

**UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**BIOCORROSÃO EM MINI-IMPLANTES EXTRA-ALVEOLARES
EXPOSTOS A BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO EM
MODELOS *EX VIVO* HUMANO**

DISSERTAÇÃO

CAMILLA ANDRADE DE SOUZA NASCIMENTO ROMÃO

ANO 2024

UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

BIOCORROSÃO EM MINI-IMPLANTES EXTRA-ALVEOLARES
EXPOSTOS A BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO EM
MODELOS *EX VIVO* HUMANO

CAMILLA ANDRADE DE SOUZA NASCIMENTO ROMÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO), como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Odontologia (Área de Concentração: Clínica Odontológica).

Orientador(a):

Prof. Dr. Fabiano Luiz Heggendorn

Coorientador (a):

Prof. Dr. Walter Barreiro Cravo Junior

ANO 2024

**BIOCORROSÃO EM MINI-IMPLANTES EXTRA-ALVEOLARES
EXPOSTOS À BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO EM
MODELOS *EX VIVO* HUMANO**

CAMILLA ANDRADE DE SOUZA NASCIMENTO ROMÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO), como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Odontologia (Área de Concentração: Clínica Odontológica).

Aprovada em 08 de julho de 2024

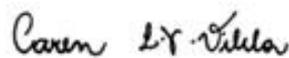
Banca examinadora



Prof. Dr. Fabiano Luiz Heggendorf
Universidade do Grande Rio



Prof. Dr. Marcos Cezar Ferreira
APCD Bauru e IOM-RJ



Prof. Dra. Caren Leite Spindola Vilela
Universidade Unigranrio

A minha mãe, meu pai, minha irmã e ao meu
esposo por sempre me apoiarem na evolução e
crescimento profissional, e estarem sempre presentes nas
alegrias e serem meu porto seguro nos momentos árdus
da vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a minha família, meu pai Roberto, minha mãe Maria de Fátima e minha irmã Carolinne que são a base da minha formação como pessoa e sempre foram exemplos de garra, caráter, honestidade e profissionalismo. Obrigada por sempre estarem presentes em todas as etapas da minha vida, me incentivando, me acalmando e me erguendo para lutar novamente.

Ao meu esposo Filippe, que sempre me apoiou, e esteve ao meu lado, me ajudando no que podia, para transformar o percurso menos penoso.

As minhas tias: Roberta, Ivanilda, Vânia, minha prima Fátima, meu tio Tarcísio, a minha amiga Ingra e minha sogra e sogro Jane e Romão, pelo apoio e acolhida. Serei eternamente grata.

Ao meu orientador professor Fabiano Luiz Heggendorn, pela oportunidade de ser sua orientanda, e me ensinar tudo sobre o mundo científico desde dos primeiros passos, como cultivo celular, confecção de artigo, até a formulação dessa dissertação. Desenvolvendo verdadeiramente o papel de mestre, com orientações e acolhimento, sendo o exemplo a ser seguido.

Ao meu coorientador professor Walter Barreiro Cravo Junior, pela receptividade ao abrir as portas do seu laboratório no Instituto Nacional de Tecnologia (INT) para a realização deste projeto, pela orientação de conceitos que a mim eram desconhecidos, e por fornecer o conhecimento e sempre sanar os questionamentos por mim feitos, muito obrigada.

À equipe do INT: Alan, Maurício, André Luiz, Vinicius, Diogo, Fabiola e Luciano e em especial a equipe do LABIO: Aike, Danielle, Raquel e Mirian, por terem me abraçado, e com paciência compartilharam muitos ensinamentos e orientações na parte experimental da minha pesquisa. Muito Obrigada.

EPÍGRAFE

“Que todos os nossos esforços estejam sempre focados no desafio à impossibilidade. Todas as grandes conquistas humanas vieram daquilo que parecia impossível”.

Charles Chaplin

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	01
2. JUSTIFICATIVA	12
3. OBJETIVO(S)	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS	14
5. RESULTADOS	32
6. DISCUSSÃO	45
7. CONCLUSÃO	56
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
9. ANEXO(S)	73

RESUMO

Os mini-implantes extra-alveolares (MIEAS) são dispositivos de ancoragem temporária com eficácia em casos ortodônticos complexos. Há uma falta de padronização do torque de instalação e poucas evidências quanto a biocorrosão.

Objetivo. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a capacidade biocorrosiva das *Desulfovibrio fairfieldensis* oral em consórcio sobre a superfície de mini-implantes extra-alveolares implantados em mandíbulas humanas *ex-vivo*. **Material e métodos.**

Os experimentos foram realizados com 21 MIEAs da marca S.I.N. e 5 mandíbulas humanas *ex-vivo*, seccionadas no seu longo eixo transversal. Os CPs/Bone foram escaneados no microtomógrafo para determinação do tipo ósseo no sítio de instalação, sendo essas, realizadas em torquímetro de mesa (n=12), e analisados em estereomicroscópio óptico. Em outro grupo de 9 MIEAs, a instalação foi com torquímetro de mão, limitando o torque a 15 N/cm. Esse grupo foi submetido ao ensaio de imersão por 99 dias, com saliva artificial e com cepas orais da *D. fairfieldensis* oral em consórcio. Após este período, os MIEAs foram removidos e as concentrações celulares foram determinadas através do Número Mais Provável (NMP) e Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo (qPCR), além da análise por microscopia eletrônica de varredura e de epifluorescência. **Resultados.** A média dos torques máximos foi de $0,226 \pm 0,101$ N/Cm². Na análise da densidade óssea, a maioria dos CPs/Bone foram classificados com osso tipo D1 em relação a Unidade de Hounsfield. Na análise do qPCR houve um decréscimo do número de células. No NMP dos MIEAS revelou a ocorrência de penetração bacteriana entre a interface metálica e óssea e a quantidade celular do início e fim da imersão se mantiveram iguais. A microanálise de superfície do MIEA do biorreator BRS mostrou a presença

de formação de biofilme. **Conclusão.** A *D. fairfieldensis* oral é capaz de se aderir e formar biofilmes na superfície dos MIEAs, porém a sua constituição de titânio impede uma alta taxa de corrosão.

Palavras-chave: Bactéria Redutora de Sulfato; Biocorrosão; Biofilme; *Desulfovibrio*; Dispositivo de ancoragem temporária; Mini-implantes extra-alveolares.

ABSTRACT

Extra-alveolar mini-implants (MIEAS) are temporary anchorage devices that are effective in complex orthodontic cases. There is a lack of standardization of installation torque and little evidence regarding biocorrosion. **Aim(s).** To characterize the biocorrosive capacity of oral *Desulfovibrios fairfieldensis*, evaluate the torque for installation and determine the bone density of the Bone Test Body (CPs/Bone)..

Materials and methods. The experiments were performed with 21 S.I.N. brand MIEAs and 5 ex-vivo human mandibles, sectioned along their long transverse axis. The CPs/Bone were scanned in the microtomography to determine the bone type at the installation site, which were performed using a table torque meter (n = 12), and analyzed under an optical stereomicroscope. In another group of 9 MIEAs, the installation was performed using a hand torque meter, limiting the torque to 15 N/cm. This group was subjected to the immersion test for 99 days with artificial saliva and oral strains of *D. fairfieldensis*. After this period, the MIEAs were removed and the cell concentrations were determined through the Most Probable Number (MPN) and quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR), in addition to analysis by scanning electron microscopy and epifluorescence. **Results.** The average maximum torque was 0.226 ± 0.101 N/Cm². In the bone density analysis, most of the CPs/Bone were type D1 bone in relation to the Hounsfield Unit. In the qPCR analysis, there was a decrease in the number of cells. The NMP of the MIEAS revealed the occurrence of bacterial penetration between the metal and bone interface, and the cell quantity at the beginning and end of immersion remained the same. The surface microanalysis of the MIEA of the BRS bioreactor showed the presence of biofilm formation.

Conclusion. Oral *D. fairfieldensis* is capable of adhering and forming biofilms on the surface of MIEAs, but its titanium composition prevents a high rate of corrosion.

Keywords: Biocorrosion; Biofilm; *Desulfovibrio*; Extra-alveolar mini-implants; Sulfate-reducing bacteria; Temporary anchorage device.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Preparo da mandíbula humana. Peça anatômica dissecada (A) e segmento seccionado formando o corpo de prova (B)	14
Figura 2.	Ensaio de torque de instalação nos CPs/Bone. Adaptação dos MIES e dos CPs/Bone no torquímetro de mesa.....	16
Figura 3.	Delimitação esquemática das regiões dos mini-implantes (imagens do manual de uso ortodôntico, SIN implantes)	17
Figura 4.	Organograma das etapas análise de desgaste do slot e do hexágono dos MIEAs por perda de massa	18
Figura 5.	Chave digital CDPO24 adaptada a um soquete (A); Torquímetro manual King Tony ¼ 15Nm adaptado a chave digital CDPO24 do Kit SIN (B); Man-Bone/MIEAs selado com cera branca ortodôntica (C).....	23
Figura 6.	Biorreator BRS (1) e Biorreator Control. (2). Formação de sulfeto ferroso no biorreator BRS após inoculação (1)	24
Figura 7.	Figura esquemática da microanálise de superfície metálica no MEV, sendo obtidas 3 áreas na região do perfil transmucoso e slot, que foram expostas aos meios de cultura, e 3 áreas na região de rosca perfurante, em contato com o osso anteriormente, sem exposição direta ao meio de cultura.....	30
Figura 8.	Análise do osso cortical periférico nos MIEAs. Cortical óssea sem trinca (A) e com trinca (B) após instalação de MIEA. Extrusão de partículas ósseas na interface de instalação.	32
Figura 9.	Delimitação da área de interesse nos CPs/Bone. Reconstrução 3D no software DataViewer (A) e no CtVox (B), onde foi analisada a estrutura	

	interna. Sobreposição das reconstruções do CP/Bone e da ROI (C) e somente a ROI onde será instalado o MIEA (D) no software CTVol	35
Figura 10.	Superfície metálica da área de rosca do MIEA excitada com o fluoróforo <i>live and dead</i> . A - Objetiva de 5x/0.16 (A), 20x/0.50(B) e 40x/0.6 (C). Reconstrução da imagem C em dois planos transversais (C.1) e 3D (C.2, C.3 e C.4).	38
Figura 11.	Biofilme sobre as superfícies metálicas (A e B). Isolamento do canal do fluoróforo de ID (B e D), revelando células dispersas de forma pontual sobre a superfície metálica (B.1 e B.2)	39
Figura 12.	Estrutura dentinária marcada com Kit <i>live and dead</i> . Primeira amostra de disco de dentina (A) revelando uma espessura de nanômetros, com alta emissão do SYTO®9 (A.1 e A.2). Segunda amostra de dentina revelando o mesmo padrão de espessura (B) e emissão (B.1)	41
Figura 13.	Microanálise de superfície dos MIEAs. Espécimen Man-Bone/MIEAs/Control demonstrando ausência de biofilme (A) e áreas sugestivas de deposições ósseas em região de rosca e flanco de rosca (setas vermelhas, A.1) e na região de fundo de vale do terço apical do MIEA (seta vermelha, A.2). Espécimen Man-Bone/MIEAs/Bac com intensa formação de biofilme na região do perfil transmucoso e slot (B), enquanto na região de flanco de rosca (B.1) e em fundo de vale, no terço apical do MIEA, foram demonstrados depósitos particulados (B.2). Microanálise de superfície dos Man-Bone/MIEAs/Control.....	42
Figura 14.	Microanálise de superfície dos Man-Bone/MIEAs/Control. Áreas sugestivas de defeitos de superfície (setas amarelas) (A, B) de forma isolada ou associada a partículas ósseas (setas vermelhas) (A.1 e B.1)	

..... 43

Figura 15. Microanálise de superfície dos Man-Bone/MIEAs/Bac. Formação de biofilme (A e A.1, setas amarelas). Presença de bactérias sobre a superfície metálica (B e C, setas vermelhas), em maior aumento demonstra-se a morfologia bacteriana, com flagelos (setas azuis) (D).

..... 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Etapas de análise de desgaste do slot e do hexágono dos MIEAs por perda de massa.....	18
Tabela 2.	Análises realizadas no MIEAs após o ensaio de imersão.....	27
Tabela 3.	Média da perda de massa do ensaio de desgaste do slot e do hexágono dos MIEA.....	33

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1.	Torque sob torção para instalação de MIEAs com trinca óssea cortical e sem trinca na cortical óssea.....	33
Gráfico 2.	Correlação entre HU na análise de densidade óssea das regiões de interesse dos CPs/Bone	35
Gráfico 3.	Medidas das taxas de corrosão (TC) por perda de massa.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

BS	<i>Buccal Shelf</i>
BRS	Bactéria Redutora de Sulfato
Cps/Bone	Corpos de prova ósseos
IZC	Crista infrazigomática
IP	Iodeto de Propídio
Man-Bone/ MIEAS	Corpos de prova ósseos com instalação de mini-implantes extra-alveolares com torquímetro de mão.
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MEV-EDS	Modo de espectroscopia por dispersão de energia
MI	Mini-implantes ortodôntico
MIEAS	Mini-implante extra alveolares
MSI	Implantes de mini parafusos

NMP	Número Mais Provável
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo
TDA	Dispositivo de ancoram temporária

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A resistência a uma movimentação dentária indesejada, a fim de maximizar os movimentos pretendidos nos tratamentos ortodônticos, é chamada de ancoragem ortodôntica (MCGUIRE *et al.*, 2006). Para aumentar a ancoragem ortodôntica, a utilização de mini parafusos (MSI) ou mini-implantes ortodônticos (MI) vem recebendo especial atenção, devido ao aprimoramento de conceitos relativos à mecânica ortodôntica (KANOMI, 1997). Sendo assim, os mini-implantes surgiram como um meio alternativo no auxílio e controle da ancoragem (MCGUIRE *et al.*, 2006).

Os mini-implantes ortodônticos foram apresentados por KANOMI (1997), demonstrando resultados eficazes quando se considerava o tempo de ancoragem. Os parafusos cirúrgicos, foram denominados como dispositivos de ancoragem temporária (TADs), tornaram-se cada vez mais populares devido ao tamanho pequeno, possibilitando mais locais de inserção na cavidade oral e diminuindo o tempo de cicatrização óssea (CHEN *et al.*, 2008). Esses dispositivos apresentam facilidade de inserção e remoção, possibilidade de ser carregados imediatamente após a inserção e fornecer ancoragem absoluta para diversos tipos de tratamento ortodôntico, sem necessidade de cooperação por parte do paciente (KANOMI, 1997; COSTA *et al.*, 1998; KYUNG *et al.*, 2003; CARANO *et al.*, 2004). Durante a última década, ocorreu uma evolução técnica em relação à ancoragem e as indicações no emprego dos mini-implantes. Inicialmente, sua utilização se restringia nas áreas inter-radulares, ou seja, entre as raízes para reforçar a ancoragem durante a mecânica ortodôntica. A revolução técnica ocorreu quando o pesquisador taiwanês Dr. Chris Chang, demonstrou uma inovadora e sofisticada forma de utilização dos minis parafusos, instalando-os em áreas antes negligenciada

pela maioria dos ortodontistas, as regiões extra-alveolares. Dessa forma, surgiram os mini-implantes extra-alveolares, inseridos nas regiões da crista infrazigomática, ramo mandibular e *buccal shelf* (BS), tendo em vista que os parafusos estão em áreas fora da linha de ação radicular, reduzindo o risco de complicações e permitindo a livre movimentação dentária ao longo dos arcos maxilar e mandibular (CHANG *et al.*, 2018).

1.1 TÉCNICA DE MINI-IMPLANTES EXTRA-ALVEOLARES

As regiões extra-alveolares vêm recebendo um maior enfoque na ciência oral, pois têm sido recomendadas para a inserção dos mini-implantes por diferentes pesquisadores, e idealizadas para um grande número de terapias ortodônticas, que necessitam de um sistema de ancoragem eficiente e seguro, ampliando os limites dos tratamentos (ALMEIDA, 2019). Os benefícios relatados na aplicação desta técnica são: menor risco de traumatizar as raízes adjacentes a área de instalação; maior quantidade de osso cortical nos pontos de inserção, permitindo o uso de mini-implantes mais calibrosos (2 mm) e de maior comprimento (12/14 mm); ausência de interferência mecânica na movimentação mesiodistal dos dentes ou grupos de dentes, possibilitando uma ancoragem adequada para a retração ou mesialização da arcada dentária como um todo, permitindo movimentar toda a dentição simultaneamente; baixa incidência de insucesso, se comparada a região dos mini-implantes interradiculares, e redução no número de mini-implantes usados, mesmo na resolução de casos ortodônticos complexos .

Dessa maneira, esses dispositivos vêm revolucionando a ortodontia, sendo amplamente utilizados devido à simplicidade de instalação, manipulação e

remoção associado ao baixo custo, indicação de aplicação de força/carga imediata após a inserção e mínima irritação aos tecidos adjacentes (SOUZA *et al.*, 2015).

1.1.1 Indicações mecânicas

Em comparação com os mini-implantes interradiculares, os instalados nas regiões da crista infrazigomática (IZC) ou *buccal shelf* (BS), são denominados extra-alveolares, e apresentam diversas indicações, sendo mais comumente utilizados para distalizar em conjunto todos os dentes das arcadas superior e inferior. Por serem instalados em áreas ósseas de reforço maxilar e mandibular, permitem maior ancoragem imediatamente após a sua inserção, resultando em uma adequada estabilidade primária (ALMEIDA, 2019).

Os mini-implantes na IZC são recomendados para casos de: retração de dentes anterossuperiores, realizada em bloco ou por meio de retração dentoalveolar em massa da arcada superior; distalização por deslizamento de caninos e pré-molares, para obtenção de espaço anterior; intrusão de dentes posteriores associada à retração de toda a arcada e retração em bloco de conjunto de dentes, para correção de protrusão; correção de assimetria do plano oclusal e desvio de linha média; ancoragem para uso de cantiléver em tracionamento de caninos inclusos e preparo para cirurgia ortognática em casos de Classe III (ALMEIDA, 2019).

Já as indicações dos mini-implantes colocados na região mandibular de BS se assemelham às dos mini-implantes na IZC, podendo ser aplicados em casos de: tratamento compensatório de Classe III; retração e/ou distalização dos caninos em casos com apinhamento excessivo dos dentes inferiores; mesialização de molares; intrusão de dentes posteriores; correções de assimetrias do plano oclusal e de desvio da linha média; ancoragem para uso de cantiléver em tracionamento de

caninos inferiores inclusos; preparo para cirurgia ortognática em casos de Classe II (ALMEIDA, 2019).

1.1.2 Insucessos relacionados à técnica de mini-implantes extra-alveolares

MOTOYOSHI e colaboradores (2007) relataram que os miniparafusos ortodônticos utilizados como TAD's apresentam uma taxa de sucesso que variam de 57% a 95,3%, sendo que a maioria dos estudos relatam taxas de sucesso em torno de 84%. A estabilidade primária é relacionada como o fator mais importante e pode ser mensurada através da avaliação do torque de inserção, torque de remoção e força de tração. Mesmo com uma taxa de sucesso superior a 80%, o insucesso na técnica dos mini-implantes extra-aveolares é multifatorial, sendo a falha dos miniparafusos o maior atuante nesta questão para os ortodontistas (REYNDERS *et al.*, 2009; CRISMANI *et al.*, 2010). CRISMANI e colaboradores (2010) relataram que existem três fatores-chave que interferem potencialmente na estabilidade inicial: qualidade óssea; projeto do parafuso e técnica de colocação. Sendo esses três fatores inter-relacionados, existe uma dificuldade na compreensão e controle dessas variáveis, visto que o ortodontista terá taxas de sucesso diferentes se utilizar diferentes modelos de parafusos e diferentes técnicas de instalação quando utilizadas no mesmo paciente. O estudo de HYDE e colaboradores (2010) relataram as experiências dos ortodontistas em relação a instalação de mini-implantes, que um em cada cinco casos clínicos apresentou fratura de mini-implantes durante a colocação, superando a taxa de dano radicular que é de cerca de 6%. Contrariamente, outros dados demonstraram que a incidência da fratura de mini-implantes é inferior a 4% de todas as suas instalações (PARK *et al.*, 2006; BUCHTER *et al.*, 2005). A aplicação

desproporcional de torque é considerada uma das causas mais prováveis de fratura do mini-implantes, assim como a associação da fratura relacionada ao diâmetro reduzido do formato da ponta do mini-implantes (CHEN *et al.*, 2010; BARROS *et al.*, 2011; SUZUKI & SUZUKI, 2011; WILMES *et al.*, 2011).

1.1.1.1 Mobilidade

Algumas falhas são relatadas com o emprego de miniparafusos, como a mobilidade do mini-implante e/ou perda de ancoragem ou estabilidade (LUZI *et al.*, 2007). A avaliação a curto e longo prazo indica que a estabilidade primária é afetada pela densidade mineral óssea do osso cortical circundante, tipo de parafuso e posição do parafuso (CHA *et al.*, 2010).

As diferenças entre os miniparafusos ortodônticos e os implantes dentários estão baseadas no tempo de serviço, na extensão da osseointegração e nas características da superfície (CRISMANI *et al.*, 2010). A osseointegração completa não é favorecida nos dispositivos de ancoragem temporária (TADs) ortodônticos devido à dificuldade de remoção, visto que são dispositivos que apresentam tempo de função limitado (REF).

Estudos clínicos correlacionam a inflamação do tecido peri-implantar com miniparafusos que se tornaram móveis ou frouxos (MIYAWAKI *et al.*, 2003; LUZI *et al.*, 2009). Dentre as razões pelas quais um mini-implante pode induzir um processo inflamatório local estão: o nível de higiene do paciente, o tipo de tecido circundante e o design da cabeça do mini-implante (TSAOUSIDIS & BAUSS, 2008). Neste contexto, a presença de macrófagos ao redor de implantes dentários com falha, contendo em seu interior citoplasmático partículas de titânio resultantes do processo corrosivo podem ser associadas com o processo

inflamatório. A presença de macrófagos está relacionada ao fato de que os produtos resultantes da corrosão do implante atuam como haptenos e induzem uma reação de hipersensibilidade tipo IV. A partir desta reação ocorreria a sensibilização dos linfócitos B, tendo como consequência a liberação de citocinas e recrutamento de macrófagos para a região, resultando em um processo inflamatório. Esses macrófagos se encontraram mais numerosos próximos das superfícies metálicas do que áreas mais distantes. Dessa maneira a concentração de íons metálicos liberados pela corrosão tenderia a ser inversamente proporcional à distância do metal. Diante de um processo corrosivo, a presença de macrófagos nos tecidos moles peri-implantares pode desempenhar um papel importante, acarretando uma consequência indesejável, onde esses processos podem levar à osteólise local e à perda da estabilidade clínica do implante (OLMEDO *et al.*, 2003).

1.1.1.2 Corrosão

A instalação de dispositivos no corpo humano pode gerar danos aos tecidos advindos da liberação de íons metálicos, resultante do processo corrosivo desencadeado na cavidade oral (COSTA *et al.*, 2007; KAO *et al.*, 2007; HOLST *et al.*, 2012; LIJIMA *et al.*, 2015). Idealmente, os mini-implantes ortodônticos devem apresentar resistência mecânica e resistência à corrosão, devido às características do ambiente oral em que serão instalados (CAETANO *et al.*, 2019). Entretanto, os dispositivos ortodônticos no meio bucal estão sujeitos a fenômenos de corrosão eletroquímica, que além de atuarem na biodegradação progressiva da superfície do material, atuam também, através do processo de oxidação, liberando substâncias potencialmente nocivas ou alergênicas (MIKULEWICZ & CHOJNACKA, 2011). GENTIL (1996) definiu: “a corrosão é a deterioração de um material, geralmente

metálico, por ação física, química ou eletroquímica do meio ambiente aliada ou não a esforços mecânicos". OLMEDO e colaboradores (2009) afirmaram que a corrosão pode ocorrer em todos os tipos de metais, necessitando de um meio corrosivo suficiente para que tal deterioração ocorra. Ainda, relata que o tipo de corrosão por pites, localizada sobre a superfície metálica, ocorre após a perda do filme passivo, que é sua camada protetora, para depois avançar em profundidade.

Os mini-implantes ortodônticos são estruturados à base de titânio, com uma camada protetora de óxido de titânio, que possui função de resistência à corrosão. Porém, quando os mini-implantes são submetidos ao meio ácido, aos íons fluoreto ou à saliva, sua proteção da camada de óxido de titânio pode ser perdida, resultando no início de um processo de corrosão (BARÃO *et al.*, 2012). ELIADES e colaboradores (2009) relataram a escassez de investigações sobre a condição da superfície do mini-implante durante sua utilização, avaliando as suas alterações estruturais, a modificação de suas propriedades mecânicas e as diversas interações tecido-material. Os episódios de corrosão resultam na formação de pequenas cavidades na superfície do dispositivo, que podem potencializar o ambiente corrosivo em torno do implante e afetar a sua estabilidade mecânica, gerando uma diminuição da vida útil do implante e a falha súbita (GITTENS *et al.*, 2011).

O titânio comercialmente puro (Ti CP), a liga titânio-alumínio-iovanádio (Ti₆Al₄V) e o aço inoxidável cirúrgico são matérias-primas utilizadas no desenvolvimento de mini-implantes ortodônticos. A liga Ti₆Al₄V dispõe vantagens quando comparada ao aço inoxidável cirúrgico, apresentando melhor biocompatibilidade, alta ação bacteriostática e alta resistência à corrosão, referente a formação de uma camada protetora de dióxido de titânio (TiO₂) (PRABHU & COUSLEY, 2006; LE GUÉHENNEC *et al.*, 2007; LICAUSI *et al.*, 2013; SUZUKI *et al.*, 2018; ALSAMAK *et al.*, 2012). Entretanto, CHANG e colaboradores (2018)

relataram preferir a inserção manual com MIEAs de aço inoxidável, por esse método requerer parafusos mais fortes e resistentes. Enquanto na maxila, por apresentar uma menor densidade óssea, é indicado o uso de parafusos de aço inoxidável (SS) e de titânio. Neste trabalho, os autores declararam que os parafusos SS são menos propensos a fraturas na mandíbula, em comparação com os de titânio. Portanto, CHANG e colaboradores (2018) indicaram como a melhor opção de uso de parafusos SS é na mandíbula, não havendo, entretanto, em relação de taxa de sucesso, diferença estatística entre os parafusos SS e os de titânio.

O titânio (Ti) comercialmente puro é usado para aumentar a resistência do implante fino à fratura. Já o alumínio (Al) e o vanádio (V) são incorporados ao Ti resultando em uma liga mais forte, Ti₆Al₄V (ELIADES *et al.*, 2009; COTRIM *et al.*, 2010). A incorporação destas ligas está diretamente relacionada a maior resistência mecânica, entretanto a presença desses metais pode acarretar uma maior correlação de presença de corrosão, quando comparado ao Ti CP, compostos pela liga Ti₆Al₄V (CAETANOVA *et al.*, 2019). Nesse contexto, são relatadas variações na liga metálica de marcas de mini-implantes, contendo pequenas quantidades de ferro (Fe) e manganês (Mn) (LIJIMA *et al.*, 2008).

A fratura do MI frequentemente está associada a miniparafusos de menor diâmetro (MIYAWAKI *et al.*, 2003; PARK *et al.*, 2003; MELSEN, 2005), porém pode-se conjecturar que a corrosão atue neste processo, levando a fratura do MI, como tem sido observado em fraturas de implantes osseointegrados convencionais (YOKOYAMA *et al.*, 2002). Neste sentido, superfícies metálicas com rugosidades ou com defeitos prévios propiciam um ambiente adequado para o processo corrosivo em um implante, levando ao comprometimento estrutural e afetando as propriedades mecânicas (GITTENS *et*

al., 2011). Assim, é essencial a investigação da resistência à corrosão, com o objetivo de determinar a biocompatibilidade desses dispositivos (LIJIMA *et al.*, 2015). KÖNÖNEN e colaboradores (1995) relataram as alterações que o hidrogênio e o flúor proporcionam na camada passiva da superfície metálica, ocorrendo a redução da resistência à corrosão ao reduzir a estabilidade da camada passiva. Além disso, o hidrogênio pode induzir a corrosão sob tensão através da fragilização por hidrogênio (KÖNÖNEN *et al.*, 1995). Corroborando tais fatos, PROBSTER e colaboradores (1992) demonstraram que os agentes profiláticos de flúor dental degradaram a superfície do titânio. ELIADES *et al.* (2009), relatam que nos mini-implantes, foi observada alguma interação entre a superfície do implante e o ambiente biológico em TADs recuperados, relacionando os seguintes materiais que estavam precipitados nas superfícies, sódio, potássio, cloro, ferro, cálcio e fósforo, que se depositaram a partir do contato do implante com fluidos biológicos, como sangue e exsudatos. Isso acarretou na formação de precipitados de cloreto de sódio, cloreto de potássio e cálcio-fósforo, e a composição do implante foi semelhante à de uma liga de titânio, sugerindo que o ambiente realmente pode afetar os mini-implantes. Entretanto, mesmo com a formação de pits de corrosão ao longo da superfície metálica de mini-implantes expostos ao fluoreto de sódio, observou-se a manutenção do torque ou dos ângulos de torção nos mini-implantes (MUGURUMA *et al.*, 2011).

1.1.1.3 Bactérias redutoras de sulfato

As Bactérias Redutoras de Sulfatos (BRS), são micro-organismos anaeróbios estritos, que apresentam um metabolismo capaz de reduzir íon sulfato a sulfeto, com temperatura ótima de crescimento entre 25 e 44°C e pH entre 5,5 e 9,0.

Esse grupo bacteriano são fastidiosos, com condições de cultivo muito específicos, como a exigência de diversos tipos de nutrientes, grande faixa de temperaturas ótimas, anaerobiose, tornando-as de difícil cultivo e isolamento. As BRS possuem a morfologia de bacilos curvos ou espiralados, com 0,5 a 1,0 µm de diâmetro e 3,0 a 5,0 µm de comprimento. Na atualidade, há cerca de 20 gêneros bem conhecidos, A partir do sequenciamento do gene *rrs*, que codifica para a subunidade 16S do RNA ribossômico (RNAr), as BRS podem ser classificadas em: *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Desulfotomaculum*, *Desulfolobus*, *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfonema* etc. (BADZIONG & THAUER, 1978; POSTGATE, 1984; VIDELA, 1992; GENTIL, 1996; MADIGAN, 2003; EHRLICH & NEWMAN, 2009).

As BRS estão distribuídas nos mais variados ambientes, como água, solo e pântanos salgados, e no no organismo humano, várias bactérias participam da digestão de ácidos gordurosos no microambiente intestinal, onde a espécie mais detectada é *Desulfovibrio desulfuricans*, entre elas as BRS (DZIERŻEWICZ *et al.*, 1996; LASKIN *et al.*, 2005), sendo estas encontradas também na microbiota oral de pacientes saudáveis e em bolsas periodontais, podendo estar associadas às doenças periodontais (BOOPATHY *et al.*, 2002).

Mesmo sendo encontrados em vários ambientes, são micro-organismos bem semelhantes, apresentando pequenas diferenças de composição nos ácidos gordurosos, nos fosfolipídios (DZIERŻEWICZ *et al.*, 1996; LASKIN *et al.*, 2005). Uma característica importante e diferencial desse grupo bacteriano é a capacidade de adesão a diferentes superfícies, formando biofilmes, onde formam um consórcio cooperativo com outros tipos de bactérias (VIDELA, 1992; LASKIN *et al.*, 2005; BITTON, 2005; LARRY & HAMILTON, 2007).

Um tipo de interação é o realizado com bactérias aeróbias, em que as BRS são favorecidas por um microambiente anaeróbio no biofilme, devido ao metabolismo das bactérias aeróbicas presentes, onde a utilização de oxigênio garantirá as condições redutoras específicas para o crescimento das BRS, gerando uma máxima atividade metabólica (VIDELA, 1992; LARRY & HAMILTON, 2007). Dessa forma, devido ao metabolismo das BRS, esse grupo microbiano é reportado na literatura como potenciais atuantes na biocorrosão, devido ser necessário a presença de microrganismo, diferentemente da corrosão.

As BRS necessitam da obtenção de energia através de fontes de carbono orgânico como o lactato, o piruvato, o etanol, o maleato e alguns ácidos graxos para que ocorra a redução do íon sulfato a sulfetos, bissulfetos e hidrogênio sulfetado, assim como produtos metabólicos intermediários como tiosulfatos, tetracionatos, politionatos, que apresentam função importante na corrosão anaeróbica do ferro (LE GALL, 1963; POSTGATE, 1965; BADZIONG & THAUER, 1978; VIDELA, 1992; MADIGAN, 2003; LARRY & HAMILTON, 2007). Os metabólitos sulfetos biogênicos, são primordiais no mecanismo de biocorrosão devido a capacidade de degradação e ruptura dos filmes protetores sobre o metal, por meio de um conjunto de mecanismos, como hidrogenásica das BRS, exposta na teoria de despolarização catódica (TDC), e os depósitos de sulfetos nos biofilmes (VIDELA, 1992; GENTIL, 1996). Segundo a TDC, as BRS apresentam capacidade hidrogenásica, utilizando o hidrogênio presente na superfície metálica, “polariza” ou detém o processo, prejudicando a recombinação de átomos de hidrogênio na zona catódica, acarretando de forma mais rápida o processo de corrosão. Essa teoria define ao efeito das BRS no processo de corrosão, diminuindo a energia de ativação da reação de recombinação dos átomos de hidrogênio e aumentando a velocidade do processo (VIDELA, 1992; GENTIL, 1996; BITTON, 2005).

2. JUSTIFICATIVA

A perda prematura dos mini-implantes extra-alveolares, assim como a sua fratura intra-óssea durante a instalação pode representar intercorrências indesejáveis durante o tratamento ortodôntico. Assim, a necessidade de uma análise de superfície metálica dos mini-implantes extra-alveolares, associada a condições biocorrosivas similares ao microambiente oral, quando instalados, pode auxiliar na interpretação e na prevenção dessas intercorrências.

Adicionalmente, o ambiente oral, altamente biocorrosivo, pode propiciar o desenvolvimento da biocorrosão e da corrosão nas superfícies metálicas dos mini-implantes extra-alveolares. Assim, a caracterização da superfície metálica, após a exposição a estes ambientes, se torna essencial, uma vez que a presença de pits de corrosão pode representar áreas de estresse, levando a fratura do instrumento, além de liberar íons metálicos potencialmente citotóxicos para o organismo.

3. OBJETIVO(S)

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a capacidade biocorrosiva das *Desulfovibrio fairfieldensis* oral em consórcio sobre a superfície de mini-implantes extra-alveolares implantados em mandíbulas humanas *ex-vivo*.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o torque para instalação, sob torção, de MIEAs novos em mandíbulas humanas;
- Caracterizar as alterações na superfície metálica dos MIEAS após a instalação nos corpos de prova ósseos (CPs/Bone) em imersão com cepas de *Desulfovibrio fairfieldensis oral*;
- Determinar a densidade óssea de corpos de prova de mandíbula humanas dissecadas correlacionado ao tipo ósseo presente em cada segmento das amostras;
- Avaliar a distribuição do biofilme bacteriano sobre a superfície metálica dos MIEAs quando estabelecido e
- Analisar a superfície metálica dos MIEAs após os ensaios biocorrosivos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ENSAIOS BIOCORROSIVOS EM MIEAS INSTALADOS EM MANDÍBULAS HUMANAS *EX-VIVO*

O projeto foi submetido ao comitê de ética e pesquisa humana da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO), nº71828323.0.0000.5283. Um total de 5 mandíbulas humanas dissecadas foram obtidas do Departamento de Anatomia Humana da Universidade Iguazu, no estado do Rio de Janeiro.

4.2 PREPARO DOS CORPOS DE PROVA ÓSSEOS

As mandíbulas humanas foram seccionadas no seu longo eixo transversal em segmentos de ± 15 mm, com auxílio de disco de carborundum. Como critério de inclusão foram utilizados os segmentos com o mínimo de 12 mm de altura do segmento mandibular, garantindo a total inserção dos mini-implantes extra-alveolares (MIEAs) (Fig. 1).

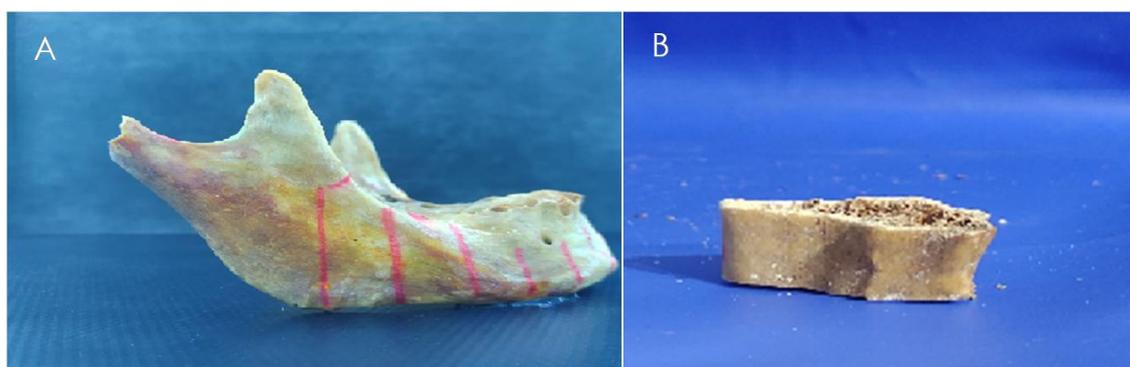


Figura 1 – Preparo da mandíbula humana. Peça anatômica dissecada (A) e segmento seccionado formando o corpo de prova (B).

Os MIEAs foram instalados sobre as áreas que apresentaram uma parede cortical óssea íntegra, sendo optada a face basilar da mandíbula nos corpos de

prova (CPs) que possuía o processo alveolar referente à presença de remanescentes dentários ou que apresentaram descontinuidade da parede cortical óssea.

Após o preparo dos corpos de prova ósseos (CPs/Bone), esses seguiram para imersão em solução salina estéril e acondicionados em incubadora por 48 h a 37 °C (Sterilifer IND. E COM.LTDA, São Paulo), objetivando manter os CPs/Bone hidratados.

4.3 MINI-IMPLANTES EXTRA-ALVEOLARES

Para o estudo, foram utilizados mini-implantes de modelos extra-alveolares (MIEAs) da marca S.I.N. Implant System, composto por titânio grau 5 com superfície anodizada em dourado, autoperfurantes com perfil transmucoso longo de 3 mm, diâmetro de 1.8 mm e comprimento de 10.0 mm. O MIEAs possuía perfil de rosca agressiva e ponta ativa, permitindo assim sua inserção sem a necessidade de formação de rosca prévia nos alvéolos dos CPs, indicados para instalações nas regiões buccal shelf e na crista infrazigomática.

Por serem mini-implantes autoperfurantes, em todos os CPs/Bone utilizados foi realizada uma perfuração prévia de 01 mm rompendo a cortical óssea, utilizando uma lança manual FML70 (orthodontic kit S.I.N, Sistemas de Implantes Nacional S/A, São Paulo, SP), seguindo a instalação do MIEAs em cada CP/Bone.

4.4 TORQUE SOB TORÇÃO PARA INSTALAÇÃO DE MINI-IMPLANTES EXTRA-ALVEOLARES

Nesta etapa foi avaliado o torque de instalação necessário, recomendado pelo fabricante de até 15 N/cm, sendo analisados os valores de torques, sob torção, máximos e mínimos em 12 MIEAs da marca S.I.N. Implant System instalados em CPs/Bone.

Como descrito na etapa 4.3, em cada CP/Bone utilizado nesta etapa foi realizada uma perfuração prévia de 01 mm, rompendo a cortical óssea, utilizando uma lança manual. Em seguida, os MIEAs e os CPs/Bone foram adaptados nos torquímetro de mesa ODEME TT100 (Odeme Dental Reserch), sendo os CPs/Bone fixados com o auxílio de uma braçadeira de mangueira, permitindo a estabilização e a exposição da crista óssea alveolar eleita para o ensaio (Fig. 2). Os parâmetros utilizados para a análise do torque de instalação dos MIEAS nos CPs/Bone, no torquímetro de mesa ODEME TT100, foram de 6 rpm e rotação em sentido horário.



Figura 2 – Ensaio de torque de instalação nos CPs/Bone. Adaptação dos MIEAS e dos CPs/Bone no torquímetro de mesa.

Durante a instalação nos CPs/Bone, os MIEAs foram instalados até final da região da rosca autoperfurante, permitindo a exposição de toda a região do perfil transmucoso e demais regiões acima, stop, hexágono e slot (Fig. 3). Em seguida os espécimens já instalados, grupo MIES/Bone, foram examinados com magnificações de 8x em estereomicroscópio óptico (Opticam Model STAND SE 2200, China), com

o auxílio do software TSView 7.2.1.1 (Tucsen Imaging Technology Co.), permitindo a avaliação da superfície cortical de instalação e os MIEAS.

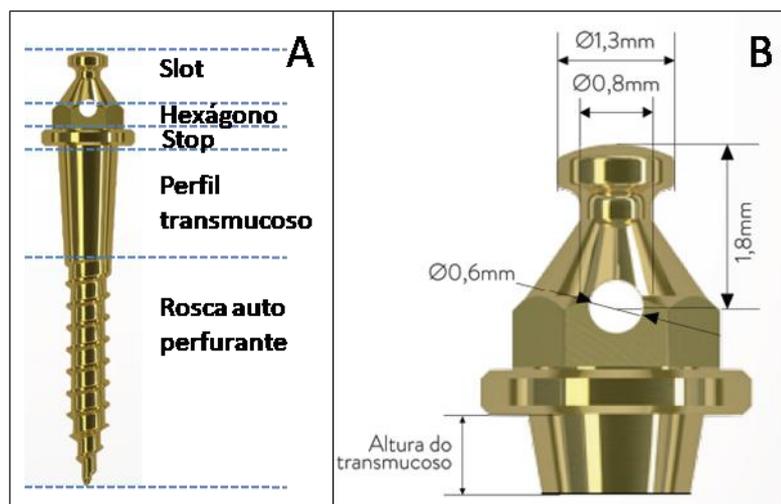


Figura 3 – Delimitação esquemática das regiões dos mini-implantes extra-alveolares (imagens do manual de uso ortodôntico, SIM implantes).

4.6 DETERMINAÇÃO DA MASSA

4.6.1 Perda de massa do slot e hexágono dos MIEAs

A fim de verificar uma possível perda de massa no slot e no hexágono dos MIEAs, foram utilizados 3 MIEAS que seguiram a metodologia do ensaio de instalação manual dos MIEAs, sendo pesados inicialmente em triplicata (M_1), em balança de precisão de 6 casas decimais (Sartorius Lab Instruments GmbH&Co.KG Goettingen.Germany). Cada MIEAS foi instalado em um CP/Bone, realizando-se a remoção imediatamente após. Em seguida, os MIEAS foram submetidos a decapagem química em solução de 1000mL de água destilada em fosfato trisódio ($\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) por 10 min a 100 °C. Ao final, os MIEAS seguiram para nova pesagem em triplicata (M_2) em balança de precisão, determinando assim a média percentual de perda de massa de cada MIEAs após a instalação, a fim de verificar se o atrito promovido durante a inserção da chave de instalação com a região do slot

e do hexágono dos MIEAs seria capaz de realizar uma perda massa significativa (Tab.1 e Fig. 4).

Tabela 1 – Etapas de análise de desgaste do slot e do hexágono dos MIEAs por perda de massa.

Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Etapa 4	Etapa 5
MIEAs novos (n = 3)	Instalação manual nos CPs/Bone	Remoção manual	Decapagem química Solução de 1000mL de água destilada em fosfato trisódio ($\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) por 10 min em ebulição.	MIEAS usados e removidos
Pesagem inicial em triplicata (M_1).	Torquímetro manual	Torquímetro manual	-----	Pesagem final em triplicata (M_2).



Figura 4 – Organograma das etapas análise de desgaste do slot e do hexágono dos MIEAs por perda de massa.

O cálculo de percentual de perda de massa (Pm) constituiu em avaliar a massa final (M_2) reduzida da massa inicial (M_1), em gramas. Dessa forma, foi aplicada a equação 1, levando em conta as massas obtidas da etapa M_1 e M_2 .

Equação 1.

$$P_m = \frac{M_2 - M_1}{100}$$

4.7 MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura para o cultivo das BRS foram preparados previamente ao ensaio de imersão, de acordo com os seguintes protocolos.

- Meio de saliva artificial (GAL *et al.*, 2001; Heggendorn *et al.*, 2010), com a seguinte composição (g/L de água destilada): NaCl (0,1256g), KCl (0,9639g), KSCN (0,1892g), KH₂PO₄ (0,6545g), Ureia (0,2g), Na₂SO₄ (1,0g), NH₄Cl (0,178g), CaCl₂.2H₂O (0,2278g) e NaHCO₃ (0,6308g). O pH do meio foi ajustado para 6.8 com NaOH. Após o preparo, o meio foi distribuído em jarra de 2 litros purgado com nitrogênio gasoso por 20 segundos sendo lacrado com tampa e, posteriormente, autoclavado por 15 minutos a 121 °C. Em seguida, a jarra foi acondicionada a 4 °C até o momento do ensaio.

- Meio de cultura Postgate E modificado (POSTGATE, 1984) consistindo da seguinte composição (g/L de água destilada): KH₂PO₄ (0,5g); NH₄Cl (1,0g); Na₂SO₄ (1,0g); CaCl₂.2H₂O (0,67g); MgCl₂.6H₂O (1,68g); Lactado de sódio (7,0g); Extrato de levedura (1,0g); Ácido ascórbico (0,1g); Ágar-ágar (1,9g); NaCl (5,0g); FeSO₄.7H₂O (0,5g). Foram utilizados 4 mL de indicador rezasurina na concentração de 0,25 g/L. A solução foi aquecida a 50 °C sob agitação em placa de aquecimento (IKA, C-MAG HS7) e purgada com nitrogênio gasoso por 20 minutos. O pH do meio foi ajustado para 7,6 com NaOH. O meio de cultura foi distribuído em frascos de penicilina de 10 mL, selados com tampa de borracha e lacre de alumínio.

Posteriormente os frascos foram autoclavados (marca Primatec Vertical, modelo CS) por 15 minutos a 121 °C e armazenados a 4 °C.

- Solução salina tamponada com fosfato (PBS): composição (g/L de água destilada): NaCl (8,01g); KCl (0,20g); Na₂HPO₄ (1,44g); KH₂PO₄ (0,24g). O pH da solução foi ajustado para 7,4 com NaOH, sendo autoclavada por 15 minutos a 121°C e acondicionada a 4°C.

- Solução redutora para bactérias anaeróbicas, com a composição (g/L de água destilada): tioglicolato de sódio (0,124g), ácido ascórbico (0,1g), NaCl (0,5g) e rezasurina (0,25g) sob agitação em placa magnética e purgada com nitrogênio gasoso. O pH da solução foi ajustado para 7,6 sendo autoclavada a 1,0 atm por 15 minutos a 121°C.

4.8 CULTIVO BACTERIANO

Os micro-organismos utilizados para as inoculações foram obtidas do banco de cepas do Laboratório de Biocorrosão e Biodegradação (LABIO) do Instituto Nacional de Tecnologia do Rio de Janeiro (INT), sendo utilizadas como inóculo bacteriano para o estudo dos efeitos biocorrosivos. A cepa de BRS pertencente à espécie *Desulfovibrio fairfieldensis* oral em consórcio bacteriano, extraída de saliva humana (Heggendorn *et al.*, 2015).

Os cultivos bacterianos contendo *D. fairfieldensis* foram repicados em meio de cultura Postgate E modificado, incubados por 28 dias em incubadora a 37° C (STERILIFER IND.E COM.LTDA.) O crescimento dos cultivos de BRS foram verificados através da formação de sulfeto ferroso, e seguiram para o ensaio de imersão dos MIEAs.

4.9 ENSAIO EX-VIVO - INSTALAÇÃO MANUAL

4.9.1 Determinação da densidade óssea

Previamente a etapa de instalação de MIEAs nos CPs/Bone, todos os CPs/Bone (n = 9) foram escaneados no microtomógrafo (μ Ct) SkyScan 1174 (Bruker- μ CT, Kontich, Bélgica). Os parâmetros utilizados na aquisição das imagens no μ CT foram: voltagem 50 Kvp; Source Current 800 μ A, flat-field correction, filtro Al 0.5, Image Pixel size 28.8 μ m; Exposure 4000 ms; Rotation Step 0.5, Frame Averaging 3.

As imagens obtidas do μ CT foram reconstruídas e processadas no programa NRecon (SkyScan, Kontich, Bélgica), ajustando os parâmetros: Ring artifacts reduction 7, Beam-hardening correction 46%, Smoothing Kernel Gaussian, Defect pixel masking 50% e Misalignment Compensation. Posteriormente, as imagens foram segmentadas no programa CTan (SkyScan, Kontich, Bélgica), delimitando as regiões de interesse (ROI) das amostras. A ROI de cada espécime seguiu para o processo de limiarização e binarização das imagens, ajustando o histograma para evidenciar a porosidade nas amostras. Em última análise, as imagens 3D foram avaliadas visualmente no software DataViewer e CtVox (SkyScan, Kontich, Bélgica).

A densidade óssea de cada CP/Bone foi analisada através do software CTan, utilizando a análise de densidade de Hounsfield (HU), que foi correlacionada seguindo a classificação do tipo ósseo de MISCH (2009).

4.9.2 – Taxa de corrosão por perda de massa em MIEAs

Dos 9 MIEAs utilizados no ensaio de determinação da densidade óssea, 6 MIES seguiram para pesagem em balança de precisão de 6 casas decimais (Sartorius Lab Instruments GmbH&Co.KG Goettingen.Germany), em triplicata,

determinando a média da massa inicial (M_1) de cada MIEA. Os dados obtidos nesta etapa foram reservados para serem aplicados no cálculo de perda de massa (Equação 1) e no cálculo da taxa de corrosão por perda (Equação 2), após o ensaio de imersão em cultivo bacteriano.

Para o cálculo da taxa de corrosão por perda de massa dos MIEAs submetidos ao ensaio de imersão, foram considerados os seguintes parâmetros expostos na equação 2 (NACE TM0169/G31, 2021). De acordo com as informações dos MIES junto a empresa S.I.N., foi estabelecida a área de superfícies do MIEAs (área de superfície = 103.97 mm²), sendo esse dado transportado para a equação de Taxa de corrosão.

Equação 2.

$$\text{Taxa de corrosão} = (k \times W) / (A \times T \times D)$$

Onde:

k= Constante (mm/ano) = 3.45×10^6

T= tempo de exposição em horas 0.01 h

A = área em cm² (1.0397 cm² · MIEAs)

W = perda de massa em g

D = densidade em g/cm³ do titânio (4.54 g /cm³) (ASTM G1 – 03, 1999).

4.9.3 Instalação manual dos MIEAS

A partir da determinação da densidade óssea dos CPs/Bone, o peso inicial de cada MIEAs e estabelecido o cultivo das *Desulfovibrio fairfieldensis* oral em consórcio, seguiu-se a instalação dos 9 MIEAS em 9 CPs/Bone. Todos os materiais e instrumentais necessários para montagem do ensaio foram levados para câmara de fluxo laminar (TROX TLF CLII A/SERIE 2594711-1) e esterilizados sob luz ultravioleta (U.V.) por 30 minutos, em cada face. O kit de lança e os CPs/Bone foram previamente esterilizados em autoclave (Autoclave ALT 21 L) por 30 min a 134 °C.

Dentro da câmara de fluxo laminar, foi realizada em cada CP/Bone uma perfuração de 1 mm com uma lança manual, seguindo-se a instalação dos MIEAs nos CPs/Bone com o auxílio do torquímetro manual (King Tony $\frac{1}{4}$ 15Nm código 3426C-1DF2110), adaptado a chave digital CDPO24 do Kit S.I.N. (orthodontic kit S.I.N, Sistemas de Implantes Nacional S/A, São Paulo, SP), limitando a força em 15N, como determinado pela fabricante. Após a instalação, os MIEAs instalados nos CPs/Bone, agora denominados de Man-Bone/MIEAs, foram selados na face mesial e distal trabecular com cera branca ortodôntica (MAQUIRA INDÚSTRIA DE PRODUTOS ODONTOLÓGICOS S.A.), evitando assim exposição direta da trabécula óssea ao meio de imersão contaminado (Fig. 5).



Figura 5 – Chave digital CDPO24 adaptada a um soquete (A); Torquímetro manual King Tony $\frac{1}{4}$ 15Nm adaptado a chave digital CDPO24 do Kit SIN (B); Man-Bone/MIEAs selado com cera branca ortodôntica (C).

Em seguida, os Man-Bone/MIEAs seguiram para o ensaio de imersão biocorrosivo em meio modificado de saliva artificial inoculados com *Desulfovibrio fairfieldensis* oral em consórcio (Heggendorn *et al.*, 2015).

4.10 ENSAIO DE IMERSÃO BIOCORROSIVO

Nesta etapa os Man-Bone/MIEAs, da sessão 4.9.3, foram expostos a diferentes condições, em triplicata. Para o ensaio de imersão biocorrosivo, foram

utilizados 2 biorreatores, feitos com um recipiente acrílico circular com fechamento hermético (11 x 12 cm, 1140 mL), sendo divididos em duas condições:

- Biorreator BRS – Inicialmente foi inoculado um volume de 5% V/L de cultivo de *Desulfovibrio fairfieldensis* oral em consórcio (57 ml) no biorreator com a saliva artificial. Imediatamente após a inoculação, os 5 Man-Bone/MIEAs foram imersos no biorreator (Man-Bone/MIEAs/BRS) (Fig. 6);

- Biorreator Control. – Grupo controle, Man-Bone/MIEAs/Control, empregando as mesmas condições utilizadas acima, sem a inoculação do consórcio bacteriano, mantendo imersos 4 Man-Bone/MIEAs imersos somente em meio modificado de saliva artificial (Fig. 6).

Após a imersão dos Man-Bone/MIEAs/BRS e dos Man-Bone/MIEAs/Control, os biorreatores seguiram para armazenamento em estufa a 30°C por 99 dias.



Figura 6 – Biorreator BRS (1) e Biorreator Control. (2). Formação de sulfeto ferroso no biorreator BRS após inoculação, tempo zero do ensaio (1).

Imediatamente antes da inoculação das *Desulfovibrio fairfieldensis* oral em consórcio e após o período de 99 dias do ensaio de imersão, no biorreator BRS, foram determinadas as concentrações celulares do inóculo bacteriano, através da

técnica do número mais provável (NMP) e da reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR).

4.10.1 Técnica do número mais provável

A quantificação celular através da técnica NMP foi realizada a partir do biorreator BRS, com a remoção de uma alíquota de 1 ml de saliva artificial contaminada, sendo uma alíquota do início e outra após o período de 99 dias. Esse conteúdo foi submetido a dez diluições decimais seriadas em Solução redutora para bactérias anaeróbicas, de 10^{-1} a 10^{-10} , para cada alíquota. De cada uma dessas diluições, alíquotas iguais de 1,0 ml foram transferidas para três frascos contendo meio de cultura Postgate E modificado. Como controle, utilizou-se um frasco de meio de cultura de Postgate E modificado sem inoculação. Todos os frascos foram incubados por 28 dias a 30°C , e em seguida, os positivos foram identificados. Pelo número de tubos positivos observados através de precipitado de sulfeto ferroso no meio de cultura, em cada uma das diluições empregadas foi determinado o NMP por ml, tendo como base a tabela estatística de APHA (2012) (MC CRADY, 1915).

O cálculo final para obtenção do NMP dos biofilmes formados nos cupons foi realizado conforme a equação 3, abaixo (SANTOS *et al.*, 2015):

Equação 3.

$$\text{NMP/cm}^2 = \frac{\text{NMP (cél/s/mL)} \times \text{Volume do Diluente (mL)}}{\text{Área Biocupom (cm}^2\text{)}}$$

4.10.2 Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)

4.10.2.1 Técnica de extração de DNA

A extração de DNA foi realizada a partir das amostras de 3 Man-Bone/MIEAs/BRS originários do Biorreator BRS, em que foram usadas uma alíquota do fluido do biorreator do início do ensaio de imersão, uma imediatamente após a inoculação no meio de saliva artificial, e outra após o período de 99 dias.

Em cada amostra, foi realizada a centrifugação de 9 ml do fluido a 10.000X g por 15 minutos, para a precipitação dos micro-organismos. A partir deste ponto, o precipitado foi separado da parte aquosa, e processado, utilizando o Kit Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep (Kit de extração de DNA, Zymo Research), a fim de promover a extração e amplificação do gene RNA ribossomal da BRS (gene AB dsr). Em adição, foi utilizada a *Desulfovibrio desulfuricans*, baseada em Clone DCM 642.

4.10.2.2 qPCR

Após a extração do DNA, as amostras originárias dos 3 Man-Bone/MIEAs/BRS e os das duas alíquotas do fluido do biorreator BRS, a inicial e final do ensaio de imersão, seguiram para o equipamento termociclador modelo AB 7500 (Applied Biosystem) com objetivo de obter a quantificação total das BRS presente na amostra. Para detectar esse alvo foram utilizados os iniciadores DSR1F (5' ACSCACTGGAAGCACG 3') e RH3-dsr-R (5' GGTGGAGCCGTGCATGTT 3'), juntamente com a solução, que é composta por uma enzima termo resistente e um marcador fluorescente, o Power SYBR® Master Mix (*Thermofisher Scientific*). Para a quantificação da taxa de fluorescência em tempo real (qPCR), cada ciclo foi realizado nas seguintes condições: 55°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos seguidos de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Para verificar a presença de dímeros de *primers*, os produtos de amplificação, obtidos com a reação, foram submetidos à curva de dissociação padrão do equipamento. Ao final

do processo, os sinais adquiridos durante a metodologia foram armazenados e utilizados para estimar o número de células por mL de amostra. O Software utilizado para o processamento dos dados foi o 7500 Software v2.3.

4.11 ANÁLISES DO ENSAIO DE IMERSÃO

Após o período de 99 dias, as amostras foram removidas dos biorreatores. Dentro de uma câmara de fluxo laminar foi realizada uma fratura na face mesial e distal, da cortical e medular óssea, em cada espécime. As fraturas foram realizadas com auxílio de um cinzel ósseo, nos 4 Man-Bone/MIEAs/Control e 5 Man-Bone/MIEAs/BRS, para a liberação dos MIEAs sem tocar as superfícies metálicas dos MIEAs.

Além da técnica do NMP e do qPCR, descritas acima, imediatamente após a liberação dos MIEAs foram realizadas análises de determinação de massa e de microscopia adicionais, como descrito na tabela 2.

Tabela 2. Análises realizadas no MIEAs após o ensaio de imersão.

	CP/Bone Correlação com a Unidade de Hounsfield	MIEA	Análises
Man-Bone/MIEAs/Bact. Removidas do Biorreator BRS	24	A	Decapagem química – Perda de massa
	18	B	Decapagem química – Perda de massa
	17	C	Decapagem química – Perda de massa
	26	D	Microscopia de Epifluorescência – Fluoróforo Live and Dead.
	15	E	Desidratação – ponto crítico – metalização - MEV* - Microanálise de superfícies e Biofilme
Man-Bone/MIEAs/Control. Removidas do Biorreator Control	25	F	Decapagem química – Perda de massa
	22	G	Decapagem química – Perda de massa
	21	H	Decapagem química – Perda de massa
	27	I	MEV – Microanálise de superfície

* = Microscopia eletrônica de varredura.

4.11.1 Microscópio confocal de varredura a laser

A visualização do potencial biofilme hidratado formado sobre o MIEA foi realizada por microscopia de epifluorescência confocal de varredura a laser (ZEISS - LSM 710/LSM 710 NLO and Confocul 3). Imediatamente após a retirada de 1 MIEA do Biorreator BRS, o dispositivo foi tratado, para a posterior visualização dos microorganismos aderidos.

O MIEA foi exposto ao fluoróforo do kit Live/Dead[®] (FilmTracer[™] Live/Dead[®] Biofilm Viability Kits, Invitrogen[™]), a fim de identificar células vivas e mortas em uma população mista. O Kit Live/Dead[®] é composto pelo SYTO[®] 9, que marca de verde fluorescente as células vivas e mortas, e pelo Iodeto de Propídio (IP), que marca de vermelho fluorescente as células mortas, penetrando apenas em bactérias com membrana danificada, sobrepondo-se ao SYTO[®] 9. O fluoróforo foi preparado com a seguinte composição em microtubo tipo eppendorf 1,5 mL: 398 µL de água deionizada Milli-Q (Direct-Q, Merck Millipore, Alemanha), 1 µL de SYTO[®] 9 e 1 µL de Iodeto de Propídio, seguido de homogeneização. Posteriormente, o MIEA foi imerso no fluoróforo, por um período de incubação de 15 minutos em ambiente escuro, para em seguida, ser observado no microscópio de epifluorescência.

Para a obtenção de imagens, o microscópio foi ajustado para excitar o SYTO[®]9 e o IP com os lasers 488 nm e 514 nm, respectivamente. Os filtros de corte foram também ajustados para que só fossem captadas emissões nas faixas dos fluoróforos. O material foi posicionado sobre lamínulas de quartzo. Uma série de imagens foi obtida em diversos planos focais (Z stack), para que assim, fosse caracterizar a morfologia do biofilme quanto a viabilidade celular. Todas as imagens

foram processadas pelo programa ZEN-2012 (Zen Blue e Zen Black), controlador do microscópio confocal LSM-710, fornecido pela empresa Zeiss.

4.11.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a análise no MEV, 1 MIEA do grupo Man-Bone/MIEAs/BRS foi submetido a preparo prévio para manutenção do biofilme bacteriano a partir da técnica do ponto crítico. Inicialmente foi realizada a fixação do material biológico, imergindo o MIEA por 4h em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,4), preparado com água Milli-Q. Decorrido o período, o MIEA foi retirado da solução e lavado três vezes em tampão cacodilato 0,1M, por 15 min cada. Em seguida, foi realizada uma desidratação seriada crescente em acetona 10%, 20%, 40%, 60% 80% e 100% (Acetona PA-ACS, Propanona, Confiança CRQ, Lot. 012782) por 15 minutos cada. Por fim, efetuou-se a técnica do ponto crítico no equipamento de ponto crítico (Leica Microsystems; Leica EM CPDO30), com a finalidade de substituir todo o líquido residual do biofilme por CO₂ líquido, que a 31°C e 73 atm de pressão, rapidamente converteu-se em CO₂ gasoso através do equipamento de ponto crítico. Em seguida, foi realizada a metalização da superfície com ouro (15 nm de espessura) e a análise no MEV-FEG (QUANTA FEG 450, FEI Company) (Tab. 2). Paralelamente, 1 MIEA do grupo Man-Bone/MIEAs/Control foi selecionado para análise comparativa.

Os MIEAs seguiram para o MEV, para microanálise de superfície metálica, sendo verificadas as seguintes regiões de interesse (Fig. 7):

A - Perfil transmucoso dos MIEAs, slot e hexágono, sendo as áreas expostas aos meios de imersão; e

B - Região de rosca perfurante, em contato com o osso cortical e medular, sem exposição direta ao meio de cultura (Tab. 2).



Figura 7. – Figura esquemática da microanálise de superfície metálica no MEV, sendo obtidas 3 áreas na região do perfil transmucoso e slot, que foram expostas aos meios de cultura; e 3 áreas na região de rosca perfurante, em contato com o osso anteriormente, sem exposição direta ao meio de cultura.

4.11.1 Determinação da taxa de corrosão por perda de massa nos MIEAS

Decorrido o tempo de imersão de 99 dias, em 3 MIEAs de cada grupo, Man-Bone/MIEAs/Bac e Man-Bone/MIEAs/Control, os espécimes foram submetidos a decapagem química (Tab.1), seguindo para o desumidificador (Armário Desumidificador MRD-45T, EIRMAI) por 7 dias, a 29 C° e 48% de umidade. Imediatamente após o período de secagem, todos os MIEAs seguiram para pesagem na balança de precisão, em triplicata, obtendo-se o valor da perda de massa final (Equação 1), para então seguir para a determinação da Taxa de corrosão por perda de massa nos MIEAs (Equação 2).

4.11.2 Análises de dados

As análises de dados qualitativas foram obtidas a partir das eletromicrografias obtidas no MEV e microscopia de epifluorescência, enquanto as análises quantitativas foram analisadas estatisticamente.

Para as análises qualitativas foram empregadas as análises de presença bacteriana e ou de biofilme, presença de trincas, pits de corrosão e outras alterações de superfície observadas por microscopia.

Para as análises quantitativas, foram analisados os valores de torques máximos de inserção por torção e o cálculo da taxa de corrosão por perda de massa, com o programa Graph Pad PRISM v. 4.0, com $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 TORQUE SOB TORÇÃO PARA INSTALAÇÃO DE MIEAS

A média dos torques máximos de instalação, sob torção, no torquímetro de mesa ODEME TT100, dos MIEAs nos CPs/Bone, foi de $0,226 \pm 0,101$ N/Cm².

Posteriormente, a análise dos 12 MIEAs/Bone no estereomicroscópio óptico revelou a presença de trincas ao longo da cortical óssea marginal em 8 MIEAs/Bone (Fig.8.B). Em adição, a análise no estereomicroscópio óptico revelou a extrusão de partículas ósseas através da interface do orifício de perfuração do leito ósseo e dos MIEAs, em 7 CPs/Bone permanecendo aderida nesta região (Fig.8.A e C).

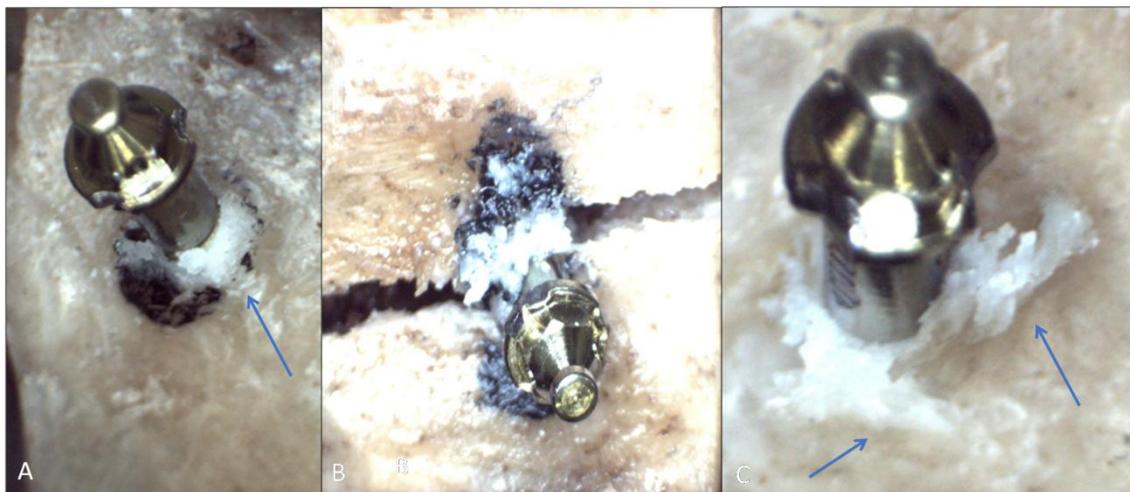


Figura 8. Análise do osso cortical periférico nos MIEAs. Cortical óssea sem trinca (A) e com trinca (B), após instalação de MIEA. Extrusão de partículas ósseas na interface de instalação (A e C, setas azuis).

A fim de isolar a influência destas trincas geradas nos CPs, a média dos torques máximos de instalação dos MIEAs nos CPs/Bone foram divididos em dois grupos: grupo com cortical óssea íntegra (GCI) (n = 4; 33,34% do total) e grupo com cortical óssea trincada (GCT) (n = 8; 66,66%), revelando uma média de $0,170 \pm 0,108$ N/Cm² e $0,254 \pm 0,092$ N/Cm², respectivamente. Através dos dados obtidos no

ensaio mecânico, foi realizado um Test T não pareado ($P = 0.1874$), que não revelou diferença estatística entre os grupos (Gráf. 1). O menor torque máximo obtido no GCI foi de 0.06 N/Cm^2 , enquanto no GCT foi de $0,124 \text{ N/Cm}^2$.

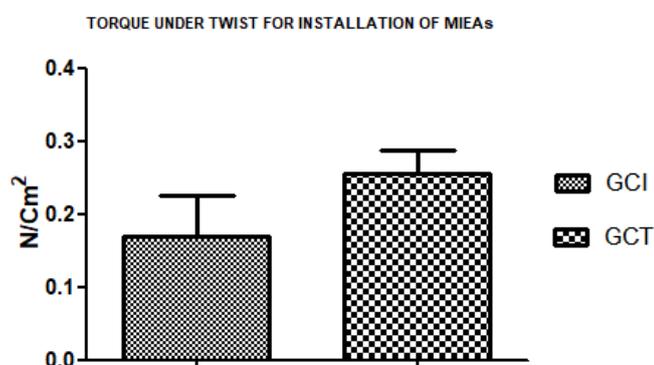


Gráfico 1 – Torque sob torção para instalação de MIEAs com trinca óssea cortical e sem trinca na cortical óssea.

5.2 PERDA DE MASSA DO SLOT E HEXÁGONO

O resultado de perda de massa através atrito promovido no slot e no hexágono dos MIEAs pelo adaptador do torquímetro manual revelou uma perda de massa insignificante, não havendo desgaste significativo nessas regiões a ponto de ser necessário inserir um coeficiente de ajuste nos demais cálculos de perda de massa (Anexo 2 e Tab. 3).

Tabela 3. Média da perda de massa do ensaio de desgaste do slot e do hexágono dos MIEA.

MIEAS	Média Inicial (M_1)	Média Final (M_2)	Perda de Massa (%)
MIEA 1	0,1405 g	0,14049 g	0,0000001
MIEA 2	0,140507 g	0,1405 g	0,00000007
MIEA 3	0,140627 g	0,140643 g	- 0,00000016

Ainda, o resultado da perda de massa do slot e hexágono sugere a permanência da integridade da superfície metálica na região do slot e hexágono dos

MIEAs, não havendo arrancamento de superfície, o que poderia favorecer a uma corrosão localizada.

Outro ponto avaliado neste ensaio foi a falta de capacidade de promover a perda de massa que a decapagem química, através da solução de fosfato trisódico, poderia realizar nas superfícies metálicas dos MIEAS. Como recomendado pela norma NACE TM0169/G31 (2021), deve ser realizado um ensaio piloto a fim de verificar a perda de massa devido a um possível efeito corrosivo que as diferentes soluções empregadas na decapagem química.

5.3 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE ÓSSEA PARA ENSAIO *EX-VIVO*

Após a segmentação das reconstruções tomográficas, dos CPs/Bone nas ROIs (Fig. 9), no μ CT, seguiram-se as análises da HU (Gráf. 1). A partir dos valores de média % de HU encontrados nas ROIs, esses foram correlacionados quanto a densidade óssea segundo MISCH (2007), como sendo osso D1, com HU superior a 1250 HU; osso D2, com valores entre 850 e 1250 HU; osso D3 com valores 350-850 HU, osso D4 com valores 150-350 HU e osso D5 com valores inferiores a 150. Esta análise revelou somente 1 CP/Bone (CP/Bone nº 25) com densidade óssea D5, enquanto os demais CPs/Bone foram classificados com densidade óssea D1 (Gráf. 2).

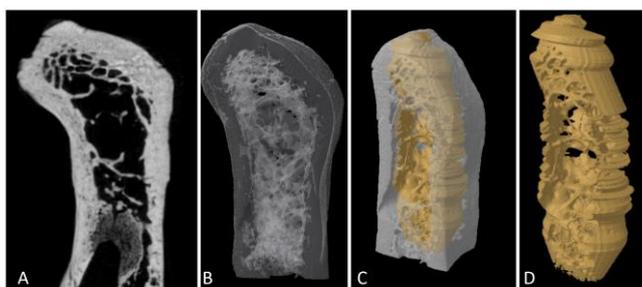


Figura 9. Delimitação da área de interesse nos CPs/Bone. Reconstrução 3D no software DataViewer (A) e no CtVox (B), onde foi analisada a estrutura interna. Sobreposição das reconstruções do CP/Bone e da ROI (C). A imagem D revela somente a ROI onde foi instalado o MIEA através do software CTVol.



* = Intertravamento na região da rosca autoperfurante.

** = Fratura na região da ponta da rosca autoperfurante.

Gráfico 2. Correlação entre HU na análise de densidade óssea das regiões de interesse dos CPs/Bone.

Durante a instalação dos 9 MIEAS, nos 9 CPs/Bone, houve a ocorrência de fratura em 1 MIEA, na região da ponta da rosca autoperfurante, e o intertravamento na região da rosca autoperfurante de 1 MIEAs, sendo interrompido após o limite alcançado pelo torquímetro de 15N. Com isso, foram acrescentados mais 1 CPs/Bone e 2 MIEAS nesta etapa, sendo realizado o aproveitamento do CPs/Bone “18”, utilizando a face cortical oposta.

Os dados demonstrados revelaram que dos 10 MIEAs instalados em osso tipo D1, a taxa de intercorrência para inviabilizar a instalação é de 20%. Já ao desconsiderar o tipo do osso a ser instalado, analisando todos os 11 CP/Bone, a taxa de intercorrência reduz para 18,18%. Entretanto, cabe resultar que o CP/Bone 18, com a maior HU, foi o que apresentou a única intercorrência de fratura na ponta da rosca do MIEA, corroborando a influência que a densidade óssea possui na fratura de MIEA.

5.4. TÉCNICA DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL E DO qPCR

As técnicas do NMP e do qPCR utilizadas para determinar o inóculo bacteriano inicial no biorreator BRS (NMP $> 2,4 \times 10^4$ células /mL e qPCR $1,70 \times 10^7$) revelaram um número de células vivas e cultiváveis iguais após o período final de 99 dias no NMP (NMP $> 2,4 \times 10^4$ células/ml). Diferentemente, na análise de qPCR houve um decréscimo no número de células no fluido do Biorreator BRS, que ficou igual a $1,9 \times 10^4$.

O NMP nos 3 Man-Bone/MIEAs/BRS foi de 4 células/ml; $4,3 \times 10^1$ células/ml. e $7,5 \times 10$ células/ml. Transportando esses dados para o cálculo final para obtenção do NMP/Cm² nos biofilmes (Equação 3) formados nos Man-Bone/MIEAs/BRS o número de células viáveis e cultiváveis por cm² na superfície foi de $3,4 \times 10^1$ células/cm², $3,7 \times 10^2$ células/cm², $6,4 \times 10^1$ células/cm².

5.4.1 Taxa de corrosão por perda de massa em MIEAs

A análise da taxa de corrosão (TC) por perda de massa revelou uma maior média de TC no grupo Man-Bone/MIEAs/Control (TC $0,011621 \pm 0,0176811$) e Man-Bone/MIEAs/BRS (TC $0,0003418 \pm 0,0025805$) (Gráf.3).

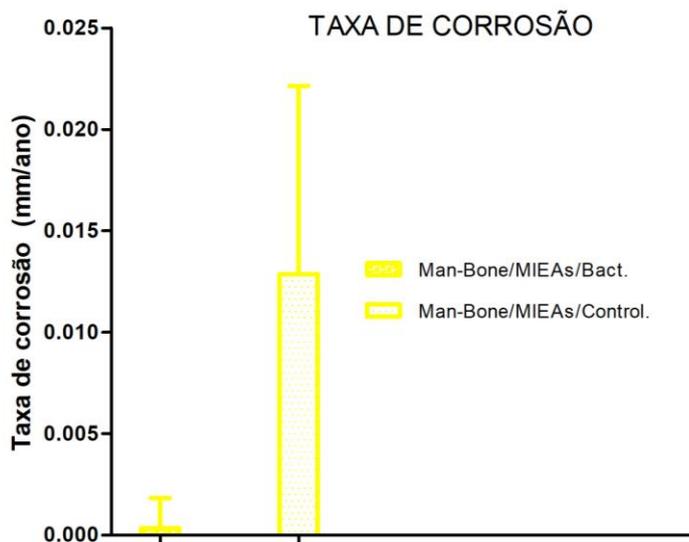


Gráfico 3. Medidas das taxas de corrosão (TC) por perda de massa.

Os valores da taxa de corrosão foram analisados usando o teste não paramétrico de Mann-Whitney, que não revelou diferença estatística significativa entre os grupos, revelando um $p = 0.400$ e $U = 2,00$ (Graph Pad PRISM v. 4.0). Ao confrontar o valor de U encontrado com a tabela de valores críticos de Mann-Whitney (U) foi possível rejeitar a hipótese de que a TC encontrada no Man-Bone/MIEAs/Control possuía o mesmo padrão corrosivo da TC do Man-Bone/MIEAs/BRS. A diferença de padrão na TC encontrada entre os grupos pode ser correlacionada à característica de corrosão abiótica e biótica que o Man-Bone/MIEAs/Control e Man-Bone/MIEAs/BRS possuem, respectivamente. Outro fator a se considerar é quanto a dependência de uma população microbiana ativa mínima para que seja realizada a biocorrosão na superfície metálica deste último grupo.

5.5 EPIFLUORESCÊNCIA

Os resultados obtidos pelo uso do Kit Live/Dead[®], demonstraram que as fotomicrografias do MIEA sugeriram um biofilme ativo, marcado predominantemente

pelo SYTO®9, que marca de verde fluorescente as células vivas. A partir do corante fluorescente IP, que marca de vermelho fluorescente as células mortas, foi verificado pontualmente após processamento do canal de emissão no programa ZEN Blue. Já as análises 3D, demonstraram um biofilme com microestrutura irregular, com áreas de maior concentração microbiana e outras pontuais (Fig. 10 C.2, C.3, e C.4). A análise dos cortes transversais sugeriu uma espessura regular como na figura 10.C.1.

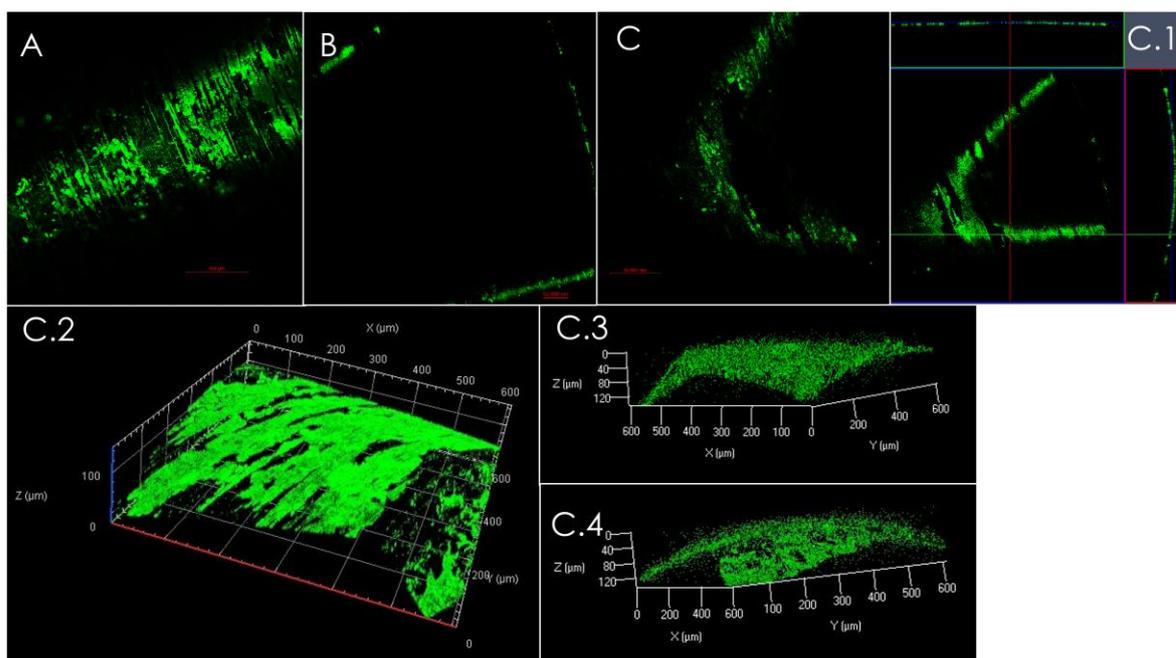


Figura 10. Superfície metálica da área de rosca do MIEA excitada com o fluoróforo *Live/Dead*. A - Objetiva de 5x/0.16 (A), 20x/0.50(B) e 40x/0.6 (C). Reconstrução da imagem C em dois planos transversais (C.1) e 3D (C.2, C.3 e C.4).

A análise isolada do canal do fluoróforo de IP, processando o histograma para o modo Min/Max com Best Fit (Zen blue) revelou a presença do IP, de forma pontual com reduzida luminescência. Em uma das imagens foi possível verificar três áreas de marcação vermelhas com maior concentração e luminescência, revelando células mortas misturadas a um biofilme ativo (Fig. 11 B, B.1 e B.2).

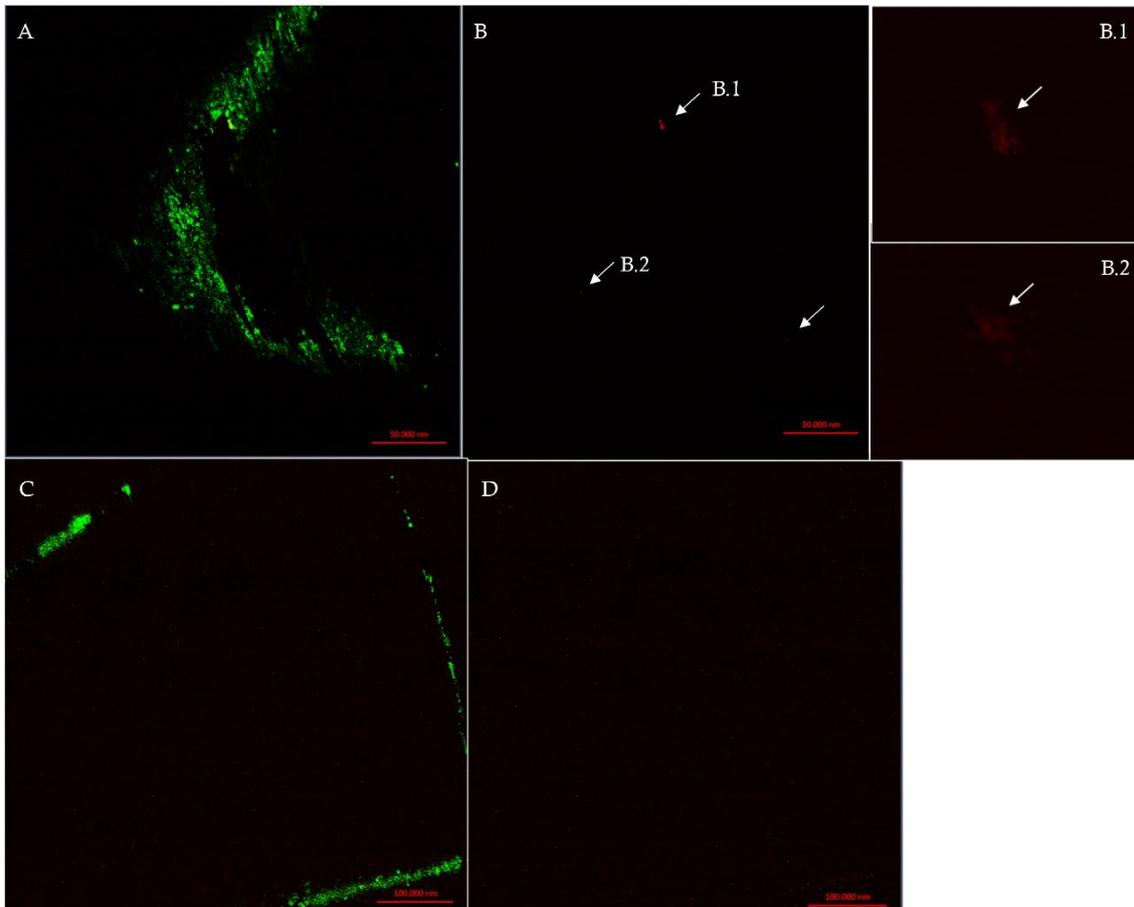


Figura 11. Biofilme sobre as superfícies metálicas (A e B). Isolamento do canal do fluoróforo de ID (B e D), revelando células dispersas de forma pontual sobre a superfície metálica (B.1 e B.2).

Logo, a região analisada, área de roscas do MIEA, ancorada dentro do osso cortical e medular, para a ancoragem do MIEA, sugeriu a ocorrência de penetração bacteriana entre a interface metálica e óssea, uma vez que este MIEA não realiza osseointegração, esta interface permanece susceptível a entrada de fluidos, juntamente com outros micro-organismos. Clinicamente, este ponto de análise pode ser crítico para possíveis perdas precoces desses tipos de MIEA.

Os dados revelados da microscopia de epifluorescência do MIEA ainda foram confrontados com os dados de HEGGENDORN *et al.* (2022), (dados não publicados e cedidos para análise neste estudo) onde avaliaram os comprimentos de onda de excitação do Kit *Live/Dead®*, em duas espécimens de dentina humana a fim de descartar a possível interferência da estrutura dentinária na interpretação do

biofilme de BRS em superfícies de limas endodônticas. Assim como o osso, a estrutura dentinária possui predominantemente hidroxiapatita e células similares a osteoblastos e osteoclastos, os odontoblastos e osteoclastos.

Assim como na análise no biofilme do MIEA, a análise na dentina revelou a ocorrência de marcação altamente predominante pelo SYTO[®]9, não havendo a marcação do IP (Fig. 12). Entretanto, percebeu-se que a penetração do SYTO[®]9 ocorre na ordem de nm (Fig. 12) revelando uma espessura de dentina muito superior a ser revelada nas análises de efluorescência dos MIES, com espessura de biofilme na ordem de micros. Logo, a hipótese de que na superfície do MIEA a estrutura excitada seria osso e não biofilme pode ser descartada. Em adição, ainda se percebe a intensidade de emissão do fluoróforo na dentina com zonas extremamente marcadas, diferentemente do biofilme verificado no MIEA.

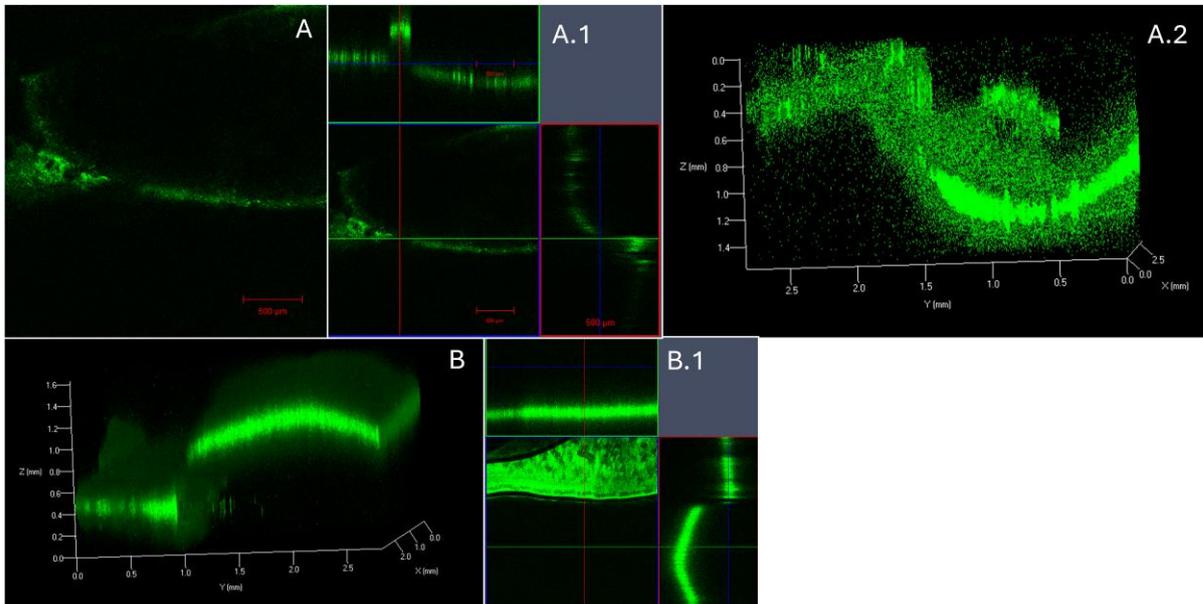


Figura 12. Estrutura dentinária marcada com Kit *live and dead*. Primeira amostra de disco de dentina (A) revelando uma espessura de nanômetros, com alta emissão do SYTO[®]9 (A.1 e A.2). Segunda amostra de dentina revelando o mesmo padrão de espessura (B) e emissão (B.1).

5.6 MICROANÁLISE DE SUPERFÍCIE

A microanálise de superfície do MIEA do espécime Man-Bone/MIEAs/Bac revelou a presença de uma intensa formação de biofilme sobre a superfície metálica na região do perfil transmucoso e slot, que foram expostas diretamente no fluido do biorreator BRS (Fig 13 B), enquanto na região de flanco de rosca, no terço médio, (Fig. 13 B.1) e em fundo de vale, no terço apical do MIEA, na ponta auto rosqueante, foram demonstrados depósitos particulados (Fig. 13 B.2). Já o espécimen Man-Bone/MIEAs/Control demonstrou ausência de biofilme (Fig. 13 A) com áreas sugestivas de deposições ósseas em região de crista e flanco de rosca (setas vermelhas, Fig 13 A.1) e na região de fundo de vale do terço apical do MIEA (seta vermelha, Fig 13 A.2). Em maior aumento foram demonstradas áreas sugestivas de defeitos de superfície (setas amarelas) (Fig. 14 A, B) de forma isolada ou associada a partículas ósseas (setas vermelhas) (Fig. 14 A.1 e B.1), decorrentes da implantação óssea.

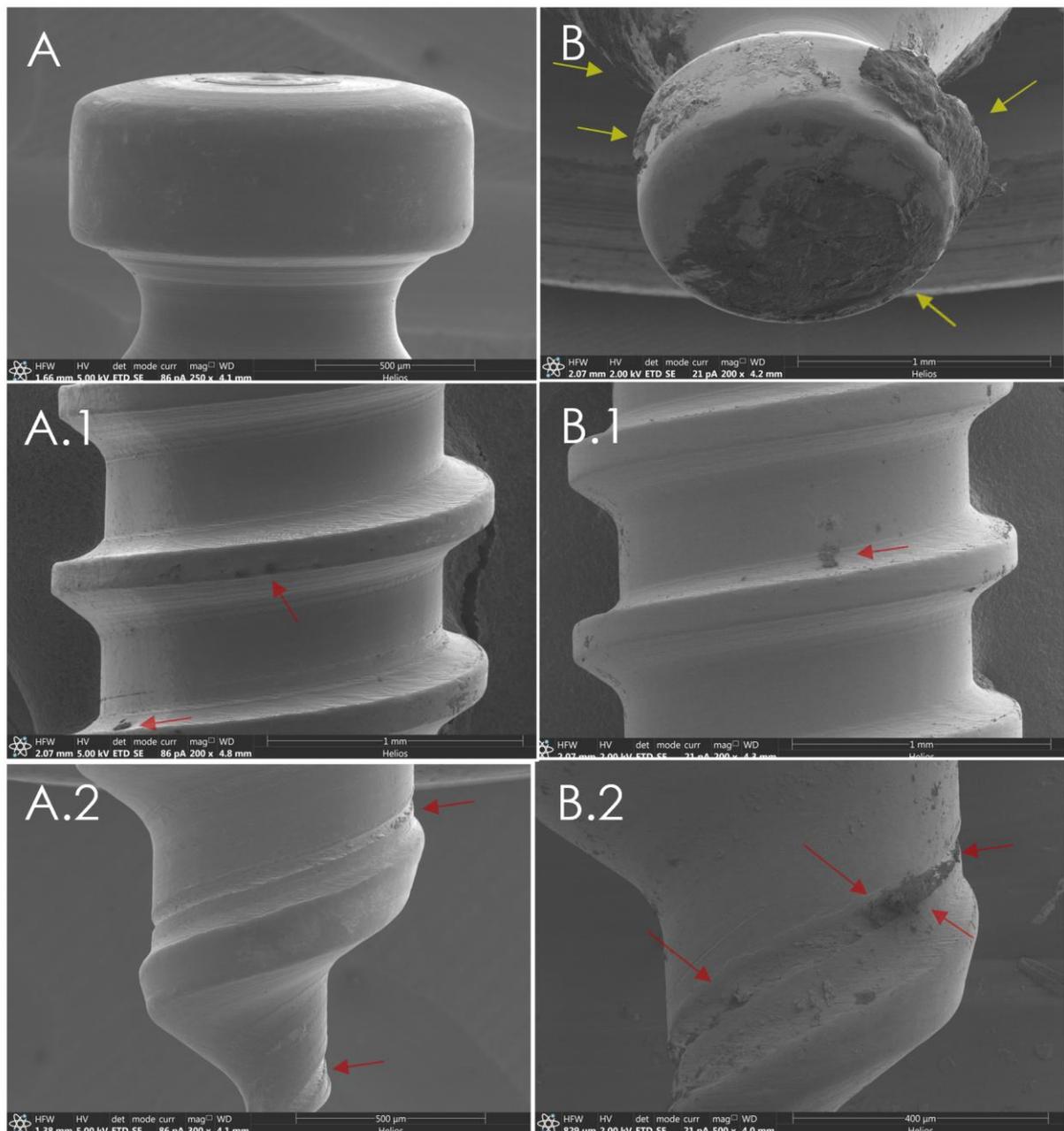


Figura 13. Microanálise de superfície dos MIEAs. Espécimen Man-Bone/MIEAs/Control sem biofilme (A) e áreas sugestivas de deposições ósseas em região de rosca e flanco de rosca (setas vermelhas, A.1) e na região de fundo de vale do terço apical do MIEA (seta vermelha, A.2). Espécimen Man-Bone/MIEAs/Bac com intensa formação de biofilme na região do perfil transmucoso e slot (B), enquanto na região de flanco de rosca (B.1) e em fundo de vale, no terço apical do MIEA, foram demonstrados depósitos particulados (B.2).

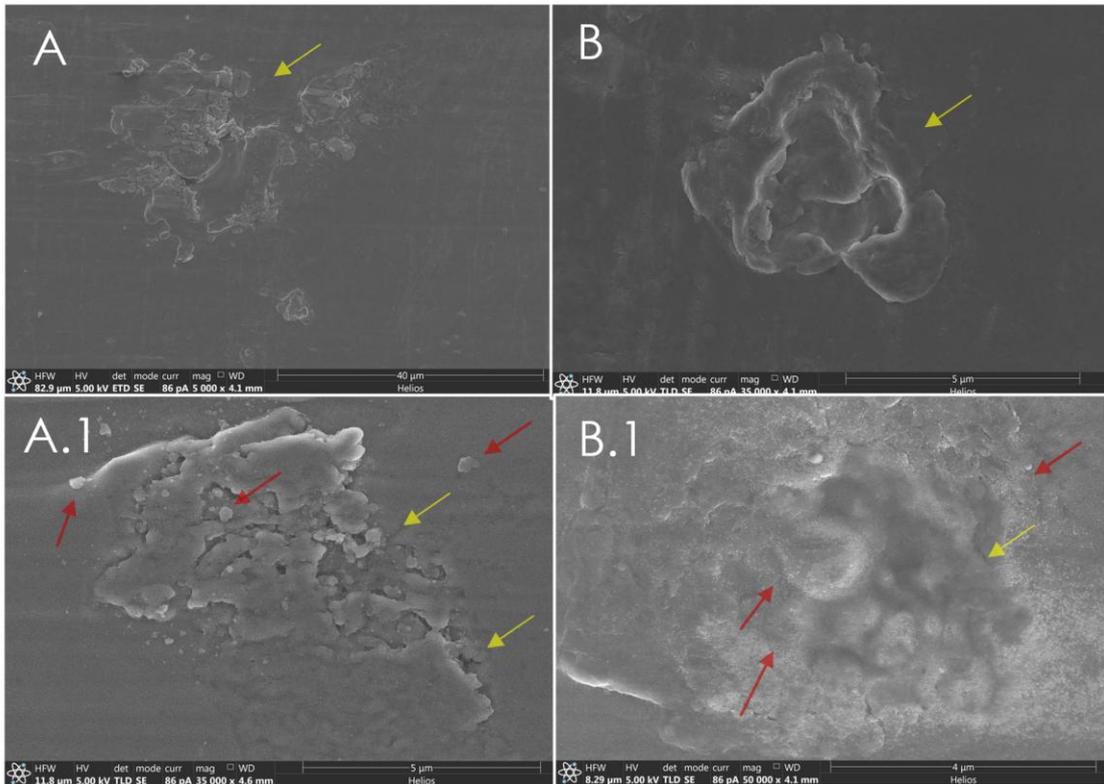


Figura 14. Microanálise de superfície dos Man-Bone/MIEAs/Control. Áreas sugestivas de defeitos de superfície (setas amarelas) (A, B) de forma isolada ou associada a partículas ósseas (setas vermelhas) (A.1 e B.1).

No espécime Man-Bone/MIEAs/Bac foi demonstrada a formação de biofilme (Fig. 15 A e A.1, setas amarelas) na região de slot e perfil transmucoso, enquanto na região de rosca foi verificada a intensa presença bacteriana sobre a superfície metálica (Fig. 15 B e C, setas vermelhas). Em 160.000 x de magnitude verificou-se a morfologia bacteriana da *Desulfovibrio fairfieldensis* (Fig. 15 D).

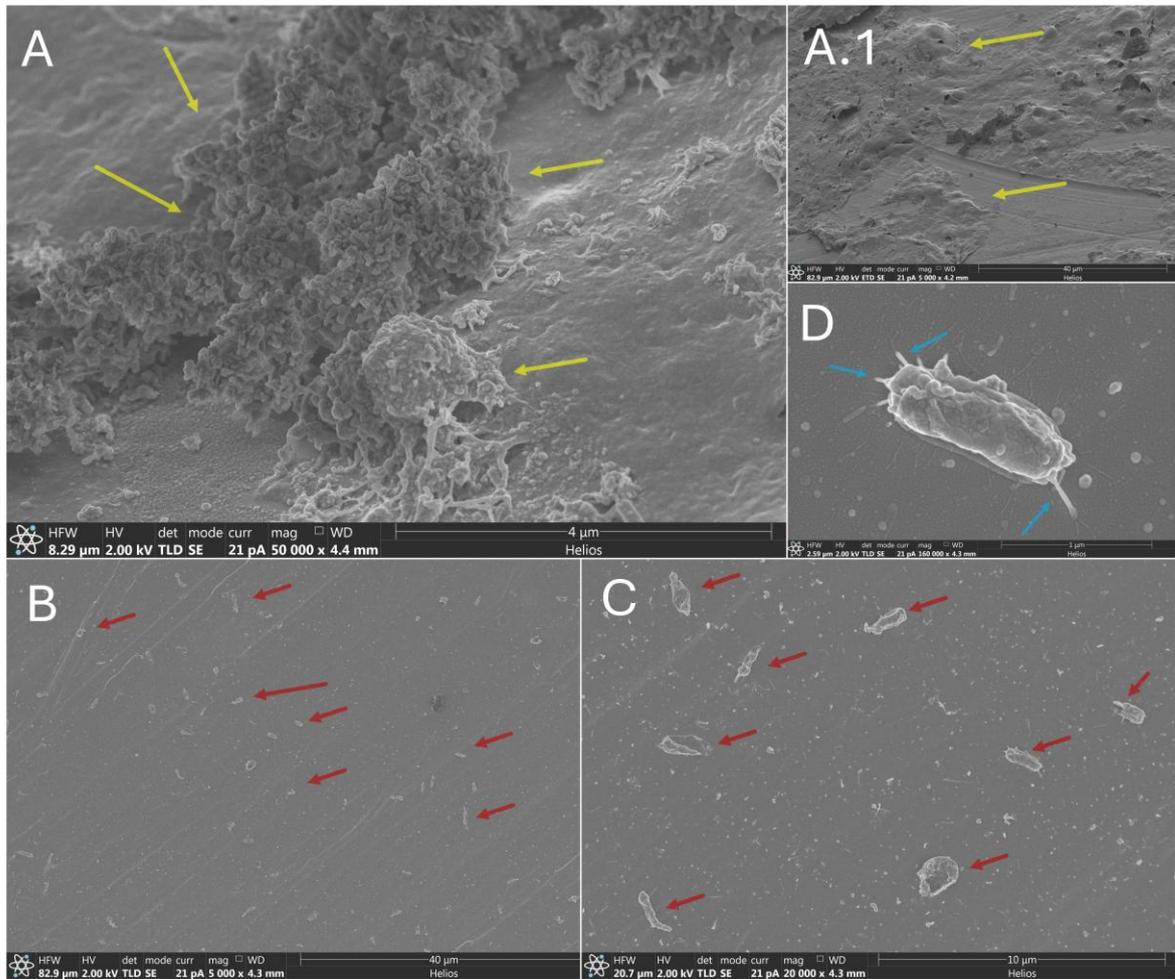


Figura 15. Microanálise de superfície dos Man-Bone/MIEAs/Bac. Formação de biofilme (A e A.1, setas amarelas). Sugere presença de bactérias sobre a superfície metálica (B e C, setas vermelhas), em maior aumento sugere a presença de BRS, (D).

6. DISCUSSÃO

6.1. INSTALAÇÃO DE MIEAS CONTROLADA SOB MESA DE TORQUE VERSUS INSTALAÇÃO MANUAL

Os parafusos ortodônticos da S.I.N. Implant System apresentam um perfil de rosca agressiva e ponta ativa, permitindo sua inserção sem a necessidade de formação de rosca prévia no alvéolo. Neste estudo, foram utilizados parafusos ortodônticos da S.I.N. Implant System com diâmetro de rosca 1.8mm. Estes MIEAS apresentam o ápice extremamente fino e afiado, não necessitando de perfuração prévia em regiões de maxila ou em mandíbula, com presença de uma cortical fina. Porém, se faz necessário que durante a instalação, o profissional use uma força de pressão associada a um movimento de giro no sentido horário, não devendo, essa pressão, ser excessiva, a fim de evitar a fratura da ponta do mini-implante (GIBBONS & HODDER, 2003; HERMAN *et al.*, 2006). Os sistemas de MIEAS possuem uma ponta cortante, sendo considerados um sistema de perfuração automática, com a necessidade de forças elevadas para a perfuração do osso cortical (SQUEFF *et al.*, 2008).

Como desvantagem, esse modo de aplicação pode gerar o desconforto do paciente e reabsorção, que conseqüentemente conduzirá à falha do mini-implante diante de uma maior compressão do osso, podendo levar também a um desvio do trajeto do dispositivo, devido ao excesso de força (BAUMGAERTEL *et al.*, 2008; LEE & BAEK, 2010). A identificação da ocorrência de extrusão óssea na periferia do leito de instalação dos MIEAs pode ser correlacionada a essa maior compressão óssea que os MIEAs autoperfurantes realizam, extruindo esse osso durante o movimento de rosqueamento dos MIEAs. Logo, os dados sugeriram que torques elevados, como no grupo GCT, podem exercer forças compressivas

horizontais pela necessidade de uma expansão óssea associada a uma perfuração ineficaz do MIEA.

Logo, essa maior compressão óssea, do sistema autoperfurante, sugere acarretar um aumento na estabilidade primária. A ausência de uma pré-perfuração do alvéolo, com fresa helicoidal, antes da instalação do mini-implante, favorece a maior estabilidade primária (BAUMGAERTEL *et al.*, 2008; WILMES *et al.*, 2006), sendo relatada por VILELLA *et al.* (2006) a necessidade de perfuração prévia em áreas de densidade óssea maior (D1), como na região posterior de mandíbula e sutura palatina.

6. 2. DENSIDADE ÓSSEA

A análise da densidade óssea da região eleita para a inserção de um mini-implante apresenta elevada consideração no sucesso da instalação dos implantes dentais. Em regiões de má qualidade óssea, o insucesso devido a falha do implante tende a ser elevado, pois os implantes dependem do osso circundante para alcançar a estabilidade primária (BAUMGAERTEL *et al.*, 2008).

A determinação da qualidade óssea da área de eleição para a instalação de um implante é fundamentada através do uso da tomografia. Através da utilização de escalas subjetivas de densidades ósseas, resulta se obter uma avaliação pré-operatória do osso, devido a relação entre a má qualidade óssea e a falha de implantes dentários (PAUWELS *et al.*, 2015).

Em geral, as escalas de classificação óssea são baseadas na caracterização da morfologia transversal trabecular e na espessura do osso cortical. Porém, não existe um consenso de um único sistema que classifique a qualidade óssea. A classificação utilizada por Lekholm & Zarb particulariza a qualidade em quatro grupos de acordo com o grau de corticalização e morfologia óssea

trabecular. Essa classificação pontua que a estabilidade primária pode ser melhor alcançada em ossos com maior densidade cortical associadas a espaços trabeculares menores. (LEKHOLM *et al.*, 1985)

A espessura do osso cortical é considerada um dos principais fatores responsáveis na estabilidade dos mini-implantes. Cerca de 10% dos mini-implantes ortodônticos falham, sendo esse dado superior quando comparado com os implantes dentários. Entretanto, cabe evidenciar que os mini-implantes ortodônticos não são projetados para osseointegrar. Nesse contexto, a osseointegração desfavoreceria a remoção do mini-implante, enquanto a estabilidade primária favoreceria a sua retenção durante a sua permanência, como um dispositivo de ancoragem temporário (BAUMGAERTEL *et al.*, 2008).

Já a Unidade *Hounsfield* (HU) é uma escala que varia nas tonalidades de branco, cinza e preto, criada especificamente para a tomografia computadorizada. A HU é relativa ao grau de atenuação dos raios X sendo correlacionada a cada pixel para resultar a imagem que representa a densidade do tecido, podendo ser instituída para a avaliação da densidade óssea nos exames tomográficos convencionais, correlacionando os tons de cinza com a qualidade óssea e assim determinando uma classificação confiável de qualidade óssea (NORTON & GAMBLE, 2001; KATSUMATA *et al.*, 2009; MAH *et al.*, 2010).

A empregabilidade dos valores de UH como um método objetivo na avaliação da densidade óssea para o local do implante proposto, possibilitaram certificar a área com melhor densidade óssea objetivando a estabilidade do implante, possibilitando um melhor prognóstico (SHAPURIAN *et al.*, 2006). Quanto maior o valor na HU, mais denso é o tecido. Segundo MISCH (2007), a classificação da densidade óssea pode ser avaliada nas imagens de tomografia computadorizada (TC), através da correlação da HU.

Logo, a análise do torque para instalação dos MIEAs evidenciou que as instalações nos CPs/Bone não excederam os limites de torque proposto pelo fabricante. Entretanto, a presença de trincas na cortical óssea sugeriram ser pontos de alívio de stress durante a instalação, sendo que essas áreas podem acarretar a perda de ancoragem do MIEA, caso tais situações ocorram na prática clínica. Ainda, a presença da extrusão óssea pode representar um fator adicional para colonização bacteriana, acarretando possíveis processos inflamatórios locais.

Já os resultados de intercorrência apresentados durante a instalação manual (18,18%) divergiram dos resultados de rompimento da cortical óssea no ensaio do torquímetro de mesa (66,66%). Analisando a estrutura dos ensaios, sugere-se que a instalação contínua do torquímetro de mesa, sem a ocorrência da parada de recuo, que ocorre no torquímetro manual, realizada para a continuidade do movimento de torque, não possibilitou a acomodação do osso medular e/ou cortical durante a inserção do MIEAs, o que poderia favorecer a permanência da integridade da cortical óssea. Entretanto, o controle manual causou a fratura do MIEA, sugerindo ser uma resultante combinatória de uma densidade óssea maior associada a forças acima da capacidade elástica do metal em seu extremo mais frágil, a ponta, e a falta de controle que a instalação manual proporciona durante a implantação.

Os dados demonstrados revelaram que dos 10 MIEAs instalados em osso tipo D1, a taxa de intercorrência para inviabilizar a instalação é de 20%. Já ao desconsiderar o tipo do osso a ser instalado, analisando todos os 11 CP/Bone, a taxa de intercorrência reduz para 18,18%, havendo uma diferença percentual mínima, revelando que além densidade óssea, existem outros parâmetros a serem considerados, como a técnica utilizada e a calibração da mão do operador, que podem estar diretamente relacionadas ao insucesso na instalação dos MIEAs.

6.3 QUANTIFICAÇÕES BACTERIANAS - TÉCNICA DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL E DO QPCR

A técnica do NMP, conhecida também como a técnica dos tubos múltiplos, é realizada por diluição aplicada para contagem de bactérias, sendo uma estimativa da densidade média dos micro-organismos nas amostras. Esse método é baseado em cálculo de probabilidade através de fórmulas ou tabelas relacionadas a combinação de tubos positivos e negativos (Anexos 2) (McCRADY, 1915; DA CUNHA, 2006). É uma técnica de fácil execução, entretanto trabalhosa, onde é necessária a utilização de um meio de cultura adequado, como os meio de cultura Postgate E modificado, que demonstre o crescimento bacteriano. Os meios de cultura líquido são considerados melhores que os sólidos, devido a necessidade do uso de muitos tubos por diluição, 10 por diluição, para obter resultados confiáveis e uma adequada interpretação (McCRADY, 1915; OBLINGER & KOBURGER 1975; OKABE *et al.*, 1999). Após o período de incubação de 28 dias, foi realizada a avaliação dos meios de cultura, e a classificação em positivo ou negativo, através da presença de BRS no meio de cultura. O resultado positivo foi indicado através do metabolismo das bactérias redutoras de sulfato, que convertem o sulfato a sulfeto, e o sulfeto reage com o ferro que está presente no meio, formando sulfeto ferroso (FeS), que gera um precipitado preto no meio de cultura (VAITHIYANATHAN *et al.*, 2018).

A técnica do qPCR e NMP são técnicas distintas e que apresentam particularidades, cujo objetivo é quantificação de micro-organismos. A utilização de ambas as técnicas possibilitou uma complementação para uma melhor avaliação da presença/quantidade de bactérias. O NMP é um método tradicional realizado através de uma técnica que identifica apenas células vivas e cultiváveis, apresentando um

universo amostral de 10^4 , sendo baseada na diluição seriada de amostras e a observação de crescimento bacteriano em meio de cultura específico. Já a técnica do qPCR, considerada uma técnica mais refinada, a nível molecular, onde se avalia um número amostral maior (células vivas, cultiváveis e mortas), apresentando um universo amostral de 10^7 , sendo uma análise em tempo real. Na qPCR são empregadas sondas fluorescentes e corantes específicos, com uma elevada precisão para a amplificação, detecção e quantificação do DNA (COUTINHO *et al.*,2014).

Os resultados sugeriram que as *Desulfovibrio fairfieldensis* orais em consórcio quando inoculadas no Biorreator BRS permaneceram em fase estacionária por todo o período do ensaio de imersão ou que no período final de 99 dias, momento de leitura do qPCR, poderia o cultivo bacteriano já se encontrar na fase de morte celular.

6.4 TAXA DE CORROSÃO E QUANTIFICAÇÃO BACTERIANA

O NMP e o qPCR realizados a partir de amostras do fluido do Biorreator (NMP > $2,4 \times 10^4$ células/ml; qPCR $1,91 \times 10^4$) demonstraram ser superior ao número de bactérias viáveis nas superfícies dos três Man-Bone/MIEAs/BRS (4 células/ml; $4,3 \times 10^1$ células/ml e $7,5 \times 10$ células/ml; qPCR $8,54 \times 10^1$; $6,56 \times 10^1$ e $7,64 \times 10$), sugerindo que a superfície de titânio dos MIEAs pode não ser uma superfície ideal para o crescimento bacteriano das *Desulfovibrio fairfieldensis* oral em consórcio. Os micro-organismos envolvidos no processo de biocorrosão possuem de 0.2 a $10 \mu\text{m}$ de comprimento e de 2 a 3 de largura (NACE, 2016). Em adição, para a ocorrência da biocorrosão em uma superfície metálica deve-se ter um número populacional

mínimo de BRS de 10^3 (VIDELA, 1992), o que não foi demonstrado sobre as superfícies dos três Man-Bone/MIEAs/BRS, em nenhuma das técnicas utilizadas.

Cabe considerar a necessidade de uma população microbiana ativa mínima para que seja realizada a biocorrosão na superfície metálica (VIDELA, 1992). Os resultados das quantificações microbianas nos Man-Bone/MIEAs/BRS podem ter impactado diretamente na baixa da taxa de corrosão desses espécimes, sendo necessário realizar novos ensaios analisando a taxa de corrosão em fase exponencial ou estacionária na *Desulfovibrio fairfieldensis* oral em consórcio.

A interpretação da maior taxa de corrosão do Man-Bone/MIEAs/Control, quando comparado ao grupo Man-Bone/MIEAs/BRS, pode ser correlacionada a presença de constituintes no fluido do biorreator Control, que possibilitaram uma maior perda de massa, enquanto, que no Biorreator BRS, estes constituintes poderiam ter sido consumidos pelas *Desulfovibrio fairfieldensis* oral em consórcio, ficando a perda de massa e a taxa de corrosão no grupo Man-Bone/MIEAs/BRS exclusivamente dependente da ação biocorrosiva. Entretanto, JHOBALIA e colaboradores relataram a diminuição repentina da corrosão em cupons de aço em solução supersaturada com sulfeto de ferro, permanecendo estável, devido ao aumento da concentração de sulfeto ao longo do ensaio, o que diminuiu a taxa de crescimento das BRS e a taxa de corrosão, existindo correlação da baixa taxa de corrosão com longo período (84 e 119 dias) utilizado nesse trabalho. Cabe ressaltar que no Biorreator Man-Bone/MIEAs/bact. no momento do ensaio, foi observada a solução supersaturada com o maior número populacional relacionado a tabela estatística do NMP (APHA, 2012) (Anexo 3).

Ao comparar os dados da análise da TC por perda de massa do grupo Man-Bone/MIEAs/Control (TC $0,011621 \pm 0,0176811$) e Man-Bone/MIEAs/BRS (TC $0,0003418 \pm 0,0025805$) com a classificação da corrosividade de acordo com a

NACE STANDARD RP0775 (2005), onde classifica a taxa de corrosão como baixa em $TC < 0,025$ mm/ano foi possível enquadrar em ambos os grupos, Man-Bone/MIEAs/Control e Man-Bone/MIEAs/BRS, que a ação biocorrosiva da *Desulfovibrio fairfieldensis* oral em consórcio e o meio de saliva artificial são incapazes de realizar uma perda de massa significativa no MIEAs de titânio.

6.5 MICROANÁLISE DE SUPERFÍCIE POR EPIFLUORESCÊNCIA E MEV

Mesmo com o baixo número populacional das *Desulfovibrio fairfieldensis* oral em consórcio, foi possível verificar através da técnica de epifluorescência e de microscopia em MEV a presença das *Desulfovibrio fairfieldensis* oral sobre toda superfície metálica dos MIEAs, formando biofilmes ativos. O biofilme bacteriano é uma estrutura séssil tridimensional composto por pilhas de células mergulhadas e encapsuladas por substâncias poliméricas hidratadas (EPS) depositas sobre uma superfície (PRIESTER *et al.*, 2007). Já o acúmulo de biofilmes, associado a partículas inorgânicas, precipitados cristalinos ou produtos de corrosão, resulta na formação do *biofouling*. O *biofouling* possui maior velocidade de formação e aderência mais firme às superfícies do que os biofilmes isolados, sendo observado em diversos tipos de superfícies metálicas ou não, lisas ou em fissuras (*cervices*), águas paradas ou turbulentas, modificando assim o comportamento da interfase metal/solução (GENTIL, 1996; VIDELA, 2003). SCHAECHTER (2004) definiu *biofouling* como sendo o dano causado a uma superfície por micro-organismos presentes no biofilme. Nesse sentido, metais resistentes à corrosão, como o titânio e o aço inoxidável, apresentam uma superfície ideal para a sedimentação do *biofouling*, sendo o primeiro o de maior deposição (VIDELA, 1992). O processo de adesão bacteriana e de formação do biofilme pode variar dependendo da espécie, da composição da superfície e de fatores ambientais (TRINIDAD *et al.*, 2010).

TRINIDAD e colaboradores (2010) recomendaram uma combinação de várias técnicas ao se investigar biofilmes. O aumento do conhecimento sobre os biofilmes é baseado no microscópio eletrônico de varredura e pela microscopia confocal a laser de varredura, que se complementam no conhecimento da ultraestrutura do biofilme, na viabilidade celular e no desenvolvimento de biofilme.

Entretanto, cabe ressaltar que o dado mais relevante deste estudo foi a constatação de bactérias na interface osso e MIEA, sendo o desenho estrutural dos MIEAS, um possível facilitador para a fixação dessas bactérias e estabelecimento do biofilme superficial. Sugere-se que a presença de bactérias dessa região pode desencadear processos inflamatórios locais, que podem gerar consequências clínicas, como a perda precoce do MIEA por perda óssea.

Corroborando os dados da baixa taxa de corrosão, a análise microestrutural do MEV demonstrou ausência de pits de corrosão sobre a superfície metálica dos Man-Bone/MIEAs/Bac, demonstrando a incapacidade biocorrosiva das *Desulfovibrio fairifieldensis* oral em consórcio, seja pelo baixo número populacional microbiano demonstrado no NMP e no qPCR, ou pela incapacidade natural de atuar sobre ligas metálicas de titânio.

O preparo de amostras bacterianas pela fixação, desidratação e secagem com a finalização do depósito de revestimento metálico condutor, para análise no MEV altera significativamente o biofilme devido ao desmoronamento do polímero de EPS, deformando essa microestrutura do biofilme (PRIESTER *et al.*, 2007). No modo “alto vácuo” do MEV, o biofilme aparece unido como uma carcaça contínua de EPS. Nessa técnica, ocorre a danificação da pilha de bactérias, reduzindo o biofilme microbiano, mas favorece a detecção da quantidade do volume do EPS. Isso possibilita a visualização da arquitetura tridimensional do biofilme, com seus canais de água para a difusão de nutrientes para a pilha bacteriana interna, porém o

método de desidratação alcoólica acarreta uma contração do volume do biofilme consideravelmente (TRINIDAD *et al.*, 2010).

Para a técnica de microscopia de epifluorescência, a intensidade de fluorescência é dependente de vários fatores que são muito difíceis de controlar com precisão, incluindo a espessura da secção, profundidade de corte óptico, e o grau de mineralização da dentina (PARMAR *et al.*, 2011). MA e colaboradores (2011) aplicaram o marcador Live/Dead em biofilmes de *Enterococcus faecalis* em dentina radicular, com comprimento de onda de excitação de 480-500 nm para o syto 9 e 490-635 nm para o iodeto de propídeo. Mesmo com essa redução da faixa de captação de fluorescência, os autores relataram autofluorescência das amostras na superfície do canal radicular, em forma de uma linha verde, alegando que tal achado deve ser considerado como margem de erro nas análises, dentro das limitações. Posteriormente, DU e colaboradores (2014) relataram o mesmo problema de fluorescência de fundo devido a dentina, ao utilizar o mesmo modelo de análise. Entretanto, o sinal de fluorescência da bactéria pode ser forte, o que permite o uso de configuração de baixo ganho do CLSM no escaneamento (DU *et al.*, 2014). Em estudos anteriores utilizando o Live/Dead, não foram encontrados relatos sobre o problema de autofluorescência da dentina, assim como as faixas de excitação do laser utilizado no IP e SYTO9 (WANG *et al.* 2012). O trabalho de NAGAYOSHI e colaboradores (2004) relataram comprimentos de onda de 480/530 do SYTO9 e 520/580 do IP. Nas análises reveladas neste trabalho, os comprimentos de onda de excitação de 493-584 nm para o SYTO9 e 584-718 nm para o IP, sendo os mais elevados comprimentos de onda em ambos os canais, o que pode ter interferido na real análise da atividade celular nos biofilmes.

A preocupação no estudo da formação do biofilme estruturado sobre superfícies metálicas de *Desulfovibrio* spp., também tem sido foco em implantes

dentários, sendo demonstrada a formação de um biofilme estruturado de *Desulfovibrio fairfieldensis* após 24 horas. A pesquisa de JORAND e colaboradores (2014) demonstraram que o biofilme com maturidade de 40 dias possuía uma atividade celular, comparável ao biofilme de 24 horas, que as células entravam na fase estacionária próxima aos 25 dias de crescimento (JORAND *et al.* 2014). Logo, esses dados vêm elucidar a questão quanto aos resultados neste trabalho, em relação aos ensaios de NMP e nos MiEAS, onde revelaram uma mesma quantificação amostral microbiana após 99 dias de ensaio de imersão.

No estudo aqui apresentado, análises microscópicas demonstraram a presença de biofilme sobre a superfície do titânio. Entretanto, a falta de áreas de pits de corrosão sobre essa superfície metálica possibilita sugerir a incapacidade de evolução deste biofilme para um *biofouling* sobre os MIEAS expostos as *Desulfovibrio fairfieldensis* oral em consórcio. Contrariamente, JORAND *et al.* (2014) já haviam demonstrado biofilme de *Desulfovibrio fairfieldenses* em cupons de titânio usados em implantes dentários.

Corroborando esta análise, os estudos de OSHIDA e colaboradores. (1992) e SONGUR e colaboradores (2009), afirmaram a maior resistência das ligas de titânio no processo de corrosão, devido a formação natural, quimicamente ou eletroquimicamente de filme de óxido de titânio (TiO₂) nas superfícies resultando em um comportamento passivo em meios biológicos. Logo, as ligas resistentes à corrosão, como o aço inoxidável e o titânio, terão comportamentos diferentes quando comparados a superfícies metálicas, pouco resistentes à corrosão, como o aço-carbono (VIDELA, 1992; LOPES *et al.*, 2006).

7. CONCLUSÃO

As *Desulfovibrio fairfieldensis* oral em consórcio são capazes de fixar na superfície metálica de titânio dos MIEAs, formando biofilmes nas áreas expostas ao meio externo e entre a interface de ancoragem, osso e roscas do MIEA. Entretanto, a constituição de titânio dos MIEA possibilita uma baixa taxa de corrosão, não significativa, sem a presença de pits de corrosão nestas áreas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida MR (2019). Biomechanics of extra-alveolar mini-implants. *Dental Press J Orthod.* 24(4):93-109.

AlSamak S, Bitsanis E, Makou M, Eliades G (2012). Morphological and structural characteristics of orthodontic mini-implants. *J Orofac Orthop.*73(1):58-71.

Alves CBC, Segurado MN, Dorta MCL, Dias FR, Lenza MG, Lenza MA (2016). Evaluation of cytotoxicity and corrosion resistance of orthodontic mini-implants. *Dental Press J Orthod.*21(5):39-46.

American Public Health Association (APHA) (2012). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.* Washington, DC: American Public Health Association.

ASTM International (American Society for testing and materials), G1-90 (1999) *Standard Practice for Preparing, Cleaning, and Evaluating Corrosion Test Specimens*1. West Conshohocken, United States.

Badziong W, Thauer RK (1978). Isolation and characterization of *Desulfovibrio* growing on hydrogen plus sulfate as the sole energy source. *Arch Microbiol*, 116 (1): 41-49.

Badziong W, Thauer RK (1978). Isolation and characterization of *Desulfovibrio* growing on hydrogen plus sulfate as the sole energy source. *Arch Microbiol*, 116 (1): 41-49.

Barão VA, Mathew MT, Assunção WG, Yuan JC, Wimmer MA, Sukotjo C (2012). Stability of cp-Ti and Ti-6Al-4V alloy for dental implants as a function of saliva pH - an electrochemical study. *Clin Oral Implants Res.*23(9):1055-62.

Barros SE, Janson G, Chiqueto K, Garib DG, Janson M (2011). Effect of mini-implant diameter on fracture risk and self-drilling efficacy. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.*140(4):181-92.

Baumgaertel S, Razavi MR, Hans MG (2008). Mini-implant anchorage for the orthodontic practitioner. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.*133(4):621-7.

Bitton G (2005). *Wastewater Microbiology*. 3. ed. New Jersey: Wiley-Liss. 22, 98, 19, 99, 428 p.

Branemark, PI, Zarb, GA, Albrektsson, T, Rosen, HM (1985). *Tissue-Integrated Prostheses: Osseointegration in Clinical Dentistry*. Chicago: Quintessence, 199-209.

Büchter A, Wiechmann D, Koerdt S, Wiesmann H, Piffko J, Meyer U (2005). Load-related implant reaction of mini-implants used for orthodontic anchorage. *Clinical oral implants research. Res.*, Copenhagen, v. 16, no. 4, p. 473-479.

Büchter A, Wiechmann D, Koerdt S, Wiesmann HP, Piffko J, Meyer U (2005). Load-related implant reaction of mini-implants used for orthodontic anchorage. *Clin Oral Implants Res.*16(4):473-9.

Boopathy R, Robichaux M, LaFont D, Howell M.(2002) Activity of sulfate-reducing bacteria in human periodontal pocket. *Can J Microbiol*, 48,1099-103.

Caetano LP, Bahia MS, Silva EF, Vitrala RWF, Campos MJS (2019). A comparative evaluation of ion release from different commercially-available orthodontic mini-implants- an in-vitro study. *Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac.*60(1):1-7.

Carano A, Velo S, Incorvati C, Poggio P (2004). Clinical applications of the Mini-Screw Anchorage-System (M.A.S.) in the maxillary alveolar bone. *Prog Orthod* 5, 212-35.

Castro HF, Williams NH, Ogram A (2000). Phylogeny of Sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 31,1-9.

Cha JY, Kil JK, Yoon TM, Hwang CJ (2010). Miniscrew stability evaluated with computerized tomography scanning. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopaedics*. 137, 73–79.

Chang C, Almeida MR, Pithon M, Ursi W (2018). Interview with Chris Chang. *Dental Press J Orthod.*23, 18-21.

Chen Y, Kyung HM, Gao L, Yu WJ, Bae EJ, Kim SM (2010). Mechanical properties of self-drilling orthodontic micro-implants with different diameters. *Angle Orthod.*80,821-7.

Chen YH, Chang HH, Chen YJ, Lee D, Chiang HH, Jane Yao CC (2008). Root contact during insertion of miniscrews for orthodontic anchorage increases the failure rate in an animal study. *Clin Oral Implants Res.*19, 99-106.

Costa A, Raffaini M, Melsen B (1998). Miniscrews as orthodontic anchorage: a preliminary report. *Int J Adult Orthodon Orthognath Surg.*13, 201-9.

Costa MT, Lenza MA, Gosch CS, Costa I, Ribeiro-Dias F (2007). In vitro evaluation of corrosion and cytotoxicity of orthodontic brackets. *J Dent Res.*86, 441-5.

Cotrim-Ferreira FA, Quaglio CL, Peralta RP, Carvalho PE, Siqueira DF (2010). Metallographic analysis of the internal microstructure of orthodontic mini-implants. *Pesquisa Oral Brasileira* 24, 438–442.

Coutinho DA, Guerreiro LTA, Junior WBC, Santana MS, Pereira VC, Pimenta G, Araujo M (2014). Estudo comparativo entre as técnicas do Número mais provável e PCR em tempo real para quantificação de bactérias redutoras de sulfato em amostras no setor de óleo e gás. *INTERCORR*, Fortaleza, Ceará, Brasil.

Crismani AG, Bertl MH, Celar AG, Bantleon HP, Burstone CJ (2010). Miniscrews in orthodontic treatment: review and analysis of published clinical trials. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.*137, 108-13.

Da cunha MA (2006). Métodos de detecção de microorganismos indicadores. *Saúde & Ambiente em revista*: 1, 09-13.

Das KR, Tiwari AK, Kerkar S (2019) Psychrotolerant Antarctic bacteria biosynthesize gold nanoparticles active Against sulfate reducing bacteria. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 50, 438-444.

De Moraes LS, Serra GG, Albuquerque PEF, Andrade LR, Müller CA, Meyers MA, Elias CN (2009). Systemic levels of metallic ions released from orthodontic mini-implants. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.*135, 522-9.

Dzierzewicz Z, Cwalina B, Kurkiewicz S, Chodurek E, Wilczok T. (1996) Intraspecies variability of cellular fatty acids among soil and intestinal strains of *Desulfovibrio desulfuricans*. *Appl Environ Microbiol.*62(9), 3360-5.

Du T, Wang Z, Shen Y, Ma J, Cao Y, Haapasalo M (2014). Effect of long-term exposure to endodontic disinfecting solutions on young and old enterococcus faecalis biofilms in dentin canals. *J Endod*;41, 509-14.

Dulbecco R, Vogt M (1954). Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J Exp Med*, 99, 167-82.

Dzierzewicz Z, Cwalina B, Kurkiewicz S, Chodurek E, Wilczok T (1996). Intraspecies variability of cellular fatty acids among soil and intestinal strains of *Desulfovibrio desulfuricans*. *Appl Environ Microbiol*. Sep;62, 3360-5.

Ehrlich HL, Newman DK (2009). *Geomicrobiology*. 5. ed. New York: CRC Press, 139, 140, 141, 151, 268, 428, 464 p.

Eliades T, Zinelis S, Papadopoulos MA, Eliades G (2009). Characterization of retrieved orthodontic miniscrew implantates, *Am J Orthod Dentofacial Orthop*.135,10.1-7.

Fedel M, Caciagli P, Chitè V, Caola I, Tessarolo F (2008). microbial biofilm imaging *esem vc. Hvsem. Imaging e microscopy* 9, 44-47

Gentil V. (1996) *Corrosão*. 3.ed. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos. 103, 326p

Gibbons AJ, Hodder SC (2003). A self-drilling intermaxillary fixation screw. *Br J Oral Maxillofac Surg*; 41, 48–9.

Gittens RA, Olivares NR, Tannenbaum R, Boyan BD, Schwartz Z (2011). Electrical implications of corrosion for osseointegration of titanium implants. *J Dent Res.*90, 1389-97.

Heggendorn FL, Fraga AGM, Ferreira DC, Gonçalves LS, Lione VOF, Lutterbach MTS (2018). Sulfate-Reducing Bacteria: Biofilm Formation and Corrosive Activity in Endodontic Files. *Int J Dent.* 10,8303450.

Heggendorn FL, Gonçalves LS, Dias EP, Lione VOF, Lutterbach MTS (2015). Biocorrosion of Endodontic Files through the Action of Two Species of Sulfate-reducing Bacteria: *Desulfovibrio desulfuricans* and *Desulfovibrio fairfieldensis*. *J Contemp Dent Pract.*1;16, 665-73.

Heggendorn FL, Gonçalves LS, Lione VOF, Junior WBC, Al-sharani HM, Lutterbach MTS (2022). Baccor, in vitro formation of biofilm in broken endodontic files in radicular canals. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 1, p.

Heggendorn FL, Gonçalves LS, Lione VOF, Junior WBC, Lutterbach MTS (2019). Análise de limas endodônticas submetidas a biocorrosão por bactérias redutoras de sulfato in vitro. *Arquivo em Odontologia.*55.10.730.

Herman RJ, Currier GF, Miyake A (2006). Mini-implant Anchorage for maxillary canine retraction: a pilot study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*;130,228-35.

Holst A, Holst S, Hirschfelder U, Seckendorff V (2012). Retrieval analysis of different orthodontic brackets: The applicability of electron microprobe techniques for determining material heterogeneities and corrosive potential. *Journal of applied oral science.* 20, 478-85.

Hyde JD, King GJ, Greenlee GM, Spiekerman C, Huang GJ. (2010) Survey of orthodontists' attitudes and experiences regarding miniscrew implants. *J Clin Orthod.*44, 481-6.

Jhobalia CM, Hu A, Gu T, Nestic S (2005). Abordagens de Engenharia Bioquímica para MIC. In: Corrosão; Houston: NACE Internacional.

Jorand FDA, Debuy S, Kamagate SF, Engels-Deutsch M (2014). Evaluation of a biofilms formation by *Desulfovibrio fairfieldensis* on titanium implants. *Letters in Applied Microbiology*, 60,279-87.

Kanomi R. (1997) Mini-implant for orthodontic anchorage. *J Clin Orthod.* 31,763-7.

Kao CT, Ding SJ, He H, Chou MY, Huang TH (2007). Cytotoxicity of orthodontic wire corroded in fluoride solution in vitro. *Angle Orthod.*77, 349-54.

Katsumata A, Hirukawa A, Okumura S, Naitoh M, Fujishita M, Aiji E (2009). Relationship between density variability and image volume size in cone-beam computerized tomographic scanning of the maxillofacial region: an in vitro study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 107,420–5.

Katsumata A, Hirukawa A, Okumura S, Naitoh M, Fujishita M, Aiji E (2009). Relationship between density variability and image volume size in cone beam computed tomography scanning of the maxillofacial region: an in vitro study. *Cirurgia OraOral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*; 107,420–5.

Könönen MHO, Lavonius ET, Kivilahti JK (1995) SEM observations on stress corrosion cracking of commercially pure titanium in a topical fluoride solution, *Dental Materials*, Volume 11, Issue 4, Pages 269-272.

Krekeler D, Cypionka H (1995). The preferred electron acceptor of *Desulfovibrio desulfuricans* CSN. *FEMS Microbiology Ecology*, 4, 271- 277.

Kyung HM, Park HS, Bae SM, Sung JH, Kim IB (2003). Development of orthodontic micro-implants for intraoral anchorage. *J Clin Orthod*.37,321-8.

Larry LB, Hamilton WA (2007). *Sulphate-reducing Bacteria Environmental and engineered systems*. New York: Cambridge University Press, 1, 12, 16, 163, 169, 171, 175, 504, 511 p.

Laskin AI, Bennett JW, Gadd GM (2005). *Advances in Applied Microbiology*. 5. vol. Elsevier Academic Press, 8,9,12, 81 p.

Le Gall J (1963). A New Species of *Desulfovibrio*. *J. Bacteriol.*, 86, 1120-1.

Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y (2007) Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater*.23, 844-54.

Lee NK, Baek SH (2010). Effects of the diameter and shape of orthodontic mini-implants on microdamage to the cortical bone. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 138:8.1-8.

Lekholm, U, Zarb GA, Albrektsson T (1985). "Patient selection and preparation. Tissue integrated prostheses." Chicago: Quintessence Publishing Co. Inc. 199-209.

Licausi MP, Munoz AI, Borrás VA (2013). Influence of the fabrication process and fluoride content on the tribocorrosion behavior of Ti6Al4V biomedical alloy in artificial saliva. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*.20,137-48.

Lijima M, Muguruma T, Brantley WA, Okayama M, Yuasa T, Mizoguchi I (2008). Torsional properties and microstructures of miniscrew implants. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*.134, 333.1-6.

Lijima M, Muguruma T, Kawaguchi M, Yasuda Y, Mizoguchi I. (2015) In vivo degradation of orthodontic miniscrew implants: surface analysis of as-received and retrieved specimens. *J Mater Sci Mater Med*.26, 71.

Lopes FA, Morin P, Oliveira R, Melo LF (2006). Interaction of *Desulfovibrio desulfuricans* biofilms with stainless steel surface and its impact on bacterial metabolism. *J Appl Microbiol*;101, 1087-95.

Lozniewski A, Maurer P, Schuhmacher, Carlier JP, Mory F (1999). First Isolation of *Desulfovibrio* Species as Part of a Polymicrobial Infection from a Brain Abscess. *EJCMID* 18,602-603.

Luzi C, Verna C, Melsen B (2007). A prospective clinical investigation of the failure rate of immediately loaded mini-implants used for orthodontic anchorage. *Prog Orthod*.8, 192-201.

Luzi C, Verna C, Melsen B (2009). Guidelines for success in placement of orthodontic mini-implants. *J Clin Orthod*.43, 39-44.

Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M (2011). A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. 37, 1380-5.

Madigan TM, Martinko JM, Parker JB (2003). *Biología de los Microorganismos*. Tradução de Carmina Rodrigues Fernández. 10. ed. Madrid: Perason-Prentice Hall. 395-8p. 07. 1, 12, 16, 163, 169, 171, 175, 504, 511 p.

Mah P, Reeves TE, McDavid WD (2010). Deriving Hounsfield units using grey levels in cone beam computed tomography. *Dento maxillofac Radiol.* 39, 323–35.

Mccrady MH (1915). The numerical interpretation of fermentation-tube results. *J Infect Dis*, 17, 183-212.

McGuire MK, Scheyer ET, Gallerano RL (2006). Temporary anchorage devices for tooth movement: a review and case reports. *J Periodontol.*77, 1613-24.

Melsen B. (2005) Mini-implants: Where are we? *J Clin Orthod.* 39, 539-47.

Mikulewicz M, Chojnacka K (2011). Release of metal ions from orthodontic appliances by in vitro studies: a systematic literature review. *Biol Trace Elem Res.*139, 241-56.

MISCH CE (2007). *Prótese sobre implantes*, Editora Santos: São Paulo.

Misch CE (2009). *Implantes dentais contemporâneos*. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier.

Miyawaki S, Koyama I, Inoue M, Mishima K, Sugahara T, TakanoYamamoto T (2003). Factors associated with the stability of titanium screws placed in the posterior region for orthodontic anchorage. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.*124, 373-8.

Motoyoshi M, Matsuoka M, Shimizu N (2007). Application of orthodontic mini-implants in adolescents. *Int J Oral Maxillofac Surg.* Aug;36, 695-9.

Muguruma T, Iijima M, Brantley WA, Yuasa T, Kyung HM, Mizoguchi I (2011). Effects of sodium fluoride mouth rinses on the torsional properties of miniscrew implants. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.*139, 588-93.

Nace standard TM0106 (2016). Detection, testing, and evaluation of microbiologically influenced corrosion (MIC) on external surfaces of buried pipelines.

Nace Standard TM0169/G31(2021) Guide for Laboratory Immersion Corrosion Testing of Metals. ASTM International (American Society for testing and materials), West Conshohocken, United States.

Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuizumi T, Nishihara T, Terashita M (2004) Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *Journal of Endodontics.* 30(11).

National Association of Corrosion Engineers (NACE) RP0775 (2005). Preparation, installation, analysis, and interpretation of corrosion coupons in oilfield operations, Houston,Texas.

Norton MR, Gamble C (2001). Bone classification: an objective scale of bone density using the computerized tomography scan. *Clin Oral Implants Res.*12, 79–84.

Oblinger JL, Koburger JA (1975). Understanding and Teaching the Most Probable Number Technique¹, *Journal of Food Protection*, Volume 38, Issue 9.

Okabe S, Itoh T, Satoh H, Watanabe Y (1999). Analyses of spatial distributions of sulfate-reducing bacteria and their activity in aerobic wastewater biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 65, 5107-16.

Olmedo D, Fernández MM, Guglielmotti MB, Cabrini RL (2003). Macrophages related to dental implant failure. *Implant Dent*. 12, 75-80.

Olmedo DG, Tasat DR, Duffó G, Guglielmotti MB, Cabrini RL. (2009) The issue of corrosion in dental implants: a review. *Acta Odontol Latinoam*. 22, 3-9.

Oshida Y., Sachdeva RC, Miyazaki S (1992). Microanalytic characterization and surface modification of TiNi orthodontic wires, *Biomed. Mater Eng.*, 2, 51–69.

Park HS, Jeong SH, Kwon OW (2006). Factors affecting the clinical success of screw implants used as orthodontic anchorage. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 130, 18-25.

Park YC, Lee SY, Kim DH, Jee SH (2003). Intrusion of posterior teeth using mini-screw implants. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 123, 690-4.

Parmar D, Hauman CHJ, Leihter JW, McNaughton A, Tompkins GR (2011). Bacterial localization and viability assessment in human ex vivo dentinal tubules by fluorescence confocal laser scanning microscopy. *International Endodontic Journal*, 44, 644-651.

Pauwels R, Jacobs R, Singer SR, Mupparapu M (2015). CBCT-based bone quality assessment: are Hounsfield units applicable. *Dentomaxillofac Radiol*44, 20140238.

POSTGATE JR (1965). Recent Advances in the Study of the Sulfate-Reducing Bacteria. *Bacteriological Reviews*, 29, 425-41.

Postgate JR (1984) *The Sulphate-reducing bacteria*. 2. ed. London: cambridge. 31 p.

Prabhu J, Cousley RR (2006). Current products and practice: bone anchorage devices in orthodontics. *J Orthod*. 33, 288-307.

Priester JH, Horst AM, Van WIC, Saleta JL, Mertes LAK, Holden PA (2007). enhanced visualization of microbial biofilms by staining and environmental scanning electrons microscopy. *Journal of microbiological methods* 68, 577-87.

Probster L, Lin W, Hutteman H (1992). Effect of fluoride prophylactic agents on titanium surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 7, 390-394.

Reynders R, Ronchi L, Bipat S (2009). Mini-implants in orthodontics: a systematic review of the literature. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 135, 564.1-19.

Santos L, Mion L, Marotzki M, Parizotto L, Rodrigues L, Nascimento V, Santos, L (2015). Número mais Provável miniaturizado e microbiologia convencional para isolamento de *Salmonella* spp. em abatedouros de frangos de corte. *Pesq Vet Bras*;35, 223-9.

Shapurian T, Damoulis PD, Reiser GM, Griffin TJ, Rand WM (2006). Quantitative evaluation of bone density using the Hounsfield index. *Int J Oral Maxillofac Implants*.21,290-7.

Schaechter M (2004). The Desk Encyclopedia of Microbiology. New York: Elsevier Academic Press.161, 164, 741 p.

Shukla SK, Reed KD (2000). Desulfovibrio desulfuricans Bacteremia in a dog. Journal of Clinical Microbiology, 38, 1701-1702.

Songur M, Celikkan H, Gokmese F, Simsek SA, Altunn S, Aksu ML (2009). Electrochemical corrosion Properties of metal alloys used in orthopaedic implantes, J. Appl. Eletroquímica, 39, 1259–1265.

Souza JCM, Henriques M, Teughels W, Ponthiaux P, Celis JP, Rocha LA (2015). Wear and Corrosion Interactions on Titanium in Oral Environment: Literature Review. J Bio Tribo-Corrosion 1, 1-13.

Squeff LR, Simonson MBA, Elias CN, Nojima LI (2008). Characterization of mini implants used in orthodontic Anchorage. Ver Dent Press Ortodon Ortop Facial. 13, 49-56.

Stowe S, Parirokh M, Asgary S, Eghbal MJ (2004). The benefits of using low accelerating voltage to assess endodontic instruments by scanning electron microscopy. Aust Endod J;30, 5-10.

Suzuki EY, Suzuki B (2011). Placement and removal torque values of orthodontic miniscrew implants. Am J Orthod Dentofacial Orthop.139, 669-78.

Suzuki MK, Martins DA, Costa MT, Ferreira AC, Ferreira FA (2018) Ions release Evaluation and Changes in Mini-implant Orthodontic Surface. J Contemp Dent Pract. 1;19, 910-917.

Trinidad A, Ibáñez A, Gómez D, Garcia-Berrocal JR, Ramíres-Camacho R (2010). Application of environmental scanning electron microscopy for study of biofilms in medical devices. Microscopy: Science, Technology, Applications and Education.p 204-210. vol 1.Badajoz, Spain.

Tsaousidis G, Bauss O (2008). Influence of insertion site on the failure rates of orthodontic miniscrews. J Orofac Orthop.69, 349-56.

Vaithiyanathan S, Chandrasekaran K, Barik RC (2018). Green biocide for mitigating sulfate-reducing bacteria influenced microbial corrosion. 3 Biotech.Dec;8, 495.

Videla HA, Characklis WG (1992) Biofouling and microbially influenced corrosion, International biodeterioration & Biodegradation 29, 195-212.

Vilella H, Bezerra F, Laboissiere MJ (2006). Microparafuso ortodôntico de titânio auto-perfurante (MPO): novo protocolo cirúrgico e atuais perspectivas clínicas. Innovations Implant Journal: Biomaterials and Esthetics, 1, (1), 46-53.

Wang Z, Shen Y, Haapasalo M (2012). Effectiveness of endodontic disinfecting solutions against Young and old enterococcus faecalis biofilms in dentin canals. JOE 38, 1376-9.

Wilmes B, Panayotidis A, Drescher D (2011). Fracture resistance of orthodontic mini-implants: a biomechanical in vitro study. *Eur J Orthod.* 33, 396-401.

Wilmes B, Rademacher C, Olthoff G, Drescher D (2006). Parameters affecting primary stability of orthodontic miniimplants. *J. Orofac. Orthop., München*, 67,162-174.

Yokoyama K, Ichikawa T, Murakami H, Miyamoto Y, Asaoka K (2002). Fracture mechanisms of retrieved titanium screw thread in dental implant. *Biomaterials.* 23, 2459-65.

9. ANEXO(S)

ANEXO 1 – Carta de autorização do departamento de anatomia humana da Universidade Iguazu (UNIG)



Scanned with CamScanner

ANEXO 2 - Ensaio de perda de massa – coeficiente de ajuste

MIEAS 1		MIEAS 2		MIEAS 3	
Pesagem inicial (g)	Pesagem final	Pesagem inicial	Pesagem final	Pesagem inicial	Pesagem final
0.14048	0.14050	0.14051	0.14050	0.14062	0.14064
0.14052	0.14048	0.14051	0.14049	0.14063	0.14066
0.14050	0.14049	0.14050	0.14051	0.14063	0.14063

ANEXO 3 - Tabela de Número Mais Provável (MPN)/100mL

TUBOS POSITIVOS			MPN	TUBOS POSITIVOS			MPN	TUBOS POSITIVOS			MPN
10 MI	1 mL	0,1 MI		10 mL	1 mL	0,1 mL		10 mL	1 mL	0,1 mL	
0	0	0	<2	1	2	0	11	3	0	0	23
0	0	1	3	1	2	1	15	3	0	1	39
0	0	2	6	1	2	2	20	3	0	2	64
0	0	3	9	1	2	3	24	3	0	3	95
0	1	0	3	1	3	0	16	3	1	0	43
0	1	1	6	1	3	1	20	3	1	1	75
0	1	2	9	1	3	2	24	3	1	2	120
0	1	3	12	1	3	3	29	3	1	3	160
0	2	0	6	2	0	0	9	3	2	0	93
0	2	1	9	2	0	1	14	3	2	1	150
0	2	2	12	2	0	2	20	3	2	2	210
0	2	3	16	2	0	3	26	3	2	3	290
0	3	0	9	2	1	0	15	3	3	0	240
0	3	1	13	2	1	1	20	3	3	1	460
0	3	2	16	2	1	2	27	3	3	2	1100
0	3	3	19	2	1	3	34	3	3	3	>2400
1	0	0	4	2	2	0	21				
1	0	1	7	2	2	1	28				
1	0	2	11	2	2	2	35				
1	0	3	15	2	2	3	42				
1	1	0	7	2	3	0	29				
1	1	1	11	2	3	1	36				
1	1	2	15	2	3	2	44				
1	1	3	19	2	3	3	53				