



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

FACULDADE
DE CIÊNCIAS
E TECNOLOGIA

Alexandra Ricardo Mendes

Avaliação de iões metálicos procedentes do
tratamento ortodôntico:
estudos *in vivo* e *in vitro*

*Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para o cumprimento dos
requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica*

Orientadoras:

Prof. Doutora Cristina Maria Gonçalves dos Santos (DEM – FCTUC)

Prof. Doutora Sónia Margarida Alves Pereira (Unidade de Medicina Dentária – FMUC)

Coimbra, 2018

Esta cópia de tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são da pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgement.

*“Mas se todo o mundo é composto de mudança,
Troquemo-lhes as voltas que ainda o dia é uma criança!”*

José Mário Branco

Agradecimentos

Costuma dizer-se que tão importante quanto o destino, a viagem e o caminho percorrido são os maiores tesouros que se guardam na bagageira. Assim, não posso deixar de agradecer aos que me acompanharam durante todo o meu percurso.

Agradeço às minhas orientadoras, a Professora Doutora Cristina Santos e a Professora Doutora Sónia Alves, pela oportunidade de participar nesta investigação, pelo incentivo constante e pela confiança depositada.

Deixo aos meus pais o meu maior agradecimento, por me terem proporcionado a melhor experiência académica que poderia ter imaginado, e por terem estado sempre ao meu lado nesta caminhada e neste sonho que, apesar de ser meu, por todos os sacrifícios e cuidados se tornou deles também. Ao meu irmão, que tem o dom de estar sempre perto mesmo estando a 2000 km de distância, deixo também o meu grande obrigado.

Deixo um especial obrigado ao Daniel, por ser sempre o meu companheiro em todos os momentos e por ser o bombeiro de todas as horas, e à Dona Belinha, ao Sr. Armando, ao Diogo, à Chica e ao Oddie por me terem recebido e amparado com tanto carinho.

Agradeço às Mondeguinas, por me mostrarem o verdadeiro espírito de Coimbra, de partilha e de amizade, e por me permitirem pertencer a um grupo com tamanha história e simbolismo.

Finalmente, exprimo a minha gratidão aos meus amigos de sempre, que comigo partilharam os seus verdes anos e que deixaram em mim um pedacinho de si. Todos os momentos de estudo, de brincadeira e de ternura só fizeram sentido com eles a viver comigo esta grande aventura.

Resumo

Os aços inoxidáveis e as ligas Nitinol são os materiais metálicos de eleição no fabrico de aparelhos ortodônticos fixos, devendo a sua preferência à boa resposta do binómio propriedades mecânicas - resistência à corrosão. Embora comumente aceites como ligas biocompatíveis, esta propriedade pode ficar comprometida, devido ao impacto do constituinte fluído da cavidade oral, a saliva, nestes biomateriais. A rutura da camada passiva de óxidos formada à superfície das bioligas metálicas, expande no tempo a libertação dos produtos de corrosão, podendo conduzir a reações locais e sistémicas. Torna-se, assim, essencial estudar os fenómenos de corrosão que ocorrem em peças que compõem o aparelho fixo e a consequente libertação de iões metálicos no decorrer do tratamento ortodôntico.

Para tal, dividiu-se o trabalho em dois grandes grupos: o estudo *in vivo* e o *in vitro*.

No primeiro caso, avaliou-se a concentração de iões Ni, Cr e Fe na saliva de uma amostra constituída por 17 pacientes, durante diferentes períodos de tratamento ortodôntico, nomeadamente antes da colocação, 2 dias após o início do tratamento e 1, 4 e 12 semanas após a colocação do aparelho. Na segunda parte do estudo, as várias peças que compõe o aparelho fixo, como *brackets*, bandas, tubos, ligaduras e fios, foram colocadas em saliva artificial com dois valores de pH (2,3 e 6,7) durante 30 dias.

As concentrações *in vivo* obtidas, por recurso a Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES), mostram que não existem diferenças significativas ao longo das fases de tratamento, registando-se um ligeiro aumento dos níveis em Ni e em Cr quatro semanas após a colocação do aparelho. Os maiores níveis de libertação foram obtidos para o Fe que atinge o seu máximo uma semana após o início do tratamento. No estudo *in vitro* verificou-se uma evidente promoção da corrosão dos metais em pH mais ácido, observando-se ainda que, de todas as peças, os *brackets* foram aqueles que libertaram maior teor em iões metálicos como consequência da menor resistência à corrosão.

A caracterização efetuada por Microscopia Eletrónica de Varrimento acoplada a Espectrometria de raios X de Energia Dispersiva (SEM/EDS) permitiu avaliar as alterações morfológicas e químicas da superfície das ligas metálicas, tendo sido identificados sinais de corrosão. A formação de biofilme à superfície das ligas metálicas,

identificada por SEM/EDS, ao alterar as características funcionais destes materiais, poderá, também, contribuir para a intensificação do processo de biocorrosão.

Todavia, os teores de íons metálicos determinados neste trabalho encontraram-se abaixo dos limites de ingestão diária (100-800 µg/dia para o Ni, 50-280 µg/dia para o Cr e 10-50 mg/dia para o Fe) não representando perigo para a saúde humana. É necessário, no entanto, continuar a vigiar de perto os efeitos da corrosão nos aparelhos fixos, especialmente em indivíduos com hipersensibilidade aos íons metálicos.

Palavras chave: Ortodontia; Libertação de íons metálicos; Estudo *in vivo*; Estudo *in vitro*.

Abstract

Stainless steel and NiTi alloys have been widely used to manufacture fixed orthodontic appliances due to their good mechanical properties and corrosion behavior. Although commonly accepted as biocompatible alloys, this property could be compromised due to the oral cavity fluid, the saliva. Therefore it is essential to study the corrosion phenomena of commercial biometallic alloys and consequently the unavoidable metal ion release during clinic treatment with can lead to local and systemic reactions.

For this, the present work was divided into two parts: the *in vivo* and the *in vitro* studies.

In the *in vivo* analysis the metallic ion concentrations, namely Ni, Cr and Fe, present in the saliva of 17 patients were assessed during different times of the orthodontic treatment. Regarding the *in vitro* studies, different components of the fixed appliance, such as brackets, bands, tubes, ligatures, and arch wires, were placed in artificial saliva of different values of pH (2.3 and 6.7) during 30 days.

In vivo concentrations obtained by Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) show that there are no significant differences throughout the different treatment times, exhibiting a slight increase in Ni and Cr contents 4 weeks after the beginning of the treatment. For Fe, the highest levels were detected upon 1 week. In the *in vitro* study, it was demonstrated that acidic pH enhances the metallic corrosion during static saliva immersion. Among all the fixed components, the brackets were those revealing the higher ions amount after 30 days of saliva submersion.

The characterization carried out by Scanning Electron Microscopy coupled to Dispersive Energy Spectrometry (SEM/EDS) allowed to evaluate the morphological and the chemical alterations of the alloy's surface and also the identification of corrosion signs. The biofilm detected on commercial biometallic alloys upon 2 years of fixed treatment, changes the functional characteristics of those materials and, contributes to the biocorrosion intensification.

Finally, the Ni, Cr, and Fe concentrations obtained in the present work could be considered insignificant from a toxicological point of view. In fact, the average daily metal contents release are below to those recommended for daily dietary level (100-800 µg/day for Ni, 50-280 µg/day for Cr and 10-50 mg/day for Fe). However, corrosion

monitoring should continue to be addressed mainly for patients with hypersensitivity to metals.

Keywords: Orthodontic; Metal ion release; *In vivo study*; *In vitro study*.

Lista de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
EAA	Espectroscopia de Absorção Atômica
EDS	Espectroscopia de Raios X de Energia Dispersiva
ETAAS	Espectroscopia de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica
GFFA	Espectroscopia de Absorção Atômica com Câmara de Grafite
ICP-MS	Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Indutivo Acoplado
ICP-OES	Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado
SEM	Microscopia Eletrônica de Varrimento

Índice de Figuras

Figura 2.1 – Representação esquemática dos tipos de corrosão.....	8
Figura 2.2 – Ação microbiótica nas peças ortodônticas.	9
Figura 2.3 – Reações alérgicas a metais.	9
Figura 3.1 – Componentes do aparelho fixo.	27
Figura 3.2 – Esquema das energias de transição da absorção e emissão atômicas.	28
Figura 3.3 – Montagem dos componentes principais de um típico instrumento ICP-OES..	29
Figura 3.4 – Equipamento ICP-OES do laboratório do ITeCons.	30
Figura 3.5 - Ilustração dos vários sinais gerados pelas diferentes interações feixe-amostra e das regiões onde esses mesmos sinais podem ser detetados em SEM.	32
Figura 3.6 – Equipamento de SEM/EDS do Laboratório de Materiais e Desgaste do IPN.	33
Figura 4.1 – Evolução no tempo de tratamento dos teores médios libertados em saliva natural.	39
Figura 4.2 – Comparação dos teores de Ni presente na saliva dos pacientes no momento antes da colocação (t1) e nas fases posteriores do tratamento.....	40
Figura 4.3 - Comparação dos teores de Cr presente na saliva dos pacientes no momento antes da colocação (t1) e nas fases posteriores do tratamento.....	41
Figura 4.4 - Comparação dos teores de Fe presente na saliva dos pacientes no momento antes da colocação (t1) e nas fases posteriores do tratamento.....	42
Figura 4.5 - Morfologia em superfície de fios Nitinol após uso clínico.....	47
Figura 4.6 - Morfologia em superfície de fios Nitinol após uso clínico.....	48
Figura 4.7 - Morfologia em superfície de <i>bracket</i> , por SEM, após 2 anos de uso clínico.	50
Figura 4.8 - Morfologia em superfície de tubo, por SEM, após 2 anos de uso clínico.	50

Figura 4.9 - Mapas de distribuição elementar EDS e microanálise por raios-X da superfície de <i>bracket</i> após 2 anos de uso clínico.....	52
Figura 4.10 - Mapas de distribuição elementar EDS e microanálise por raios-X da superfície do tubo após 2 anos de uso clínico.	53
Figura 4.11 - Microanálise por raios-X da superfície do tubo após 2 anos de uso clínico.	54
Figura 4.12 – Micrografias por SEM de <i>bracket</i> após 2 anos de exposição intraoral, com notável acumulação de biofilme	54
Figura 4.13 – Concentração de iões metálicos, por peça e por dia.	59
Figura 4.14 - Morfologia em superfície, por SEM, de <i>bracket</i> após imersão em saliva artificial.....	60
Figura 4.15 – Microanálise por EDS da superfície do <i>bracket</i> após 30 dias de imersão em saliva artificial a pH=2,3.	61
Figura 4.16 – Mapas de distribuição elementar EDS do <i>bracket</i> após 30 dias de imersão em saliva artificial a pH 2,3.....	61
Figura 4.17 – Composição do <i>bracket</i> tal como recebido do fabricante.....	62
Figura 4.18 – Composição do tubo tal como recebido do fabricante.....	62
Figura 4.19 – Morfologia em superfície, por SEM, de tubos após imersão em saliva artificial.....	63
Figura 4.20 – Morfologia em superfície, por SEM, de fragmentos do filme depositado nos tubos.....	64
Figura 4.21 – Morfologia em superfície, por SEM, das bandas após imersão em saliva artificial.....	65
Figura 4.22 – Junção das peças que compõe a banda, mostrando na ampliação a soldadura de prata.	66
Figura 4.23 – Fio NiTi antes da imersão (ampliação e composição).	67
Figura 4.24 - Micrografias por SEM de fio após imersão.....	68

Índice de tabelas

Tabela 3.1 - Amostra dos indivíduos no estudo <i>in vivo</i>	23
Tabela 3.2 – Características do conjunto de Material 1 , onde todas as peças são da marca Dentaurum.	24
Tabela 3.3 – Características do conjunto de Material 2 , onde existem vários fornecedores.....	24
Tabela 3.4 – Tempos de recolha <i>in vivo</i>	25
Tabela 3.5 – Condições utilizadas no estudo <i>in vitro</i>	26
Tabela 3.6 – Composição da saliva artificial utilizada neste estudo.	26
Tabela 4.1 - Concentrações de Ni, por análise ICP, na saliva de 17 indivíduos em função do tempo de tratamento.	36
Tabela 4.2 - Concentrações de Cr, por análise ICP, na saliva de 17 indivíduos em função do tempo de tratamento.	36
Tabela 4.3 - Concentrações de Fe, por análise ICP, na saliva de 17 indivíduos em função do tempo de tratamento.	37
Tabela 4.4 - Estatística descritiva das concentrações de Ni, Cr e Fe nos diferentes momentos do tratamento.	38
Tabela 4.5 - Concentrações dos iões metálicos em estudo <i>in vitro</i> após 4 semanas.	58
Tabela 4.6 - Concentração de iões metálicos no estudo <i>in vitro</i> , por peça e por dia.....	58

Índice

1.	Introdução.....	1
2.	Revisão bibliográfica.....	5
2.1.	A corrosão das ligas metálicas, utilizadas em aparelhos ortodônticos fixos	5
	• Tipos de corrosão.....	5
	• Fatores que determinam a resistência à corrosão.....	10
2.2.	Efeitos do níquel na saúde humana.....	13
2.3.	<i>In vitro</i> vs <i>in vivo</i>	14
	• 2.3.1. Estudos <i>in vitro</i>	15
	• 2.3.2. Estudos <i>in vivo</i>	16
3.	Materiais e métodos.....	23
3.1.	Materiais	23
	Estudo <i>in vivo</i>	23
	Estudo <i>in vitro</i>	25
3.2.	Técnicas de análise	27
	Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES)	27
	Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM) e Espectrometria de raios X de Energia Dispersiva (EDS)	31
	Análise estatística dos dados	33
4.	Resultados e Discussão.....	35
4.1.	Estudo <i>in vivo</i>	35
	4.1.1. Avaliação da concentração de íons metálicos.....	35
	4.1.2. Avaliação da presença de corrosão.....	46
4.2.	Estudo <i>in vitro</i>	57
	4.2.1. Avaliação da concentração de íons metálicos.....	57
	4.2.2. Avaliação da presença de corrosão.....	59
5.	Conclusões.....	73
6.	Referências	77

1. Introdução

A utilização de ligas metálicas em componentes ortodônticos possibilitou o aperfeiçoamento das propriedades mecânicas dos materiais dentários que, por sua vez, permitiu obter progressos significativos no tratamento clínico, como foi o caso da introdução das ligas NiTi em 1971¹. Nos últimos anos, devido à cada vez maior procura de tratamento ortodôntico, quer por motivos estéticos, quer por motivos de saúde, tem-se tornado evidente a necessidade de melhorar a resistência mecânica, aumentar a resistência à corrosão e baixar a citotoxicidade dos componentes do aparelho fixo².

Propriedades vantajosas tais como a sua resistência mecânica e resistência à corrosão, e, acrescentando no caso das ligas de Nitinol a propriedade de memória de forma, fazem das ligas de aço inoxidável e de NiTi os materiais de eleição para a composição dos aparelhos fixos³. A boa resistência à corrosão que estas ligas apresentam deve-se sobretudo à formação da camada de óxido na superfície do metal. Porém, esta camada passiva apesar de protetora não é infalível, sobretudo quando exposta a microambientes propícios à corrosão como é o caso da boca^{4,5}.

O ambiente da cavidade oral é particularmente propício à biodegradação dos aparelhos fixos, sendo caracterizado por flutuações de pH e de temperatura, pela presença de atividade enzimática e microbiana e pelas várias substâncias químicas derivadas da dieta e parâmetros fisiológicos e psicológicos do indivíduo^{6,7}. A suscetibilidade à corrosão dos materiais metálicos quando colocados no ambiente intraoral aumenta significativamente, ocorrendo inevitavelmente a libertação de iões metálicos para o meio. Adicionalmente, os movimentos e a fricção resultantes da interação do fio com as restantes peças do aparelho, as forças exercidas nos vários componentes, a mastigação e a escovagem dos dentes também promovem a degradação da superfície dos materiais e a corrosão dos mesmos^{7,8}.

Das substâncias libertadas, os iões Ni e Cr reclamam especial atenção. O níquel é referenciado como um elemento tóxico e cuja exposição deve ser cuidadosamente monitorizada. É tido como um forte alergénio e desencadeador de reações de hipersensibilidade, sendo potencialmente carcinogénico e mutagénico, capaz de provocar alterações ao nível molecular nas cadeias de ADN. O crómio é também considerado um agente tóxico e mutagénico, associado à ocorrência de reações alérgicas. Na sua forma

hexavalente (Cr(VI)) levanta ainda problemas graves de citotoxicidade, sendo capaz de danificar o ADN. Níveis mais elevados de crómio estão também associados a distúrbios do sono, dores de cabeça e vômitos^{1,6}.

Têm sido reportadas ao longo dos anos manifestações clínicas em pacientes ortodônticos, tais como hiperplasia gengival, descamação labial, eritemas multiformes e periodontites, associadas a respostas inflamatórias provocadas pela corrosão do aparelho fixo e pela consequente libertação de iões metálicos para o meio intraoral^{7,9}.

É sabido, portanto, que a introdução de iões metálicos no organismo humano constitui um sério risco para a saúde, sendo que estes podem ser libertados em diferentes sítios e a diferentes níveis, afetando funções biológicas e levando a reações locais e sistémicas¹⁰. Os metais pesados, como é o caso do Ni e do Cr, podem danificar diretamente o ADN ou inibir a sua reparação, assim como podem inibir ações de defesa celular ou aumentar o mecanismo de peroxidação lipídica, provocando alterações ao nível da permeabilidade e integridade das membranas celulares¹¹. No entanto, os importantes papéis destes elementos na resistência à corrosão das ligas de aço inoxidável e nas ligas de NiTi tornam difícil a sua exclusão da composição de materiais ortodônticos². Por tudo isto, torna-se essencial estudar os fenómenos de corrosão que ocorrem nas peças que compõe o aparelho fixo e a consequente libertação de iões metálicos no decorrer do tratamento ortodôntico.

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* têm sido realizados com o intuito de melhor compreender as alterações provocadas pelos fenómenos corrosivos em peças de aço inoxidável, tais como *brackets*, bandas e tubos, e em peças de NiTi como o fio do aparelho fixo, e, apesar das dissemelhanças que encontramos entre as investigações, de uma forma geral todas concluem que os valores determinados não ultrapassam os limites de ingestão diária, sendo por isso considerados não alarmantes para a saúde dos indivíduos¹².

Apesar dos baixos valores de concentrações encontrados na literatura, a presença de iões metálicos, ainda que em baixas quantidades e em níveis não tóxicos, pode interferir com os mecanismos celulares, provocar danos diretos e indiretos nas bases de ADN e promover mutações genéticas⁷. Assim, importa continuar a investigar a relação entre a libertação dos iões metálicos e o uso de aparelho fixo durante o tratamento ortodôntico.

O presente trabalho surge precisamente com esse propósito, visando a determinação e a comparação das concentrações de íões metálicos, nomeadamente de Ni, Cr e Fe, presentes na saliva dos pacientes durante os diferentes períodos do tratamento clínico. Optou-se por utilizar a saliva como substrato biológico a analisar pois para além de ser o principal diluente do corpo humano permite realizar estudos a longo termo¹². A hipótese nula testada nesta investigação é a de que as concentrações de íões metálicos na saliva dos pacientes não se alteram significativamente com a colocação de aparelho fixo.

O método experimental está dividido em duas fases. A primeira fase é dedicada à recolha passiva da saliva dos pacientes em cinco momentos específicos: t1 - antes da colocação do aparelho fixo, t2 - 2 dias após a colocação, t3 - 1 semana após, t4 - 4 semanas após e t5 - 12 semanas após o início do tratamento. Na segunda fase da investigação procede-se então à quantificação dos teores de íões metálicos presentes nas amostras de saliva através do método de Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES).

Complementarmente realizou-se um estudo *in vitro* no qual os constituintes do aparelho fixo (*brackets*, bandas, tubos, ligaduras e fio) foram imersos em soluções de saliva artificial, com dois níveis de acidez (pH=2,3 e pH=6,7), durante 30 dias em condições estáticas. As soluções de saliva após o período de imersão foram analisadas por ICP-OES para quantificar os níveis de íões metálicos presentes. Ainda se procurou observar por Microscopia Eletrónica de Varrimento e por Espectrometria de raios X de Energia Dispersiva (SEM/EDS) alterações na morfologia dos materiais metálicos, pretendendo estudar a influência das condições ambientais, como o pH da solução, na corrosão das peças.

O trabalho que aqui se apresenta possui cinco capítulos. Na introdução pretendeu-se contextualizar o assunto estudado e indicar as motivações que levam à reflexão sobre o tema. Ao longo do capítulo 2 é exibida uma breve revisão bibliográfica sobre os tipos de corrosão suscetíveis de ocorrerem nos componentes ortodônticos, assim como os fatores que influenciam a sua degradação, falando-se ainda dos efeitos nefastos do Ni para a saúde humana, concretizado-se, por fim, um apanhado geral de estudos *in vitro* e *in vivo* realizados ao longo dos anos. A descrição dos materiais e métodos envolvidos nesta investigação encontra-se no capítulo 3. No capítulo 4 revelam-se os resultados obtidos nos estudos *in vivo* e *in vitro* sendo nesta mesma secção realizada a sua discussão

e interpretação. Por fim, no último e quinto capítulo, encontram-se as conclusões deste trabalho e algumas sugestões para futuras investigações.

2. Revisão bibliográfica

A biocompatibilidade dos materiais empregues em aplicações biomédicas é um dos principais critérios a assegurar para garantir que estas possam ser utilizadas pelo ser humano em tratamentos médicos.

As ligas de Níquel-titânio (NiTi) com 47-52% de níquel⁵ e as ligas de aço inoxidável compostas por 8-12% de níquel e por 17-22% de crómio são largamente utilizadas em aparelhos ortodônticos fixos¹³ reunindo propriedades mecânicas vantajosas, tais como uma boa resistência mecânica e propriedades elásticas (efeito de memória de forma, no caso das ligas NiTi)¹⁴, conjugadas com uma elevada resistência à corrosão^{2,11}. No entanto, a biocompatibilidade destes materiais em ambiente oral coloca algumas questões.

2.1. A corrosão das ligas metálicas, utilizadas em aparelhos ortodônticos fixos

- Tipos de corrosão

O ambiente da cavidade oral é particularmente propício à degradação dos metais devido às suas propriedades iónicas e à presença de ácidos orgânicos e enzimas produzidas pelos micróbios e bactérias existentes na boca¹⁵. O processo de degradação que ocorre nos materiais designa-se por corrosão, no qual os aparelhos ortodônticos geram correntes eletrolíticas utilizando a saliva como meio, causando a libertação de iões metálicos através de reações químicas^{7,16}. Podemos então definir corrosão como a degradação gradual dos materiais devido ao ataque eletroquímico, fenómeno que levanta especial preocupação no caso dos componentes dos aparelhos ortodônticos¹⁷.

São as reações de oxidação e redução, e a formação da camada passiva de óxido metálico sob a superfície do material, que determinam o como e o porquê dos materiais ortodônticos corroerem¹⁷, podendo existir vários tipos de corrosão.

Começamos por falar do tipo de corrosão mais comum que ocorre em todos os metais, a **corrosão uniforme**. Este tipo de corrosão deve-se sobretudo à interação dos metais com o meio onde estão inseridos e à posterior formação de compostos hidróxidos e organometálicos (compostos que possuem pelo menos uma ligação carbono-metal, sendo que o metal pode ser o boro, o silício ou o arsénio)⁵. A corrosão uniforme diz respeito a qualquer reação química ou eletroquímica que ocorra uniformemente por toda a superfície exposta ou por uma área considerável. Para que ocorra, o meio corrosivo precisa de ter igual acesso a todas as partes da superfície, e o metal tem de ser uniforme ao nível da sua composição. Este tipo de ataque pode não ser detetado até que sejam dissolvidas grandes quantidades de metal¹⁷.

A **corrosão do tipo *pitting***, causada normalmente pelo ataque não uniforme de iões cloreto em locais aleatoriamente distribuídos¹⁸, tem sido observada em fios e *brackets* ortodônticos⁷. A corrosão *pitting* ataca de forma agressiva a superfície do metal, originando furos¹⁷, os chamados *pits*, que não são mais do que poros com profundidade igual à sua largura⁵. Geralmente ocorre nas bases dos metais, as quais se encontram na maioria das vezes revestidas por uma fina camada de óxido. Na presença dos iões cloreto, a camada degrada-se em determinados locais e dá-se uma rápida dissolução dos metais subjacentes à mesma, criando-se furos. Desta forma, as superfícies dos fios de aço inoxidável e de NiTi apresentam furos e poros, locais considerados muito suscetíveis a ataques corrosivos^{2,17}. Curiosamente, foram detetadas estruturas características de corrosão *pitting* em componentes nunca utilizados, o que leva a crer que este processo se possa iniciar ainda antes da colocação intraoral do aparelho ortodôntico⁵.

Quando estamos perante duas superfícies muito próximas ou locais muito estreitos, como fendas (*crevice*), onde a troca de oxigénio é dificultada, observamos **corrosão do tipo *crevice***¹⁷. Este fenómeno ocorre após a aplicação de elementos não metálicos no material metálico, como por exemplo, a colocação de ligaduras elásticas no *bracket*, e surge devido à diferença de iões metálicos ou da concentração de oxigénio entre a fenda e a vizinhança^{2,5}. Em situações clínicas, a profundidade da fenda pode ir dos 2 até aos 5 mm, perfurando a base do *bracket*, e a quantidade de metal dissolvido a partir deste pode ser relativamente alta¹⁸. O ataque corrosivo deve-se principalmente à insuficiente concentração de oxigénio, que não permite a regeneração da camada passiva de óxido de crómio nas superfícies dos materiais de

aço inoxidável, associada à formação de placa e produtos derivados da flora microbiana^{5,18}. A diminuição do pH e o aumento de íons cloreto em solução são dois fatores essenciais para a iniciação e propagação da corrosão *crevice*. Quando o meio se torna mais ácido a camada passiva da liga metálica dissolve-se, acelerando o processo de corrosão local. Os produtos corrosivos, como os íons Fe, Cr e Ni, alguns dos principais componentes do aço inoxidável, acumulam-se nas fendas e promovem a formação de uma solução de ácido clorídrico, na qual a taxa de corrosão é elevada¹⁷.

A **corrosão do tipo *fretting***, responsável pela maioria dos íons metálicos libertados nos tecidos, resulta de uma ação conjunta de ataque químico e mecânico¹⁷. Este fenómeno ocorre em áreas de contacto sujeitas a pressão de carga, como se verifica na interface entre o fio metálico e a ranhura do bracket, ao qual está ligado⁵. A corrosão *fretting* é um tipo de corrosão-erosão que aumenta com o movimento relativo entre o fluído corrosivo e a superfície do material, sendo que o rápido movimento do fluído corrosivo erode fisicamente e remove a camada protetora do material, expondo a liga metálica, por si só reativa, que se encontra por baixo da mesma e acelerando o processo de corrosão¹⁷. Em situações clínicas, a profundidade da fenda pode situar-se entre os 2 e os 5 mm, sendo suficiente para perfurar a base do bracket,, que pode ter como consequência uma quantidade de metal dissolvido relativamente alta¹⁸.

Acoplando dois metais distintos, ou metais pertencentes à mesma liga mas sujeitos a tratamentos diferentes, estabelecem-se processos de oxidação e dissolução⁵, que constituirão o mecanismo da **corrosão galvânica**¹⁸. Este fenómeno ocorre por exemplo quando se colocam os *brackets*, e o fio ortodôntico em contacto, componentes constituídos por ligas diferentes com potenciais corrosivos também eles distintos¹⁷. O metal menos nobre (ou a região menos nobre da superfície do metal) sofre oxidação, perdendo eletrões e tornando-se num ânodo, ocorrendo consequentemente a libertação de catiões solúveis para o meio circundante (meio este denominado de eletrólito). Por sua vez, o metal mais nobre (ou a região mais nobre da superfície do metal) torna-se o cátodo da célula eletroquímica e não fica sujeito a fenómenos corrosivos¹⁸. A razão de área de superfície entre as duas ligas diferentes é um fator com grande importância no comportamento da corrosão galvânica, podendo levar a uma maior taxa de corrosão da liga anódica se for desfavorável, isto é, se

existir uma grande superfície metálica no cátodo e uma pequena superfície no ânodo¹⁷.

Os *brackets* de aço inoxidável são sujeitos a uma gama de temperaturas elevadas (aproximadamente entre 500°C e 800°C) durante o seu processamento (as chamadas temperaturas de sensibilização), nas quais ocorre uma alteração na microestrutura da liga^{17,18}. Nessas temperaturas, o cromo e o carbono presentes no aço inoxidável reagem, formando precipitados de carboneto de cromo nas fronteiras de grão. A presença deste precipitado, solúvel mesmo em ácidos fracos, e a diminuição de cromo tornam essas regiões da liga particularmente suscetíveis à **corrosão intergranular**¹⁸. Contrariamente à corrosão uniforme ou do tipo *pitting*, em que ocorre a dissolução de uma grande superfície do *bracket*, na corrosão intergranular apenas são removidas as regiões da liga próximas das fronteiras de grão, o que pode levar à formação de grãos isolados^{5,18}.

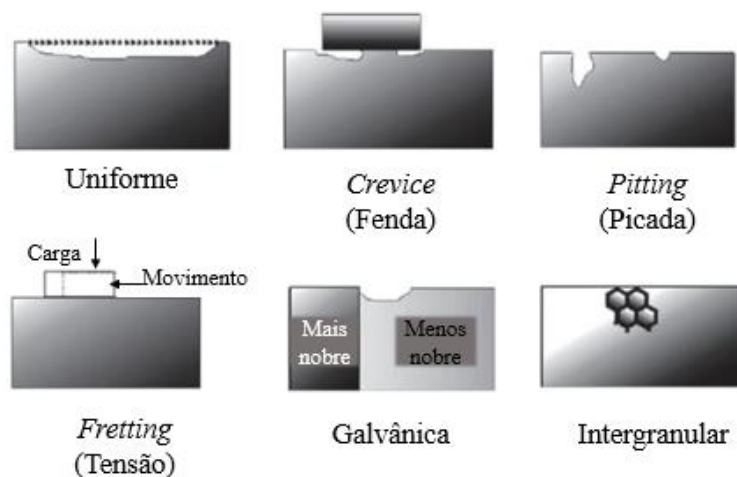


Figura 2.1 – Representação esquemática dos tipos de corrosão. Imagem adaptada de Chaturvedi et al., *An overview of orthodontic material degradation in oral cavity*, 2010.

Podemos ainda falar sobre a **relação existente entre a atividade microbiológica e os fenômenos corrosivos**. A ação dos micróbios ocorre em dois sentidos, por um lado, certas espécies podem metabolizar os metais das ligas, por outro, os produtos derivados da ação microbiana e os processos metabólicos associados a estes microorganismos podem alterar as condições do microambiente (por exemplo diminuindo o pH e, conseqüentemente, promover a corrosão do material)⁵. O resultado da atividade destes seres vivos na peça metálica constata-se através da presença de crateras em forma de cone, com tendência a localizarem-se ao longo das fronteiras de grão. Hoje em dia este

fenómeno não é tão frequente, talvez devido à melhoria das práticas de higiene oral dos pacientes¹⁸. É também conhecido o efeito da atividade enzimática na formação de crateras nas bases de *brackets* ortodônticos⁵.

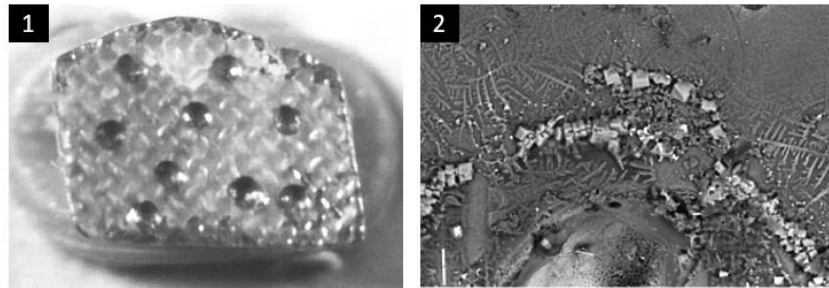


Figura 2.2 – Ação microbiótica nas peças ortodônticas. 1- Ataque de microorganismos na base de um *bracket* de aço inoxidável.¹⁸; 2 – Atividade microbiana num material dentário e presença de complexos cristalinos (estruturas cúbicas).⁵

A corrosão dos materiais ortodônticos e a consequente libertação de iões metálicos podem ainda causar reações alérgicas aos pacientes, mais ou menos graves^{17,18} e descoloração dos tecidos moles adjacentes ao aparelho e dos próprios dentes^{5,17}. Para além disso, a corrosão pode afetar significativamente as propriedades dos materiais, levando a alguma rutura mecânica dos componentes do aparelho¹⁷⁻¹⁹.



Figura 2.3 – Reações alérgicas a metais. 1 – Reação alérgica severa ao níquel após a colocação de aparelho fixo, apresentando eczema e urticária.²⁰; 2 – Descoloração do esmalte após o uso de *brackets* metálicos.⁵; 3 – Reação alérgica no lábio inferior causada pela utilização de aparelho fixo.¹⁸

- Fatores que determinam a resistência à corrosão

Existem alguns fatores cuja influência no processo de degradação e na resistência à corrosão é de assinalar. Em primeiro lugar, temos o fabricante do material e o tipo de processamento que este sofreu ao longo do seu fabrico. Aqui incluem-se também o tipo de liga utilizada, as propriedades dos metais que a compõe e as características da superfície do material. No segundo conjunto de fatores englobam-se todas as condições do ambiente no qual a peça ortodôntica está inserida, nomeadamente o pH, a temperatura e a flora oral. Por fim, interessa ainda referir a importância do uso (e envelhecimento) da liga metálica, assim como os fenómenos consequentes (stress mecânico, fadiga)^{5,10,21-24}.

A resistência à corrosão das ligas de aço inoxidável deve-se maioritariamente à presença do cromo, o qual forma uma camada passiva à superfície do material¹¹. A formação (passivação) e a dissolução (repassivação) desta camada ocorrem de forma espontânea, quando o cromo entra em contacto com o ar ou quando se encontra em ambientes fluidos. Para que a camada passiva de cromo se forme e se mantenha é necessário a presença de oxigénio; por sua vez, a acidez do meio e a existência de iões cloreto no mesmo, podem causar danos na camada. Em ambientes aquosos, a camada passiva de cromo é maioritariamente constituída por um óxido, na região mais próxima da superfície metálica (região mais interior), e por um hidróxido, na região mais próxima do meio ambiente (região mais exterior)⁵.

A adição de níquel nas ligas de aço inoxidável aumenta a sua resistência à corrosão, na medida em que compete com o cromo na formação de sais, e, como possui uma maior afinidade, permite que fique uma maior quantidade de cromo disponível para a passivação. Também a adição de molibdénio mostrou, em estudos anteriores, aumentar a resistência aos fenómenos de corrosão^{2,4,25}. A existência de pontos de soldadura no material contribui para uma maior suscetibilidade à corrosão, uma vez que estas estruturas tendem a emitir correntes eletroquímicas juntamente com a saliva, provocando a libertação de iões metálicos. Além do mais, o aço inoxidável na sua fase austenítica (o mais utilizado em aplicações ortodônticas²⁵) pode perder a sua resistência à corrosão quando submetido a temperaturas entre 400^o C a 900^oC, gama de temperaturas utilizadas em ortodontia para soldadura. A redução da resistência à corrosão das ligas de aço inoxidável, deve-se então à precipitação do carboneto de cromo-ferro nos limites de grão, quando o material é sujeito a essas elevadas temperaturas¹⁷. Pode-se afirmar ainda que,

embora as ligas de aço inoxidável possuam um revestimento devido à camada passiva de crómio, esta camada revela-se menos eficaz na resistência aos fenómenos corrosivos quando comparada com a camada de óxido de titânio formada nos componentes de ligas NiTi⁴.

Quando falamos das ligas NiTi, temos de atribuir a sua resistência à corrosão ao teor de titânio que constitui o material (valores normalmente entre 48% a 54%). O titânio pode formar várias configurações de óxidos (TiO, TiO₂ e Ti₂O₅), sendo que o dióxido de titânio é a forma mais estável e por isso, a que ocorre mais frequentemente⁴. O TiO₂ deve ainda a sua facilidade de formação à baixa energia necessária para a respetiva reação química, podendo formar-se quando o titânio entra em contacto com o oxigénio ou com a água, sendo ambas as reações termodinamicamente muito favoráveis⁵. Apesar de alguns estudos mostrarem que a espessura da camada de óxido aumenta através de uma relação logarítmica com o tempo de imersão no meio dos eletrólitos, outros obtiveram conclusões diferentes, nomeadamente sobre o estado estacionário da camada de TiO₂⁵.

Quando a camada de óxido é danificada ou removida, sendo incapaz de se voltar a formar em certas partes da superfície, a liga de níquel-titânio torna-se tão corrosiva como as outras ligas metálicas. A rugosidade da superfície das ligas que contêm titânio é superior à observada em ligas de aço inoxidável, o que pode servir de célula galvânica na boca, e assim aumentar a suscetibilidade à corrosão¹⁷.

Por vezes, num tratamento ortodôntico, utilizam-se componentes “reciclados” (como por exemplo *brackets*, e fios ortodônticos reciclados). Estes componentes, após serem removidos, são normalmente sujeitos a um tratamento térmico de forma a ficarem higienizados e aptos para uma nova utilização. Sabe-se que, devido ao tratamento pelo qual os *brackets* metálicos passam, as suas propriedades físicas podem sofrer alterações e, conseqüentemente, a resistência à corrosão pode ser afetada. Como anteriormente dito, quando as ligas de aço inoxidável são sujeitas a altas temperaturas, forma-se um precipitado de carboneto de crómio que aumenta a suscetibilidade à corrosão intragranular e enfraquece a estrutura da liga. Desta forma, os *brackets* e fios reutilizados possuem uma menor resistência à corrosão, libertando uma maior quantidade de iões, quando comparados com os mesmos dispositivos ortodônticos não-usados^{24,26}.

Existem três métodos utilizados para o processamento de componentes ortodônticos, nomeadamente por fundição (*casting*), fresagem (*milling*) e moldagem por injeção (*injection molding*)¹⁸. A diferente escolha nas técnicas de processamento, assim como nas técnicas de acabamento e polimento dos materiais, podem influenciar o comportamento à corrosão do material⁴. A microestrutura de um metal é um parâmetro que afeta as suas propriedades mecânicas, como por exemplo a sua resistência à corrosão. Por sua vez, a microestrutura é determinada pela composição da liga, e pelo tratamento térmico (com calor) ou pelo trabalho a frio a que é sujeita, e, uma alteração na microestrutura do metal implica mudanças nas suas propriedades químicas e físicas²⁵. Por exemplo, no processamento dos *brackets*, o trabalho a frio é realizado durante a fresagem e o corte da peça, o que pode induzir o aparecimento de um par galvânico entre a área trabalhada e a não trabalhada, ou seja, pode levar ao aparecimento de duas áreas de metal distintas, o que por sua vez promoverá o processo de corrosão. Também na fase final do processamento, muitos fabricantes recorrem ao polimento eletroquímico (*electropolishing*) para melhorar a estética do componente e diminuir a sua suscetibilidade à corrosão. No entanto, ao sujeitar a peça ao polimento eletroquímico, podem ser induzidas células galvânicas entre as áreas polidas e as não polidas, o que aumentará a vulnerabilidade do material à corrosão⁴.

Estudos anteriores mostram que uma diminuição do pH da boca reduz a resistência à corrosão dos materiais ortodônticos e produz um aumento da libertação de iões metálicos^{21,23}. Os fatores que levam a um pH mais ácido vão desde a dieta de cada indivíduo, até ao seu estado emocional, registando-se com o aumento da ansiedade e do stress, uma redução no pH salivar²². A dieta não contribui somente para a alteração do pH. Uma dieta rica em cloreto de sódio e em bebidas ácidas carbonatadas (como refrigerantes) pode ser uma fonte de agentes corrosivos, assim como a utilização de pastas dentífricas e soluções bucais ricas em flúor. Ainda referente à dieta alimentar, a ingestão de alimentos ricos em níquel, como vegetais, leguminosas e cereais, pode contribuir para um aumento de iões Ni presentes na saliva²¹.

Com a utilização do aparelho ortodôntico fixo, os procedimentos de higiene oral regular tornam-se mais delicados de realizar, pelo que, na maioria dos indivíduos, se acumula placa bacteriana nos componentes do aparelho e na superfície dos dentes. À medida que esta placa se torna cada vez mais espessa, com o decorrer do tempo, as

condições anaeróbicas na cavidade oral são favorecidas, o que também promove a corrosão dos metais^{27,28}.

Para reduzir a libertação de íons metálicos derivada de processos corrosivos, têm-se estudado algumas técnicas, como o revestimento *epoxy* de fios NiTi ou a criação de novas ligas NiTi que possuam cobre na sua constituição^{8,17}. Também se aconselha aos pacientes que colocam aparelho fixo que reduzam o teor de sal na sua dieta e que tomem especial cuidado na sua higiene oral¹⁷. Porém, a corrosão é um fenómeno inevitável no ambiente oral, e por isso torna-se essencial compreender os efeitos que os seus produtos desencadeiam no organismo humano.

2.2. Efeitos do níquel na saúde humana

De entre os íons metálicos libertados, existe um ião que levanta especial preocupação, o níquel (Ni). O níquel é um oligoelemento mineral que desempenha um papel importante na saúde do corpo humano, auxiliando na absorção de ferro e participando no metabolismo da adrenalina e da glucose. Para além disso, ajuda a fortalecer a força óssea e desempenha um papel na produção de células sanguíneas⁶, sendo por isso aceite uma quantidade de 100-800 µg/dia na dieta do ser humano^{12,27}.

Apesar de em estudos anteriores se observar uma diminuição de alergia no contacto com o níquel em idades mais jovens, foram reportadas reacções de dermatite, asma e hipersensibilidade induzida pelo níquel em procedimentos dentários, reportando ainda hiperplasia gengival, descamação labial, irritações, lesões eritematosas e outras reacções resultantes da resposta inflamatória desencadeada pela corrosão dos aparelhos ortodônticos e pela conseqüente libertação de íons Ni⁷. A probabilidade de ocorrer uma reacção ao níquel em pacientes que realizem tratamento ortodôntico estima-se ser de 1:100, estando também evidenciado que a própria pele sofre as mesmas reacções quando em contacto com aplicações metálicas, ocorrendo ainda mais frequentemente do que as reacções intraorais⁹. Mais ainda, estudos mostraram que 31,9% das mulheres e 20,7% dos homens, numa amostra de 403 pessoas revelaram uma reacção positiva ao sulfato de níquel²⁹.

O níquel é então considerado um forte sensibilizador imunológico e um elemento que desencadeia efeitos citotóxicos e mutagênicos^{11,16,30}. Estudos *in vitro* mostraram que uma exposição prolongada ao níquel, ainda que em concentrações baixas, pode alterar a atividade metabólica das células³¹. Sabe-se que uma concentração tão baixa como 2,5 ng/ml pode afetar a quimiotaxia de células imunitárias⁷, e, mesmo que em níveis não-tóxicos, a presença de níquel pode causar danos diretos nas bases do ADN e levar à cisão das ligações que unem as duas cadeias. Também indiretamente, as alterações infligidas pelo níquel levam à inibição de enzimas responsáveis por consertar a rutura nas ligações do ADN^{7,9,21}. Assim, torna-se importante definir a quantidade de iões metálicos libertados durante o tratamento ortodôntico e a sua influência no organismo humano.

2.3. *In vitro* vs *in vivo*

Ao longo dos anos têm sido realizados vários estudos que têm como principal objetivo avaliar a biocompatibilidade dos aparelhos ortodônticos e das ligas metálicas que os compõe, utilizando como método de avaliação a variação da concentração de iões metálicos em saliva. Estes estudos podem ser colocados em duas categorias diferentes, podendo ser estudos *in vitro* ou estudos *in vivo*.

Os estudos *in vitro* descrevem normalmente as concentrações de iões metálicos em soluções de NaCl e/ou em saliva artificial. Têm como vantagem a sua rapidez e simplicidade de execução, permitindo ainda assegurar o controlo das condições de laboratório; porém, estes estudos não refletem exatamente os fenómenos que ocorrem na boca³⁰, falhando na simulação do ambiente intraoral. A diferença deve-se a vários fatores, nomeadamente à ausência das variações extremas que ocorrem em ambiente oral (de pH, temperatura, stress) e que afetam significativamente o potencial de corrosão. Sabe-se por exemplo que o potencial de corrosão do aço inoxidável aumenta em meios ácidos. Para além disso, *in vitro* não se consegue simular a ligação *bracket*-fio, que, como são ambos componentes móveis podem induzir corrosão *fretting*. O movimento do fio e a fricção deste com os *brackets* pode levar a um aumento da corrosão podendo promover a libertação de iões metálicos do aparelho ortodôntico fixo⁷.

Também a ausência da complexa flora intraoral e da acumulação de placa e dos produtos que dela derivam constitui uma das principais diferenças. Por fim, a libertação de iões a longo-prazo não é tida em conta, uma vez que se observa que em solução a libertação de Ni a partir dos fios atinge rapidamente o equilíbrio. Desta forma a fadiga, fator que acelera a taxa de libertação e que promove a degradação do material, não é avaliada⁵.

Já *in vivo*, o substrato a analisar é geralmente saliva, sangue ou urina, existindo ainda estudos que utilizam células da mucosa oral^{15,30}. Estes estudos utilizam normalmente biomarcadores de exposição que não refletem a exposição crónica aos metais, sendo a recolha feita momentaneamente, e não correspondendo a uma avaliação dinâmica. Desta forma, os fatores que alteram a concentração momentânea de iões metálicos não são tidos em conta, tais como a dieta (comida e bebida, que podem alterar as condições ácidas) e como a utilização de produtos de higiene oral (pasta dentrífica)³⁰. No entanto, a grande vantagem dos estudos *in vivo* quando comparados aos estudos *in vitro* diz respeito ao facto de registarem as concentrações de iões níquel no ambiente oral natural, onde ocorrem todos os eventos e fenómenos que levam à variação da sua concentração.

• 2.3.1. Estudos *in vitro*

Encontramos na literatura diversos estudos *in vitro* que se debruçam sobre a libertação de iões metálicos provenientes de componentes de aparelhos fixos ortodônticos, ainda que as questões a que estes estudos se propõem responder variem entre eles.

Temos estudos que pretendem avaliar a libertação de iões metálicos de diferentes fabricantes e/ou diferentes composições da mesma peça^{11,26,32-36}, estudos que pretendem estudar a influência dos diferentes meios de imersão na corrosão dos materiais ortodônticos, seja utilizando saliva artificial com diferentes pH, soluções de NaCl ou até mesmo recorrendo a vários antissépticos bucais^{23,26,37}, e temos ainda estudos que visam observar potenciais diferenças entre materiais novos (tal como chegam da fábrica) e materiais “reciclados” (materiais sujeitos a um tratamento térmico para ficarem aptos a ser utilizados novamente)^{26,33,35}.

Alguns estudos destinam-se a observar possíveis variações entre as concentrações de íons metálicos libertados *in vitro* em diferentes momentos ou após um único intervalo de tempo (maioritariamente ao fim de 28-30 dias), utilizando um aparelho fixo simulado (ou parte dele). Procuram dessa forma avaliar uma possível toxicidade dos valores obtidos e assim poder especular sobre a libertação de íons que ocorre *in vivo* durante o tratamento ortodôntico^{3,23,33,34,38}. De uma maneira geral os estudos concluem que os resultados obtidos se situam abaixo do limite máximo de ingestão diária dos íons estudados, e que por isso não se pressupõe a existência de toxicidade, ainda que se observe uma clara diferença entre os valores iniciais e finais das espécies estudadas. Nos artigos que estudam o comportamento da concentração de íons Ni e cujo o período de estudo é mais de dois meses, observa-se que a máxima libertação ocorre após o primeiro mês de imersão, decaindo ligeiramente e estabilizando nos momentos posteriores³⁴.

Podemos ainda retirar outras conclusões através de artigos *in vitro*, como a maior suscetibilidade à corrosão provocada por um pH mais ácido^{23,26} e a maior vulnerabilidade dos materiais reciclados ao ataque corrosivo^{24,26,33}.

As diferenças relativas à metodologia abraçada por cada artigo, como a utilização de várias soluções de imersão (diferente composição química e diferente pH), de diferentes condições de estudo (condições estáticas ou dinâmicas), de diferentes objetos de estudo (peças de marcas e materiais distintos) e ainda de diferentes procedimentos experimentais (diferente número de peças por unidade de volume), tornam difícil a comparação dos resultados dos estudos *in vitro*. Para além disso, as limitações referidas no ponto 2.3. são assinaladas em todos os estudos anteriores, como é exemplo a saturação observada no meio de imersão¹ que pode influenciar a libertação de íons e levar a obter resultados que se distanciam mais ainda da realidade do tratamento ortodôntico³².

• 2.3.2. Estudos *in vivo*

Como referido anteriormente, na literatura encontramos vários estudos cujo propósito é estudar a biocompatibilidade dos materiais ortodônticos e a exposição dos pacientes que colocam aparelho ortodôntico fixo aos íons metálicos libertados pelo mesmo durante o tratamento.

Partindo-se de uma pesquisa bibliográfica na base de dados PUBMED/MEDLINE, utilizando como palavras-chave “orthodontic appliances and (metal release or nickel) and (in vivo or salivary) not in vitro”, obtiveram-se 68 publicações. Dos resultados obtidos apenas 15 artigos reuniram os critérios de seleção, ou seja, apenas 15 publicações diziam respeito a estudos *in vivo* da libertação de iões metálicos a partir de aparelhos fixos ortodônticos, cujo biomarcador de exposição utilizado se tratava de saliva.

Nos vários estudos podem-se encontrar duas abordagens. A primeira abordagem utiliza como método a divisão dos pacientes em dois grupos: o grupo controlo, constituído por indivíduos que não possuem materiais ortodônticos (entre 7 a 28 indivíduos), e o grupo experimental que engloba os pacientes que se encontram em tratamento ortodôntico (entre 15 a 28 pacientes). A segunda abordagem utiliza um grupo apenas (entre 10 a 100 pacientes), que pode ser subdividido em alguns casos consoante o material que os pacientes utilizam^{8,10,16}, e a partir do qual se analisa a quantidade de metal presente na saliva de cada indivíduo, antes e durante as várias fases do tratamento. Para a análise das amostras são utilizadas várias técnicas, entre as quais Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-AES ou ICP-OES - *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy*)⁴⁰, Espectrometria de emissão atômica com plasma indutivo acoplado (ICP-MS - *Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy*)^{7,9,39}, Espectroscopia de absorção atômica (EAA ou AAS - *Atomic Absorption Spectrometry*)^{8,10,12,13,16,21,29,41}, Espectroscopia de absorção atômica com câmara de grafite (GFAA)^{6,42} ou Espectroscopia de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS)^{27,43,44}.

Segue-se uma descrição mais detalhada de cada um dos resultados selecionados na pesquisa.

Kerosuo et al. (1997)¹³ investigaram o teor de níquel e de crómio na saliva de indivíduos com diferentes tipos de aparelhos fixos. O grupo de estudo era constituído por 47 pacientes que dariam início a um tratamento ortodôntico, não existindo um grupo controlo em separado. Recolheram-se amostras de saliva em quatro momentos: antes da colocação do aparelho fixo, após 1-2 dias, após 7 dias e após 30 dias do início do tratamento. Depois de analisadas as concentrações de Ni e Cr verificou-se que as diferenças entre as várias fases do tratamento não se mostravam significativas, concluindo

o autor que a concentração de níquel e de crómio não teriam aumentado significativamente como consequência do tratamento ortodôntico.

Kocadereli et al. (2000)⁴³ também estudaram os níveis de níquel e de crómio na saliva de pacientes com aparelho ortodôntico fixo. Neste caso, um grupo de 45 indivíduos foi subdividido em 3 grupos: um grupo com 15 pacientes que possuíam arco superior e arco inferior do aparelho fixo, um grupo com 15 pacientes apenas com arco superior do aparelho e por fim um grupo com 15 indivíduos que não se encontrava a realizar tratamento ortodôntico (grupo controlo). Foram recolhidas amostras de saliva antes da colocação do aparelho fixo e após 1 semana, 4 semanas e 12 semanas. No final do estudo, não foram encontradas diferenças significativas entre as salivas do grupo controlo e do grupo experimental.

Agaoglu et al. (2001)²⁹ analisaram amostras de saliva e de sêrum de 100 pacientes com aparelho ortodôntico fixo, com o objetivo de determinar os níveis de níquel e de crómio presentes. Os 100 pacientes foram divididos em 5 grupos coincidentes com 5 fases específicas do tratamento, isto é, no primeiro grupo foram recolhidas amostras antes da colocação do aparelho, no segundo, no terceiro, no quarto e no quinto grupos, foram recolhidas amostras 1 semana, 4 semanas, 1 ano e 2 anos após a colocação, respetivamente. Observaram-se diferenças nas concentrações das salivas dos vários intervalos, sendo assinalada a concentração máxima do níquel após as primeiras 4 semanas de tratamento; posteriormente os níveis de níquel diminuíram, aproximando-se dos valores registados antes do tratamento, e concluiu-se que os níveis de níquel 2 anos após o tratamento e o início do mesmo, não eram significativamente diferentes.

Eliades et al. (2003)⁴⁰ analisaram a saliva de pacientes com aparelho ortodôntico fixo, procurando avaliar a concentração de iões metálicos (níquel, crómio e ferro). Constituiu-se um grupo de 17 pacientes que realizaram tratamento ortodôntico durante cerca de 1 ano, e um grupo controlo de 7 indivíduos não sujeitos ao tratamento. Não se observaram diferenças significativas entre o grupo controlo e o grupo de pacientes ao fim de um ano de tratamento, independentemente do elemento metálico em questão.

Matos de Souza et al. (2006)¹⁰ também avaliaram os níveis de níquel, crómio e ferro presentes na saliva de pacientes com aparelho ortodôntico fixo. Um grupo de 30 pacientes foi subdividido em 3 grupos, com 10 pacientes cada, de acordo com o tipo de liga de aço inoxidável e o fabricante dos *brackets* colocados. Um dos grupos possuía

brackets com a liga AISI 303 da 3M/Unitek, o segundo grupo utilizava liga AISI 316L da American Orthodontics e o terceiro grupo tinha na constituição dos seus *brackets* a liga AISI 316L da Dentaurum. As amostras de saliva foram recolhidas em momentos específicos: antes de colocar o aparelho fixo, 10 minutos após a sua colocação, e 1 dia, 7 dias, 30 dias e 60 dias após o início do tratamento. No que diz respeito à concentração de níquel, foram encontradas diferenças significativas entre os vários intervalos, registando o seu valor máximo 10 minutos após a colocação do aparelho. Quanto aos vários tipos de *brackets* estudados, não foram observadas diferenças significativas entre os mesmos.

Petoumeno et al. (2008)⁹ investigaram a libertação de níquel em fios Níquel-Titânio. Para tal, analisou a saliva de 18 pacientes com aparelho ortodôntico fixo em diversas fases do tratamento. Recolheram-se amostras antes da colocação de qualquer componente ortodôntico, após a colocação dos *brackets* e bandas, 2 semanas após a colocação das bandas e antes de colocar o fio NiTi, imediatamente após colocar o fio NiTi, e 4 e 8 semanas após a colocação do fio. Observou-se que a concentração de níquel aumenta ligeiramente com a colocação dos *brackets* e bandas (sendo um aumento significativo em relação ao momento inicial, e registando-se nesta fase a maior concentração de Ni) e com a colocação do fio (existindo diferenças significativas nos momentos anterior e posterior à colocação). Observou-se ainda que nas semanas posteriores à colocação do fio a concentração de níquel decresce, atingindo após 10 semanas valores semelhantes aos obtidos antes de iniciar o tratamento. Assim, apesar de se observarem diferenças significativas antes e depois de colocar materiais constituídos por níquel (*brackets*, bandas, fio), não se verificam diferenças significativas entre os valores da concentração de níquel antes e depois de realizado o tratamento ortodôntico.

Preet Singh et al. (2008)⁴¹ procuraram estimar a quantidade níquel e de crómio presentes na saliva de pacientes com aparelho ortodôntico fixo, e obteve conclusões que diferem com os estudos anteriormente descritos. Num grupo composto por 10 pacientes fizeram-se recolhas de saliva em 3 fases específicas do tratamento: antes da colocação do aparelho, e 1 e 3 semanas após esse momento. A maior libertação de níquel registou-se 1 semana após o início do tratamento, decrescendo depois gradualmente até à terceira semana. Mesmo com este decréscimo, a concentração medida 3 semanas após a colocação do aparelho revelou-se superior à concentração medida antes de iniciar o tratamento, sendo a diferença entre ambas significativa.

Sahoo et al. (2010)¹⁶ avaliaram os níveis salivares de níquel e de crómio em pacientes com *brackets* convencionais e autoligáveis. Dividiu-se um total de 20 pacientes em 2 grupos distintos, cada um com 10 pacientes, sendo que num dos grupos se englobaram os pacientes que possuíam *brackets* convencionais e no outro grupo os pacientes com *brackets* autoligáveis. As recolhas da saliva foram efetuadas em vários estádios do tratamento: antes da colocação do aparelho fixo e após 1 dia, 7 dias e 30 dias. Verificou-se que a libertação de ião Ni aumentou progressivamente desde o primeiro dia até ao fim de 7 dias, decrescendo a partir deste momento. Observou-se ainda uma maior libertação de níquel nos *brackets* autoligáveis do que nos convencionais. Comparando os valores iniciais e os valores dos restantes intervalos, concluiu-se que as diferenças registadas entre eles se consideram significativas, em ambos os tipos de *brackets*.

Amini et al. (2011)²¹ estudaram a libertação de iões metálicos de aparelhos ortodônticos fixos. Utilizando um grupo experimental composto por 28 pacientes com aparelho fixo, e um grupo controlo composto pelos respetivos irmãos/irmãs do mesmo género (28 no total portanto), comparou-se a saliva de ambos os grupos 12 a 18 meses após o início do tratamento. Observou-se uma notável variação entre o teor de níquel no grupo experimental e no grupo controlo, sendo as diferenças entre ambos consideradas significativas.

Mais tarde, Amini et al. (2012)¹² voltaram a investigar os efeitos a longo prazo da utilização de aparelho ortodôntico fixo, avaliando os níveis de níquel e de crómio. Recolheram-se amostras de saliva de um grupo de 20 pacientes, em estádios específicos do tratamento: antes da colocação do aparelho fixo, e 6 e 12 meses após esse momento. Registaram-se variações notáveis a nível inter-individual, mas olhando para a média global, as alterações na concentração do níquel foram ligeiras. Verificou-se um ligeiro aumento da concentração de níquel até aos primeiros 6 meses após o início do tratamento, decrescendo a partir desse momento. Assim, após 12 meses os níveis de níquel registados são inferiores aos níveis de controlo. Concluiu-se assim que as diferenças na concentração de níquel ao longo do estudo não se mostravam significativas.

Ousehal et al. (2012)³⁹ registaram as alterações nos níveis de níquel na saliva de pacientes com aparelho ortodôntico fixo. Para tal, analisou a saliva de 16 pacientes em determinadas fases do seu tratamento: antes da colocação do fio NiTi, imediatamente após a colocação do mesmo, e 8 semanas após o início do processo. Observaram-se diferenças significativas entre o momento anterior e imediatamente posterior à colocação

do fio. Constatou-se ainda um decréscimo na concentração de níquel após as 8 semanas, e verificou-se que, comparando o teor de níquel nesse momento com o observado antes de iniciar o tratamento, as diferenças não eram consideradas significativas.

Também Yassaei et al. (2013)⁴² estudaram os níveis de níquel e de crômio libertados no decorrer do tratamento de pacientes com aparelho fixo. Num grupo de 32 pacientes fizeram-se quatro recolhas de saliva, em quatro intervalos de tempo diferentes: antes da colocação do aparelho fixo, e 20 dias, 3 meses e 6 meses após esse momento. Foi possível verificar um aumento de 0,8 µg/l na concentração de níquel 20 dias após o início do tratamento, observando-se nesta fase o maior valor obtido para a quantidade de íon Ni. Porém, as diferenças entre os vários momentos de estudo não se revelaram significativas.

Dwivedi et al. (2015)⁶ investigaram a liberação de íons níquel e íons crômio na saliva de pacientes como consequência da utilização de aparelhos ortodônticos fixos. Foram recolhidas amostras das salivas de um grupo de 13 pacientes, no momento anterior à colocação do aparelho fixo, e posteriormente passado 1 semana, 4 semanas e 12 semanas. Comparando todos os intervalos de tempo, as diferenças entre as concentrações mostraram-se todas significativas exceto a diferença entre a concentração no primeiro mês e no terceiro. Registou-se o máximo de teor de níquel 1 semana após a colocação do aparelho, decaindo gradualmente a partir desse momento. Apesar desta diminuição, os níveis registados ao fim de 12 semanas revelaram ser superiores aos registados antes de iniciar tratamento, sendo a diferença entre ambos significativa. Este estudo refere ainda que, após a mudança de fio de NiTi para um fio de aço inoxidável, 1 mês antes da última recolha de saliva, os níveis de níquel não mostraram grande diferença quando comparados com os níveis da recolha anterior, o que pode significar que a maior liberação de íons níquel resulta da corrosão de *brackets*, bandas e outros elementos que não o fio.

Nayak et al. (2015)⁷ também utilizaram a saliva como biomarcador para quantificar os íons níquel e íons crômio libertados a partir de aparelhos fixos durante o tratamento ortodôntico. Num conjunto de 30 pacientes fizeram-se três recolhas de saliva: antes de colocar o aparelho, após se realizar o ajuste do fio, e 10 a 12 meses após o início do tratamento. Conseguiu-se observar um aumento da concentração de níquel após o ajuste do fio. Porém, após 10 a 12 meses o teor de níquel presente situava-se em níveis inferiores aos registados no momento inicial (no nível “controlo”), ainda que a diferença calculada não fosse significativa.

Mais recentemente, Masjedi et al. (2016)⁸ também avaliaram através da saliva os efeitos da utilização de aparelhos fixos no tratamento ortodôntico. Este estudo compreende ainda uma comparação entre três tipos de fio utilizados, sendo eles o fio convencional NiTi, o fio NiTiCu e o fio NiTi revestido com *epoxy*. Assim, dividiram-se 42 pacientes em três grupos, cada um com 14 pacientes, sendo que em cada grupo todos os indivíduos utilizavam o mesmo tipo de fio, e entre grupos o tipo de fio colocado diferia. Recolheram-se amostras de saliva antes da colocação do aparelho fixo, e 60 dias após esse momento. Verificou-se um aumento significativo da concentração de níquel desde o início do tratamento e 60 dias após o mesmo, em todos os tipos de fio estudados. Observou-se ainda que a taxa de libertação de íons níquel revelou ser menor em fios NiTi revestidos com *epoxy*, seguidos pelos fios NiTiCu. Os fios convencionais NiTi mostraram possuir a maior taxa de libertação de níquel. Apesar de se observarem diferenças na libertação de íons níquel nos diferentes tipos de fio, essas não se apresentam como significativas, o que leva a concluir que a libertação de íons deriva não só da degradação do fio, mas dos danos provocados pela combinação do fio com os *brackets*.

Ainda numa pesquisa cruzada, Gjerdet et al. (1991)⁴⁴ compararam as concentrações de níquel em saliva de 34 pacientes nos momentos anteriores à colocação do aparelho ortodôntico e após 3 semanas (no mínimo), tendo sido recolhido em alguns casos (em 6 pacientes) amostras de saliva no momento imediatamente posterior à colocação. Não se registaram diferenças significativas entre os dois momentos do tratamento, tendo-se observado diferenças significativas apenas quando comparadas as amostras iniciais e as recolhidas poucos momentos após a colocação do aparelho.

Contrariamente, Fors et al. (2006)²⁷, encontrou diferenças significativas entre a saliva de 24 pacientes submetidos ao tratamento ortodôntico 16 meses após a colocação e a saliva do grupo controlo, constituído por 24 pacientes sem qualquer componente do aparelho fixo durante esse mesmo período de tempo.

3. Materiais e métodos

3.1. Materiais

Estudo *in vivo*

Após obter a aprovação da Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra procedeu-se à seleção da amostra de pacientes.

O estudo *in vivo* contou com a colaboração de 17 indivíduos (Tabela 3.1), que após explicação dos objetivos do estudo consentiram a sua participação. Os sujeitos, com idades compreendidas entre os 12 e os 46 anos, correspondente a uma média de idades de $20,00 \pm 8,01$ anos, preparavam-se para iniciar tratamento ortodôntico, sendo que a colocação do respetivo aparelho fixo decorreu em sincronia com o presente estudo. Os aparelhos fixos colocados nos pacientes incluíam, em média, 10 *brackets*, 2 tubos, 2 bandas, 1 fio. O número de ligaduras metálicas foi variável, consoante a especificidade de cada paciente. As ligas metálicas utilizadas neste estudo foram associadas a dois grupos de ligas metálicas, o **Material 1** (Tabela 3.2) e o **Material 2** (Tabela 3.3), de acordo com o fornecedor comercial.

Tabela 3.1 - Amostra dos indivíduos no estudo *in vivo*.

Paciente	Sexo	Peso (kg)	Idade	Material
P1	M	65	22	1
P2	F	63	23	1
P3	M	60	17	1
P4	F	50	14	1
P5	M	66	18	1
P6	M	66	18	1
P7	F	52	14	1
P8	F	57	19	1
P9	F	63	18	1
P10	F	70	17	1
P11	F	112	46	1
P12	F	52	18	1

P13	M	60	16	2
P14	M	90	15	2
P15	F	63	22	2
P16	F	60	31	2
P17	F	50	12	2

Tabela 3.2 – Características do conjunto de **Material 1**, onde todas as peças são da marca Dentaureum.

Componente	AISI/DIN	Composição (% pd.)							
		Ni	Cr	Mo	Mn	C	Si	Outros	Balance
Banda	305/1.4303	11-13	17-19	-	≤2	≤0,06	≤1	≤0,185	Fe
<i>Bracket</i>									
Tubo	316L/1.4404	10-13	16,5-18,5	2-2,5	≤2	≤0,3	≤1	≤0,185	Fe
<i>Ligadura</i>									
		Ni	Fe	Al	C	O	H	N	Balance
Fio 3.002	NiTi	50-60	≤0,5	≤0,1	≤0,1	≤0,1	≤0,1	≤0,1	Ti

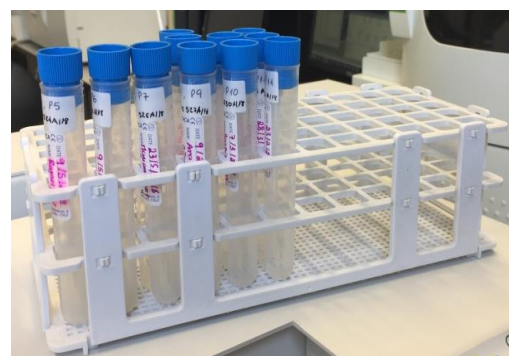
Tabela 3.3 – Características do conjunto de **Material 2**, onde existem vários fornecedores.

Componente	AISI/DIN	Fornecedor	Composição (% pd.)						
			Ni	Cr	Cu	Mn	C	Si	Balance
<i>Bracket</i>	303 SE/1.4305	Ormco	8-10	17-19	-	2	0,15	1	Fe
Banda	305/1.4303	Ormco	10,5-13	17-19	-	2	0,12	1	Fe
Tubo	630/1.4542	Morelli	4	17	4	1,5	0,07	0,7	Fe
Ligadura	Fabricante e composição iguais às do Material 1 (Tabela 3.2).								
Fio	NiTi	RMO	55	-	-	-	-	-	Ti

Como foi mencionado anteriormente, recolheram-se cinco amostras de saliva por cada paciente, correspondentes a cinco tempos diferentes durante o tratamento (Tabela 3.4). De referir que o período máximo foi de três meses, devido à limitação temporária do presente trabalho. Todos os pacientes, após bochechar a boca com água durante aproximadamente 20 segundos, cuspiram a saliva não-estimulada (~2 a 5 ml) para um tubo de polipropileno higienizado. Todas as amostras ficaram armazenadas num congelador (a -20° C) até à análise por ICP-OES.

Tabela 3.4 – Tempos de recolha *in vivo*.

Tempo	
t1	momento imediatamente anterior à colocação do aparelho fixo
t2	2 dias após a colocação do aparelho fixo
t3	1 semana após o início do tratamento
t4	4 semanas após o início do tratamento
t5	12 semanas após o início do tratamento



Foram ainda analisadas por SEM/EDS alguns fios NiTi utilizados durante algumas semanas por pacientes do estudo. Como a média do tratamento clínico se situa em geral nos 2 anos, foram analisados *brackets* e tubos, iguais aos do **Material 2**, mas cuja utilização clínica correspondeu a um paciente que não se encontrava na nossa amostra.

Estudo *in vitro*

O método *in vitro* consistiu na colocação de um número variável de componentes do aparelho fixo (Tabela 3.5) em frascos distintos contendo saliva artificial (Tabela 3.6) à temperatura ambiente durante 30 dias. Com base na razão massa/volume utilizada por outros autores em estudos similares, aferiu-se uma relação de 0,0238 mg/ml entre a massa do componente do aparelho e o volume de saliva artificial. De referir que as peças

selecionadas possuíam as características do material mencionado neste estudo como **Material 2** (Tabela 3.3).

Tabela 3.5 – Condições utilizadas no estudo *in vitro*.

Componentes	Volume de saliva (ml)
5 brackets	15
1 banda	17
3 tubos	18
10 ligaduras	10
1 fio	35




Tabela 3.6 – Composição da saliva artificial utilizada neste estudo.

Composição	Concentração (g/L)
NaCl	0,400
KCl	0,400
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,795
Na ₂ PO ₄ . 2H ₂ O	0,780
Na ₂ S . 9H ₂ O	0,005
CO(NH ₂) ₂ (ureia)	1,000
H ₂ O (água destilada)	1 litro

As amostras de saliva artificial, num total de 10, foram divididas em dois grupos, correspondentes a dois valores de pH diferentes, muito ácido (pH=2,3) e o normal salivar (pH=6,7). De modo a tentar comparar o comportamento *in vivo* com o *in vitro*, as bases dos *brackets* e dos tubos foram revestidas com resina Transbond™ da marca 3M, utilizada habitualmente nas práticas ortodônticas para conseguir a adesão da peça ao dente, como ilustrado na Figura 3.1. Após ensaio de imersão que decorreu ao longo de 30 dias, os componentes foram limpos com álcool etílico (96%) e banho de ultrassom durante cerca de 10 minutos. Posteriormente a saliva foi armazenada a -20° C e os materiais guardados até à sua análise por ICP-OES e por SEM/EDS, respetivamente.

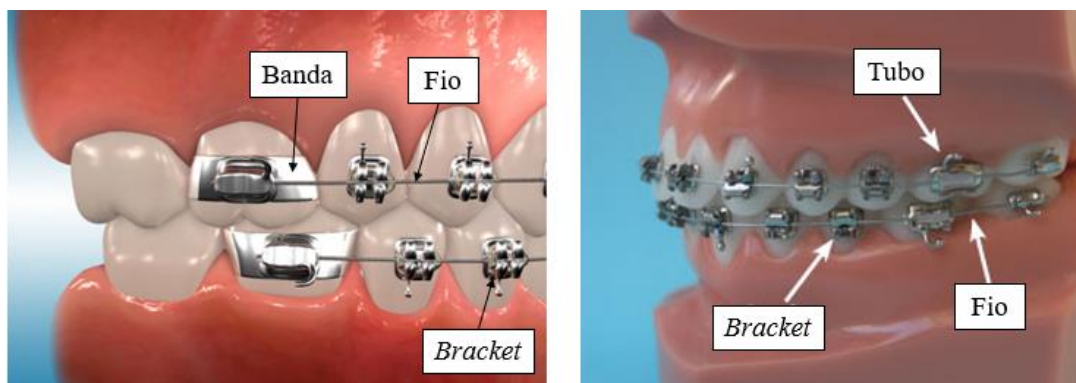


Figura 3.1 – Componentes do aparelho fixo. Imagens adaptadas de <http://www.habernorthodontics.com/glossary-of-orthodontic-appliances.php> (esquerda) e de <https://www.cmsfabriek.nl/> (direita).

3.2. Técnicas de análise

Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES)

A escolha do método analítico que melhor se adequa à análise das amostras em estudo deverá ser efetuada tendo em conta diversos fatores, nomeadamente a quantidade de amostra disponível, o limite de deteção, a exatidão e precisão do método analítico, as interferências analíticas, o tempo necessário para analisar cada amostra e o custo da análise⁴⁵. Como referido anteriormente, as amostras de saliva (quer resultantes das colheitas dos casos clínicos quer as soluções artificiais) foram analisadas por ICP-OES.

A Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado tornou-se numa das técnicas de espectrometria de emissão mais utilizadas nos últimos tempos⁴⁶. De uma forma simplificada podemos explicar o funcionamento do ICP-OES como resultado da medição da intensidade da luz emitida pelos elementos da amostra que são introduzidos na fonte do ICP. A intensidade medida é comparada com intensidades padrão de concentrações conhecidas de forma a obter a concentração do elemento de interesse na amostra⁴⁵.

À temperatura ambiente os átomos da amostra que pretendemos analisar encontram-se no seu estado fundamental (estado de mais baixa energia). Ora, num ambiente com temperaturas mais elevadas (como as utilizadas em ICP) os átomos são capazes de absorver radiação, de tal forma que transitam para níveis de energia mais elevados (transitam pois para estados excitados). Como a energia envolvida em cada

transição é bem definida e como o tempo de vida do átomo excitado é efêmero, este regressa ao seu estado fundamental acompanhado de emissão de radiação eletromagnética. É precisamente a intensidade desta radiação, que possui um comprimento de onda específico, que é medida e utilizada para calcular a concentração da amostra^{47,48}. O comprimento de onda é determinado a partir da relação $E = \frac{hc}{\lambda}$, onde E é a energia libertada na desexcitação (energia dos fótons libertados), h é a Constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34} J s$), c é a velocidade da luz ($3 \times 10^8 m/s$) e λ é o comprimento de onda da linha do espectro de emissão relativa a uma certa transição⁴⁷.

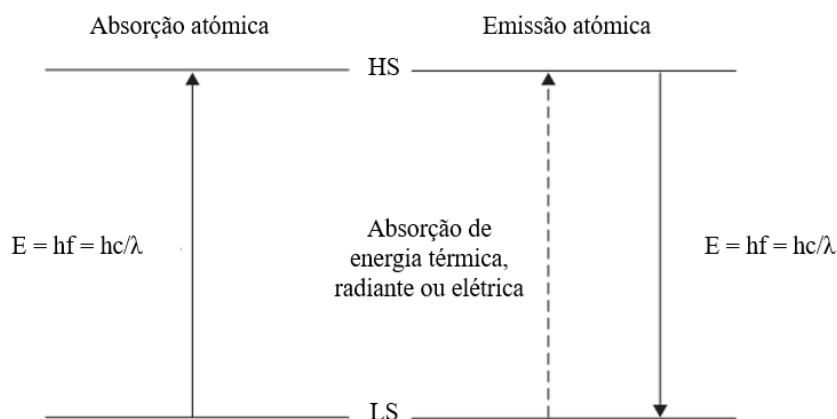


Figura 3.2 – Esquema das energias de transição da absorção e emissão atômicas: LS, estado de menor energia ou estado fundamental (*lower-energy state*); HS, estado de mais alta energia (*higher-energy state*). Adaptada de Dean, J. R., *Practical Inductively Coupled Plasma Spectroscopy*, Northumbria University, Newcastle, UK, 2005.

O equipamento de ICP-OES inclui: sistema de introdução de amostra (bomba peristáltica, nebulizador e câmara de nebulização), *torch*, gerador de ráiofrequências, espectrómetro, detetor e interface informática.

As amostras a analisar estão, normalmente, sob forma aquosa e possuem uma diluição conhecida. A solução é aspirada para o nebulizador que a transforma em aerossol. O aerossol passa, de seguida, para o plasma composto por Árgon parcialmente ionizado⁴⁹. No ICP-OES o plasma é gerado numa *torch* de quartzo a partir de uma bobine de indução arrefecida, na qual flui uma corrente alternada de ráiofrequências. Como consequência, gera-se um campo magnético alternado que acelera eletrões livres que, posteriormente, ao colidirem com os átomos de Árgon provocam a sua ionização e dão origem a um plasma estável e extremamente quente (podendo atingir os 10000 K)⁵⁰. Devido às elevadas temperaturas do sistema, a amostra que se encontrava vaporizada é agora ionizada e transformada em átomos e iões que sofrem reações de excitação,

acompanhadas da emissão de radiação com comprimentos de onda característicos, resultante do retorno das espécies excitadas ao estado de mais baixa energia. A intensidade da radiação nos comprimentos de onda associados a cada elemento é proporcional à concentração do mesmo⁵¹.

O feixe de radiação emitido pelos átomos precisa de ser convertido num sinal elétrico para que possa ser quantificado, por isso o feixe é separado por uma rede de difração (espectrómetro) e o comprimento de onda específico da intensidade das linhas de emissão selecionadas é então detetado e transformado por fotomultiplicadores (PMT). O sinal que daqui resulta é tratado informaticamente e a concentração do elemento da amostra é determinada comparando a intensidade de sinais de emissão de amostras padrão (amostras com concentrações conhecidas do elemento em questão)^{45,51}.

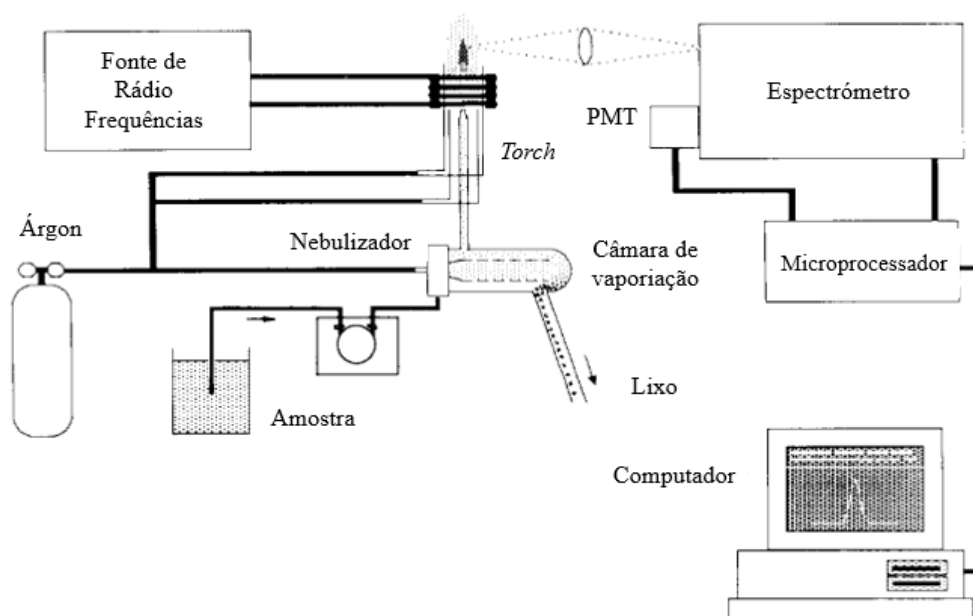


Figura 3.3 – Montagem dos componentes principais de um típico instrumento ICP-OES. Adaptada de C. B. Boss. and K. J. Fredeen , *Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*, 3ª edição, 2004.

Uma das principais vantagens do ICP-OES prende-se com as propriedades de excitação das elevadas temperaturas utilizadas neste método. As altas temperaturas como fonte de excitação conseguem gerar um grande número de diferentes níveis energéticos para vários elementos ao mesmo tempo, pelo que todos os átomos e iões excitados conseguem emitir a sua radiação característica praticamente ao mesmo tempo, contribuindo para a flexibilidade e capacidade de medição do comprimento de onda de emissão de diferentes elementos. Por outro lado, esta característica pode tornar-se numa

desvantagem uma vez que à medida que o número de comprimentos de onda de emissão aumenta, a probabilidade de ocorrerem interferências devido à proximidade das linhas de emissão aumenta também⁴⁸. Para além disso, o ICP-OES pode ser utilizado para analisar e quantificar a maior parte dos elementos da tabela periódica. Possui ainda uma ampla gama dinâmica de concentrações, conseguindo medir tanto concentrações vestigiais como valores muito elevados. Para além do curto período de tempo que necessita para quantificar vários elementos, esta técnica necessita também de uma pequena quantidade de amostra (0,5-1,0 ml). A Espectroscopia de Emissão Ótica é assim uma técnica que combina uma boa capacidade de quantificação multielementar, uma ampla gama dinâmica, uma boa sensibilidade, interferências espectrais e químicas fracas para soluções diluídas e limites de deteção baixos com a facilidade e a rapidez do tratamento de dados⁵¹.

No presente estudo foi utilizado o equipamento ICP-OES da PerkinElmer, modelo Optima 8000, pertencente ao ITeCons⁵², utilizando os comprimentos de onda $\lambda=231,604$ nm para o Ni, $\lambda=267,716$ nm para o Cr e $\lambda=259,939$ nm para o Fe. Os limites de quantificação estipulados correspondem a 5 $\mu\text{g/l}$ para o ião Ni e 10 $\mu\text{g/l}$ para os iões Cr e Fe. Todas as amostras foram sujeitas a um processo de digestão de forma a destruir a matéria orgânica inerente à natureza do substrato com que estamos a lidar. Para tal, tendo em conta o tipo de matriz e a quantidade reduzida de amostra disponível, optou-se por tratar inicialmente as amostras com ácido sulfúrico (H_2SO_4) respeitando uma relação de 1 ml de ácido para 0,5 ml de amostra. As soluções resultantes foram, posteriormente, diluídas pelo menos 20 vezes com ácido nítrico (HNO_3) a 0,5% e analisadas diretamente por ICP-OES, sendo feitas três leituras da concentração de iões e apresentado o valor médio das medições.

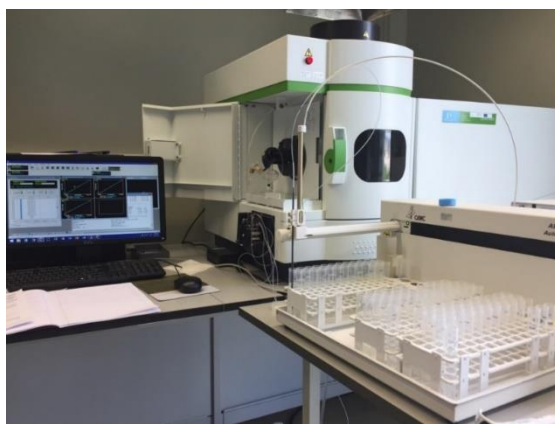


Figura 3.4 – Equipamento ICP-OES do laboratório do ITeCons.

Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM) e Espectrometria de raios X de Energia Dispersiva (EDS)

A técnica de Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM – *Scanning Electron Microscopy*) é uma técnica muito útil para a análise detalhada de superfícies sendo bastante aplicada ao estudo de filmes finos, uma vez que permite identificar defeitos, calcular espessuras e analisar a microestrutura, conseguindo obter imagens com elevadas ampliações. Adicionalmente, se ao SEM aliarmos um espectrómetro de raios X de energia dispersiva (EDS - *Energy Dispersive Spectrometry*) podemos obter informação relativa à composição química, quer através de análises singulares quer com mapas de distribuição⁵³.

O princípio do mecanismo SEM tem por base a utilização de um feixe de eletrões altamente energéticos que incide na superfície do material a analisar. À medida que o feixe atravessa a amostra, ponto a ponto, inúmeras interações entre os eletrões e a superfície ocorrem resultando na emissão de diferentes sinais. Estes são recolhidos, processados e traduzidos em pixels formando a imagem da topografia da amostra que se apresenta de forma tridimensional^{53,54}.

A interação do feixe de eletrões com a amostra leva à excitação de um volume de amostra interior à superfície. A profundidade a que se dá a interação depende da composição da amostra, da energia do feixe incidente e do ângulo de incidência.

Assim, a informação retirada a partir da Microscopia Eletrónica de Varrimento deve-se sobretudo a três processos físicos diferentes: as imagens formadas a partir da emissão dos eletrões secundários (SE – *secondary electrons*), as imagens geradas através dos eletrões backscattered (BSE – *backscattered electrons*) ou através do mapeamento por raios X. Os dois primeiros, os SE e os BSE diferem entre si relativamente à energia que emitem e ao mecanismo físico pelo qual são produzidos. Quando um eletrão primário do feixe, altamente energético, interage com um átomo da amostra, este pode sofrer dispersão de forma elástica ou inelástica. Num processo elástico os eletrões conservam toda a sua energia após a interação e existe a produção de eletrões *backscattered* (BSE) quando os eletrões regressam à superfície da amostra e escapam para o vácuo. Se, por outro lado, a interação for inelástica os eletrões vão perdendo energia até excitar a estrutura da amostra. Estes eletrões de baixa energia (< 50 eV) quando escapam para o

vácuo designam-se de eletrões secundários (SE)⁵⁵. Os eletrões secundários excitados da superfície da amostra são a fonte mais comum do sinal detetado, ao passo que os eletrões *backscattered*, de maior energia, e os raios X são emitidos pelas camadas interiores à superfície, permitindo obter informações sobre a composição da amostra⁵⁴.

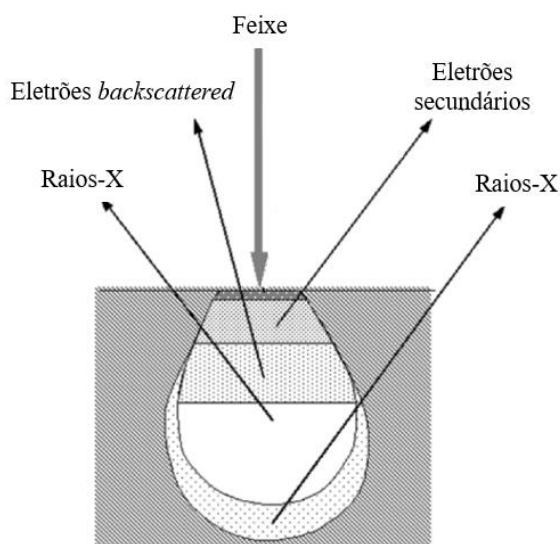


Figura 3.5 - Ilustração dos vários sinais gerados pelas diferentes interações feixe-amostra e das regiões onde esses mesmos sinais podem ser detetados em SEM. Adaptada de W. Zhou, Z. L. Wang, *Scanning Microscopy for Nanotechnology, Techniques and Applications*, Springer, 2006.

Para o correto funcionamento do SEM existe um canhão de eletrões responsável por produzir e acelerar os eletrões, sendo necessário que o feixe produzido seja estável e com elevada corrente, seja estreito para que a resolução não seja afetada e que possua uma baixa energia de dispersão. Existem dois tipos de canhão de eletrões e as propriedades dos eletrões produzidos variam consoante este fator. Existem filamentos de hexaboreto de lantânio ou de tungsténio, embora nos equipamentos mais recentes a tendência seja utilizar fontes de emissão de campo pois estas permitem aumentar a corrente e diminuir a energia de dispersão do feixe⁵⁵.

O equipamento possui um conjunto de lentes que permite focar o feixe de eletrões na amostra, podendo utilizar para este fim um campo eletrostático ou um campo magnético. Existem as lentes condensadoras que, ao convergirem, colimam o feixe de eletrões e controlam assim a sua dimensão, e existem as lentes objetivas que orientam o feixe para a zona da amostra a analisar. As lentes utilizadas influenciam a qualidade da resolução da imagem, uma vez que são usadas para focar e definir a dimensão do feixe,

podendo assim reduzir o diâmetro do feixe de elétrons que incide na amostra o que pode induzir a uma melhoria na resolução⁵⁵.

Na Microscopia Eletrônica de Varrimento é essencial a existência de um sistema de vácuo para evitar que ocorra a dispersão do feixe de elétrons e a contaminação do mesmo ou de outros componentes. Para assegurar estas condições na coluna de propagação, existe uma bomba de vácuo anexada ao sistema. No sistema SEM existem ainda os detetores das interações entre o feixe de elétrons e a amostra referidos anteriormente, existindo assim detetores para os elétrons secundários (SE), para os elétrons *backscattered* e para os raios X⁵⁵.

Neste trabalho utilizou-se o equipamento do Laboratório de Materiais e Desgaste do Instituto Pedro Nunes, da Merlin, Zeiss Gemini 2'. Para as imagens SEM e EDS as tensões de aceleração aplicadas corresponderam a 4 kV e a 10 kV respetivamente.



Figura 3.6 – Equipamento de SEM/EDS do Laboratório de Materiais e Desgaste do IPN. Foto retirada do site do IPN⁵³.

Análise estatística dos dados

Na análise estatística dos resultados obtidos por ICP-OES, utilizou-se o IBM SPSS Statistics Versão 24, utilizando o Modelo Linear Misto no cálculo das médias das concentrações dos iões e restantes parâmetros estatísticos descritivos. Definiu-se um valor de $P < 0,05$ como valor de corte para rejeitar a hipótese nula e para averiguar se as diferenças entre as concentrações são estatisticamente significativas.

4. Resultados e Discussão

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos, com o objetivo de avaliar o comportamento de ligas comerciais usadas em ortodontia face à corrosão *in vivo* e *in vitro*. Para tal foi avaliada a concentração de metais libertada em meio salivar e, posteriormente, feita a caracterização morfológica da superfície dos componentes que constituem um aparelho fixo.

4.1. Estudo *in vivo*

4.1.1. Avaliação da concentração de iões metálicos

Como foi mencionado anteriormente, o estudo *in vivo* recaiu sobre a análise da saliva de uma amostra de 17 pacientes que colocaram aparelho fixo ortodôntico pela primeira vez. Foram feitas 5 recolhas por paciente correspondentes a 5 tempos diferentes, num intervalo de tempo 0-12 semanas (ver Tabela 3.5). Os resultados obtidos por ICP-OES para os metais selecionados, Ni, Cr e Fe, encontram-se sumariados nas Tabelas 4.1, 4.2 e 4.3, respetivamente.

Para uma melhor aferição da evolução no tempo da degradação das ligas ortodônticas em ambiente oral, as concentrações por ICP-OES foram tratadas estatisticamente, utilizando o Modelo Linear Misto do SPSS. Os resultados obtidos, correspondentes aos valores médios de concentração nos 5 tempos em estudo, com o respetivo desvio padrão a partir dos valores mínimos e máximos para cada tempo, encontram-se compilados na Tabela 4.4.

Tabela 4.1 - Concentrações de Ni, por análise ICP, na saliva de 17 indivíduos em função do tempo de tratamento.

Paciente	Teor de Ni [µg/L]				
	t1 (0 dias)	t2 (2 dias)	t3 (1 semana)	t4 (4 semanas)	t5 (12 semanas)
P1	125	67	-	63	67
P2	98	53	55	63	58
P3	313	122	108	98	85
P4	119	162	86	-	110
P5	107	103	99	167	191
P6	127	104	124	159	132
P7	140	106	-	120	128
P8	120	144	147	336	142
P9	129	154	214	203	-
P10	108	-	-	149	115
P11	143	121	283	172	-
P12	115	104	70	81	145
P13	112	114	117	112	129
P14	115	206	215	277	140
P15	415	300	216	409	268
P16	169	143	127	187	-
P17	157	161	170	158	-

t1 – antes da colocação, t2 – 2 dias após, t3 – após 1 semana, t4 – após 4 semanas, t5 – após 12 semanas. As amostras impossíveis de analisar encontram-se representadas por ‘-’.

Tabela 4.2 - Concentrações de Cr, por análise ICP, na saliva de 17 indivíduos em função do tempo de tratamento.

Paciente	Teor de Cr [µg/L]				
	t1 (0 dias)	t2 (2 dias)	t3 (1 semana)	t4 (4 semanas)	t5 (12 semanas)
P1	148	97	-	91	96
P2	93	92	96	94	87
P3	202	195	205	178	98
P4	187	192	97	-	189
P5	179	177	173	194	216
P6	216	189	218	199	163
P7	169	158	-	168	170
P8	164	186	187	399	199

P9	174	252	211	322	-
P10	163	-	-	220	172
P11	225	173	315	172	-
P12	174	95	104	100	199
P13	165	181	185	174	193
P14	173	176	171	192	269
P15	201	196	197	212	202
P16	158	206	190	182	-
P17	167	176	176	181	-

t1 – antes da colocação, t2 – 2 dias após, t3 – após 1 semana, t4 – após 4 semanas, t5 – após 12 semanas. As amostras impossíveis de analisar encontram-se representadas por ‘-’.

Tabela 4.3 - Concentrações de Fe, por análise ICP, na saliva de 17 indivíduos em função do tempo de tratamento.

Paciente	Teor de Fe [µg/L]				
	t1 (0 dias)	t2 (2 dias)	t3 (1 semana)	t4 (4 semanas)	t5 (12 semanas)
P1	600	442	-	381	513
P2	619	500	746	515	1047
P3	1138	856	949	781	376
P4	780	951	375	-	665
P5	1050	721	657	852	1227
P6	1249	1174	1305	924	1125
P7	820	866	-	772	875
P8	882	890	1200	1791	2708
P9	748	1170	971	1274	-
P10	731	-	-	1110	816
P11	917	792	1448	767	-
P12	784	864	607	853	1143
P13	833	824	834	1063	851
P14	713	719	719	1116	1080
P15	1084	782	778	813	851
P16	660	944	3024	726	-
P17	707	719	709	667	-

t1 – antes da colocação, t2 – 2 dias após, t3 – após 1 semana, t4 – após 4 semanas, t5 – após 12 semanas. As amostras impossíveis de analisar encontram-se representadas por ‘-’.

Tabela 4.4 - Estatística descritiva das concentrações de Ni, Cr e Fe nos diferentes momentos do tratamento.

	Tempo	Teor Médio (µg/L)	Desvio Padrão (SD)	Mínimo (µg/L)	Máximo (µg/L)	95% IC (µg/L)	
						Limite Inferior	Limite Superior
Ni	t1	153,65	83,21	98,00	415,00	110,86	196,43
	t2	135,25	57,80	53,00	300,00	104,45	166,05
	t3	145,07	65,99	55,00	283,00	106,97	183,17
	t4	175,13	96,62	63,00	409,00	120,64	223,61
	t5	131,54	54,02	58,00	268,00	98,90	164,18
Cr	t1	174,00	29,52	93,00	225,00	158,82	189,18
	t2	171,38	43,11	92,00	252,00	148,40	194,35
	t3	180,36	56,56	96,00	315,00	147,70	213,01
	t4	192,38	77,88	91,00	399,00	150,88	233,87
	t5	173,31	52,42	87,00	269,00	141,63	204,98
Fe	t1	842,06	188,34	600,00	1249,00	745,23	938,89
	t2	825,88	194,56	442,00	1174,00	722,20	929,55
	t3	1023,00	644,15	375,00	3024,00	651,08	1394,92
	t4	894,63	331,28	381,00	1791,00	718,10	1071,15
	t5	1021,15	565,71	376,00	2708,00	679,30	1363,01

t1 – antes da colocação, t2 – 2 dias após, t3 – após 1 semana, t4 – após 4 semanas, t5 – após 12 semanas.

Apresenta-se ainda nesta Tabela 4.4, a concentração no intervalo de confiança (IC) a 95% . Este fator indica, de uma forma simplificada, que se se realizassem 100 estudos semelhantes a este, 95 dos casos encontrar-se-iam resultados dentro deste intervalo e só 5 vezes se chegaria a resultados diferentes.

A Figura 4.1 mostra a evolução da libertação *in vivo* de Ni, Cr e Fe durante as 12 semanas de tratamento, após tratamento estatístico. Como se pode verificar da análise desta figura, o teor em Ni salivar mantém-se praticamente invariável com concentrações médias semelhantes às do momento de início de tratamento. Todavia há um ligeiro aumento *in vivo* deste metal na quarta semana de tratamento. Comportamento similar é, também, observado para os níveis de libertação em Cr, ou seja, a maior concentração salivar é no tempo t4 (após 4 semanas). Para o metal mais pesado, Fe, a avaliação *in vivo* regista as maiores concentrações médias ao fim de uma semana (t3) de tratamento.

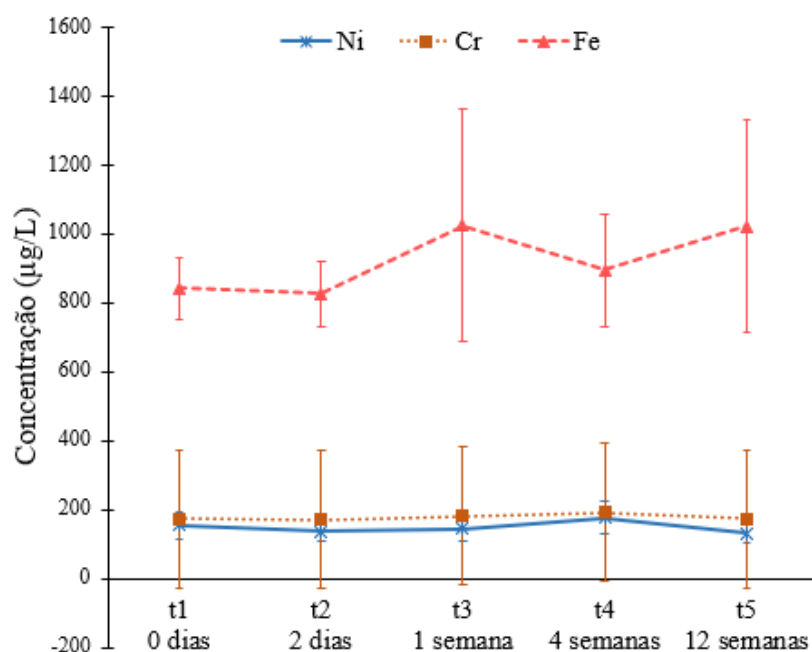


Figura 4.1 – Evolução no tempo de tratamento dos teores médios libertados em saliva natural.

A estabilização no tempo da libertação de Ni e Cr pode explicar-se pelo processo de passivação dos componentes constitutivos do aparelho fixo (*brackets*, bandas, tubos). De acordo com a literatura, é aceite que a formação de uma camada contínua de biofilme à superfície da liga metálica, estará completa ao fim de quatro semanas em ambiente intraoral^{9,10}. A diminuição da libertação *in vivo* de metais após quatro semanas é explicada por Barret et al.⁵⁶. Segundo aqueles autores, o Ni presente na superfície do aço inoxidável corrói rapidamente durante a fase inicial do tratamento e, quando a camada de Ni se encontra praticamente corroída, a taxa de libertação de iões diminui. Por outro lado, os produtos de corrosão produzidos na fase inicial do tratamento acumulam-se sobre a superfície e retardam a corrosão do Ni.

O valor máximo de libertação de Ni e Cr é registado após as primeiras 4 semanas de tratamento (t4), concordando com o resultado obtido no estudo de Agaoglu et al.²⁹ em que registou também um máximo após o mesmo período de tempo. Porém, o referido autor encontrou diferenças significativas de concentração nos intervalos do tratamento (entre o momento anterior à colocação e o primeiro mês após o início do tratamento, entre a primeira semana e o primeiro mês do tratamento) contrariamente ao presente estudo. Outros artigos, no entanto, obtêm uma maior concentração de Ni e Cr 10 minutos após a

colocação¹⁰, uma semana^{6,16,41} ou 6 meses após o início do tratamento¹² ou após um momento específico, tal como o alinhamento do fio⁷ ou a colocação das bandas⁹.

A hipótese nula testada no presente estudo de que as concentrações de iões metálicos na saliva dos pacientes não se alteram significativamente após a colocação de aparelho fixo foi aceite ($P>0,05$), mostrando que na realidade a diferença entre as concentrações registadas nos vários intervalos de tempo estudados não se revelou estatisticamente significativa, estando de acordo com alguns dos estudos *in vivo* da literatura^{12,13}. Existem no entanto outros trabalhos cujas diferenças entre os vários pontos do estudo se revelaram significativas^{6,7,10,16,29,41}.

O estudo comparativo, nos vários intervalos do estudo, entre os níveis libertados *in vivo* com a média obtida para cada metal, Ni, Cr e Fe, pode ser visualizado nas evoluções gráficas das Figuras 4.2. 4.3 e 4.4.

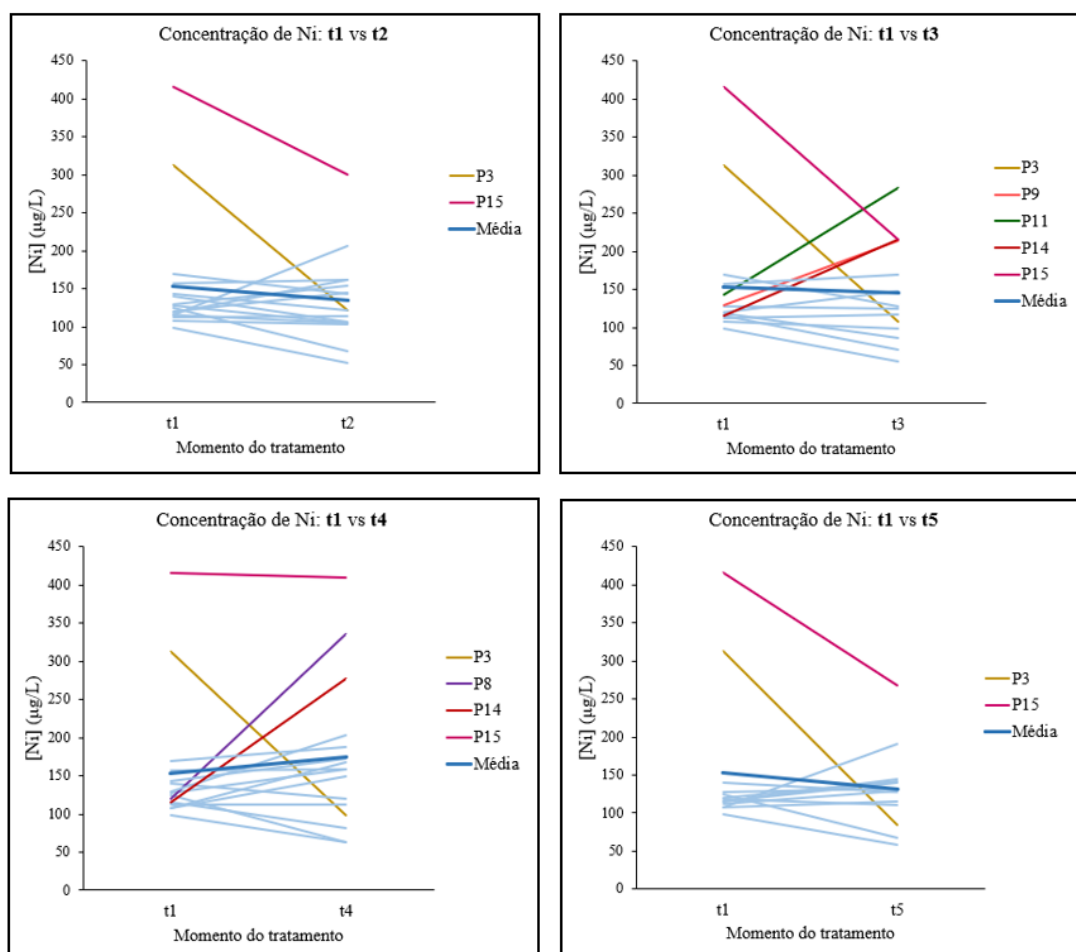


Figura 4.2 – Comparação dos teores de Ni presente na saliva dos pacientes no momento antes da colocação (t1) e nas fases posteriores do tratamento.

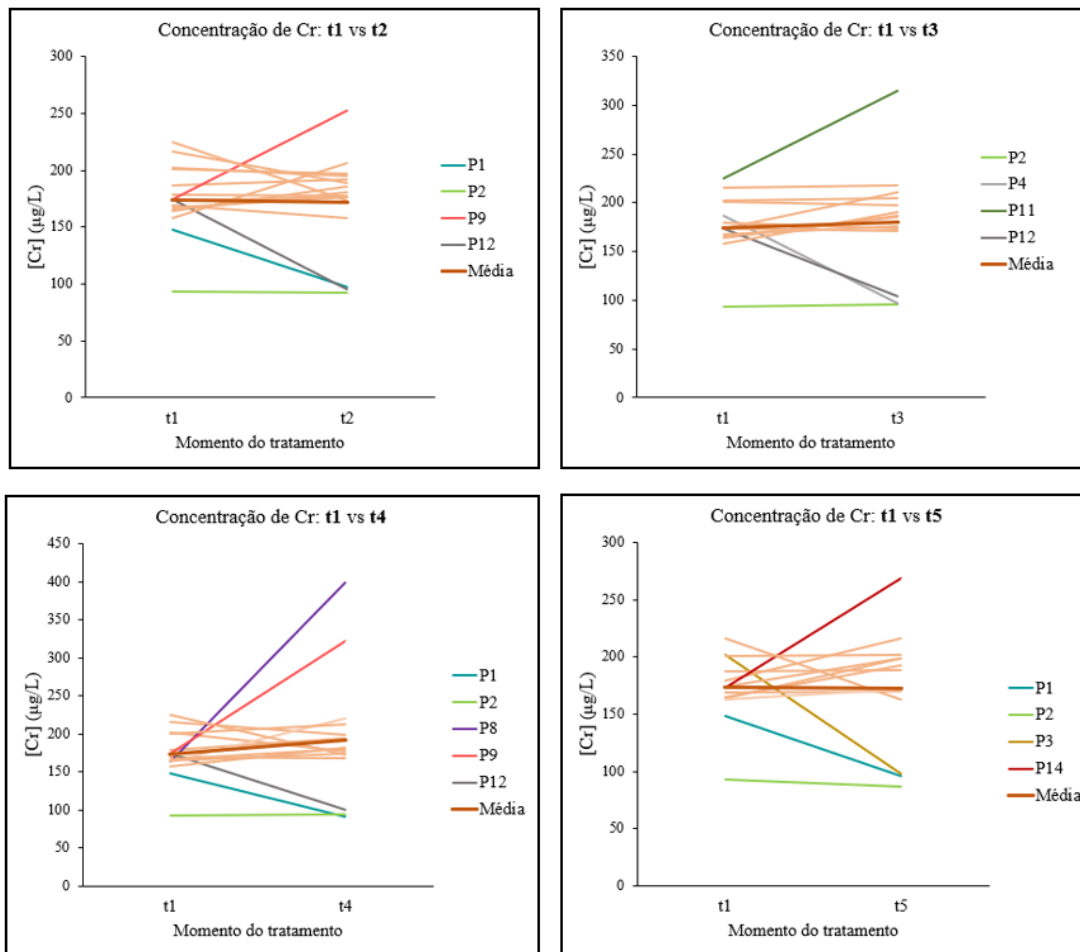


Figura 4.3 - Comparação dos teores de Cr presente na saliva dos pacientes no momento antes da colocação (t1) e nas fases posteriores do tratamento.

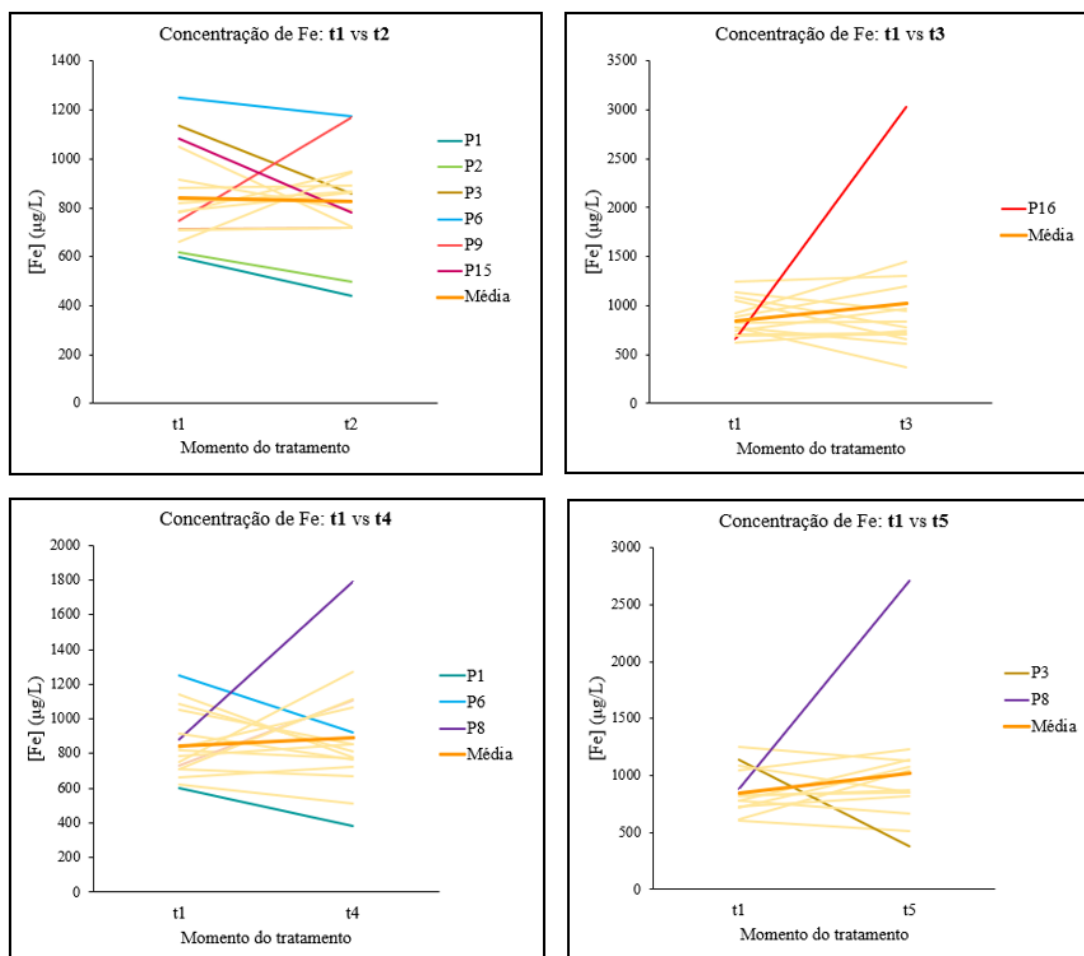


Figura 4.4 - Comparação dos teores de Fe presente na saliva dos pacientes no momento antes da colocação (t1) e nas fases posteriores do tratamento.

A valor de concentração média em Ni, no momento anterior à colocação do aparelho (t1) situou-se em 153,65 µg/L. Nesta fase, destaquem-se dois pacientes, o P3 e o P15 que mostram possuir *in vivo* o triplo do valor médio em Ni salivar dos restantes pacientes que constituíram a amostra, 313 e 415 µg/L, respetivamente (Tabela 4.4). Uma vez que se trata de pacientes de sexos opostos e com idades relativamente próximas e jovens, (Tabela 3.1) não se pode explicar a maior concentração de Ni observada nestes dois casos como influência de fatores de género ou de idade. Mais ainda, nos momentos posteriores ao início do tratamento verifica-se que os níveis do indivíduo P3 se encontram já próximos da média, enquanto que os teores da paciente P15 continuam bem mais elevados em relação à mesma (Tabela 4.1). Assim, tudo leva a crer que os valores iniciais registados em t1 se deverão no caso do P3 a questões alimentares, recaindo sobre a dieta do indivíduo nos momentos anteriores à recolha, e, no caso da P15 podem explicar-se pelas suas características individuais, como as suas condições fisiológicas e psicológicas.

A análise da Figura 4.2, que traduz a variabilidade entre os níveis salivares de Ni dos indivíduos permite concluir que em t2, ou seja, 2 dias após a colocação do aparelho, há um aumento de 31,50% em relação ao momento inicial (t1). A percentagem de aumento nas amostras no tempo t3 (1 semana após a colocação) em relação a t1 é semelhante, sendo de 35,71%. Já quatro semanas após o início do tratamento, em t4, registam-se 56,25% de aumento em relação a t1, atingindo aqui o valor máximo de aumento e coincidindo com o momento onde a média de Ni calculada é máxima. Após 12 semanas, em t5, há também um incremento de 53,85% de aumentos em relação aos valores iniciais de t1.

Nas evoluções apresentadas na Figura 4.3, relativas ao Cr, destaca-se a paciente P2, que possui níveis muito constantes ao longo dos vários momentos e sempre bastante inferiores aos níveis médios. Observe-se, por exemplo, no momento inicial (t1) em que a média se situa em 174,00 µg/L e a paciente P2 apresenta 93 µg/L. Outros exemplos representam bem a enorme variabilidade inter-individual observada nos níveis de Cr libertados. Os indivíduos P1, P12 e P4 apresentam em t1 valores próximos da média de Cr, porém nos momentos posteriores do tratamento os seus níveis de Cr baixam consideravelmente quando comparados com os valores médios. Por outro lado, na paciente P9 as concentrações de Cr em t2 e em t4, 252 e 322 µg/L, respetivamente, são bastante superiores às médias calculadas para este ião nesses momentos (t2 – 171,38 µg/L e t4 – 192,38 µg/L), observando-se também uma maior concentração no momento t3 para a P11 (315 µg/L) e no momento t5 para o P14 (269 µg/L) relativamente à concentração média (t3 - 180,36 µg/L e t5 - 173,31 µg/L).

Das amostras que foram possíveis analisar em t2, 2 dias após o início do tratamento, verificaram-se ~ 44% de aumento nas concentrações de Cr. A percentagem aumenta nos momentos posteriores, registando-se 64,30% e 62,50% de aumentos em t3 (uma semana após) e t4 (quatro semanas após), respetivamente. O maior número de aumentos na concentração das amostras encontra-se em t5, doze semanas após a colocação do aparelho, sendo que em 69,23% das amostras analisadas existiu um aumento em relação ao momento inicial (t1).

A grande variabilidade nas concentrações *in vivo* em Fe obtidas neste estudo são também evidenciadas da Figura 4.4. A paciente P16 destaca-se do grupo no momento t3, uma semana após a colocação, apresentando níveis 3 vezes superiores à média. Também quatro e doze semanas após o início do tratamento (tempos t4 e t5) se registam grandes

variações entre as concentrações dos pacientes e da média. Tomemos o caso dos pacientes P8 e P1, que em t4 apresentam 1791 e 381 µg/L, respectivamente, contrastando com a concentração média de 894,63 µg/L nesse mesmo período. Em t5 a paciente P8 apresenta uma concentração de Fe igual a 2708 µg/L, enquanto o paciente P3 regista 376 µg/L, valores bastante divergentes da média calculada para este momento (1021,15 µg/L). Estas diferenças nas concentrações podem explicar-se pelas características próprias, fisiológicas e psicológicas, de cada indivíduo do estudo e pela dieta alimentar que praticam. Se estes pacientes que apresentam maiores concentrações em Fe, possuíssem para além dos componentes do aparelho fixo outras peças ortodônticas com grande percentagem de Fe na sua composição, como por exemplo expansores, poder-se-ia relacionar a presença dos mesmos com os elevados níveis salivares do ião em questão, no entanto, não sendo o caso, não se podem tecer considerações a este respeito.

Numa avaliação global de amostras analisadas em t2, dois dias após a colocação do aparelho, 50,00% das concentrações registaram um aumento em relação ao momento inicial (t1). No momento t3, 1 semana após, e t4, 4 semanas após, os aumentos nas concentrações relativamente a t1 observaram-se sendo 57,14% e 43,75% das amostras analisadas, respetivamente. O último período analisado, t5 (12 semanas após a colocação) regista a maior percentagem de aumentos, sendo que neste momento 61,54% das amostras registaram concentrações mais elevadas comparativamente ao início do tratamento.

Importa afirmar também que no presente estudo, não só não se verificaram diferenças significativas entre as concentrações de iões metálicos nas várias fases do tratamento estudadas, como também não se observaram diferenças significativas nas concentrações dos pacientes dos diferentes géneros ($P > 0,05$), ou seja, na nossa amostra as diferenças entre as concentrações dos pacientes masculinos e das pacientes de sexo feminino não se mostraram significativas.

Tal como na literatura existente (Capítulo 2) também neste estudo se observaram variações nas concentrações dos vários indivíduos envolvidos. Tal variabilidade pode relacionar-se com diversos fatores uma vez que a composição da saliva varia de indivíduo para indivíduo, dependendo das suas condições fisiológicas e de saúde, podendo ainda ser diferente ao longo do dia para o mesmo indivíduo. As propriedades físicas, a quantidade e a composição da saliva dependem das horas do dia, da dieta e condições físicas do meio^{10,12}. Apesar de se terem feito recomendações aos pacientes no que diz respeito aos alimentos e bebidas a evitar ingerir duas horas antes da recolha e de ter sido

ainda indicado que recolhessem a saliva às mesmas horas do dia, não se pode assegurar que estas indicações tivessem sido cumpridas. Aliás, estes fatores só foram controlados pelos próprios pacientes.

As concentrações de Ni e de Cr apresentam grandes variações na literatura existente sobre esta matéria. Nos estudos anteriores, a média de níquel presente na saliva após iniciar o tratamento ortodôntico encontra-se entre 0,005 e 113 $\mu\text{g/L}$ ^{27,41} e para o cromo a média de valores situa-se entre 0,29 e 102,68 $\mu\text{g/L}$ ^{7,10}. Sobre o ião Fe existe um considerável menor número de estudos realizados e os que existem apresentam valores médios de ferro entre os 11 e os 28,31 $\mu\text{g/L}$ ^{10,40}. No presente estudo, as concentrações médias dos iões após a colocação do aparelho fixo situaram-se entre 124,88 – 171,54 $\mu\text{g/L}$ para o Ni, entre 165,5 – 181,8 $\mu\text{g/L}$ para o Cr e entre 803,8 – 1038,9 $\mu\text{g/L}$ para o Fe (Tabela 4.4).

O único artigo¹⁰ que, tal como o presente estudo, avalia *in vivo* os níveis do ião Fe em vários momentos do tratamento ortodôntico mostra um máximo da sua concentração média um dia após a colocação do aparelho fixo, diferindo com os resultados aqui apresentados. Importa referir que neste estudo, contrariamente ao que aqui se apresenta, foi utilizado um aparelho simulado no qual se encontravam 7 *brackets* ligados a uma placa acrílica. No entanto, em ambos se registam teores de Fe bastante superiores aos observados nos iões Ni e Cr e que podem ser explicados devido ao facto de o ferro ser o principal constituinte do aço inoxidável que constitui os *brackets*, as bandas e os tubos, bem como por ser um ião diariamente consumido com abundância na dieta do ser humano¹⁰.

O facto da evolução da concentração de Ni acompanhar a de Cr (Figura 4.1), observando-se comportamentos semelhantes entre ambos os iões, entre os quais a diminuição da média da concentração 4 semanas após o início do tratamento, leva a crer que não se trata apenas de um acontecimento improvável. Alguns autores sugerem que esta ligeira diminuição se deve ao aumento da captação dos iões metálicos por parte dos microorganismos presentes na placa (ou nas células da mucosa oral), basta pensar que estes seres possuem grande capacidade de acumulação de iões metálicos através da combinação com glicoproteínas ou com iões existentes no biofilme previamente absorvidos. Desta forma, a captação de iões Ni e Cr é favorecida pelo aumento do número destas bactérias no biofilme, bactérias estas que por sua vez estão intimamente relacionadas com o incremento da espessura da placa devido à maior dificuldade em

manter uma boa higiene oral durante o tratamento^{12,15,30}. O simultâneo aumento da absorção de iões via oral e a diminuição da taxa de libertação após a fase inicial do tratamento, podem explicar a diminuição observada após as primeiras quatro semanas para níveis abaixo dos registados antes da colocação do aparelho fixo¹².

Note-se ainda que apesar das concentrações em Ni e em Cr apresentarem diferenças pequenas, o valor médio em Ni é ligeiramente inferior ao obtido para o ião Cr. O mesmo foi observado em estudos anteriores^{6,7,16} podendo-se atribuir este fenómeno à combinação entre os iões Ni e as proteínas salivares, que transformam o níquel, retirando-o da sua forma iónica e conseqüentemente fazem com que seja impossível detetá-lo por ICP-OES⁷.

Neste estudo participaram dois irmãos gémeos monozigóticos, os indivíduos P5 e P6. Nestes dois casos os níveis de concentração de iões mostraram-se semelhantes ao longo do tempo, exceto relativamente às concentrações de Fe que apresentaram maiores diferenças nos intervalos t2 e t3, correspondentes a dois dias e uma semana, respetivamente, após a colocação. De referir que, apesar destes irmãos possuírem a mesma carga genética, apresentam um fenótipo algo diferente face ao estímulo ambiental. Contudo, tal como Amini et al.¹⁵ referem, o facto de serem irmãos do mesmo género ajuda a reduzir os efeitos do comportamento emocional e da dieta na libertação de iões metálicos.

4.1.2. Avaliação da presença de corrosão

O tempo médio de tratamento ortodôntico com aparelho fixo é cerca de 2 anos, pelo que não é possível apresentar neste trabalho, todas as características microestruturais dos componentes dos 17 pacientes em estudo. Todavia, a peça móvel do aparelho, o fio ortodôntico, foi substituída em alguns pacientes durante o tempo de execução deste trabalho. Como é sabido, o arco proporciona a força necessária para o movimento dos dentes, sendo mais apropriado o fio de NiTi na fase de alinhamento e nivelamento do tratamento clínico devido às suas propriedades de elevado limite elástico, baixo módulo de elasticidade (não são rígidos) e alta resiliência. Na fase final do nivelamento e alinhamento pretende-se adquirir a formabilidade do arco, não existindo grandes desnivelamentos na dentição, pelo que aqui são então utilizados os fios de aço inoxidável.

Além disso, estes fios são de baixo custo e permitem a execução das dobras com facilidade e precisão, necessárias à minúcia do acabamento de um tratamento ortodôntico.

As Figuras 4.5 e 4.6 mostram exemplos da morfologia superficial de fios de Nitinol, obtidos por SEM, entre a 9ª e 22ª semana de uso clínico.

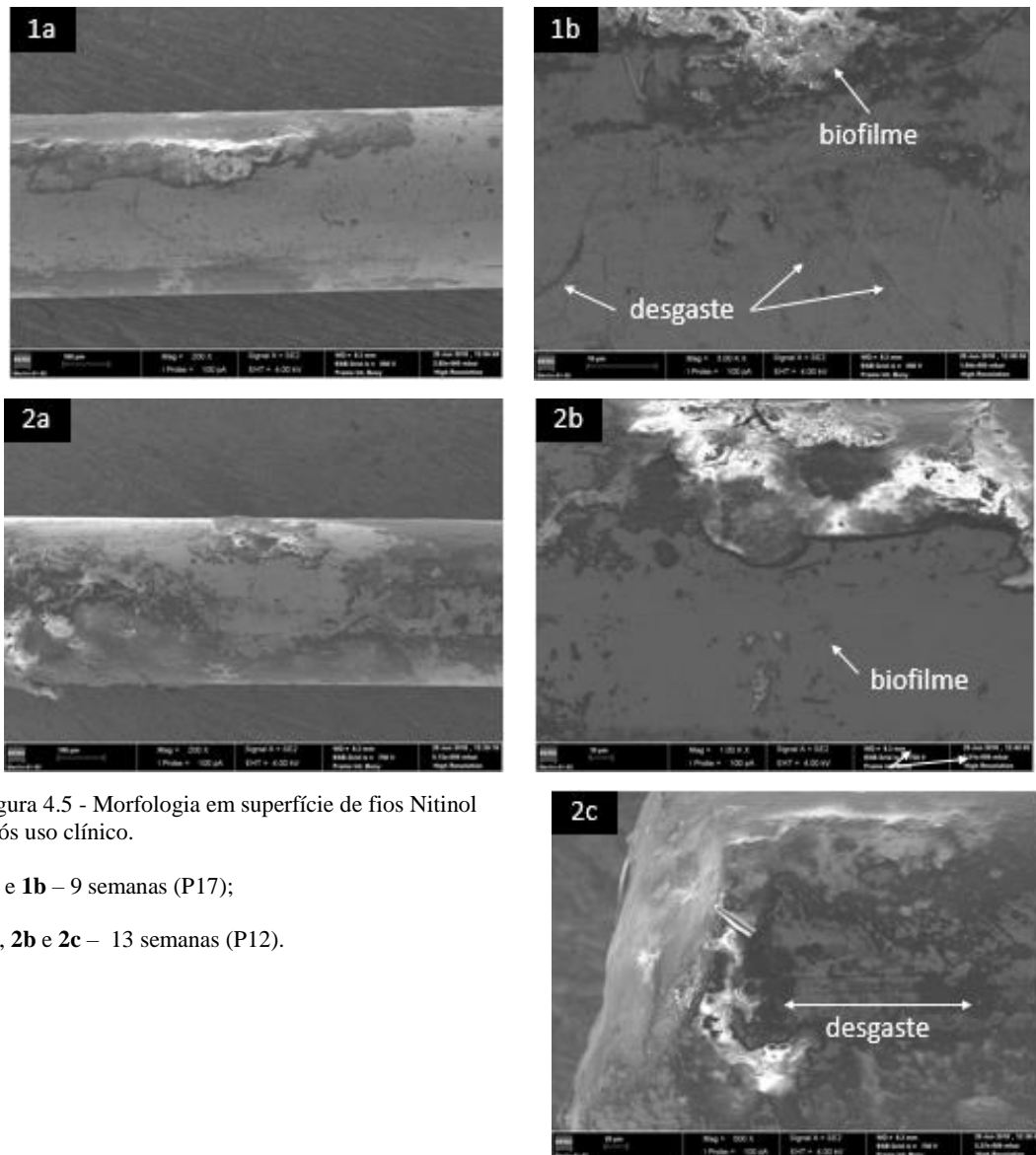


Figura 4.5 - Morfologia em superfície de fios Nitinol após uso clínico.

1a e 1b – 9 semanas (P17);

2a, 2b e 2c – 13 semanas (P12).

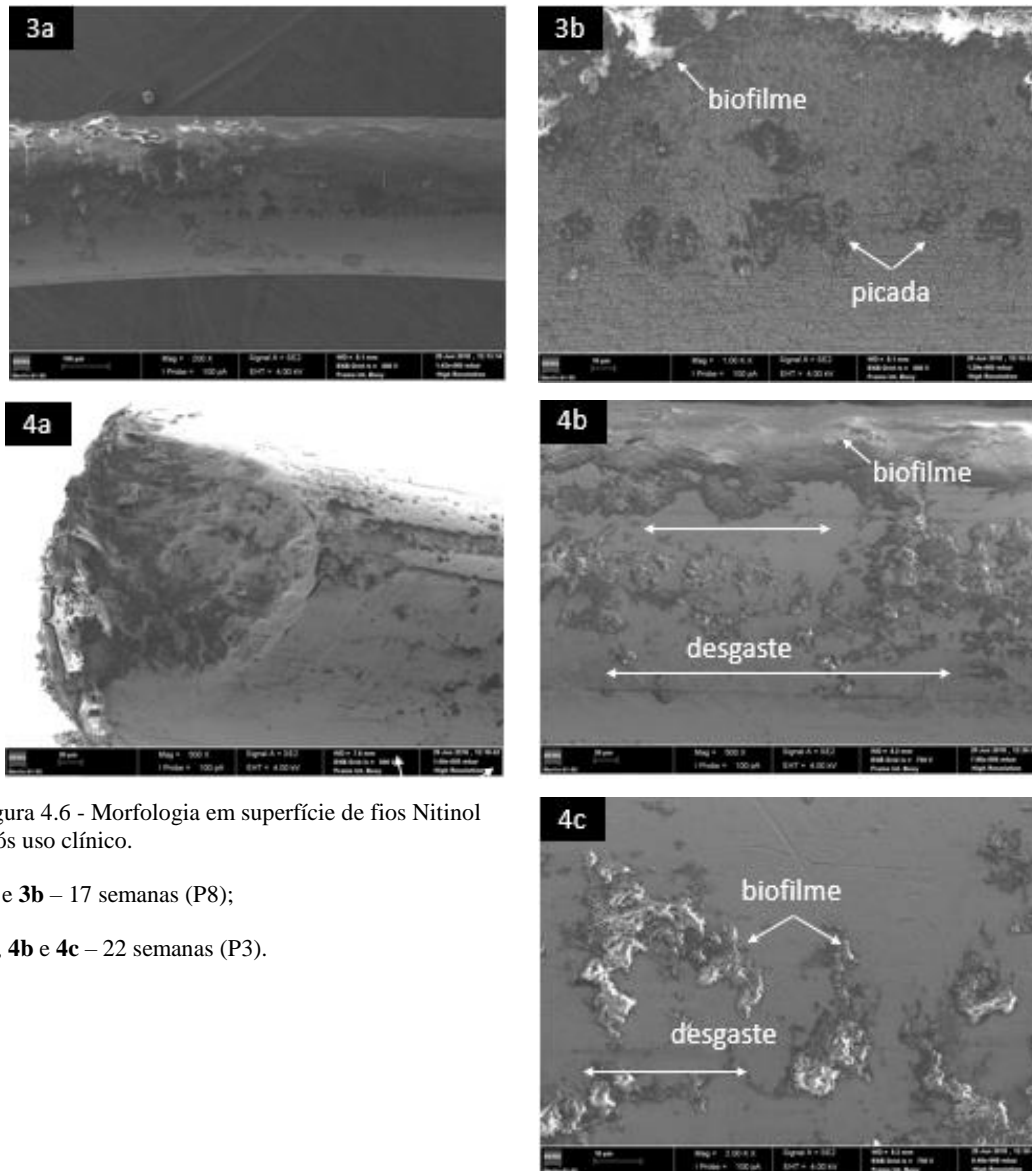


Figura 4.6 - Morfologia em superfície de fios Nitinol após uso clínico.

3a e 3b – 17 semanas (P8);

4a, 4b e 4c – 22 semanas (P3).

Genericamente pode concluir-se que, independentemente do tempo de tratamento, todos os fios analisados mostraram alterações morfológicas superficiais importantes. Embora tenha sido feita limpeza por ultrassons, conseguiu detetar-se, por SEM, grande teor de placa bacteriana, como se pode observar, por exemplo, ao fim de $\sim 1/2$ ano, nas micrografias da Figura 4.6 – **4b**. O biofilme acumulado à superfície da liga metálica permanece aderente, e, pode mesmo, camuflar alguns defeitos provenientes da biodegradação das ligas NiTi. Embora a camada de óxido formada à superfície destas

biológicas seja estável e espontânea, podem ocorrer reações na cavidade oral potenciadas por solicitação mecânica e desgaste. Ao permitir simultaneamente, durante o tratamento, o nivelamento, a rotação e ainda movimentos de torção, o fio, em contacto com as outras peças do aparelho fixo, pode originar rutura da camada passiva e conseqüentemente corrosão (*fretting corrosion*). Sempre que uma superfície é friccionada contra outra, os filmes passivos podem ser removidos parcialmente. Repare-se que em ambas as Figuras 4.5 e 4.6 são evidentes zonas de desgaste.

Neste trabalho a libertação *in vivo* de Ti não foi quantificada, mas se existir descolamento/fendas/inclusões na camada nativa de TiO_2 / Ti_2O_3 , a libertação de Ni do fio deverá ser muito superior à das restantes peças (em aço) do aparelho fixo, devido à concentração mais elevada em Ni no Nitinol, liga equiatômica de Ni e Ti. É interessante verificar que a paciente P8, cujo fio foi utilizado durante 17 semanas (Figura 4.6), registou os maiores níveis salivares em iões metálicos comparativamente aos restantes três pacientes P3, P12 e P17; e que, a paciente P12, cujo fio permaneceu em ambiente intraoral cerca de 13 semanas (Figura 4.5) mostrou os valores mais baixos de concentração de iões. Assim, uma vez mais, a variabilidade interindividual e as características do meio intraoral do paciente, a variação da temperatura, tipo de fluxo salivar, alimentos e/ou medicamentos ingeridos, presença de bactérias, ditam a progressão do fenómeno de corrosão.

Apesar de alguns danos na superfície, irregularidades no acabamento e pistas de desgaste devido ao processo de colocação e retirada do fio, pode afirmar-se que não ocorreram modificações significativas na composição química da superfície dos fios de NiTi destes 4 pacientes, confirmada por SEM/EDS. Mais ainda, o acumular de placa bacteriana, embora evidencie a dificuldade de higienização dos dentes durante o tratamento ortodôntico, é preferível ao uso de pastas dentífricas e soluções bucais com muito flúor.¹² Os iões fluoreto degradam a camada passiva do óxido de titânio da superfície dos fios de NiTi, através da absorção de hidrogénio, reduzindo a sua resistência à corrosão.

Para completar o estudo da corrosão *in vivo*, foram ainda analisados por SEM/EDS, dois componentes de aparelho fixo, *bracket* e tubo, após 2 anos em ambiente oral durante um tratamento ortodôntico de um dado paciente. Estes dois componentes foram adquiridos ao mesmo fabricante dos materiais avaliados por ICP-OES, correspondentes ao Material 2 (Tabela 3.3). Tal como seria expectável, o longo período

de permanência do aparelho na cavidade oral, promove a formação de biofilme e corrosão (Figura 4.7 e 4.8).

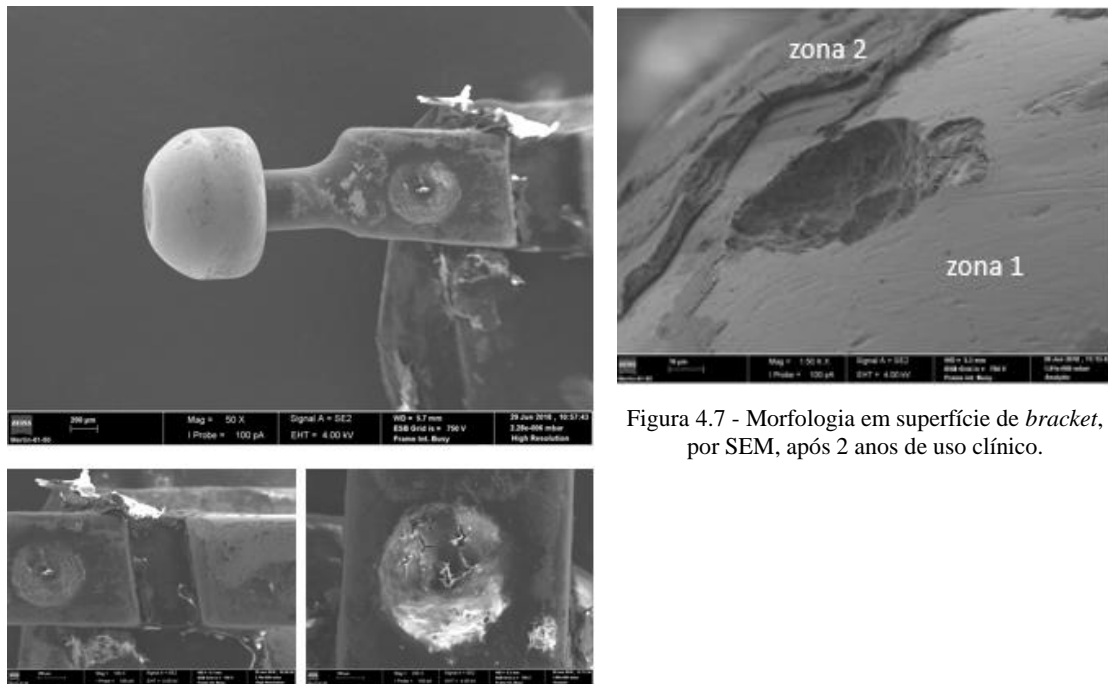


Figura 4.7 - Morfologia em superfície de *bracket*, por SEM, após 2 anos de uso clínico.



Figura 4.8 - Morfologia em superfície de tubo, por SEM, após 2 anos de uso clínico.

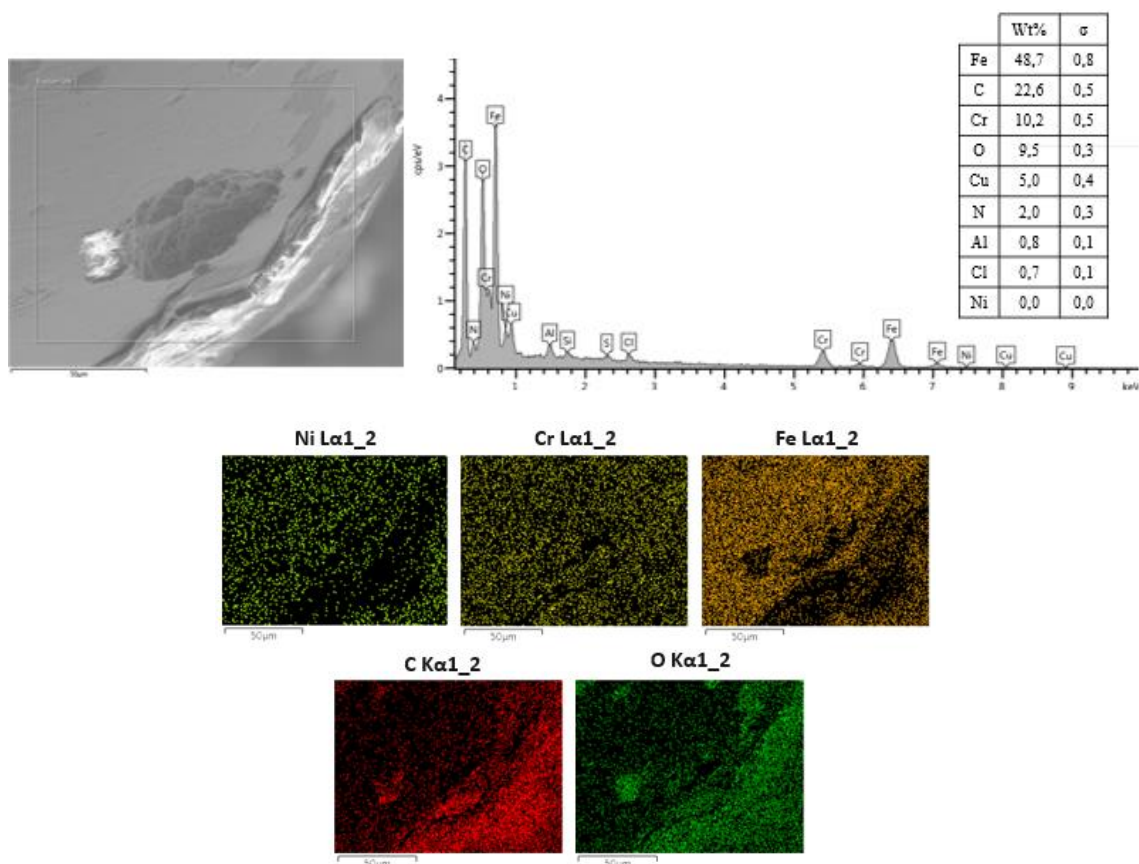
Para completar este estudo morfológico, recorreu-se à Espectrometria de Energia Dispersiva, EDS, já que é um método de avaliação que permite qualificar e quantificar quimicamente a composição do material. Os resultados obtidos para o *bracket* são mostrados na Figura 4.9, referentes às duas zonas distintas assinaladas na micrografia da Figura 4.7.

Como se pode observar, a zona 1, inclui uma área sem qualquer camada à superfície e uma picada. A análise revela como elementos metálicos principais os picos do Fe, Cr e Ni, ou seja, a composição típica do aço 303 SE (ver Tabela 3.3). Os elementos não metálicos, C, N e O, constituem uma pequena percentagem da composição da liga, sendo apenas referido pelo fabricante um teor de C de cerca de 0,15% da composição total, não referindo a presença de elementos como o N e O. A distribuição destes elementos confirma claramente a picada por corrosão, formada por óxidos e/ou hidróxidos de metais (Fe_2O_3 ; $Fe_2O_3.H_2O$). No que respeita à zona específica 2, relativa à camada superficial aderente ao *bracket*, os mapas EDS mostram que se trata de um filme rico em Cr e O, encontrando-se os restantes elementos uniformemente distribuídos pela área analisada, mas com menor concentração nesta camada. Assim, pode concluir-se que se trata da camada passiva formada à superfície dos aços inoxidáveis, podendo conter a mistura de óxido e hidróxido de Cr, Cr_2O_4 e $CrOOH$.

Enquanto que a análise da superfície do *bracket* não revelou sinais evidentes de deformação plástica (riscos, sulcos), talvez devido à presença do biofilme que camuflou a interação *bracket*-fio, o mesmo não pode ser dito relativamente ao tubo (Figura 4.8). Neste componente ou o teor de biofilme formado foi inferior, ou o processo de limpeza por ultrassons foi mais eficaz devido à pior adesão do mesmo à superfície do aço, ou, ambos os casos. A funcionalidade do tubo é semelhante à da banda, que está essencialmente relacionada com o suporte do fio e com o auxílio do posicionamento correto do dente durante o movimento ortodôntico. Como os tubos e as bandas são colocados nos primeiros e segundos molares, pode-se dizer que o *bracket* sofre uma maior exposição a danos surgindo riscos mais evidentes, havendo mesmo arrancamentos que se podem soltar, durante o uso ou colocação/remoção do aparelho.

Também neste caso se efetuou análise elementar por EDS. Os resultados obtidos em duas zonas distintas do tubo, encontram-se nas Figuras 4.10 e 4.11.

a) Zona 1



b) Zona 2

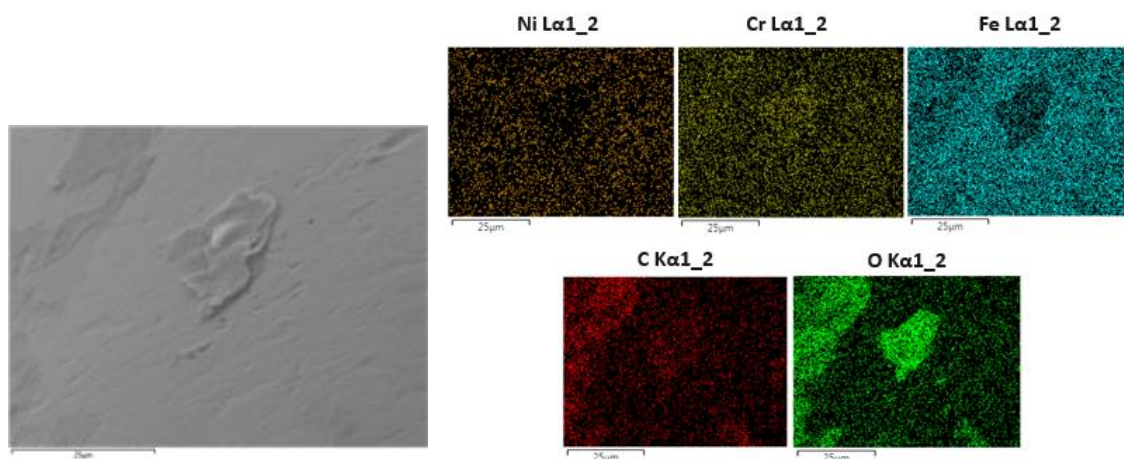


Figura 4.9 - Mapas de distribuição elemental EDS e microanálise por raios-X da superfície de *bracket* após 2 anos de uso clínico (Zona 1 e 2 assinaladas na Figura 4.7).

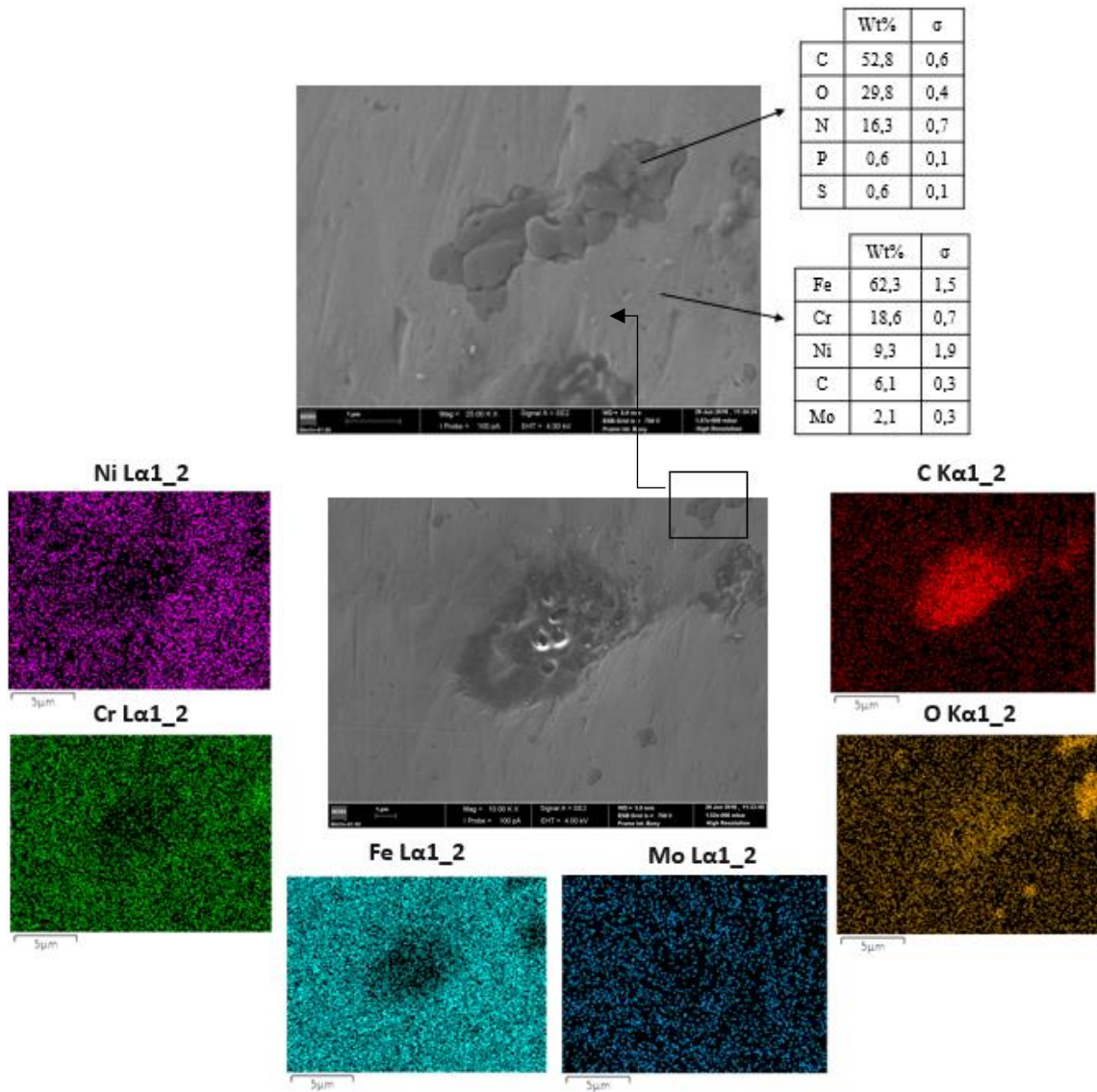


Figura 4.10 - Mapas de distribuição elemental EDS e microanálise por raios-X da superfície do tubo após 2 anos de uso clínico.

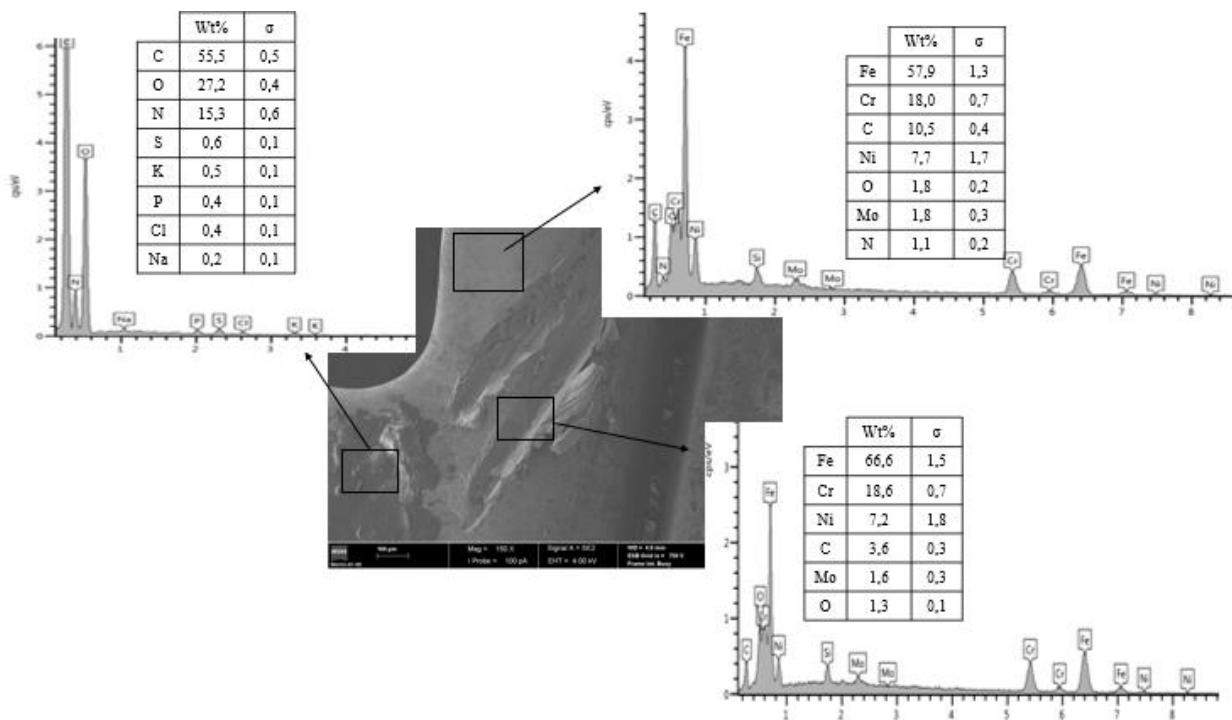


Figura 4.11 - Microanálise por raios-X da superfície do tubo após 2 anos de uso clínico.

De notar que o aço do *bracket* difere na sua composição da liga que constitui o tubo, verificando-se neste último um teor de Ni inferior. Porém, no aço do tubo encontra-se presente uma percentagem de Cu, elemento capaz de estabilizar a estrutura austenítica do aço e de melhorar sua resistência à corrosão, bem como as propriedades mecânicas.⁵⁷

Estes resultados *in vivo* estão em concordância com os observados por outros autores⁵⁸ para o mesmo tempo de exposição intraoral (2 anos). Como se pode observar nas micrografias da Figura 4.12, a morfologia superficial é muito semelhante à mostrada na Figura 4.7. Também naquele trabalho, os autores identificaram, uma forte acumulação de biofilme entre os dentes do *bracket*, cuja constituição incidia em elementos como o C, o O e o N.

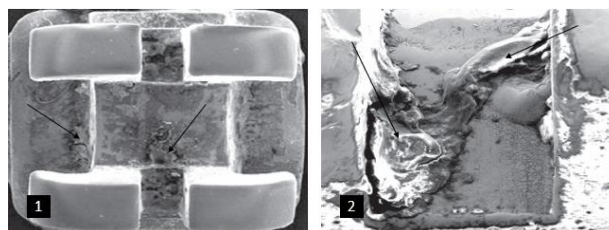


Figura 4.12 – Micrografias por SEM de *bracket* após 2 anos de exposição intraoral, com notável acumulação de biofilme (setas). **1** – Ampliação de 15x; **2** – Ampliação de 150x.⁵⁸

Os resultados *in vivo* obtidos vêm acentuar uma constatação já anteriormente tecida. Como se pode perceber pela revisão bibliográfica apresentada na secção 2.3.2., nos vários estudos consultados na literatura encontram-se conclusões que diferem entre si relativamente à significância da diferença da concentração de níquel, determinada antes e depois do tratamento ortodôntico. Os motivos sugeridos pelos quais alguns artigos obtêm resultados que provam uma diferença significativa do teor de níquel entre vários estádios do tratamento, e outros não, prendem-se com os diferentes tamanhos da amostra (que varia desde 10 até 100 pacientes), com as durações do estudo e com os métodos de recolha e processamento da saliva. Um maior tamanho da amostra permite que se estude os efeitos da corrosão e os fenómenos mecânicos, como o uso e a fadiga, os quais contribuem para a libertação de iões níquel³⁹. A duração do estudo ao longo do qual são feitas as recolhas de saliva desempenha também um papel crucial nos resultados obtidos, uma vez que um estudo a longo-prazo permite que se registe com maior veracidade as alterações que ocorrem durante todo o tratamento ortodôntico (que, regra geral, se prolonga até 2 anos)¹². Também porque a corrosão dos metais e a libertação de iões níquel possuem uma relação cumulativa, em vez de linear, com o tempo, os estudos que possuem um curto período de recolha, não conseguem avaliar com eficácia a concentração de níquel salivar em pacientes com aparelho ortodôntico fixo²¹, pois não traduzem o efeito da fadiga e o desgaste provocado pelo uso do material ao longo do tempo¹⁶.

Encontramos ainda diferenças no método de recolha de saliva, sendo que a maioria dos estudos utiliza saliva não-estimulada. A saliva estimulada, por exemplo através da mastigação de uma pastilha elástica ou através de movimentos adicionais de língua ou da mucosa jugal⁹, possui uma composição diferente relativamente à que não sofre estimulação. No estado de repouso, cerca de dois terços do volume total de saliva são produzidos pela glândula submandibular. No entanto, quando se procede à estimulação das glândulas salivares, metade do volume de saliva provém das glândulas parótidas, o que modifica a composição proteica da saliva. Ora, uma vez que o níquel se combina rapidamente com as proteínas, uma alteração a nível proteico na saliva pode levar a uma variação na concentração de níquel presente. Para além disso, com saliva estimulada a exposição dos materiais do aparelho ao fluxo salivar é menor, pelo que poderá induzir um resultado falso negativo⁷. Também se pode explicar a diferença entre os valores obtidos das concentrações nos diversos estudos como consequência da utilização de diferentes técnicas de preparação de saliva (filtração, digestão, diluição), de

diferentes métodos de quantificação de iões³⁰ e pela análise de materiais provenientes de fabricantes diferentes⁷.

Mais ainda, como nestes estudos são utilizadas concentrações muito baixas, todos os procedimentos envolvidos na recolha, preparação e análise das amostras de saliva possuem um risco de contaminação accidental^{10,21}, contribuindo para diferenças nos resultados finais.

Assim, tal como ocorreu no presente estudo, a maioria das investigações realizadas *in vivo* enfrentam uma limitação inevitável: a recolha momentânea da saliva^{16,27}. A falta de uma monitorização contínua das concentrações dos iões metálicos na saliva representa um grande obstáculo na determinação dos teores de iões libertados *in vivo*³⁹. O facto de recorrermos a um biomarcador que não permite a monitorização da exposição crónica aos elementos vestigiais, tais como os iões metálicos, origina uma falha nos dados cumulativos. Como a libertação de iões metálicos consequente da corrosão do aparelho fixo deve ser tratada como uma exposição crónica a agentes tóxicos, teria grande interesse investigar a acumulação de metais em locais específicos do organismo humano. Em toxicologia, os biomarcadores de exposição para metais tóxicos incluem geralmente locais de acumulação ou de eliminação. Para conduzir uma investigação *in vivo* em locais de acumulação, como no fígado ou nos rins, seria necessário utilizar mecanismos invasivos, tornando assim inviável a execução destes procedimentos devido à maior dificuldade de realização, mas também ao inevitável surgimento de questões éticas que tais mecanismos acarretam. Por isso mesmo se aconselham as vias de eliminação para encontrar biomarcadores de exposição. Uma alternativa à recolha de saliva pode ser encontrada nos materiais de queratina, tal como o cabelo, sendo este biomarcador indicado como um dos mais importantes no estudo da exposição crónica dos humanos aos metais³⁰.

Entre os constrangimentos enfrentados nesta investigação, pode-se apontar a falta de amostras de alguns pacientes cuja recolha estava encarregada pelos mesmos. Num futuro trabalho será conveniente a utilização de uma maior amostra de pacientes para permitir retirar elações mais fiáveis e avaliar com maior certeza estatística os efeitos da corrosão e de fenómenos mecânicos (tais como uso e fadiga) dentro da cavidade oral^{12,30}. Contudo, este foi o tamanho de amostra possível, 17 pacientes, face ao tempo útil em que se realizou todo o trabalho clínico e laboratorial.

As comparações entre os estudos *in vivo* são necessárias, porém são limitadas e confrontadas pela diversidade de metodologias e variáveis que se encontram na literatura. Assim sendo, para tornar possível a comparação entre resultados das investigações *in vivo*, estas devem ser conduzidas sob condições rigorosamente controladas por forma a que os resultados consigam ser reprodutíveis e significativos³⁰. A elaboração de regras e padrões para os estudos *in vivo* parece ser um fator importante para cimentar as conclusões retiradas destas investigações e relacioná-las com a situação clínica real.

De uma maneira convergente, apesar dos diferentes resultados obtidos, todos os artigos concluem que os níveis de iões encontrados se situam significativamente abaixo da dose diária aceite (100-800 µg/dia para o Ni, 50-280 µg/dia para o Cr¹² e 10-50 mg/dia para o Fe⁵⁹), não atingindo concentrações tóxicas e encontrando-se bem abaixo dos valores aceites na água potável³⁰. Contudo, os resultados obtidos podem constituir uma falsa segurança, uma vez que, mesmo em baixas concentrações, uma exposição crónica aos iões metálicos pode provocar inflamações, induzir alterações biológicas nas células (ao nível da sua morfologia e metabolismo) e danificar o ADN, tornando-o mais instável^{7,9,12,21}.

4.2. Estudo *in vitro*

4.2.1. Avaliação da concentração de iões metálicos

Como referido anteriormente, o estudo *in vitro* incidiu sobre a avaliação da libertação de iões metálicos em condições estáticas, isto é, após imersão dos diferentes componentes do aparelho fixo em saliva sintética. Para tal selecionou-se um período de tempo de 30 dias, em 2 meios de diferentes valores de pH, 6,7 e 2,3.

Os resultados obtidos, por ICP-OES, para os metais selecionados, Ni, Cr e Fe, encontram-se sumariados nas Tabelas 4.5 em função do pH da solução salivar.

Tabela 4.5 - Concentrações dos íons metálicos em estudo *in vitro* após 4 semanas.

pH	Componentes	Saliva sintética (mL)	Teor em Ni (µg/L)	Teor em Cr (µg/L)	Teor em Fe (µg/L)
2,3	5 brackets	15	75020	24380	138960
	1 banda	17	593	812	4608
	3 tubos	18	691	2162	10723
	10 ligaduras	10	23	32	396
	1 fio NiTi	35	18	21	79
6,7	5 brackets	15	54	24	218
	1 banda	17	363	125	2710
	3 tubos	18	11	< Lq	90
	10 ligaduras	10	13	20	147
	1 fio NiTi	35	12	< Lq	63

Nota: Alguns dos valores detetados encontram-se abaixo dos limites de quantificação (Lq) por ICP, sendo o limite de quantificação do Ni igual a 5 µg/L e o limite de quantificação para o Cr e para o Fe igual a 10 µg/L.

Para uma melhor aferição da contribuição individual de cada componente na evolução da degradação *in vitro* das ligas ortodônticas, os valores de concentração de íons metálicos obtidos foram tratados tendo em conta o número de peças e o tempo de imersão. Os resultados obtidos, em µg/L/dia, encontram-se na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 - Concentração de íons metálicos no estudo *in vitro*, por peça e por dia.

pH	Componente	Teor em Ni (µg/L/dia)	Teor em Cr (µg/L/dia)	Teor em Fe (µg/L/dia)
2,3	bracket	500,13	162,53	926,4
	banda	3,95	5,41	30,72
	tubo	4,61	14,41	71,45
	ligadura	0,15	0,21	2,64
	fio	0,12	0,14	0,53
6,7	bracket	0,36	0,16	1,45
	banda	2,42	0,83	18,07
	tubo	0,07	0,13	0,60
	ligadura	0,09	0,13	0,98
	fio	0,08	0,13	0,42

De um modo geral pode concluir-se que os componentes imersos em saliva mais ácida apresentam maior libertação de metais, comparativamente à solução de pH=6,7, com exceção das ligaduras e do fio que parecem não apresentar diferenças entre os dois meios. Os maiores valores de concentração foram obtidos para o Fe, principal elemento constitutivo dos aços. Estes resultados ICP, estão em conformidade com os resultados da literatura^{23,24,26,60}, sendo reportado uma maior tendência na libertação de iões metálicos em soluções mais ácidas, como resultado da maior taxa de corrosão.

Importa, todavia, referir que a deteção de Cr e de Fe nas soluções contendo o fio Nitinol, Figura 4.13, poderá estar relacionada com alguma contaminação pelo processo de corte do fio por recurso a alicate, ainda que em concentrações muito baixas. Os componentes que exibem maior taxa de libertação são, sem dúvida, os *brackets* em meio ácido, enquanto que nas ligaduras as concentrações avaliadas, independentemente do pH não são significativas.

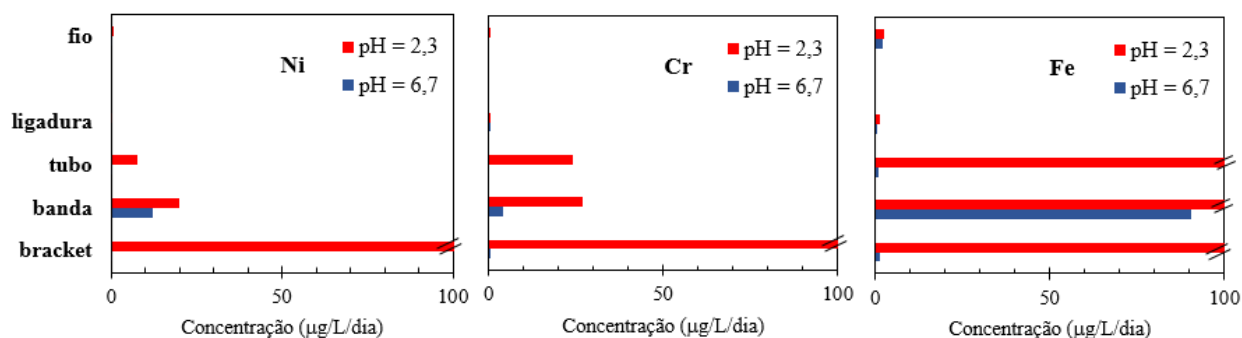


Figura 4.13 – Concentração de iões metálicos, por peça e por dia.

4.2.2. Avaliação da presença de corrosão

Os resultados por SEM/EDS relativos a um dos *brackets* após imersão estática, encontram-se na Figura 4.14. Como se pode concluir da análise comparativa destas micrografias, o *bracket* imerso em pH 2,3 apresenta pior comportamento à corrosão, validando os resultados de ICP anteriormente apresentados.

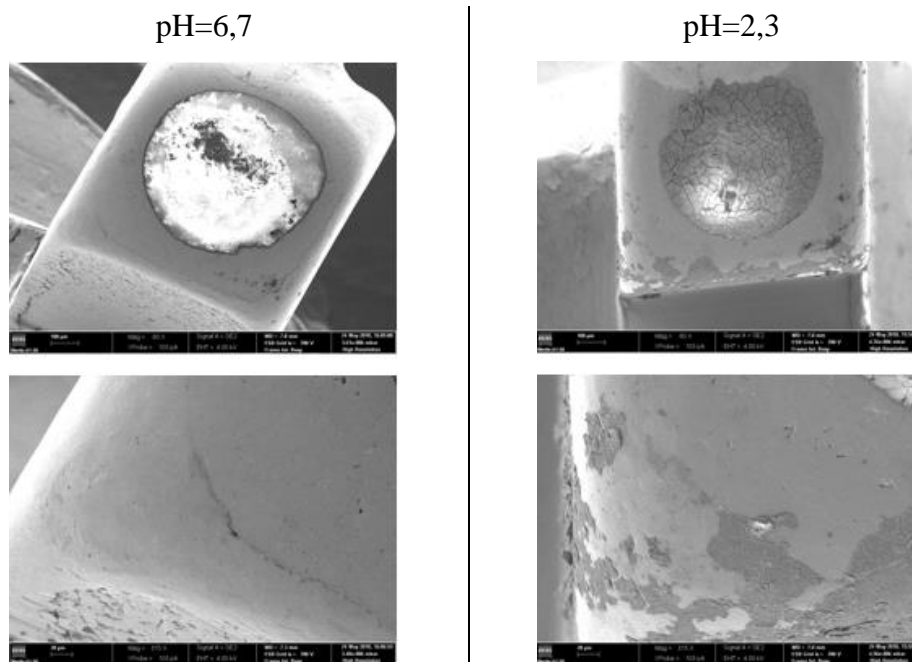


Figura 4.14 - Morfologia em superfície, por SEM, de *bracket* após imersão em saliva artificial

Enquanto o *bracket* em solução com pH similar ao salivar não mostra sinais evidentes de corrosão, o mesmo não se pode afirmar para o colocado em meio ácido. Assim, para aferir a composição elementar da camada formada após 30 dias de imersão em pH 2,3, efetuou-se análise EDS. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 4.15 e incluem além desta camada externa, a análise em área de uma zona sem filme.

A análise EDS da superfície sem filme do *bracket* revela como elementos metálicos principais os picos de Fe, Cr e Ni, constituintes do aço 303 SE (Tabela 3.3), e como elementos não metálicos o C e O. A camada de filme que cobre algumas zonas da peça (sobretudo as zonas mais internas) é formada por elementos metálicos como o Fe e o Cr, ainda que em percentagens inferiores relativamente à zona sem filme, e por elementos não metálicos como O, P, K, Ca e Cl. Trata-se pois da camada passiva formada à superfície dos aços inoxidáveis, contendo a mistura de óxido e hidróxido de Cr, Cr_2O_3 e CrOOH , e contendo ainda elementos constituintes da saliva artificial (P, K, Ca e Cl).

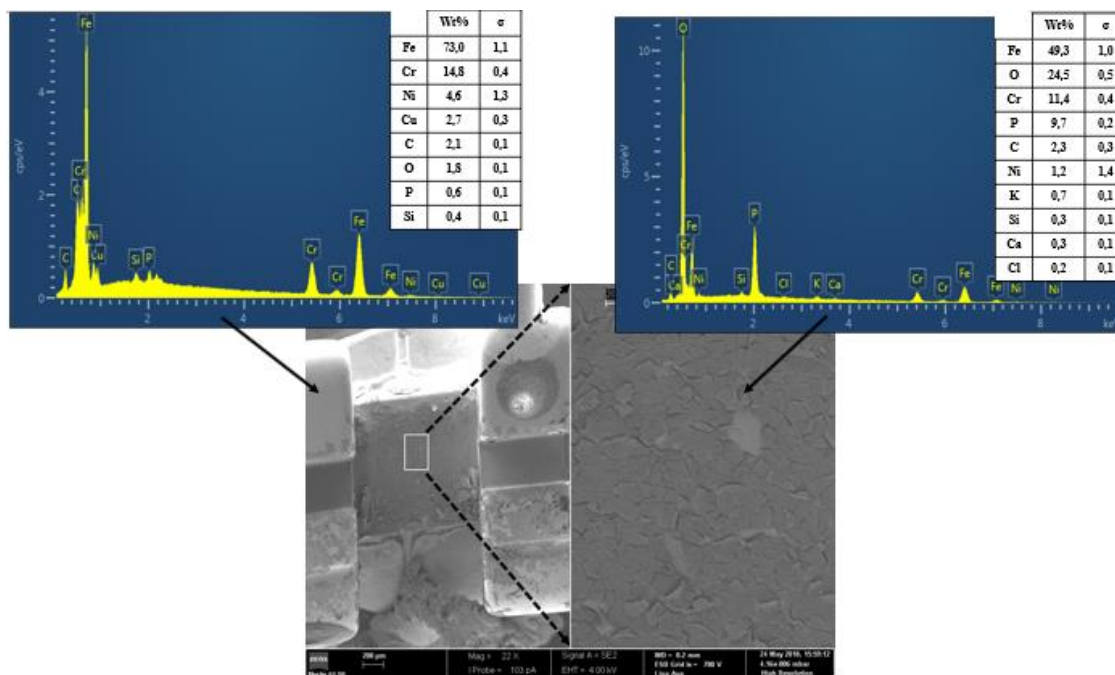


Figura 4.15 – Microanálise por EDS da superfície do *bracket* após 30 dias de imersão em saliva artificial a pH=2,3.

A quantificação elemental foi ainda completada pelos respectivos mapas de distribuição elemental, Figura 4.16 A comparação das distribuições elementares, associada a cada cor, é compreensível, ou seja, trata-se de uma camada rica em Cr, O e P. A distribuição do Ni (vermelho) e do Fe (amarelo) é mais pronunciada sobre a superfície do *bracket* do que na camada. Pode então concluir-se que os elementos que compõem a camada superficial do *bracket* provêm da composição da saliva artificial, e que este filme apresenta uma fraca adesão à superfície da peça, explicando os consideráveis teores de iões metálicos libertados pelos *brackets* em pH ácido.

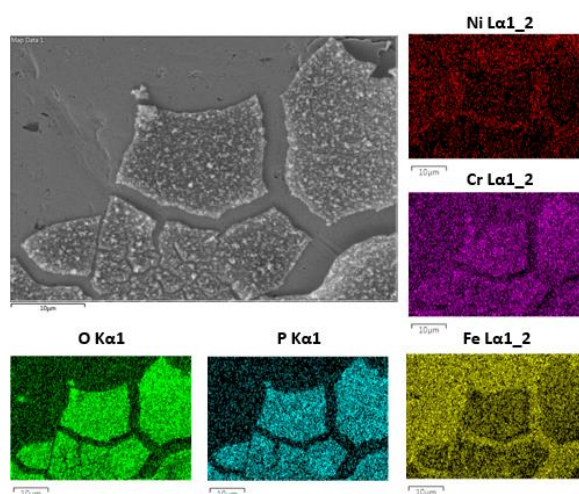


Figura 4.16 – Mapas de distribuição elemental EDS do *bracket* após 30 dias de imersão em saliva artificial a pH 2,3.

Colocando lado a lado a composição do *bracket* tal como recebido do fabricante determinada por SEM/EDS (Figura 4.17) e a composição discriminada pelo fornecedor (Tabela 3.3) vislumbram-se algumas diferenças, nomeadamente quanto ao teor de Ni que se revela metade do valor apontado pelo fabricante.

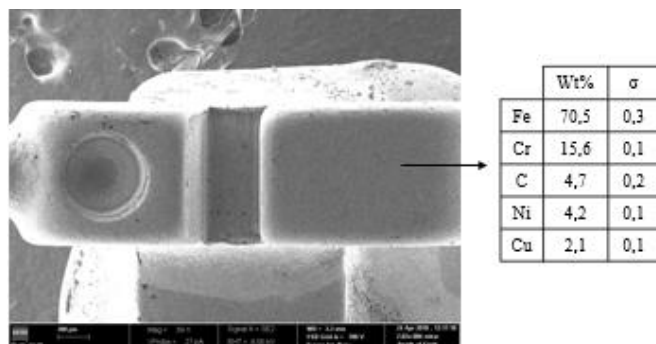


Figura 4.17 – Composição do *bracket* tal como recebido do fabricante.

Os *brackets* imersos em pH=6,7 apresentam um comportamento menos corrosivo. Como o ambiente nesta solução não é tão agressivo quando comparado com o pH mais ácido, não se libertam tantos iões como nesse meio (Tabela 4.5). Nos *brackets* imersos nestas condições não foi possível detetar a presença da camada de óxido. Na Figura 4.14, apresentada anteriormente, conseguem observar-se claras diferenças entre os *brackets* imersos nos diferentes valores de pH, acentuando assim a influência que um pH mais ácido tem nos fenómenos corrosivos.

A lista de elementos que integram a composição dos tubos do estudo apresenta ligeiras diferenças quando comparados os dados obtidos por SEM/EDS (Figura 4.18) com os fornecidos pelo fabricante (Tabela 3.3), sendo determinada por Microscopia Eletrónica de Varrimento uma percentagem de Ni e de Cu inferior à declarada na ficha da peça.

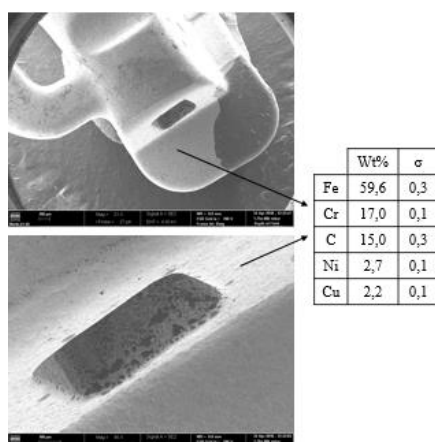


Figura 4.18 – Composição do tubo tal como recebido do fabricante.

No que concerne ao comportamento dos tubos *in vitro*, mostram-se na Figura 4.19 as micrografias relativas ao orifício retangular, onde é introduzido o fio, e ao pino do tubo, acessório para a colocação de elásticos ortodônticos pelo próprio paciente. Como se pode concluir da análise comparativa, os tubos apresentam características muito semelhantes independentemente do pH da solução de saliva. Em ambos os casos não se registaram diferenças assinaláveis quando comparados com o tubo antes da imersão (assim como recebido do fornecedor).

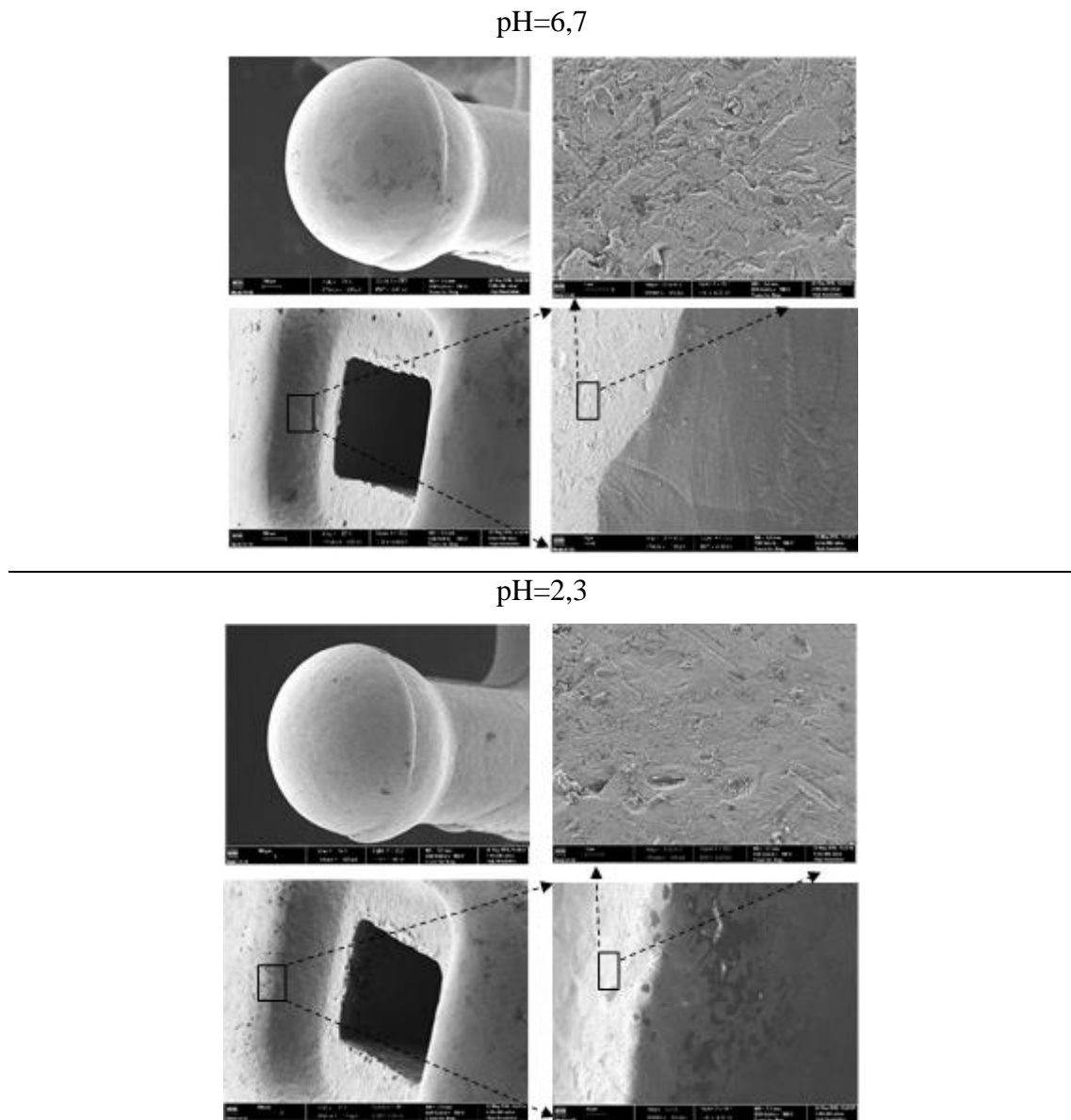


Figura 4.19 – Morfologia em superfície, por SEM, de tubos após imersão em saliva artificial.

Por SEM/EDS não se identificaram camadas externas de óxidos, exceto em pequenas zonas do tubo imerso em pH=2,3 cuja adesão ao aço é mais fraca (Figura 4.20), e talvez precisamente devido a este destacamento da camada passiva, a libertação de iões metálicos foi superior nos tubos imersos no pH mais ácido, quando comparados com os tubos em pH=6,7. Também através da análise das imagens dos tubos se percebe que, independentemente do pH, não se verificam sinais de corrosão a mencionar, apenas sendo observáveis pequenos defeitos do acabamento da peça (Figura 4.19), encontrando-se em concordância com os resultados da Espectrometria de Emissão Atômica, pois nestes dados podemos constatar que a libertação de iões provenientes dos tubos é baixa, sobretudo quando se compara com os valores libertados pelos brackets. Apesar da maior concentração de iões libertados pelos tubos em pH=2,3 em relação à determinada na solução de pH=6,7 pela razão mencionada anteriormente, os teores de iões metálicos são consideravelmente inferiores aos observados nas amostras dos brackets.

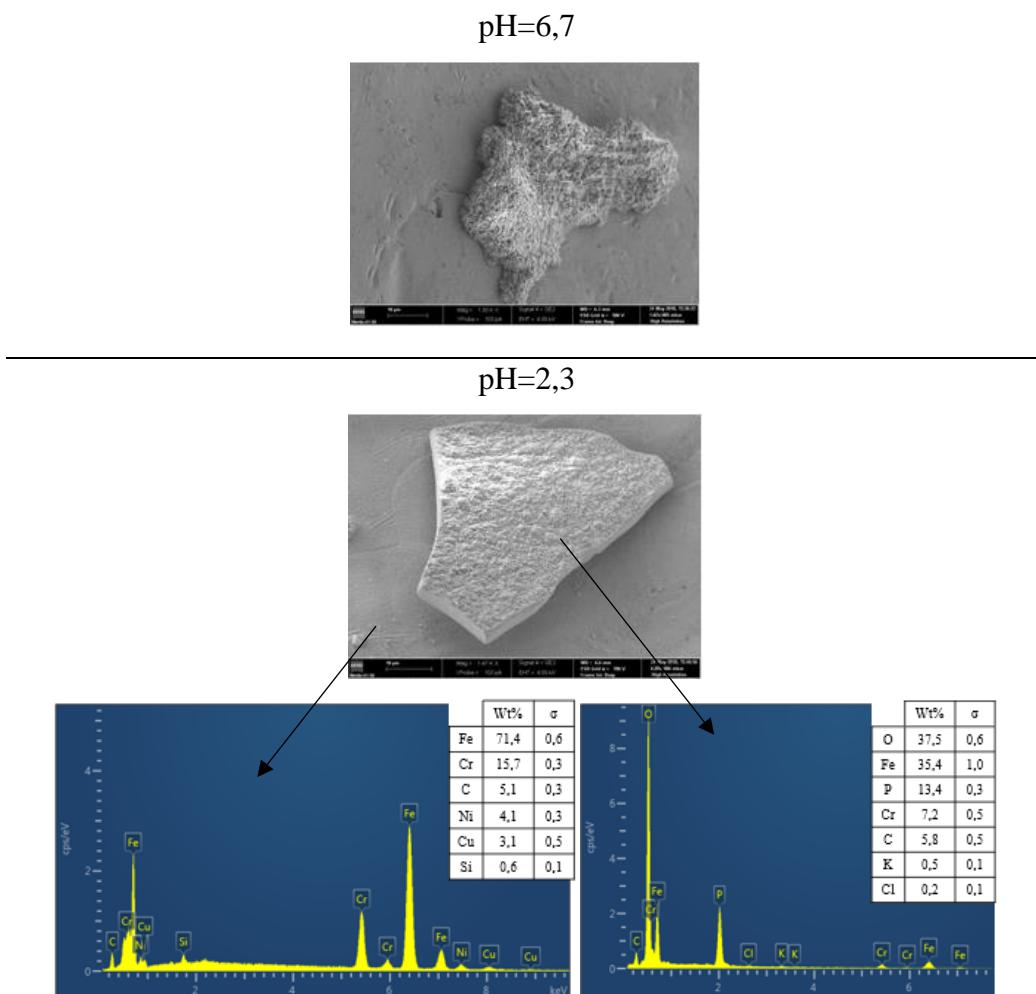


Figura 4.20 – Morfologia em superfície, por SEM, de fragmentos do filme depositado nos tubos.

A análise da morfologia da superfície das bandas é apresentada na Figura 4.21.

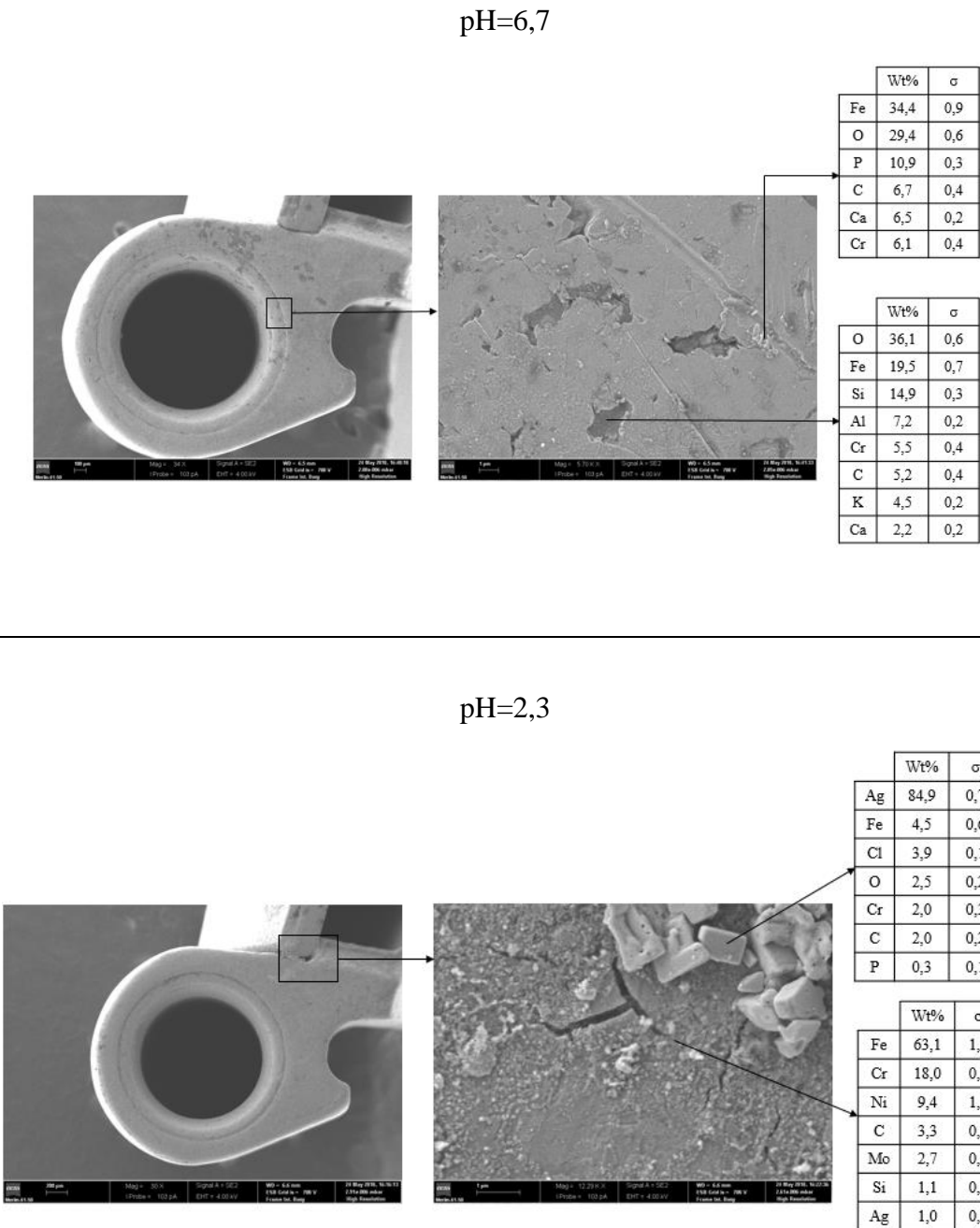


Figura 4.21 – Morfologia em superfície, por SEM, das bandas após imersão em saliva artificial.

Por SEM, na banda de pH=6,7 não se observou a formação de óxido na superfície. Todavia, uma análise mais pormenorizada ao tubo que compõe a banda permitiu identificar algumas alterações morfológicas que requerem um estudo mais preciso, nomeadamente na zona de ligação com o fio na qual se observa a junção de duas peças diferentes soldadas.

Nesta banda são visíveis alguns defeitos resultantes do acabamento. Com uma maior ampliação ainda é possível distinguir-se uma película de óxido, que possivelmente será a camada de Cr-O, camada passiva uniformemente distribuída. Esta parece ser constituída ainda por elementos provenientes da composição da saliva artificial, tais como o fósforo e o cálcio, e apresenta arrancamentos que deixam a descoberto os elementos do aço (Figura 4.21).

A banda imersa em pH=2,3 apresenta defeitos resultantes do acabamento, sendo evidente a fraca ligação das estruturas que compõe a peça. Estes defeitos, tais como fendas e arrancamentos, podem ter contribuído para um maior ataque corrosivo, o que poderá justificar os consideráveis níveis de iões metálicos libertados por esta peça na solução de imersão. Na superfície da banda pode observar-se uma camada de óxido e alguns cristais de cloreto de prata, formados a partir dos constituintes da saliva artificial e de resíduos da soldadura (Figura 4.22).

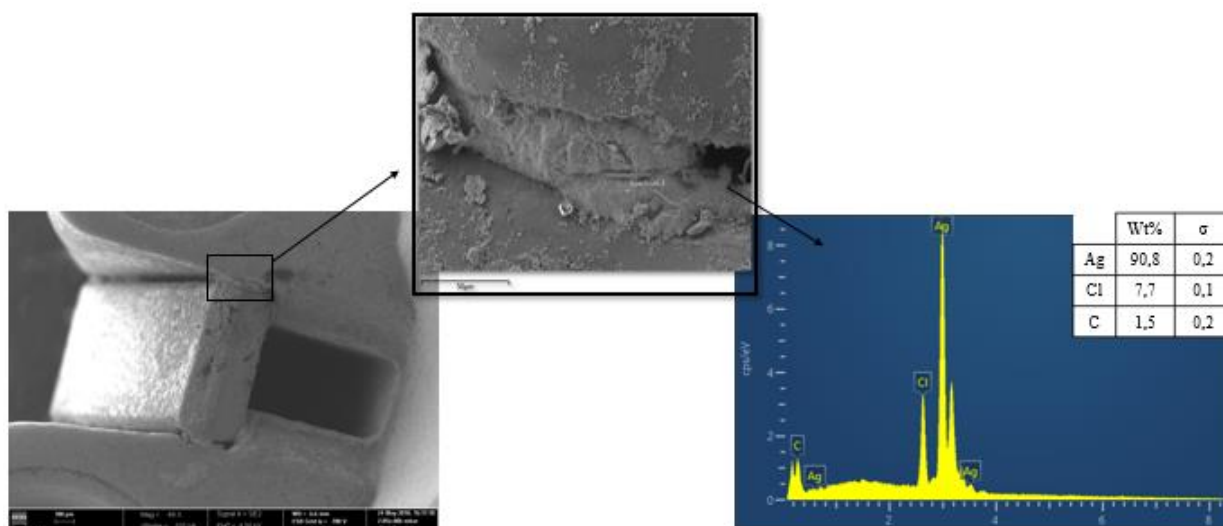


Figura 4.22 – Junção das peças que compõe a banda, mostrando na ampliação a soldadura de prata.

Das peças de aço inoxidável faltam ainda analisar as ligaduras metálicas. Os teores de iões metálicos libertados a partir das ligaduras, quer no pH=2,3 quer no pH=6,7, revelaram-se baixos, significando que a contribuição destes componentes para a libertação de iões Ni, Cr e Fe durante o tratamento ortodôntico é mínima. Devido às suas pequenas dimensões não foi possível analisar por SEM/EDS as superfícies das ligaduras.

O único componente do estudo composto por uma liga níquel-titânio é o fio. A composição do fio NiTi determinada por SEM/EDS foi ao encontro dos valores declarados pelo fornecedor (Figura 4.23 e Tabela 3).

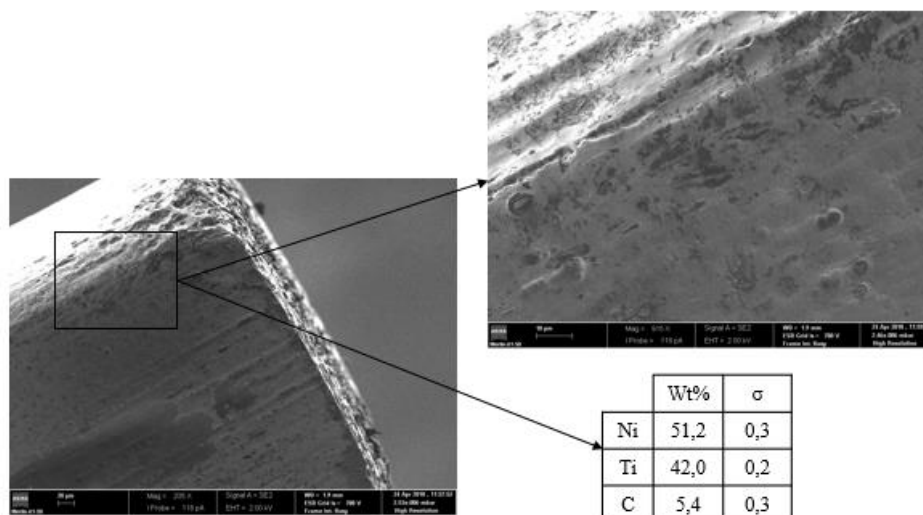


Figura 4.23 – Fio NiTi antes da imersão (ampliação e composição).

Os teores de íons metálicos libertados ficaram abaixo dos limites de quantificação para a solução de pH=6,7, e revelaram-se baixos mesmo quando se está perante o cenário mais agressivo de pH=2,3. As imagens obtidas por SEM vêm corroborar estes resultados, pois apenas se observam alguns defeitos de fabrico (nomeadamente marcas típicas da trefilação). Olhando pois para o fio como recebido da fábrica, antes da imersão, e após ser colocado em saliva artificial durante 30 dias em dois valores de pH diferentes, não existem diferenças assinaláveis (Figura 4.24).

No entanto, relativamente à composição da peça, verifica-se por EDS que tanto no fio em pH=2,3 como no fio em pH=6,7 existe um incremento de oxigénio, possivelmente relacionado com a formação da camada passiva (TiO , TiO_2 , TiO_3), favorecida pelas condições estáticas da imersão³⁵.

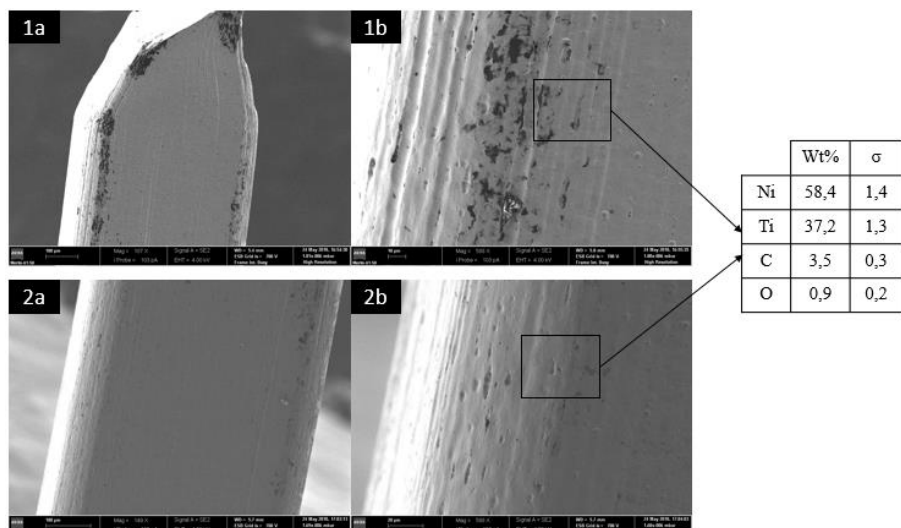


Figura 4.24 - Micrografias por SEM de fio após imersão: **1a e 1b** - pH=2,3; **2a e 2b** - pH=6,7.

Com o estudo *in vitro* dos vários componentes do aparelho fixo fica evidenciado que a libertação de iões metálicos não é proporcional ao seu teor na liga da peça, tal como reportam estudos anteriores^{1,3,26,60}. No estudo aqui apresentado, fio NiTi que possui uma percentagem de Ni bastante mais elevada que a presente nos *brackets*, nos tubos e nas bandas, libertou uma quantidade de iões Ni considerada mínima, contrastando com os valores determinados nas peças de aço inoxidável. Assim, fica claro que a libertação de iões a partir das ligas metálicas não é um processo linear. Para além disso, a reduzida libertação de iões Ni observada pelo fio em ambos os pH, sobretudo quando comparada com o teor presente na liga, pode ser explicada devido à quantidade significativa de titânio presente na liga (~45%)⁶¹, um elemento altamente resistente à corrosão, e à combinação deste com o níquel, que produz uma liga com um excelente comportamento perante os fenómenos corrosivos³³. Assim, no nosso estudo a maior libertação de iões metálicos foi observada nos *brackets*, seguida das bandas e dos tubos, sendo o fio a peça com menor libertação. Também em estudos *in vivo* podemos encontrar conclusões semelhantes. Dwivedi et al.⁶ ao observarem que a libertação de iões permaneceu semelhante após a troca do fio NiTi por um fio de aço inoxidável, concluíram que a libertação de iões Ni se devia sobretudo à corrosão de peças como *brackets* e bandas, e não ao fio propriamente dito. Também Petoumeno et al.⁹ chegaram à mesma conclusão ao registarem uma maior concentração de Ni após a colocação dos *brackets* quando comparada com os valores registados após a colocação do fio NiTi.

Estudos anteriores que procuravam comparar fios NiTi com fios de aço inoxidável concluíram que os fios de NiTi, apesar da maior percentagem de Ni na sua composição, libertaram menos iões Ni quando comparado com os fios de aço inoxidável^{33,60,61}. No entanto, existem na literatura artigos que não corroboram esses resultados, já que nestes, a libertação de iões metálicos em fios de aço inoxidável é inferior à observada em fios NiTi^{1,34,62}.

Ficou também clara a influência do pH da solução na corrosão dos materiais metálicos. Investigações anteriores tinham já concluído que a libertação de iões é um fenómeno promovido por um meio mais ácido^{23,24,26,60}, uma vez que um ambiente redutor torna menos estável o filme de óxido que protege o metal.

Os *brackets* foram as peças que mais libertaram iões Ni, Cr e Fe. Estudos anteriores debruçaram-se sobre o efeito do tratamento térmico aplicado a estas peças, a fim de as tornar reutilizáveis e aptas para um novo tratamento ortodôntico, concluindo que a libertação de iões metálicos pelos *brackets* tratados é superior à verificada em *brackets* novos, podendo chegar a ser dez vezes maior²⁶. Estes estudos verificaram que após o tratamento térmico a composição dos *brackets* não se alterou, o que leva a concluir que a maior libertação de iões que ocorre nos mesmos se deve sobretudo à redução da resistência à corrosão após o tratamento. Uma possível explicação para este fenómeno prende-se com o facto da maioria dos *brackets* ser constituída por aço inoxidável na fase austenítica, e quando este é aquecido a temperaturas que variam de 400°C até 900°C, dá-se a formação um precipitado de carboneto de crómio que leva a uma desintegração parcial da liga e ao conseqüente enfraquecimento da estrutura²⁴.

Para que os *brackets* consigam infligir a força exata exercida pelo fio no dente, estes devem possuir a dureza e a resistência mecânica adequadas, uma superfície sem rugosidades para que a deposição de placa e compostos orgânicos seja minimizada, e deve ainda existir o mínimo de fricção entre o *bracket* e o fio². A resistência do aço inoxidável que compõe os *brackets* deve-se sobretudo à formação da camada passiva de óxido de crómio na superfície do mesmo. Quando esta camada é exposta a condições que a tornam menos estável (como quando está em contacto com a saliva), ocorre a libertação de iões Cr para o meio. A camada passiva torna a formar-se assim que o *bracket* é de novo exposto ao ambiente da cavidade oral, mas quando ocorre a repassivação existem alguns iões Cr que não se tornam a ligar e que eventualmente ficam livres no meio⁶³, sendo estes os iões detetados na análise ICP-OES. Por sua vez, a libertação de iões Ni ocorre devido

à posição que estes ocupam na estrutura da peça metálica. Os iões Ni situam-se perto da superfície do *bracket*, ajudando a melhorar a sua resistência à corrosão uma vez que competem com o crómio na formação de sais e, como possuem uma maior afinidade, permite que exista mais crómio disponível para formar a camada passiva. Porém, como a ligação entre os átomos de Ni e os compostos intermetálicos não é muito forte, a libertação de iões Ni dá-se para o meio até que a superfície se desgaste completamente ou até que uma nova camada passiva se deposite e impeça a libertação de níquel⁶³.

De um ponto de vista clínico, a corrosão dos *brackets* pode afetar a forma como o fio desliza sobre eles e conseqüentemente o tratamento ortodôntico pode ficar comprometido³⁷. Isto porque um *bracket* corroído apresenta normalmente uma superfície mais irregular e com uma maior acumulação de produtos de corrosão e, assim, a fricção entre o *bracket* e o fio durante os movimentos aumenta, tornando necessário a aplicação de uma força maior. Se for aplicada uma força excessiva no *bracket*, o controlo mecânico torna-se mais difícil de concretizar e com isto aumenta a probabilidade de ocorrer rutura da peça⁶⁴.

Apesar de se verificar nos tubos a ligação entre vários componentes na constituição da peça em si, foi nas bandas que a união destas estruturas foi mais evidente. Sabe-se que é a combinação do processamento da peça com a sua composição que afeta a libertação dos iões. Nestas peças constituídas por mais que uma estrutura, a união das mesmas faz-se através do processo de soldadura, sendo que a composição da soldadura e a forma como se encontram ligadas as diferentes estruturas podem afetar a libertação de iões metálicos²⁴. Tal como no estudo Wendl et al.¹ se verificou a presença de cobalto na superfície da banda, que na sua composição química não possuía este elemento, levando a crer que a origem do cobalto detetado seria da soldadura utilizada para unir as estruturas que compunham a peça, também se observou através de SEM/EDS a presença de prata na superfície da banda e conclui-se através da análise da composição da soldadura que esta seria a origem do elemento (Figura 27).

Ainda comparando o presente estudo com o de Wendl et al.¹, também aqui a superfície das bandas esteve em total contacto com a solução de saliva artificial (o que não acontece em situação real), e como consequência poderá ter existido uma sobreestimação da libertação de iões. Porém, enquanto que no estudo de Wendl et al. as bandas foram os componentes com a maior libertação de iões, seguindo-se os *brackets* e o fio (estes dois com níveis semelhantes de libertação), neste estudo os *brackets* foram as

peças mais afetadas pela corrosão tendo sido as que apresentaram maiores concentrações de íons libertados.

Os estudos *in vitro* enfrentam como principal limitação a incapacidade de mimetizar o ambiente oral, não conseguindo recriar as variações de pH e de temperatura, originadas principalmente pela grande variedade na dieta dos indivíduos no dia-a-dia (podendo a temperatura variar entre 1,6 e 65,4 °C e o pH entre 2,0 e 14,0 ⁶⁵), nem conseguindo reproduzir a interação entre o fio e as restantes peças do aparelho e os movimentos a ela associados, para além de falharem na imitação da complexa composição da saliva e das condições dinâmicas observadas na boca. Assim, no presente estudo não se procurou recriar o ambiente da cavidade oral, mas sim avaliar a libertação de íons metálicos de cada peça que compõe o aparelho fixo, em dois ambientes diferentes, um com um pH mais extremo (pH=2,3) e um com pH próximo ao valor normal da boca ⁶⁵.

Porém, temos de ter sempre presente que as peças em situação real estão ligadas entre si e que, devido às interações e movimentos derivados da sua ligação, a suscetibilidade dos materiais à corrosão aumenta²³. Para além disso, importa referir que as elevadas temperaturas a que ocorre o processo da ligação das várias peças na boca dos pacientes podem introduzir rugosidade na superfície dos materiais e provocar alterações na estrutura cristalina dos mesmos, aumentando assim a suscetibilidade à corrosão³³. Também as condições estáticas utilizadas na imersão dos componentes deste estudo não têm em conta a renovação do fluxo salivar e a escovagem dos dentes e o uso de pastas fluoretadas, que podem degradar a camada de óxido e permitir uma maior libertação de íons do que a observada *in vitro*^{33,35}. Assim, os resultados do presente estudo *in vitro* devem ser interpretados tendo em conta as limitações dos estudos desta categoria.

Como foi anteriormente referido, e como os artigos da literatura também o referem^{3,32,35,62}, as inúmeras diferenças verificadas entre as investigações *in vitro*, desde o objeto de estudo (que incluem peças de diferentes composições e de fabricantes distintos), às condições e técnicas adotadas por cada uma (entre as quais a solução de imersão, as condições experimentais, o tempo de estudo), fazem com que seja impossível realizar uma comparação direta dos vários resultados. Assim, uma sugestão para futuros estudos seria definir normas e protocolos comuns que permitissem comparar uma relação mg/ml de íons metálicos libertados por volume de solução.

Quer os estudos *in vivo* realizados, quer as investigações *in vitro*, não têm em conta o tempo real do tratamento ortodôntico, considerando apenas exposições de curta duração quando comparadas com os 2-3 anos de um caso clínico real. Assim, a influência dos processos corrosivos e de fenómenos tais como a ação microbiana, o uso ou a fadiga na libertação de iões metálicos podem não ter sidos em conta¹⁶.

A resistência à corrosão é um parâmetro importante para o sucesso do tratamento ortodôntico. Basta pensar que a utilização de metais com boa resistência à corrosão pode promover a diminuição da fricção entre as superfícies das peças do aparelho fixo e assim induzir movimentos mais precisos ao dente, diminuindo a duração total do tratamento². Também de um ponto de vista biológico é importante minimizar ao máximo a libertação de iões metálicos, potencialmente tóxicos, a partir dos componentes ortodônticos⁶³. Para tal, diversas técnicas têm sido estudadas para aumentar a resistência à corrosão dos materiais metálicos utilizados em práticas ortodônticas, tais como a utilização da técnica de molde de injeção na produção dos *brackets* (evitando a soldadura de peças), a incorporação de cobre na liga ou revestimentos de TiN ou de resina epoxy^{8,17}.

Apesar de as conclusões *in vitro* e *in vivo* encontradas na literatura e já discutidas anteriormente apresentarem valores não significativos quando comparados com os valores de ingestão diária bem como não atingirem níveis de toxicidade, deve-se vigiar de perto o comportamento dos materiais constituintes do aparelho fixo aos fenómenos corrosivos, assim como investigar melhor o efeito das baixas concentrações de iões metálicos libertados ao nível molecular⁷.

5. Conclusões

O presente trabalho teve como grande objetivo a determinação e comparação das concentrações de íons metálicos, nomeadamente de Ni, Cr e Fe, presentes na saliva de pacientes após a colocação de aparelho ortodôntico fixo *multibrackets*, em diferentes períodos do tratamento clínico.

As médias das concentrações de Ni e de Cr determinadas por ICP-OES na saliva dos pacientes aumentaram ligeiramente quatro semanas após a colocação do aparelho fixo, decrescendo a partir desse momento para valores abaixo dos registados antes de iniciar o tratamento. No que diz respeito ao íon Fe, o maior aumento da sua concentração média regista-se uma semana após o início do tratamento, diminuindo às quatro semanas e voltando a atingir valores mais elevados às doze semanas após a inserção dos componentes ortodônticos.

A hipótese nula testada neste estudo de que as concentrações de íons metálicos na saliva dos pacientes não se alteram significativamente após a colocação de aparelho fixo foi aceite ($P > 0,05$), demonstrando que as diferenças entre as concentrações de Ni, Cr e Fe nos vários intervalos não se revelaram estatisticamente significativas. Mais ainda, em todos os momentos estudados verificou-se que as concentrações de íons metálicos se situavam abaixo dos limites de ingestão diária.

A análise por SEM/EDS de fios NiTi usados por alguns pacientes durante algumas semanas veio demonstrar uma forte acumulação de biofilme na superfície das peças, sendo apenas observados sinais de corrosão em zonas não cobertas pela placa bacteriana, nomeadamente arrancamento de material e riscos à superfície da peça. Nas imagens SEM de um *bracket* e de um tubo que permaneceram dois anos na cavidade oral de uma paciente não pertencente à nossa amostra, vislumbra-se uma acumulação de biofilme ainda mais proeminente e sinais de corrosão visivelmente mais evidentes que os observados nos fios NiTi dos pacientes do estudo, realçando a influência do tempo de utilização e do uso da peça na corrosão dos materiais.

Em geral, no estudo *in vitro* os teores de íons Ni, Cr e Fe libertados a partir das peças que compõe o aparelho fixo mostraram-se notavelmente superiores nas soluções de saliva artificial com pH mais ácido (pH=2,3). Os resultados provenientes da análise por ICP-OES vieram ainda mostrar que, tal como estudos anteriores comprovaram, a libertação

de metais não é um processo linear nem proporcional ao teor do elemento na liga. Assim, observou-se que apesar dos fios NiTi serem as peças que possuem na composição da sua liga a maior percentagem de Ni, estes foram os componentes que menos iões Ni libertaram. Os *brackets* foram as peças metálicas que mais iões Ni, Cr e Fe libertaram, seguidos das bandas. As imagens SEM/EDS das superfícies destes componentes vêm corroborar os resultados obtidos por ICP-OES, evidenciando a presença de camadas de óxido nos *brackets* e nas bandas e de arrancamentos de material.

O estudo *in vivo* enfrentou algumas dificuldades típicas dos estudos desta natureza, como a falha de amostras de saliva de alguns pacientes ou a pequena quantidade de saliva que os pacientes forneceram, dificultando o posterior tratamento químico da mesma e a análise das concentrações dos iões metálicos. Assim, fica a sugestão para que num próximo estudo se procure utilizar uma amostra de pacientes maior, já que aumentando o número de casos clínicos estudados aumentará também a fiabilidade das elações retiradas.

Ainda relativamente ao estudo *in vivo* aqui apresentado, seria bom recolher novamente amostras de saliva dos pacientes que integraram esta investigação numa data mais espaçada em relação ao momento da colocação do aparelho, como por exemplo um ou dois anos após o início do tratamento ortodôntico. Também se afiguraria pertinente analisar por SEM/EDS as peças de aço inoxidável dos pacientes do estudo, algo que apenas poderá ser levado a cabo no final do respetivo tratamento.

Podem-se ainda deixar algumas sugestões quanto ao estudo *in vitro*. Neste estudo a solução de saliva artificial em pH=6,7 mostrou um certo grau de turvação após quatro semanas, o que dificultou a análise ICP-OES, pelo que em investigações futuras seria interessante utilizar soluções de diferente composição e com reagentes que diminuam este efeito. Para avaliar a ação da corrosão nas peças metálicas seria também positivo realizar um estudo em condições dinâmicas e em condições de temperatura que mimetizem o ambiente da cavidade oral.

As comparações entre os estudos *in vivo* e entre os estudos *in vitro* são difíceis de concretizar, por isso, para conseguir resultados comparáveis e fiáveis talvez fosse vantajoso elaborar regras rigorosas e procedimentos padrão para a realização de futuros estudos em condições controladas para que os resultados consigam ser reprodutíveis.

Sabendo a importância que uma boa resistência à corrosão tem no sucesso do tratamento clínico, quer na preservação das boas propriedades mecânicas do metal, quer na redução da libertação de iões metálicos para a cavidade oral, é importante continuar a investigar o efeito dos fenómenos corrosivos nos componentes do aparelho fixo. Mais ainda, apesar dos valores de concentrações de iões metálicos encontrados neste estudo, tal como em estudos anteriores, não constituírem um perigo para a saúde (exceto para as pessoas sensíveis), dado que se encontram abaixo dos limites de ingestão diária aceites, deve-se continuar a vigiar de perto a libertação destes iões em meio oral. Na realidade, mesmo a partir de baixas concentrações podem ser desencadeadas respostas inflamatórias, alterações na morfologia e no metabolismo celular e causar a instabilidade das cadeias de ADN¹².

6. Referências

1. Wendl B, Wiltsche H, Lankmayr E, et al. Metal release profiles of orthodontic bands, brackets, and wires: an in vitro study. *J Orofac Orthop / Fortschritte der Kieferorthopädie*. 2017;78(6):494-503. doi:10.1007/s00056-017-0107-z
2. Oh KT, Choo SU, Kim KM, Kim KN. A stainless steel bracket for orthodontic application. *Eur J Orthod*. 2005;27(3):237-244. doi:10.1093/ejo/cji005
3. Mikulewicz M, Chojnacka K, Woźniak B, Downarowicz P. Release of metal ions from orthodontic appliances: An in vitro study. *Biol Trace Elem Res*. 2012;146(2):272-280. doi:10.1007/s12011-011-9233-4
4. House K, Sernetz F, Dymock D, Sandy JR, Ireland AJ. Corrosion of orthodontic appliances-should we care? *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 2008;133(4):584-592. doi:10.1016/j.ajodo.2007.03.021
5. Eliades T, Athanasiou AE. In Vivo Aging of Orthodontic Alloys: Implications for Corrosion Potential, Nickel Release, and Biocompatibility. *Angle Orthod*. 2002;72(3):222-237. doi:10.1043/0003-3219(2002)072<0222:IVA00A>2.0.CO;2
6. Dwivedi A, Tikku T, Khanna R, Maurya R, Verma G, Murthy R. Release of nickel and chromium ions in the saliva of patients with fixed orthodontic appliance: An in-vivo study. *Natl J Maxillofac Surg*. 2015;6(1):62. doi:10.4103/0975-5950.168224
7. Nayak RS, Khanna B, Pasha A, Vinay K, Narayan A, Chaitra K. Evaluation of nickel and chromium ion release during fixed orthodontic treatment using inductively coupled plasma-mass spectrometer: An in vivo study. *J Int oral Heal*. 2015;7(8):14-20.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26464533>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4588781>.

8. Khaneh Masjedi M, Niknam O, Haghghat Jahromi N, Javidi P, Rakhshan V. Effects of Fixed Orthodontic Treatment Using Conventional, Copper-Included, and Epoxy-Coated Nickel-Titanium Archwires on Salivary Nickel Levels: A Double-Blind Randomized Clinical Trial. *Biol Trace Elem Res.* 2016;174(1):27-31. doi:10.1007/s12011-016-0690-7
9. Petoumeno E, Kislyuk M, Hoederath H, Keilig L, Bourauel C, Jäger A. Corrosion susceptibility and nickel release of nickel titanium wires during clinical application. *J Orofac Orthop.* 2008;69(6):411-423. doi:10.1007/s00056-008-0808-4
10. De Souza RM, De Menezes LM. Nickel, chromium and iron levels in the saliva of patients with simulated fixed orthodontic appliances. *Angle Orthod.* 2008;78(2):345-350. doi:10.2319/111806-466.1
11. Ortiz AJ, Fernández E, Vicente A, Calvo JL, Ortiz C. Metallic ions released from stainless steel, nickel-free, and titanium orthodontic alloys: Toxicity and DNA damage. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2011;140(3). doi:10.1016/j.ajodo.2011.02.021
12. Amini F, Rakhshan V, Mesgarzadeh N. Effects of long-term fixed orthodontic treatment on salivary nickel and chromium levels: A 1-Year prospective cohort study. *Biol Trace Elem Res.* 2012;150(1-3):15-20. doi:10.1007/s12011-012-9457-y
13. Kerosuo H, Moe G, Hensten-Pettersen a. Salivary nickel and chromium in subjects with different types of fixed orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1997;111(6):595-598. doi:S0889540697001194 [pii]
14. Anusavice KJ. *Phillips' Science of Dental Materials - EBook.* Elsevier Health Sciences; 2003. <https://books.google.pt/books?id=ZtFwJCAiF3wC>.
15. Amini F, Borzabadi Farahani A, Jafari A, Rabbani M. In vivo study of metal content of oral mucosa cells in patients with and without fixed orthodontic appliances. *Orthod Craniofac Res.* 2008;11(1):51-56. doi:10.1111/j.1601-6343.2008.00414.x

16. Sahoo N, Kailasam V, Padmanabhan S, Chitharanjan AB. In-vivo evaluation of salivary nickel and chromium levels in conventional and self-ligating brackets. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2011;140(3):340-345.
doi:10.1016/j.ajodo.2010.05.022
17. Chaturvedi T, Upadhyay S. An overview of orthodontic material degradation in oral cavity. *Indian J Dent Res.* 2010;21(2):275. doi:10.4103/0970-9290.66648
18. Eliades G. *Dental Materials in Vivo: Aging and Related Phenomena.* Quintessence Publishing Company; 2003.
<https://books.google.pt/books?id=F64TAQAAMAAJ>.
19. Bakhtari A, Bradley TG, Lobb WK, Berzins DW. Galvanic corrosion between various combinations of orthodontic brackets and archwires. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2011;140(1):25-31. doi:10.1016/j.ajodo.2010.05.021
20. Kolokitha OE, Chatzistavrou E. A severe reaction to Ni-containing orthodontic appliances. *Angle Orthod.* 2009;79(1):186-192. doi:10.2319/111507-531.1
21. Amini F, Jafari A, Amini P, Sepasi S. Metal ion release from fixed orthodontic appliances--an in vivo study. *Eur J Orthod.* 2012;34(1):126-130.
doi:10.1093/ejo/cjq181
22. Sandin B, Chorot P. Changes in Skin, Salivary, and Urinary pH as Indicators of Anxiety Level in Humans. *Psychophysiology.* 1985;22(2):226-230.
doi:10.1111/j.1469-8986.1985.tb01591.x
23. Staffolani N, Damiani F, Lilli C, et al. Ion release from orthodontic appliances. *J Dent.* 1999;27(6):449-454. doi:10.1016/S0300-5712(98)00073-6
24. Huang TH, Yen CC, Kao CT. Comparison of ion release from new and recycled orthodontic brackets. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2001;120(1):68-75.
doi:10.1067/mod.2001.113794
25. von Fraunhofer JA. Corrosion of orthodontic devices. *Semin Orthod.* 1997;3(3):198-205. doi:10.1016/S1073-8746(97)80070-9

26. Sfondrini MF, Cacciafesta V, Maffia E, et al. Nickel release from new conventional stainless steel, recycled, and nickel-free orthodontic brackets: An in vitro study. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2010;137(6):809-815.
doi:10.1016/j.ajodo.2008.07.021
27. Fors R, Persson M. Nickel in dental plaque and saliva in patients with and without orthodontic appliances. *Eur J Orthod.* 2006;28(3):292-297.
doi:10.1093/ejo/cji091
28. Hamilton W a. Bioenergetics of sulphate-reducing bacteria in relation to their environmental impact. *Biodegradation.* 1998;9(3-4):201-212.
doi:10.1023/a:1008362304234
29. Ağaoğlu G, Arun T, Izgü B, Yarat A. Nickel and Chromium Levels in the Saliva and Serum of Patients with Fixed Orthodontic Appliances. *Angle Orthod.* 2001;71(5):375-379. doi:10.1016/j.sdentj.2013.10.001
30. Mikulewicz M, Chojnacka K. Trace Metal release from orthodontic appliances by in vivo studies: A systematic literature review. *Biol Trace Elem Res.* 2010;137(2):127-138. doi:10.1007/s12011-009-8576-6
31. Wataha JC, Lockwood PE, Schedle A, Noda M, Bouillaguet S. Ag, Cu, Hg and Ni ions alter the metabolism of human monocytes during extended low-dose exposures. *J Oral Rehabil.* 2002;29(2):133-139. doi:10.1046/j.1365-2842.2002.00845.x
32. Haddad ACSS, Tortamano A, de Souza AL, de Oliveira PV. An in vitro comparison of nickel and chromium release from brackets. *Braz Oral Res.* 2009;23(4):399-406. doi:10.1590/S1806-83242009000400009
33. Hwang CJ, Shin JS, Cha JY. Metal release from simulated fixed orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001;120(4):383-391.
doi:10.1067/mod.2001.117911
34. Hussain HD, Ajith SD, Goel P. Nickel release from stainless steel and nickel titanium archwires - An in vitro study. *J Oral Biol Craniofacial Res.* 2016;6(3):213-218. doi:10.1016/j.jobcr.2016.06.001

35. Ramazanzadeh BA, Ahrari F, Sabzevari B, Habibi S. Nickel Ion Release from Three Types of Nickel-titanium-based Orthodontic Archwires in the As-received State and After Oral Simulation. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2014;8(2):71-76. doi:10.5681/joddd.2014.013
36. Mockers O, Deroze D, Camps J. Cytotoxicity of orthodontic bands, brackets and archwires in vitro. *Dent Mater*. 2002;18(4):311-317. doi:10.1016/S0109-5641(01)00055-0
37. Danaei SM, Safavi A, Roeinpeikar SMM, Oshagh M, Iranpour S, Omidekhoda M. Ion release from orthodontic brackets in 3 mouthwashes: An in-vitro study. *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 2011;139(6):730-734. doi:10.1016/j.ajodo.2011.03.004
38. Kerosuo H, Moe G, Kleven E. In vitro release of nickel and chromium from different types of simulated orthodontic appliances. *Angle Orthod*. 1995;65(2):111-116. doi:10.1043/0003-3219(1995)065<0111:ivrona>2.0.co;2
39. Ousehal L, Lazrak L. Change in nickel levels in the saliva of patients with fixed orthodontic appliances. *Int Orthod*. 2012;10(2):190-197. doi:10.1016/j.ortho.2012.03.003
40. Eliades T, Trapalis C, Eliades G, Katsavrias E. Salivary metal levels of orthodontic patients: A novel methodological and analytical approach. *Eur J Orthod*. 2003;25(1):103-106. doi:10.1093/ejo/25.1.103
41. Singh DP, Sehgal V, Pradhan KL, Chandna A, Gupta R. Estimation of nickel and chromium in saliva of patients with fixed orthodontic appliances. *World J Orthod*. 2008;9(3):196-202.
42. Yassaei S, Dadfarnia S, Ahadian H, Moradi F. Nickel and chromium levels in the saliva of patients with fixed orthodontic appliances. *Orthodontics (Chic)*. 2013;14(1):e76-81. doi:10.11607/ortho.810
43. Kocadereli L, Ataç A, Kale S, Özer D. Salivary Nickel and Chromium in Patients with Fixed Orthodontic Appliances. *Angle Orthod*. 2000;70(6):431-434. doi:10.1043/0003-3219(2000)070<0431:SNACIP>2.0.CO;2

44. Gjerdet NR, Erichsen ES, Remlo HE, Evjen G. Nickel and iron in saliva of patients with fixed orthodontic appliances. *Acta Odontol Scand.* 1991;49(2):73-78.
45. Leader W. Atomic Spectroscopy: A guide to selecting the appropriate technique and system. *PerkinElmer.* 2008:14.
http://www.perkinelmer.com/Content/Manuals/GDE_InorganicAnalysis.pdf.
46. Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M. *Handbook on the Toxicology of Metals: Fourth Edition.* Vol 1.; 2014. doi:10.1016/C2011-0-07884-5
47. Dean JR. *Practical Inductively Coupled Plasma Spectroscopy.*; 2005.
doi:10.1002/047009351X
48. Boss CB, Fredeen KJ. *Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry.* Vol 1542.; 2015.
49. Jarvis I, Jarvis KE. Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry in exploration geochemistry. *J Geochemical Explor.* 1992;44(1-3):139-200.
doi:10.1016/0375-6742(92)90050-I
50. Radboud University. <https://www.ru.nl/science/gi/facilities-activities/elemental-analysis/icp-oes/>.
51. Macfadden KO, Castleman AW, De Forest PR. *Forensic Analysis Weighing Bullet Lead Evidence.* The National Academy Press; 2004.
52. IteCons. <https://www.itecons.uc.pt/>.
53. Site IPN. <https://www.ipn.pt/laboratorio/LEDMAT/ensaio/15>.
54. Carter M, Shieh JC. *Guide to Research Techniques in Neuroscience.*; 2010.
doi:10.1016/C2009-0-01891-1
55. Zhou W, Wang ZL. *Scanning Microscopy for Nanotechnology: Techniques and Applications.*; 2007. doi:10.1007/978-0-387-39620-0

56. Barrett RD, Bishara SE, Quinn JK. Biodegradation of orthodontic appliances. Part I. Biodegradation of nickel and chromium in vitro. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 1993;103(1):8-14. doi:10.1016/0889-5406(93)70098-9
57. Xi T, Shahzad MB, Xu D, et al. Effect of copper addition on mechanical properties, corrosion resistance and antibacterial property of 316L stainless steel. *Mater Sci Eng C.* 2017;71:1079-1085. doi:10.1016/j.msec.2016.11.022
58. Azevedo B De, Mendes B, Alberto R, et al. Physical and chemical properties of orthodontic brackets after 12 and 24 months : in situ study. *J Appl Oral Sci.* 2014;22(3):194-203. doi:10.1590/1678-775720130528
59. WHO. Guidelines for drinking-water quality. *Guidel Drink Qual FOURTH Ed.* 2013;1. doi:10.1016/S1462-0758(00)00006-6
60. Kuhta M, Pavlin D, Slaj M, Varga S, Lapter-Varga M, Slaj M. Type of archwire and level of acidity: Effects on the release of metal ions from orthodontic appliances. *Angle Orthod.* 2009;79(1):102-110. doi:10.2319/083007-401.1
61. Gopokrishnan S, Melath A, Ajith V, Mathews NB. A Comparative Study of Bio Degradation of Various Orthodontic Arch Wires : An In Vitro Study. *J Int oral Heal.* 2015;7(August 2014):12-17.
62. Charles A, Gangurde P, Jacob S, Jatol-Tekade S, Senkutvan R, Vadgaonkar V. Evaluation of nickel ion release from various orthodontic arch wires: An in vitro study. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2014;4(1):12. doi:10.4103/2231-0762.130921
63. Karlina I, Amtha R, Roeslan BO, Zen Y. The Release of Total Metal Ion and Genotoxicity of Stainless Steel Brackets: Experimental Study Using Micronucleus Assay. *Indones Biomed J.* 2016;8(2):97-102. doi:10.18585/inabj.v8i2.193
64. Maia LHEG, Lopes Filho H, Ruellas AC de O, Araújo MT de S, Vaitsman DS. Corrosion behavior of self-ligating and conventional metal brackets. *Dental Press J Orthod.* 2014;19(2):108-114. doi:10.1590/2176-9451.19.2.108-114.oar

65. Liu JK, Liu IH, Liu C, et al. Effect of titanium nitride/titanium coatings on the stress corrosion of nickel-titanium orthodontic archwires in artificial saliva. *Appl Surf Sci.* 2014;317:974-981. doi:10.1016/j.apsusc.2014.08.132