



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba



JADISON JUNIO CONFORTE

“Efeito do biofilme de *Enterococcus faecalis* na resistência corrosiva no Titânio submetido a diferentes tratamentos de superfície”

Araçatuba – SP

2019

JADISON JUNIO CONFORTE

“Efeito do biofilme de *Enterococcus faecalis* na resistência corrosiva no Titânio submetido a diferentes tratamentos de superfície”

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/UNESP – Universidade Estadual Paulista, para a obtenção do título de Mestre em Odontologia (Área de Concentração: Prótese Dentária).

Orientador: Prof. Dr. Wirley Gonçalves Assunção

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Cristiane Duque

Araçatuba – SP

2019

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Conforte, Jadison Junio.

C748e Efeito do biofilme de *Enterococcus faecalis* na resistência
corrosiva no Titânio submetido a diferentes tratamentos de
superfície./ Jadison Junio Conforte. – Araçatuba, 2019
79 f. : 11 il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia, Araçatuba

Orientador: Prof. Wirley Gonçalves Assunção

Coorientadora: Prof^a. Cristiane Duque

1. Implantação dentária endo-óssea
2. Titânio
3. Corrosão
4. Biofilmes I. T.

Black D3

CDD 617.6



Dedicatoria

Dedico este trabalho à Deus e aos nossos amigos fraternos das camadas elevadas. Sou uma pessoa muito grata por ter tudo o que tenho recebido.

Dedico esta obra aos meus pais que me ensinaram o maior valor que carrego, a paz interior!

Dedico esta obra, também aos amigos dos planos superiores e ao senhor, meu Deus, pelas graças que tem possibilitado eu alcançar!

Obrigado meu Deus, por permitir o meu nascimento em uma família que contribuiu muito para a minha evolução terrestre. Uma família onde o pai e a mãe estão realmente presente, que me orientaram até o momento e forneceram o respaldo para que eu evoluísse na eternidade. Que Deus os ilumine e a todos nós chegue esta proteção.

Dedico ao senhor, meu pai, Milton Conforte.

Pelo exemplo de pessoa que o senhor é para mim e para as pessoas próximas. A coisa mais fundamental que aprendi com o senhor foi a serenidade, tranquilidade, saber calar quando somos atacados e que jamais possamos perder nossa credibilidade perante a Deus. A criança adquire características de seus espelhos, os pais! Digo ao senhor pai que a forma que sempre tratou as pessoas mais humildes e a seus familiares me ajudaram a tornar uma pessoa igual ao senhor, humilde. O senhor é uma benção em minha vida! Obrigado por ser um ser que sempre levou a paz para o nosso lar.

Dedico esta obra para a senhora, minha mãe, Maria Fatima Rezende Conforte.

Por ter me aceitado como filho e ter me fornecido o seu ventre para me gerar. Agradeço aos meios que a senhora buscou para que a educação chegasse para mim. Amo muito a senhora. Adquirir todo o seu o seu ânimo ao trabalho para mim e a forma de encarar as dificuldades que a vida nos trás e saber que todo momento turbulento passará, bastando apenas ter calma e dar tempo para o tempo. Se aqui hoje cheguei é muito graças a senhora que nunca deixou que eu desistisse. Fico muito feliz por torce por mim, enquanto que muitas mãe nem se importam com seus filhos. Assim como o meu pai, agradeço a Deus por ter me colocado como seu filho. Te amo por toda a eternidade!

Dedico esta obra ao meu irmão, Vinicius Conforte.

Ao meu irmão pelo companheirismo e amizade que temos. Agradeço por integrar o nosso lar, por somar para a paz que temos, a doação do seu amor aos nossos pais e a proteção a eles que você oferece para eles na minha ausência. Ainda que muitas das vezes parecemos ser tão distante um do outro por questão de gosto e ideais, mesmo assim nos tornamos próximos pelos laços familiares terrenos. Agradeço a Deus por tê-lo como irmão.

Dedico também, a minha namorada, Ana Claudia Rodrigues da Silva.

À você Ana, eu posso dizer com tranquilidade este jargão, que todo grande homem tem sempre uma grande mulher por trás. Para eu falta apenas ser este “grande homem”. Fico feliz por partilhar de sua alegria, ternura, tranquilidade e paciência. Fico surpreso com a sua maturidade mental. Agradeço a você pelo apoio prestado no mestrado me incentivando e me ajudando a carregar as energias ao seu lado. A paciência que tinha quando eu precisava reclamar, você me ouvia sempre serena. Sou grato aos incentivos me dado e por não deixar com que patologias psíquicas se manifestasse, como o orgulho, arrogância e prepotente que eu estava me tornando no início da minha pós graduação. A pessoa que eu idealizava encontrar ao meu lado como companheira, Deus me concedeu. Acredito que juntos poderemos contribuir para o progresso espiritual um do outro e dos que estão ao nosso redor. Que juntos possamos mais fornecer, do que receber. Te amo.



Agradecimientos

Agradeço,

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, na pessoa do seu Diretor, Professor Wilson Roberto Poi e no do coordenador do programa de pós-graduação em Odontologia, Professor André Luiz Fraga Briso, pela oportunidade da realização do curso de Mestrado em Prótese Dentária.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES pelo auxílio em forma de bolsa de ensino em 2017 e a Fundação de Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo Fapesp 2017/11471-5) pela bolsa de ensino para o ano de 2017 a 2019, as quais, sem estas bolsas seria impossível minha permanência no programa.

Ao meu orientador, Prof Dr Wirley Gonçalves Assunção,

Sou grato por ter me aceitado como seu orientado. Vejo o como uma pessoa íntegra, honesta, caprichoso e compreensivo. Fico feliz por saber aguardar o tempo necessário que tive para resolver os problemas que foram surgindo durante o mestrado. Sou muito grato por não ter me privado das oportunidades que foram surgindo para mim, me auxiliando nestes momentos. De característica pessoal absorvi o seu capricho na execução dos meus trabalhos diários. De característica de docente carregarei comigo a excelente didática para aspectos clínicos. Agradeço por até aqui ter me ajudado nesta caminhada da minha formação profissional.

À minha co-orientadora, Profa Dra Cristiane Duque,

À professora Cris Duque, como carinhosamente é tratada, agradeço pelos ensinamentos durante o mestrado na execução das minhas atividades laboratoriais. A senhora foi fundamental para a conclusão deste trabalho. O primeiro contato que tive com a professora foi em 2016, durante a graduação, na disciplina de Odontopediatria onde tive a felicidade de conhecer essa pessoa carismática e empenhada. Fiquei feliz em saber que seria minha co-orientadora no mestrado. Obrigado por tudo professora e por estar sempre prontificada em ajudar o próximo.

Aos meus amigos de graduação e agora pós graduando,

Ana Maria Vasquez, Henrique Rinaldi Matheus, Luan F Toro, Luan Benetti, Guilherme Ramires, Jesse Augusto por terem me acompanhado nesta empreitada,

dividindo as amarguras e compartilhando as glórias que estamos alcançando. Sabemos das dificuldades que nós enfrentamos nessa trajetória, mas que gradativamente está sendo superada.

Ao meu amigo Gestter Willian Lattari Tessarin,

Sou grato ao nosso companheirismo, amizade iniciada durante a graduação e agora intensificada mais ainda na pós graduação. Sou grato pelas dicas para evitar caminhos menos dolorosos para trilhar na pesquisa e assunto referentes à pós graduação. Tenho contigo uma amizade verdadeira. Sou grato por tê-lo como amigo.

Ao meu amigo João Paulo Bonardi,

Agradeço pela nossa amizade e trabalhos desenvolvidos juntos. Puder aprender muito contigo casos mais complexos de cirurgia, bem como evoluir na prática clínica ao executar estes casos. Sou grato a você. Obrigado pela parceira nesses dois anos de pós graduando.

À minha colega de pós graduação Cecília Alves de Sousa

Agradeço a você por todos os ensinamentos proporcionados para elaboração deste trabalho. Sem a sua ajuda ficaria impossível a solução de alguns problemas que surgiram do decorrer das atividades. Sou grato pela ajuda oferecida para que este trabalho tivesse o seu prazo concluído dentro do período proposto. Obrigado de coração.

À minha amiga Juliana Brunetto e colega João Paulo,

Que nesta reta final tanto me auxiliaram para que alguns contra tempos fossem superados. Tenho profunda gratidão a isto tudo. Sei que nesta reta final acabei por ganhar duas grandes amizades. Jamais esquecerei estes momentos que passei com vocês.

Aos professores,

Ao Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani que é mais como um irmão mais velho para nós, pós graduandos, do que propriamente um professor. Sempre manteve as suas portas abertas para ouvir as nossas lamentações, compartilhar de nossas alegrias e conquistas e solícito para nos auxiliar. Tenho uma profunda dívida contigo.

Às professoras Daniela Ponzoni, Ana Paula Farnezzzi Bassi, Adriana Cristina Zavarelli e Daniela Atili Brandini que foram mães / amigas para mim. Sou muito grato

por vocês terem sempre me deixado desenvolver as minhas atividades clínicas nas dependências das clínicas dos departamentos e das clínicas das disciplinas. Sempre tiveram dispostas a me ajudar. Acredito que quem ajuda ao próximo na verdade é sempre o primeiro beneficiário e Deus está atento a tudo. O meu crescimento como profissional é também graças a vocês três. Estendo os meus agradecimentos aos funcionários do departamento de Cirurgia e Clínica Integrada Marco Ianner, Paulo Gratão e Renato pela amizade e convivência cultivada ao longo destes anos de FOA-UNESP.

Ao professor Edilson Ervolino na ajuda para a elaboração de meu Exame Geral de Qualificação, bem como na disponibilidade do local para desenvolvimento deste trabalho e de toda a cooperação necessária para a execução deste trabalho. Pude aprender muito com o senhor e saber que cada um tem seu tempo. Peço desculpa pelos momentos que fui inconveniente. Obrigado por tudo.

Aos professores do Departamento de Ciências Básicas, José Américo de Oliveira, Paulo Roberto Botacin, Roberta Okamoto, Alaíde Gonçalves, Cláudio Aparecido Casati e Mariza Akemi Matsumoto pela companhia no departamento, ensinamento e participação das atividades que vocês sempre desenvolveram. Amplio estas considerações aos funcionários deste departamento Eliseide Maria Ferreira Silva, José Ari Gualberto Junqueira, Arnaldo César dos Santos e André L Mattos.

Aos professores Aldiéris A. Pesqueira pela amizade sincera, companheirismo e muitas vezes se preocupando quanto a minha execução da minha dissertação. Sou grato pelas possibilidades de aprendizado me concedido no ano de 2015, quando estreitamos a nossa amizade. Agradeço também ao professor Valentin Adelino R. Barão por ter sempre abrindo as portas da instituição onde leciona, bem como nos auxiliado nos esclarecimentos das dúvidas que frequentemente surgiam. Suas orientações vieram para elucidar muitas das minhas dúvidas e também as vezes para aumentá-las. Obrigado de coração professor.

Aos professores do departamento de Materiais Odontológico e Prótese, Daniela Michelini, Paulo Henrique dos Santos, Marcelo Goiato, Karina Helga Turcio, Aimée Guiotti, José Vitor Mazaro, Eduardo Rocha, Paulo Zuim, Fellipo Ramos Verri e Humberto Gennari pelos momentos em que convivemos no departamento, bem como aos

funcionários Jander, Carlão e Eduardinho, senhora Magda e Dalete. Agradeço a todos vocês.

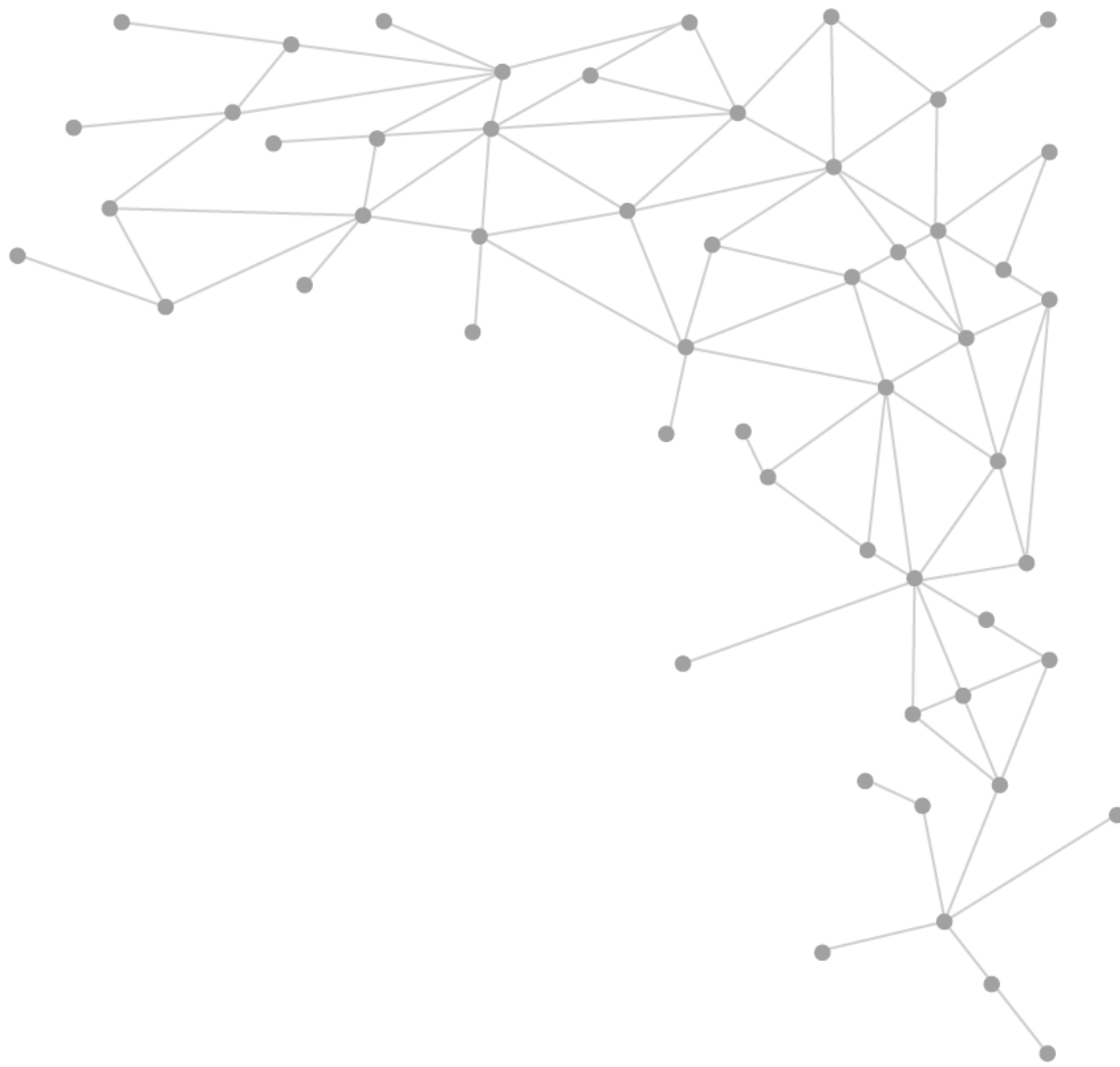
Aos colegas de pós graduação

Jessica Moreno, Ariane Barion, Tiago Machado, Gabriel Mulinari, William Philip, Henrico Strazzi, Tárík Polo, Bruno Mendes, Gabriel Mulinari, Caio Debortoli, Martin Adriazola, Marina Fuzette, Marina Cury, Karina Caiaffa, Vanessa Rodrigues, Gabriela Costa, Thayse Hosida, Leonardo Moraes, Caio, José Antônio, Fernando Isquierdo, Fábio, Isabela pelos momentos compartilhados com vocês.

As instituições no fornecimento de equipamento de MEV e MFA, como o Instituto Federal de São Paulo, em Biririgui, no nome do Prof Dr Allan Victor Ribeiro pela colaboração no AFM, e ao Instituto de Química da Unesp de Araraquara pelas disponibilização de realização do MEV e EDS.

Agradeço a DSP Biomedical por fornecimento dos espécimes de titânio com o tratamento de superfície que possibilitou com que este trabalho fosse executado.

Ao professor Alberto Delben pela liberação quanto ao uso das dependências do laboratório de microbiologia.



Epígrafe

“Uma coisa sei: eu era cego e agora vejo”.

– (João,9:25)



Resumo

Conforte JJ. **Efeito do biofilme de *Enterococcus faecalis* na resistência corrosiva no Titânio submetido a diferentes tratamentos de superfície.** [Dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2019.

Resumo

O objetivo desse estudo foi avaliar, *in vitro*, a corrosão em diferentes superfícies de Titânio comercialmente puro-Grau 4 (Ticp-G4) em função do efeito de biofilme bacteriano de *Enterococcus faecalis*. 57 discos foram utilizados divididos aleatoriamente de acordo com a superfície (n=19): Grupo I superfície usinada (USI); Grupo II superfície texturizada por duplo ataque ácido (D.A.) e Grupo III superfície texturizada por duplo ataque ácido e jateamento por zircônia (D.A.Zir). Para análise microbiológica (n=9), os discos foram posicionados em placas de 24 poços contendo cultura de *Enterococcus faecalis* à 1.5×10^5 células/mL em meio BHI caldo e incubados por 168 horas (7 dias) a 37° C. Após este período os discos foram removidos e as bactérias aderidas em sua superfície foram avaliadas por meio de contagem de Unidades Formadora de Colônias/mL (UFC/mL). Para análise corrosiva (n=5), novos espécimes foram inoculados da mesma forma em cultura de *E. faecalis* e após 7 dias, estes foram destinados ao ensaio eletroquímico por meio de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), utilizando como eletrólitos BHI e biofilme e BHI caldo estéril. Os resultados foram submetidos à análise estatística: microbiológico (ANOVA com pós teste Tukey; 5%) e ensaio eletroquímico (ANOVA 2 Fatores e pós teste Tukey 5%). Na avaliação da contagem celular bacteriana, somente D.A.Zir (média 34 UFC/ml) diferiu de USI (média 16 UFC/ml) ($p = 0,034$), mas não de D.A. (24 UFC/ml). Na espectroscopia de impedância eletroquímica, para Nyquist e BODE, o grupo D.A.Zir (Biofilme) manifestou pior comportamento eletroquímico. Para resistência à polarização o USI (BHI) teve melhor resistência de troca iônica com o meio. Para o estudo eletroquímico D.A.Zir (Biofilme) teve o pior comportamento eletroquímico e o grupo USI (BHI) teve melhor capacidade de resistir as trocas iônicas. Conclui-se que houve maior formação de biofilme para o grupo D.A.Zir, com maior troca eletroquímica para D.A.Zir (Biofilme) e a presença biofilme favoreceu uma maior troca eletroquímica para com o meio.

Palavras-chaves: implantação dentária endo-óssea osseointegrado, titânio, corrosão, biofilmes.



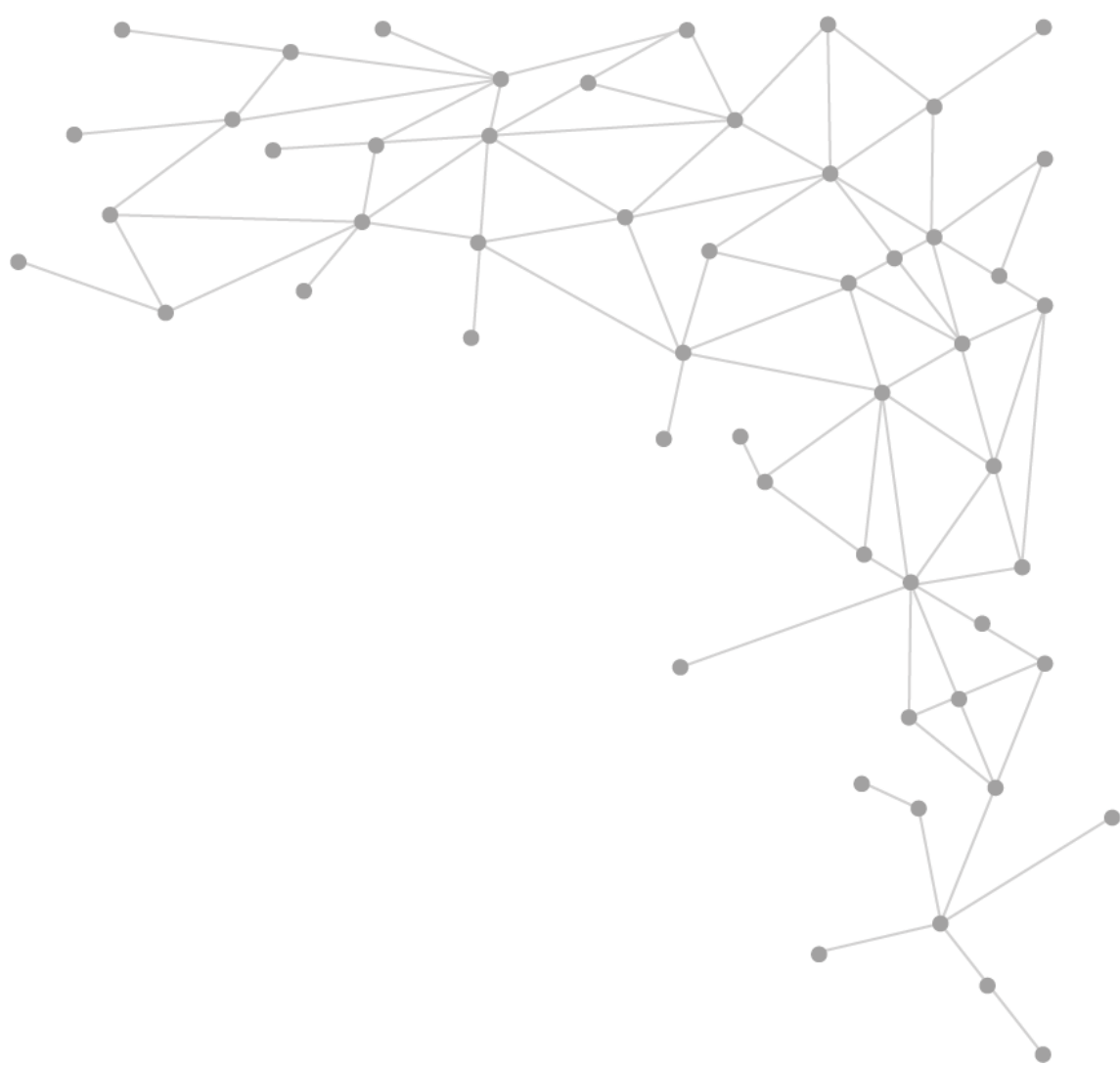
Abstract

Confort JJ. **Effect of Enterococcus faecalis biofilm on corrosion resistance in titanium submitted to different surface treatments.** [Dissertation]. Araçatuba: School of Dentistry, São Paulo University; 2019.

Abstract

The objective of this study was to evaluate, *in vitro*, the corrosion in different surfaces of Titanium commercially pure-Grade 4 (Ticp-G4) as a function of the bacterial biofilm effect of *Enterococcus faecalis*. 57 disks were randomly divided according to the surface (n = 19): Group I machined surface (USI); Group II surface textured by double acid attack (D.A.) and Group III surface textured by double acid etching and zirconia (D.A.Zir). For microbiological analysis (n = 9), the discs were positioned in 24-well plates containing *Enterococcus faecalis* culture at 1.5×10^5 cells / ml in broth BHI medium and incubated for 168 hours (7 days) at 37 ° C. period the discs were removed and the bacteria adhered on its surface were evaluated by means of Colony Forming Units / mL (CFU / mL) counts. For corrosive analysis (n = 5), new specimens were inoculated in the same way in *E. faecalis* culture and after 7 days, they were destined to the electrochemical test by means of electrochemical impedance spectroscopy (IEE) using BHI and biofilm electrolytes and BHI sterile broth. The results were submitted to statistical analysis: microbiological (ANOVA with Tukey post test, 5%) and electrochemical test (ANOVA 2 Factors and post test Tukey 5%). In the evaluation of bacterial cell count, only D.A.Zir (mean 34 CFU / ml) differed from USI (mean 16 CFU / ml) (p = 0.034), but not D.A. (24 CFU / ml). In electrochemical impedance spectroscopy, for Nyquist and BODE, the D.A.Zir (Biofilm) group showed worse electrochemical behavior. For resistance to polarization the USI (BHI) had better ion exchange resistance with the medium. For the electrochemical study D.A.Zir (Biofilm) had the worst electrochemical behavior and the USI group (BHI) had better ability to resist ionic exchanges. It was concluded that there was a higher biofilm formation for the D.A.Zir group, with a higher electrochemical exchange for D.A.Zir (Biofilm) and the biofilm presence favored a greater electrochemical exchange with the medium.

Keywords: osseointegrated endo-osseous dental implant, titanium, corrosion, biofilms.



Lista de Figuras

Lista de Figuras

- Figura 01** – Gráfico comparativo entre os grupos D.A., D.A.Zir e USI considerando a média de UFC/ml $\times 10^5$, segundo os testes de ANOVA e Tukey ($p < 0.05$), onde letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística..... **38**
- Figura 02:** Representação gráfica das médias e desvio padrão dos valores de OCP para os grupos USI (BHI), USI (Biofilme), D.A. (BHI), D.A. (Biofilme), D.A.Zir (BHI) e D.A.Zir (Biofilme). Letras maiúsculas iguais mostram semelhança estatística entre as superfícies. Letras minúsculas iguais evidenciam semelhança estatísticas, considerando o eletrólito entre os grupos para BHI e Biofilme..... **39**
- Figura 03:** Diagrama dos valores do OCP para as superfícies testadas: USI (BHI e Biofilme), D.A. (BHI e Biofilme) e D.A.Zir (BHI e Biofilme)..... **40**
- Figura 04:** Diagrama dos valores do Nyquist das superfícies testadas: USI (BHI e Biofilme), D.A. (BHI e Biofilme) e D.A.Zir (BHI e Biofilme).....**41**
- Figura 05:** Módulo de impedância ($|Z|$) obtidos através do diagrama de Bode para os grupos USI (BHI e Biofilme), D.A. (BHI e Biofilme) e D.A.Zir (BHI e Biofilme).....**42**
- Figura 06:** Ângulo de fase obtido através do diagrama de Bode para os grupos USI (BHI e Biofilme), D.A. (BHI e Biofilme) e D.A.Zir (BHI e Biofilme).....**42**
- Figura 07:** Representação gráfica das médias e desvios padrão dos valores de R_p para os grupos USI, D.A. e D.A.Zir em Biofilme e BHI. Letras maiúsculas iguais evidenciam semelhança estatística entre as superfícies. Letras minúsculas iguais mostram semelhança estatísticas considerando o eletrólito (BHI e Biofilme) entre os grupos.....**43**
- Figura 08:** Circuito Elétrico Equivalente..... **43**
- Figura 09:** Gráfico com os valores de média e desvio padrão do Circuito de Polarização Elétrica (CPE com Difusão) para os grupos USI, D.A. e D.A.Zir em função dos eletrólitos (BHI e Biofilme). Letras maiúsculas, se diferentes, mostram a diferença estatística entre as superfícies. Letras minúsculas, se diferentes, mostram diferença estatísticas considerando o eletrólito entre os grupos para BHI e Biofilme.....**44**
- Figura 10:** Curvas potenciodinâmicas dos grupos USI, D.A. e D.A.Zir em função dos eletrólitos (BHI e Biofilme)..... **45**
- Figura 11:** Representação gráfica das médias e desvios padrão dos valores de E_{corr} para os grupos USI, D.A. e D.A.Zir em função dos eletrólitos (BHI e Biofilme). Letras maiúsculas, se diferentes, mostram a diferença estatística entre as superfícies. Letras minúsculas, quando diferentes, mostram diferença estatísticas considerando o eletrólito (BHI e Biofilme) entre os grupos das superfícies..... **46**
- Figura 12:** Representação gráfica das médias e desvios padrão dos valores de I_{corr} para os grupos de superfícies (USI, D.A. e D.A.Zir em função dos eletrólitos (BHI e Biofilme). Um único asterisco sobre a indicação dos espécimes corresponde ao fator eletrólito. Dois asteriscos sobre a indicação dos espécimes correspondem ao fator superfície..... **47**

Figura 13 – Imagens obtidas por MEV 3000x sobre a superfície dos discos com as superfícies alteradas. [A] USI (Padrão) espécime usinado e submetido a metalografia, sem condicionamento da superfície; [B] USI (BHI) espécime em contato com BHI para o ensaio eletroquímico para esta superfície; [C] USI (Biofilme) espécime com a formação de biofilme após 7 dias após ensaio eletroquímico; [D] D.A.Zir (Padrão) espécime representativo deste tratamento de superfície, como recebido da empresa e sem ser testado; [E] D.A.Zir imerso em BHI para o ensaio eletroquímico para esta superfície; [F] D.A.Zir em Biofilme de 7 dias de crescimento microbiano após ensaio eletroquímico; [G] D.A (Padrão) espécime representativo deste tratamento de superfície, como recebido da empresa e sem ser testado; [H] D.A. imerso em BHI para o ensaio eletroquímico para esta superfície; [I] D.A. em Biofilme de 7 dias de crescimento microbiano após ensaio eletroquímico..... **48**

Figura 14 - Gráfico expondo os dados da EED da superfície, USI (BHI) e USI (Biofilme)..... **50**

Figura 15 - Gráfico representativo dos dados da EED da superfície D.A., D.A. (BHI) e D.A. (Biofilme)..... **51**

Figura 16 - Gráfico representativo dos dados da EED da superfície D.A.Zir (padrão), D.A.Zir (BHI) e D.A.Zir (Biofilme)..... **52**

Figura 17 – Imagens obtido por MFA em área de 50 µm por 50 µm sobre a superfície dos discos Usinados (USI), representando o USI (Padrão) (disco recebido pelo fabricante para os ensaios), USI (BHI) (disco que passou pelo ensaio eletroquímico sem o crescimento de biofilme por 7 dias) e USI (Biofilme) (disco que passou pelo ensaio microbiológico para crescimento de biofilme de 7 dias e ensaio eletroquímico)..... **54**

Figura 18 - Imagens obtido por MFA em área de 50 µm por 50 µm sobre a superfície dos discos Duplo Ataque Ácido (D.A.), representando o D.A. (Padrão) (disco recebido pelo fabricante para os ensaios), D.A. (BHI) (disco que passou pelo ensaio eletroquímico sem o crescimento de biofilme por 7 dias) e D.A. (Biofilme) (disco que passou pelo ensaio microbiológico para crescimento de biofilme durante 7 dias seguido do ensaio eletroquímico)..... **55**

Figura 19 - Imagens obtido por MFA em área de 50 µm por 50 µm sobre a superfície dos discos Duplo Ataque Ácido e Jateamento de Zircônia (D.A.Zir), representando o D.A.Zir (Padrão) (disco recebido pelo fabricante para os ensaios), D.A.Zir (BHI) (disco que passou pelo ensaio eletroquímico sem o crescimento de biofilme por 7 dias) e D.A.Zir (Biofilme) (disco que passou pelo ensaio microbiológico para crescimento de biofilme durante 7 dias, seguido do ensaio eletroquímico)..... **56**



Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Abreviaturas e siglas

Ticp-G4: Titânio comercialmente puro grau 4
USI: Superfície Usinada
D.A.: Superfície Duplo Ataque Ácido
D.A.Zir: Superfície Duplo Ataque Ácido com jateamento Zircônia.
BHI: Brain-Heart Infusion
Ti: titânio
CO₂: Dióxido de carbono
mm: milímetro
cm²: centímetro quadrado
µm³: microlitro cúbico
µl: microlitro
ASTM: American Society for Testing of Materials
EIE: Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
mHz: milihertz
mV: millivolt
[Z]: impedância total
Z'': imaginário
Z': componente real
mV/s: millivolts / Segundo
V: volts
MFA: Microscopia de Força Atômica
MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura
EED: Espectroscopia de Energia Dispersiva
ml: mililitro
UFC: Unidade Formadora de Colônia
Cpe: Circuito Elétrico de Polarização
Icorr: Densidade de Corrente de Corrosão
Ipass: Densidade de Corrente de Passivação
Ecorr: Potencial de Corrosão do Metal
OCP: Potencial de Circuito Aberto
Rp: Resistência a polarização
Ω: ohm

C: carbono

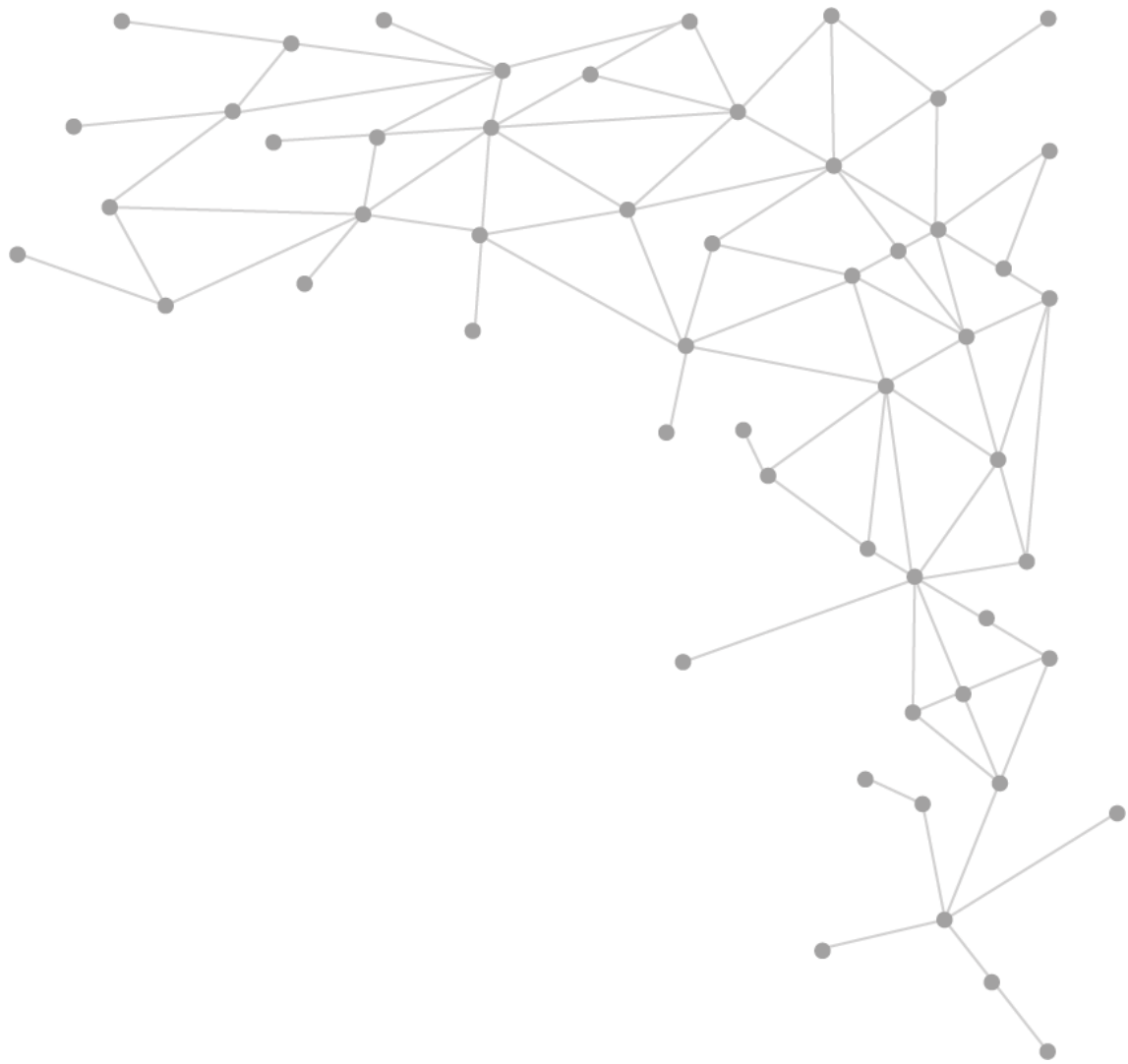
Na: sódio

P: fósforo

S: enxofre

Cl: cloro

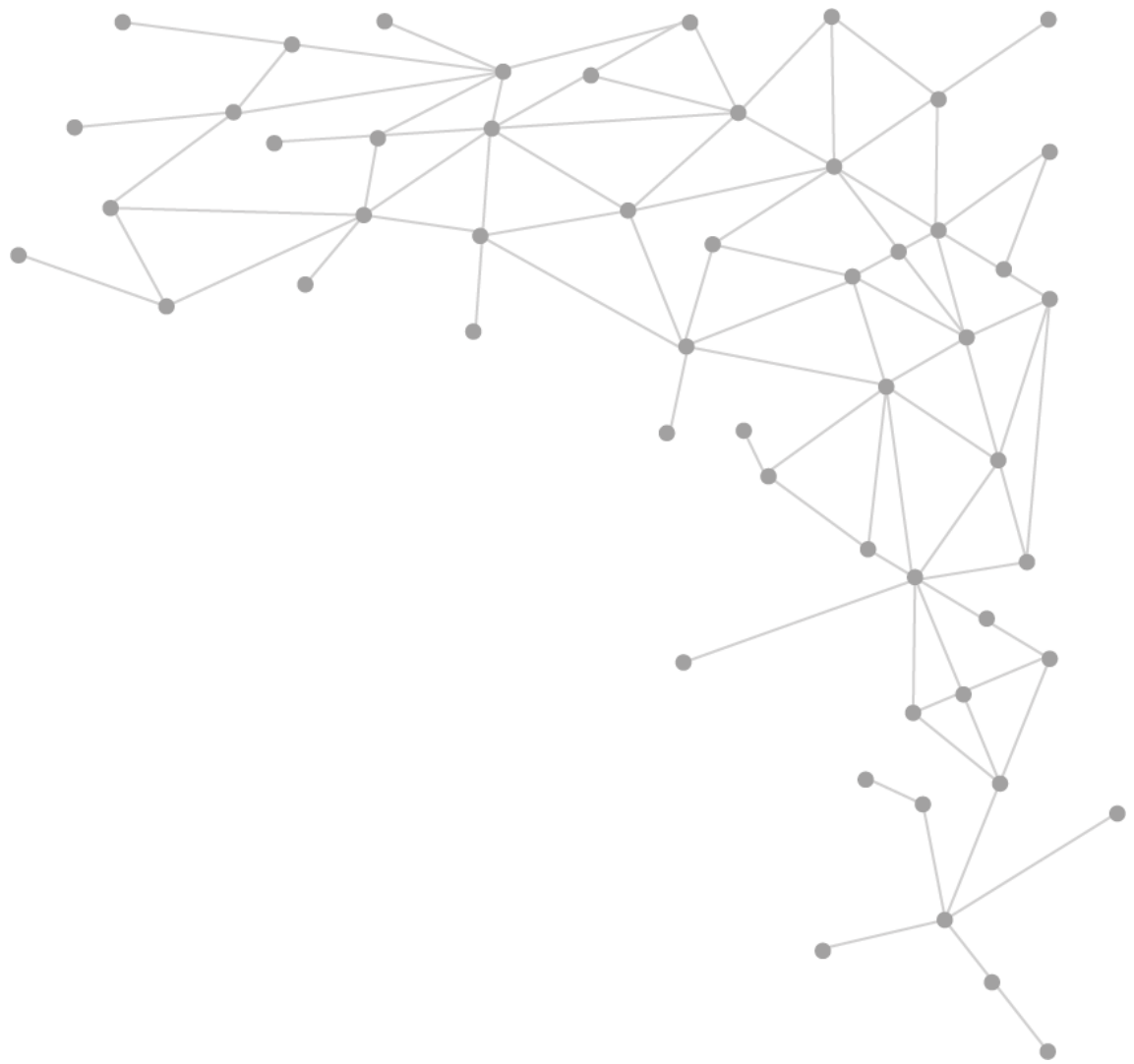
K: potássio



Sumário

Sumário

1	INTRODUÇÃO	25
2	PROPOSIÇÃO	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1	PREPARAÇÃO DOS ESPÉCIMES	32
3.2	CEPAS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	33
3.3	ENSAIO ELETROQUÍMICO	34
3.4	MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.....	36
3.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA (EED)	36
3.6	ANÁLISE DOS RESULTADOS	37
4	RESULTADOS	38
4.1	MICROBIOLÓGICO	38
4.2	ENSAIO ELETROQUÍMICO.....	38
4.2.1	<i>Potencial de Circuito Aberto (OCP)</i>	38
4.2.2	<i>Espectroscopia de Impedância Eletroquímica</i>	40
4.2.3	<i>Curva de Polarização Potenciodinâmica</i>	44
4.2.1	<i>Potencial de Corrosão (E_{corr})</i>	45
4.2.2	<i>Densidade de Corrente de Corrosão (I_{corr})</i>	46
4.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA (EED)	47
4.4	MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA).....	52
5	DISCUSSÃO	61
6	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	69
	ANEXO	79



Introdução

1 INTRODUÇÃO

O titânio (Ti) é o principal constituinte de implantes ortopédicos e odontológicos, podendo ser utilizado na sua forma pura com mais de 98% de Ti ou associado a outros metais, sendo o Ti grau 4 (ASTM F67) empregado na confecção dos implantes dentários (Cortada *et al.*, 2000; Schiff *et al.*, 2002; Mabboux *et al.*, 2004).

Estudos comparando os implantes dentários de superfície usinada com superfície modificada mostraram superioridade do reparo ósseo nos implantes com superfície rugosa (Zechner *et al.*, 2003; Queiroz *et al.*, 2013). Ainda que essas superfícies favoreçam a osseointegração, as variações topográficas em sua estrutura também aumentam a colonização inicial de microrganismos, tornando a formação de biofilme consideravelmente mais rápida, podendo levar a quadros de inflamações e infecções periimplantares (Rimondini *et al.*, 1997; Schmidlin *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2014) (De Melo *et al.*, 2016; Ferreira Ribeiro *et al.*, 2016).

Os implantes dentários de titânio com superfícies modificadas por jateamento com óxidos e ou ação de ácidos têm superioridade clínica em comparação com as suas contrapartes lisas (Al Qahtani *et al.*, 2017). A investigação de implantes dentários de titânio e zircônia com superfícies jateadas, sinterizadas ou modificadas à laser foram investigadas considerando seu torque de remoção e a aposição óssea inicial. O implante de titânio com a zircônia jateada teve melhor taxa de deposição óssea comparada com as outras superfícies (Hoffmann *et al.*, 2012). O jateamento sobre a zircônia estabilizada com ítrio (Y-TZP) com óxido de alumínio melhorou a rugosidade média da superfície de implante em estudo *in vitro* (Al Qahtani *et al.*, 2012).

O Ti é um material altamente reativo e quando em contato com o ar ou a água, uma camada fina de óxido de titânio (TiO₂) é formada impedindo a descarga de íons para o organismo (Cortada *et al.*, 2000; Schiff *et al.*, 2002). Entretanto, quando o Ti é exposto às condições adversas como as observadas na cavidade bucal (mudança de pH, presença de flúor, alterações térmicas, químicas e mecânicas, presença de biofilme e saliva) essa camada de óxido pode ser degradada e íons são liberados tanto para o meio externo quanto o interno, como ocorre nos casos de corrosão da superfície do implante, culminando em alterações nessa estrutura e causando resposta de hipersensível com a liberação de mediadores inflamatórios no local do implante (Guglielmotti *et al.* 2000, Hallab *et al.* 2001).

Com o uso generalizado de implantes de Ti e coroas protéticas na cavidade oral, o acúmulo de biofilme sobre estes materiais, muitas vezes promovem a inflamação periodontal e a colonização microbiana (Botero *et al.*, 2005; Furst *et al.*, 2007; Belibasakis, 2014). Apesar do implante estar estéril durante sua instalação, a colonização microbiana se inicia nos primeiros 30 minutos após a instalação dos implantes na cavidade bucal, sendo que a composição bacteriana do biofilme encontrada nestes sítios são próximas da microbiota de dentes vizinhos ou similares às bactérias já presentes na microflora bucal do indivíduo (Botero *et al.*, 2005; Salvi *et al.*, 2008; Belibasakis, 2014). Após o estabelecimento do biofilme na superfície dos implantes dentais, similarmente ao que ocorre nos dentes naturais em condições de periodontite, é possível identificar quadros de inflamação e subsequente destruição do tecido ósseo adjacente ao implante instalado. Tão logo, a inflamação tecidual destrutiva que ocorre nos casos de periimplantites são tão nocivas como as infecções periodontais, podendo levar até mesmo à perda do implante dental (Belibasakis, 2014).

Supõe-se que a corrosão dos materiais metálicos na cavidade oral, pode ser causada pela atividade metabólica dos microrganismos vivos. A corrosão induzida microbiologicamente é considerada uma consequência devido aos metabólitos liberados pelos microrganismos tais como os ácidos orgânicos, gerando um meio ácido, levando a formação de células eletroquímicas locais devido a uma diferença de potencial nas concentrações de produtos químicos, tais como oxigênio e reações de transferência iônica direta ou indireta com as substâncias liberada por microrganismos (Videla and Herrera, 2005; Fukushima *et al.*, 2014).

Estudos prévios de Pan e colaboradores (1996) e investigações de Koike e Fujii (2001) revelaram que a imersão nos metabólitos liberados por bactérias e microrganismos, tais como o ácido lático e peróxido de hidrogênio, causam a corrosão no titânio. Além disso, as medições eletroquímicas realizadas nesses estudos indicaram que a carga elétrica sobre a superfície de titânio foi modificada formando peróxido de hidrogênio tamponado com fosfato, seguido de corrosão com formação de células eletroquímicas locais (Pan *et al.*, 1996; Koike and Fujii, 2001; Bearinger *et al.*, 2003; Fukushima *et al.*, 2014). Entretanto, estes estudos foram realizados sem formação de biofilme microbiano, avaliando exclusivamente apenas o processo de corrosão no Ti na presença destas substâncias do metabolismo celular microbiano.

Quanto a escolha de um dada bactéria para um modelo experimental, pode ser adotada pela importância clínica que ela significa ou pela facilidade de cultivo que ela

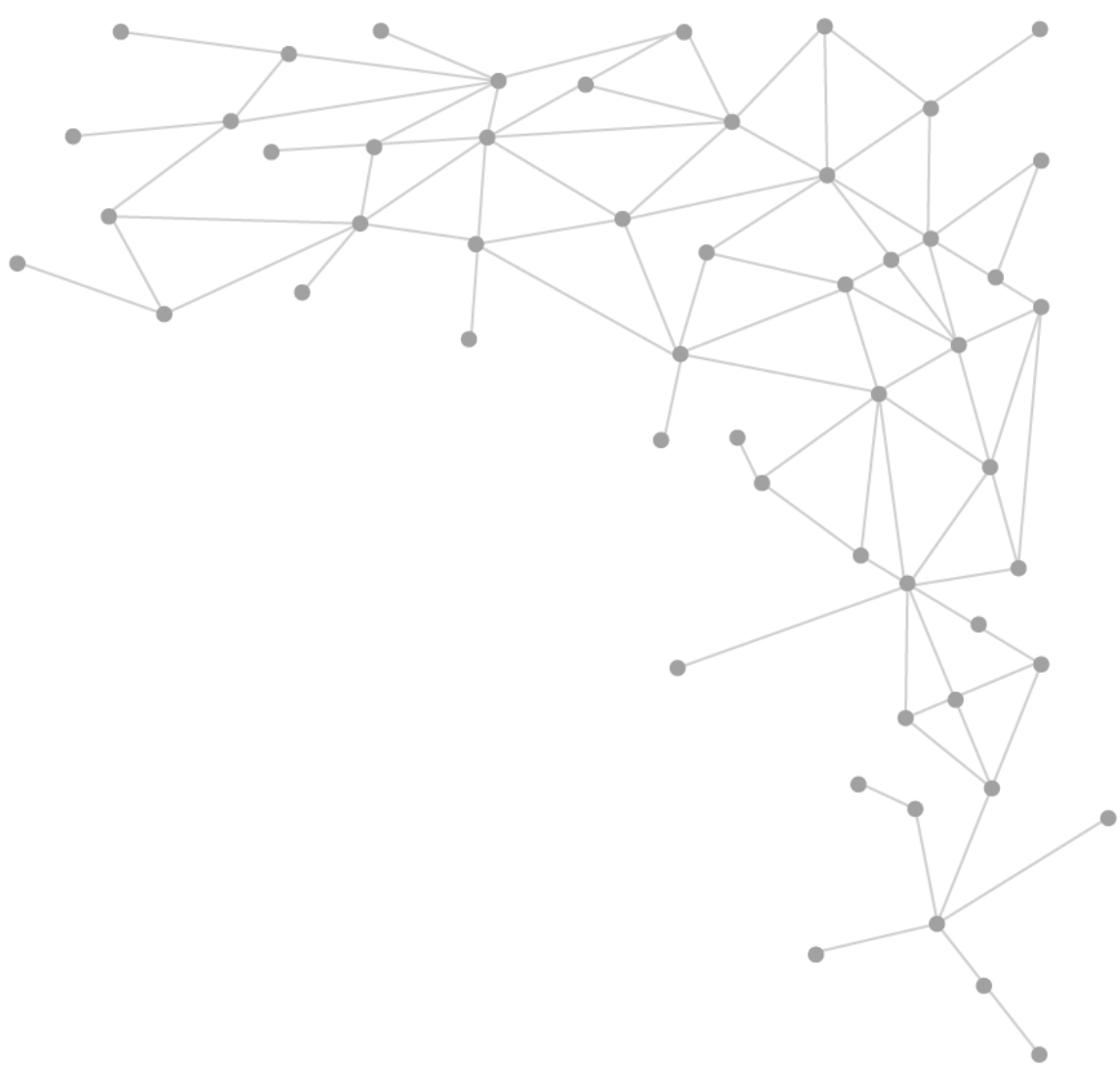
apresenta, como por exemplo, o *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), o qual é um dos microrganismos envolvidos nos casos de peri implantite (Flanagan *et al.*, 2017), que apresenta fácil capacidade de cultivo e sabe sobre muito sobre as características desta bactéria.

O *E. faecalis* é uma bactéria Gram positiva, anaeróbio facultativo, libera metabólitos tóxicos, colonizadora do trato gastrointestinal, geniturinário e oral (Farrow *et al.*, 1983; Graham *et al.*, 2017), que nos últimos anos está associada à bacteremia, à sepse e à endocardite bacteriana (Molander *et al.*, 1998; Rocas *et al.*, 2004; Heidari *et al.*, 2017). É um microrganismo que consegue sobreviver à inanição prolongada e consegue sobreviver até um valor de pH de 11,5 (Fabricius *et al.*, 1982; Bystrom *et al.*, 1985). Ela é uma das espécies mais importantes nas infecções dentárias e colonizadora de canais radiculares necrosados em periodontite apical, podendo permanecer no alvéolo mesmo após a exodontia do remanescente radicular e levar ao insucesso da reabilitação com implantes (Rakic *et al.*, 2016; Flanagan, *et al.*, 2017). É considerada a causa primária da periodontite apical de dentes com canal radicular infectado e encontrado ao redor do canal radicular (Shen *et al.*, 2010).

Recentemente observou-se que *E. faecalis* colonizou implantes dentários causando a peri implantite (Rakic *et al.*, 2016). Este microrganismo é observado em dentes multirradiculares com lesões perirradiculares e a prevalência pode aproximar de 78%. (Molander *et al.*, 1998; Murad *et al.*, 2014) permanecendo no local após as exodontia com consequente instalação imediata de implantes dentários.

A escolha por parte de alguns experimentos com o uso de *E. faecalis* é uma bactéria de fácil cultivo laboratorial, de baixo custo de manutenção do seu crescimento e neste caso, por ser um microrganismo presente na microbiota oral.

Isto posto, esta pesquisa objetivou analisar o efeito do biofilme de *E. faecalis* na cinética de corrosão de liga de titânio comercialmente puro grau 4 (Ticp-G4) com superfície modificada por meio de ataque ácido e jateamento de zircônia.



Proposição

2 PROPOSIÇÃO

Este trabalho avaliou, *in vitro*, a adesão de biofilme bacteriano de *E. faecalis* em diferentes superfícies de ligas de Ti-cp-G4 (lisa/usinada, texturizada por meio de duplo ataque ácido e texturizada por duplo ataque ácido seguido de jateamento com zircônia) e com aplicação de ensaio eletroquímico após formação de biofilme de 7 dias sobre as superfícies.

Nesse sentido, algumas hipóteses foram levantadas:

H1: haveria maior formação de biofilme na superfície do Ti com duplo ataque ácido;

H2: biofilme diminuiria a resistência do Ti à corrosão;

H3: a cinética de corrosão seria semelhante nas superfícies avaliadas.



Materiais
e métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 57 discos de Ticp-G4 nas dimensões de 8 mm de diâmetro e 2 mm de espessura fornecidos pela empresa DSP Biomedical® (Campo Largo, Paraná, Brasil), os quais passaram pelo processo de metalografia, conforme descrito a seguir.

3.1 PREPARAÇÃO DOS ESPÉCIMES

Inicialmente, todos os discos foram incluídos em resina acrílica autopolimerizável incolor, (JET®, Artigos Odontológicos Clássico, Campo Limpo Paulista, São Paulo, Brasil) polidos e limpos através de métodos padronizados de metalografia (Barao *et al.*, 2011; Faverani, Barao, Ramalho-Ferreira, *et al.*, 2014) por meio de polimento em sequência de lixas de gramatura #320, #400, #600 e #800 (Carbimet 2, Buehler, Lake Bluff, IL, USA) em polidora automática (ECOMET 250PRO/AUTOMET 250, Buehler).

Os discos foram lavados em água deionizada e propanol 70% e depois, permaneceram por 10 minutos em cuba ultrassônica para remoção de partículas metálicas desagregadas e ainda aderida ao espécime (Lavadora ultrassônica THORTON, modelo USC 2850, Tecnal Equipamentos para Laboratório Ltda, Piracicaba SP, Brasil). Após a lavagem, os discos foram secos por meio de ar quente a 45°C.

Após o processo de metalografia, os discos de Ticp foram removidos da resina acrílica com uso de broca minicut (Wilcos, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil) acoplada em peça reta e novamente lavados e secos, conforme citado acima, a fim de remover partículas de resina acrílica oriundas do embutimento. Depois os divididos aleatoriamente em três grupos (n=19) de acordo com a superfície a ser avaliada: Superfície usinada (Grupo I – USI) que representou o grupo controle; Texturização por ataque/condicionamento ácido (Grupo II – D.A.) (ácido nítrico, sulfúrico e hidrocloreídrico) e Texturização por jateamento de partículas de zircônia seguido de ataque/condicionamento ácido (Grupo III – D.A.Zir) (jateamento de partículas de zircônia seguido de ácido nítrico, sulfúrico e hidrocloreídrico), de acordo com os padrões estabelecidos pela empresa do setor de Implantodontia responsável pelos tratamentos de superfícies.

Por meio de microscopia de força atômica (Flex AFM – Nano Surf), um espécime representativo de cada superfície modificada teve sua área real mensurada a fim de permitir a mensuração ao realizar o ensaio eletroquímico e observar alterações sobre a topografia dos espécimes antes e após os testes. O grupo USI apresentou área real de 0,5024 cm², o DA 0,5343 cm² e D.A.Zir 0,683 cm².

Para ensaio de adesão de biofilme foram destinados 9 espécimes de cada grupo, os quais foram avaliados a contagem de célula bacteriana em UFC/mL. Enquanto que para o ensaio eletroquímico, 10 espécimes de cada grupo foram utilizados, sendo 5 imersos em meio de infusão cérebro-coração [Brain Heart Infusion (BHI)] (sem crescimento microbiano para a formação de biofilme sobre os discos) representando o controle e os outros 5 espécimes após passar pelo período de 7 dias de incubação para adesão de biofilme de *E. faecalis*, a fim de avaliar o impacto causado pelo biofilme durante este período nas diferentes superfícies do titânio (Ti).

3.2 CEPAS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Todos os discos foram submetidos à esterilização química por óxido de etileno. Utilizou-se a espécie bacteriana *E. faecalis* (ATCC 29212) para formação do biofilme nos espécimes. Para a reativação da cepa bacteriana, 100 µL da cultura previamente congelada a -70° C em BHI contendo 25% de glicerol, foi semeada em placas contendo meio m-*Enterococcus* Ágar (Difco Laboratories®, São Paulo, São Paulo, Brasil) e incubadas em condições de anaerobiose em estufa de anaerobiose 5% de CO₂ a 37°C por 24h. Após o crescimento bacteriano, estas colônias foram cultivadas em meio BHI caldo a 37° C durante 24h, diluída em 5mL de BHI caldo sem suplementação (1:20) e mantidas em anaerobiose em estufa bacteriológica (5% de CO₂ a 37°C) a fim de obter a curva de crescimento do microrganismo determinada pelos valores de Densidade Óptica (DO). Após atingir a fase log de crescimento (fase de maior multiplicação celular), sendo ela de 0.5, a cultura foi ajustada por meio de diluição em BHI caldo até a quantidade de 1.5 x 10⁵ células/mL (Gao, *et al.*, 2016).

Os espécimes estéreis foram posicionados no fundo de placas de microtitulação de 24 poços e foram colocados em contato com 1mL da cultura de *E. faecalis*. Suspensões bacterianas e meio de cultura BHI estéril foram incubadas em poços vazios distintos para controle positivo e negativo, respectivamente. As placas foram incubadas por 168 horas (7 dias) a 37°C em estufa de anaerobiose. A cada 2 dias 0,5 mL de cada poço com a suspensão bacteriana do experimento foi removida e foram acrescentados 0,5 mL de meio de cultura BHI para evitar a saturação do meio, mantendo as bactérias em condições viáveis, a fim de permitir a formação do biofilme sobre as superfícies dos espécimes.

Importante ressaltar que, nesta primeira etapa do projeto, os espécimes e todos os demais materiais a serem utilizados no experimento foram esterilizados a fim de evitar contaminação do experimento e isolamento de *E. faecalis*. Todo o experimento foi

conduzido em câmara de fluxo laminar com seu interior previamente descontaminado com álcool 70%, os materiais previamente esterilizados e luz ultra violeta do fluxo mantida por 15 minutos a fim de manter o ambiente estéril.

Após o período de 7 dias, as células não aderidas foram removidas dos discos por meio de lavagem com 1mL de solução salina estéril, a fim de que bactérias não aderidas se desprendessem (Andreotti *et al.*, 2018). Em seguida, os discos foram inseridos em tubos tipo Falcon contendo 1mL de solução salina. Os tubos foram levados para ultrassom (USC 700; UNIQUE Ultrasonic Cleaner, São Paulo, SP) a 50 kHz, 150W, durante 10min, e ao agitador de tubos do tipo Vórtex (Vórtex Biomixer QL – 901, Curitiba, PR, Brasil) por 30 segundos para promover o desprendimento das células aderidas e obtenção da suspensão do biofilme.

De cada tubo Falcon com a solução salina que passou pelo desprendimento das células aderidas, coletou-se 10 microlitros (μL) da solução, transferiu-se para a solução salina em um microtubo com 90 μL dessa solução, seguido por 7 diluições seriadas da solução coletada. Plaqueou-se cada diluição, duas gotas de 25 μL de cada microtubo em placa de petri com meio de cultura BHI ágar.

Em seguida, as diluições foram plaqueadas, em triplicata, em placas de meio de cultura *BHI* Agar (Difco) e mantidas a 37° C em condições de anaerobiose por 24 horas. As colônias observadas nas placas foram contadas em contador manual de colônias e obtido o número de UFC/mL para cada amostra de biofilme (Madigan, *et al.*, 2004).

3.3 ENSAIO ELETROQUÍMICO

Para o ensaio eletroquímico foram usados 10 espécimes de cada grupo, sendo 5 espécimes estéril e o eletrólito BHI estéril e outros 5 espécimes que ficaram em contato com biofilme de *E. faecalis* durante 7 dias (como descrito no item 3.2). Para este último, o eletrólito utilizado foi a cultura de BHI e *E. faecalis* na quantidade de 1.5×10^5 células/mL, ou seja, sem o caldo com as bactérias do biofilme formado aos 7 dias.

Foi realizado o teste eletroquímico nos espécimes seguindo protocolo previamente descrito na literatura (Barao *et al.*, 2011; 2012). Todas as mensurações foram realizadas em um método padronizado de três células de eletrodo de acordo com as instruções da Sociedade Americana para Testes de Materiais (American Society for Testing of Materials (ASTM) (G61 e G31-72) (Barao *et al.*, 2011). Um eletrodo saturado de cloreto de mercúrio (SCE) foi utilizado como eletrodo de referência, um bastão de grafite como contra-eletrodo (auxiliar) e as superfícies expostas dos discos de Ti dos espécimes como

eletrodo de trabalho. Um potenciostato (Series G 750 Potentiostat/Galvanostat/ZRA, Gamry Instruments, Warminster, PA, EUA) ligado a um microcomputador foi utilizado para realizar as mensurações de corrosão. Foi utilizado como eletrólito controle 10 mL de meio de cultura BHI estéril e como eletrólito teste 10mL de meio de cultura BHI e *E. faecalis* (1.5×10^5 células/mL) após 7 dias de incubação para crescimento e formação do biofilme sobre os espécimes.

O eletrólito de solução microbiana permitiu apenas que houvesse bactérias ativas em interação com o biofilme da superfície do discos de Ticp-Gr4 estavam em condições de temperatura próximas à cavidade bucal (37°C).

Inicialmente, os discos de Ticp-Gr4 foram submetidos a um potencial catódico (-0,9 V vs SCE) a fim de garantir uma padronização da camada de óxido na superfície dos mesmos. Vale ressaltar que o potencial catódico de 1,8 V vs SCE por 24 horas pode causar uma erradicação de bactérias planctônicas e associadas a biofilme abaixo dos níveis detectáveis (Canty *et al.*, 2019). O potencial catódico de 1,5 V vs SCE por 4 horas não causa erradicação de bactérias planctônicas e associadas ao biofilme (Canty *et al.*, 2017). Tão logo durante todo o monitoramento do circuito e durante a formação da camada eletroquímica de óxido o potencial catódico de 0,9 V vs SCE não afetou viabilidade celular. O potencial de circuito aberto (OCP – Open Circuit Potential) foi monitorado por um período de 3600 segundos para avaliar o potencial do material perante a solução e estabilizar o sistema.

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foi usada para investigar a formação eletroquímica da camada de óxido na superfície do Ti e as propriedades dessa camada (cinética de corrosão). Por meio da EIE, o processo eletroquímico pode ser representado por um circuito elétrico equivalente e as propriedades do filme de óxido (capacitância e resistência) foram quantificadas para determinar o processo de corrosão. As mensurações da EIE foram efetuadas na frequência de 100 KHz a 5 mHz, com a curva AC numa amplitude de 10 mV aplicada ao eletrodo no seu potencial de corrosão (Barao *et al.*, 2011; Mathew *et al.*, 2012). Esses valores foram usados para determinar os componentes real (Z') e imaginário (Z'') da impedância no foram plotados no plote de Bode ou impedância total ($|Z|$) e ângulo de fase. Finalmente, os espécimes foram polarizados anodicamente de -0,8 V a 1,8 V a uma taxa de varredura de 2 mV/s.

Os parâmetros de corrosão foram obtidos por meio das curvas de polarização potenciodinâmica. O método de Tafel foi usado para investigar a taxa de corrosão (densidade de corrente de corrosão - I_{corr}) e o potencial de corrosão (E_{corr}) do Ticp. A

corrente de densidade de passivação (I_{pass}) corresponderá ao valor da corrente na transição entre a região ativa e passiva expressas na curva de polarização do Ticp. Os resultados da EIE foram usados para modelar o processo de corrosão e entender as propriedades do filme de óxido formado na superfície dos discos de Ti, usando o circuito elétrico mais apropriado. Para simulação dos dados da EIE (capacitância da camada de óxido (dupla camada) e resistência de polarização - R_p), foi utilizado o software Gamry Echem Analyst (Gamry Instruments, Warminster, P.A., EUA).

3.4 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

Uma amostra dos espécimes de cada grupo foi analisada em microscópio de força atômica ($n=1$) (AFM; Veeco Metrology Inc., Santa Barbara, CA, EUA), antes (*Baseline* e Biofilme) e após o ensaio de corrosão (*Baseline* e Biofilme). A microscopia de força atômica (MFA) usou para fornecer a área de cada espécime, consoante mencionado no item 3.1., informando a área real (considerando os picos e vales) capturada pela alteração da superfície dos espécimes. As imagens foram transportadas do microscópio para um computador e no programa Nanoscope Analysis (2004 Veeco Instruments Inc., Santa Barbara, CA, EUA), as imagens passaram inicialmente pelos filtros “*lowpass*” e “*medium*”. Em seguida, as imagens em três dimensões (3D) foram obtidas, sendo padronizada a escala do eixo z com o intuito de possibilitar uma análise comparativa visual entre os grupos.

3.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA (EED)

Os discos de Ticp-Gr4 de um de cada grupos para cada período de teste (entregue pela empresa, após crescimento microbiano e após ensaio eletroquímico) foram analisados em MEV (Jeol, modelo JSM-7401F, Oregon, EUA) para caracterização das possíveis irregularidades presentes em suas superfícies. Foram realizadas comparações das imagens obtidas entre as diferentes superfícies de Ti, por meio da análise pré e pós-corrosão (*Baseline* e Biofilme).

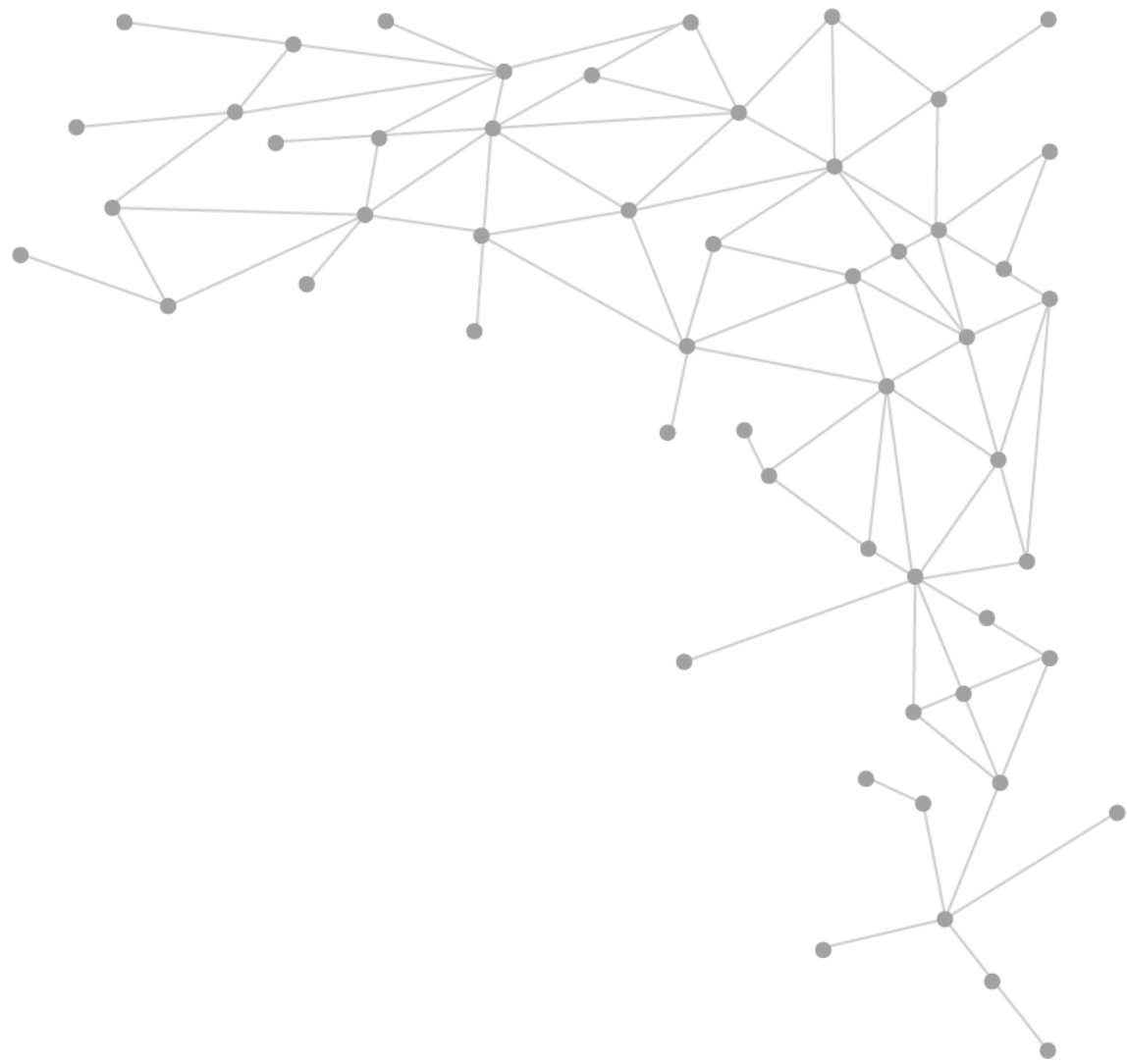
Além disso, foram realizadas análises químicas elementares em volumes pequenos, da ordem de $1 \mu\text{m}^3$ (micrômetro cúbico), por meio da técnica de EED prévia e posteriormente ao teste de corrosão (períodos *Baseline* e Biofilme).

3.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Para as análises dos resultados foram usados o programa estatístico GraphPad Prism 7.

Para o teste estatístico do ensaio microbiológico foi adotada ANOVA e aplicado pós-teste de Tukey considerando nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Para o ensaio eletroquímico foi aplicado o teste ANOVA 2 fatores (superfície e eletrólito). Cada parâmetro dos dados de corrosão (E_{corr} , I_{corr} , I_{pass} , Cdl e R_p) foram submetidos ao teste estatístico não paramétrico de Shapiro – Wilk e pós-teste de Tukey para comparações múltiplas ($p < 0,05$).



Resultados

4 RESULTADOS

4.1 MICROBIOLÓGICO

No que diz respeito à análise de UFC/mL, o grupo D.A.Zir apresentou a maior média UFC/mL ($34 \text{ UFC/ml} \times 10^5$), apresentando diferença estatística significativa quando comparado ao grupo USI ($p=0,034$). Entretanto, quando comparado ao grupo D.A, este não apresentou diferença estatística significativa ($p=0,393$) ainda que seu valor médio de UFC/mL tenha sido superior ($24 \text{ UFC/ml} \times 10^5$) (Figura 1).

Observa-se ainda que o grupo USI teve menor quantidade de biofilme formado ($16 \text{ UFC/mL} \times 10^5$) na superfície quando comparado aos demais grupos (D.A.Zir = $34 \text{ UFC/ml} \times 10^5$; D.A. = $24 \text{ UFC/ml} \times 10^5$). Porém, não houve diferença estatística significativa quando comparado ao grupo D.A. ($p=0,416$).

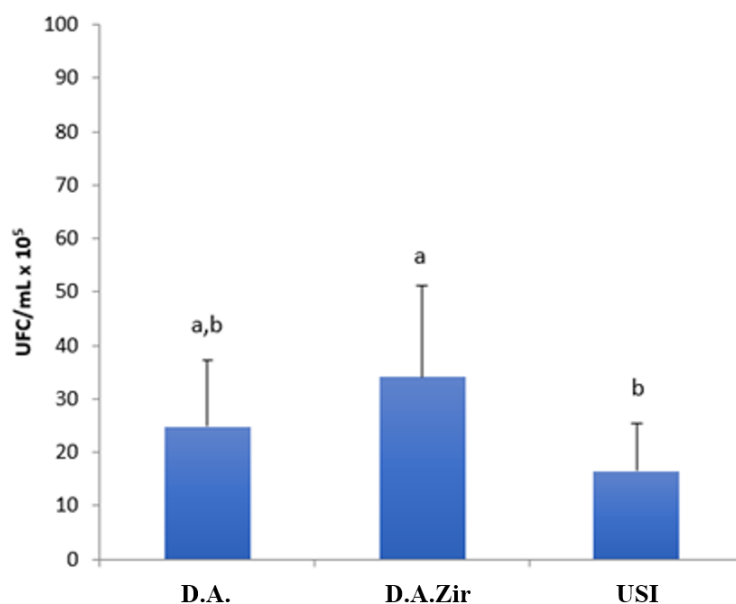


Figura 01 – Gráfico comparativo entre os grupos D.A., D.A.Zir e USI considerando a média de UFC/ml x 10^5 , segundo os testes de ANOVA e Tukey ($p<0.05$), onde letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística.

4.2 ENSAIO ELETROQUÍMICO

4.2.1 Potencial de Circuito Aberto (OCP)

A evolução do OCP em função do tempo está descrita na figura 2. Em relação às diferentes superfícies na análise intragrupo para o eletrólito (BHI), não houve diferença estatística ($p>0.05$) entre as superfícies teste (D.A. e D.A.Zir) e controle (USI) e nem

entre todas as superfícies avaliadas. Da mesma forma, na análise intragrupo para o eletrólito Biofilme, também não é possível observar diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre as superfícies teste e controle e nem entre as três superfícies avaliadas, porém, apresentando maiores valores de OCP para o grupo D.A. (BHI).

Na análise em função do eletrólito, também foi observado que não houve diferença estatística entre os grupos ($p = 0,3681$). O grupo D.A. em BHI apresentou os maiores valores para OCP, sendo seguido pelos grupos D.A.Zir em Biofilme, USI em Biofilme, USI em BHI, D.A.Zir em BHI e D.A. em Biofilme. Na avaliação intra grupo, todos apresentaram valores de p maior que 0,05.

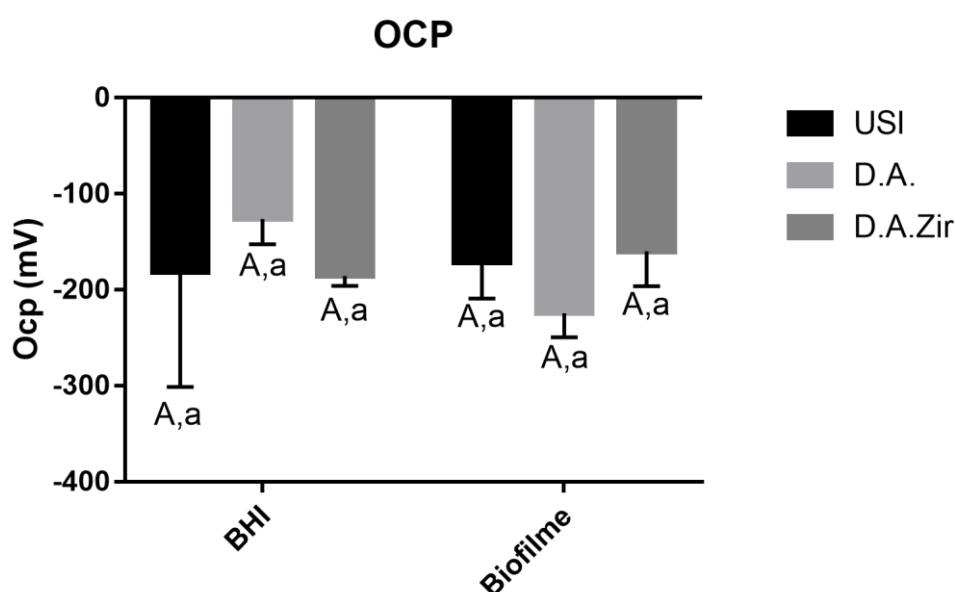


Figura 02: Representação gráfica das médias e desvio padrão dos valores de OCP para os grupos USI (BHI), USI (Biofilme), D.A. (BHI), D.A. (Biofilme), D.A.Zir (BHI) e D.A.Zir (Biofilme). Letras maiúsculas iguais mostram semelhança estatística entre as superfícies. Letras minúsculas iguais evidenciam semelhança estatísticas, considerando o eletrólito entre os grupos para BHI e Biofilme.

No diagrama de OCP (Figura 03), pode constatar resultado semelhante ao que foi apresentado na figura 02. O grupo D.A.Zir em Biofilme mostrou maior valor positivo, ou seja, possui o melhor potencial eletroquímico, isto é, há uma recuperação maior de potencial em um menor tempo. Segue-se pelo D.A. BHI e D.A.Zir BHI. Os altos valores apresentados para D.A.Zir Biofilme e D.A. BHI indicam os melhores comportamentos para resistir aos eventos corrosivos.

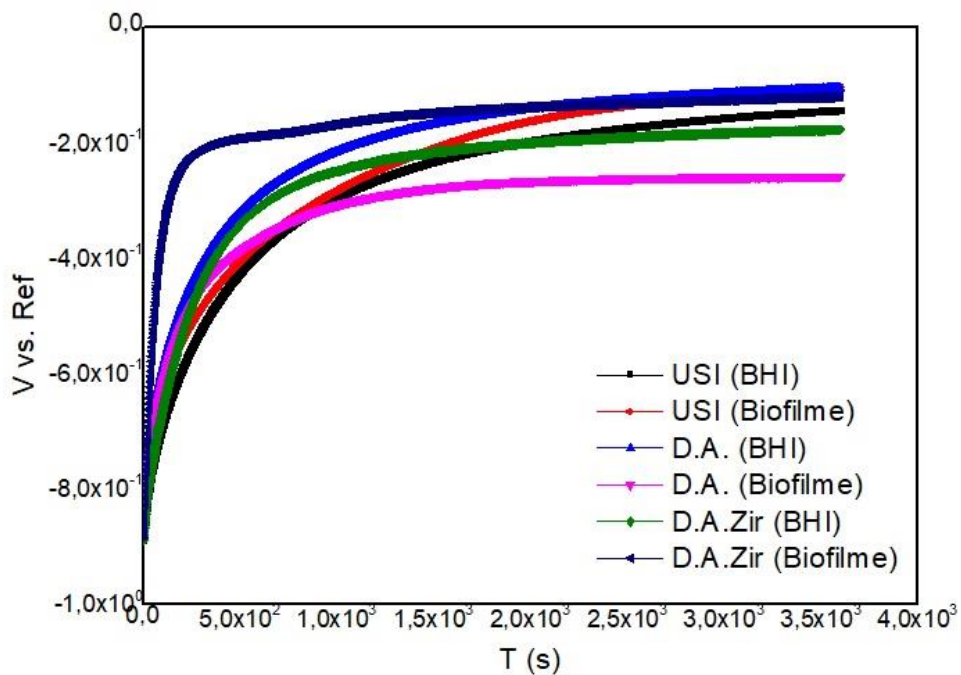


Figura 03: Diagrama dos valores do OCP para as superfícies testadas: USI (BHI e Biofilme), D.A. (BHI e Biofilme) e D.A.Zir (BHI e Biofilme).

4.2.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

Na apresentação dos dados da Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) (Figura 04), o diagrama de Nyquist (componente real – $|Z|_{\text{real}}$ da impedância *versus* componente imaginário – $|Z|_{\text{img}}$ da impedância) visualiza-se que o USI (BHI) teve o maior diâmetro semicircular do looping da capacitância, seguido por USI (Biofilme) e D.A. (Biofilme).

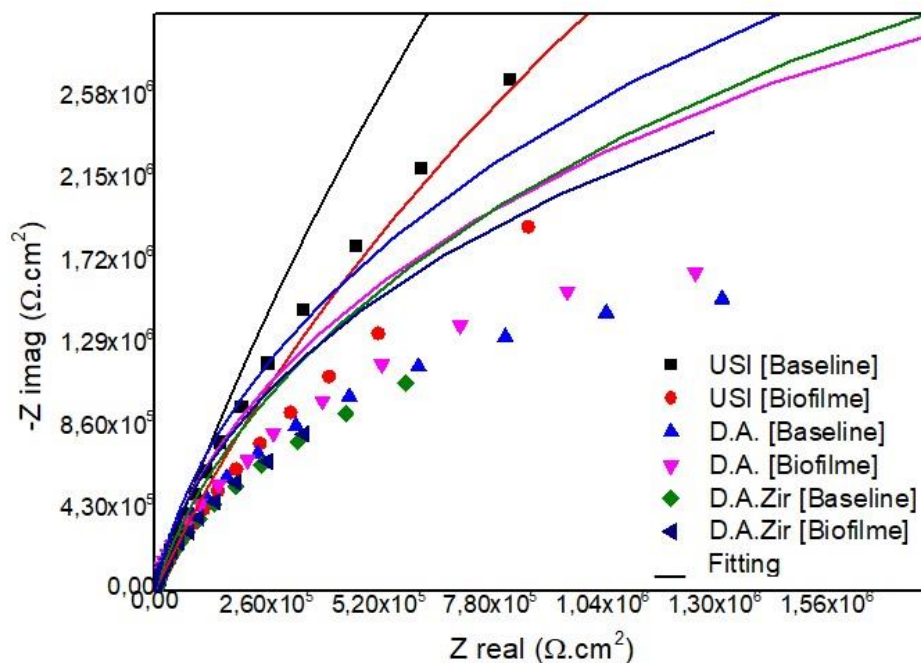


Figura 04: Diagrama dos valores do Nyquist das superfícies testadas: USI (BHI e Biofilme), D.A. (BHI e Biofilme) e D.A.Zir (BHI e Biofilme).

No diagrama de Bode (Figura 05) é possível observar que em baixa frequência, apenas o grupo D.A.Zir (Biofilme) apresentou valor mais baixo para módulo de impedância, seguido pelo grupo D.A.Zir (BHI). Os grupos USI (BHI), D.A. (BHI) e USI (Biofilme) apresentaram valores mais alto, ou seja, mantiveram as frequências altas.

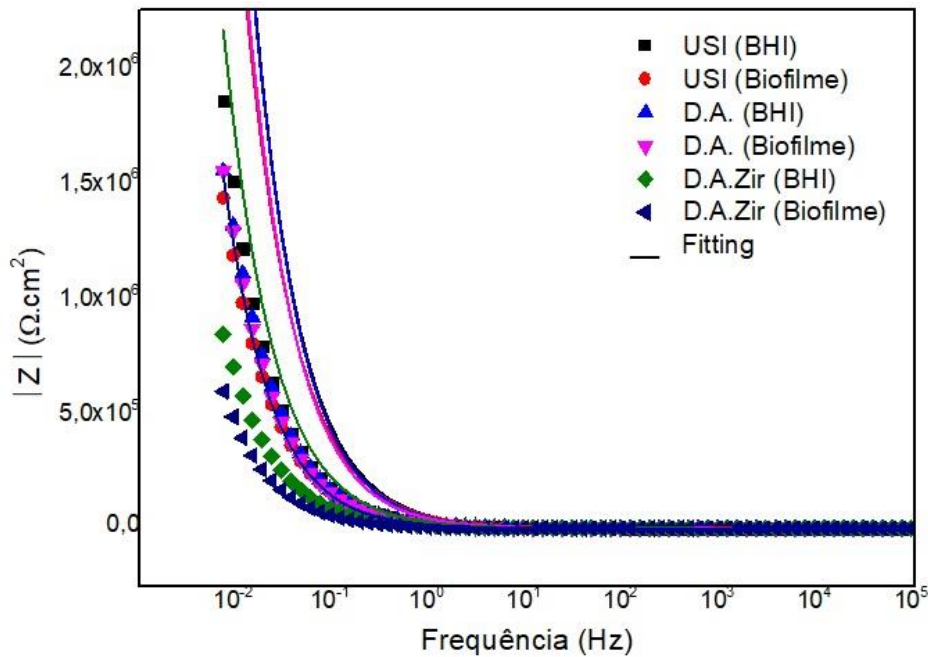


Figura 05: Módulo de impedância ($|Z|$) obtidos através do diagrama de Bode para os grupos USI (BHI e Biofilme), D.A. (BHI e Biofilme) e D.A.Zir (BHI e Biofilme).

Pela análise do diagrama da Figura 06, observa-se que o grupo D.A. (BHI), D.A. (Biofilme) e USI (BHI) apresentaram similaridade no ângulo de fase entre a frequência de 10^{-1} a 10^1 demonstrando as amplitudes similares. Os demais grupos mantiveram, considerando a amplitude do ângulo de fase, um comportamento próximo D.A.Zir (BHI), D.A.Zir (Biofilme) e USI (Biofilme).

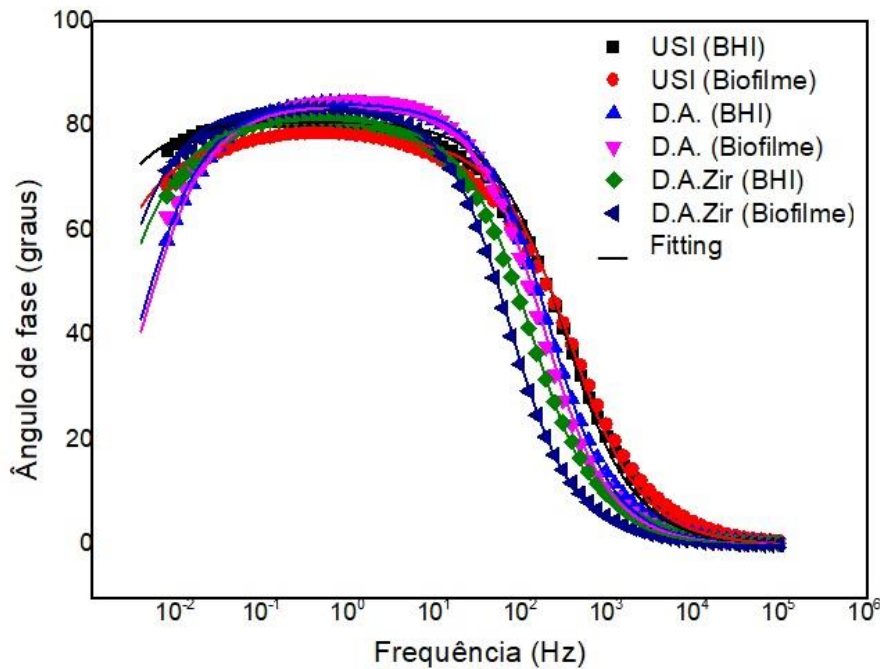


Figura 06: Ângulo de fase obtido através do diagrama de Bode para os grupos USI (BHI e Biofilme), D.A. (BHI e Biofilme) e D.A.Zir (BHI e Biofilme).

Resistência de polarização (Rp)

Os valores de Rp, em relação as diferentes superfícies na análise intragrupo para os eletrólitos BHI e Biofilme, bem como a interação entre estas superfícies e entre estes fatores, não apresentaram diferenças estatísticas ($p = 0.360$) (Figura 7). Ao nível de 5% de significância para o teste Tukey, considerando apenas o parâmetro eletrólito (BHI e Biofilme), houve diferença estatística entre: USI BHI vs D.A. Biofilme ($p = 0,0058$); USI BHI vs D.A.Biofilme ($p = 0,0041$); USI BHI vs D.A.Zir BHI ($p = 0,0077$).

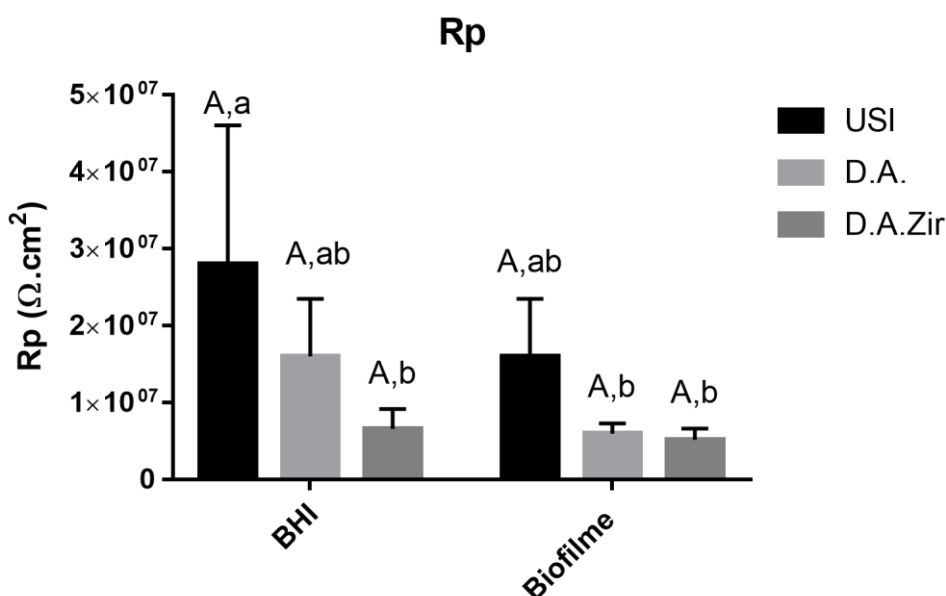


Figura 07: Representação gráfica das médias e desvios padrão dos valores de Rp para os grupos USI, D.A. e D.A.Zir em Biofilme e BHI. Letras maiúsculas iguais evidenciam semelhança estatística entre as superfícies. Letras minúsculas iguais mostram semelhança estatísticas considerando o eletrólito (BHI e Biofilme) entre os grupos.

Para os achados elétricos da superfície dos espécimes, o circuito equivalente para os ensaios elétricos utilizou se o circuito elétrico simples, composto por Rsol (resistência da solução), Rp (resistência da polarização) e CPE (Figura 8).

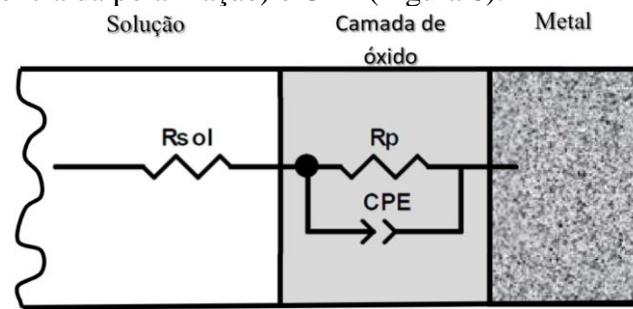


Figura 08. Circuito elétrico equivalente.

Constância de Elemento de Fase

Para CPE (Figura 09), não houve diferença significativa intra grupo para o fator eletrólito (BHI e Biofilme) e superfície $p = 0.1365$. Para o fator eletrólito houve diferença estatística para ANOVA dois fatores, mas no pós teste Tukey não houve diferença estatística entre os grupos ao nível de 5%. As superfícies não apresentaram diferença estatística para o teste ANOVA ($p = 0,1385$).

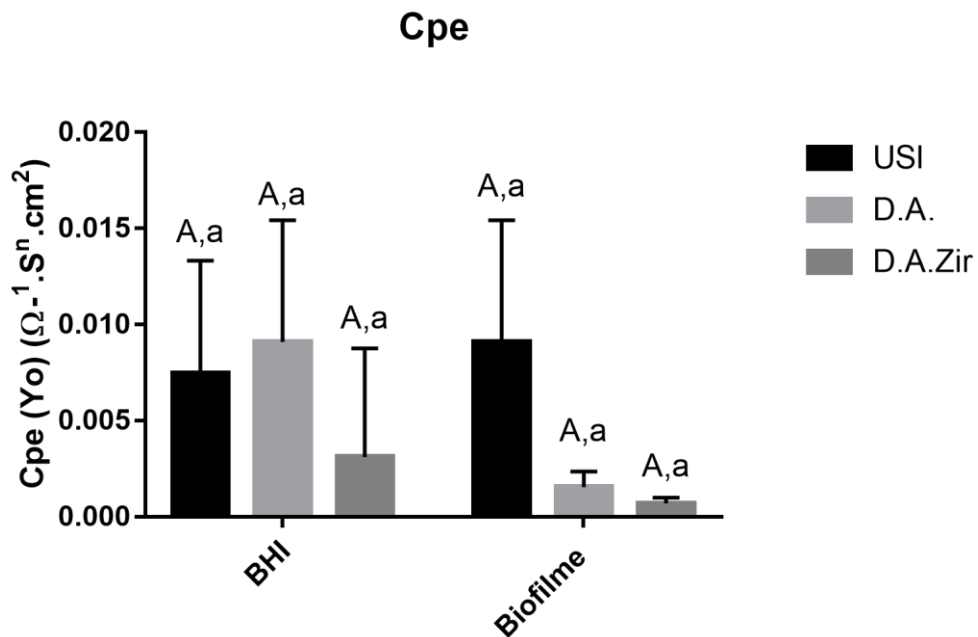


Figura 09: Gráfico com os valores de média e desvio padrão do Circuito de Polarização Elétrica (CPE com Difusão) para os grupos USI, D.A. e D.A.Zir em função dos eletrólitos (BHI e Biofilme). Letras maiúsculas, se diferentes, mostram a diferença estatística entre as superfícies. Letras minúsculas, se diferentes, mostram diferença estatísticas considerando o eletrólito entre os grupos para BHI e Biofilme.

4.2.3 Curva de Polarização Potenciodinâmica

Na representação dos resultados por meio da curva potenciodinâmica, todos os grupos apresentaram regiões de transição ativa-passiva (Figura 10).

De um modo geral, todos os grupos apresentaram constantes de passivação similares. Este, além de apresentar passivação tardia, não apresentou uma constante, em verdade apresentou uma curva na região de passivação, levando mais tempo para atingir o ponto de passividade.

Quanto a corrente de passivação, em ordem crescente em relação ao comportamento eletroquímico mais favorável, foram USI (BHI) > USI (Biofilme) > D.A. (BHI) = D.A. (Biofilme) > D.A. Zir (BHI) > D.A.Zir (Biofilme).

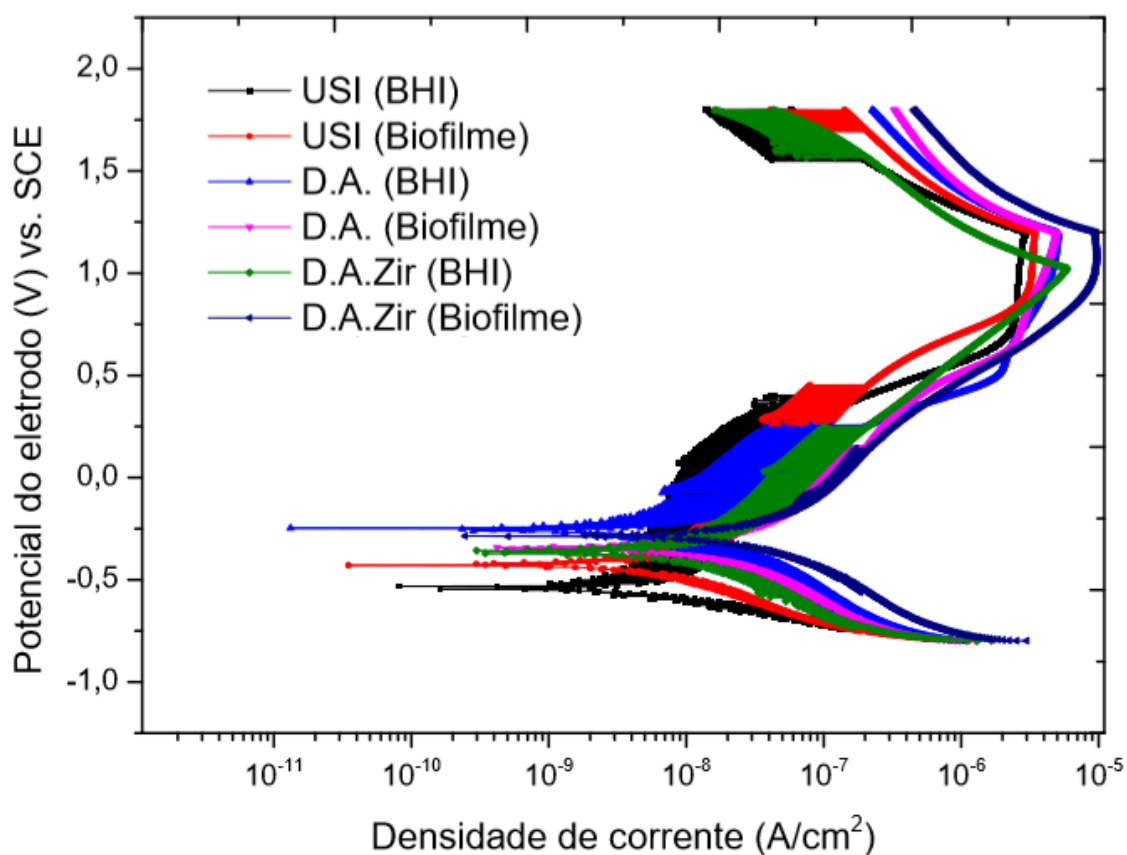


Figura 10: Curvas potenciodinâmicas dos grupos USI, D.A. e D.A.Zir em função dos eletrólitos (BHI e Biofilme).

4.2.1 Potencial de Corrosão (E_{corr})

Na análise estatística para E_{corr} não foi possível observar diferença significativa na interação de eletrólito com a superfície ($p = 0.3690$), nem na interação entre os eletrólitos (BHI e Biofilme) ($p = 0.2028$) e houve diferença para as superfícies ($p = 0.0019$). Para a superfície houve diferença estatística entre o grupo USI (Biofilme) vs D.A. (BHI) ($p = 0.0072$).

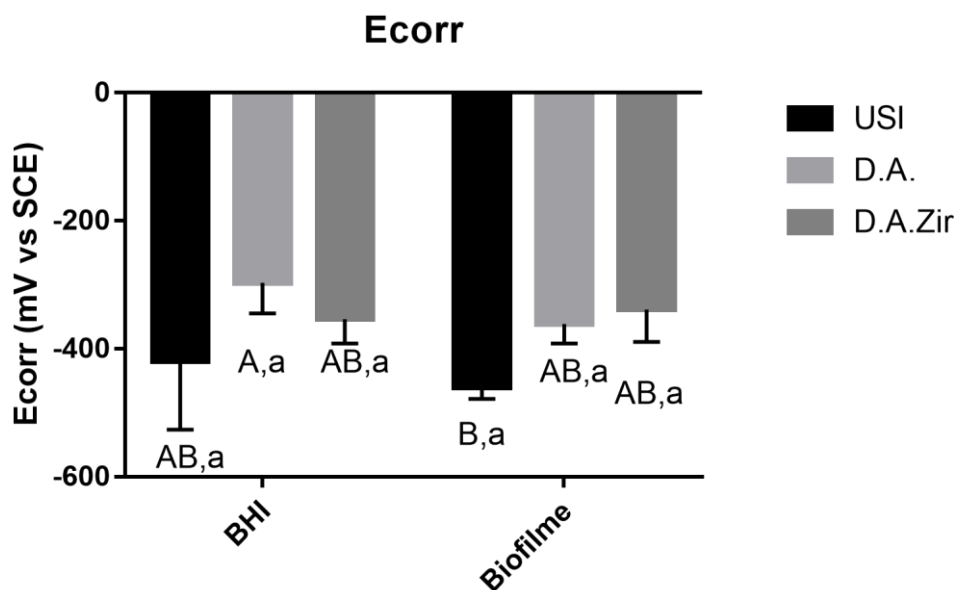


Figura 11: Representação gráfica das médias e desvios padrão dos valores de E_{corr} para os grupos USI, D.A. e D.A.Zir em função dos eletrólitos (BHI e Biofilme). Letras maiúsculas, se diferentes, mostram a diferença estatística entre as superfícies. Letras minúsculas, quando diferentes, mostram diferença estatísticas considerando o eletrólito (BHI e Biofilme) entre os grupos das superfícies.

4.2.2 Densidade de Corrente de Corrosão (I_{corr})

Para o I_{corr} , na análise entre os grupos considerando eletrólito e biofilme, não houve diferença estatística ($p = 0.2868$). Para análise inter grupos considerando o fator “eletrólito”, houve diferença entre os grupos, conforme se pode visualizar no Figura 12.

Na análise considerando o fator “superfície”, houve diferença estatística significativa no pós teste de Tukey ao nível de 5%, conforme se pode observar na Figura 12.

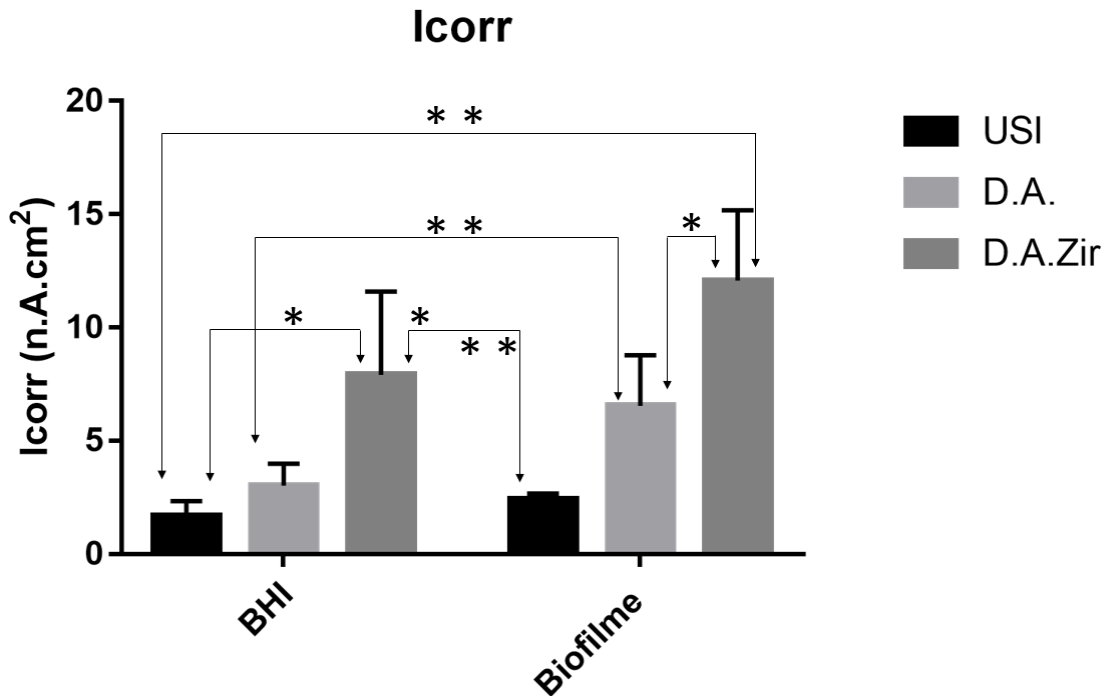


Figura 12: Representação gráfica das médias e desvios padrão dos valores de I_{corr} para os grupos de superfícies (USI, D.A. e D.A.Zir em função dos eletrólitos (BHI e Biofilme). Um único asterisco sobre a indicação dos espécimes corresponde ao fator eletrólito. Dois asteriscos sobre a indicação dos espécimes correspondem ao fator superfície.

4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA (EED)

A MEV foi realizada considerando um aumento de 3000x, os quais permitiram a visualização da superfície dos espécimes.

As imagens A, D e G da Figura 13, representam a superfície dos grupos USI, D.A. e D.A.Zir, no período inicial do estudo (Padrão), sem interferência do biofilme e/ou da corrosão. Observa-se que para o grupo USI, a superfície é lisa e com pequenas ranhuras que podem ter ocorrido durante o processo de metalografia (Figura 13A). No grupo D.A., nota-se a presença de superfície porosa devido ao processo de ataque ácido promovido nesta superfície, sendo este um processo de subtração, formando os poros na superfície (Figura 13D). Já no grupo D.A.Zir, a superfície mostra uma camada homogênea, como um amontoado de partículas, que sugerem ser as partículas de zircônia que recobriram os poros promovidos pelo ataque ácido (Figura 13D).

As Figuras 13B, E e H, são correspondentes ao período *BHI* para os grupos USI, DA e DAZir, respectivamente, após o ensaio eletroquímico. É possível observar que a superfície mais irregular quando comparado ao período inicial (figura 13A), permite

afirmar que haja deposição de microrganismos facilitada. Da mesma forma, as figuras 13E e H referente ao grupo DA e DAZir, mostram uma superfície com poros mais profundos e pontos mais claros, o que sugere ser precipitação de substâncias (cloro, fósforo, potássio, sódio, enxofre) em função do biofilme e pelo ensaio de corrosão.

De um modo geral, as figuras 13C, F e I para os grupos USI, DA e DAZir, respectivamente de biofilme no período de 7 dias após ensaio eletroquímico. Além disso, no grupo DA (figura 13F), não é possível observar de forma definida os poros formados pelo ataque ácido como na figura 13B. E no grupo DAZir (figura 13I), grande quantidade de biofilme parece ter se formado na superfície, sendo possível notar que neste grupo houve a maior quantidade e formação do que sugere ser matriz extracelular.

Pode se observar que a superfície da imagem [D] apresenta maior quantidade de irregularidades do que as outras superfícies [A – G] a qual permite que estas irregularidades permitam a adesão de grande quantidade de microrganismos, corroborando com os achados microbiológicos. Percebe-se que a imagem [E] teve uma ocupação das irregularidades da superfície com algumas alterações do local. A imagem [F] permite a visualização ainda menor das irregularidades superficial.

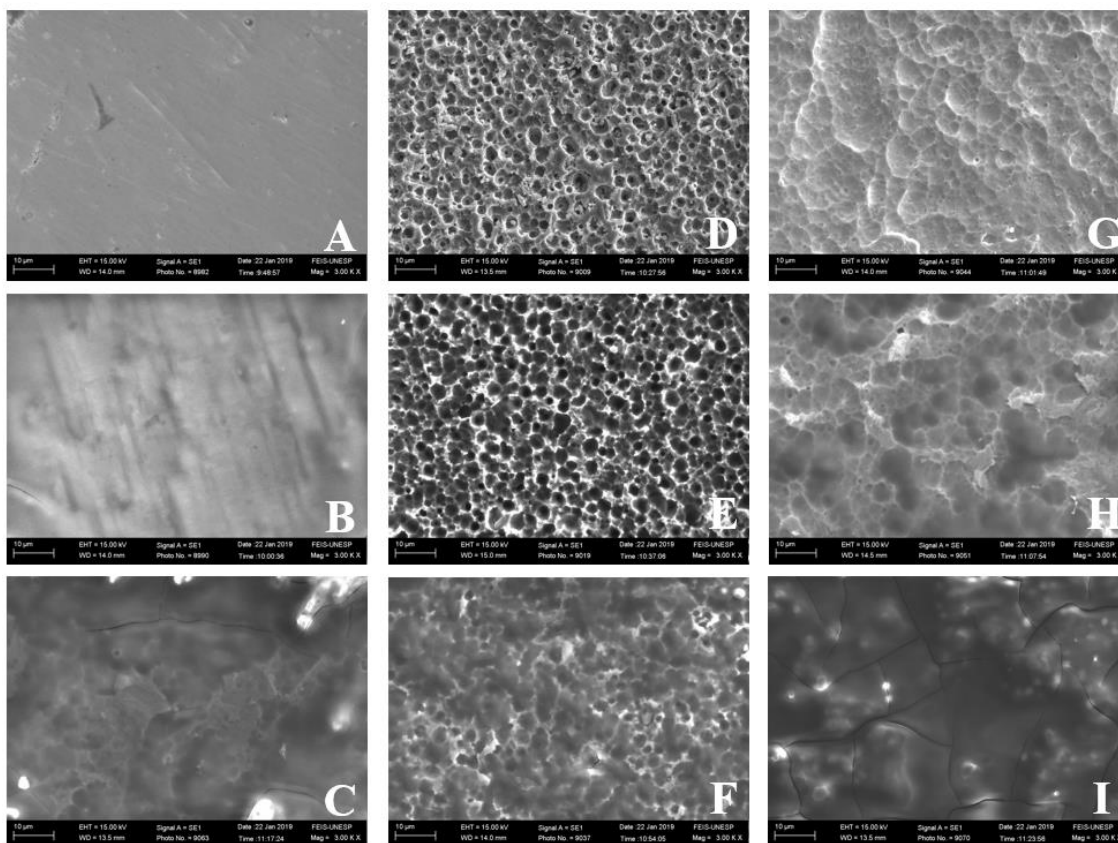


Figura 13 – Imagens obtidas por MEV 3000x sobre a superfície dos discos com as superfícies alteradas. [A] USI (Padrão) espécime usinado e submetido a metalografia, sem condicionamento da superfície; [B] USI (BHI) espécime em contato com BHI para o ensaio eletroquímico para esta superfície; [C] USI (Biofilme) espécime com a formação de biofilme após 7 dias após ensaio eletroquímico; [D] D.A.Zir (Padrão) espécime representativo deste tratamento de superfície, como recebido da empresa e sem ser testado; [E] D.A.Zir imerso em BHI para o ensaio eletroquímico para esta superfície; [F] D.A.Zir em Biofilme de 7 dias de crescimento microbiano após ensaio eletroquímico; [G] D.A (Padrão) espécime representativo deste tratamento de superfície, como recebido da empresa e sem ser testado; [H] D.A. imerso em BHI para o ensaio eletroquímico para esta superfície; [I] D.A. em Biofilme de 7 dias de crescimento microbiano após ensaio eletroquímico.

Pela espectroscopia de energia dispersiva (EED) analisou-se a química elementar em volume dos espécimes. Esta comparação da composição química das diferentes superfícies analisadas, prévia e posteriormente ao teste de corrosão, observou uma similaridade quanto aos tipos de elementos químicos encontrados nas superfícies, além do Ti, principal componente do material avaliado.

O grupo D.A.Zir (Biofilme) em relação ao D.A.Zir (BHI) observa pontos de Ti mais expressivo para o grupo controle (BHI), enquanto o D.A.Zir (Biofilme) apresenta picos com a presença de outras substâncias que sugerem ser oriundas do meio de cultura **BHI**.

De um modo geral, em todos os grupos em biofilme de 7 dias (USI, D.A. e D.A.Zir), houve precipitação de partículas de alguns elementos químicos sobre a superfície, tais como carbono (C), sódio (Na), fósforo (P), enxofre (S), cloro (Cl), potássio (K), provavelmente oriundos do meio de cultura BHI e metabólitos bacterianos liberados por *E.faecalis*.

Entre D.A.Zir (Biofilme) e D.A. (Biofilme), houve maior concentração de elementos químicos (Na, O e Cl) sobre a superfície do primeiro, evidenciada por picos elevados destes elementos químicos.

A presença do elemento enxofre representa produtos do metabolismo bacteriano estando localizado em alguns pontos em concentrações baixas.

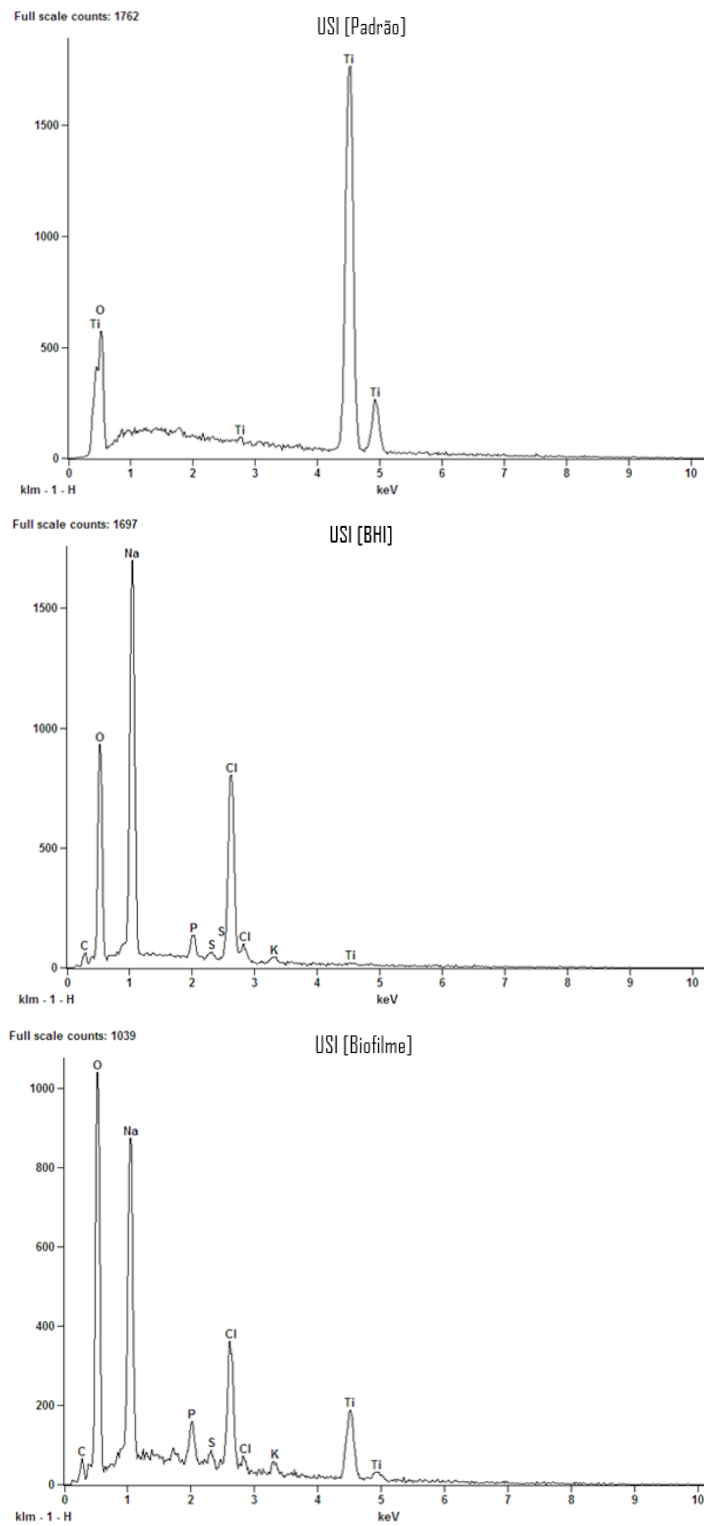


Figura 14 - Gráfico expando os dados da EED da superfície, USI (BHI) e USI (Biofilme).

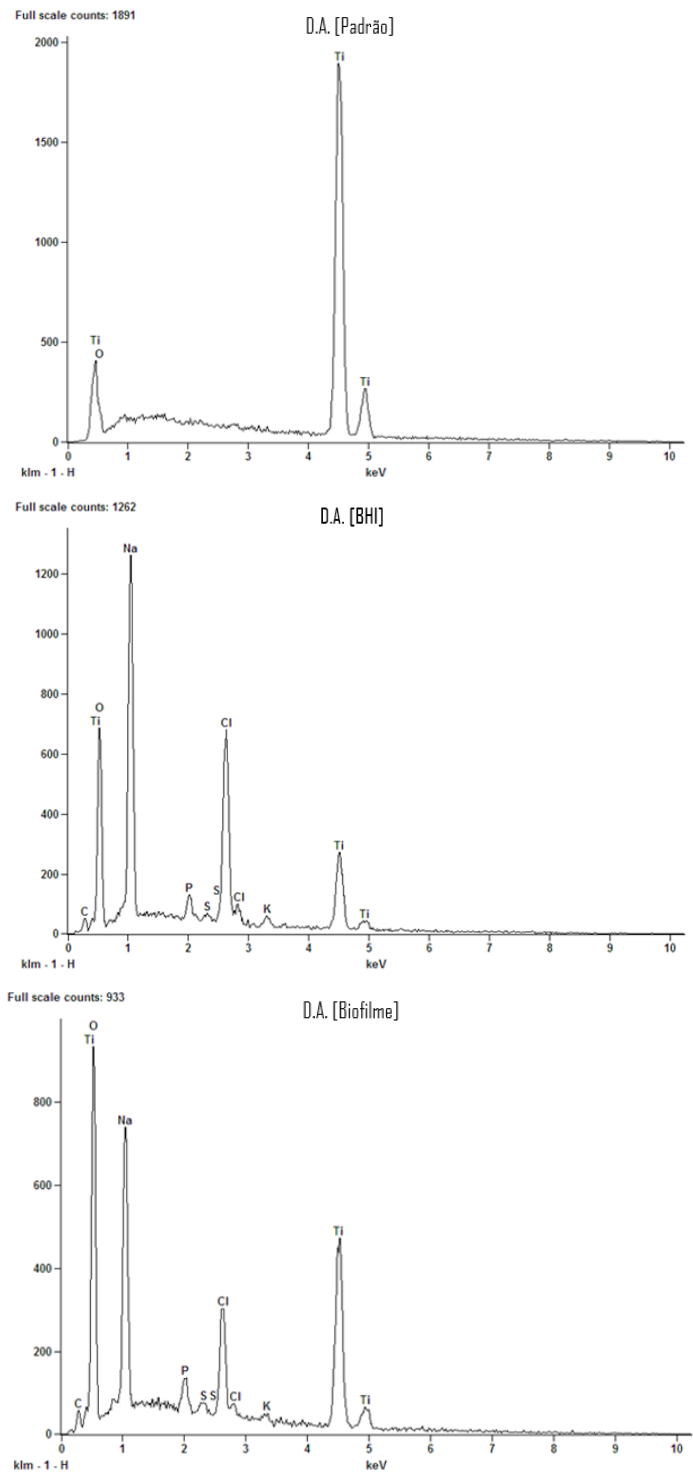


Figura 15 - Gráfico representativo dos dados da EED da superfície D.A., D.A. (BHI) e D.A. (Biofilme).

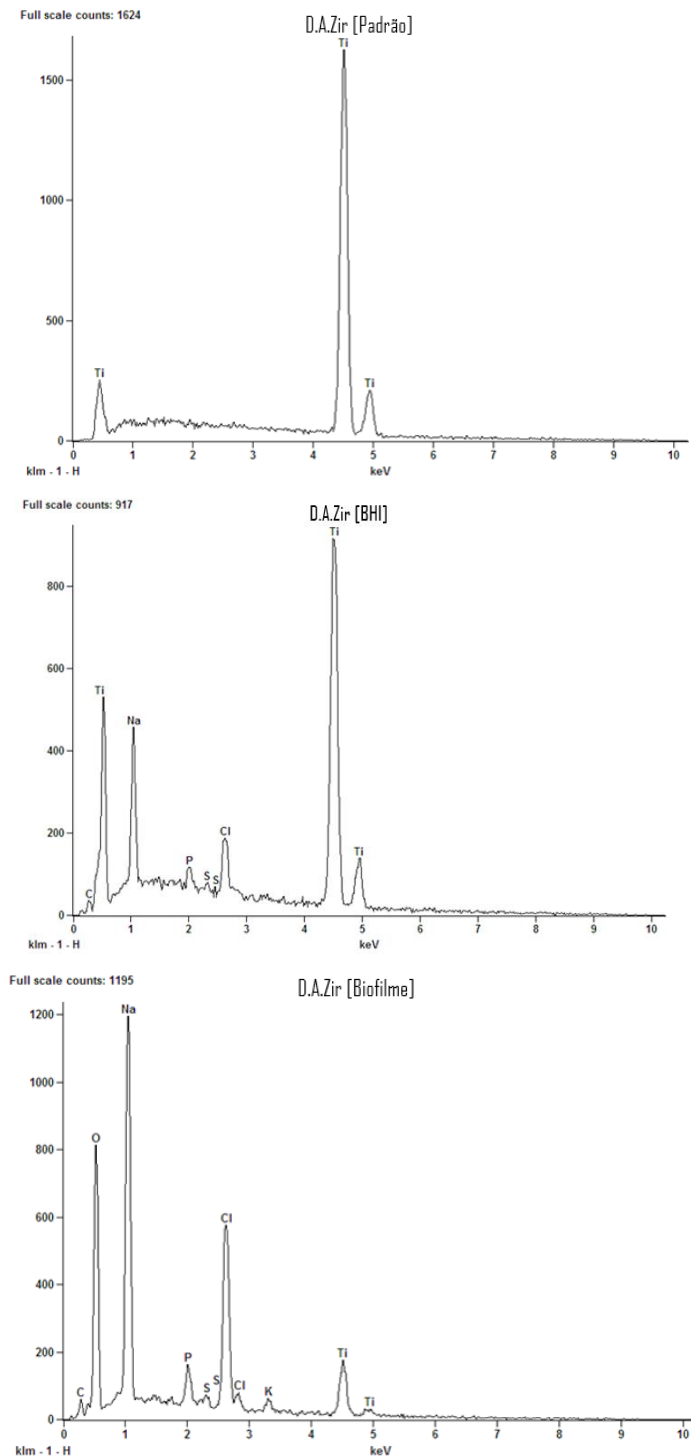


Figura 16 - Gráfico representativo dos dados da EED da superfície D.A.Zir (padrão), D.A.Zir (BHI) e D.A.Zir (Biofilme).

4.4 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA)

As Figuras 17, 18 e 19 representam as imagens em 3D obtidas na análise MFA (modelo Flex AFM – Nano Surf EasyScan 2 Flex), com leituras em modo de contato dos valores de rugosidade gerados após a varredura da área pré-determinada (área de varredura de $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$). De modo geral, observa-se que a superfície USI se

apresenta mais homogênea em relação as demais (D.A e D.A. Zir), independente do biofilme e ensaio eletroquímico. Entretanto, observa-se que houve uma maior diferença em altitude de uma superfície de 0,62 μm para 1.8 μm após o ensaio de corrosão na presença de *E. faecalis*. Já a superfície tratada por meio de D.A. apresenta picos e vales bem definidos, porém, com diminuição da altitude do espécime após o ensaio de corrosão e pelo contato com o biofilme (de 3.7 μm para 2.2 μm) por haver deposição de material orgânico e biológico sobre a superfície tornado a menos irregular e atenuando a altitude de picos e vales. O grupo D.A.Zir apresentou maiores quantidades de picos e vales em comparação as outras duas superfícies, confirmando para este grupo aquilo que já fora demonstrado na MEV, ou seja, grandes irregularidades da superfície, apresentando diminuição da rugosidade após o ensaio de corrosão de 4.1 μm para 2.3 μm devido a deposição dos compostos do caldo de BHI.

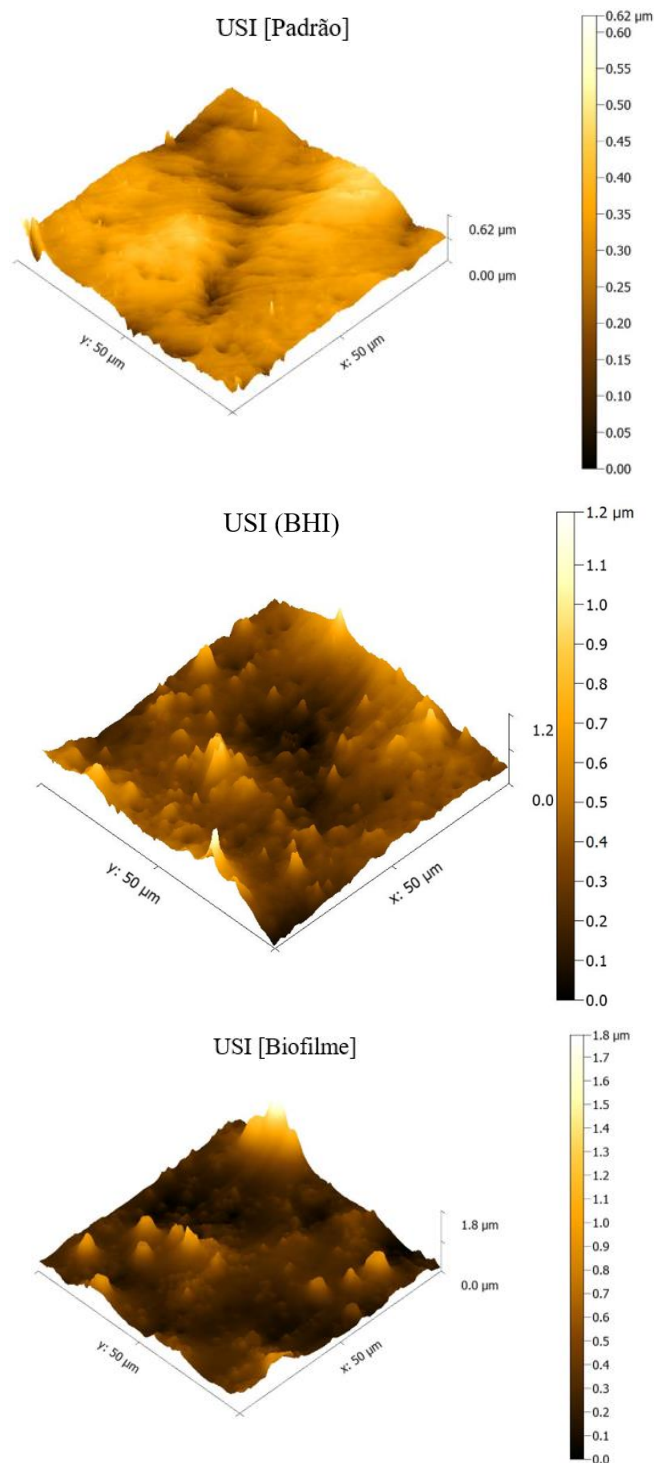


Figura 17 – Imagens obtido por MFA em área de 50 μm por 50 μm sobre a superfície dos discos Usinados (USI), representando o USI (Padrão) (disco recebido pelo fabricante para os ensaios), USI (BHI) (disco que passou pelo ensaio eletroquímico sem o crescimento de biofilme por 7 dias) e USI (Biofilme) (disco que passou pelo ensaio microbiológico para crescimento de biofilme de 7 dias e ensaio eletroquímico).

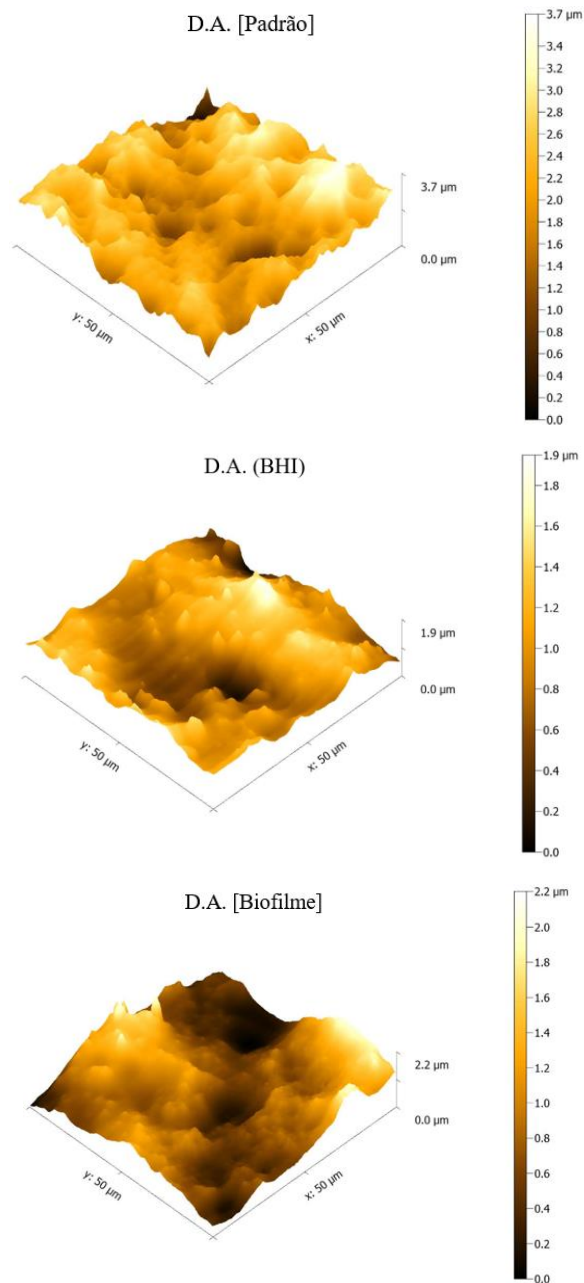


Figura 18 - Imagens obtido por MFA em área de 50 μm por 50 μm sobre a superfície dos discos Duplo Ataque Ácido (D.A.), representando o D.A. (Padrão) (disco recebido pelo fabricante para os ensaios), D.A. (BHI) (disco que passou pelo ensaio eletroquímico sem o crescimento de biofilme por 7 dias) e D.A. (Biofilme) (disco que passou pelo ensaio microbiológico para crescimento de biofilme durante 7 dias seguido do ensaio eletroquímico).

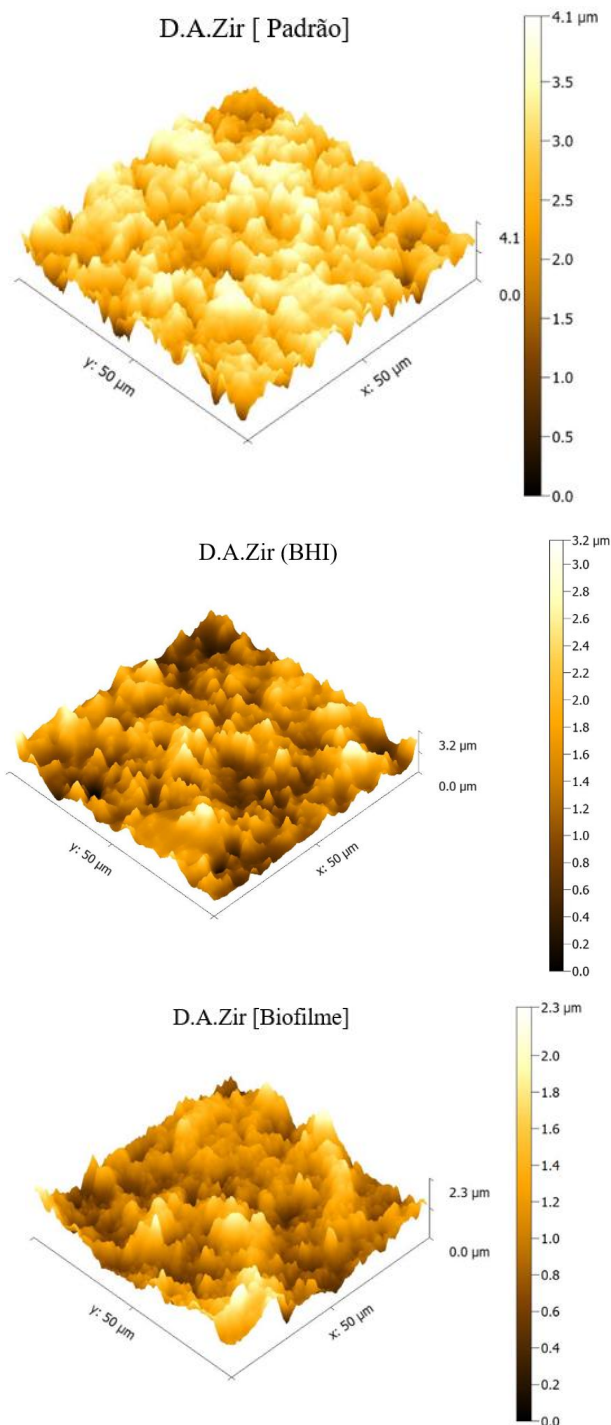


Figura 19 - Imagens obtido por MFA em área de 50 µm por 50 µm sobre a superfície dos discos Duplo Ataque Ácido e Jateamento de Zircônia (D.A.Zir), representando o D.A.Zir (Padrão) (disco recebido pelo fabricante para os ensaios), D.A.Zir (BHI) (disco que passou pelo ensaio eletroquímico sem o crescimento de biofilme por 7 dias) e D.A.Zir (Biofilme) (disco que passou pelo ensaio microbiológico para crescimento de biofilme durante 7 dias, seguido do ensaio eletroquímico).



Discussão

5 DISCUSSÃO

Dos resultados microbiológicos apresentados, observa-se que as modificações de superfície facilitaram a agregação bacteriana quando comparada à superfície usinada (Figura 01). No grupo D.A.Zir aderiu maior quantidade de bactérias por apresentar superfície mais irregular (Figura 18). Em superfície rugosa há uma facilidade de adesão bacteriana, especialmente no interior das irregularidades da superfície onde estão localizados os vales, porém acaba favorecendo a velocidade de osseointegração e a taxa de sucesso (Amoroso *et al* 2006). Esta rugosidade superficial que facilita a adesão bacteriana aos implantes (Figura 01), há caso de adição de revestimentos antibacteriano para poder inibir infecções (Patelli *et al* 2018) uma vez que inibe adesão microbiana. Neste sentido, há estudos para melhorar a integração de células-superfície, principalmente com empenho nos últimos anos para desenvolvimento de superfície com características antibacteriana, como: superfície antiaderente; introdução de drogas ou íons metálicos sobre as superfícies; agentes inorgânicos (íon prata) (Rai *et al* 2009, Variola *et al* 2011, Vos *et al* 2017, Ferraris *et al* 2019). Há uma prática na clínica através da administração de drogas para o organismo, normalmente por via oral, a fim de prevenir infecção bacteriana pela adesão no material implantado e impedir formar um biofilme bacteriano sobre a superfície (Kazek-Kesik *et al* 2018).

A ciência tem trabalhado para o aprimoramento das superfícies implantares com qualidade para eventos anti inflamatórios e antimicrobiano (Li *et al* 2019), mas mesmo assim os métodos de alteração de superfície continuam sendo empregados. O método de subtração é bem comum para tratar superfície dos implantes. A subtração na superfície do titânio é com jateamento de óxido de alumínio (Chen *et al* 2016) partículas biocerâmicas (Muller *et al* 2003) de grãos de vários tamanhos e ou ataque ácido conferindo uma superfície rugosa micro texturizada, biocompatível, os quais os implantes são tratados com banho ultra sônico, enxaguados e finalmente secos (Buser *et al* 1991) . O grupo D.A.Zir teve a subtração feita por zircônia e sem presença de impureza da partícula sobre a superfície (Figura 16).

Corroborando com esta informação, neste estudo a superfície modificada por jateada com zircônia e acrescida de ataque ácido teve maior adesão microbiana (Figura 01), já que houve otimização da rugosidade da superfície (Karthigeyan *et al* 2019). O que está de acordo com as imagens de MEV, que apontam as irregularidades das superfícies modificadas em relação à usinada (Figura 13), corroborando com o dado quantitativo da análise de adesão bacteriana (Figura 01).

Neste estudo, a superfície que foi modificada por jateamento seguido por duplo ataque ácido (D.A.Zir) teve a maior irregularidade superficial (Figura 19 – D.A.Zir [Padrão]). Esta superfície modificada sem adição de partículas de zircônia (Figura 16 – D.A.Zir [Padrão]) é facilitada ataque ácido que remove os resíduos (Karthigeyan *et al* 2019).

Acredita-se que a formação de colônias foi facilitada pela grande quantidade de picos e vales presentes no grupo D.A.Zir, fato não encontrado no grupo USI. Esta observação experimental, sugere modificações na superfície dos implantes dentários, com a texturização dos terços apical e médio a fim de favorecer a osseointegração, enquanto no terço cervical e plataforma do implante, por estar frequentemente supra ósseo, minimizaria a adesão microbiana.

Como observado para grupo D.A. não teve diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% em relação aos grupos USI e D.A.Zir, ambos para o ensaio microbiológico. Nota-se que a modificação da superfície do grupo D.A. apresenta menos irregularidades que o grupo D.A.Zir (Figura 19), porém mais do que o grupo USI (Figura 17). A diferença de colônias entre D.A.Zir e USI pode ter causado, em dados episódios, a uma redução do pH local, causado pela colonização microbiana sobre as superfícies (Virtanen *et al.*, 2004). Na presença de pH baixo o comportamento corrosivo no Ti é mais acentuado (Taman *et al* 2014).

Esta relação entre a presença de biofilme e diminuição na capacidade de resistir a corrosão foi encontrado neste estudo (Figura 10), mas sem diferença estatística para alguns fatores a serem discutidos. Pode-se observar que o maior valor de UFC/mL no grupo D.A.Zir (BHI) resultou em menor capacidade de resistir ao processo corrosivo (Figura 10), especialmente quando se considera a ciclo polarização que causa a perturbação do biofilme, ou seja, a maior irregularidade teve incapacidade de resistir a corrosão. Além disso, a corrosão do titânio aumenta a sua rugosidade superficial (Mombelli *et al.*, 2018) que aumenta a área para integração eletroquímica, desestabilizando ainda mais sua superfície. Isto causa a liberação de produtos de corrosão do Ti ao meio, com consequências biológicas peri implantares, acúmulo nos tecidos (Yu *et al.*, 2015) e, com a presença de corpo estranho, inflamação, dor, peri implantite e perda de implante (De Melo *et al.*, 2016; Ferreira Ribeiro *et al.*, 2016). É desejável que a aplicação do titânio na forma de implante dentário e ortopédico apresente baixa taxa de corrosão. (Zhang *et al.*, 2015). Assim, foi aceita a hipótese H0 levantada, de que o biofilme se forme em maior quantidade na superfície com duplo ataque ácido foi aceita.

A análise dos diagramas de EDD para os tratamentos de superfície com os eletrólitos (BHI e Biofilme), referentes ao ensaio eletroquímico, chama a atenção a presença do íon Cloro. A presença deste íon em meio corrosivo acelera a presença de pites no aço inoxidável, pois a sua presença tende a desestabilizar o filme passivo em aços inoxidáveis (Gentil *et al.*, 2003). A grande deposição de íons cloreto e também de íons sódio sobre a superfície dos espécimes ocorreu pelo contato com o meio de cultura BHI, bem como na forma de eletrólito BHI, uma vez que este apresenta em sua composição cloreto de sódio (5 g/L) e fosfato dissódico 2,5 g/L. Entretanto, apesar da presença deste íon ser mais expressivo nos grupos USI e D.A. (BHI), do que nos grupos USI e D.A. (Biofilme), conforme observa-se no diagrama para EDS, o comportamento mais favorável eletroquimicamente para resistir a corrosão ocorreu nos grupos USI e D.A. (BHIs), confirmando que o íon cloro, neste caso, não teve efeito sobre a corrosão, haja vista que não foi um subproduto do microrganismo e sim um componente da composição BHI estando presente para todos os grupos.

Chama a atenção a concentração de oxigênio em alguns pontos, sobretudo nos grupos que tiveram a formação de biofilme sobre a sua superfície. A distribuição não uniforme de oxigênio pode formar uma célula de concentração de oxigênio, potencial elétrico entre áreas de altas e baixas concentrações de oxigênio (Fukushima *et al.*, 2014). Importante salientar que nenhum outro elemento químico com maior expressividade foi observado nos discos USI, D.A. e D.A.Zir que foram recebidos pela indústria, ou seja, nenhuma impureza foi encontrada pela do EED.

Quanto aos parâmetros aos quais os grupos foram submetidos, correspondem ao Potencial de Circuito Aberto (OCP), Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) e a Curva de Polarização Potenciodinâmica. As reações de corrosão eletroquímica sobre a superfície dos espécimes deste trabalho, requereu um ambiente úmido / eletroquímico, mas isento de corrosão mecânica onde tensões funcionais sobre o implante viessem comprometê-lo (Tschernitschek *et al.*, 2005; Norumbissi *et al.*, 2019). Para o OCP os grupos D.A.Zir (Biofilme) teve o melhor comportamento por ter a recuperação de potencial elétrico em menor tempo. Os grupos D.A (BHI) e D.A.Zir (BHI) apresentaram uma boa estabilização do sistema no início para resistir a corrosão também. Pelos dados observados na Figura 02, o OCP não teve diferença estatística para a superfície ($p = 0.9891$) e eletrólito ($p = 0.3681$). A análise de OCP pode remeter que a presença do biofilme sobre os espécimes influenciou na estabilização eletroquímica ao causar o

biofilme uma certa proteção para eventos corrosivos. Salienta-se que o OCP permite avaliar o potencial do material perante a solução e estabilizar o sistema.

Para o diagrama de Nyquist que tem a finalidade de informar uma maior resistência à transferência de cargas e menor potencial de troca de íons com o ambiente externo, o maior diâmetro semi circular do USI (BHI) e USI (Biofilme) denota um bom comportamento eletroquímico, observado também para o do D.A. (Biofilme), mas sem grandes diferenças destes para os demais grupos D.A.Zir (BHI e Biofilme) e D.A. (BHI). Se há uma menor quantidade de irregularidades ou poros na superfície, pode haver menor troca iônica com o meio (Faverani *et al.*, 2014; Beline *et al.*, 2016). Superfície de titânio expostas a alterações do pH do meio oral baixo, como ocorre com o uso de dentifrícios fluoretados que acabam promovendo a acidificação do meio com prejuízo para a camada de TiO₂, se tornam vulneráveis à corrosão (Siirilä *et al.*, 1991; Lugowski *et al.*, 1991; Anwar *et al.*, 2011).

Em reabilitação oral nenhum íon deve ser liberado como resultado da corrosão (Noumbissi *et al.*, 2019), ainda que seja da dissolução de ligas de titânio que acaba levando a toxicidade (Sedarat *et al.*, 2001). Neste sentido, ao analisar o diagrama de BODE permite observar que os grupos USI (BHI), D.A (BHI) e USI (Biofilme) tiveram boa capacidade de resistir as trocas iônica com o meio. A menor irregularidade da superfície propicia uma menor troca iônica, conforme pode se observar para o grupo USI (BHI) e D.A. (BHI), enquanto D.A.Zir (Biofilme) com maior troca iônica. O tipo de superfície, no caso a usinada, propiciou uma melhor estabilidade eletroquímica e a presença do biofilme não causou uma proteção quanto para a superfície em evento corrosivo. Conforme observado, a menor troca iônica grupo USI (BHI), acaba tendo um menor processo corrosivo, não perturbando a camada de óxido (Noumbissi *et al.*, 2019). Para o Potencial de Polarização Dinâmica os grupos D.A.Zir (BHI) e D.A.Zir (Biofilme) tiveram pior comportamento eletroquímico. Quanto a densidade de corrente de corrosão (I_{corr}), quando se comparou a superfície dos grupos e destes para os eletrólitos, houve diferença estatisticamente significativa. Observou-se melhor capacidade para resistir a corrosão generalizada pelo grupo USI (BHI e Biofilme). A análise da Figura 11 permite observar uma maior região ativa de corrosão e maior demora para atingir a região passiva para o D.A.Zir (BHI) e D.A.Zir (Biofilme). No caso de colonização por *Porphyromonas gingivalis* por 30 dias em implantes houve a indução da corrosão dos implantes, bem

como presença de ataque severo de ataque de corrosão pela descoloração da superfície e aumento de rugosidade da superfície (Rodrigues *et al.*, 2013; Siddiqui *et al.*2019).

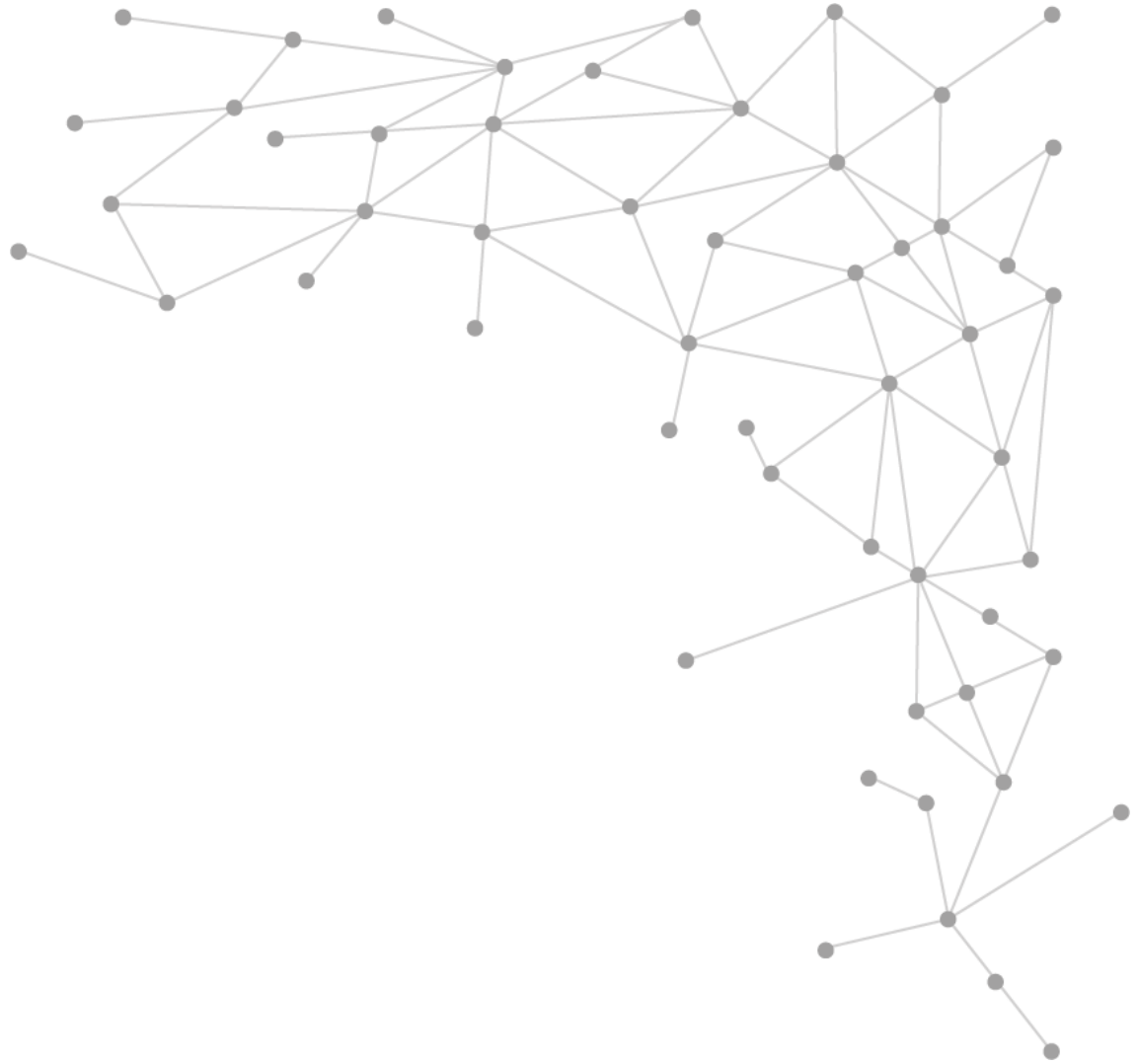
Saber as dimensões dos vales, poros e fissuras na superfície em relação ao tamanho das bactérias é importante em termos de fixação, ainda mais com a presença de saliva artificial que contém a proteína mucina que favorece adesão a superfície (Narendrakumar *et al.*2015). A análise da Figura 11 evidencia que os espécimes que passaram pelo tempo para a formação de biofilme comparados com os imersos em BHI, apresentam maiores valores de densidade de corrente de corrosão, ou seja, tiveram pior comportamento eletroquímico.

Assim sendo, diante da outra hipótese levantada a respeito do ensaio eletroquímico sob a influência ou não da presença de biofilme em proteger a superfície do titânio em ter maior passivação frente a corrente elétrica, observou-se que a presença do biofilme trouxe uma pior capacidade dos espécimes de resistir trocas iônica com o meio. Esta afirmação é confirmada pelos resultados apresentados pelos resultados apresentados por BODE (Figura 04), R_p (Figura 06), E_{corr} (Figura 10) e I_{corr} (Figura 11).

Pode se dizer que biofilme trás severa atividade metabólica de substâncias corrosivas de metais para o ambiente (Fukushima *et al.*2014; Zhang *et al.* 2015), ou seja, em outra situação a degradação da superfície com a dissolução de partículas metálica para o *in vivo* (Rodrigues *et al.*2013).

Pelo exposto acima, é diferentemente da adesão de bactérias que pode servir de forma mais preventiva para a dissolução de íons metálicos no eletrólito (Sridhar *et al.*2019). Tão logo o pior comportamento eletroquímico foi para D.A.Zir (Biofilme), conforme se observa no diagrama de BODE, Nyquist, I_{corr} , E_{corr} . Para todos estes parâmetros analisados o grupo D.A.Zir apresentou comportamento eletroquímico com o meio pior do que os demais grupos. Em contrapartida, o grupo USI teve melhor comportamento para trocas iônicas. Assim, diante do exposto, pode-se afirmar que a maior quantidade de biofilme formada e superfície mais irregular do espécime exerceram influência as trocas iônicas mais agressivas com o meio. Ao observar dentro do próprio grupo, os BHI e Biofilme, a presença do biofilme favoreceu a maior troca iônica com o meio.

Esses achados permitem afirmar que o biofilme não diminuiu a resistência do Ti à corrosão (rejeita H1), pois D.A.Zir teve maior capacidade de adesão microbiana e com maior capacidade de troca iônica com o meio.

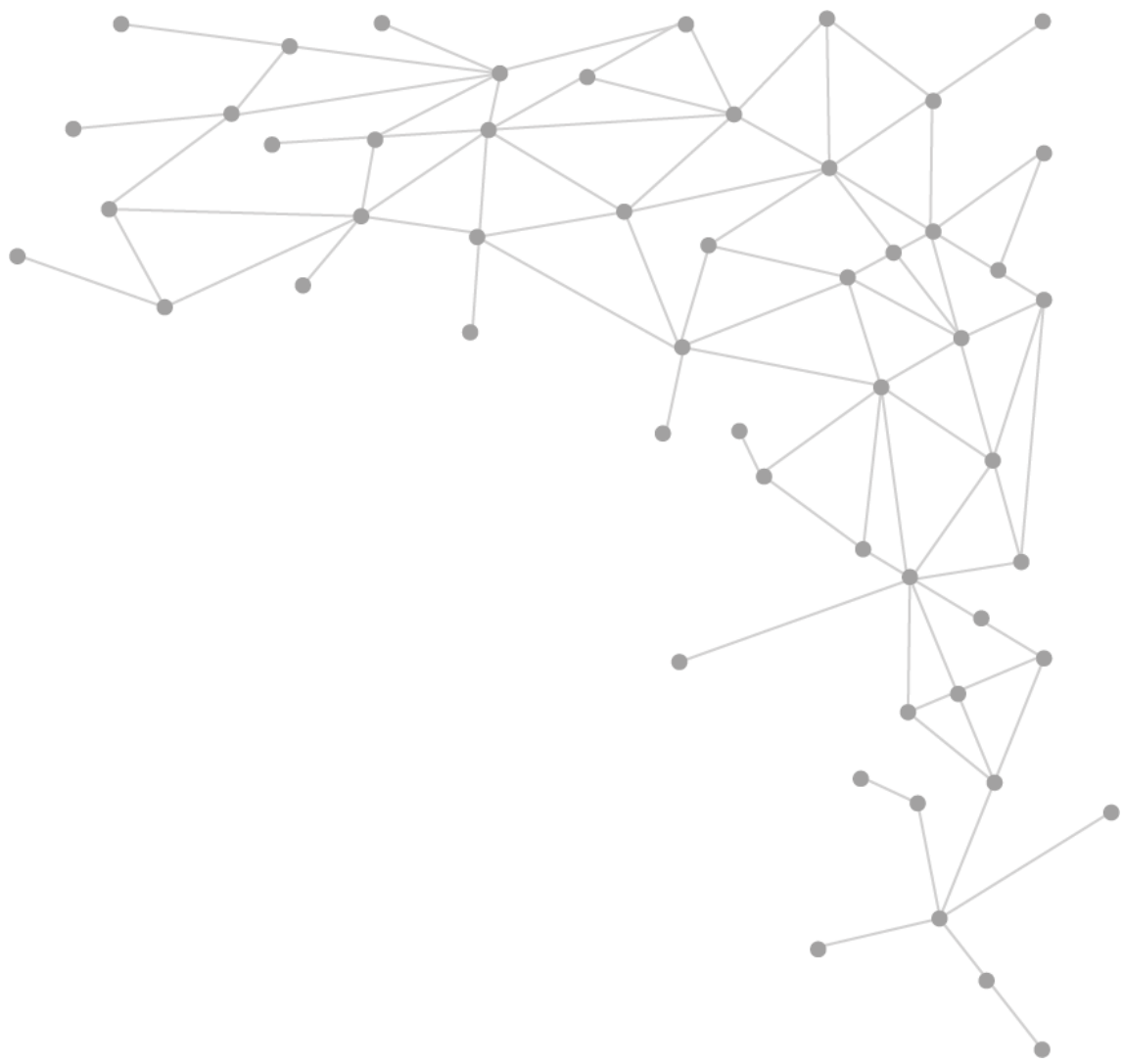


Conclusão

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos e considerando as limitações do estudo e dentro do que foi proposto em relação à corrosão sobre as superfícies em função do biofilme e do tempo avaliado, concluiu-se que:

- houve maior formação do biofilme na superfície do Ti com jateamento de zircônia seguido de duplo ataque ácido (D.A.Zir);
- a presença do biofilme exerceu influência para aumento da corrosão;
- o grupo D.A.Zir (Biofilme) teve o comportamento mais corrosivo.



Referências

REFERÊNCIAS

AL-RADHA, A. S. et al. Molecular analysis of microbiota associated with peri-implant diseases. In: (Ed.). **J Dent**. England: 2012 Elsevier Ltd, v.40, 2012. p.989-98. ISBN 1879-176X.

ALBREKTSSON T, WENNERBERG A. Oral implant surfaces: part I – review focusing on topographic and chemical properties of diferente surfaces and in vivo responses to them. **Int J Prosthodont**. 2004 Sep-Oct; 17(5):536-43 ISSN 0893-2174

AL QAHTANI WM, SCHILE C, SPINTZYK S, AL QAHTANI MS, ENGEL E, GEISGERSTORFER J, RUPP F, SCHEIDELER L. Effect os surface modofication of zirconia on cell adhesion, metabolic activity and proliferation of human osteoblastos. **Biomed Tech** (Berl). 2017 Feb 1;62(1):75-87.doi:10.1515/bmt-2015-0139.

ALT V, BITSCHNAU A, ÖSTERLING J, SEWING A, MEYER C, KRAUS R, MEISSNER AS, WENISCH S, DOMANN E, SCHNETTLER R. The effects of combined gentamicin–hydroxyapatite coating for cementless joint prostheses on the reduction of infection rates in a rabbit infection prophylaxis model. **Biomaterials** 27:4627–34. ISSN:0142-9612

AMOROSO PF, ADAMS RJ, WATERS MG, WILLIAMS DW. Titanium surface modification and its effect on the adherence of *Porphyromonas gingivalis*; an in vitro study. **Clin Oral Implants Res**. 2006 Dec;17(6):633-7. ISSN:1600-0501.

ANDREOTTI AM, DE SOUSA CA, GOIATO MC, FREITAS DA SILVA EV, DUQUE C, Moreno A, Dos Santos DM. In vitro evaluation of microbial adhesion on the diferente surface roughness of acrylic resin specific for ocular prosthesis. **Eur J Dent**. 2018 Apr-Jun;12(2):176-183. Doi:10.4103/ejd_50_18.

ANWAR EM, KHEIRALLA LS, TAMMAM RH. Effect of fluoride on the corrosion behavior of Ti and Ti6Al4V dental implants coupled with different superstructures. **J Oral Implantol**. 2011 Jun;37(3):309-17. doi: 10.1563/AAID-JOI-D-09-00084.

BARAO, V. A. et al. The role of lipopolysaccharide on the electrochemical behavior of titanium. In: (Ed.). **J Dent Res**. United States, v.90, 2011. p.613-8. ISBN 1544-0591.

BARAO, V. A. et al. 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**, v. 23, n. 9, p. 1055-62, Sep 2012. ISSN 1600-0501.

BARAO, V. A. et al. Attachment of *Porphyromonas gingivalis* to corroded commercially pure titanium and titanium-aluminum-vanadium alloy. **J Periodontol**, v. 85, n. 9, p. 1275-82, Sep 2014. ISSN 1943-3670.

BEARINGER, J. P.; ORME, C. A.; GILBERT, J. L. Effect of hydrogen peroxide on titanium surfaces: in situ imaging and step-polarization impedance spectroscopy of commercially pure titanium and titanium, 6-aluminum, 4-vanadium. **J Biomed Mater Res A**, v. 67, n. 3, p. 702-12, Dec 1 2003. ISSN 1549-3296.

BELIBASAKIS, G. N. Microbiological and immuno-pathological aspects of peri-implant diseases. In: (Ed.). **Arch Oral Biol**. England: 2013 Elsevier Ltd, v.59, 2014. p.66-72. ISBN 1879-1506.

BELINE T, GARCIA CS, OGAWA ES, MARQUES IS, MATOS AO, SUKOTJO C, MATHEW MT, MESQUITA RX, CONSANI RX, BARÃO. Surface treatment influences electrochemical stability of cpTi exposed to mouthwashes. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**. 59 (2016) 1079-1088. INSS:1873-0191.

BOTERO, J. E. et al. Subgingival microbiota in peri-implant mucosa lesions and adjacent teeth in partially edentulous patients. **J Periodontol**, v. 76, n. 9, p. 1490-5, Sep 2005. ISSN 0022-3492.

BURGERS, R. et al. In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. In: (Ed.). **Clin Oral Implants Res**. Denmark, v.21, 2010. p.156-64. ISBN 1600-0501.

BUSER D, SCHENK RK, STEINEMANN S, FIORELLINI JP, FOX CH, STICH H (1991) Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. **J Biomed Mater Res** 25:889-902
BUSER, D. et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. **J Dent Res**, v. 83, n. 7, p. 529-33, Jul 2004. ISSN 0022-0345.

BYSTROM A, CLAEISSON R, SUNDQVIST G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. **Endod Dent Traumatol**. 1985;1:170-5.

CANTY MK, HANSEN LA, TOBIAS M, SPENCER S, HENRY T, LUKE-MARSHALL NR, CAMPAGNARI AA, EHRENSBERGER MT. Antibiotics Enhance Prevention and Eradication Efficacy of Cathodic-Voltage-Controlled Electrical Stimulation against Titanium-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *mSphere*. 2019 May 1;4(3). pii: e00178-19. doi: 10.1128/mSphere.00178-19.

CANTY M, LUKE-MARSHALL N, CAMPAGNARI A, EHRENSBERGER M. Cathodic voltage-controlled electrical stimulation of titanium for prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii* biofilm infections. *Acta Biomater*. 2017 Jan 15;48:451-460. doi:10.1016/j.actbio.2016.11056.

CHEN CJ,DING SJ,CHEN CC(2016). Effects of surface conditions of titanium dental implants on bacterial adhesion. **Photomed Laser Surg** 34:379–388.

CORTADA, M. et al. Galvanic corrosion behavior of titanium implants coupled to dental alloys. In: (Ed.). **J Mater Sci Mater Med**. United States: 2000 Kluwer Academic Publishers, v.11, 2000. p.287-93. ISBN 0957-4530.

CUIS, YIN X, YU Q, LIU Y, WANG D, ZHOU F, **Corrosion Science**. 98 (2015) 471 477. ISSN: 0010-938X.

DELGADO-RUIZ R, ROMANOS G. Pontential Causes of Titanium Particle and Ion Release in Implant Dentistry: A Systematic Review. **Int J Mol Sci**. 2018 Nov 13;19(11). pii: E3585. doi: 10.3390/ijms19113585.

DE MELO, F. et al. Identification of oral bacteria on titanium implant surfaces by 16S rDNA sequencing. **Clin Oral Implants Res**, Jun 5 2016. ISSN 1600-0501.

FABRICIUS L, DAHLÉN G, HOLM SE, MÖLLER AJ. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. **Scand J Dent Res**. 1982;90:200-6.

FAVERANI, L. P. et al. Corrosion kinetics and topography analysis of Ti-6Al-4V alloy subjected to different mouthwash solutions. In: (Ed.). **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**. Netherlands: 2014 Elsevier B.V, v.43, 2014. p.1-10. ISBN 1873-0191.

DE VOS MG, ZAGORSKI M, MCNALLY A, BOLLENBACH T. (2017). Interaction networks, ecological stability, and collective antibiotic tolerance in polymicrobial infections. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 114, 10666-10671. doi: 10.1073/pnas.1713372114.

FAVERANI, L. P. et al. Effect of bleaching agents and soft drink on titanium surface topography. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 102, n. 1, p. 22-30, Jan 2014. ISSN 1552-4981.

FERRARIS S, COCHIS A, CAZZOLA M, TORTELLO M, SCALIA A, SPRIANO S, RIMONDINI L. Cytocompatible and Anti-bacterial Adhesion Nanotextured Titanium Oxide Layer on Titanium Surface for Dental and Orthopedic Implants. **Front Bioeng Biotechnol**. 2019 May 9;7:103. ISSN:2296-4185.

FERREIRA RIBEIRO, C. et al. Initial oral biofilm formation on titanium implants with different surface treatments: An in vivo study. In: (Ed.). **Arch Oral Biol**: 2016 Elsevier Ltd, v.69, 2016. p.33-39. ISBN 1879-1506.

FLANAGAN, D. et al. Enterococcus faecalis and Dental Implants. **J. Oral Implant**. v. 43, n. 1, p. 8-11. ISSN 1548-1336. FARROW J. A. E. et al. Taxonomic studies on some

group D *Streptococci*. **J General Microbiology**, v. 129, n. 5, 1983 p. 1423-32. ISSN 0022-1287.

FUKUSHIMA, A. et al. Microbiologically induced corrosive properties of the titanium surface. In: (Ed.). **J Dent Res**. United States, v.93, 2014. p.525-9. ISBN 1544-0591.

FURST, M. M. et al. Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. In: (Ed.). **Clin Oral Implants Res**. Denmark, v.18, 2007. p.501-8. ISBN 0905-7161 .

GAO Y, JIANG X, LIN D, CHEN Y, TONG Z. The Starvation Resistance and Biofilm Formation of *Enterococcus faecalis* in Coexistence with *Candida albicans*, *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces viscosus*, or *Lactobacillus acidophilus*. **J Endodontic**, v42,n.8, p1233-1238. ISSN 0099-2399.

GENTIL V. Corrosão. 4. ed. LTC Livros técnicos e Científicos S.A.: Rio de Janeiro, 2003.

GRAHAM, C. E. et al. *Enterococcus faecalis* bacteriocin EntV inhibits hyphal morphogenesis, biofilm formation, and virulence of *Candida albicans*. **PNAS**, v. 114, n.17, p. 4507-12, Apr 2017. ISSN 1091-6490.

GUGLIELMOTTI MB, OLMEDO DG, CABRINI RL. Research on implants and osseointegration. *Periodontol* 2000. 2019 Feb; 79(1):178-189.doi: 10.1111/prd. 12254.

GUPTA, A.; DHANRAJ, M.; SIVAGAMI, G. Status of surface treatment in endosseous implant: a literary overview. In: (Ed.). **Indian J Dent Res**. India, v.21, 2010. p.433-8. ISBN 1998-3603.

HAFEZEGORAN A, KOODARYAN R. Effect of Zirconia Dental Implant Surfaces on Bone Integration: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Biomed Res Int**. 2017;2017:9246721. ISSN:2314-6141

HALLAB N, MERRIT K, JACOBS J. Metal sensitivity in patients with orthopaedic implants. **J Bone Joint Surg Am**. 2001;83(3):428-436.

HE, X. S.; SHI, W. Y. Oral microbiology: past, present and future. **Int J Oral Sci**, v. 1, n. 2, p. 47-58, Jun 2009. ISSN 1674-2818.

HEIDARI, H. et al. High Incidence of VirulenceFactors among Clinical *Enterococcus faecalis* Isolates In Southwestern Iran. **Infect Chemother**, v. 49, n. 1, p. 51-56, Mar 2017. ISSN 2092-6448.

HOFFMANN O, ANGELOV N, ZAFIROPOULOS GG, ANDREANA S. Osseointegration of zirconia implants with different surface characteristics: an evaluation in rabbits. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 2012 Mar-Apr;27(2):352-8.

IVANOFF, C. J. et al. Histologic evaluation of the bone integration of TiO₂ blasted and turned titanium microimplants in humans. In: (Ed.). **Clin Oral Implants Res**. Denmark, v.12, 2001. p.128-34. ISBN 0905-7161.

JACOBS, J. J. et al. Metal release in patients who have had a primary total hip arthroplasty. A prospective, controlled, longitudinal study. **J Bone Joint Surg Am**, v. 80, n. 10, p. 1447-58, Oct 1998. ISSN 0021-9355.

KARRHOLM, J. et al. Fixation and metal release from the Tifit femoral stem prosthesis. 5-year follow-up of 64 cases. **Acta Orthop Scand**, v. 69, n. 4, p. 369-78, Aug 1998. ISSN 0001-6470.

KARTHIGEYAN S, RAVINDRAN AJ, BHAT RTR, NAGESHWARAO MN, MURUGESAN SV, ANGAMUTHU V. Surface Modification Techniques for Zirconia-Based Bioceramics: A Review. **J Pharm Biomed Sci**. 2019 May; 11 (Suppl 2):S131-S134. doi: 10.4103/JPBS.JPBS_45_19.

KOIKE, M.; FUJII, H. The corrosion resistance of pure titanium in organic acids. In: (Ed.). **Biomaterials**. England, v.22, 2001. p.2931-6. ISBN 0142-9612.

KRUPA, D. et al. Effect of dual ion implantation of calcium and phosphorus on the properties of titanium. In: (Ed.). **Biomaterials**. England, v.26, 2005. p.2847-56. ISBN 0142-9612.

KRUPA, D. et al. Corrosion resistance and bioactivity of titanium after surface treatment by three different methods: ion implantation, alkaline treatment and anodic oxidation. **Anal Bioanal Chem**, v. 381, n. 3, p. 617-25, Feb 2005. ISSN 1618-2642.

KRUPA, D. et al. Effect of plasma electrolytic oxidation in the solutions containing Ca, P, Si, Na on the properties of titanium. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 100, n. 8, p. 2156-66, Nov 2012. ISSN 1552-4981.

KAZEK-KESIK A, NOSOL A, PLONKA J, ŚMIGA-MATUSZOWICS, GOLDA-CEPA M, KROK-BORKOWICZ M, BRZYCHCZY-WLOCH M, PAMULA E, SIMKA W. PLGA-amoxicillin-loaded layer formed on anodized Ti alloy as a hybrid material for dental implant applications. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**. 2019 Jan 1;94:998-1008. doi: 10.1016/j.msec.2018.10.049.

LALOR, P. A. et al. Sensitivity to titanium. A cause of implant failure? **J Bone Joint Surg Br**, v. 73, n. 1, p. 25-8, Jan 1991. ISSN 0301-620X.

LAURINDO, C. A. et al. Incorporation of Ca and P on anodized titanium surface: Effect of high current density. In: (Ed.). **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**. Netherlands: 2014 Elsevier B.V, v.37, 2014. p.223-31. ISBN 1873-0191.

LI X, QI M, SUN X, WEIR MD, TAY FR, OATES TW, DONG B, ZHOU Y, WANG L, XU HHK. Surface treatments on titanium implants via nanostructured ceria for antibacterial and anti-inflammatory capabilities. **Acta Biomater**. 2019 Jun 15. pii:S1742-7061(19)30434-9. doi: 10.1016/j.actbio.2019.06.023.

LIN, A. et al. The role of titanium implant surface modification with hydroxyapatite nanoparticles in progressive early bone-implant fixation in vivo. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 24, n. 5, p. 808-16, Sep-Oct 2009. ISSN 0882-2786.

MABBOUX, F. et al. Surface free energy and bacterial retention to saliva-coated dental implant materials--an in vitro study. In: (Ed.). **Colloids Surf B Biointerfaces**. Netherlands, v.39, 2004. p.199-205. ISBN 0927-7765.

LUGOWSKI SJ, SMITH DC, MCHUGH AD, VAN LOON JC. Release of metal ions from dental implant materials in vivo: determination of Al, Co, Cr, Mo, Ni, V, and Ti in organ tissue. **J Biomed Mater Res**. 1991 Dec;25(12):1443-58.

MANTI, A. et al. A dual-species microbial model for studying the dynamics between oral streptococci and periodontal pathogens during biofilm development on titanium surfaces by flow cytometry. In: (Ed.). **Res Microbiol**. France: 2016 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS, v.167, 2016. p.393-402. ISBN 1769-7123.

MARQUES, I. D. et al. Electrochemical behavior of bioactive coatings on cp-Ti surface for dental application. v. 100, p. 133-146, Nov 1 2015. ISSN 0010-938X.

MARQUES IDA, S. et al. Tribocorrosion behavior of biofunctional titanium oxide films produced by micro-arc oxidation: Synergism and mechanisms. In: (Ed.). **J Mech Behav Biomed Mater**. Netherlands: 2015 Elsevier Ltd, v.60, 2016. p.8-21. ISBN 1878-0180.

MARSH, P. D. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. In: (Ed.). **J Clin Periodontol**. Denmark, v.32 Suppl 6, 2005. p.7-15. ISBN 0303-6979.

MATHEW, M. T. et al. What is the role of lipopolysaccharide on the tribocorrosive behavior of titanium? In: (Ed.). **J Mech Behav Biomed Mater**. Netherlands: A 2011 Elsevier Ltd, v.8, 2012. p.71-85. ISBN 1878-0180.

MJOBORG, B. et al. Aluminum, Alzheimer's disease and bone fragility. **Acta Orthop Scand**, v. 68, n. 6, p. 511-4, Dec 1997. ISSN 0001-6470

- MOLANDER A, et al. Microbiological status of rootfilled teeth with apical periodontitis. **Int Endod J.** v. 31, n. 1, p. 1-7 Jan 1998. ISSN 1365-2591
- MOLANDER A, REIT C, DAHLÉN G, KVIST T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. **Int Endod J.** 1998; 31:1-7.
- MOMBELLI A, HASHIM D, CIONCA N. What is the impact of titanium particles and biocorrosion on implant survival and complications? A critical review. **Clin Oral Implants Res.** 2018 Oct; 29 Suppl. ISSN: 1600-0501.
- MOUHYI J, DOHAN EHRENFEST DM, ALBREKTSSIN T. The peri-implantitis: implant surfaces, microstructure, and physicochemical aspect. **Clin Implant Dent Relat Res.** 2012;14:170-183
- MUELLER WD, GROSS U, FRITZ T, VOIGT C, FISCHER P, BERGER G, ROGASCHWSKI S, LANGE KP (2003). Evaluation of the interface between bone and titanium surfaces being blasted by aluminium oxide or bioceramic particles. **Clin Oral Implants Res** 14:349–356
- MURAD CF, SASSONE LM, FAVERU M, HIRATA R Jr, FIGUEIREDO L, FERES M, et al. Microbial diversity in persistente root canal infections investigated by checkerboard DNA-DNA hybridization. **J Endod.** 2014;40:899-906.
- NARENDRAKUMAR K, KULKARNI M, ADDISON O, MAZARE A, JUNKAR I, SCHMUKI P, SAMMONS R, IGLIC A. Adherence of oral streptococci nanostructured Titanium surfaces. **Dent Mater.** 2015 Dec;31(12):1460-8.
- NOUMBISSI S, SCARANO A, GUPTA S. A Literature Review Study on Atomic Ions Dissolution of Titanium and Its Alloys in Implant. **Materials (Basel).** 2019 Jan 24;12(3). doi: 10.3390/ma12030368.
- OLIVEIRA, N. T. et al. Biomedical Ti-Mo alloys with surface machined and modified by laser beam: biomechanical, histological, and histometric analysis in rabbits. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 15, n. 3, p. 427-37, Jun 2013. ISSN 1708-8208.
- OLMEDO, D. G. et al. Reactive lesions of peri-implant mucosa associated with titanium dental implants: a report of 2 cases. In: (Ed.). **Int J Oral Maxillofac Surg.** Denmark: 2009 International Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. Published by Elsevier Ltd, v.39, 2010. p.503-7. ISBN 1399-0020 .
- PAN, J.; THIERRY, D.; LEYGRAF, C. Hydrogen peroxide toward enhanced oxide growth on titanium in PBS solution: blue coloration and clinical relevance. In: (Ed.). **J Biomed Mater Res.** United States, v.30, 1996. p.393-402. ISBN 0021-9304.

PATELLI A, MUSSANO F, BRUN P, GENOVA T, AMBROSI E, MICIELI N, MATTEI G, SCOPECE P MORONI L. Nanoroughness, Surface Chemistry, and Drug Delivery Control by Atmospheric Plasma Jet on Implantable Devices. **ACS Appl Mater Interfaces**. 2018 Nov 21;10(46):39512-39523. doi: 10.1021/acsami.8bb15886.

QUEIROZ, T. P. et al. Commercially pure titanium implants with surfaces modified by laser beam with and without chemical deposition of apatite. Biomechanical and topographical analysis in rabbits. **Clin Oral Implants Res**, v. 24, n. 8, p. 896-903, Aug 2013. ISSN 1600-0501.

RAI M, YADAV A, GADE A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnol Adv**. 27, 76-83. doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.09.002.

RAJAN A, SIVARAJAN S, VALLABHAN CG, NAIR AS, JAYAKUMAR S, PILLAI AS. An In Vitro Study to Evaluate and Compare the Hemocompatibility of Titanium and Zirconia Implant Materials after Sandblasted and Acid-etched Surface Treatment. **J Contemp Dent Pract**. 2018 Dec 1;19(12):1448-1454.

RAKIC, M, et al. The Microbiologic Profile Associated with Peri-Implantitis in Humans: A Systematic Review. **Int. J. Oral Maxillofac Implants**, vol 31, n. 2, p. 359-68, Mar 2016 ISSN 1942-4434.

RASPERINI, G. et al. In vivo early plaque formation on pure titanium and ceramic abutments: a comparative microbiological and SEM analysis. **Clin Oral Implants Res**, v. 9, n. 6, p. 357-64, Dec 1998. ISSN 0905-7161.

RIMONDINI, L. et al. The effect of surface roughness on early in vivo plaque colonization on titanium. **J Periodontol**, v. 68, n. 6, p. 556-62, Jun 1997. ISSN 0022-3492.

ROCAS, I. et al. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. **J.Endodontics**, v. 30, n. 5, p.315-20, Mar 2004. ISSN 0099-2399.

SALVI, G. E. et al. One-year bacterial colonization patterns of Staphylococcus aureus and other bacteria at implants and adjacent teeth. In: (Ed.). **Clin Oral Implants Res**. Denmark, v.19, 2008. p.242-8. ISBN 0905-7161.

Dent Mater. England: 2014 Academy of Dental Materials. Published by Elsevier Ltd, v.30, 2014. p.1161-71. ISBN 1879-0097.

SÁNCHEZ M. D. et al. Quantitative real-time PCR combined with propidium monoazide for the selective quantification of viable periodontal pathogens in an in vitro subgingival biofilm model. **J Periodontal Res**, v. 49, n. 1, p. 20-8, Feb 2014. ISSN 1600-0765.

SCHAUDINN, C. et al. Periodontitis: an archetypical biofilm disease. In: (Ed.). **J Am Dent Assoc.** United States, v.140, 2009. p.978-86. ISBN 1943-4723.

SCHIFF, N. et al. Influence of fluoride content and pH on the corrosion resistance of titanium and its alloys. **Biomaterials**, v. 23, n. 9, p. 1995-2002, May 2002. ISSN 0142-9612.

SCHMIDLIN, P. R. et al. Polyspecies biofilm formation on implant surfaces with different surface characteristics. **J Appl Oral Sci**, v. 21, n. 1, p. 48-55, Jan-Feb 2013. ISSN 1678-7765.

SCHWARTZ Z, KIESWETTER K, DEAN DD, BOYAN BD. Underlying mechanisms at the bone-surface interface during regeneration. **J Periodontal Res.** 1997 Jan;32(1 Pt 2): 166-71. ISSN: 0022-3484.

SEDARAT C, HARMAND MF, NAJI A, NOWZARI H. In vitro kinetic evaluation of titanium alloy biodegradation. **J Periodont. Res.** 2001, 36, 269-274.

SHEN, Y. et al. Bacterial viability in starved and revitalized biofilms: comparison of viability staining and direct culture. **J. Endodontics.** v. 36, n. 11, p. 1820–1823, Nov 2010. ISSN 0099-2399.

SIIRILÄ HS, KÖNÖNEN M. The effect of oral topical fluorides on the surface of commercially pure titanium. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 1991 Spring;6(1):50-4.

SRIDHAR S, WANG F, WILSON THOMAS G, PALMER K, VALDERRAMA P, RODRIGUES DC. The role of bacterial biofilm and mechanical forces in modulating dental implant failures. **J Mech Behav Mater.** 2019 Apr;92:118-127.

RODRIGUES DC. The role of bacterial biofilm and mechanical forces in modulating dental implant failures. **J Mech Behav Biomed Mater.** 2019 Jan 17;92:118-127 ISSN:1878-0180.

RODRIGUES DC, VALDERRAMA P, WILSON Jr TG, et al. Titanium corrosion mechanisms in the oral environment: a retrieval study. **Materials (Basel).** 2013;6:528-5274.

TAVARES, M. G. et al. Treatment of a commercial, machined surface titanium implant with H₂SO₄/H₂O₂ enhances contact osteogenesis. In: (Ed.). **Clin Oral Implants Res.** Denmark, v.18, 2007. p.452-8. ISBN 0905-7161.

TEUGHEL, W. et al. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. In: (Ed.). **Clin Oral Implants Res.** Denmark, v.17 Suppl 2, 2006. p.68-81. ISBN 1600-0501.

TRISI, P. et al. Bone-implant contact on machined and dual acid-etched surfaces after 2 months of healing in the human maxilla. **J Periodontol**, v. 74, n. 7, p. 945-56, Jul 2003. ISSN 0022-3492.

TSCHERNITSCHKEK H, BORCHERS L, GEURTSEN W. Nonalloyed titanium as a bioinert metal- a review. *Quintessence Int.* 2005 Jul-Aug; 36(7-8):523-30.

URBAN, R. M. et al. Dissemination of wear particles to the liver, spleen, and abdominal lymph nodes of patients with hip or knee replacement. **J Bone Joint Surg Am**, v. 82, n. 4, p. 457-76, Apr 2000. ISSN 0021-9355.

VARIOLA F, BRUNSKI JB, ORSINI G, TAMBASCO DE OLIVEIRA P, WAZEN R, NANJI A. Nanoscale surface modifications of medically relevant metals: state-of--the art and perspectives. *Nanoscale* 3, 335-353. doi: 10.1039/c0nr00485e.

VIDELA, H. A.; HERRERA, L. K. Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. In: (Ed.). **Int Microbiol.** Spain, v.8, 2005. p.169-80. ISBN 1139-6709.

VIRTANEN S, CURTY C. Metastable and stable pitting corrosion of titanium in halide solutions. **Corrosion** 2004; 60(7): 643-649. ISSN: 0010-9312.

XAVIER, S. P. et al. Response of rat bone marrow cells to commercially pure titanium submitted to different surface treatments. In: (Ed.). **J Dent.** England, v.31, 2003. p.173-80. ISBN 0300-5712.

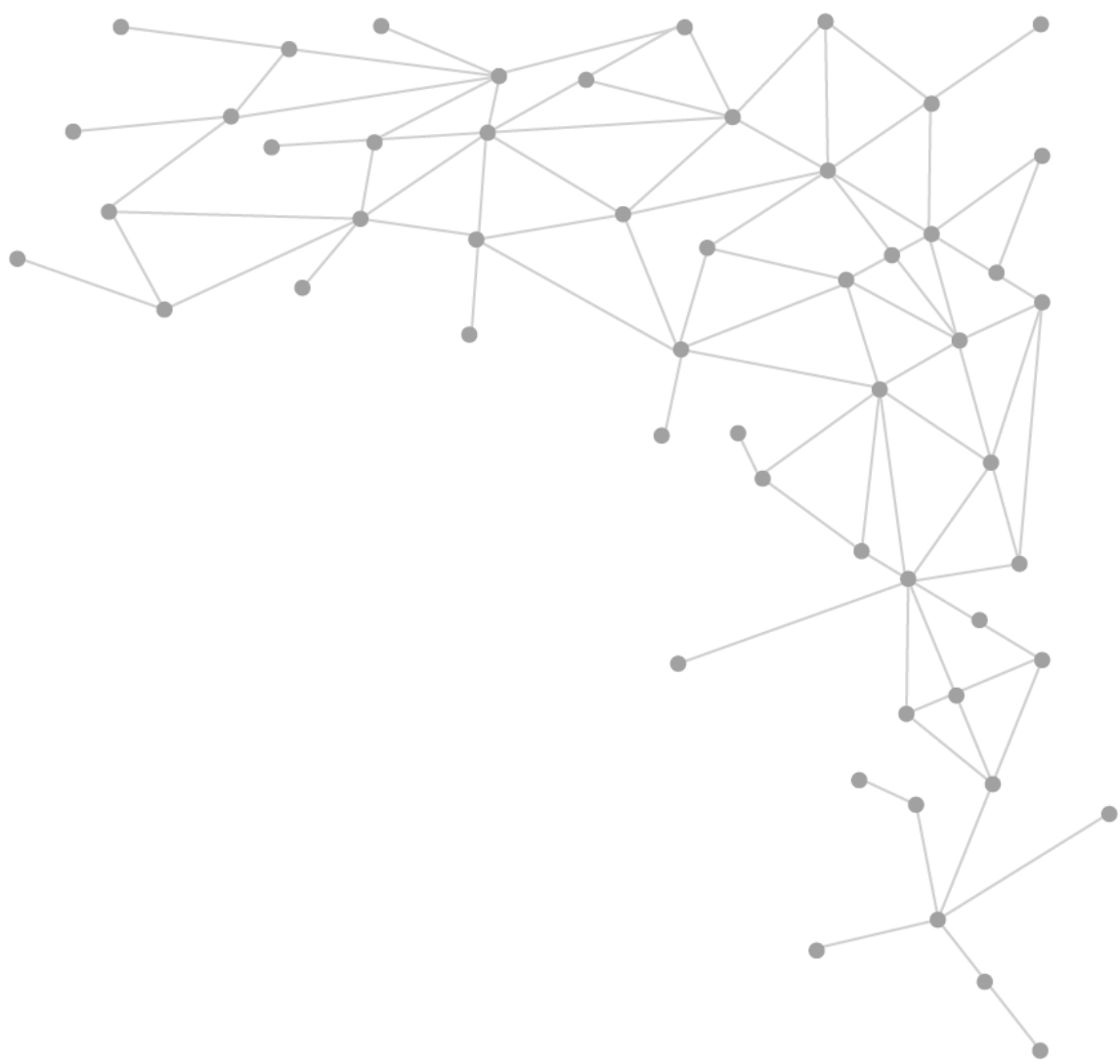
ZECHNER, W. et al. Osseous healing characteristics of three different implant types. In: (Ed.). **Clin Oral Implants Res.** Denmark, v.14, 2003. p.150-7. ISBN 0905-7161.

ZHAO, B. et al. Soft tissue integration versus early biofilm formation on different dental implant materials. In: (Ed.). **Dent Mater.** England: 2014 Academy of Dental Materials. Published by Elsevier Ltd, v.30, 2014. p.716-27. ISBN 1879-0097.

ZHANG E, LIU C. Effect of surface treatments on the surface morphology, corrosion property, and antibacterial property of Ti-10Cu sintered alloy. **Biomed Mater.** 2015 Jul 23; 10(4):045009. ISSN: 1748-6041.

ZHANG Y, ZHENG Y, LI Y, WANG L, BAI Y, ZHAO Q, XIONG X, CHENG Y, TANG Z, DENG Y, WEI S. Tantalum Nitride-Decorated Titanium with Enhanced Resistance to Microbiologically Induced Corrosion and Mechanical Property for Dental Application. **PloS One.** 2015 Jun 24;10(6):e0130774.

WILSON M, PATEL H, KPENDEMA H, NOAR JH, HUNT NP, MORDAN NJ. Corrosion of the intra-oral magnets by multi-species biofilms in the presence and absence of sucrose. **Biomaterials.** 1997 Jan; 18(1):53-



Anexo

ANEXO

Esta dissertação será submetida a revista Corrosion Science que apresenta suas normas de publicação no seguinte web site:

<https://www.elsevier.com/journals/corrosion-science/0010-938x/guide-for-authors>



CORROSION SCIENCE

The Journal on Environmental Degradation of Materials and its Control

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.1
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.3



ISSN: 0010-938X

DESCRIPTION

Occurrence of corrosion and its practical control is an area of study covering a wide range of scientific knowledge. *Corrosion Science* provides a medium for the communication of ideas, developments and research in all aspects of this field and includes both **metallic** and **non-metallic corrosion**. The scope of this international journal is very extensive. Published papers range from the highly theoretical to the essentially practical and cover such areas as high temperature oxidation, passivity, anodic oxidation, biochemical corrosion, stress corrosion cracking, and mechanisms and methods of **corrosion control**. This journal publishes original papers and critical reviews in the fields of pure and applied corrosion, the **degradation** of materials, and both surface science and engineering. It forms an important link between metallurgists, materials scientists and all investigators of corrosion and degradation phenomena.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our [Support Center](#)

AUDIENCE

Corrosion engineers, materials scientists, electrochemists.

IMPACT FACTOR

2017: 4.862 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2018