

Análise de limas endodônticas submetidas a biocorrosão por bactérias redutoras de sulfato *in vitro*

Fabiano Luiz Heggendorn¹, Lúcio Souza Gonçalves², Viviane de Oliveira Freitas Lione³, Walter Barreiro Cravo Junior¹, Márcia Lutterbach¹

¹Instituto Nacional de Tecnologia, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

²Faculdade de Odontologia, Universidade Estácio de Sá, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

Objetivo: Avaliar as alterações químicas presentes na superfície metálica de limas endodônticas fraturadas em canais radiculares, *in vitro*, após a inoculação intraradicular de culturas de BRS de três cepas microbianas, *Desulfovibrio desulfuricans* (uma cepa oral e outra ambiental) e *Desulfovibrio fairfieldensis*.

Métodos: foram analisadas 5 limas kerr #90, sendo uma Lima Kerr nova, sem tratamento, e as outras 4 limas fraturadas dentro de canais radiculares *in vitro*, com posterior inoculação de *Desulfovibrio desulfuricans*, cepa oral e ambiental, e *Desulfovibrio fairfieldensis* e um grupo controle sem inoculação bacteriana, por 477 dias. Os grupos foram analisados no modo EDS (Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-x) do microscópio eletrônico de varredura (FEI-Inspect-S50).

Resultados: A presença do S, Cl e O foram relacionados ao processo biocorrosivo, assim como a redução dos elementos de liga nesta área.

Conclusão: As análises no modo EDS demonstraram biocorrosão ao longo da superfície metálica das limas quando empregado o biofármaco BACCOR, nas três diferentes cepas empregadas, indicada pela redução dos elementos formadores da liga metálica, Fe, Ni e Cr, com a associação da presença de elementos indicadores de biocorrosão como O, Cl e S.

Descritores: Endodontia. Cavidade pulpar. Produtos biológicos. Corrosão. Desulfovibrio.

Submetido: 19/04/19

Aceito: 22/10/19

INTRODUÇÃO

Diversos métodos são empregados na remoção de limas endodônticas fraturadas no canal radicular, entretanto, nenhuma técnica se mostra segura, podendo levar a perfurações, falsos canais, destruição da raiz ou redução na resistência da raiz dentária¹⁻⁴. A fim de auxiliar a remoção de instrumentos fraturados do interior do canal radicular, esta sendo desenvolvido o BACCOR. Um biofármaco baseado na ação de Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) com a proposta de promover a biocorrosão em limas endodônticas manuais⁵.

A biocorrosão ou *microbiologically influenced corrosion* (MIC) é um tipo de corrosão em que microrganismos participam ativamente nesse processo, iniciando ou acelerando a reação eletroquímica de dissolução metálica. Um passo fundamental é a capacidade de formação de biofilme pelos microrganismos, que através do seu metabolismo, induzem e mantêm o gradiente de concentração de oxigênio acelerando o processo de corrosão^{6,7}. Neste contexto, torna-se essencial avaliar a ação *in vitro* do BACCOR na superfície de limas endodônticas fraturadas em canais radiculares. O presente estudo teve como objetivo avaliar as alterações químicas presentes na

Autor para correspondência:

Fabiano Luiz Heggendorn

Rua dos Araújo, 33, Tijuca, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. CEP.: 20.521.000. Telefone: +55 21 9 9411 9341

Email: fabianohegg@gmail.com

superfície metálica de limas endodônticas fraturadas em canais radiculares *in vitro* após a inoculação intraradicular de culturas de BRS de três cepas microbianas, *Desulfovibrio desulfuricans* (cepa oral e ambiental) e *Desulfovibrio fairfieldensis*, a fim de verificar diferenças nas condições de preparo das amostras e entre as diferentes condições de exposição.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o estudo foram utilizados 4 dentes unirradiculares. Os dentes foram acessados na região coronária e instrumentados pela técnica escalonada no terço apical até adaptar no terço médio uma lima tipo Kerr 90 (Dentsply Maillefer®; Lote: 1306001790). Após verificar o encravamento, foi seccionada a parte intermediária da lima endodôntica e os corpos de prova autoclavados por 15 min. Antes da inoculação do BACCOR, foi procedida a lavagem dos inócuos bacterianos, centrifugados a 10.000 g/05 min. para a recuperação das células bacterianas. O precipitado de cada amostra foi ressuscitado com meio de cultura Postgate E⁶ sem Agar-agar. Uma alíquota de 1,0 ml de cada inóculo bacteriano foi removido para a determinação da concentração celular pela técnica do número mais provável (NMP) para seguir a inoculação de 20 µl no interior do conduto radicular segundo a tabela 1 e incubados a 30 °C em estufa.

Após 477 dias de cultivo, as limas endodônticas foram removidas dos cultivos e submetidas a decapagem química, para observação e caracterização da forma de corrosão. Os corpos de prova foram imersos por 20 min. a 60 °C em solução de HNO₃ a 10%, lavados com álcool

etílico hidratado 70° INPM e acetona e secos com ar quente. As limas endodônticas foram analisadas ao longo de toda a superfície metálica, da ponta ativa até a parte intermediária. Os elementos químicos foram analisados no modo EDS (Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-x) do microscópio eletrônico de varredura (MEV-FEI-Inspect-S50), que permite a imediata identificação com o mapeamento da distribuição espacial destes elementos gerando mapas posicionais por raios-x (mapeamento por raios-x) ou análises pontuais e um espectro de energia demonstrando a contagem relativa dos elementos químicos obtidos na análise da superfície⁸.

Foram selecionados em um mesmo campo de imagem dois pontos para comparações, um ponto controle para as superfícies integras, e outro, denominado de ponto 2, para superfícies sugestivas de corrosão ou alterações superficiais. As amostras com cultivos de BRS foram submetidas a uma segunda tomada de análise pontual de espectrometria, sendo realizada a metalização da superfície das limas por pulverização catódica revestida em ouro (15 nm de espessura), a fim de melhor interpretação das áreas com reduzida condução elétrica, para melhor interpretação da espectrometria.

O estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal Fluminense, através do parecer substanciado do CEP: CAAE 0285.0.258.000-11.

RESULTADOS

A concentração celular obtida pela técnica do NMP nos inóculos utilizados no ensaio de biocorrosão nos dentes *in vitro* encontra-se na tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição do ensaio de biocorrosão em limas endodônticas: Concentração celular dos inóculos do ensaio biocorrosivo em dentes *in vitro* e relação de número de campos analisados em cada lima endodôntica

GRUPO	Cepa Inoculada Concentração celular	Meio de cultura	Tempo de Cultivo	Campos analisados Sem metalização da superfície	Campos analisados Após metalização das amostras
D11- Controle	Sem inóculo	Sem meio de Cultura	477 dias	3	Não realizado
D12	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> Ambiental 3,5 x 10 ⁹ nmp/ml	Meio Postgate E sem Agar-agar		3	4
D13	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> Oral 1,1 x 10 ⁹ nmp/ml	Meio Postgate E sem Agar-agar		6	4
D14	<i>Desulfovibrio fairfieldensis</i> 1,2 x 10 ¹⁰ nmp/ml	Meio Postgate E sem Agar-agar		2	4
D15 - Controle II	Lima endodôntica nova, sem tratamento específico. Sem exposição de interiorização no canal radicular			2	Não realizado

nmp/ml: Número mais provável por ml

ESPECTROMETRIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS-X

O número de campos analisados no modo EDS foi variável em cada amostra, devido a dificuldade de obter uma superfície adequada em

relação a incidência do feixe do microscópio, pelo fato da lima possuir uma conformação de giro, dificultando as análises de espectro (Tabela 1). A tabela 2 relata os elementos químicos encontrados em cada campo de análise nos diferentes grupos.

Tabela 2 - Relação do espectro químico da superfície metálica das limas endodônticas

Grupo	Preparo	Campo analisado	Espectrometria pontual	% em massa																
				Si	Cr	Fe	Ni	C	O	Na	Al	S	Cl	Ca	Mn	Mg	P	Mo	K	
D11	AMOSTRAS SEM METALIZAÇÃO	CP 1	Controle	0,29	17,79	74,67	5,22	2,02												
			Área2		2,74	26,71		8,02				1,48	0,91	59,32	0,83					
		CP 2	Controle	2,21	17,47	71,04	7,29	1,99												
			Área2	1,10	9,95	38,39	3,64	46,30				0,28		0,34						
		CP 3	Controle	0,22	19,97	74,98	3,28	1,48			0,08									
			Área2	2,26	2,81	8,75		10,02	5,60					47,75		1,61	21,20			
D12	AMOSTRAS SEM METALIZAÇÃO	CP 1	Controle	1,45	17,68	73,54	7,33													
			Ponto 2	1,83	8,47			47,82	2,73	1,08	0,86	0,95	0,64	2,72						
		CP 2	Controle	0,83	16,84	72,69	7,06	1,42			1,17									
			Área2		5,98	24,49	2,59	2,05			64,88									
		CP 3	Controle	1,75	16,72	70,16	7,67	3,28				0,42								
			Área2		14,57	60,15	5,73	19,16			0,39									
D13	AMOSTRAS SEM METALIZAÇÃO	CP 1	Controle	1,76	17,61	71,74	7,16	1,44			0,28									
			Área2	1,53	13,52	53,33	4,91	24,25			0,28	1,54					0,64			
		CP 2	Área 1 Corrosão	1,32	13,49	51,90	4,88	25,59	0,95			1,41					0,46			
			Área 2 corrosão	1,85	16,21	63,02	6,58	11,77				0,56								
		CP 3	Controle	1,56	17,87	71,96	7,22	1,39												
			Área2	1,62	17,33	70,00	6,74	3,89				0,42								
		CP 4	Área 1	1,48	13,93	55,56	5,09	19,92	0,76	0,86		0,74		1,64						
			Area2	1,32	9,12	33,21	2,97	50,07	0,73	0,73		0,60		1,25						
		CP 5	Controle	1,27	12,74	40,13	3,81	26,64	1,47		13,65	0,29								
			Área2	0,76	10,17	23,58		45,96	3,46		11,86	0,35		0,46		1,01				
		CP 6	Controle	0,79	19,03	72,58	5,85	1,58				0,18								
			Área2	1,29	34,39	47,32	3,47	8,43			4,53	0,31								
D14	AMOSTRAS SEM METALIZAÇÃO	CP 1	Controle	2,24	17,23	69,36	7,20	3,97												
			Área2	0,66	4,76	14,96	1,25	78,37												
		CP 2	Controle	1,52	17,58	71,73	7,30	1,86												
			Área2	1,52	13,20	49,44	4,85	22,64						8,34						

Análise de limas endodônticas biocorroídas

Grupo	Preparo	Campo analisado	Espectrometria pontual	% em massa															
				Si	Cr	Fe	Ni	C	O	Na	Al	S	Cl	Ca	Mn	Mg	P	Mo	K
D15	CP 1	Controle		0,86	17,75	73,08	6,95	1,35											
		Área2		0,37	17,33	71	5,84	5,57											
	CP 2	Controle		0,82	18,32	74,05	6,81												
		Área2						100											
D12	CP 1	Controle		1,34	19,10	79,23								0,32					
		Área2		0,98	17,98	74,31	6,74												
	CP 2	Controle		1,65	18,30	72,44	7,36							0,26					
		Área2		2,01	16,06	63,53	6,58	11,05						0,37	0,40				
	CP 3	Controle		0,57	17,49	73,81	5,96	1,99						0,18					
		Área2		0,72	31,32	68,17	3,79	6											
	CP 4	Controle		2,22	17,71	72,88	7,32							0,43					
		Área2		1,12	8,87	32,52	3,24	52,54	1,49					0,24					
D13	CP 4	Controle		1,02	17,36	71,80	7,31	2,51											
		Área 2		0,36	7,08	25,14	1,90	65,53											
	CP 1	Controle		1,84	17,65	72,11	7,40											1,00	
		Área 2		1,22	12,41			4,99	1,21	14,59			9,08	1,52				1,89	2,10
	CP 2	Controle		1,12	18,07	73,07	7,06											0,68	
		Área 2		0,75	10,80	41,31	3,82	42,44					0,23	0,65					
	CP 3	Controle		1,66	15,92	66,10	6,77	8,47										1,08	
		Área 2		1,20	11,13	42,96	4,37	38,84					0,49					1,02	
D14	CP 1	Controle		1,54	16,91	72,54	8,03											0,98	
		Área2		1,00	13,63	53,74	5,56	24,40										1,67	
	CP 2	Controle		1,64	17,33	72,66	7,60											0,77	
		Área2		2,11	17,15	67	7,40	4,89										1,45	
	CP 3	Controle		1,26	17,10	73,41	7,53											0,69	
		Área2		1,11	18,47	69,70	5,53	3,82										1,54	
	CP 4	Controle		0,98	16,83	74,41	7,14											0,65	
		Área2		0,82	17,65	74,70	6,22											0,61	

CP: Corpo de prova.

A análise no modo EDS demonstrou corrosão ao longo da superfície metálica das limas nos Grupos D12, D13 e D14, indicada pela redução dos elementos formadores da liga metálica, Fe, Ni e Cr, com a associação da presença de elementos indicadores de corrosão como O, Cl e S. Estas áreas corrosivas apresentaram diferentes magnitudes, formas e local de ataque corrosivo. Já as amostras Grupo controle D11 apresentaram áreas sugestivas de depósito de *smear-layer* e áreas integras sem

ataque corrosivo como no grupo de limas novas, Grupo D15 (CP 1) que apresentaram valores aproximados dos elementos de liga (Fe, Cr e Ni) entre as duas análises, o ponto controle e o ponto 2.

O Grupo D11, sem metalização, apresentou nos espectros pontuais maiores concentrações de Cr, Fe e Ni, que são os elementos formadores da liga metálica. Já as áreas sugestivas de depósito obtiveram concentrações aleatórias e variáveis de Si e C além de S, Cl, O, Ca, Mg, Mn e P. Tais elementos indicam que estas partículas

sejam restos dentinários, *smear-layer*. Além disso, a imagem demonstra uma partícula muito

carregada de elétrons, o que é comum em uma área não eletrocondutora e orgânica (Figura 1).

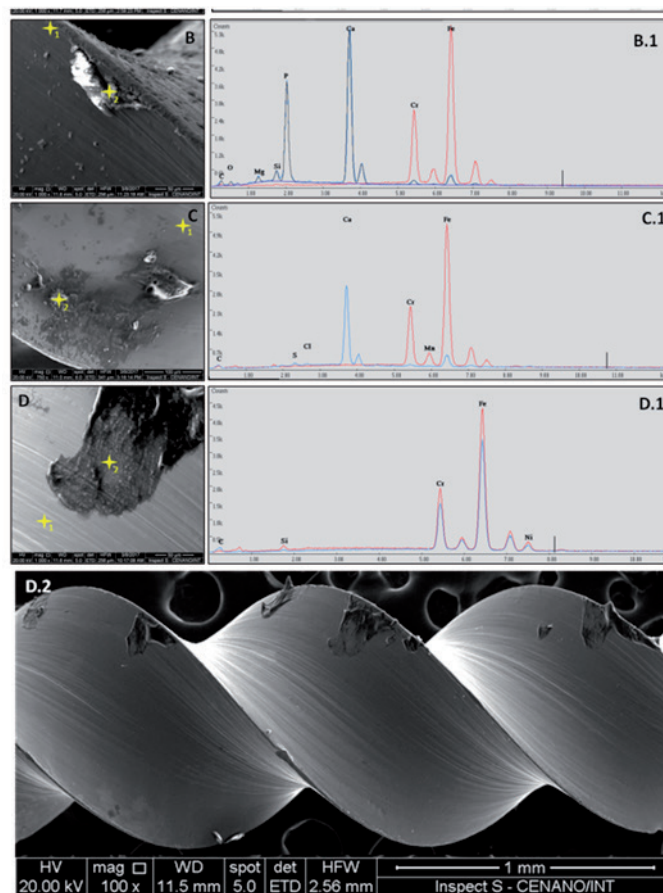


Figura 1 - Limas controle: Grupo D15 (D) superfície com área de depósito amórfico e imagens D.1 com o espectro do ponto 1 (espectrograma vermelho), superfície íntegra, e espectro pontual 2 (espectrograma azul), superfície sugestiva de depósito. Lima D11 (B e B.1 e C e C.1) superfície com área de depósito de *smear-layer* (ponto 2, espectro azul) e área íntegra (Ponto 1, espectro vermelho). Imagem em menor magnitude (D.2), relevando a localização preferencial dos depósitos de estruturas amorfas nas arestas de corte da lima endodôntica permanecendo a superfície sem depósitos.

O Grupo D15 apresentou áreas de depósitos localizadas nas arestas cortantes da lima, com maiores concentrações de Si, Cr, Fe, Ni e aumento de C. Entretanto este grupo só apresentou estes elementos químicos na superfície, enquanto o outro grupo controle, D11, com condições *in vitro* dentro do dente, apresentaram áreas de depósito com O (5,60% O); S (0,28% S e 1,48% S); Cl (0,91% Cl), Ca (47,75% Ca; 0,34% Ca, 59,32% Ca), Mn (0,83% Mn); Mg (1,61% Mg) e P (21,20% P).

Já para o Grupo D12, com inóculo *D. desulfuricans* ambiental, os campos demonstraram maiores concentrações de elementos estruturais de liga metálica nos espectros pontuais controles (Cr, Fe, Ni) quando comparado as áreas de corrosão. Também foi possível indicar a presença

de O, Na, Al, S, Cl, Ca em um mesmo campo, sugerindo uma área de corrosão. Nos outros dois campos foram identificados a presença de Al, nas áreas de corrosão. As imagens obtidas neste grupo diferenciam das imagens das amostras controle sugerindo áreas de corrosão (Figura 2 - M, N). A mesma amostra, após metalização da superfície, mostrou característica superficial semelhante a amostra sem este preparo. Foi verificada a presença de S, podendo ser notada no espectro pontual do campo de análise dois, um aumento de S na área sugestiva de corrosão (0,37% S) quando comparada a área de superfície íntegra (0,26% S), apresentando ainda nesta área Ca (0,40% Ca) e C (11,05% C) ausentes no espectro pontual da área de superfície íntegra. Já o espectro pontual do campo de análise três apresentou

aumento no nível de Cr (31,32% Cr) quando compara a área íntegra (17,49% Cr), também foi relacionado aumento de Si (0,72% Si), C (6% C) em comparação ao espectro pontual da superfície íntegra Si (0,57% Si) e C (1,99% C). A figura 2 sugere bordas elevadas com um afundamento na área central da área sugestiva de corrosão.

O Grupo D14 apresentou aumento de concentração dos elementos de liga nas superfícies íntegras (Si, Cr, Fe, Ni) e aumento de C na área de depósito de biofilme ou *smear-layer*, circundada por uma área de corrosão, associada a presença de Ca (8,34% Ca) no campo da figura 2.P. Após metalização, apresentou o mesmo padrão de redução dos elementos de liga e forte presença de C nas áreas de corrosão. Na figura 2.Q é possível verificar a área de corrosão com uma borda em elevação e uma das faces da área socavada.

Já o grupo D13 revelou uma superfície com depósitos irregulares e diversos. As

análises revelaram S somente na área de corrosão (1,54% S; 0,42% S, campos de análise 1 e 3 respectivamente) (Tabela 2), um aumento de S nas áreas de corrosão (campo 5 e 6, de 0,18% S para 0,31% S e de 0,29% S para 0,35% S respectivamente) e pequena redução de S no campo 4, da área controle para a área de corrosão, de 0,74% S para 0,60% S, com associação dos elementos O, Ca, Na (Figura 2). Após metalização, este grupo apresentou (Figura 2.T), um campo com forte indicio de corrosão com presença de O (1,21% O), C (4,99% C), Cl (9,08% Cl), Ca (1,52% Ca) e K (2,10% K). Nos outros campos, foi observado o mesmo padrão de redução dos elementos de liga e a presença de outros elementos, como S (0,23% S) e Ca (0,65%) (Figura 2 e Tabela 2). Esta análise sugere haver uma relação da presença do S com a alteração da superfície metálica da lima, como um produto do rompimento da camada passivadora da superfície metálica.

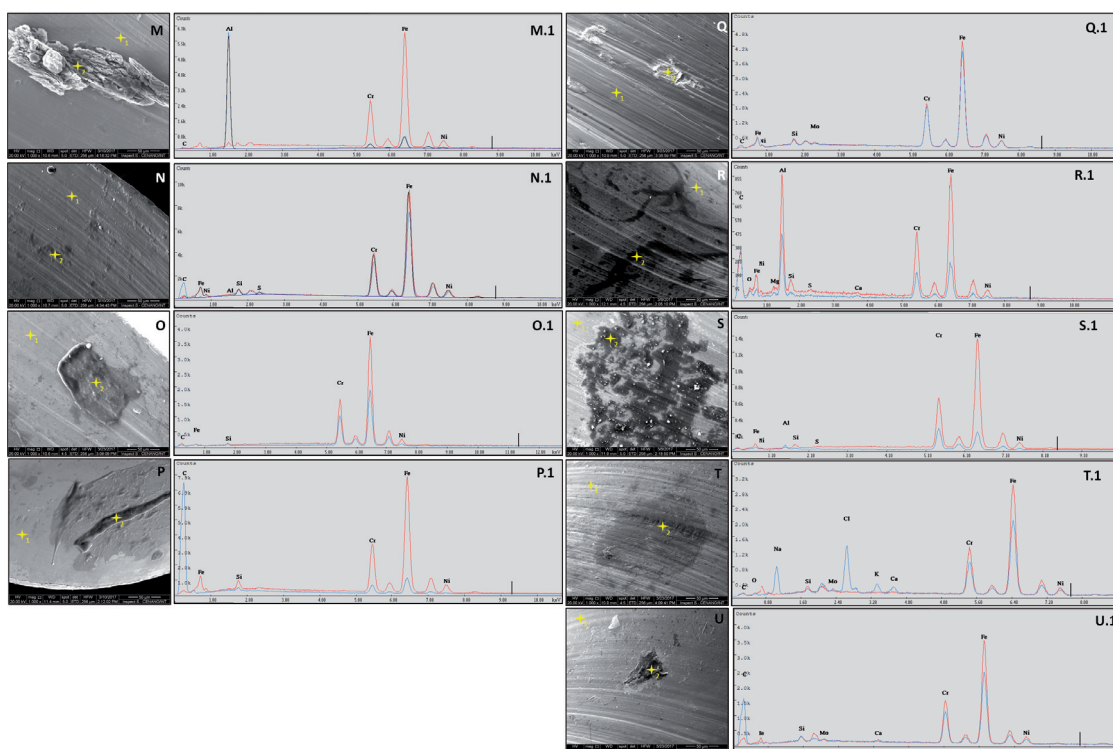


Figura 2 - Análises de superfície. Lima D12, antes (M, N) e após metalização (O), superfície com área de Corrosão e espectro do ponto 1 (vermelho), superfície íntegra, e análise pontual 2 (azul), superfície de corrosão. Lima D14 (P), superfície com área de material biológico, sugerindo ser biofilme, com áreas adjacentes de corrosão e (Q) áreas de corrosão. Espectro do ponto 1 (vermelho), superfície íntegra, e análise pontual 2 (azul), superfície de corrosão. Lima D13 (R, S) e após a metalização (T e U) superfície com área de corrosão. Antes da metalização e após metalização (H e L), espectro do ponto 1 (vermelho), superfície íntegra, e análise pontual 2 (azul), superfície de corrosão.

Antes da metalização da superfície do Grupo D13, foram analisadas as extremidades de uma mesma área de corrosão, em dois pontos, que apresentou variações na concentração de Si, Cr, Fe, Ni, C e S. A concentração de S variou neste mesmo campo de 1,41% S a 0,56% S. Ainda foi possível comparar estas análises com uma área íntegra e outro ponto de corrosão, de mesma tomada de campo, o que permitiu sugerir que as áreas mais densas e escuras da imagem representavam maiores concentrações de P e C, como na análise de espectro pontual 2 da figura 3.A e no ponto 1 figura 3.B. A área de corrosão apresentou S nos três pontos de avaliação e

ausente na área íntegra. Uma mesma área de corrosão apresentou zonas de variação de elementos químicos, apresentando (0,95% O) e Al (0,28% O) em uma zona e P (0,64% P e 0,46% P) em duas zonas próximas (Figura 3). Tal análise reforça que as alterações superficiais estão envolvidas com a presença e concentração de S na superfície metálica. Podendo ainda ser correlacionado ao fato de haver, no momento do cultivo das BRS nas limas endodônticas, a presença de depósitos de biofilmes nestas áreas mais escuras, o que poderia responder a presença de Ca e P associado a S em algumas áreas.

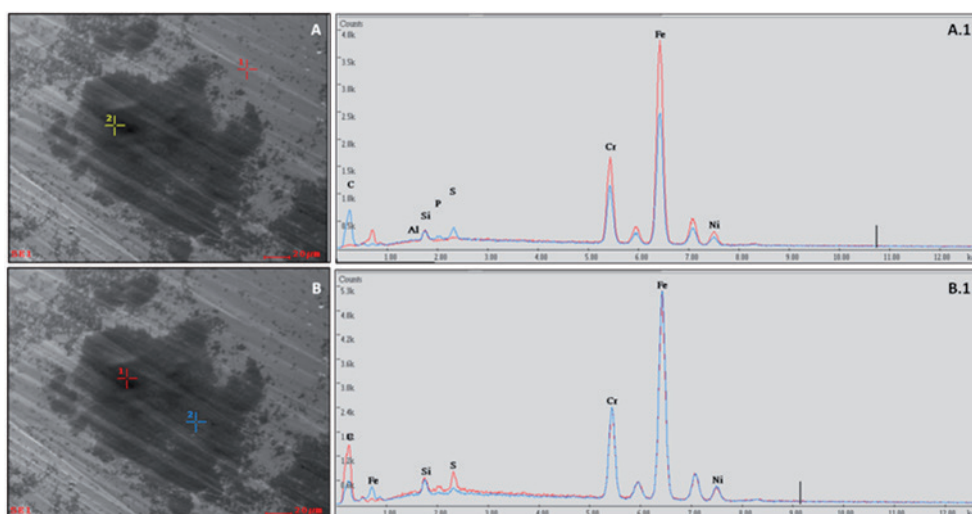


Figura 3 - Comparação entre áreas de corrosão. Lima D13, campo com espectrometria de um ponto íntegro, sem corrosão (vermelho) e com corrosão (amarelo, A e azul A.1) e campo com espectrometria de dois pontos sugestivos de corrosão (B e B.1) (vermelho e azul).

DISCUSSÃO

A corrosão propiciada pelas BRS é localizada, predominantemente por pites^{6,9}. Este processo biocorrosivo seria desejável em limas endodônticas fraturadas, facilitando o desprendimento da lima das paredes do canal radicular. Todos grupos inoculados com as BRS, sugeriram a possibilidade de ocorrência da MIC, indicando que as BRS não ficariam imobilizadas somente na área de acesso do inóculo e sim conseguiriam transpassar a barreira da lima endodôntica fraturada, alcançando regiões apicais do canal radicular assim como a ponta ativa da lima endodôntica fraturada no canal radicular.

Anteriormente foi comprovado o poder biocorrosivo do BACCOR, com cepas de *D. desulfuricas* e *D. fairfieldensis*, em

limas endodônticas tipo kerr seccionada transversalmente, com 28 dias de incubação⁵. O padrão de corrosão foi semelhante aos apresentados neste trabalho mesmo extrapolando o tempo de avaliação para 477 dias, a fim de verificar a capacidade máxima de biocorrosão das BRS⁵. Também foi percebido em áreas de defeitos estruturais preexistentes onde o processo biocorrosivo foi capaz de atuar⁵ semelhantes as arestas de corte com arrancamento onde foi identificado área de corrosão no grupo D12.

Além de comprovar a formação da MIC pelas BRS, este estudo demonstrou que as BRS se mantêm viáveis no canal radicular por longo período. Anteriormente, já havia sido identificada presença de BRS na cavidade oral, em superfícies dentinárias e saliva^{10,11}. O condicionamento de amostras para a observação no MEV, como a

fixação, desidratação e revestimento condutor pode levar a distorção na amostra, colapsando as matrizes de EPS, permanecendo somente as estruturas proteináceas¹³. Tal fato pode responder a diferença encontrada entre os espectros das amostras de antes e após a metalização da superfície¹³. Stowe et al.¹⁴ relataram que estruturas orgânicas ou inorgânicas depositadas sobre a superfície metálica, quando revestidas por ouro irão produzir um sinal dependente da topografia da amostra, em vez da sua composição, orientando pela não metalização das amostras em estudos de limas endodôntica, quando é objetivada a diferenciação de áreas de contaminação orgânicas de superfícies metálicas. A ausência de BRS nas imagens geradas nas amostras observadas no MEV foi ocasionada pela não utilização de métodos para preservação das bactérias, como a técnica do ponto crítico. Esta técnica não foi utilizada, uma vez que a desidratação de amostras também podem gerar artefatos que tornam o resultado difícil de interpretar¹⁵, podendo gerar contração no biofilme¹⁵.

A metodologia de reobservação de limas endodôntica no MEV e análise no MEV-EDS já havia sido relatada por Popović et al.¹⁶. Ao comparar as imagens dos dois momentos, com o nosso trabalho, fica evidente a falta de semelhança da superfície metálica quando comparamos com a superfície das amostras onde houve atividade da BRS. Quanto aos espectros químicos no MEV-EDS, Popović et al.¹⁶ relataram somente a grande presença de Fe e Cr para as limas de aço inoxidável enquanto Parirokh et al.¹⁷ determinaram em limas endodônticas de aço inoxidável a composição de detritos metálicos, como sendo Fe e Cr com reduzida concentração de Si, Ni e Mo, e de detritos orgânicos, apresentando elevada concentração de C.

Estruturas sólidas em formas de hastes, observadas no MEV, seriam células bacterianas encapsuladas por sulfetos de Zinco e de ferro¹⁸. Remoundaki et al.¹⁸ descreveram através do MEV-EDX um encapsulamento de BRS, com forma de haste de 10µm, por uma nevoa turva correspondente a deposição de sulfuretos metálicos na superfície da parede celular e ou área adjacente a célula bacteriana¹⁸. Tais indícios sugerem que a presença de S nas amostras analisadas são vestígios da existência de um biofilme de BRS que foi removido com a decapagem química, permanecendo ainda

a presença do S residual nesta superfície pré-colonizada.

No grupo D11 a exposição da lima no canal radicular foi capaz de promover uma corrosão abiótica em algumas áreas, que pode ser relacionado à umidade residual na dentina, tratada previamente com hipoclorito de sódio e pela presença do oxigênio, mesmo que em reduzida concentração. Ao comparar o grupo D11 com os grupos inoculados com BRS, as imagens sugerem que a biocorrosão propiciada pelas BRS foi capaz de atuar em grande extensão.

A limitada presença dos elementos Si, Cr, Fe, Ni e C no Grupo D15 sugere que os elementos na lima D15 sejam resíduos amorfos do processo de usinagem, óleos ou mesmo material humano de manipulação.

Em relação às análises de espectro pontual, a presença de Al e Si nas limas, não possuíram um padrão em relação as condições de ensaio. Ounsi et al.⁸ indicaram a presença do Al em áreas próximas a haste da lima e Si distribuído pela superfície como resultado do uso dos cursores nas limas endodônticas analisadas.

Lens et al.¹⁹ identificaram em biofilmes de BRS de 150 dias a presença de PO_4^{3-} -P compondo a biomassa. Para Remoundaki et al.¹⁸ o espectro de elementos obtidos no MEV-EDS revelaram alta concentração de O, Mg, P, S, Zn, Fe, C, N. Enquanto o espectro no biofilme bacteriano revelou alta concentração de S, Zn e O, respectivamente em ordem decrescente, seguidos por P, Mg, Cl, Fe, Ca, C e N. Anteriormente White e Gadd²⁰ caracterizaram a presença de P, Ca, S, Fe e Cu em culturas de BRS de sete, 14 e 21 dias, identificando uma distribuição não uniforme de Cu e S nos biofilmes. Brown et al.¹³ correlacionaram no MEV-EDS a identificação de P aos ácidos nucleicos e fosfolipídios das células de biofilmes assim como o Mg e Ca a eletrólitos citoplasmáticos. A similaridade destes elementos químicos associados à presença de biofilmes de BRS com os dados aqui apresentados corroboram os achados nas análises apresentadas.

Um maior teor de carbono reduz a resistência microestrutural do aço austenítico, reduzindo a resistência a corrosão²¹, tal situação pode ser constatada nas áreas sugestivas de corrosão dos grupos onde foi verificado um aumento no teor de carbono. Em contra partida o níquel fornece a resistência a corrosão²¹, sendo verificada a redução do teor nas áreas

sugestivas de corrosão. Já a resistência a corrosão dada pela presença do alto teor de cromo, que produz um filme protetor passivo e estável²¹ também seguiu o mesmo padrão do Ni, reduzindo a concentração nas áreas sugestivas de corrosão. Já para o Mo, que produz um filme passivo protetor mais estável²¹ foi verificada alterações nas amostras após a metalização, entretanto na maioria das análises estava em maior concentração nas áreas sugestivas de corrosão.

Costerton et al.²² relataram a presença de níveis muito baixos de O₂ nos centros de micro colônias formadoras dos biofilmes, mesmo os biofilmes de bactérias anaeróbicas. Assim como a ocorrência de redução de O₂ nas áreas circundantes da colônia, Videla & Herrera²³ relataram a presença de Mg dissolvido abaixo de áreas de colonização de biofilme. Tal fato poderia justificar a variável e baixa ocorrência de O₂ e Mg nas áreas sugestivas de corrosão dos grupos de limas expostas a BRS.

Já Geiger et al.²⁴ ao estudarem o biofilme da *D. vulgaris* relataram a presença de S, Fe, Cl, K, Ca e Cr em um tubérculo de corrosão em aço inoxidável. Lin e Jay²⁵ relataram a presença de sulfeto e Hg em biofilmes de *Desulfovibrio desulfuricans* com tempos de 24 e 48 horas, enquanto Jhobalia et al.²⁶ relataram a predominância de Fe e S. Tais minerais formados em associação com os biofilmes são denominados como biominerais: sulfato, fosfato, carbono, sulfureto e íons de silicato²⁷.

As imagens apresentadas neste trabalho, com formações localizadas de áreas calcificadas além de áreas sugestivas de corrosão foram semelhantes as de Dunsmore et al.²⁸ e Yuan et al.²⁹ que descreveram uma superfície metálica coberta por grumos de biofilme de BRS, densos e porosos, levando a um ataque localizado por íons agressivos de Cl⁻ e S²⁻, que conduz a iniciação de corrosão²⁹. Além disso, foi possível relacionar que em todas as análises onde o Cl estava presente, o S estava associado, exceto na análise do G14 figura 1, após a metalização (Tabela 2). Pickering²¹ relatou que estes contaminantes, como cloreto e dióxido de enxofre, evidenciam a corrosão.

Em relação ao tempo de exposição das amostras, a taxa de biocorrosão foi inexpressiva quando correlacionada com o tempo de imersão das limas endodônticas. Porém Isa et al.³⁰ relataram a maior atividade de BRS em reatores anaeróbicos entre 11 e 24 dias, decaindo a produção de S entre 54 e 63 dias.

Este fato pode ser devido a supersaturação de sulfeto de ferro no meio, como relatado por Jhobalia et al.²⁶ que relacionou a queda brusca de corrosão em cupons de aço quando a solução era super saturada com FeS₂. Ao longo do ensaio os autores relataram que o aumento da concentração de sulfeto diminuiu a taxa de crescimento das BRS e a taxa de corrosão.

Já Lopes et al.⁹ relacionaram a concentração de Ni a viabilidade de *Desulfovibrio desulfuricans*. Altas concentrações de Ni reduziram a taxa de duplicação celular enquanto níveis baixos foram positivos ao crescimento celular¹³. Já o Cr, apesar de presente nas superfícies metálicas, não apresentou efeito sobre o tempo de duplicação das bactérias nos estudos de Lopes et al.⁹ e o Mo foi indicado por retardar o crescimento celular das *D. desulfuricans*³¹. Nas análises apresentadas em nosso trabalho a presença de Ni e Cr foram evidentes em todas as amostras, enquanto a presença de Mo foi evidente somente após a metalização das amostras.

A constatação da presença dos elementos químicos através do MEV-EDS sugere a presença da existência de um biofilme irregular de BRS nas limas endodônticas. Entretanto o EDS não fornece o estado de oxidação do elemento químico, o que seria importante para demonstração efetiva do acúmulo do mineral no biofilme²⁷. A investigação sobre a formação do biofilme em aço se torna importante, uma vez que representa o estágio inicial na MIC³².

CONCLUSÃO

As análises no modo EDS demonstraram biocorrosão ao longo da superfície metálica das limas quando empregado o biofármaco BACCOR, nas três diferentes cepas empregadas, indicada pela redução dos elementos formadores da liga metálica, Fe, Ni e Cr, com a associação da presença de elementos indicadores de biocorrosão como O, Cl e S. Estas áreas corrosivas apresentaram diferentes magnitudes, formas e local de ataque corrosivo. Logo, as BRS foram capazes de alterar a estrutura superficial de limas endodônticas fraturadas no interior do canal radicular através da formação de áreas sugestivas de corrosão. Tais evidências podem possibilitar um caminho para facilitar a prática endodôntica para a remoção de limas endodônticas fraturadas em canais radiculares.

AGRADECIMENTOS

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e Instituto Nacional de Tecnologia (LABIO e DCOR).

Não existe conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Wefelmeier M, Eveslage M, Burklein S, Otto K, Kaup M. Removing fractured endodontic instruments with a modified tube technique using a light-curing composite. *J Endod.* 2015;41(5):733-6.
2. Wohlgemuth P, Cuocolo D, Vandrangi P, Sigurdsson A. Effectiveness of the gentlewave system in removing separated instruments. *J Endod.* 2015;41(11): 1895-8.
3. Yang Q, Shen Y, Huang D, Zhou X, Gao Y, Haapasalo M. Evaluation of two trephine techniques for removal of fractured rotary nickel-titanium instruments from root canals. *J Endod.* 2017;43(1):116-20.
4. Pedir SS, Mahran AH, Beshr K, Baroudi K. Evaluation of the Factors and Treatment Options of Separated Endodontic Files Among Dentists and Undergraduate Students in Riyadh Area. *J Clin Diagn Res.* 2016;10(3):ZC18-ZC23.
5. Heggendorn FL, Gonçalves LS, Dias E.P, Lione VOF, Lutterbach MTS. Biocorrosion of endodontic files through the action of two species of sulfate-reducing bacteria: *desulfovibrio desulfuricans* and *desulfovibrio fairfieldensis*. *J Contemp Dent Pract.* 2015;16(8):665-73.
6. Videla HA. *Biocorrosão, biofouling e biodeterioração de materiais.* 1th ed. São Paulo: Edgard Biucher; 2003.
7. Larry LB, Hamilton WA. *Sulphate-reducing bacteria environmental and engineered systems.* New York: Cambridge University Press; 2007.
8. Ounsi HE, Al-Shalan T, Salamed Z, Grandini S, Ferrari M. Quantitative and qualitative elemental analysis of different nickel-titanium rotary instruments by using scanning electron microscopy and energy dispersive spectroscopy. *J Endod.* 2008;34(1):53-5.
9. Lopes FA, Morin P, Oliveira R, Melo LF. Interaction of *desulfovibrio desulfuricans* biofilmes with stainless steel surface and its impact on bacterial metabolism. *J Appl Microbiol.* 2006;101(5):1087-95.
10. Heggendorn FL, Gonçalves LS, Dias EP, Silva Junior A, Galvão MM, Lutterbach, MTS. Detection of sulphate-reducing bacteria in human saliva. *Acta Odontol Scand.* 2013;71(6):1458-63.
11. Heggendorn FL, Gonçalves LS, Dias EP, Heggendorn C, Lutterbach MTS. Detection of sulphate-reducing bacteria and others cultivable facultative bacteria in dental tissues. *Acta stomatol Croat.* 2014;48(2):116-22.
12. Jorand FDA, Debuy S, Kamagate SF, Engels-Deutsch M. Evaluation of a biofilms formation by *desulfovibrio fairfieldensis* on titanium implants. *Lett Appl Microbiol.* 2014;60:279-87.
13. Brown DA, Beveridge TJ, Keevil CW, Sherriff BL. Evaluation of microscopic techniques to observe iron precipitation in a natural microbial biofilm. *FEMS Microbiol Ecol.* 1998;26:297-310.
14. Stowe S, Parirokh M, Asgary S, Eghbal MJ. The benefits of using low accelerating voltage to assess endodontic instruments by scanning electron microscopy. *Aust Endod J.* 2004;30(1):5-10.
15. Surman SB, Walker JT, Gobbard DT, Morton LHG, Keevil CW, Weaver W, et al. Comparison of microscope techniques for the examination of biofilms. *J Microbiol Methods.* 1996;25:57-70.
16. Popović J, Gašić J, Radičević G. The investigation of ultrasound efficacy in cleaning the surface of new endodontic instruments. *Srp Arh Celok Lek.* 2009;137(7-8):357-62.
17. Parirokh M, Asgary S, Eghbal MJ. An energy-dispersive X-ray analysis and SEM study of debris remaining on endodontic instruments after ultrasonic cleaning and autoclave sterilization. *Aust Endod J.* 2005;31(2):53-8.
18. Remoundaki E, Kousi P, Joulain C, Battaglia-Brunet F, Hatzikioseyan A, Tsezos M. Characterization, morphology and composition of biofilm and precipitates from a sulphate-reducing fixed-bed reactor. *J Hazard Mater.* 2008;153:514-24.
19. Lens P, Massone A, Rozzi A, Verstraete W. Effect of sulfate concentration and scraping on aerobic fixed biofilm reactors. *Water Res.* 1995;29(3):857-70.
20. White C, Gadd GM. Copper accumulation by sulfate-reducing bacterial biofilms. *FEMS Microbiol Lett.* 2000;183:313-8.
21. Pickering FB. Physical metallurgy of stainless steel developments. *Int Met Rev.* 1976:227-68.

22. Costerton JW, Lewandowski Z, Debeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized Microniche. *J Bacteriol.* 1994;176(8):2137-42.
23. Videla HA, Herrera LK. Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. *Int Microbiol.* 2005;8(3):169-80.
24. Geiger SL, Ross TJ, Barton LL. Environmental scanning electron microscope (ESEM) evaluation of crystal and plaque formation associated with biocorrosion. *Microsc Res Tech.* 1993;25:429-33.
25. Lin CC, Jay JA. Mercury methylation by planktonic and biofilm cultures of *Desulfovibrio desulfuricans*. *Environ Sci Technol.* 2007;41(19):6691-7.
26. Jhobalia CM, Hu A, Gu T, Nescic S. Biochemical Engineering Approaches to MIC. In: *Corrosion, 2005*, Houston.
27. Hullebusch EDV, Zandvoort MH, Lens PNL. Metal immobilisation by biofilms: Mechanism and analytical tools. *Rev Environ Sci Biotechnol.* 2003;2(1):9-33.
28. Dunsmore BC, Jacobsen A, Hall-stoodley L, Bass CJ, Lappin-Scott HM, Stoodley P. The influence of fluid shear on the structure and material properties of sulphate-reducing bacterial biofilms. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2002;29(6):347-53.
29. Yuan SJ, Pehkonen SO, Ting YP, Neoh KG, Kang ET. Inorganic – Organic hybrid coatings on stainless steel by layer-by-layer deposition and surface-initiated atom-transfer-radical polymerization for combating biocorrosion. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2009;1(3):640-52.
30. Isa Z, Grusenmeyer S, Verstraete W. Sulfate reduction relative to methane production in high-rate anaerobic digestion: microbiological aspects. *Appl Environ Microbiol.* 1986;51(3):580-7.
31. Chen G, Ford TE, Clayton CR. Interaction of sulfate-reducing bacteria with molybdenum dissolved from sputter-deposited molybdenum thin films and pure molybdenum powder. *J Colloid Interface Sci.* 1998;204(2):237-46.
32. Purish LM, Asaulenko LG, Abdulina DR, Vasil'ev VN, Latinskaia GA. Role of Polymer complexes in the formation of biofilms by corrosive bacteria on steel surfaces. *Appl Biochem Microbiol.* 2012;48(3):262-9.

Analysis of endodontic files submitted to biocorrosion by sulfate reducing bacteria *in vitro*

Aim: To evaluate the chemical alterations present on the metallic surface of root canal fractured endodontic files *in vitro* after the intraradicular inoculation of BRS cultures of three microbial strains, *Desulfovibrio desulfuricans* (one oral and one environmental strain), and *Desulfovibrio fairfieldensis*.

Methods: Five kerr #90 files were analyzed, one new untreated Kerr file and the other 4 files fractured within root canals *in vitro*, with a subsequent inoculation of *Desulfovibrio desulfuricans* (oral and environmental strains), and *Desulfovibrio fairfieldensis*, as well as a control group without bacterial inoculation for 477 days. The groups were analyzed using the scanning electron microscope (FEI-Inspect-S50) EDS (X-ray Dispersive Energy Spectrometry) mode.

Results: The presence of S, Cl, and O were related to the biocorrosive process, as well as the reduction of alloying elements in this area.

Conclusion: The EDS mode analysis showed biocorrosion along the metallic surface of the files when the BACCOR biopharmaceutical was used in the three different strains employed in this study, indicated by the reduction of the alloying elements – Fe, Ni, and Cr – with the association of the presence of indicator elements of biocorrosion, such as O, Cl, and S.

Uniterms: Endodontics. Dental pulp cavity. Biological products. Corrosion. *Desulfovibrio*.