



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

CAROLINA DA SILVA MACHADO MARTINELLI

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO
DE LIGAS DE Co-Cr-Mo**

2016

CAROLINA DA SILVA MACHADO MARTINELLI

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO
DE LIGAS DE Co-Cr-Mo**

Tese apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Especialidade em Prótese Dentária.

Orientador: Prof. Tit. Estevão Tomomitsu Kimpara
Coorientadora: Prof^a. Adj. Ana Paula Rosifini Alves Claro

São José dos Campos

2016

Apresentação gráfica e normatização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos
Campos: ICT/UNESP; 2016.

Martinelli, Carolina da Silva Machado
Desenvolvimento e caracterização de ligas de Co-Cr-Mo / Carolina
da Silva Machado Martinelli. - São José dos Campos : [s.n.], 2016.
89 f. : il.

Tese (Doutorado em Odontologia Restauradora) - - Instituto de
Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual
Paulista, 2016.

Orientador: Estevão Tomomitsu Kimpara

Coorientadora: Ana Paula Rosifini Alves Claro.

1. Materiais biomédicos e odontológicos. 2. Ligas dentárias. 3.
Ligas de cobalto-cromo. I. Kimpara, Estevão Tomomitsu, orient. II.
Claro, Ana Paula Rosifini Alves, coorient. III. Instituto de
Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual
Paulista. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita
Filho'. V. UNESP - Univ Estadual Paulista. VI. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática,
ICMC/USP com adaptações - STATi e STI do ICT/UNESP. Dados fornecidos pelo autor.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer
meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 05/02/2016

E-mail: csmmartinelli@gmail.com

Assinatura: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Tit. Estevão Tomomitsu Kimpara (Orientador)

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus São José dos Campos

Prof. Adj. Rubens Nisie Tango

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Profa. Ass. Marina Amaral

Programa de Pós Graduação em Odontologia
Universidade de Taubaté
Campus de Taubaté

Prof. Adj. Luís Augusto Sousa Marque da Rocha

Faculdade de Ciências
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de Bauru

Prof. Dr. André da Silva Antunes

Divisão de Engenharia Mecânica
ITA – Instituto Tecnológico de Aeronáutica
Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 05 de fevereiro de 2016.

Dedicatória

Dedico este trabalho à Flávia Junqueira de Castro, irmã de vida, amiga querida e minha primeira aluna. Nossos sonhos nos afastaram geograficamente, nos guiaram por caminhos muito parecidos, mas nossos corações sempre nos mantiveram unidas! Que o tempo nos ajude a transformar a tristeza em saudade! Todo meu carinho♥.

Agradecimentos

A Deus.

A minha mãe, meu pai (*in memoriam*) e minha irmã por todo carinho, cumplicidade, generosidade e doação incondicional. Vocês são meu exemplo e minha inspiração! Que todos os sonhos que dividimos sejam alcançados! Vocês são tudo pra mim! Amo vocês.

Ao meu noivo Leonardo Cesar Lobo, por todo seu amor, atenção e apoio. Sou muito feliz por ter encontrado você para dividirmos as nossas vidas e construirmos juntos nosso futuro. Amo muito você.

Ao meu tio Walter, pai substituto, tarefa que desempenha com tanto carinho! Te admiro muito e desejo que o mundo retribua todo carinho que você dedica a ele.

À minha família que o nosso carinho sempre nos mantenha unidos e dividindo os bons e não tão bons momentos. Que todos sejam sempre muito felizes e realizados.

À minha família da vida, Tia Roseli, Tio Luís, Fernanda, Flávia e Gabriel, que mesmo longe são tão presentes. Que Deus nos dê força e nos ajude a superar este momento. Amo muito vocês!

À família do Leonardo, que eu escolhi pra ser minha também, obrigada por todo apoio e principalmente por todo carinho. Vocês são muito importante na minha vida, amo vocês!

Aos meus amigos queridos Roberta, Natália, Gláucia, Nídia, Jéssica, Fernanda, Isadora, Rafael, Bruna, Erica, Fernando, Fernanda, Marcos e Aline que tanto torcem por mim e me apoiando e fazendo os meus dias mais divertidos e intensos.

Aos meus amigos e futuros padrinhos Francine e Guilherme por serem tão presentes na minha e na vida do Leonardo. Obrigada por emprestarem suas famílias para gente de vez em quando!

Às minhas queridas roomates fizeram da minha estadia mais agradável Tess, Marissa e Paige.

À Michelle por ser tão boa amiga por ter feito minha estadia muito mais divertida e bem mais norte-americana!

Aos amigos que a pós graduação trouxeram para minha vida Alecsandro, Aline, Aline Barcelos, Amanda, Ana Carolina, Ana Flávia, Anderson, Anelyse, Anna Karina, Ariane, Caroline, Elen, Elizeu, Fernanda Campos, Fernanda,

Gabriela, Graziela, Humberto, João, Julia, Julio, Ligia, Lilian, Marina, Mayra, Natália, Patrícia, Pedro, Regina, Rodrigo, Rodrigo Prado, Ronaldo, Sabrina, Sâmia, Sarina, Tábata, Vanessa, Viviane, pela nossa agradável convivência, por nossa troca de experiências. Agradeço pela convivência diária, pela disponibilidade em ajudar sempre que precisei, pelos momentos de trabalho e de lazer.

Às queridas amigas de pós graduação: Anna Karina, Carolina Bacci, Fernanda Campos, Julia, Lilian, Marina, Mayra, Natália, Sâmia, Sarina, Tabata e Vanessa que me acompanharam tão de perto nesta caminhada, que sempre torceram por mim e me apoiaram tenho certeza que nossa amizade ultrapassa os limites da ciência.

À Nathália Candela, aula de iniciação e amiga querida por nossa convivência tão agradável nesses 5 anos, pela ajuda na execução deste e de outros trabalhos e por todos os conselhos.

Aos colegas Leonardo Custódeo, Reginaldo e Adelman pela ajuda neste trabalho, pela convivência agradável e por toda amizade.

Aos colegas do Laboratório de Materiais – FEG, da Divisão de Engenharia Mecânica – ITA e do laboratório de Engenharia Tecidual – CSU: Reginaldo, André, Adelman, João, Celso, Patrícia, Marisa, Maurício, Ana Lucia, Victoria, Rachael, Paige e Ilya, agradeço pela convivência agradável, por todo auxílio em muitas das etapas de trabalho que eu desconhecia e pelas discussões científicas tão produtivas.

Agradecimentos Especiais

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, no nome do reitor Prof. Titular Julio Cezar Durigan.

Ao Programa de Pós Graduação em Odontologia Restauradora, coordenado pelo Prof. Adj. Alexandre Luiz de Souto Borges, estendo meus agradecimentos aos professores do programa de pós graduação que sempre me estimularam e me incentivaram a buscar o conhecimento, e que tantas oportunidades me proporcionaram contribuindo para o meu crescimento profissional e acadêmico. Principalmente aos professores Estevão Tomomitsu Kimpara, Rubens Nisie Tango, Paula Carolina Komori de Carvalho, Alexandre Luiz de Souto Borges, Tarcísio Arruda Paes Junior, Márcia Carneiro Valera Garakis, Carlos Rocha Torres e Renata Marques de Melo Marinho. Estendo ainda meus agradecimentos aos funcionários da seção de pós graduação Rosemary, Erena, Bruno, Ivan e Sandra por todo auxílio e atenção prestada.

Aos meus orientadores Prof. Titular Estevão Tomomitsu Kimpara e Prof. Adj. Ana Paula Rosifini Alves Claro por terem confiado o desafio deste trabalho a mim e por terem acreditado na minha capacidade para executá-lo.

Ao Prof. Carlos de Moura Neto (*in memoriam*), por ter participado ativamente da elaboração deste trabalho. Só tenho a agradecer a maneira gentil e atenciosa que sempre se disponibilizou a me atender e me ajudar com minhas dúvidas. Sou muito grata por nosso convívio e por todo o conhecimento transmitido em metalurgia.

À Universidade do Estado do Colorado (Colorado State University – CSU), EUA, na pessoa do Prof. Dr. Ketul C. Popat e de toda sua equipe de trabalho, por terem me recebido no Laboratório do Departamento de Engenharia Biomédica da Universidade do Estado do Colorado, CSU, EUA, para execução de parte deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro concedido nas modalidades bolsa de doutorado e bolsa pelo programa de doutorado sanduíche no exterior (Processo: 99999.004105/2014-01).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo – FAPESP, pelo apoio financeiro concedido por meio de bolsa de doutorado (processo: 2013/12437-4).

Aos professores do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, na pessoa do chefe de departamento Prof. Adj. Rubens Nisie Tango, estendo meus agradecimentos aos professores das disciplinas de Materiais Dentários e Prótese Total por todo conhecimento transmitido, por toda disponibilidade e auxílio para execução deste trabalho e pela convivência extremamente agradável.

Aos funcionários do ICT-UNESP Juliana, Marcos Vestalli (*in memoriam*), Fernando, Marcos, Lilian, Eliane, Reginaldo, Márcio, Thais, Gilson, Renato, Edson, Carlos Guedes, Silvana e Renata sem os quais seria impossível desempenhar qualquer trabalho.

Aos laboratórios parceiros: Laboratório de Materiais do Departamento de Engenharia de Materiais, FEG, Unesp, na pessoa da Profª Adj. Ana Paula Rosifini Alves Claro; ao Laboratório do Departamento de Materiais, EEL, USP, na pessoa da Prof. Adj. Paulo Atsushi Suzuki; ao Laboratório Associado de Sensores e Materiais, LAS, INPE, na pessoa do Dr. João Paulo Barros Machado; ao laboratório de Materiais e Processo de Fabricação, EAM-M, ITA.

*Quanta mais aumenta nossa conhecimento, mais
evidente fica nossa ignorância.*

John F. Kennedy

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Ligas Metálicas em Odontologia.....	16
2.2 Características Mecânicas e Estruturais	17
2.3 Citotoxicidade em Ligas Odontológicas.....	20
3 PROPOSIÇÃO.....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Processamento das Ligas Metálicas	26
4.1.1 L1 - Liga Comercial.....	28
4.1.2 L2 - Ligas Comercial Acrescida de Porcentagens de Mo.....	28
4.2 Caracterização Microestrutural.....	31
4.2.1 Preparação Metalográfica.....	31
4.2.2 Ataque químico para evidênciação de grãos	31
4.2.3 Difração de Raio X.....	32
4.2.4 Fluorescência de Raios X (XDR)	33
4.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva (MEV/EDS).....	33
4.3 Características Físicas	34
4.3.1 Ensaio de Microindentação Vickers.....	34
4.3.2 Ensaio de Corrosão	35
4.4 Citotoxicidade in vitro	37
4.4.1 Cultura Celular	37
4.4.2 Adesão e Proliferação Celular	38
4.4.3 Viabilidade Celular.....	39
4.4.4 Organização Citoesquelética.....	40
4.4.5 Morfologia Celular	40
5 RESULTADOS	43
5.1 Características Microestruturais.....	43
5.1.1 Difração de Raios X (DRX).....	43

5.1.2 Fluorescência de Raios X (XDR)	48
5.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva (MEV/EDS).....	49
5.2 Características Físicas	54
5.2.1 Dureza Vickers	54
5.2.2 Corrosão	55
5.3 Citotoxicidade <i>in vitro</i>	56
5.3.1 Adesão e Proliferação Celular	56
5.3.2 Viabilidade Celular	59
5.3.3 Organização Citoesquelética.....	68
5.3.4 Morfologia Celular	71
6. DISCUSSÃO	75
6.1 Caracterização Microestrutural.....	75
6.2 Caracterização Física	77
6.3 Citotoxicidade Celular.....	79
7 CONCLUSÃO	82
8 REFERÊNCIAS.....	83

Martinelli CSM. Desenvolvimento e caracterização de ligas de Co-Cr-Mo [tese]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2016.

RESUMO

As ligas de Co-Cr têm o uso consagrado para reabilitação oral com próteses dentárias. Os procedimentos reabilitadores orais por implantes osseointegrados destacaram novas necessidades biomecânicas e estruturais das ligas metálicas. O objetivo deste estudo foi desenvolver e caracterizar três ligas metálicas de Co-Cr-Mo experimentais, para aplicação odontológica. Foram confeccionadas ligas de Co-Cr-Mo, com percentuais crescentes de Mo (6, 7 e 8% - A, B e C, respectivamente), por duas técnicas de processamento: L2, fusão para acréscimo de Mo a uma liga comercial certificada (American Society for Testing and Materials, 1996) (L1); e L3, fusão dos metais Co, Cr e Mo, comercialmente puros. As ligas em estudo foram caracterizadas microestruturalmente por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva (EDS), difração de raios X (DRX), fluorescência de raios X (XDR); fisicamente por microdureza, resistência à corrosão. Fibroblastos dérmicos humanos foram utilizados para avaliar a citotoxicidade das ligas experimentais após 1, 4 e 7 dias de cultura celular. Organização citoesquelética, adesão, viabilidade, morfologia e diferenciação celular foram avaliados por microscopia de fluorescência, análise bioquímica e MEV. Os resultados obtidos permitiram concluir que as ligas experimentais (L2A, L2B, L2C, L3A, L3B e L3C) apresentaram desempenho microestrutural, mecânico e citotóxico superior à L1, sendo indicada para utilização biomédica e odontológica.

Palavras-chave: Materiais biomédicos e odontológicos. Ligas dentárias. Ligas de cobalto-cromo.

Martinelli CSM. Development and characterization of Co-Cr-Mo alloy [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2016.

ABSTRACT

In Dentistry, the Co-Cr alloys are general used for oral rehabilitation by dental prosthesis. The oral rehabilitation procedures by osseointegrated implants point out to new metal alloys' biomechanical and structural necessities. The aim of this study was develop and characterize three experimental Co-Cr-Mo alloys, for dental application. Three alloys will be made out with different Mo's percentages by two processing techniques: L2, casting by addition of Mo to a certified commercial Co-Cr alloy (American Society for Testing and Materials, 1996) (L1); and L3, casting of purified commercial metals (Co, Cr, Mo). The experimental alloys were characterized by microstructure by digital optical microscopy, scanning electron microscopy, energy dispersive X-ray spectrometry, X-ray diffraction and X-ray fluorescence; and mechanically by microhardness and corrosion resistance. Human dermal fibroblasts were used to evaluate the biocompatibility of experimental Co-Cr alloys after 1, 4 and 7 days of culture. Cellular adhesion, proliferation, viability, cytoskeletal organization and morphology were investigated using fluorescence microscope, biochemical assay and SEM. Based on data was possible to concluded that experimental alloys (L2A, L2B, L2C, L3A, L3B e L3C) shown higher performance for microstructure, mechanical and cytotoxic as L1 and they are recommend to biomedical and dentistry applications.

Keywords: Biomedical and dental daterials. Dental alloys. Cobalto-chromium alloys.

1 INTRODUÇÃO

Para a reabilitação oral em odontologia são utilizados, basicamente, quatro tipos de materiais restauradores: metais, cerâmicas, resinas acrílicas e resinas compostas (Anusavice, 2005). O desafio atual é propor um material que apresente resistência adequada, estética favorável resultando em um excelente prognóstico clínico.

Atualmente, para reabilitação oral das regiões de pré-molares e molares, áreas que apresentam maior esforço mastigatório (400 a 890 N) (Anusavice, 2005), os melhores prognósticos clínicos são obtidos quando são utilizadas infraestrutura metálica ou cerâmicas de alta resistência, em geral, recobertos por material estético.

Devido à deficiência estética das ligas metálicas alguns profissionais e pacientes subestimam sua utilização acreditando em sua total substituição por sistemas totalmente cerâmicos. No entanto, vários procedimentos odontológicos ainda contraindicam a substituição das ligas metálicas por cerâmicas, uma vez que, as ligas metálicas apresentam propriedades mecânicas, relacionadas à resistência, mais adequadas do que as cerâmicas de alta resistência (Matkovic et al., 2004).

As ligas metálicas são utilizadas para reabilitações orais: em próteses parciais removíveis (PPR), para a confecção de infraestrutura dos aparelhos protéticos; em prótese parcial fixa (PPF), para confecção de retentores intrarradiculares, munhão (*coppings*), infraestrutura de próteses unitárias ou múltiplas, sistemas de encaixe (*attachment*) e próteses unitárias metálicas; em implantes, para confecção dos implantes, cicatrizadores, parafusos trespassantes, pilares protéticos, parafusos protéticos, barras metálicas para união dos implantes, entre outros.

Com o sucesso e popularização das reabilitações por implantes as ligas metálicas passaram a ser utilizadas em novos modelamentos nos quais a biomecânica é antagônica à biomecânica habitual, uma vez que, a biomecânica habitual são observadas micromovimentações no interior do alvéolo. Tanto em implantes unitários quanto em implantes múltiplos as próteses são implantossuportadas, redefinindo a assimilação e transmissão de forças.

Em pacientes parcialmente dentados reabilitados por PPR ou PPF as forças mastigatórias são dissipadas por meio dos dentes e/ou fibromucosa para o osso adjacente. Quando sob compressão ou tensão os dentes apresentam micromovimentação no interior do alvéolo e a fibromucosa apresenta microdeformação de acordo com a sua resiliência (Kliemann, Oliveira, 1999). Em implantes as forças mastigatórias são transmitidas por um sistema rígido diretamente ao osso suporte. Este novo cenário suscita novas dúvidas e algumas dificuldades clínicas a serem superadas para que a longevidade do tratamento clínico seja aumentada.

Desta forma foi realizada uma busca na base de dados PubMed®, para nortear este projeto. Primeiramente foi realizada uma busca utilizando a expressão “*development alloy metal*” (Quadro 1), a maior parte dos artigos avaliou adesão bacteriana, toxicidade celular, propriedades mecânicas e microestruturais em ligas para implantes, os materiais desenvolvidos tinham finalidade biomédica e odontológica.

Ao selecionarmos o descritor “*alloy metal*” foram relacionados 10543 artigos a partir de 2005. Ao adicionarmos o descritor “*dentistry*” ao descritor anterior foram relacionados 3443 artigos, no período de 2005 a 2015. Os últimos cinco anos estão descritos no quadro 1. Os estudos verificaram adesão a cimentos resinosos, o efeito da corrosão, propriedades mecânicas, métodos de envelhecimento, correlação entre infraestruturas cerâmicas e infraestruturas metálicas, modificações na superfície metálica, entre outros. Foram avaliadas

diversas ligas, sendo que a grande maioria tinha como elemento principal de liga o titânio (Ti).

Quadro 1 – Relação dos artigos publicados entre 2011- 2015, base de dados Pubmed

<i>Development metal alloy</i>		<i>Metal alloy + Dentistry</i>	
Ano	Artigos Publicados	Ano	Artigos Publicados
2011	130	2011	446
2012	142	2012	451
2013	155	2013	401
2014	122	2014	233
2015	34	2015	21

Nenhum dos artigos citados anteriormente abordou o desenvolvimento e aplicação de uma liga para utilização em reabilitações orais protéticas. Desta forma, as ligas desenvolvidas não tiveram como objetivo as propriedades mecânicas do material quando em função mastigatória, sua união a material de revestimento e/ou a interface implante/coróa, sendo evidente a necessidade de mais estudos para o desenvolvimento de uma liga metálica com a finalidade protética que preencha os requisitos necessários para reabilitação oral por próteses implantossuportadas.

As ligas ternárias propostas neste estudo foram apresentaram o Cobalto (Co) como elemento principal de liga por suas propriedades mecânicas como módulo elástico, resistência e dureza (Callister-Jr, 2002). Cromo foi utilizado como segundo elemento da liga por sua resistência ao manchamento e a corrosão (Anusavice, 2005). Foi acrescentado maior porcentagem em peso de molibdênio às ligas experimentais por reduzir o coeficiente de expansão térmica (Sakaguchi, Powers, 2012) e por aumentar a resistência à corrosão (Lee, 1985), além de aumentar a dureza, a resistência mecânica e a resistência à abrasão (Paffenbarger, Caul, Dickson, 1943).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Para facilitar a leitura esta seção foi subdividida em: ligas metálicas em odontologia; características mecânicas e estruturais; citotoxicidade em ligas odontológicas.

2.1 Ligas Metálicas em Odontologia

O primeiro relato da utilização das ligas metálicas em odontologia data de 1907, por Targget, para a confecção de restaurações *inlay* pelo método da cera perdida. A técnica obteve tanto sucesso que passou a ser empregada para a confecção de próteses *inlay*, *onlay*, PPF unitárias e múltiplas, e infraestrutura para PPR. No mesmo ano Elwood Haynes patenteou a liga Stellite, composta por cobalto (Co) e cromo (Cr), mais tarde os elementos tungstênio (W) e molibdênio (Mo) foram incorporados à liga a fim de aumentar a resistência à abrasão e dureza (Roach, 2007).

Na década de 30 foram introduzidas as ligas de metais básicos sendo popularizadas as ligas de Ni-Cr e Co-Cr em substituição as ligas áuricas. O primeiro implante com crescimento ósseo de que se tem referência foi realizado por Strock em 1939, com uma liga de Co-Cr-Mo (Roach, 2007). Em 1950 estimava-se que nos Estados Unidos da América a confecção de PPR em Co-Cr fosse cinco vezes maior que sua confecção em ouro (Lane, 1949, citado por Roach, 2007 (Roach, 2007)).

Em 1970, devido ao alto custo dos metais nobres, a utilização das ligas básicas foi estimulada e extrapolada para confecção de outros tipos de restaurações além das PPR (Roach, 2007).

Na década de 80 alguns estudos (Evans, Thomas, 1986; Rae, 1981) apontavam a toxicidade celular de ligas básicas (Ni-Cr, Co-Cr e Ni-Cr-Be), no entanto, estes estudos foram conduzidos utilizando pó dos metais puros em diferentes granulações. Mesmo com poucas explicações sobre a ação e os efeitos destes metais muito deles foram contra indicados para utilização em odontologia e em implantes ortopédicos.

Ao final da década de 90, alguns estudos conduzidos (Messer et al., 1999; Messer, Lucas, 2000) permitiam compreender o efeito de íons metálicos na fisiologia celular. Desta forma, a utilização de Mo como elemento de liga continuou a ser indicada, uma vez que, as células expostas ao material apresentavam-se metabolicamente ativas (Messer et al., 1999).

No estudo de Messer e Lucas (2000) em uma das ligas em estudo foi detectada a porcentagem em peso de 8,4% de Mo, os autores afirmaram que o alto conteúdo de Cr e Mo aumentou a resistência à corrosão e diminuiu a liberação de íons, comprovando os achados de estudos anteriores (Johansson et al., 1989).

2.2 Características Mecânicas e Estruturais

As vantagens das ligas de metais básicos em relação as ligas altamente nobres e nobres são: menor densidade, menor módulo de elasticidade, menor custo operacional, além de possuírem características comuns a outras ligas como biocompatibilidade aos tecidos orais e fusibilidade, e quando associadas a outros elementos possuem alta resistência ao desgaste e à corrosão (Anusavice, 2005; Roach, 2007).

Atualmente as ligas de Co-Cr para reabilitações protéticas são regulamentadas por normas como a *American Society for Testing and Materials*,

1996. Esta norma regulamenta a utilização de ligas de Co-Cr para utilização em turbinas a gás, implantes ortopédicos e implantes odontológicos. O principal elemento de liga é o Co que deve ser utilizado para balanceamento da liga, o Cr deve se utilizado em porcentagens que variam entre 27 e 30 wt%, o Mo deve variar entre 5 e 7 wt%.

As ligas comercialmente disponíveis para confecção de próteses para reabilitação odontológica sobre implantes ou não, seguem a ISO 6871-1:1994, que foi revisada e substituída pela ISO 22674:2006. Estas normas estabelecem que a composição química deva ser da seguinte forma: o Co como componente principal, Cr não menos que 25 wt%, Mo não deve ser inferior a 4 wt% e que somados Co, níquel (Ni) e Cr não devem ser inferior a 85 wt%. No entanto grande parte das ligas apresentam o teor de Mo próximo a 5 wt%. As ligas de Co-Cr-Mo são preferíveis por sua alta resistência a tração, 960 MPa; alta susceptibilidade ao polimento; alta resistência ao desgaste; alta resistência à corrosão e alta dureza Rockwell, 34 HRC (American Society for Testing and Materials ,1996).

No entanto as ligas regulamentadas pela American Society for Testing and Materials (1996) podem apresentar um fenômeno descrito a mais de 15 anos, a segregação elementar superficial (Mostardi et al., 2010). Processo em que micropartículas de diferentes íons metálicos se desprendem da superfície metálica (Kovacik et al., 2008) apresentando diferentes efeitos citotóxicos na viabilidade celular (Mostardi et al., 2002). Os processos que podem ser responsáveis por este fenômeno são ciclagem térmica, abrasão mecânica ou deformação e exposição química (Mostardi et al., 2010).

A fim de avaliar o efeito da segregação elementar superficial a tribocorrosão tem sido amplamente estudada em ligas odontológicas (Faria et al., 2011; Galo et al., 2012; Souza et al., 2012; Vieira et al., 2012) por abranger múltiplos processos que podem resultar na segregação elementar superficial. O

processo tribocorrosivo consiste na degradação resultante da ação combinada de desgaste mecânico (a partir do contato entre dois corpos) e químico ou eletroquímico. Combinados, os desgastes, agem de maneira complexa acelerando o processo corrosivo (Galo et al., 2012). A saliva presente no meio bucal comporta-se como agente eletroquímico do sistema, caracterizando um sistema de tribocorrosivo.

Em odontologia as ligas de Co-Cr, em geral são obtidas pelo processo de fundição dos metais puros, que pode resultar em propriedades mecânicas inferiores às obtidas por outros métodos de processamento do material (Al Jabbari et al., 2014).

A fragilidade do material é decorrente dos defeitos de solidificação observados em sua estrutura como porosidade, falta de homogeneidade química, grãos grandes e microestrutura com precipitados na zona interdendrítica (Callister-Jr, 2002). Juntos estes defeitos podem alterar a dureza, ductilidade e resistência à fratura do material (Giacchi et al., 2011).

A fim reduzir a presença de defeitos e consequentemente melhorar as propriedades mecânicas do material é realizado o tratamento térmico posterior à fundição, que resulta em uma estrutura mais homogênea (Montero-Ocampo, 1999).

À temperatura ambiente, o Co puro pode ser caracterizado por uma estrutura hexagonal compacta - *hexagonal close-packed* (hcp), a 400 °C esta estrutura sofre uma transformação alotrópica tornando-se uma estrutura cúbica de face centrada (fcc). A adição de outros elementos como Cr, tungstênio (W) aumentam esta transformação a 400 °C (Callister-Jr, 2002; Opris et al., 2007).

Muitos estudos têm demonstrado que substratos repletos por estrutura hcp em ambos os componentes deslizantes exibem menor resistência comparado à estrutura fcc (Balagna et al., 2012). Fatores como quantidade, homogeneidade de distribuição de carbonetos e a presença de hcp na estrutura cristalina podem

influenciar a resistência ao desgaste de uma liga de Co-Cr-Mo (Julian, Munoz, 2011).

No entanto, para Varano et al. (2006), ligas que possuem alto conteúdo de estrutura fcc, estabilizadas pelo conteúdo de carbono, apresentam menor ou nenhuma transformação martensítica resultando em menor desgaste, uma vez que, a estrutura cristalina hcp é mais frágil e prejudica à resistência da liga.

No estudo de Giacchi et al. (2011), os autores se propuseram a obter maiores informações microestruturais sobre três diferentes ligas de Co-Cr-Mo, detectando diferentes fases e morfologias presentes. Foi avaliada também a possibilidade de transformação de fase durante a solidificação e resfriamento em ambiente industrial. Os autores concluíram que os defeitos microestruturais como trincas, poros e segregações, bem como, presença de grãos de tamanho grande resultaram em fracas condições microestruturais. Embora estas condições tenham sido superadas, deve-se considerar que em ambiente industrial o controle não é tão rigoroso quanto em um laboratório de pesquisa.

No estudo de Balagna et al. (2012), foi realizada caracterização de uma liga de Co-Cr-Mo após tratamento térmico para aumentar a resistência ao desgaste. Os autores concluíram que o tratamento térmico alterou a microestrutura, induzindo a formação da fase hexagonal de Co, reduzindo a presença de fase cúbica. No entanto esta transformação não alterou o comportamento das propriedades triboquímicas da liga, mas alterou a resistência e a ductilidade da liga.

2.3 Citotoxicidade em Ligas Odontológicas

Para Niinomi et al. (2012), as ligas metálicas dentárias serão futuramente revistas quanto suas utilização e formulação. Em seu estudo os autores ressaltam

a necessidade da eliminação de vários dos elementos metálicos componentes das ligas devido a suas implicações sistêmicas. Segundo os autores, as ligas de Co-Cr são frequentemente utilizadas para aplicações biomédicas, principalmente por serem livres de níquel (Ni).

A principal desvantagem sistêmica da utilização de ligas de Ni é a possível indução à reação de hipersensibilidade que é uma das mais comuns no mundo moderno, sua prevalência está em constante crescimento em muitos países representando um dos maiores problemas de saúde pública (Darlenski et al., 2012).

Mesmo havendo uma indicação mundial para substituição das ligas de Ni devido ao potencial de indução a reação de hipersensibilidade, no Brasil as ligas que contêm Ni ainda são muito utilizadas em odontologia.

A utilização de elementos como alumínio (Al) e vanádio (V) é bastante criticada. Embora seja comprovado que o Al não é a causa para a doença de Alzheimer, apesar de sua comprovada ação neurotóxica (Boyce et al., 1992), pacientes com predisposição genética à doença são sensibilizados por este metal. O V, no entanto, apresenta alto potencial citotóxico (Domingo, 2002) podendo causar necrose celular, debris citoplasmáticos e núcleo picnótico ao contato com o metal (Rae, 1981).

Estes elementos podem ser substituídos por outros metais como tântalo (Ta) e nióbio (Nb). Os autores ressaltam que ligas com outros biomateriais são interessantes do ponto de vista biomédico por não apresentarem ação citotóxica, no entanto, estes biomateriais ainda são pouquíssimo utilizados.

Neste aspecto, as ligas de Co-Cr são indicadas por apresentarem alta resistência à corrosão (Wylie et al., 2007) e baixa formação de debris (Patel et al., 2010). O que pode ser resultante da camada espontaneamente formada na superfície da liga quando em contato com o ar (Callister-Jr, 2002; Lucchetti et

al., 2015; Matkovic et al., 2004; Qiu et al., 2011), tornando-se quimicamente inerte. Este fenômeno é denominado camada passivadora.

Desta forma, poucas reações de hipersensibilidade de ligas de Co-Cr são relatadas na literatura, sendo mais raras que as ligas contendo Ni. Song et al. (2011), relataram um caso de reação de hipersensibilidade em um paciente de 58 anos, chinês. O paciente apresentou a reação após um ano da instalação de uma coroa metálica fundida. A reação foi comprovada pelo teste de *Patch*. O paciente apresentava rubor, pústulas, vesículas, eritema escamoso na planta dos pés e nas mãos. Para os autores o Co é largamente utilizado em restaurações protéticas e não apresenta alto potencial alérgico, e tal reação não havia sido anteriormente relatada, no entanto é importante que no caso de um paciente apresentar este tipo de reação o diagnóstico seja preciso, mas a reação de hipersensibilidade não é o suficiente para contraindicar a utilização de ligas de Co-Cr.

Sugere-se que as reações de hipersensibilidade às ligas de Co-Cr possam ser resultantes da liberação de íons em ambiente bucal (Lucchetti et al., 2015). Como esta liberação é baixa o relato de reações de hipersensibilidade ao cromo também é baixo na população mundial, sendo da ordem de 3% para população feminina e 10% para a masculina, já as reações de hipersensibilidade em mucosa oral são incomuns e há pouco relato de caso clínico.

Assim para este estudo é proposto o desenvolvimento de uma liga metálica experimental com alto conteúdo de Mo para utilização odontológica.

3 PROPOSIÇÃO

Caracterizar mecânica, estrutural e citotoxicamente três ligas de Co-Cr-Mo experimentais, com adição de Mo.

Hipótese em estudo:

H₁: A microestrutura das ligas experimentais (L2 e L3) será diferentes de liga comercialmente certificadas (L1);

H₂: A dureza Vickers de L2 (bruta de fusão) será menor que L1;

H₃: A dureza Vickers de L2 e L3 (forjadas) será maior que L1;

H₄: A resistência à corrosão será maior quanto maior for a adição de Mo;

H₅: A adição de Mo não reduzirá a adesão, proliferação e viabilidade celular;

H₆: A adição de Mo não modificará a organização citoesquelética e a morfologia celular.

4 MATERIAL E MÉTODOS

As ligas metálicas foram confeccionadas utilizando duas técnicas de fabricação, fundição e forjamento. Os materiais utilizados para confecção das ligas L2 e L3 estão descritos no quadro 2.

Para facilitar a leitura esta seção foi subdividida de acordo com as fases de execução e caracterização. Fase 1 – Processamento das ligas metálicas; Fase 2 – Caracterização microestrutural; Fase 3 – Caracterização mecânica. A rota de processamento dos materiais experimentais está descrita na figura 1.

Quadro 2 – Lista de materiais

Material	Fabricante	Caracterização	Lote
Cobalto	Sigma – Aldrich Co. LLC, MO, EUA	99,9 de pureza	#MKBV5809V
Cromo	Sigma – Aldrich Co. LLC, MO, EUA	99,9 de pureza	#MKBS3538V
Liga de Co-Cr	DeguDent Ind. E Com. Ltda. – SP, Brasil	64,8 Co, 28,5 Cr; 5,3 Mo; 0,5 Si; 0,5 Mn; 0,4 C.	#MKBS3538V
Molibdênio	Sigma – Aldrich Co. LLC, MO, EUA	99,9 de pureza	#MKBT7262V

*valores em porcentagem.

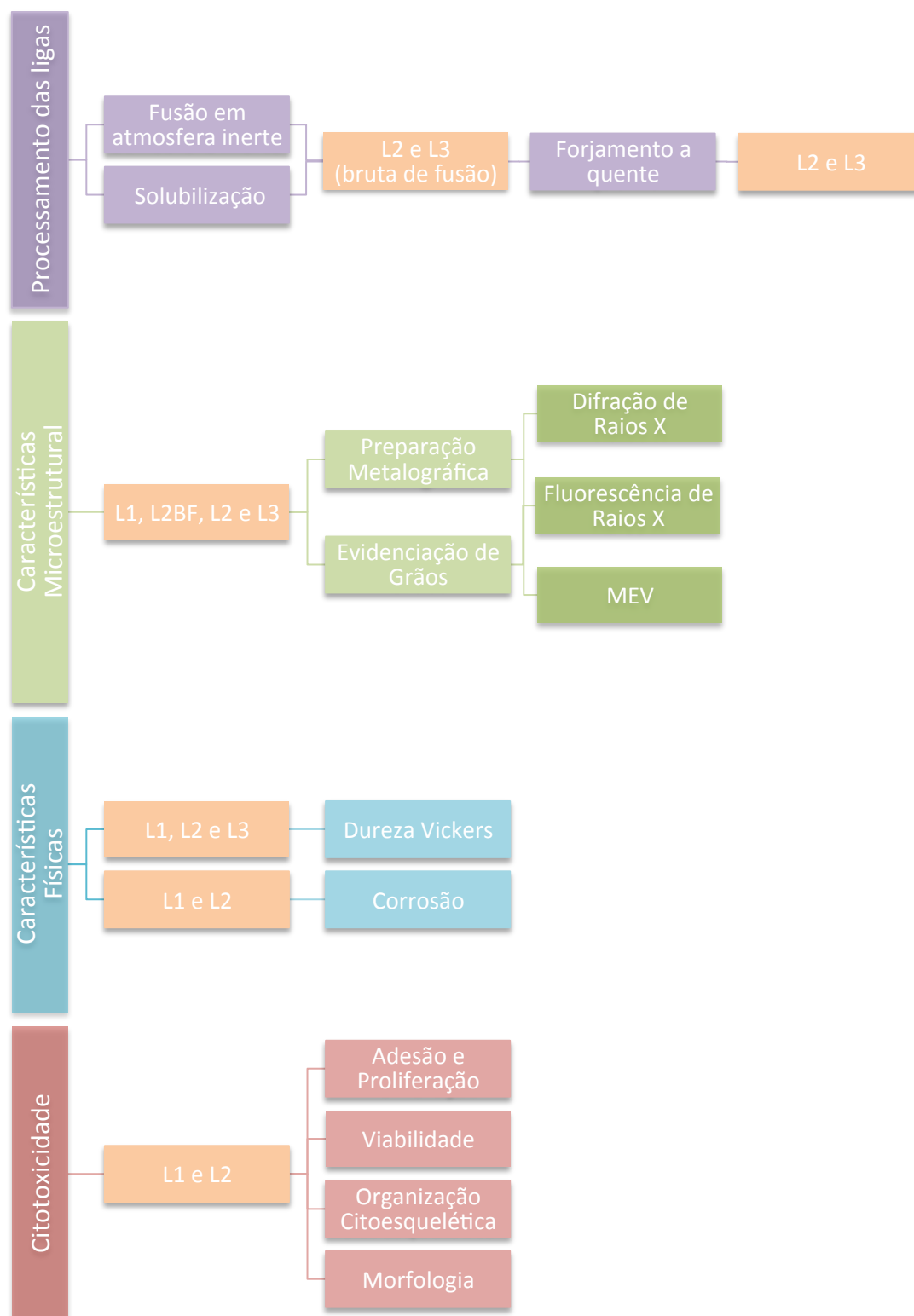


Figura 1 – Rota de processamento dos materiais em estudo.

4.1 Processamento das Ligas Metálicas

Foram confeccionadas três ligas de Co-Cr-Mo, com diferentes percentuais, em peso atômico, de Mo e/ou por diferentes técnicas de processamento. Para o grupo L1 foi utilizada uma liga comercial certificada – American Society for Testing and Materials ,1996 – (Degudent-Dentsply); as ligas L2A, L2B e L2C foram obtidas a partir de L1 acrescentando diferentes percentuais de Mo comercialmente puro (Giacchi et al., 2011).

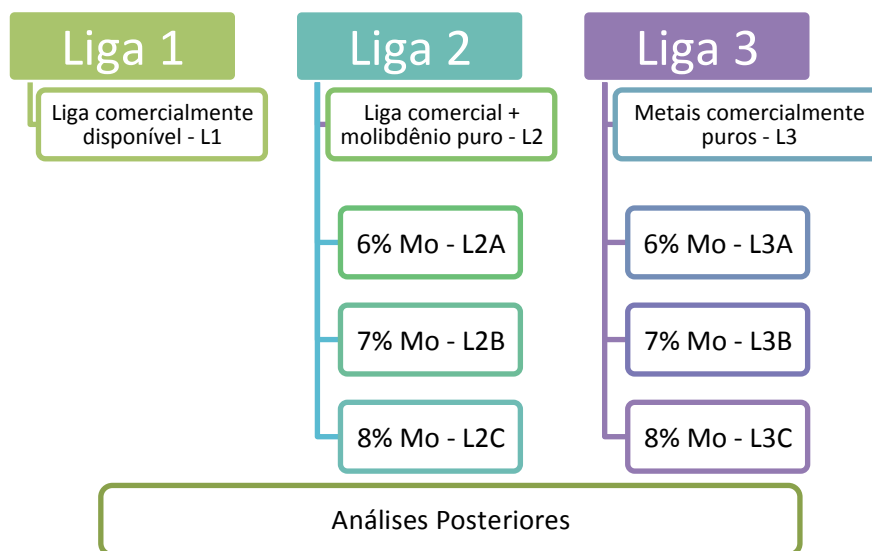


Figura 2 – Delineamento do Estudo.

Para confecção dos espécimes, inicialmente, foram analisadas as propriedades físicas e químicas (Tabelas 1 e 2; Figura 3) dos metais que compõem as ligas experimentais, para posteriormente submeter os espécimes à fundição em atmosfera inerte.

Tabela 1 – Propriedades físicas e químicas dos materiais em estudo

Grandeza	Cobalto	Cromo	Molibdênio
Densidade (kg/m^3)	8900	7140	10280
Ponto de fusão ($^{\circ}\text{C}$)	1495	1907	2623
Módulo de elasticidade (GPa)	209	279	329
Coeficiente de Poisson	0,31 ^a	0,21 ^a	0,31 ^a
Estrutura cristalina	Hexagonal ^a	CCC ^a	CCC ^a

CCC: cúbica de corpo centrado. / ^a Callister-Jr (2002).

Tabela 2 - Propriedades física e químicas de L1 e Mo

Grandeza	L1 (63Co-28Cr-5Mo)	Mo
Densidade (GPa)	0,84	1,01
Intervalo de fusão ($^{\circ}\text{C}$)	1320-1380	2622,8
Dureza Vickers	400	5,5
Módulo de elasticidade (GPa)	220	329

Informações fornecidas pelos fabricantes.

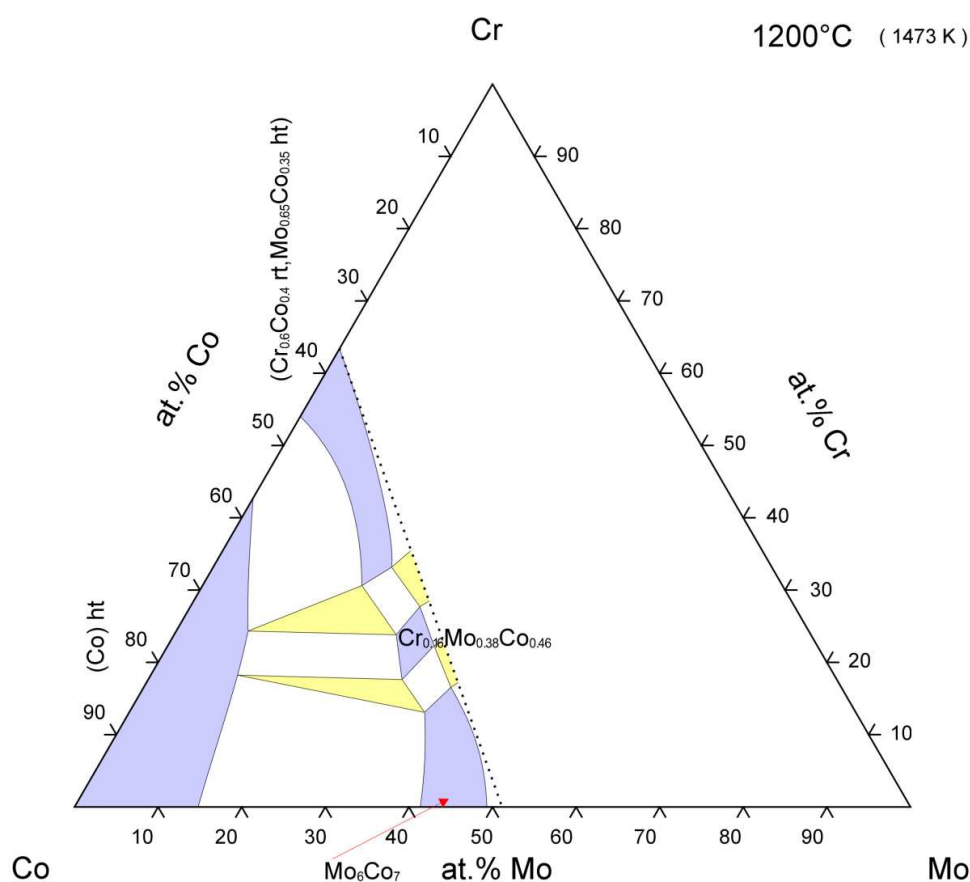


Figura 3 – Diagrama de fases liga de Co-Cr-Mo (Rideout, 1951).

A figura 3 indica que nas concentrações selecionadas para este estudo serão observadas na análise microestrutural duas fases distintas. A diferença de acréscimo de Mo foi pequena, desta forma, as ternárias em estudo encontram-se na mesma seção do diagrama.

4.1.1 L1 - Liga Comercial

Foi utilizada uma liga de Co-Cr comercialmente disponível (Liga de Co-Cr – DeguDent Ind. e Com. Ltda., São Paulo, SP, Brasil) regulamentada pela American Society for Testing and Materials, 1996, esta norma define a proporção em peso de cada elemento de liga e as características desejadas destas ligas, esta norma define que teor de Mo na liga deve ser inferior a 4% wt.

Os lingotes comercialmente disponíveis foram utilizados como controle para os testes comparativos às ligas experimentais.

4.1.2 L2 - Ligas Comercial Acrescida de Porcentagens de Mo

Foi utilizada a liga L1 acrescida de Mo comercialmente puro (Sigma Aldrich). Os metais foram refundidos em forno arco voltaico em atmosfera inerte (gás argônio) e cadinho de cobre refrigerado com água (figura 4) (Laboratório de Materiais do Departamento de Engenharia de Materiais – FEG – Unesp). A liga comercial foi acrescida em proporção em peso por 6, 7 e 8% de Mo, segundo a fórmula descrita abaixo:

$$C = \left(\frac{n \times M_E}{M_C} \right) \times 100$$

Em que:

C = porcentagem em massa de cada elemento do composto;

n = número de mols do elemento presente em 1 mol do composto;

M_E = massa molar do elemento;

M_C = massa molar do composto.

Os metais foram limpos empregando decapagem química em solução formada por 50 mL de H_2SO_4 , 20 mL de HF, 20 mL de HNO_3 e 10 mL de água destilada. As ligas obtidas por fusão foram refundidas 10 vezes para homogeneização (Capellato et al., 2012).

As ligas brutas de fusão (BF) experimentais foram obtidas em botões de aproximadamente 18 g. Para a confecção das barras foram unidos 8 botões de cada uma das BF. Foi selecionado aleatoriamente um botão de cada condição experimental para caracterização microestrutural das BF.

Após solubilização as ligas experimentais apresentaram aproximadamente 120 mm de comprimento e diâmetro médio de 16 mm. Os espécimes foram mantidos no forno (Hevi Duty) por 4 horas a temperatura de 1200 °C, antes de cada passe de deformação plástica os espécimes foram deixados no interior do forno por 15 minutos para a uniformização da temperatura do espécime (Santos, 2012).

Os espécimes foram submetidos a forjamento rotativo (Forno n° 6F, General Controls) à quente (Laboratório de Estruturas, Departamento de Aeronáutica, Engenharia Metalúrgica, ITA) com velocidade de 1700 rpm, 30 CV (HP) (Figura 5).

Os cilindros obtidos foram cortados em cortadeira automática LabCut 1010 (Extex Corp.- Enfield, CT, EUA) resultando em espécimes com as seguintes dimensões 2 mm de espessura e 8 mm de diâmetro.



Figura 4 – a) Forno a arco voltaico (Departamento de Materiais e Tecnologia, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, FEG – Unesp); b) Interior do forno.



Figura 5 – a) Forno utilizado para aquecimento dos espécimes antes da forja; b) Máquina de forjamento rotativo (Laboratório de Estruturas, Departamento de Aeronáutica, Engenharia Metalúrgica – ITA).

4.2 Caracterização Microestrutural

4.2.1 Preparação Metalográfica

Os espécimes foram embutidos a quente em resina fenólica sob pressão de 20 kN. Posteriormente, os espécimes foram lixados e polidos em politriz automática (Buehler, Lake Bluff, Illinois, EUA) com lixas de carbeto de silício as granulações 400#, 600#, 800#, 1000#, 1200#, 1800#, 2000#, 3000# e 5000#. O polimento foi realizado com panos específicos para polimento e suspensão de sílica coloidal.

4.2.2 Ataque químico para evidencição de grãos

Esta técnica foi realizada a fim de revelar a microestrutura e identificar as fases secundárias das ligas em estudo. Foi utilizado ataque ácido recomendado para ligas de Co-Cr (ASM Handbook). A solução de ataque foi obtida a partir de 30 ml de HCl, 15 ml de HNO₃ e 45 ml de glicerol (Departamento de Engenharia Química de Guaratinguetá, FEG – Unesp). Os espécimes foram imersos em solução de ataque por 10 minutos, lavados em água corrente por 1 minuto e limpos em água deionizada em cuba ultrassônica por 10 minutos (Figura 6).



Figura 6 – Sequência de ataque ácido da superfície metálica. a) Substâncias químicas utilizadas para o ataque ácido; b) cuba ultrassônica utilizada para limpeza dos espécimes; c) Imersão dos espécimes em solução de ataque.

4.2.3 Difração de Raio X

A difração de raios X foi realizada a fim de detectar as fases presentes nos sistemas experimentais. Os espécimes foram caracterizados por meio de difração de raios X na forma sólida, utilizando-se difratômetro (LABX XRD-6000 Shimadzu – Departamento de Materiais – EEL – USP; Figura 7), com radiação Mo-K α , tensão de 40 kV, corrente de 30 mA, varredura entre 30 e 100°, passo angular 0,05°, tempo de contagem 0,05 segundos à temperatura ambiente. Os dados obtidos foram exportados e os difratogramas confeccionados em software Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA). A identificação das fases foi realizada com o auxílio de um arquivo JCPDS, para correspondência de cada pico característico (Faria et al., 2011).

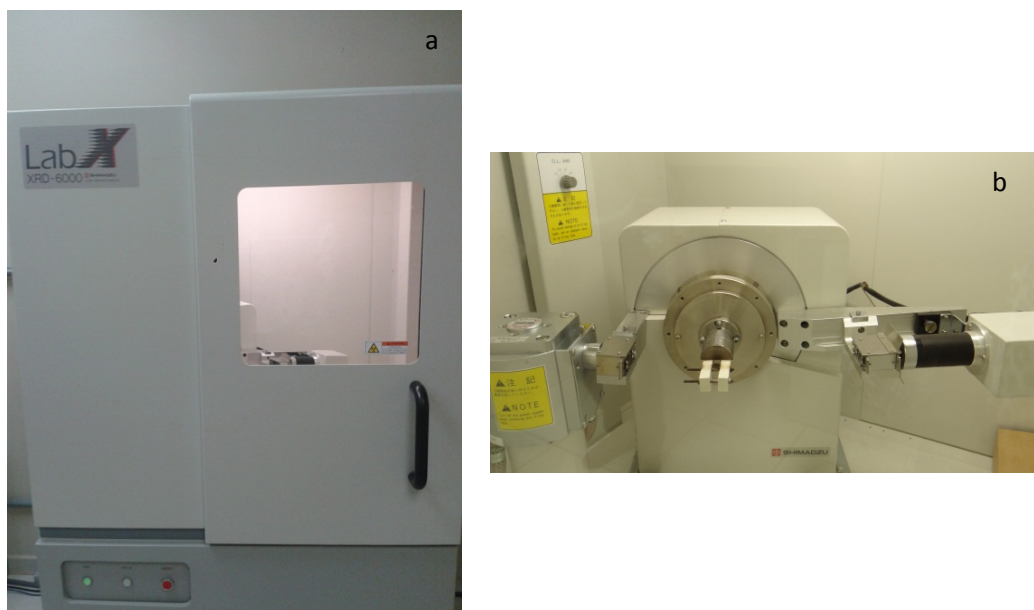


Figura 7 – a) Difratorômetro de raio X; b) Emissor de Mo, porta amostra e receptor na fase inicial da análise.

4.2.4 Fluorescência de Raios X (XDR)

Foi realizada análise semiquantitativa ($n=3$) sem padrões, com determinação de elementos químicos de flúor a urânio em equipamento (Axios^{mAX} PANalytical B.S., Holanda - Laboratório de Caracterização Química, Escola de Engenharia de Lorena, EEL – USP) (Figura 8a). Os espécimes foram preparados em base de ácido bórico que é transparente ao equipamento.

4.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva (MEV/EDS)

Foi realizada análise qualitativa ($n=3$) em microscópio eletrônico de varredura (Inspect S50 – FEI Worldwide Corporate Headquarters, Oregon, EUA – Laboratório de Materiais Odontológicos, Departamento de Materiais

Odontológicos e Prótese, ICT, Unesp) (Figura 8b). Os espécimes foram selecionados aleatoriamente. Foi utilizado o detector de elétrons secundários (BDSE), a fim de observar as diferentes fases presentes em cada sistema. Para a análise química semiquantitativa em EDS, foram utilizadas as funções que permitem a caracterização mais precisa elementos das ligas.



Figura 8 – a) Equipamento para análise de fluorescência (Laboratório de caracterização Química, Escola de Engenharia de Lorena, EEL-USP); b) Microscópio eletrônico de varredura (Laboratório de Materiais Odontológicos e Prótese, Instituto de Ciência e Tecnologia, ICT, UNESP).

4.3 Características Físicas

4.3.1 Ensaio de Microindentação Vickers

Para avaliação da dureza Vickers dos grupos em estudo foi realizado o teste de microindentação Vickers, para sua execução foram confeccionados espécimes ($n=3$) com as seguintes dimensões: 6 mm de diâmetro e 4 mm de

espessura. Foi utilizado um microdurômetro HMV 2T, (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, EUA – Laboratório de Polímeros, FEG, UNESP).

Foi aplicada a força constante de 16,25 Kgf, foram realizadas 3 medidas por quadrante, totalizando 12 medidas por espécime, utilizando penetrador com diamante Vickers, piramidal de base quadrada com ângulo de 136° entre planos. Os resultados foram fornecidos pelo software do aparelho, posteriormente foi realizada a mensuração das diagonais das mossas produzidas. Foi realizada média aritmética das leituras, obtendo-se a dureza Vickers (HV) de cada espécime (Balagna et al., 2012).

Os dados obtidos foram comparados por análise de variância (Anova 1 fator) e teste de comparações múltiplas de Dunnett e de Tukey. O nível de significância para todos os testes foi de 5%.

4.3.2 Ensaio de Corrosão

Foi realizado o teste de corrosão em espécimes dos grupos L1 e L2 forjados (n=1). Espécimes foram preparados em forma de disco ($\varnothing = 8$ mm; h = 3 mm). O contato elétrico foi feito fixando os espécimes a uma haste de cobre com cola de prata. Em seguida, o conjunto foi embutido em resina poliéster, mantendo uma área exposta de 0,50 cm².

Os ensaios eletroquímicos foram realizados em uma célula convencional de três eletrodos com capacidade de 250 mL de solução, com camisa de termostatização, para controle de temperatura. O eletrodo de referência utilizado foi o de calomelano saturado 2 (Hg/Hg₂Cl₂, KCl_{saturado}) e eletrodo auxiliar, um bastão de grafite com área de 10 cm². Para eletrólito foi empregada uma solução de NaCl 0,15 mol/L + NaF 0,03 mol/L, com pH 6. Todos os ensaios foram realizados a temperatura constante de 37 °C.

Os testes eletroquímicos foram realizados no Departamento de Química – Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá (FEG-UNESP). Foi utilizado um potenciostato/galvanostato (METRHOM, Autolab PGSTAT 302N), com um módulo analisador de respostas de frequências (frequency response analyzer - FRA). As técnicas empregadas consistiram em leitura do potencial de circuito aberto (OCP) em função do tempo e polarização potenciodinâmica. As mensurações OCP foram realizadas por um período de tempo de três horas, seguido dos ensaios de polarização potenciodinâmica. As curvas de polarização foram obtidas a uma velocidade de varredura de potencial de 1 mV/s, no intervalo de -0,50V a 3,0V.

4.4 Citotoxicidade in vitro

Nesta etapa do estudo foram utilizados espécimes dos grupos L1 e L2, pois objetivava-se avaliar a influencia dos diferentes percentuais de Mo (6, 7 e 8 % - A, B e C, respectivamente) quanto à citotoxicidade celular. Como L2 e L3 apresentavam o mesmo conteúdo de molibdênio foram utilizados os espécimes obtidos com menor custo operacional.

Para os grupos L1, L2A, L2B e L2C (6, 7 e 8 % Mo, respectivamente) foram confeccionados 36 espécimes com as seguintes dimensões 8 mm de diâmetro e 2 mm de altura.

Os espécimes foram esterilizados por imersão em álcool 70% à temperatura ambiente, seguidos por 30 minutos de exposição à luz UV. Posteriormente as superfícies foram limpas duas vezes com PBS (solução salina de fosfato tamponado) aquecido. Os espécimes foram posicionados poços em placa com 24 poços.

4.4.1 Cultura Celular

Para cultura celular foi utilizado fibroblasto dérmico humano (HDF, Clonetics), passagem 3. O HDF foi suspenso em 12,5 ml de meio de cultura composto por 500 ml de DMEN/ High glucose (HyCiclone), 50 ml de soro fetal bovino (HyCiclone) e 5 ml de Penicilina Strep (HyCiclone). As células foram incubadas em frasco para cultura de células com a superfície com colágeno (75 cm²) em incubadora a 37 °C e 5% CO₂. A primeira troca do meio de cultura (13 ml) foi realizada 48 horas após a cultura inicial, posteriormente a troca do meio

de cultura foi realizada a cada 48 horas até que as células atingissem 70% de confluência.

As células suspensas foram removidas do frasco de cultura com tripsina (1 ml de 0,025% de tripsina – Invitrogen). Posteriormente a células foram totalmente removidas por tripsina (3 ml de 0,025% tripsina), o processo foi interrompido com 3 ml de meio de cultura. A solução foi transferida do frasco para tubo Falcon, 3 ml de meio de cultura foram adicionados ao frasco de cultura e a solução transferida para um tubo Falcon estéril. A solução foi submetida a centrifugação em máquina automática (180 G por 7 minutos). Posteriormente o meio de cultura foi aspirado e foi acrescido 2 ml de PBS e a solução foi pipetada para cima e para baixo para sua homogeneização, posteriormente foi acrescido 8 ml de PBS ao tubo Falcon. Foi utilizado um contador de células digital (Scepter 2.0 Handheld Automated Cell Counter – EMD Millipore Co., Germany) para avaliar a densidade de células por Falcon, foram removidos 200 µl de solução e transferido para um eppendorfe. Para cada mensuração foi utilizado um sensor novo descartável de 40 µl, anexado ao contador de células. Após determinação da densidade de células os tubos Falcon foram novamente centrifugados, o PBS foi aspirado e as células re-suspensas em 5 ml de meio de cultura. Foi utilizada a densidade celular de 2×10^5 por espécime.

4.4.2 Adesão e Proliferação Celular

Para avaliar a adesão e proliferação celular foi utilizado o marcador de atividade celular F-actina (Invitrogen) e o para evidenciação do núcleo celular o marcador DAPI (4'6-diamidino-2-phenyl- indole-dihydrochloride, Invitrogen).

Inicialmente, as células não aderidas foram removidas aspirando o meio

de cultura dos espécimes, posteriormente os espécimes foram gentilmente lavados com PBS por duas vezes. Os espécimes foram transferidos para uma placa de 24 poços estéril e incubados à temperatura ambiente com 3 μ m solução de Actina em PBS por 20 minutos, após este período foi adicionado DAPI (105 ng/ml em PBS) e incubados à temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente os substratos foram gentilmente lavados e armazenados em PBS.

Os espécimes foram analisados por microscopia de fluorescência (Axio Imager 2 for Polarized Light, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Goettingen, Germany – *Colorado State University – Biomedical Engineering Department*) utilizando o filtro azul DAPI BP 445/50 (Zeiss) e filtro vermelho Rhodamine BP 560/40 (Zeiss). As imagens obtidas foram analisadas no software ImageJ, o número de células foi determinado utilizando as imagens de fluorescência por detecção nuclear (marcador DAPI). As análises foram realizadas após 1, 4 e 7 dias cultura celular.

4.4.3 Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi caracterizada utilizando um kit para bioanálise MTT (metiltiazol tetrazólio - Sigma) comercialmente disponível. Primeiramente as células não aderidas foram removidas aspirando o meio de cultura do substrato e lavando-o gentilmente com PBS por duas vezes. Posteriormente foi realizado o protocolo descrito pelo fabricante. Os substratos foram transferidos para uma placa de 24 poços estéril e incubados em 10% de solução de MTT em PBS por 4 horas a 37 °C e 5% CO₂, resultando na formação de cristais que foram dissolvidos adicionando uma solução de 10% de Triton-X, solvente de MTT em PBS, em igual quantidade da solução de MTT, e incubando por 4 horas a 37 °C e 5% CO₂. Foi utilizada uma placa de leitura de 96 poços (BMG

Labtech). A densidade óptica resultante do solvente foi mensurada a 570 nm utilizando um espectrofotômetro (FLUOstar Omega; BMG Labtech, Durham, NC, USA – *Colorado State University – Biomedical Engineering Department*). A base de absorbância utilizada foi 690 nm e foi subtraída a absorbância aferida.

Os dados obtidos foram comparados por análise de variância (Anova 2 fatores) e teste de comparações múltiplas de Tukey. O nível de significância para todos os testes foi de 5%.

4.4.4 Organização Citoesquelética

Nos espécimes marcados por DAPI e F-Actin foi avaliado concomitantemente a organização citoesquelética por microscopia de fluorescência. Os espécimes foram incubados em Rodamina conjugada (70 ng/ml - Invitrogen) por 20 minutos à temperatura ambiente. Os espécimes foram analisados por microscopia de fluorescência (Axio Imager 2 for Polarized Light, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Goettingen, Germany – *Colorado State University – Biomedical Engineering Department*) utilizando o filtro vermelho Rhodamine BP560/40 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Goettingen, Germany).

4.4.5 Morfologia Celular

A morfologia celular foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) a fim de visualizar a interação celular com a superfície metálica após 1, 4 e 7 dias de cultura celular. As células não aderidas foram removidas aspirando o meio de cultura e lavando gentilmente o substrato com

PBS por duas vezes. As células aderidas foram desidratadas e fixadas na superfície do espécime. As células foram fixadas por incubação em solução primária fixadora (3% de glutaraldeído, 0,1 M de cacodilato sódico e 0,1 M de sucrose) por 45 minutos, posteriormente os espécimes foram fixados em uma solução secundária (solução primária sem glutaraldeído) por 10 minutos. Posteriormente, procedeu-se a desidratação em soluções com concentração crescente de etanol (35%, 50%, 70% e 100%), por 10 minutos respectivamente. Após desidratação os substratos foram incubados em HMDS (hexametildissilazano – Sigma) por 10 minutos. Os espécimes foram secados em ar e armazenados em dessecador para a análise em MEV.

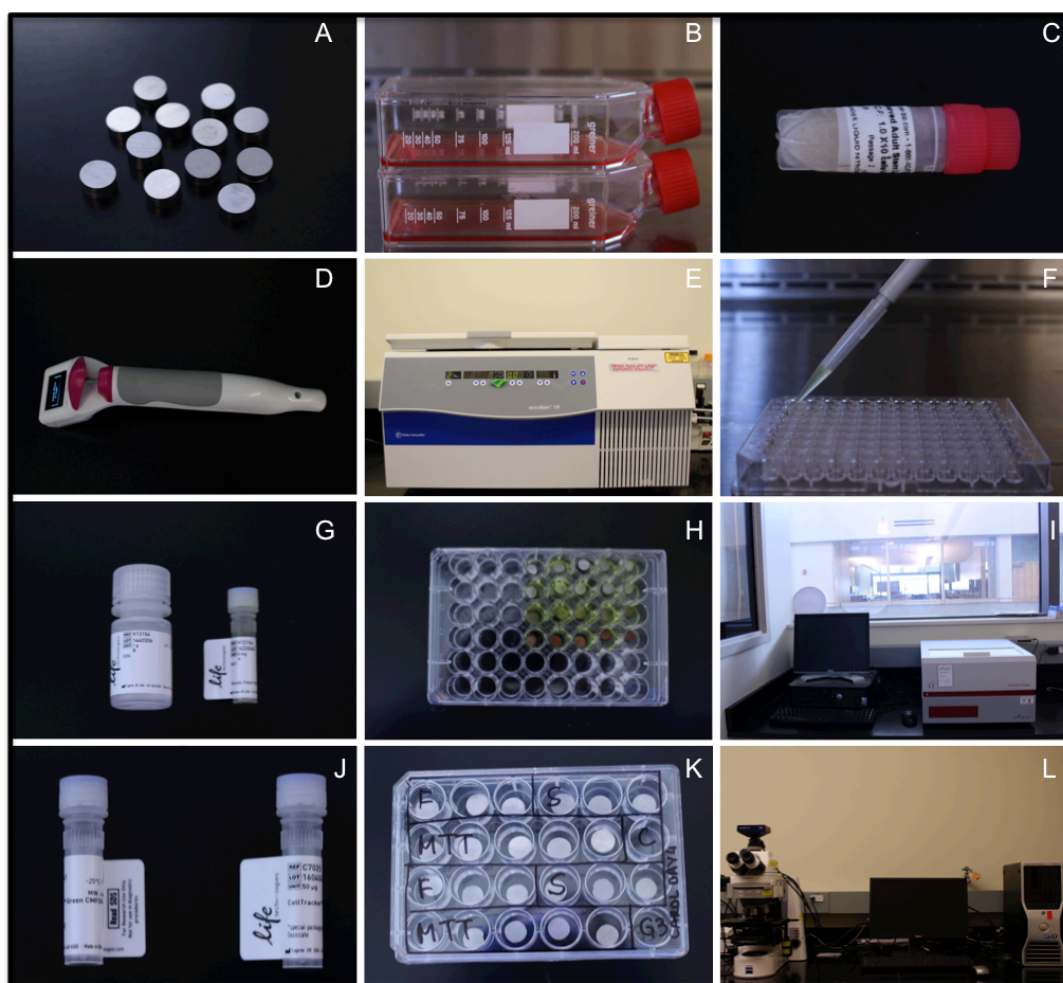


Figura 9 – Processo de cultura celular. a) Espécimes metálicos L1; b) Meio de cultura em frasco; c) Fibroblastos; d) Contador de células digital; e) Centrífuga; f) Semeadura dos fibroblastos; g) Reagentes para MTT; h) Espécimes com os reagentes para análise de absorbância; i) Máquina para o teste de absorbância; j) Marcadores CMFDA e Actina, para análise de fluorescência; k) Espécimes dos grupos C e G3 em placa de 24 poços, dispostos para semeadura e posterior incubação; l) Microscópio de fluorescência.

5 RESULTADOS

A seguir serão descritos o resultados das análises microestruturais, mecânicas e citológicas dos espécimes L1, L2 e L3.

Para as análises microestruturais foram avaliados os espécimes nas condições brutas de fusão (BF) e após forjamento. Para tanto, em um mesmo grupo foram analisados espécimes provenientes de diferentes lingotes.

5.1 Características Microestruturais

5.1.1 Difração de Raios X (DRX)

As ligas de Co-Cr-Mo são tipicamente caracterizadas por duas fases cristalinas: cúbica (CFC, Co) e hexagonal (HCP, Co) (Balagna et al., 2012). Os difratogramas apresentados a seguir (figura 10) representam as ligas brutas de fusão comparadas a L1, no entanto, vale ressaltar que L1 foi submetida ao tratamento térmico, processo que induz a transformação martensítica da fase CFC para a fase HCP, desta forma podemos observar picos mais característicos em L1 do que em L2 brutas de fusão.

Em L1, a 20° podemos observar um pico fraco de CFC (destacado nos difratogramas por círculos), por volta de 38° podemos observar um pico um pouco mais pronunciado desta mesma fase e em 53° seu pico mais forte; no entanto, a fase HCP (destacado nos difratogramas por quadrados) apresenta-se mais forte já em seu primeiro pico 22° , maior intensidade obtida na análise, o pico se repete com menor intensidade a 32° .

Como referido anteriormente, as ligas brutas de fusão apresentam maior quantidade de estruturas CFC do que as termicamente tratadas, esta característica foi observada nos três difratogramas apresentados.

Em L2A BF é possível observar que os picos de CFC apresentam-se mais numerosos (20, 23, 27, 33, 40°) e em maior intensidade, em 20° a intensidade do pico é seis vezes superior ao pico de L1; e picos de baixa intensidade de HCP. Em L2B BF, os picos de CFC apresentam intensidade superior aos picos em L2A BF, chegando a atingir dez vezes mais a intensidade atingida por L1, apresentando três picos característicos de alta intensidade e apenas um pico de baixa intensidade para HCP (53°).

Em L2C BF é possível observar um pico característico e de alta intensidade (20°) de CFC, picos com menores intensidades podem ser observados, no entanto, estes picos representam a fase HCP e não a fase CFC como esperado, o que pode ser consequência da alta concentração de Mo. Ao permear a estrutura cristalina o Mo resultou em maior concentração da fase HCP.

Na figura 11 (L2 forjada) foi detectado mais ruído do que nas outras análises. Foi possível observar o deslocamento em 20° de ambos os picos, CFC e HCP, além da intensidade dos picos ser quase duas vezes maior que em L1 e L2 BF. Em ambos os difratogramas foram observados menor quantidade de picos (CFC e HCP), mas com a mesma angulação (42° e 50° HCP para e 45° para CFC). Como esperado a quantidade de picos CFC detectados foi menor que a quantidade de picos HCP.

Na figura 12 (L3 forjadas) não foi detectado ruído nos difratogramas, no entanto foi observada maior quantidade de picos CFC e HCP do que nos outros grupos. Neste grupo ambos os picos apresentaram menor intensidade em comparação aos demais. Os picos iniciais foram detectados a aproximadamente 20° assim como em L1.

Nos difratogramas abaixo (Figura 10, 11 e 12) é possível observar presença das fases de Co solução sólida com estrutura cúbica de face centrada (γ Co) e estrutura hexagonal compacta (ϵ Co). Observa-se o deslocamento dos picos para ângulos maiores do que os difratogramas teóricos do Co puro (CFC e HC), observa-se o aumento da distância interplanar como consequência do acréscimo de Mo.

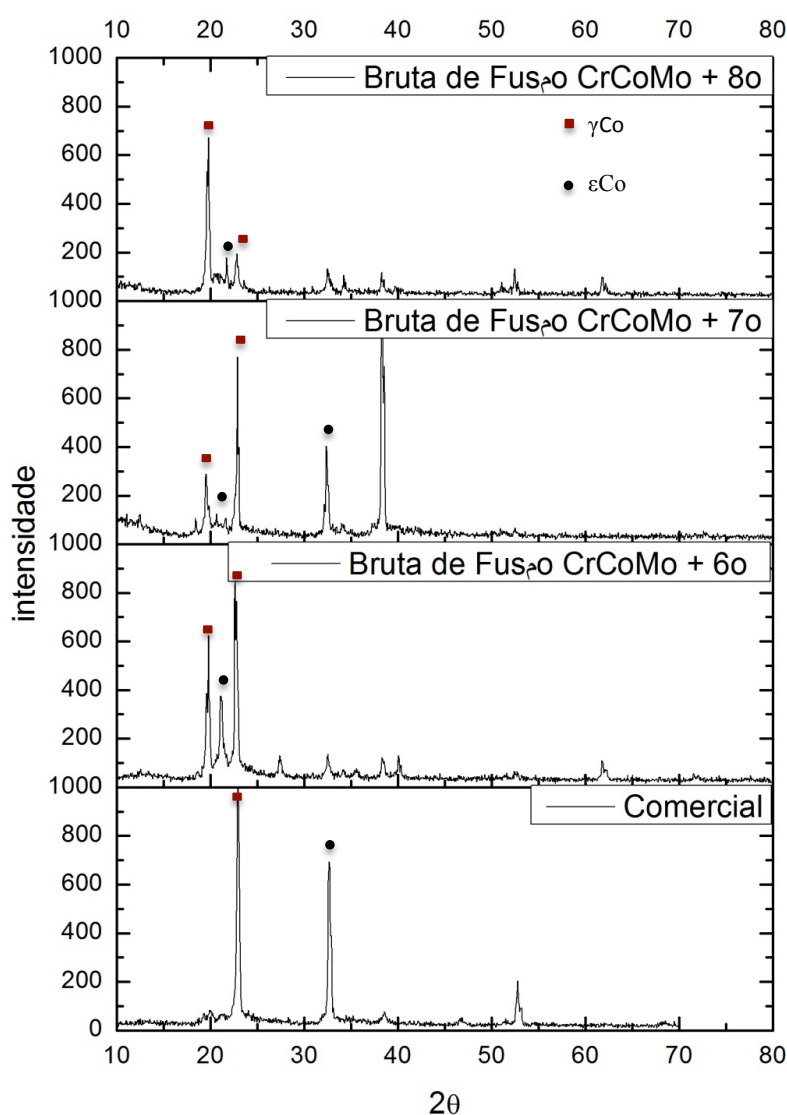


Figura 10 - Difratogramas referentes a L1 e L2 BF.

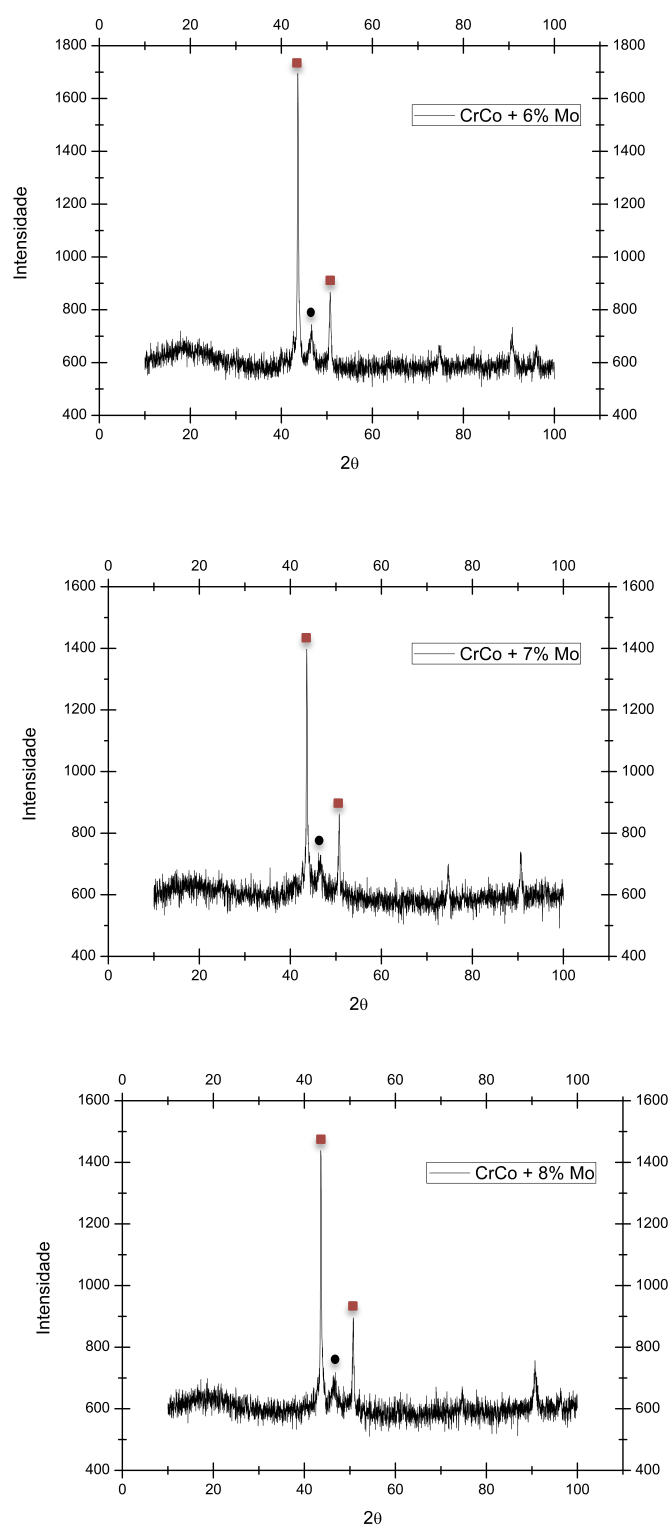


Figura 11 – Difratoqramas de L2A, L2B e L2C forjadas.

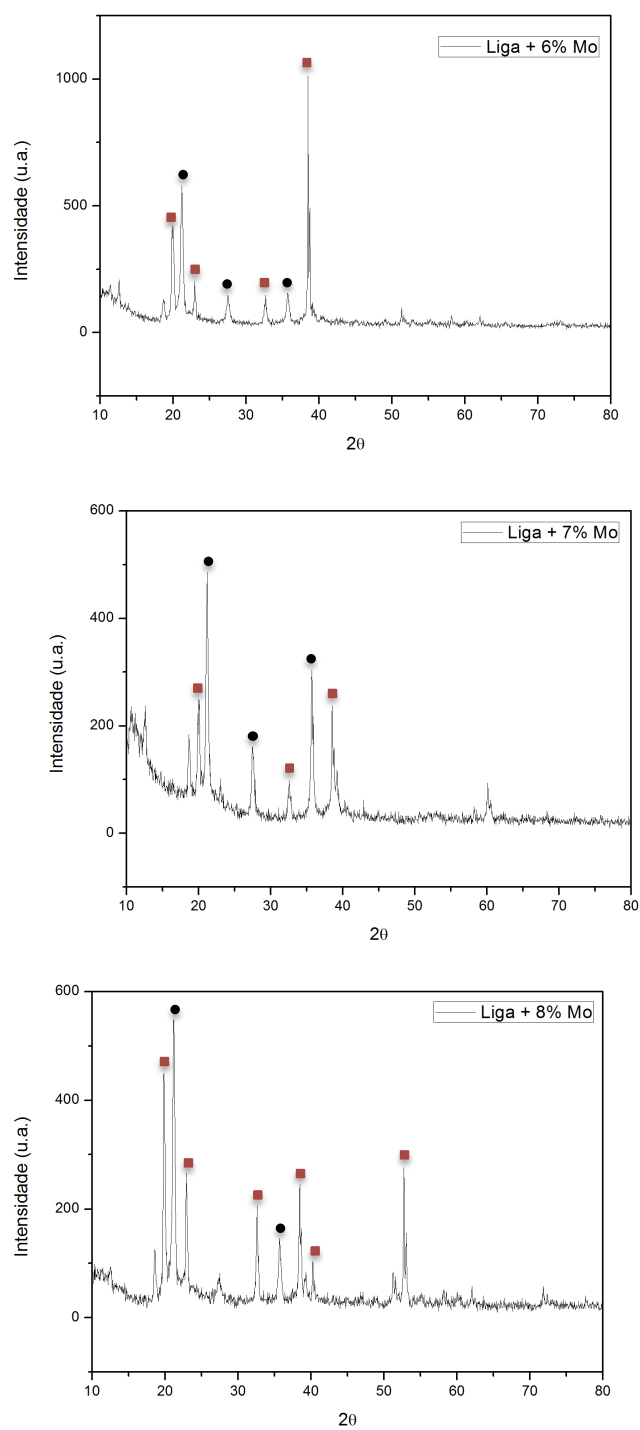


Figura 12 – Difractogramas de L3A, L3B e L3C forjadas.

5.1.2 Fluorescência de Raios X (XDR)

A espectrometria descreve os elementos presentes no sistema com maior precisão do que outras análises semiquantitativas. Mesmo a etapa de fundição tendo ocorrido em ambiente controlado, na tabela 3 é possível observar que as porcentagens de Mo são diferentes do esperado.

Foi possível observar a presença de Fe em L2 no entanto, este elemento não foi doado ao sistema durante a fundição das ligas experimentais. Especula-se que o Fe seja originário dos processos de fundição e homogeneização das ligas L2. É possível observar que L1 apresentava Si em sua composição podendo ser oriundo do processo de preparação metalográfica dos espécimes, uma vez que, em L2 este elemento não foi detectado.

Tabela 3 – Quantificação dos elementos presentes em L2 brutas de fusão – porcentagem em peso

Elemento	L2A	L2B	L2C
Co	60,83	59,2	59,63
Cr	27,32	27,07	27,05
Mo	10,4	12,3	11,79
Si	0	0	0
Mn	0,54	0,54	0,54
W	0,77	0,74	0,82
Fe	0,14	0,16	0,18

Os dados de fluorescência para os espécimes forjados (F) são semelhantes aos espécimes BF, indicando mudanças na estrutura cristalina do material mas não da proporção em peso do material (Tabela 4) ou de contaminantes oriundos do processamento final das ligas.

5.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva (MEV/EDS)

Para a análise em MEV foram utilizados os seguintes parâmetros detector de elétrons secundários (BDSE), spot 5.0, hv 20.00 kV, distância 11,9 mm e magnitude 1200 ×.

A análise em MEV permitiu observar presença de duas fases distintas em todos os grupos experimentais e a análise em EDS permitiu quantificar os elementos em cada fase.

Em L1 (Figura 13) não foi possível observar diferença de fases (áreas claras e escuras), provavelmente, devido ao tratamento térmico ao qual a liga (Co – 63,91%; Cr – 31,49%; Mo 3,06%) foi submetida durante seu processamento pelo fabricante.

Nas figuras 13A, 13C, 13E e 13F é possível observar a presença de duas áreas distintas: áreas claras e escuras. Após análise em EDS foi possível afirmar que as áreas claras são ricas em Cr, fase com estrutura CFC e representa a parte mais nobre da liga; e as áreas escuras, com carbonetos ricos em Mo, fase com estrutura HCP, representa a fase menos nobre da liga. Nestas fotomicrografias (Figura 13A, 13C, 13E e 13F) podem ser observados poros com aproximadamente 1 µm de diâmetro.

Em L3A e L3B não foi possível observar as diferentes fases presentes no sistema devido ao fato anteriormente relatado, as fases foram parcialmente reveladas na preparação metalográfica.

Não foi possível observar presença de ilhas de Mo indissoluto na matriz de ambas as ligas, o que indica que não houve saturação de Mo, ou seja, todo o Mo fornecido aos sistemas permeou as redes cristalinas das ligas experimentais, compondo as fases presentes nos sistemas.

Tabela 4 – Quantificação dos elementos presentes em L1, L2 e L3 – porcentagem em peso

Elemento	L1	L2A	L2B	L2C	L3A	L3B	L3C
Co	63,73	60,83	59,34	59,04	60,47	58,18	49,09
Cr	29,03	27,31	27,13	26,17	20,64	20,45	23,71
Mo	5,01	10,32	12,23	13,14	7,17	8,02	10,78
Si	0,73	0	0	0	0	0	0
Mn	0,62	0,6	0,38	0,62	0	0	0
W	0,89	0,79	0,76	0,84	0	0	0
Fe	0	0,15	0,16	0,19	0	0	0
C		0	0	0	3,17	2,87	3,94

Tabela 5 – Quantificação da porcentagem atômica dos elementos Co, Cr e Mo em L2

Grupo	Cobalto (%at)		Cromo (%at)		Molibdênio (%at)	
	Clara	Escura	Clara	Escura	Clara	Escura
L2A	62,52	51,63	28,26	32,65	5,48	12,33
L2B	64,33	51,94	27,40	32,60	4,34	11,97
L2C	63,54	58,14	28,25	30,60	4,30	7,33
L3C	44,99	52,36	27,05	23,01	18,96	9,06

*unidade de medida porcentagem atômica.

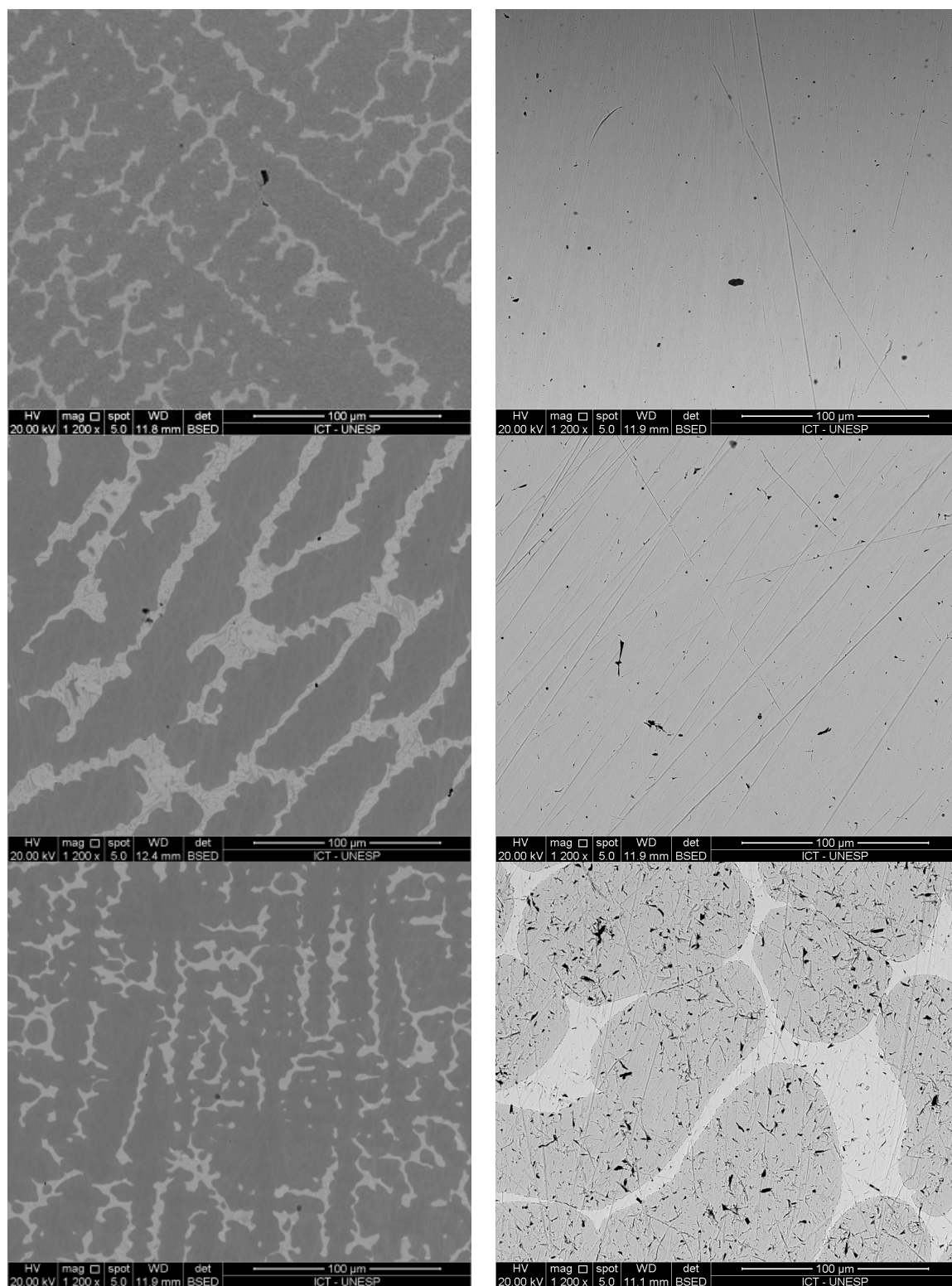


Figura 13 – Fotomicrografia das ligas após ataque químico, nas imagens é possível observar a presença de duas fases discordantes. a) L2A; b) L2B; c) L2C; d) L3A; e) L3B; f) L3C.

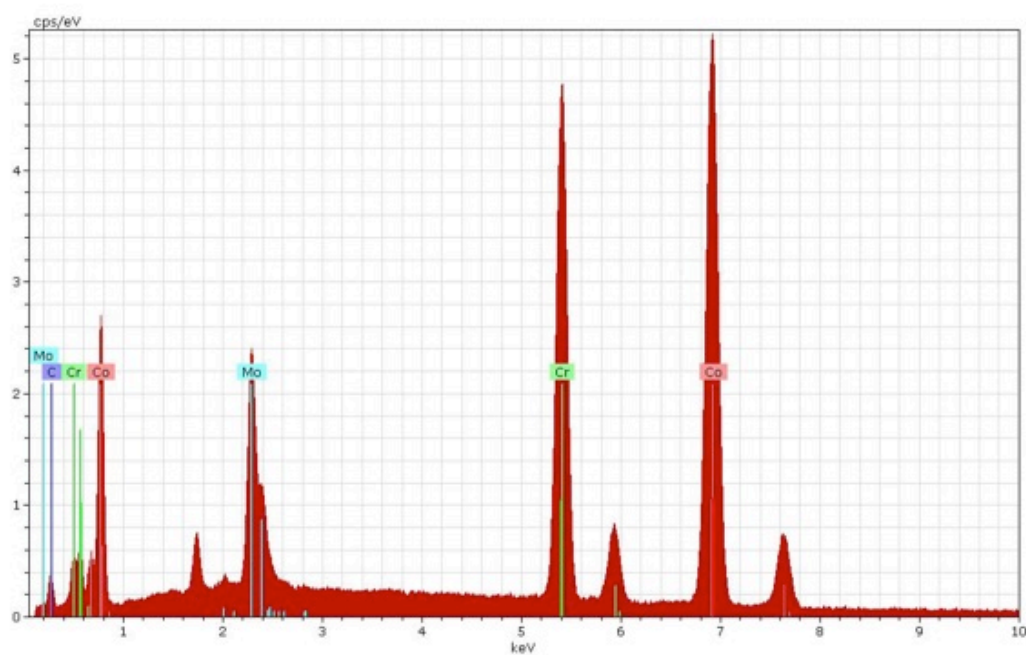


Figura 14 - Espectro de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) para área em L1.

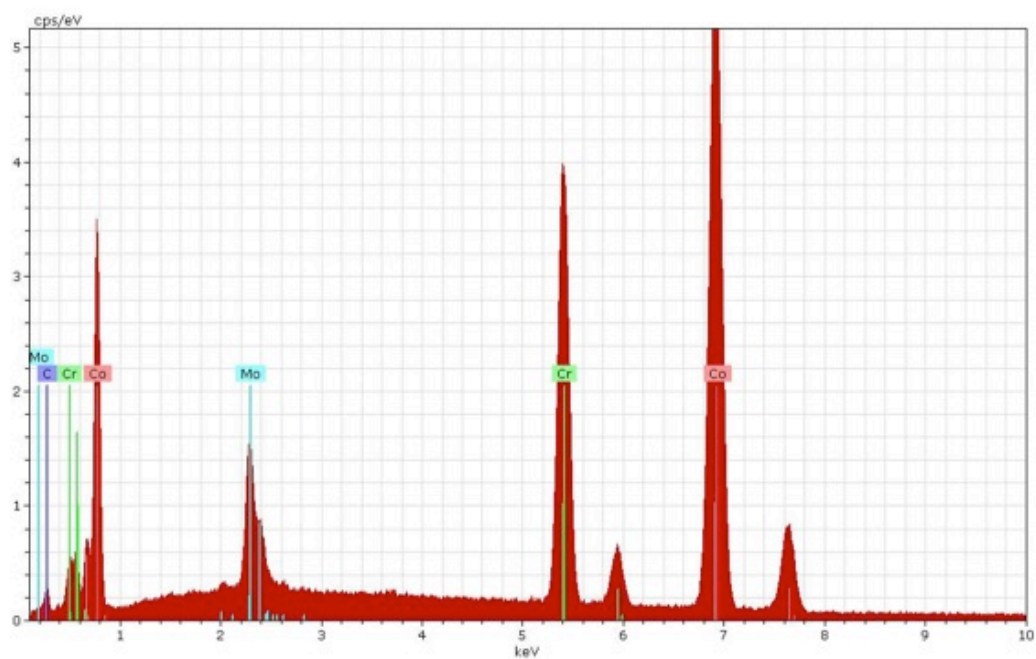


Figura 15 – Espectro de EDS para área em L3A.

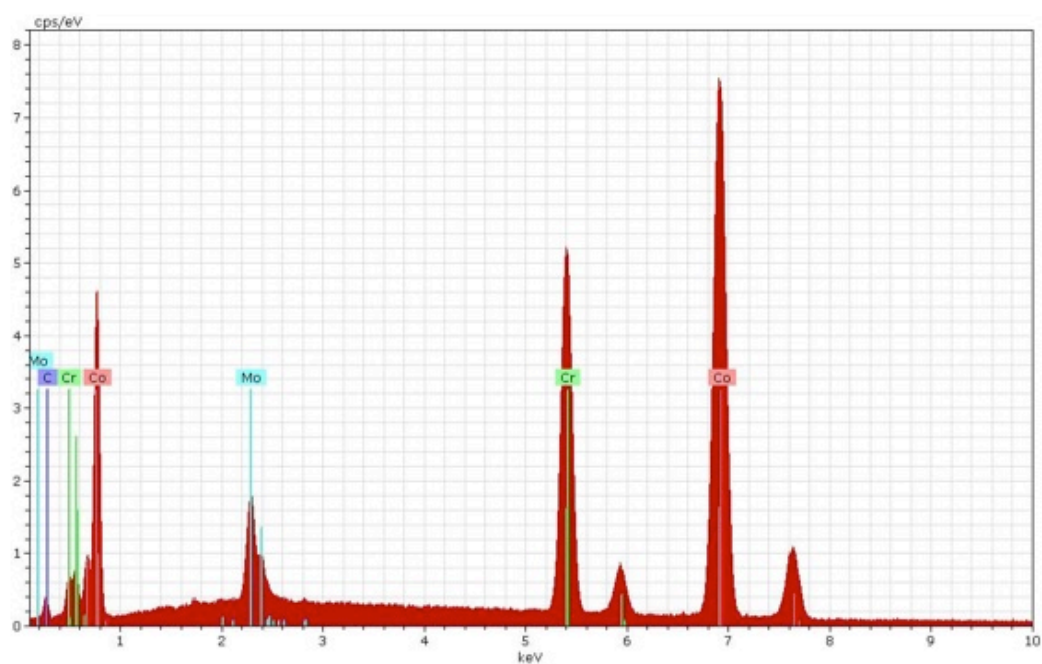


Figura 16 – Espectro de EDS para área em L3B.

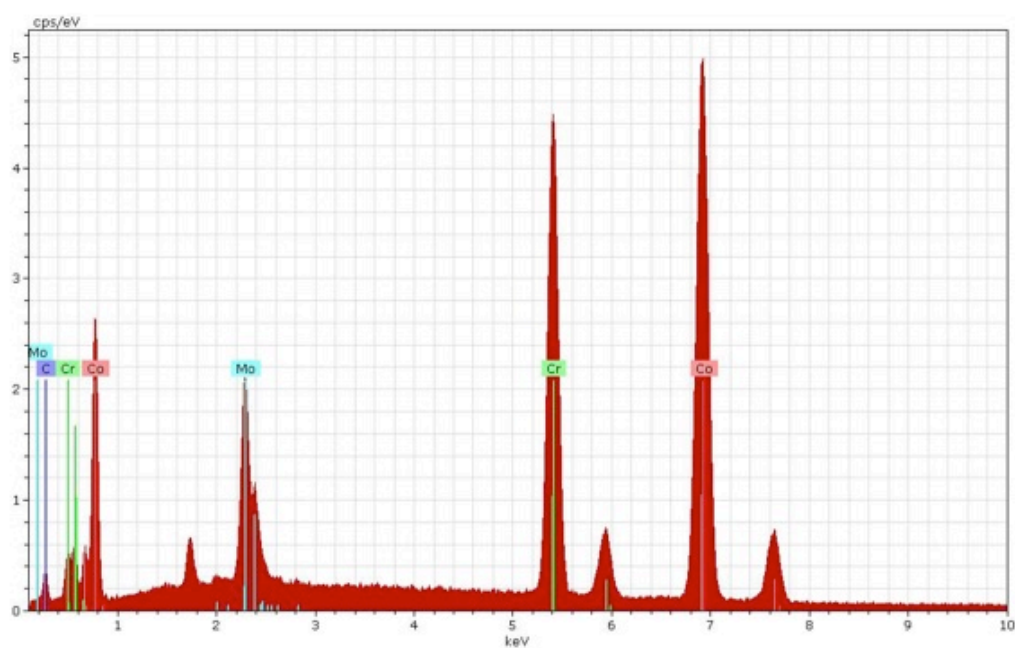


Figura 17 – Espectro de EDS para área em L3C.

5.2 Características Físicas

5.2.1 Dureza Vickers

O teste de anova 1 fator evidenciou diferença estatisticamente significativa ($p=0,000$) para dureza Vickers.

O teste de Dunnett mostrou que apenas os grupos L2A e L2C brutas de fusão e L3B foram estatisticamente semelhante à L1.

O teste de comparações múltiplas de Tukey mostrou que a dureza da liga após forjamento apresenta diferença estatística significativa. Após forjamento L2B foi estatisticamente superior aos demais grupos e foi o grupo que apresentou menor coeficiente de variação, os demais grupos após forjamento apresentaram semelhança estatística para as duas condições.

Os grupos obtidos a partir de metal puro (L3A; L3B; L3C) apresentaram semelhança estatística. O grupo L3B ($450,00 \pm 74,213$) apresentou menor média de dureza e alto desvio padrão e portanto alto coeficiente de variação.

Tabela 6 – Média e desvio padrão de dureza Vickers para as L1, L2 e L3

Grupo	Média (HV) Brutas de Fusão	Média (HV) Forjadas
L1	---	$456,25 \pm 24^{BCa}$
L2A	$472,05 \pm 66^{BCa}$	$445,65 \pm 28^C$
L2B	$516,05 \pm 64^B$	$665,30 \pm 29^A$
L2C	$489,45 \pm 72^{BCa}$	$531,30 \pm 40^B$
L3A	---	$536,60 \pm 47^B$
L3B	---	$450,00 \pm 74^{BCa}$
L3C	---	$535,00 \pm 52^B$

*Força aplicada: 16,25 Kgf.

**Letras maiúsculas diferentes na tabela apresentam diferença estatisticamente significativa para o teste de Tukey. Letras minúsculas iguais na tabela apresentam semelhança estatística ao grupo controle segundo o teste de Dunnett.

5.2.2 Ensaio de Corrosão

Foram realizados ensaios eletroquímicos de monitoração do potencial de circuito aberto (OCP) e análise de curvas de polarização empregando meio fluoretado.

Na figura 18 é possível observar as curvas obtidas por OCP para os grupos em estudo. L1 apresentou o menor valor de OCP indicando menor nobreza que os grupos experimentais. A sequência de nobreza pode ser descrita da seguinte maneira: $L2B > L2A > L2C > L1$. O valor mais positivo de OCP indica a formação de óxidos mais estáveis, caracterizando melhor formação do filme de passivação na superfície do substrato.

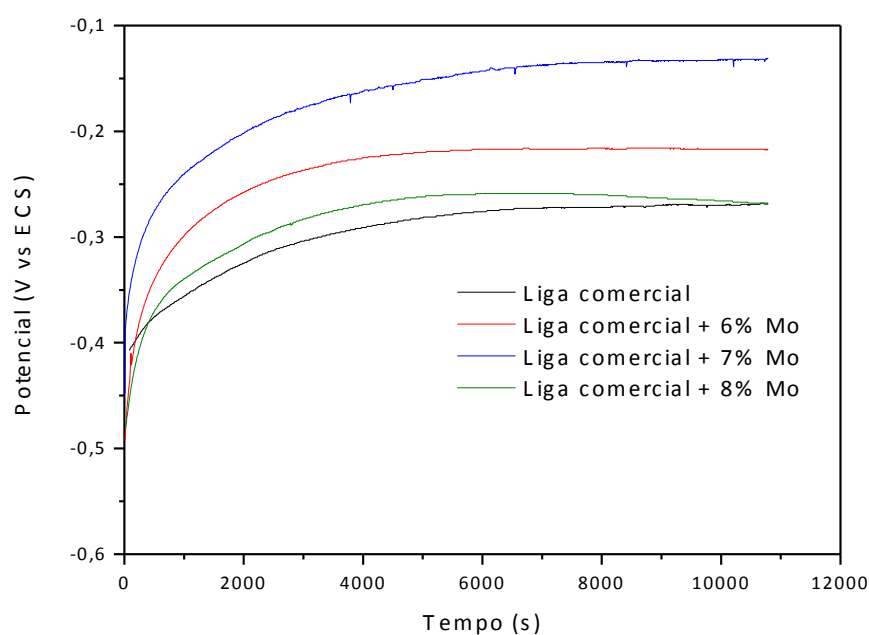


Figura 18 – Curvas de OCP para L1, L2A, L2B e L2C em solução de NaCl 0,15 mol/L + NaF 0,03 mol/L, pH 6,0 à 37 °C.

Na tabela 8 é possível observar outros parâmetros eletroquímicos obtidos no ensaio, o maior valor de densidade de corrente de corrosão (j_{corr}) foi obtido por L1 indicando menor resistência à corrosão. Todos os grupos experimentais apresentaram valores inferiores de densidade de corrente de corrosão e portanto,

todos os grupos experimentais apresentaram resistência à corrosão superiores a L1, sendo L2A o grupo que apresentou maior resistência à corrosão.

Tabela 8 – Média de corrosão para as ligas experimentais e comercial

Grupo	E_{corr} (mV)	i_{corr} (nA)	j_{corr} (A/cm²)
L1	-111,9	294,3	3,164 x 10 ⁻⁷
L2A	-149,7	36,50	4,679 x 10 ⁻⁸
L2B	-169,9	82,23	1,158 x 10 ⁻⁷
L2C	-187,7	48,01	6,762 x 10 ⁻⁸

* E_{corr}, potencial de corrosão em relação ao ECS; i_{corr}, corrente de corrosão; j_{corr}, densidade de corrente de corrosão.

5.3 Citotoxicidade *in vitro*

Para as análises celulares foram utilizadas L1 e L2 F, com as seguintes dimensões: 8 mm de diâmetro e 2 mm de altura. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Engenharia Tecidual do Departamento de Engenharia Biomédica na Universidade do Estado do Colorado, CO, EUA.

5.3.1 Adesão e Proliferação Celular

O teste de anova 2 fatores evidenciou interação entre os fatores grupo e dia de cultura celular (p=0,000). As interações obtidas no teste de Tukey podem ser observadas na figura 19.

A adesão e proliferação são indicativos de afinidade celular por um substrato. Na figura 19, é possível observar o desempenho celular sobre os substratos em estudo.

Em L1 é possível observar a manutenção populacional homogênea com o decorrer do tempo. Como esperado o maior desvio padrão foi observado no 1º dia de cultura celular (cc).

Em L2A no 1º dia houve aumento populacional, o que indica maior secreção inicial de proteínas adesivas que garantem a adesividade celular ao substrato. Nos dias subsequentes de análise foi observado o decréscimo constante no dia 7 pode ser observado pequeno decréscimo da população celular, mas não a níveis semelhantes a L1 no 7º dia e com desvio padrão menor que em L1.

Em L2B a população celular observada no 1º dia de cc é praticamente duas vezes maior do que os outros dias de cultura do mesmo grupo. O mesmo efeito pode ser observado no grupo L2C, no entanto, a população celular observada no 7º dia de cc foi a maior comparada aos demais grupos.

O decréscimo populacional observados nos grupos experimentais, indicado pela análise de absorbância nos dias 4 e 7 de cc não foi confirmado pelas análises de microscopias, que serão descritas a seguir.

Em ambos os grupos experimentais (L2A, L2B e L2C), que possuem maior porcentagem de Mo do que em L1, foi possível observar que o aumento populacional no dia 1 está relacionado a secreção de proteínas adesivas que garantem a adesividade celular ao substrato. Na figura 20 é possível observar em detalhe os prolongamentos celulares e região referente a fluorescência de proteínas (ambos em vermelho). É possível observar o espraçamento e a morfologia celular típica de fibroblastos com metabolismo ativo.

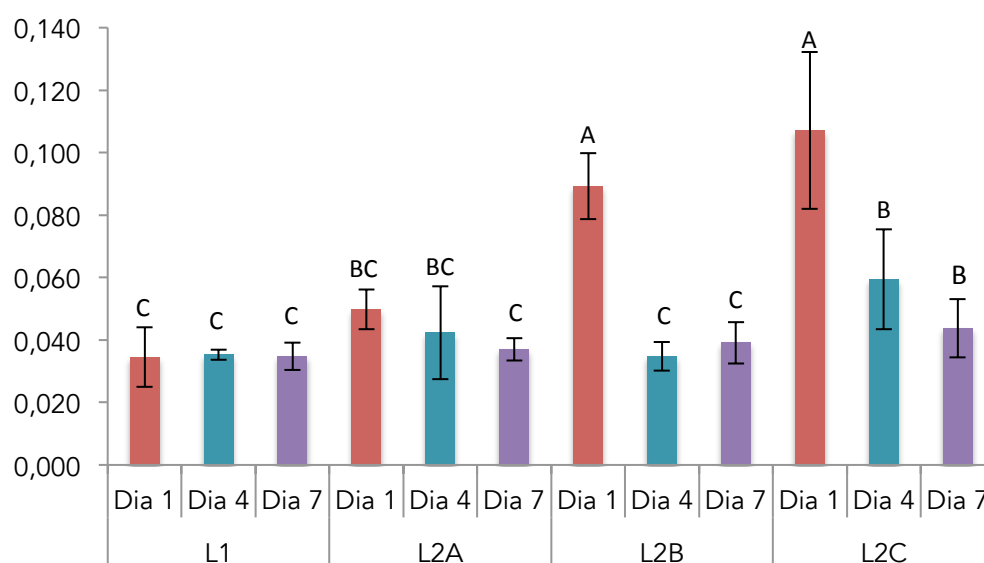


Figura 19 - Contagem do número de células por análise de absorvância para os dias 1, 4 e 7 de cultura de HDF para cada substrato.

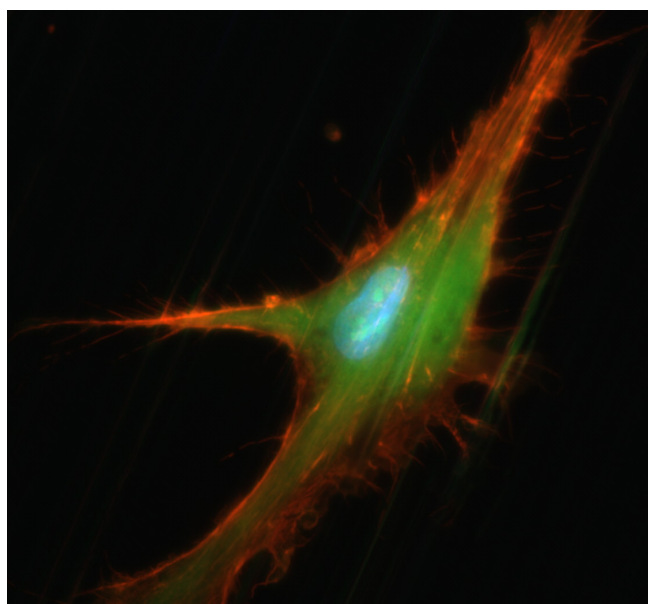


Figura 20 – Imagem representativa de fluorescência. Imagem de fibroblasto de L2A, dia 1.

5.3.2 Viabilidade Celular

O teste de anova 2 fatores evidenciou interação entre os fatores grupo e dia de cultura celular ($p=0,000$). As interações obtidas no teste de Tukey podem ser observadas na figura 21.

Em contraste com o que foi detectado por absorbância, na figura 21 é possível observar que, com o decorrer do tempo, o crescimento celular foi positivo e ascendente para os grupos experimentais; em L1 ocorreu redução da população celular no sétimo dia de cc atingindo níveis próximos ao índice de citotoxicidade ($IC_{50\%}$), que corresponde a cinquenta por cento da densidade celular inicial, materiais que apresentam valores abaixo deste índice são considerados citotóxicos.

A viabilidade celular observada no quarto dia de cc foi semelhante para todos os grupos, sendo que os grupos experimentais apresentaram maior desvio padrão do que o observado em L1.

No sétimo dia de cc o grupo L2C apresentou resultado superior aos demais e menor desvio padrão em comparação a L2A e L2B, apresentando menor coeficiente de variação e, portanto, maior confiabilidade que os demais grupos.

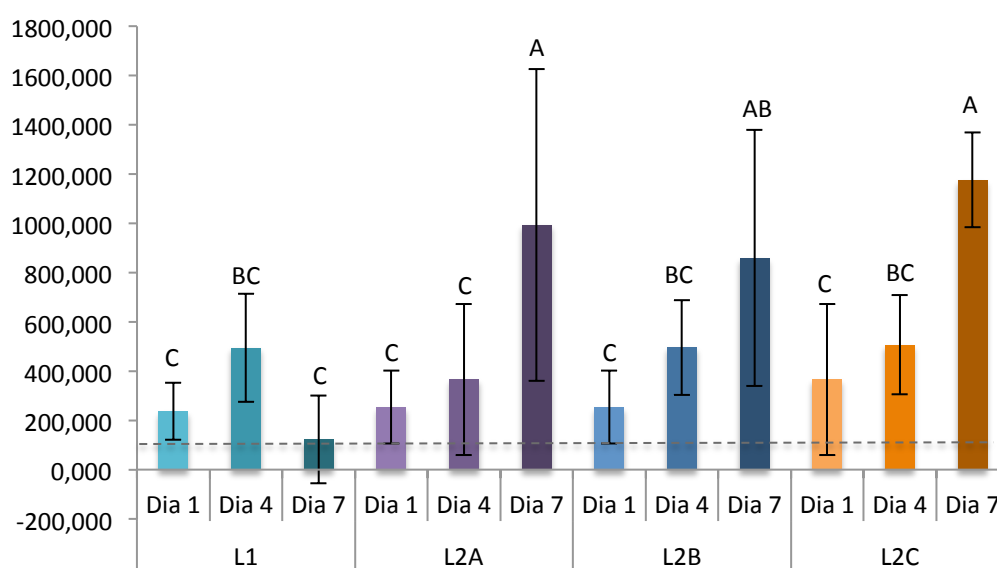


Figura 21 – Contagem do número de células por análise de fluorescência para os dias 1, 4 e 7 dias de cultura de HDF para cada substrato. Linha pontilhada: IC_{50%} - índice de citotoxicidade corresponde ao limite de viabilidade celular.

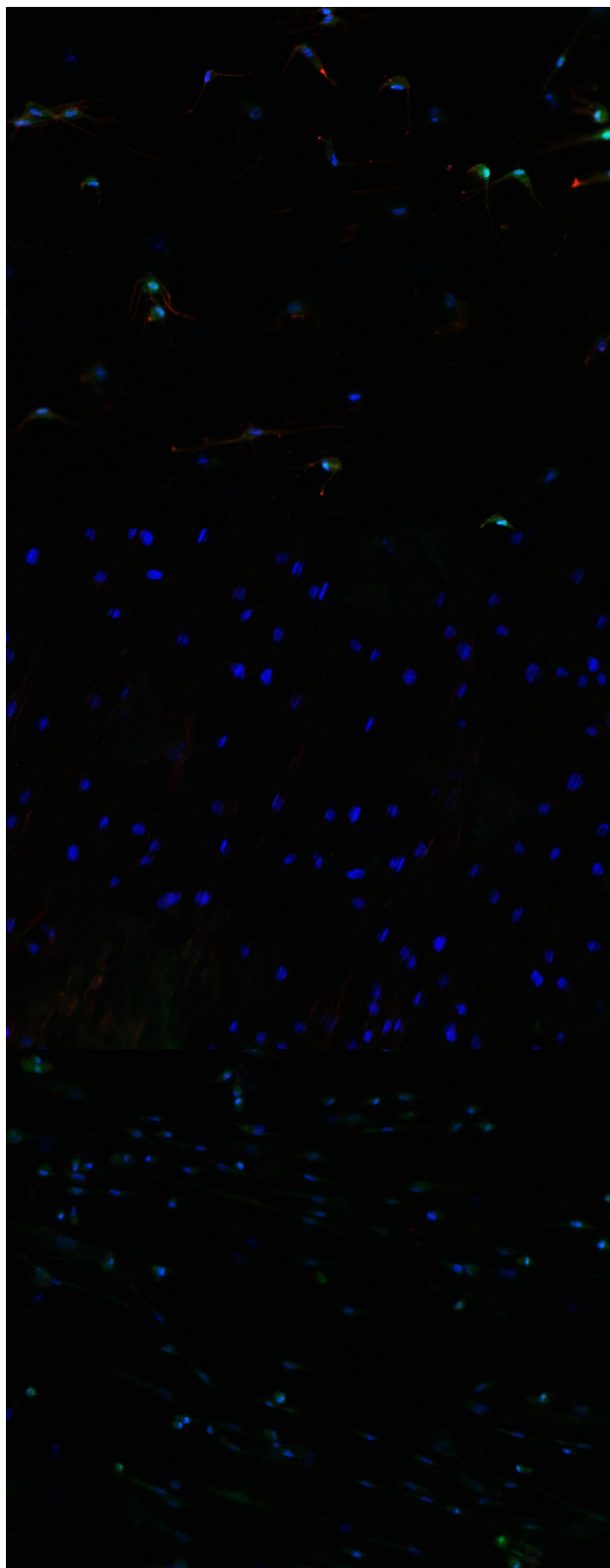


Figura 22 - Imagens de fluorescência da superfície dos espécimes do grupo L1, magnitude 10 ×. a) Dia 1; b) dia 4; c) dia 7.

Na figura 22 podem ser observadas imagens representativas do grupo L1. Em todas fotomicrografias podem ser observadas as áreas referentes aos núcleos celulares. Mesmo não sendo observadas a pigmentação das outras estruturas celulares a pigmentação do núcleo pelo marcador específico indica atividade metabólica.

Na figura 22a é possível observar células em que todas as estruturas estão evidenciadas por fluorescência dos marcadores específicos. Outras células apresentam apenas o núcleo evidenciado, não indicando apoptose celular e sim indicação de atividade metabólica.

A figura 22b apresenta a mesma magnitude ($10\times$) das outras fotomicrografias (Figuras 22a e 22c), no entanto, os núcleos celulares apresentam maior volume em comparação às figuras 22a e 22c. O tamanho aumentado do núcleo indicando que a maior atividade metabólica, e que portanto, a maior atividade metabólica do grupo L1 foi observada no quarto dia de cc. Na mesma fotomicrografia é possível observar a deposição extracelular de proteínas adesivas no quadrante inferior esquerdo.

Na figura 22c é observada maior população celular em comparação à outras fotomicrografias do grupo e volume celular semelhante a figura 22a. Nesta imagem não foram evidenciadas a presença de membrana celular, prolongamentos celulares e proteínas adesivas.

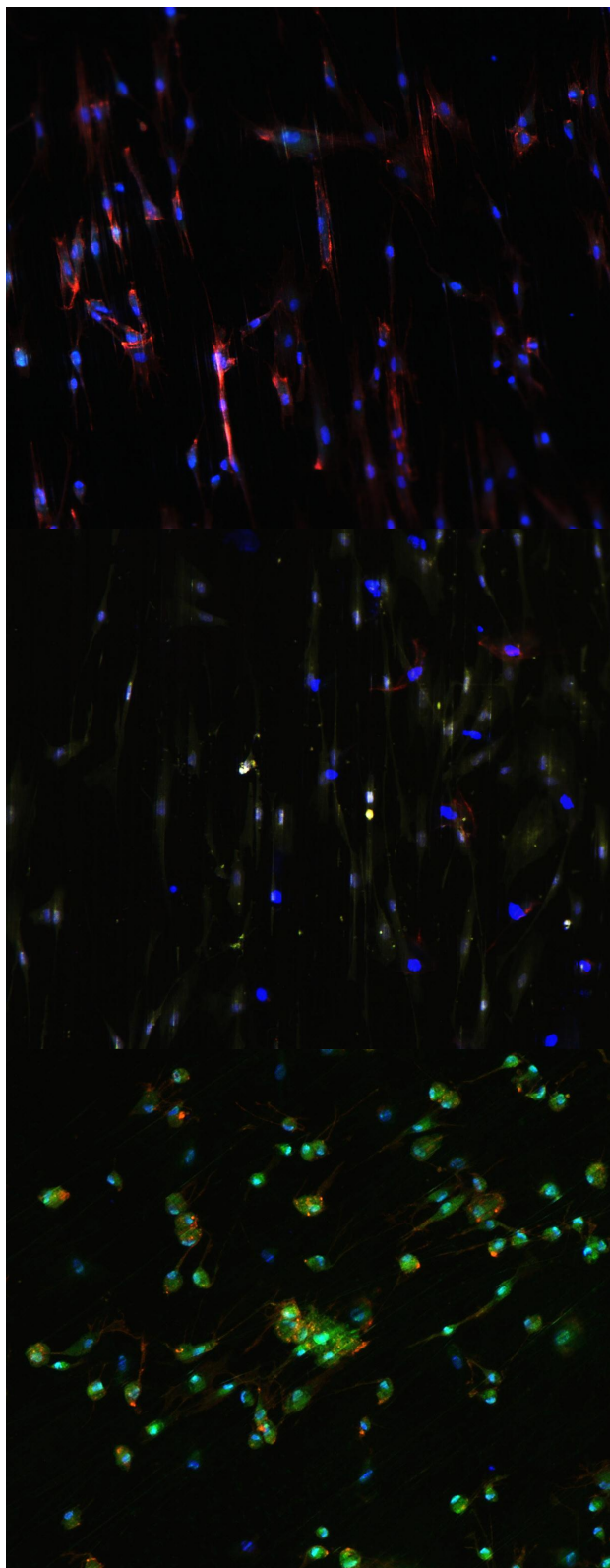


Figura 23 - Imagens de fluorescência referentes ao primeiro dia de cultura celular, magnitude $10\times$.
a) L2A; b) L2B; c) L2C.

Em comparação a figura 22, a figura 23 apresenta maior população celular em todos os dias de cc e por todo o substrato. Na figura 23a, além da maior população celular é observada maior secreção de proteínas adesivas e prolongamentos fibroblásticos evidentes. Diferente do que o observado na figura anterior, as figuras 23b e 23c as outras estruturas celulares foram evidenciadas.

Na figura 23a é observada uma população celular superior ao detectado nas outras fotomicrografias, o que corrobora com o que foi detectado por absorbância. As células na superfície do substrato apresentaram diferentes graus de maturação, sendo observados núcleos em diferentes estágios de desenvolvimento celular.

Na figura 23b são observados núcleos com volumes maiores e em processo de mitose indicando alta atividade metabólica e proliferação celular, indicando que para L2A a maior atividade metabólica foi observada no quarto dia de cc. o As células estão distribuídas por toda extensão da superfície do substrato e de forma aleatória.

Na figura 23c é possível observar células com grau de maturação mais definido além de interatividade celular. Os citoplasmas se encontram bem evidenciados e é possível observar os prolongamentos celulares.

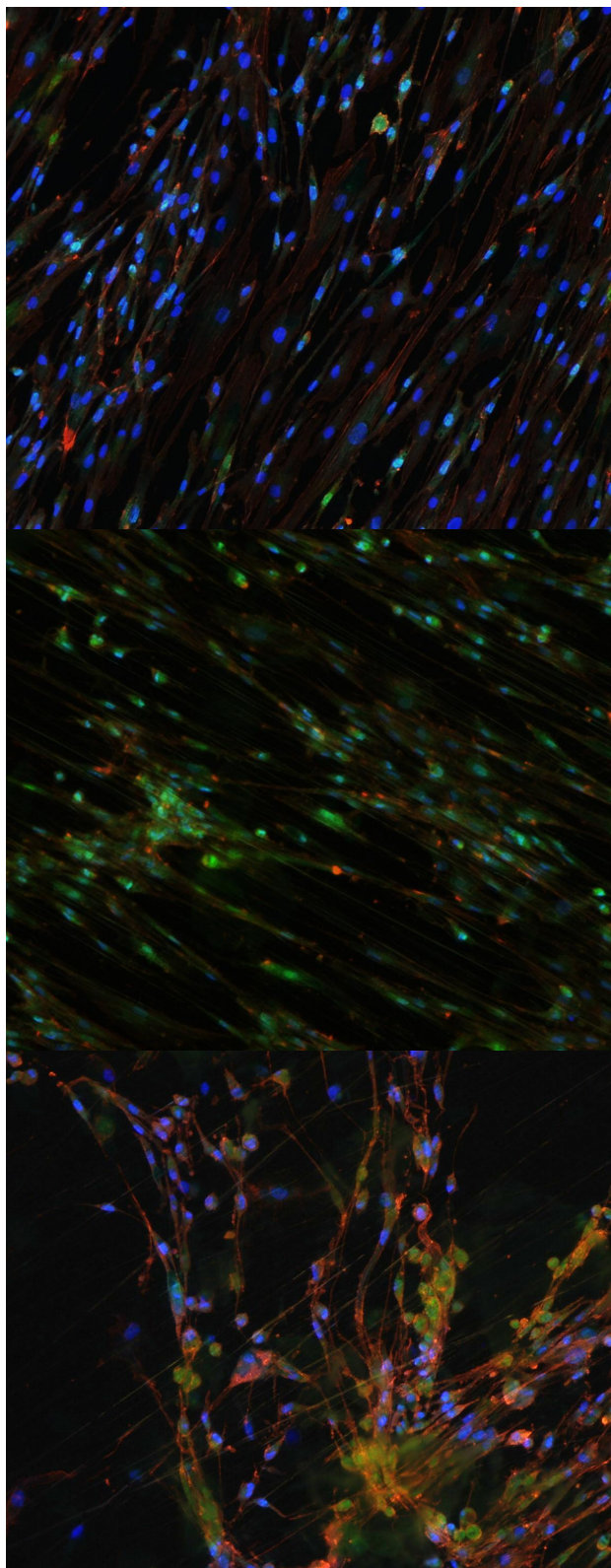


Figura 24 - Imagens de fluorescência referentes ao quarto dia de cultura celular, magnitude $10\times$.
a) L2A; b) L2B; c) L2C.

Na figura 24 é observada maior população celular em todos os dias de cc, o que corrobora com os achados de absorbância.

No primeiro dia de cc (Figura 24a) são evidenciados maior quantidade de núcleos e portanto maior população celular, assim como detectado por absorbância e núcleos com maior volume. Em toda extensão do substrato pode ser detectadas a secreção de proteínas adesivas.

Na figura 24b além dos núcleo celulares são fortemente evidenciados os citoplasmas, pode ser observada maior interação celular e o espraio dos fibroblastos sobre o substrato. As células encontram-se dispostas de maneira mais organizada do que até então observado.

Na figura 24c são evidenciadas todas as estruturas celulares. As células apresentam maior interatividade e estão distribuídas de forma aleatória indicando a presença de mais de uma camada celular. Nesta imagem é possível observar que as células se desenvolvem em direções múltiplas, diferente das demais em que as células se desenvolviam em direção aos sulcos provenientes do lixamento dos espécimes. As membranas citoplasmáticas bem como os prolongamentos celulares e proteínas são mais evidentes do que nas fotomicrografias até então analisadas.

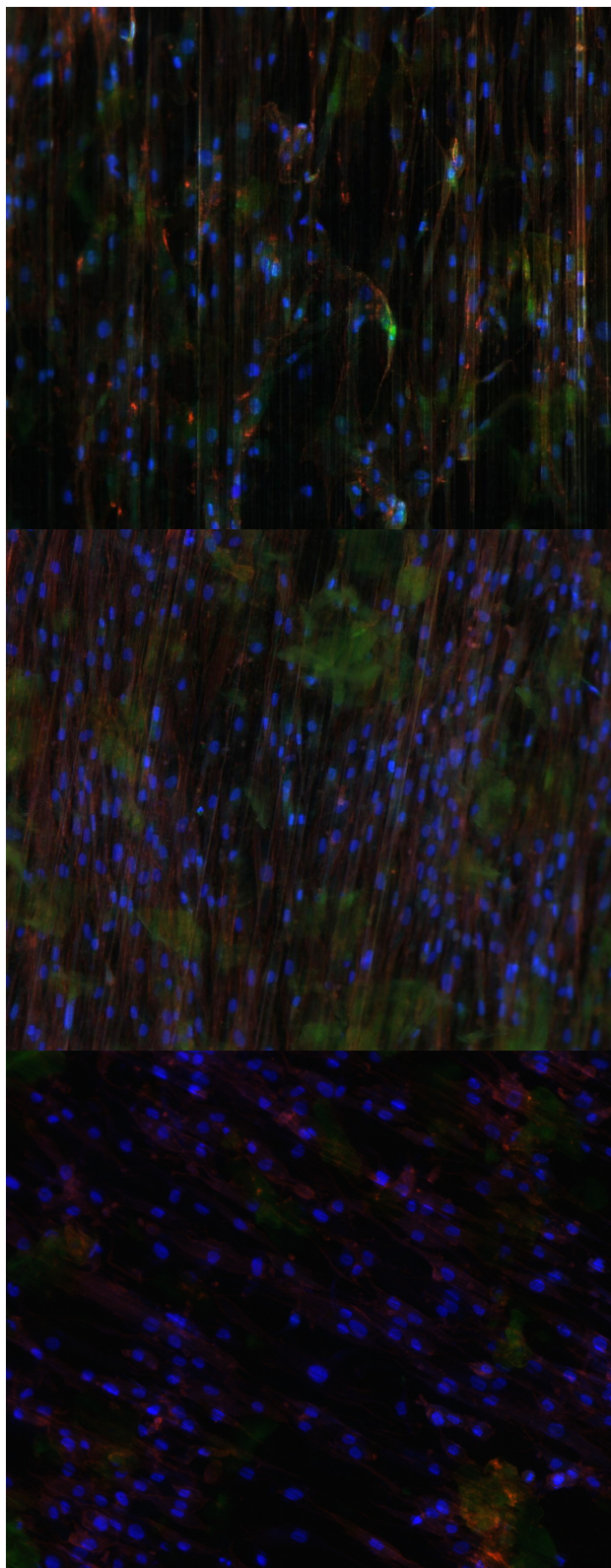


Figura 25 - Imagens de fluorescência referentes ao 7º dia de cultura celular, magnitude 10 ×. a) L2A; b) L2B; c) L2C.

Na figura 25 é observada grande quantidade populacional, maior do que nas demais fotomicrografias o que corrobora com o que foi detectado por absorbância.

Na figura 25a, como no grupo L2B, foi observada a secreção de proteínas adesivas por toda extensão do substrato no primeiro dia de cc. Em contraste com o teste de absorbância há menor quantidade de núcleos celulares no 1º dia do que no 4º dia de cc.

Na figura 25b é observada a distribuição celular por toda extensão do substrato não sendo observada múltiplas camadas celulares. Nesta imagem pode-se observar secreção de grande volume de proteínas adesivas na matriz extracelular.

Na figura 25c é possível observar núcleos com diferentes volumes indicando atividade metabólica e proliferação celular. É possível observar que as células se desenvolvem no sentido dos sulcos provenientes do lixamento dos espécimes.

Sendo analisadas as fotomicrografias dos grupos em estudo é possível observar que as populações celulares detectadas no sétimo dia de cc para os grupos experimentais foram superiores a população detectada em L1, em contraste com que foi detectado por absorbância, indicando que o aumento populacional foi proporcional ao aumento da concentração de Mo.

5.3.3 Organização Citoesquelética

Nas imagens a seguir podem ser observadas a organização citoesquelética nos diversos grupos. Na figura 26 foram selecionadas fotomicrografias representativas do que foi observado nos grupos em estudo.

A figura 26a é referente ao primeiro dia de cc, nesta imagem é evidente o direcionamento dos prolongamentos celulares em direção à superfície do substrato e a secreção das adesinas próximas a estas regiões. São células em alta atividade metabólica em processo de fixação ao substrato. A figura 26b é referente ao quarto dia de cc, é possível observar que: as células apresentam uma direção de crescimento definida; apresentam maior quantidade de células na superfície do substrato: e pode ser detectada maior secreção de proteínas.

Nas figuras 26c e 26d são observadas sobre o substrato as células típicas com alta atividade metabólica, pode-se observar todas as estruturas celulares: em vermelho, prolongamentos celulares e membrana celular; em verde, citoplasma; e em azul, núcleo.

Nas figuras 26e e 26f podem ser observadas células com alta atividade metabólica, as diferenças entre estas células se devem mais ao fato do marcador (verde) não ser evidente na figura 26f. Na figura 26e as células seguem crescimento unidirecional e em 26f o crescimento é unidirecional mas é possível observar poucas células em sentido diferente.

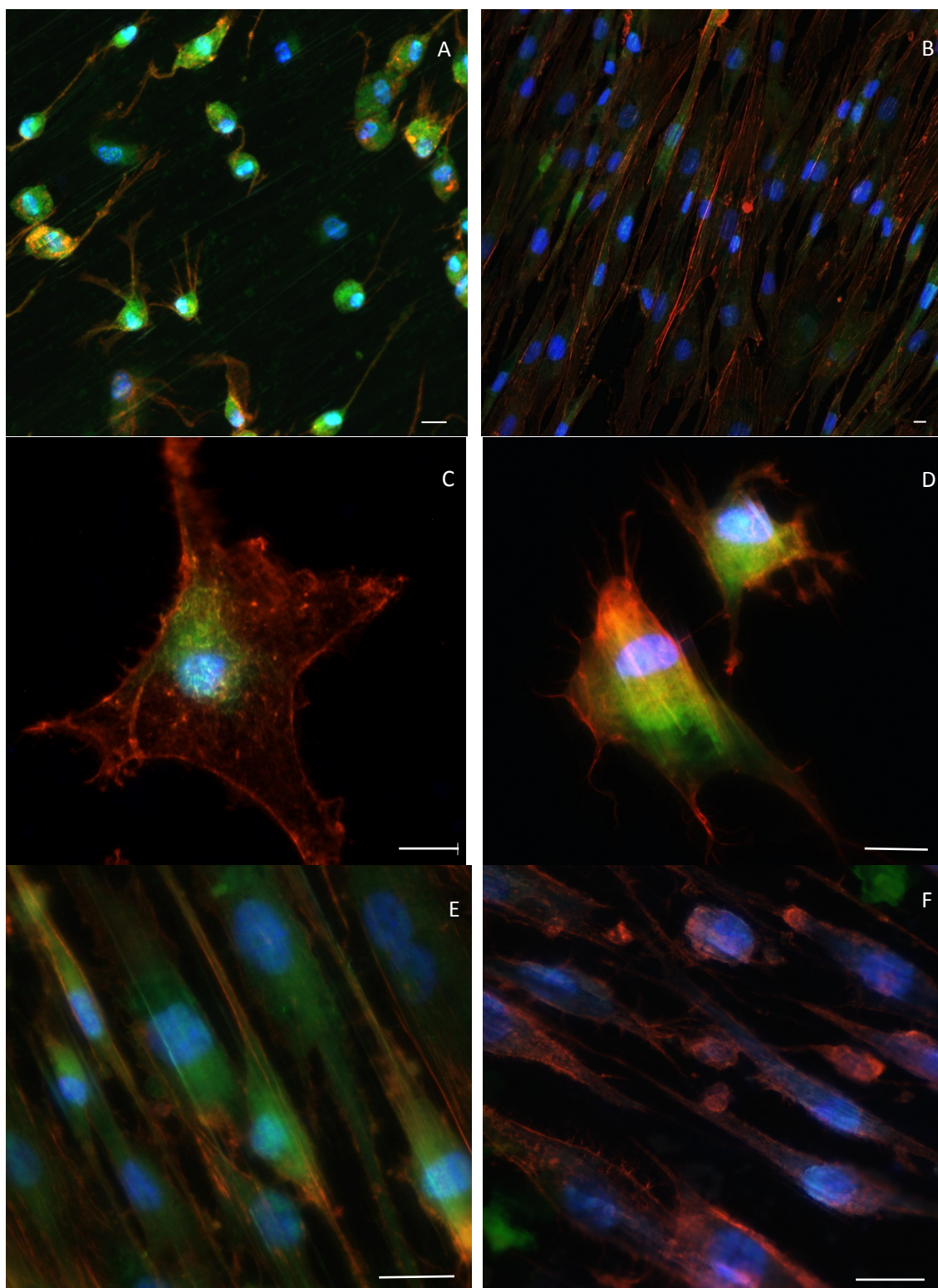


Figura 26 – Imagens de fluorescência representativas da morfologia celular nos diferentes dias e nos diferentes grupos em estudo. A) L2C, dia 1, 20 $\times$; B) L2B, dia 4, 10 $\times$; C) L2A, dia 1, 50 $\times$; D) L2A, dia 1, 50 $\times$; E) L2C, dia 7, 50 $\times$; F) L3C, dia 7, 50 $\times$. * As barras nas imagens correspondem a 20 μm .

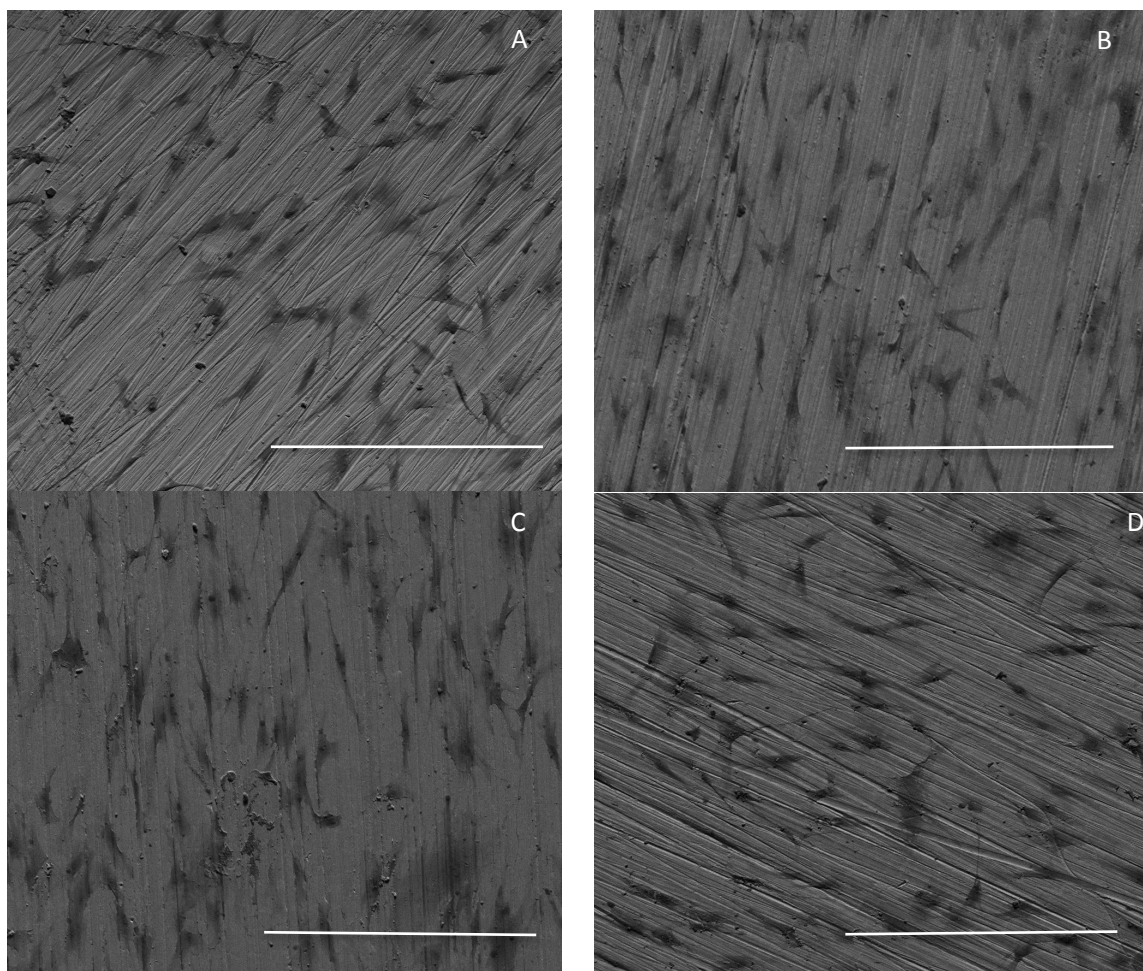
5.3.4 Morfologia Celular

As fotomicrografias a seguir foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura, nas imagens é possível observar a morfologia celular e interação celular.

Na figura 27 são observadas fotomicrografias dos grupos L1, L2A, L2B e L2C referentes ao primeiro dia de cultura celular, nestas as células apresentam atividade metabólica e não foram observadas células em apoptose. Fica evidente que a proliferação celular acompanha o direcionamento dos sulcos provenientes do processo de preparação dos espécimes.

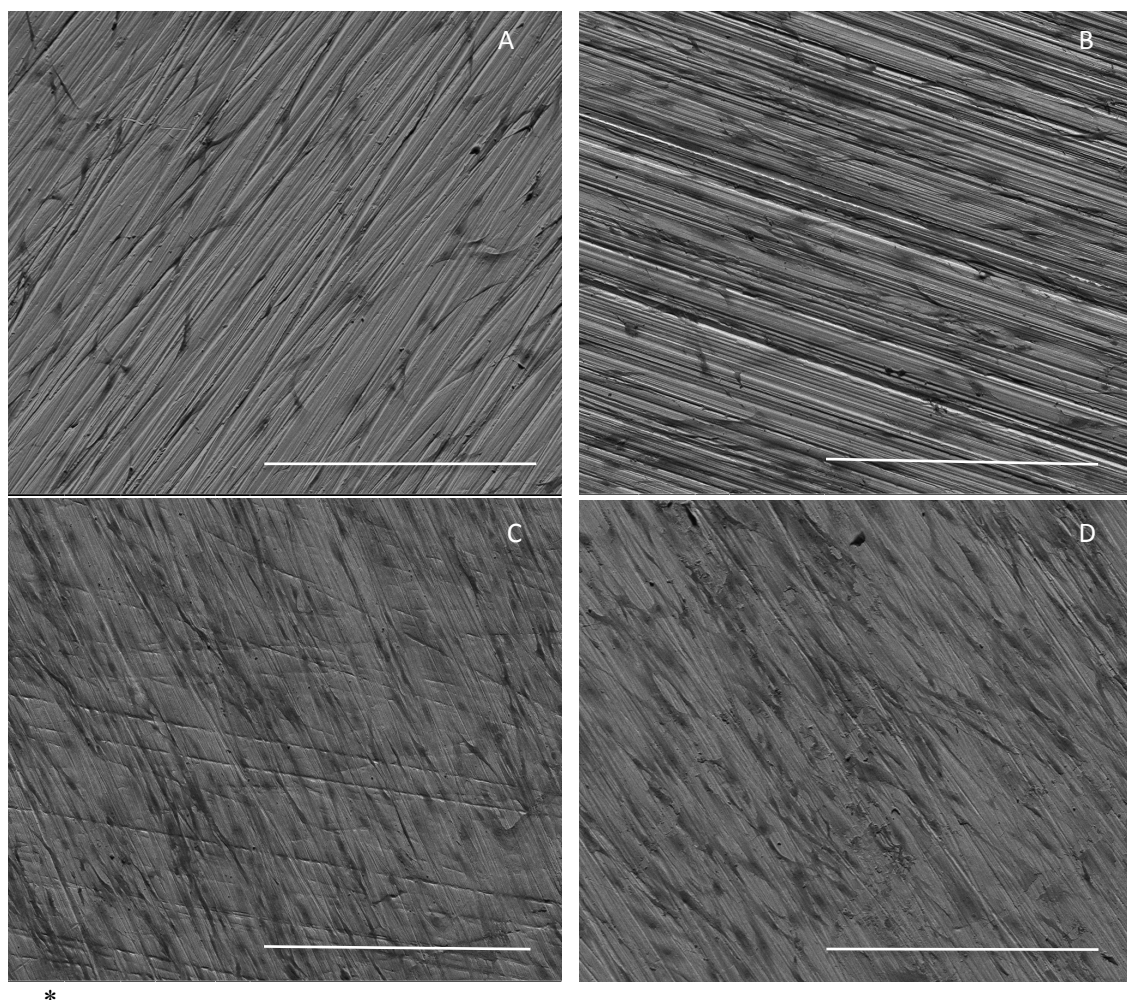
Na figura 28 são observadas as fotomicrografias dos grupos em estudo referentes ao quarto dia de cultura celular. Os grupos experimentais (L2A, L2B e L2C) apresentaram aumento populacional, com exceção de L1 que apresentou redução populacional e algumas imagens sugestivas de apoptose celular.

A figura 29 é referente ao sétimo dia de cultura celular, todos os grupos apresentaram acentuado crescimento celular indicando a presença de múltiplas camadas celulares na superfície do substrato.



*Barras correspondentes a 500 μm .

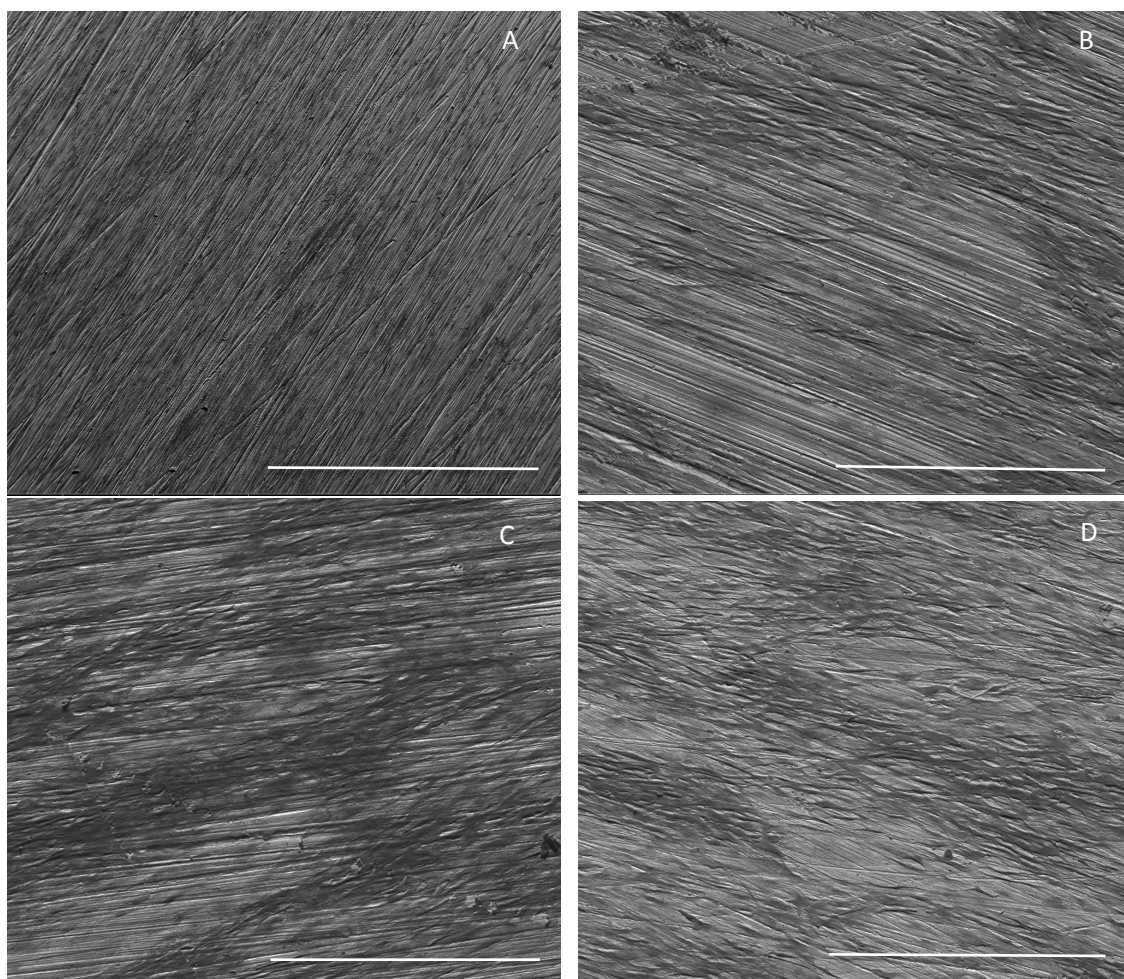
Figura 27 – Fotomicrografias do 1º dia de cultura de células HDF sobre os substratos, magnitude 300 $\times$. A) L1; B) L2A; C) L2B; D) L2C.



*

*Barras correspondentes a 500 μm

Figura 28 – Fotomicrografia do quarto dia de cultura de células HDF sobre os substratos, magnitude 300 $\times$. a) L1; b) L2A; c) L2B; d) L2C.



*Barras correspondentes a 500 μm

Figura 29 – Fotomicrografia do 7º dia de cultura de células HDF sobre os substratos, magnitude 300 $\times$.

A) L1; B) L2A; C) L2B; D) L2C.

6 DISCUSSÃO

Com o sucesso e popularização das reabilitações por implantes as ligas metálicas passaram a ser utilizadas em novos modelamentos nos quais a biomecânica é antagônica à biomecânica habitual. No presente estudo foram desenvolvidas ligas ternárias Co-Cr-Mo com diferentes percentuais em peso de Mo. A alteração do percentual de Mo foi benéfica em vários aspectos que serão pontuados a seguir.

6.1 Características Microestruturais

As ligas ternárias propostas (L2A, L2B e L2C) neste estudo apresentaram o Cobalto como elemento principal de liga por suas propriedades mecânicas como módulo elástico, resistência e dureza (Callister-Jr, 2002). Cromo foi utilizado como segundo elemento da liga por sua resistência ao manchamento e a corrosão (Anusavice, 2005). Foi acrescentado maior porcentagem em peso de molibdênio às ligas experimentais devido à diminuição do coeficiente de expansão térmica (Sakaguchi, Powers, 2012) e ao aumento da resistência a corrosão (Lee, 1985), além de aumentar a dureza, a resistência e a resistência à abrasão (Paffenbarger, 1943).

Com relação a caracterização microestrutural a hipótese alternativa (H_1) foi aceita, uma vez que, foram observadas diferenças significativas quanto a microestrutura das ligas experimentais (L2) em comparação a L1.

Na superfície dos espécimes L2 foram detectadas imagens semelhantes a poros, que foram confirmadas pelas análises em MEV (Figuras 13A, 13B, 13C, 13D e 13E). Alguns autores afirmam que estes poros são cavidades resultantes

da técnica de fundição utilizada para obtenção do material (Lewis, 1975, 1977; Lucchetti et al., 2015), mas a técnica utilizada para confecção dos espécimes deste estudo (fusão em atmosfera inerte, solubilização e forjamento à quente) não resultaria em porosidades no interior da liga, uma vez que, não haveria doadores de oxigênio para o sistema, assim os poros observados podem ser resultantes do processo de resfriamento dos espécimes após forjamento (Balagna et al., 2012; Giacchi et al., 2011). Defeitos semelhantes a estes foram encontrados por Santos (2012). Autores afirmam que estes defeitos influenciam negativamente a resistência e microdureza do material (Giacchi et al., 2011; Lewis, 1975; Lucchetti et al., 2015). Neste estudo não foi avaliada a resistência dos materiais experimentais, desta forma mais estudos são necessários para caracterização mecânica dos materiais.

Os difratogramas dos grupos em estudo (Figuras 10, 11 e 12) indicam a presença de duas fases distintas, cobalto solução sólida com estrutura cúbica de face centrada (CFC – γ Co) e estrutura hexagonal compacta (HCP – ϵ Co). Os picos das ligas L1, L2 e L3 forjada foram detectados em ângulos menores (2θ) comparado aos difratogramas L2 bruta de fusão e aos difratogramas teóricos do cobalto puro, segundo Santos (2012), o aumento da distância interplanar é consequência da inserção dos átomos de cromo e molibdênio na rede cristalina. Outra diferença observada foi a intensidade dos picos, em torno de 1700 u.a para L2 forjadas e em torno de 800 u.a para as L2 brutas de fusão, tal fato não foi comparado aos achados da literatura pois os difratogramas semelhantes não apresentavam os valores de intensidade ou apresentavam unidade de medida diferentes.

As duas fases detectadas nos difratogramas foram confirmadas pelas análises em MEV (Tabela 5) e quantificadas por EDS que determinou para L2 a presença aproximadamente de 60 % Co, 28 % Cr e 5 % Mo na fase CFC; e aproximadamente 50 % Co, 30 % Cr e 12 a 7 % Mo na fase HCP. Em L3, para

foram detectadas menores percentagens de Co e Cr (45% e 27%, respectivamente) e maior percentagem de Mo (18 %); em HCP foi detectado percentagem semelhante de Co e Mo (52 % e 9 %, respectivamente), percentagem inferior de Cr (23 %). Dados semelhantes não foram observados na literatura, por isso a comparação não foi possível.

A quantificação dos elementos químicos apontou a presença de Si (0,73% em peso) em L1 dentro do limite aceitável estabelecido pela American Society for Testing and Materials (1996), mesmo que utilizada como base para adição de Mo e confecção das ligas L2A, L2B e L2C a presença de Si não foi detectada nas ligas experimentais (Figura 14).

Os níveis de Mn detectados nas ligas L1 e L2 ocorreram inversamente proporcional a concentração de Mo, mas dentro dos limites estipulados pela American Society for Testing and Materials, 1996, (Figuras 14 e 15).

Os outros elementos apresentaram limites dentro do estabelecido pela norma e na proporção apresentada no delineamento do estudo (Tabelas 3 e 4; Figuras 14, 15, 16 e 17). Em L3 foram observados apenas os metais oferecidos ao sistema e não foi observado nenhum contaminante. Assim acredita-se que o Fe detectado nos espécimes L2 seja advindo de L1, e que este elemento não foi detectado em L1 devido à sua baixa concentração sendo esta variação atribuída ao erro conhecido do equipamento (0,05).

6.2 Características Físicas

A hipótese alternativa (H_2) foi rejeitada, pois a dureza Vickers para os grupos L1 ($456,25 \pm 24$) e L2 brutas de fusão (L2A – $472,05 \pm 66$; L2B – $516,05 \pm 64$; L2C – $489,45 \pm 72$) foi estatisticamente semelhante. A dureza detectada para L2 BF foi superior ao detectado por outros autores que

apresentaram em média 300 HV (Henriques et al., 2012; Santos, 2012) (Tabela 6).

A hipótese alternativa (H_3) foi rejeitada, pois a dureza detectada para os grupos L2 e L3 foi semelhante a L1.

O melhor desempenho foi observado para a L2B forjada ($665,30 \pm 29$), valores semelhantes dureza não foram anteriormente descritos pela literatura. No entanto, ao reproduzir esta liga a partir de metais puros (L3B - $450,00 \pm 74$) o mesmo valor de dureza não foi reproduzido.

Outro fator importante a ser avaliado é a resistência à corrosão. Sabe-se que as ligas de Co-Cr-Mo apresentam alta resistência à corrosão devido à presença do cromo que auxilia a formação de uma camada protetora na superfície da liga, a camada passivadora (Henriques et al., 2012; Martin et al., 2013; Qiu et al., 2011; Roberts et al., 2009), por esta razão há interesse médico e odontológico em sua utilização em implantes orais e ósseos e novos estudos estão sendo conduzidos a fim de se utilizar desta propriedade do material.

Neste estudo foi possível observar (Tabela 8; Figura 18) que a adição de molibdênio reduziu a intensidade de corrente de corrosão em todas as ligas experimentais e por consequência a resistência à corrosão detectada é superior as relatadas na literatura (Henriques et al., 2012; Qiu et al., 2011). No entanto, não foi observada uma correlação entre a proporção de Mo acrescido e a intensidade de corrente de corrosão, assim a hipótese H_5 foi rejeitada.

Os valores mais estáveis de OCP, que neste caso foi obtido por L2A, indica a formação de óxidos mais estáveis, caracterizando melhor formação do filme protetor na superfície do substrato.

Estes resultados são interessantes pois, quando uma liga de Co-Cr entra em contato com os fluido corporais o cobalto é completamente dissolvido, alterando a composição do filme protetor para óxidos de cromo contendo uma baixa quantidade de óxidos de molibdênio (Hanawa, 2004; Posada et al., 2014),

o que leva a acidificação local podendo resultar em infecção aguda e crônica (Rajamaki et al., 2013) um filme protetor mais estável reduz a dissolução do cobalto diminuindo acidificação local e seus efeitos.

Assim pode-se inferir que a adição de Mo contribui para a formação da camada passivadora mais estável na superfície das ligas de Co-Cr e que na concentração de 6% a liga de Co-Cr-Mo apresentou a menor densidade de corrente de corrosão e portanto, maior resistência à corrosão.

6.3 Citotoxicidade Celular

As propriedades mecânicas são extremamente importantes para a adequada indicação de um biomaterial para que ele apresente o desempenho esperado. Mas a indicação de um biomaterial é dependente de sua biocompatibilidade ao organismo.

A adição de molibdênio às ligas metálicas tem se tornado uma estratégia de interesse médico-odontológico para reabilitações. Inicialmente as vantagens almejadas estavam relacionadas as propriedades mecânicas dos materiais. A limitação da concentração de Mo nos materiais de aplicação biomédica era necessária pois especulava-se o efeito citotóxico deste elemento em grandes concentrações (Rae, 1981).

Os estudos conduzidos para avaliar a citotoxicidade dos íons de molibdênio que contraindicam a utilização deste metal em geral avaliaram partículas metálicas, metais puro em pó e íons (Coogan et al., 1989; Dalal et al., 2012; Messer et al., 1999; Messer, Lucas, 2000). Neste estudo foi possível observar que a adição de Mo levou a resultados interessantes de biocompatibilidade celular. A adesão e a proliferação celular no dia 1 foi maior para as ligas experimentais do que para L1, sendo aproximadamente duas vezes

maior para L2B e quase três vezes maior para L2C. A hipótese nula H6 foi aceita, e foi possível observar que a adição de Mo em L2 resultou em melhores resultados do que em L1.

A viabilidade celular apresentada por L1 foi próxima ao limite do índice de citotoxicidade ($IC_{50\%}$), em contraste ao IC observado por Santos (2012). Sugere-se que mais estudos sejam realizados, uma vez que, L1 é uma liga comercialmente certificada pela American Society for Testing and Materials (1996).

Nos dias 4 e 7 as ligas experimentais apresentaram redução da população celular no entanto, atingindo valores até seis vezes maior que $IC_{50\%}$.

Os fibroblastos dérmicos na pele proliferam rapidamente e formam uma rede de células alinhadas com morfologia alongada liberando proteínas e fatores de crescimento formando uma densa matriz dérmica (Biggs et al., 2010; Smith et al., 2011). Quando utilizados *in vivo* estas células se desenvolvem em camadas com formações aglomeradas (*clusters*). Estudos tem apontado que o quarto dia de cultura celular é ótimo para as células expressarem o marcador proteico (Bechara et al., 2011; Capellato et al., 2012; Marionnet et al., 2006; Smith et al., 2011), o que corrobora com os achados deste estudo em que no quarto dia de cultura celular todos os grupos apresentaram população celular superior ao primeiro dia.

A morfologia alongada dos fibroblastos demonstra afinidade da célula pelo substrato que leva ao aumento da proliferação celular na superfície do substrato, ativando outros sítios adesivos resultando em maior funcionalidade das células fibroblásticas. Desta forma a hipótese H7 foi aceita.

As análises de organização citoesquelética e morfologia celular demonstram que além do maior crescimento populacional observado nas ligas experimentais (L2), também foi observado seu crescimento em camadas e

aglomerados (*cluster*), formando uma rede celular complexa. O mesmo não foi observado em L1.

De acordo com as propriedades avaliadas neste estudo sugere-se que mais estudos sejam realizados a fim de avaliar a utilização das ligas experimentais para aplicação biomédica.

As pesquisas tem os procedimentos laboratoriais mais controlados e por isso resultam em menor quantidade de defeitos (Giacchi et al., 2011). Os procedimentos envolvidos na confecção de próteses metálicas em laboratórios de prótese comerciais podem resultar em um biomaterial diferente ao biomaterial desenvolvido, com maior quantidade de porosidades internas, mais frágil, com propriedades mecânicas e biológicas não programadas e grande quantidade de óxidos superficiais.

Desta forma sugere-se que mais estudos sejam realizados a fim de avaliar os processos de confecção de próteses metálicas por laboratórios técnicos comerciais; e, que as vantagens das técnicas de confecção de próteses que utilizam o material como desenvolvido, por exemplo usinagem, sejam mais estimuladas, uma vez que, apresentam maior confiabilidade quanto a manutenção das propriedades do material.

7 CONCLUSÃO

Com as limitações deste estudo foi possível concluir que:

- a) As características microestruturais das ligas experimentais (L2 e L3) foram superiores a L1;
- b) A elevação da concentração de molibdênio influenciou positivamente a resistência à corrosão em liga de Co-Cr-Mo;
- c) A elevação da concentração de molibdênio em liga de Co-Cr foi comprovadamente não citotóxica sendo promissora para aplicação biomédica e odontológica.

8 REFERÊNCIAS*

Al Jabbari YS, Koutsoukis T, Barmpagadaki X, Zinelis S. Metallurgical and interfacial characterization of PFM Co-Cr dental alloys fabricated via casting, milling or selective laser melting. *Dent Mater.* 2014;30(4):e79-88. doi:10.1016/j.dental.2014.01.008

American Society for Testing and Materials [internet]. Standard specification for cobalt-28 chromium-6 molybdenum alloy castings and casting alloy for surgical implants: UNS R30075. Conshohocken; c1996 [acesso em 28 nov 2015]. Disponível em <http://www.astm.org/cgi-bin/resolver.cgi?F75-12>

Anusavice K. Phillips science of dental materials 11. ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2005.

Balagna C, Spriano S, Faga MG. Characterization of Co-Cr-Mo alloys after a thermal treatment for high wear resistance. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2012;32(7):1868-77. doi:10.1016/j.msec.2012.05.003

Bechara S, Wadman L, Popat KC. Electroconductive polymeric nanowire templates facilitates in vitro C17.2 neural stem cell line adhesion, proliferation and differentiation. *Acta Biomater.* 2011;7(7):2892-901. doi:10.1016/j.actbio.2011.04.009

Biggs MJ, Richards RG, Dalby MJ. Nanotopographical modification: a regulator of cellular function through focal adhesions. *Nanomedicine.* 2010;6(5):619-33. doi:10.1016/j.nano.2010.01.009

Boyce BF, Byars J, McWilliams S, Mocan MZ, Elder HY, Boyle IT, et al. Histological and Electron-Microprobe Studies of Mineralization in Aluminum-Related Osteomalacia. *J Clin Pathol.* 1992;45(6):502-8.

Callister-Jr W. Ciência e engenharia de materiais: uma introdução. 5. ed. São Paulo: LTC; 2002.

*Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jan 2016]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Capellato P, Smith BS, Popat KC, Claro AP. Fibroblast functionality on novel Ti-30Ta nanotube array. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2012;32(7):2060-7. doi:10.1016/j.msec.2012.05.013

Coogan TP, Latta DM, Snow ET, Costa M. Toxicity and carcinogenicity of nickel compounds. *Crit Rev Toxicol*. 1989;19(4):341-84.

Dalal A, Pawar V, McAllister K, Weaver C, Hallab NJ. Orthopedic implant cobalt-alloy particles produce greater toxicity and inflammatory cytokines than titanium alloy and zirconium alloy-based particles in vitro, in human osteoblasts, fibroblasts, and macrophages. *J Biomed Mater Res A*. 2012;100(8):2147-58. doi:10.1002/jbm.a.34122

Darlenski R, Kazandjieva J, Pramatarov K. The many faces of nickel allergy. *Int J Dermatol*. 2012;51(5):523-30. doi: 10.1111/j.1365-4632.2011.05233.x

Domingo JL. Vanadium and tungsten derivatives as antidiabetic agents - A review of their toxic effects. *Biol Trace Elem Res*. 2002;88(2):97-112.

Evans EJ, Thomas IT. The in vitro toxicity of cobalt-chrome-molybdenum alloy and its constituent metals. *Biomaterials*. 1986;7(1):25-9.

Faria AC, Rodrigues RC, Claro AP, da Gloria Chiarello de Mattos M, Ribeiro RF. Wear resistance of experimental titanium alloys for dental applications. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2011;4(8):1873-9. doi:10.1016/j.jmbbm.2011.06.004

Galo R, Ribeiro RF, Rodrigues RC, Rocha LA, Mattos Mda, G. Effects of chemical composition on the corrosion of dental alloys. *Braz Dent J*. 2012;23(2):141-8.

Giacchi JV, Morando CN, Fornaro O, Palacio HA. Microstructural characterization of as-cast biocompatible Co-Cr-Mo alloys. *Mater Charact*. 2011;62(1):53-61. doi:10.1016/j.matchar.2010.10.011

Hanawa T. Metal ion release from metal implants. *Mat Sci Eng C-Bio S*. 2004;24(6-8):745-52. Metal ion release from metal implants. doi:10.1016/j.msec.2004.08.018

Henriques B, Soares D, Silva FS. Microstructure, hardness, corrosion resistance and porcelain shear bond strength comparison between cast and hot pressed CoCrMo alloy for metal-ceramic dental restorations. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2012;12:83-92. doi: 10.1016/j.jmbbm.2012.03.015.

Internacional Organization for Standardization. ISO 6871-1: dental base metal casting alloys. Genebra: International Organization for Standardization; 1994.

Internacional Organization for Standardization. ISO 22674: metallic materials for fixed and removable restorations and appliances. Genebra: International Organization for Standardization; 2006.

Johansson BI, Lucas LC, Lemons JE. Corrosion of copper, nickel, and gold dental casting alloys: an in vitro and in vivo study. *J Biomed Mater Res.* 1989;23(A3 Suppl):349-61.

Julian LC, Munoz AI. Influence of microstructure of HC CoCrMo biomedical alloys on the corrosion and wear behaviour in simulated body fluids. *Tribol Int.* 2011;44(3):318-29. doi:10.1016/j.triboint.2010.10.033

Kliemann C, Oliveira W. Manual de prótese parcial removível. São Paulo: Santos; 1999.

Kovacik MW, Mostardi RA, Neal DR, Bear TF, Askew MJ, Bender ET, et al. Differences in the surface composition of seemingly similar F75 cobalt-chromium micron-sized particulates can affect synovial fibroblast viability. *Colloids and Surf B Biointerfaces.* 2008;65(2):269-75. doi:10.1016/j.colsurfb.2008.04.018.

Lee J, Lucas L, O'Neal J, Lacefield W, Lemons J. In vitro corrosion analyses of nickel-base alloys. *J Dent Res* 1985;63(DMG 1285):1–21.

Lewis AJ. Microporosity in casting alloys. *Aust Dent J.* 1975;20(3):161-6.

Lewis AJ. Porosity in the base metal removable partial denture casting alloys relative to observable metallographic features. *J Biomed Mater Res.* 1977;11(3):447-58.

Lucchetti MC, Fratto G, Valeriani F, De Vittori E, Giampaoli S, Papetti P, et al. Cobalt-chromium alloys in dentistry: an evaluation of metal ion release. *J Prosthet Dent.* 2015;114(4):602-8. doi: 10.1016/j.prosdent.2015.03.002

Marionnet C, Pierrard C, Vioux-Chagnoleau C, Sok J, Asselineau D, Bernerd F. Interactions between fibroblasts and keratinocytes in morphogenesis of dermal epidermal junction in a model of reconstructed skin. *J Invest Dermatol.* 2006;126(5):971-9.

Martin EJ, Pourzal R, Mathew MT, Shull KR. Dominant role of molybdenum in the electrochemical deposition of biological macromolecules on metallic surfaces. *Langmuir*. 2013;29(15):4813-22. doi:10.1021/la304046q.

Matkovic T, Matkovic P, Malina J. Effects of Ni and Mo on the microstructure and some other properties of Co-Cr dental alloys. *J Alloy Compd*. 2004;366(1-2):293-7. doi:10.1016/j.jallcom.2003.07.004

Messer RL, Bishop S, Lucas LC. Effects of metallic ion toxicity on human gingival fibroblasts morphology. *Biomaterials*. 1999;20(18):1647-57.

Messer RL, Lucas LC. Cytotoxicity of nickel-chromium alloys: bulk alloys compared to multiple ion salt solutions. *Dent Mater*. 2000;16(3):207-12.

Montero-Ocampo C, Lopez H, Talavera M. Effect of alloy preheating on the mechanical properties of as-cast Co-Cr-Mo-C alloys. *Metall Mater Trans A*. 1999;30(3):611-20.

Mostardi RA, Kovacik MW, Ramsier RD, Bender ET, Finefrock JM, Bear TF, et al. A comparison of the effects of prosthetic and commercially pure metals on retrieved human fibroblasts: The role of surface elemental composition. *Acta Biomater*. 2010;6(2):702-7. doi:10.1016/j.actbio.2009.07.006

Mostardi RA, Pentello A, Kovacik MW, Askew MJ. Prosthetic metals have a variable necrotic threshold in human fibroblasts: An in vitro study. *J Biomed Mater Res*. 2002;59(4):605-10.

Niinomi M, Nakai M, Hieda J. Development of new metallic alloys for biomedical applications. *Acta Biomater*. 2012;8(11):3888-903. doi:10.1016/j.actbio.2012.06.037

Opris CD, Liu R, Yao MX, Wu XJ. Development of Stellite alloy composites with sintering/HIPing technique for wear-resistant applications. *Mater Design*. 2007;28(2):581-91. doi:10.1016/j.matdes.2005.08.004

Paffenbarger GC, Caul HJ, Dickson G. Base metal alloys for oral restorations. *J Am Dent Assoc* 1943;30: 852-62. doi:10.14219/jada.archive.1943.0177

Patel B, Inam F, Reece M, Edirisinghe M, Bonfield W, Huang J, et al. A novel route for processing cobalt-chromium-molybdenum orthopaedic alloys. *J R Soc Interface*. 2010;7(52):1641-5. doi: 10.1098/rsif.2010.0036

Posada OM, Gilmour D, Tate RJ, Grant MH. CoCr wear particles generated from CoCr alloy metal-on-metal hip replacements, and cobalt ions stimulate apoptosis and expression of general toxicology-related genes in monocyte-like U937 cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014;281(1):125-35. doi: 10.1016/j.taap.2014.09.010.

Qiu J, Yu WQ, Zhang FQ, Smales RJ, Zhang YL, Lu CH. Corrosion behaviour and surface analysis of a Co-Cr and two Ni-Cr dental alloys before and after simulated porcelain firing. *Eur J Oral Sci.* 2011;119(1):93-101. doi: 10.1111/j.1600-0722.2011.00791.x

Rae T. The toxicity of metals used in orthopaedic prostheses. An experimental study using cultured human synovial fibroblasts. *J Bone Joint Surg Br.* 1981;63-B(3):435-40.

Rajamaki K, Nordstrom T, Nurmi K, Akerman KE, Kovanen PT, Oorni K, et al. Extracellular Acidosis Is a Novel Danger Signal Alerting Innate Immunity via the NLRP3 Inflammasome. *J Biol Chem.* 2013;288(19):13410-9. doi:10.1074/jbc.M112.426254

Rideout S, Manly WD, Kamen EL, Lement BS, Beck PA. Intermediate Phases in Ternary Alloy Systems of Transition Elements. *Trans AIME.* 1951;191: 872-6.

Roach M. Base metal alloys used for dental restorations and implants. *Dent Clin North Am.* 2007;51(3):603-27, vi.

Roberts HW, Berzins DW, Moore BK, Charlton DG. Metal-ceramic alloys in dentistry: a review. *J Prosthodont.* 2009;18(2):188-94. doi: 10.1111/j.1532-849X.2008.00377.x

Sakaguchi RL, Powers JM. *Craig's restorative dental materials.* 13. ed. Philadelphia (PA): Elsevier Mosby; 2012. doi:10.1016/B978-0-323-08108-5.10010-6

Santos LA. *Processamento e Caracterização da liga 66Co-28Cr-6Mo (%peso) para implantes.* [dissertação]. Lorena(SP): Universidade de São Paulo-USP; 2012.

Smith BS, Yoriya S, Johnson T, Popat KC. Dermal fibroblast and epidermal keratinocyte functionality on titania nanotube arrays. *Acta Biomater.* 2011;7(6):2686-96. doi: 10.1016/j.actbio.2011.03.014

Song H, Yin W, Ma Q. Allergic palmoplantar pustulosis caused by cobalt in cast dental crowns: a case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011;111(6):e8-10. doi: 10.1016/j.tripleo.2010.12.013

Souza JC, Barbosa SL, Ariza E, Celis J-P, Rocha LA. Simultaneous degradation by corrosion and wear of titanium in artificial saliva containing fluorides. *Wear.* 2012;292:82-8. doi:10.1016/j.wear.2012.05.030

Varano R, Bobyn JD, Medley JB, Yue S. Effect of microstructure on the dry sliding friction behavior of CoCrMo alloys used in metal-on-metal hip implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2006;76(2):281-6.

Vieira AC, Rocha LA, Papageorgiou N, Mischler S. Mechanical and electrochemical deterioration mechanisms in the tribocorrosion of Al alloys in NaCl and in NaNO₃ solutions. *Corros Sci.* 2012;54:26-35. doi:10.1016/j.corsci.2011.08.041

Wylie CM, Shelton RM, Fleming GJ, Davenport AJ. Corrosion of nickel-based dental casting alloys. *Dent Mater.* 2007;23(6):714-23.