca, A., Farcasiu, A.T., Marinescu, F., Chifiriuc, M.C. Modulation of biofilm development in biomimetic hydroxyapatite and natural enamel by cold plasma treatment. E-MRS Spring Meeting 2022, simpozionul Q “Fundamental and applicative research in laser-material interactions”, (conferinta virtuala) Strasbourg, Franta.

2). Alina Maria Holban*, Maria Zarif, Sorin Vizireanu, Alexandru Titus Farcasiu, Alexandra Birca, Florica Marinescu, Nichita Puscas, Alexandru Mihai Grumezescu. Cold plasma treatment to remove bacterial biofilms: applications in dentistry and medical implants, 32nd European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, sesiunea “9c. Preclinical biofilm studies”, programme no. L0318, Lisabona, Portugalia.

3). Lavinia CARPEN, Veronica SATULU, Tomy ACSENTE, Gheorghe DINESCU, Loredana PREDA, Maria MARCU, Tanta SPATARU, Nicolae SPATARU, Sorin VIZIREANU, Hybrid Nanostructures Based on Vertically Graphenes Decorated with Tungsten Oxide Nanoparticles for Enhancement Capacitive Performance, International Conference on Lasers, Plasma, and Radiation – Science and Technology, TOPIC 5, pag. 192, Palace of Parliament, Bucharest, Romania, 7-10-2022.

III.5. Scrierea și publicarea de lucrări științifice în jurnale de prestigiu în domeniu (cel puțin 1 articol ISI).

1) Zarif, M.E.; Yehia, S.A.; Biță, B.; Sătulu, V.; Vizireanu, S.; Dinescu, G.; Holban, A.M.; Marinescu, F.; Andronescu, E.; Grumezescu, A.M.; Bîrcă, A.C.; Farcașiu, A.T. Atmospheric Pressure Plasma Activation of Hydroxyapatite to Improve Fluoride Incorporation and Modulate Bacterial Biofilm. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 13103. <https://doi.org/10.3390/ijms222313103>*

* Articolul a fost raportat in etapa 2 ca acceptat spre publicare, publicarea propriu-zisa fiind realizata dupa incheierea perioadei de raportare anterioare (Decembrie 2021). In etapa 2 au fost scrise / publicate mai multe articole decat era prevaztut (2 articole ISI publicate si 1 acceptat spre publicare).

- 2) Marcu, M; Preda, L; Vizireanu, S; Bitu, B; Mihai, MA; Spataru, T; Acseste, T; Dinescu, G; Spataru, N; "Enhancement of the capacitive features of WO₃ supported on pristine and functionalized graphite by appropriate adjustment of the electrodeposition regime"; *Materials Science & Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology* 277, 115585 (2022).
- 3) Yehia, SA; Petrea, N; Grigoriu, N; Vizireanu, S; Zarif, ME; Carpen, LG; Gingham, RE; Dinescu, G; "Organophosphorus toxic compounds degradation in aqueous solutions using single filament dielectric barrier discharge plasma jet source"; *Journal of Water Process Engineering* 46, 102637 (2022).

Brevet de inventie

Depunerea brevetului inregistrat cu numarul A100310, data inregistrarii: 08 iunie 2022. Titlul: METODĂ CU PLASMĂ LA PRESIUNE ATMOSFERICĂ PENTRU ÎNDEPĂRTAREA BIOFILMELOR MICROBIENE DEZVOLTATE PE DIFERITE SUBSTRATURI; Autori: Alina-Maria Holban, Maria-Elena Zarif, Sorin Vizireanu, Sasa Alexandra Yehia, Alexandra Birca, Alexandru Mihai Grumezescu, Alexandru Titus Farcasiu, Carmen Curutiu, Lia Mara Ditu, Mariana Carmen Chifiriuc, Gheorghe Dinescu.

Bibliografie selectiva

- ⁱ Fathollah S., Abbasi H., Akhouni S., Naeimabadi A., Emamjome S., Cold plasma enamel surface treatment to increase fluoride varnish uptake, *Scientific Reports*, 12, 1, 4657, 2022, 10.1038/s41598-022-08069-4
- ⁱⁱ Wang J., Yang X., Sun K., Sun P., Pan J., Zhu W., Becker K.H., Zhang J., Fang J., Tooth enamel evaluation after tooth bleaching with hydrogen peroxide assisted by a DC nonthermal atmospheric-pressure plasma jet, *IEEE Transactions on Plasma Science* 40 (9), 6246714, 2157-2162, 2012, 10.1109/TPS.2012.2204779
- ⁱⁱⁱ Stasic J.N., Selaković N., Puač N., Miletić M., Malović G., Petrović Z.L., Veljovic D.N., Miletic V., Effects of non-thermal atmospheric plasma treatment on dentin wetting and surface free energy for application of universal adhesives, *Clinical Oral Investigations* 23, 1383-1396, 2019
- ^{iv} El Moshly S., Abbass M.M.S., El-Motayam A.M., Biomimetic remineralization of acid etched enamel using agarose hydrogel model, *F1000 Research* 7, 1476, 2018, 10.12688/F1000RESEARCH.16050.1
- ^v Šantak V., Vesel A., Zaplotnik R., Biščan M., Milošević S., Surface Treatment of Human Hard Dental Tissues with Atmospheric Pressure Plasma Jet, *Plasma Chemistry and Plasma Processing* 37, 401-413, 2017, 10, 10.1007/s11090-016-9777-3
- ^{vi} Sodhi, R.N.S., Symington, J., Penetration of chlorhexidine coating into tooth enamel: A surface analytical study, *Biointerphases* 11 (2) 02A328, 2016
- ^{vii} Stasic J.N., Pfcic J.K., Milicic B., Puač N., Miletic V., Effects of non-thermal atmospheric plasma on dentin wetting and adhesive bonding efficiency: Systematic review and meta-analysis, *Journal of Dentistry* 112, 103765, 2021
- ^{viii} Behnecke M, Steinert V, Petersen S., Surface Characterisation of PEEK and Dentin, Treated with Atmospheric Non-Thermal PDD Plasma, *Applicable for Dental Chair-Side Procedures*, *Plasma* 4, 389–398, 2021, <https://doi.org/10.3390/plasma4030028>
- ^{ix} Stasic J.N., Selaković N., Puač N., Miletić M., Malović G., Petrović Z.L., Veljovic D.N., Miletic V., Effects of non-thermal atmospheric plasma treatment on dentin wetting and surface free energy for application of universal adhesives, *Clinical Oral Investigations* 23, 1383-1396, 2019