UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

ADRIANA CLÁUDIA LAPRIA FARIA

**Estudo da biocompatibilidade de ligas metálicas odontológicas e do Ti cp obtidos por
fundição**

RIBEIRÃO PRETO

2005

ADRIANA CLÁUDIA LAPRIA FARIA

Estudo da biocompatibilidade de ligas metálicas odontológicas e do Ti cp obtidos por fundição

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Reabilitação Oral

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Faria Ribeiro

Ribeirão Preto

2005

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Faria, Adriana Cláudia Lapria

Estudo da biocompatibilidade de ligas metálicas odontológicas e do Ti cp obtidos por fundição. Ribeirão Preto, 2005.
96 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto / USP – Depto. de Materiais Dentários e Prótese – Área de Concentração: Reabilitação Oral.

Orientador: Ribeiro, Ricardo Faria

1. Ligas de metais básicos; 2. Titânio; 3. Biocompatibilidade.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Adriana Cláudia Lapria Faria

Estudo da biocompatibilidade de ligas metálicas odontológicas e do Ti cp obtidos por fundição

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção
do grau de Mestre.
Área de Concentração: Reabilitação Oral

Aprovado em: ____ / ____ / 2005

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

A Deus

*A quem entreguei a minha vida, na
confiança de que serei conduzida pelos
caminhos que levam a sua vontade.*

*Tu conheces o meu sentar e o meu levantar,
de longe penetras o meu pensamento.
(Salmos 138, 2)*

Dedico

Aos meus pais João Batista e Deolinda Aparecida, que não mediram esforços para a realização dos meus sonhos.

Palavras são insuficientes para expressar tamanho amor compartilhado em anos de uma caminhada de luta, em que limites foram superados e dores ocultadas, para que eu enxergasse a beleza da caminhada da vida e desse meus primeiros passos.

Aos meus avôs Cyro (in memorian), Elpídio (in memorian), Estephânia (in memorian) e Ondina, pelo incentivo recebido desde a infância. Foram os elogios recebidos diante de cada etapa cumprida que impulsionaram minha chegada até aqui.

Aos meus irmãos André Eduardo, Ana Maria e Alexandre Vinícius, por todos os momentos compartilhados desde a infância. Vocês são fundamentais para o meu aprendizado, pois com nossos acertos e erros, crescemos juntos e vencemos. Portanto, esta vitória é nossa.

Ao Gustavo Henrique, por ser amigo, companheiro e sempre me incentivar a lutar pelos meus ideais.

Homenagem

*Ao Prof. Dr. Ricardo Faria Ribeiro,
pela confiança depositada ao aceitar me
orientar. Pelos conhecimentos e
experiências compartilhados, pela
presença tranqüila nos momentos de
dificuldades.*

*Ao Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa,
por ter me conduzido em meus primeiros
passos na pesquisa. Sua presença foi
fundamental para que eu escolhesse este
caminho. Neste período de convivência, o
aprendizado foi além da ciência,
despertando em mim admiração pela
profissional e pelo ser humano que
conheci.*

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, representada por sua diretora, Prof. Dra. Marisa Semprini, pela acolhida durante o curso de graduação e pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Edgar Graner da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade de Campinas.

Ao Prof. Dr. Augusto César Spadaro, representando funcionários e professores da disciplina de Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Ao Prof. Dr. Osvaldo de Freitas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

À Prof. Dra. Rossana Pereira de Almeida Antunes, por contribuir para o desenvolvimento do trabalho e pelo carinho.

À Prof. Dra. Maria da Glória Chiarello de Mattos e Prof. Dra. Valéria Oliveira Pagnano de Souza, da disciplina de Prótese Parcial Removível da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo convívio e ensinamentos transmitidos.

À Ana Paula Macedo e Renata Cristina Silveira Rodrigues, pela prestatividade durante a realização deste trabalho, sendo além de profissionais, grandes amigas.

Às amigas Ana Luiza de Carvalho Felippini e Ana Carolina Bernardes Azevedo, pela convivência e cumplicidade desde a graduação.

À Elaine Risques Faria, pela disponibilidade e amizade,

Aos amigos e colegas do curso de Pós-Graduação.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral.

A Júnia Ramos, Roger Rodrigo Fernandes e colegas do Laboratório de Cultura de Células.

A Regiane de Cássia Tirado Damasceno e Ana Paula Xavier, secretárias do Departamento de Materiais Dentários e Prótese, Aparecida Dulce de Oliveira Negreti e Tatiana Angeli Passos Fernandes, secretárias do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia.

A Isabel Cristina Galino Sola e Regiane Cristina Mói Sacilotto, secretárias da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP.

Ao Ricardo de Souza Antunes e Edson Volta.

Ao Luis Sérgio Soares, Lício Firmino Júnior, Marcelo Aparecido Vieira, José de Godoi Filho e Fernando Schiavetto.

A Fapesp, Cnpq e Capes.

A todos, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

FARIA, A. C. L. **Estudo da biocompatibilidade de ligas metálicas odontológicas e do Ti cp obtidos por fundição.** 2005.96 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

Há uma grande quantidade de ligas odontológicas no mercado e é difícil para os dentistas escolher qual utilizar. Além disso, não há pesquisas que tenham investigado a influência dos métodos de fundição e da variação de temperatura na biocompatibilidade destes materiais. Então, o objetivo deste estudo foi comparar a biocompatibilidade das ligas odontológicas de metais básicas e do titânio e avaliar se o método de fundição e a mudança de temperatura influenciavam esta biocompatibilidade. A biocompatibilidade e a influência dos métodos de fundição foram avaliadas através de testes de contato direto e a influência da temperatura por testes em extratos. Para os testes de contato direto, discos de Ni-Cr, Ni-Cr-Be, Co-Cr-Mo, Co-Cr-Mo-W e Ni-Cr-Ti foram fundidos por dois métodos: plasma, sob atmosfera de argônio com injeção da liga no molde por vácuo-pressão; e chama de gás oxigênio, com injeção da liga no molde por centrifugação. Ti-6Al-4V e Ti cp foram fundidos por plasma. Os discos foram polidos, limpados e autoclavados. Células SCC9 foram cultivadas em meio de cultura D-MEM/HF12 suplementado sobre os discos; poços sem discos foram usados como controle negativo e fenol como controle positivo. Após período de 48 horas e 18 dias, o número de células e a viabilidade celular foram avaliados. Nos testes em extratos, discos limpos e autoclavados de Ni-Cr, Co-Cr-Mo, Ni-Cr-Ti, Ti-6Al-4V e Ti cp fundidos por plasma foram imersos em saliva artificial previamente filtrada para obtenção dos extratos e divididos em dois grupos: um foi submetido a 1700 ciclos térmicos, durante um período de 24 dias; e o outro foi mantido em 37°C durante o mesmo período. Depois deste período, os discos foram separados da saliva. Células foram cultivadas em placas de 24 poços até atingirem subconfluência. Então a saliva foi colocada na cultura de células durante 6 horas, e após este período, o número de células e a viabilidade celular foram avaliados. Os resultados foram submetidos a teste estatístico apropriado. Os resultados dos testes de contato direto mostraram que Ti cp e Ti-6Al-4V foram os mais biocompatíveis, seguidos pela liga de Ni-Cr, que teve bons resultados em ambos os métodos de fundição. Os piores resultados para os materiais fundidos por chama de gás oxigênio foram da liga à base de Ni-Cr-Be. Não houve diferenças significativas entre os métodos de fundição. Na avaliação dos testes em extratos, os ciclos térmicos foram significativos somente para a liga Ni-Cr-Ti. Não houve diferenças significativas entre os extratos submetidos aos ciclos térmicos, mas entre os extratos mantidos em 37°C, a liga à base de Ni-Cr e o Ti cp mostraram os piores resultados. Os resultados sugerem que Ti cp e Ti-6Al-4V foram biocompatíveis e Ni-Cr-Be foi citotóxica. O método de fundição não foi significativo para a biocompatibilidade e a variação de temperatura é significativa para a liga à base de Ni-Cr-Ti.

Palavras-chave: ligas de metais básicos, titânio, biocompatibilidade.

ABSTRACT

FARIA, A. C. L. **Study of biocompatibility of dental alloys and Ti cp obtained by casting.** 2005. 96 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

There is a large number of dental alloys in the market and it is difficult for the dentists to choose which to use. Besides, there are not researches that has investigated the influence of casting methods and the variation of temperature in the biocompatibility of these materials. Then, the aim of this study was to compare the biocompatibility of base-metal alloys and titanium and to evaluate if the casting method and change of temperature influenced this biocompatibility. The biocompatibility and the influence of casting methods were analyzed by direct contact and the influence of temperature by tests on extracts. For direct contact tests, disks of Ni-Cr, Ni-Cr-Be, Co-Cr-Mo, Co-Cr-Mo-W, Ni-Cr-Ti were casted by two methods: plasma, under argon atmosphere, injected by vacuum-pressure; and oxygen gas flame, injected by centrifugation. Ti-6Al-4V and Ti cp were casted by plasma. After casting, the disks were polished, cleaned and autoclaved. SCC9 cells were cultured in culture media D-MEM/HF12 supplemented, on the disks; empty wells were used as a negative control and phenol as a positive control. After a period of 48 hours and 18 days, the number of cell and its viability were evaluated. In the tests on extracts, clean and autoclaved disks of Ni-Cr, Co-Cr-Mo, Ni-Cr-Ti, Ti-6Al-4V alloys and Ti cp casted by plasma were immersed in filtered artificial saliva for extraction and divided in two groups: one was subjected to 1700 thermal cycles, during a period of 24 days; and the other was maintained in 37° C during the same period. After this period, the disks were separated from saliva. Cells were cultured until the subconfluence. Then the saliva was put in the cell culture for 6 hours, and after this period, the number of cell and cell viability was evaluated. The results were submitted to the appropriate statistical analysis tests. The results of the direct contact tests showed that Ti cp and Ti-6Al-4V were the most biocompatible, followed by Ni-Cr alloy, which had good results in both casting methods. The worst results for oxygen gas flame were of Ni-Cr-Be. There was no significant differences between casting methods. In the evaluation of tests on the extracts, the thermal cycles were significant only for Ni-Cr-Ti alloy. There were no significant differences among the extracts subjected to thermal cycles, but in the extracts maintained in 37°C, the Ni-Cr and Ti cp showed the worst results. The results suggest that the Ti cp and Ti-6Al-4V were biocompatible and the Ni-Cr-Be was cytotoxic. The casting method was not significant for biocompatibility and the variation of temperature was significant for Ni-Cr-Ti alloy.

Key-words: base-metal alloys, titanium, biocompatibility.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
3. PROPOSIÇÃO	46
4. MATERIAIS E MÉTODOS	48
Obtenção dos corpos-de-prova	49
Cultura de células.....	52
Biocompatibilidade das ligas e efeito do método de fundição	55
Efeito dos ciclos térmicos sobre a citotoxicidade	56
5. RESULTADOS	60
Biocompatibilidade das ligas e efeito do método de fundição	61
Efeito dos ciclos térmicos sobre a citotoxicidade	66
6. DISCUSSÃO	72
7. CONCLUSÃO	81
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
APÊNDICE	92

1. INTRODUÇÃO

Escolher um material para uma reabilitação protética tem se tornado uma tarefa cada vez mais difícil, já que há grande quantidade de ligas metálicas para uso em prótese disponíveis no mercado, tentando alcançar o ideal do material perfeito, o que acaba gerando nos profissionais certo receio quanto à escolha da liga metálica para cada tipo de trabalho (GEIS-GERSTORFER, 1994). A escolha do material deve ser feita pelo paciente e pelo profissional, após realizar um balanço risco-benefício; e, embora haja atualmente enorme demanda por restaurações estéticas, as ligas continuam sendo usadas pela combinação de suas propriedades (WATAHA, 2000; WATAHA & MESSER, 2004).

Em 2002, Lygre relatou haver mais de 800 ligas disponíveis na Alemanha; e segundo este autor, as ligas odontológicas podem conter mais de 30 diferentes metais, essenciais ou não para o corpo humano, com potencial de induzir reações tóxicas a partir de determinadas concentrações. As ligas odontológicas contêm, geralmente, pelo menos quatro metais e freqüentemente apresentam seis ou mais na tentativa de melhorar as propriedades da liga, já que os metais puros não têm propriedades físicas e biológicas suficientes para utilização na boca. No entanto, a complexidade e a diversidade destas ligas dificultam o entendimento de sua biocompatibilidade (WATAHA, 2000).

A escolha para utilização de uma liga em Odontologia deve obedecer a três fatores: economia, propriedades físicas e propriedades biológicas. No entanto, é freqüente a escolha das ligas ser baseada no custo e na cor, apesar destes serem os mais pobres indicadores (WATAHA & MESSER, 2004).

A flutuação do preço de metais nobres, como o ouro e posteriormente o paládio, levou à busca de ligas alternativas não nobres. No entanto, é primordial que a liga tenha boas propriedades químicas, físicas e biológicas (WATAHA, 2002).

As ligas podem ser denominadas biomateriais, já que são aplicadas em contato com epitélio oral por longos períodos, isto é, muitos anos no caso das próteses, para reposição de tecidos orais perdidos. Daí a necessidade de que provoquem poucas reações biológicas (WATAHA & LOCKWOOD, 1998; WATAHA, 2000; LYGRE, 2002).

Biocompatibilidade é definida como “um estado de mútua coexistência entre um material e o ambiente fisiológico, sem que um exerça efeito desfavorável sobre o outro” (BOSS et al., 1995).

O meio oral é propício a biodegradação, pelo processo de destruição e dissolução em saliva, além da destruição físico-química, desgaste e erosão, causados por alimentos, mastigação e atividade bacteriana (LYGRE, 2002). Além disso, a variação de temperatura e pH, e a constante liberação de ácidos, decorrente da decomposição dos alimentos, favorecem o processo de degradação de materiais no ambiente bucal.

Em 2002, Wataha ressaltou a influência do tamanho dos grãos e da microestrutura nas propriedades físicas e na corrosão das ligas. A velocidade de resfriamento da liga durante a fundição interfere no modo de cristalização e conseqüente microestrutura do material. A microestrutura afeta a corrosão, que está relacionada com a biocompatibilidade. Desta forma, o método de fundição pode interferir de forma indireta nas propriedades biológicas das ligas metálicas, mas não há relatos na literatura que evidenciem esta relação.

Antes da ampla utilização dos materiais para uso clínico, é importante que sejam realizados testes biológicos que investiguem a segurança destes materiais em contato com tecidos do corpo (STANFORD, 1986). Há relatos na literatura da utilização de cultura de células para avaliação de materiais odontológicos desde a década de 50. No entanto, foi a partir da década de 80 que surgiram organizações que estabeleceram parâmetros e normatizaram estes testes (HANKS, WATAHA & SUN, 1996).

O objetivo destes testes é simular as reações biológicas aos materiais quando eles são colocados em contato com os tecidos do corpo, com a vantagem de menor custo e tempo do que a realização de testes *in vivo*. No entanto, é importante ressaltar as diferenças e limitações destes testes *in vitro* para as reações biológicas *in vivo* (HANKS, WATAHA & SUN, 1996).

Avaliações das propriedades biológicas dos materiais vêm sendo realizadas através de culturas de osteoblastos, macrófagos, fibroblastos e outros tipos celulares (WANG & LI, 1998; WATAHA, LOCKWOOD & NELSON, 1999; SJÖGREN, SLETTEN & DAHL, 2000; HORNEZ et al, 2002; WATANABE et al, 2004). No entanto, há poucos relatos na literatura sobre o efeito de ligas metálicas odontológicas sobre células epiteliais da mucosa bucal, que estariam em contato direto com estes materiais. Além disso, pouco se sabe sobre a influência do método de fundição nas propriedades biológicas destas ligas e do efeito da variação de temperatura do meio bucal no padrão de degradação destes materiais e na sua biocompatibilidade. Desta forma, o objetivo deste trabalho será avaliar a influência da composição, do método de fundição e da variação de temperatura na biocompatibilidade das ligas metálicas, utilizando cultura de células.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Apesar da tendência atual da odontologia para restaurações metal-free, consequência de uma maior preocupação com estética e a uma melhora nas características das cerâmicas nos dias atuais, reabilitações que utilizam ligas metálicas ainda são preferidas em determinadas situações clínicas, principalmente em reabilitações de dentes posteriores e próteses parciais fixas, pois apresentam melhores propriedades, maior longevidade, menor necessidade de desgaste de estrutura dental e menor risco de fratura. Segundo Wataha & Messer (2004), nenhum outro material combina resistência, resistência ao desgaste e compatibilidade biológica, requisitos necessários a um material para permanecer na boca por longos períodos, como as ligas metálicas.

Ligas metálicas são materiais formados pela combinação de dois ou mais metais, ou metais e não-metais, que são unidos na tentativa de alcançar resistência, propriedades físicas, propriedades biológicas e resistência à corrosão, melhores que os metais puros, possibilitando utilização adequada em ambiente bucal para aplicações protéticas.

Até 1975, as ligas metálicas eram divididas de acordo com sua aplicação, ou seja, ligas para reabilitações metálicas totais, reabilitações metalocerâmicas ou estruturas metálicas de próteses parciais removíveis, sendo que as propriedades físicas eram ideais para cada aplicação e a maioria das ligas era à base de ouro. No entanto, a facilidade de fundição em altas temperaturas, a flutuação do preço do ouro e uma maior preocupação com a biocompatibilidade das ligas levou a uma mudança no critério de classificação das ligas, hoje baseada em dois critérios separados: composição e propriedades físicas. Segundo a composição, as ligas podem ser classificadas, segundo a classificação da *American Dental Association* (ADA), em altamente nobres, nobres ou de metais básicos, sendo que as primeiras devem possuir pelo menos 40% de ouro e 60% de elementos nobres na composição;

nas nobres, o mínimo é de 25% de metais nobres; e as de metais básicos, menos de 25% (WATAHA, 2002).

Em 1993, Craig estabeleceu que, independente da composição dos vários sistemas de ligas, alguns requisitos devem ser respeitados, tais como: não provocar intoxicações ou reações alérgicas nos pacientes e operadores, propriedades químicas que promovam resistência à corrosão e a mudanças físicas na cavidade bucal, propriedades físicas e mecânicas satisfatórias e composição de materiais abundantes, relativamente baratos e disponíveis.

As ligas de metais básicos podem ser divididas ainda em subclasses: ligas à base de níquel-cromo e ligas à base de cobalto-cromo. O titânio e suas ligas, devido à biocompatibilidade, não se enquadram entre as ligas de metais básicos e são classificados separadamente (ANUSAVICE, 2005).

As ligas de níquel-cromo são utilizadas em restaurações metálicas totais, restaurações metalocerâmicas e estruturas de próteses parciais removíveis. Elas apresentam mais de 60% de níquel e são sempre de múltipla fase. Com relação ao cromo, este pode estar presente em mais de 20% ou menos de 20% de sua composição; quando é menos de 20% da composição, ele pode ou não apresentar 1 ou 2% de berílio, adicionado às ligas para reduzir a temperatura líquida de fundição, tornando este processo mais fácil. No entanto, o berílio aumenta a corrosão destas ligas, daí as controvérsias com relação à sua utilização nas ligas de níquel-cromo, sendo as ligas com berílio mais comuns nos Estados Unidos, enquanto as sem berílio são utilizadas na Europa e no Japão (WATAHA et al., 1998).

Em 1998, Bezzon et al. relataram, após pesquisar ligas de níquel-cromo com diferentes quantidades de berílio e compará-las a uma liga sem berílio, que a adição de berílio às ligas de

níquel-cromo melhorava a fusibilidade das ligas e aumentava a resistência à união metalocerâmica.

No entanto, a presença do berílio foi questionada ao se avaliar as propriedades fundamentais para uso clínico de ligas de níquel-cromo, comparando ligas livres de berílio, com nióbio e/ou molibdênio e com berílio. Por este estudo, foi concluído que a presença do berílio não era necessária para garantir as propriedades fundamentais para uso clínico destas ligas (BEZZON et al., 2001).

A presença do berílio nas ligas de níquel-cromo aumenta a corrosão, liberando não somente o berílio, mas também o níquel. O berílio remove a resistência à corrosão em fendas na presença de íons cloreto (WHITTERS et al., 1999). Além disso, as ligas de níquel-cromo podem variar em composição pela adição ou não de pequena quantidade de carbono, sendo que este é geralmente adicionado quando se usa esta liga para fundir estruturas metálicas de próteses parciais removíveis, já que ele aumenta a dureza e resistência à tensão da estrutura.

As ligas de cobalto-cromo contêm pelo menos 60% de cobalto em sua composição e são sempre de múltipla-fase. O conteúdo de cromo é geralmente menos de 30% e o carbono é freqüentemente adicionado para reforçar a liga. Apesar de poderem ser utilizadas em restaurações metálicas totais, restaurações metalocerâmicas e estruturas metálicas de próteses parciais removíveis, seu uso mais comum está nas próteses parciais removíveis, principalmente na Europa e no Japão. Nos Estados Unidos, elas são utilizadas como uma liga alternativa às ligas de níquel-cromo, para casos em que os pacientes são alérgicos ao níquel (WATAHA et al., 1998).

As ligas de cobalto-cromo têm as mais altas temperaturas de fusão, seguindo o titânio, daí a dificuldade em fundição, acabamento e polimento destes materiais. Apesar de ser usada como substituto das ligas de níquel-cromo em casos de alergia, é importante lembrar que o

cobalto é o segundo metal alergênico mais comum e a substituição só deve ser feita após averiguação de alergia ao cobalto (WATAHA & MESSER, 2004).

Segundo Mareci et al. (2005) o conteúdo de cromo e molibdênio em uma liga é significativo para aumentar a resistência à corrosão da liga, por melhorar a passivação superficial.

As ligas de titânio foram propostas para restaurações totais, restaurações metalocerâmicas e estruturas metálicas de próteses parciais removíveis, mas seu uso ainda não é comum pela necessidade de destreza dos laboratórios para o processo de fundição, além de máquinas de fundição e revestimentos especiais (WATAHA, 2002).

As ligas não-nobres, exceto os sistemas à base de titânio, apresentam como principais constituintes o níquel, o cobalto e o cromo, sendo os elementos minoritários o silício, que melhora a fusibilidade e a ductilidade das ligas de níquel, o berílio que melhora a fusibilidade e determina a formação de óxidos que favorecem a união metalocerâmica; e manganês, molibdênio, tungstênio e irídio, que aumentam a resistência à corrosão. São características destas ligas propriedades mecânicas superiores, maior módulo de elasticidade e dureza, e maior adesão à cerâmica quando comparadas às ligas nobres; no entanto, elas apresentam várias características negativas, tais como alta corrosão em meio ácido, dificuldade de acabamento e polimento, camadas de óxidos finas e escuras, risco de alergia e dificuldade de soldagem. Apresentando as mais altas temperaturas líquidas de fundição dentre as ligas odontológicas, estas ligas são mais difíceis de fundir e, conseqüentemente, fica mais difícil assegurar adaptação marginal (KELLY & ROSE, 1983; CRAIG, 1993; WATAHA et al., 1998).

Como elemento de liga, o cromo tem como função aumentar a resistência à corrosão, à oxidação e ao manchamento, ou seja, aumentar a estabilidade superficial devido à formação

de óxido de cromo (Cr_2O_3) (HARCOURT, RIDDIOUGH & OSBORNE, 1970; CRAIG, 1993; HORATH, 1995).

A incorporação de titânio às ligas de níquel-cromo participa da fase γ' , conferindo a elas resistência mecânica e resistência à fluência em altas temperaturas, além de melhorar resistência à tração, limite de proporcionalidade e dureza superficial (MORRIS et al., 1992; CRAIG, 1993).

As ligas à base de titânio apresentam grande variação nas propriedades mecânicas, dependendo da composição da liga (WATAHA et al., 1998). Entretanto, estas ligas são mais difíceis de soldar, por serem propensas a formar óxidos de superfície e a alterar a estrutura de fase, durante o aquecimento no processo de soldagem (WATAHA & MESSER, 2004).

Segundo Weber (1983), as ligas à base de ouro foram substituídas pelas ligas de níquel-cromo, na Alemanha, por razões econômicas. Apesar das falhas ocorridas no início da utilização, o autor atribui as falhas à utilização de máquinas, materiais e técnicas específicas para as ligas de ouro; à composição e propriedades das ligas de níquel-cromo que não são uniformes; e à falta de padrões e especificações na época. No entanto, isso não era suficiente para que ela não fosse uma alternativa para as ligas de ouro. Então ele sugeriu a realização de mais testes e alertou para a variação na composição destas ligas, levando a diferenças na microestrutura, propriedades físicas, e comportamento eletroquímico.

A biocompatibilidade favorável, boa resistência à corrosão e propriedades físicas vantajosas são características determinantes para o aumento do uso do titânio na odontologia, mas a alta temperatura de fusão continua sendo um desafio (LYGRE, 2002).

O uso do titânio foi encorajado entre os dentistas da Noruega, através de pesquisas realizadas em 1995. Os profissionais demonstraram satisfação com o novo material, em relação ao seu preço (comparado às ligas nobres), biocompatibilidade e leveza, mas a estética

e as dificuldades técnicas foram um obstáculo. A adaptação marginal foi considerada tão boa quanto à das ligas convencionais. No entanto, os profissionais declararam que o titânio não substituiria as ligas convencionais, sendo somente uma alternativa a estas (WHITTERS et al., 1999).

Mori et al. (1997) apud Whitters et al. (1999) apresentam uma taxa de 40% de rejeição para as fundições de próteses removíveis em titânio, pois a maior exigência técnica aumenta os riscos de falhas. Na tentativa de resolver estes problemas, Chan et al. (1999) apud Whitters et al. (1999) sugeriram uso de duplo espru nos padrões de coroas, para reduzir rugosidade e porosidade, através do mais rápido e eficiente preenchimento do molde durante a centrifugação.

Além disso, entre as características do titânio estão: baixa condutividade e difusibilidade térmica (que interferem na velocidade de resfriamento deste metal, sendo mais rápido do que o níquel). Estas características do titânio resultarão em limitações práticas, como a necessidade de fornos próximos à área de trabalho, para minimizar a perda de calor e necessidade de reaquecimento, porque o rápido resfriamento limita o tempo de trabalho. Outras características ainda, como a presença de fendas na superfície, pobreza de qualidade na superfície final e baixo escoamento do material, acarretam severas distorções dimensionais (SEAGLE, YU & GIANGIORDANO, 1999).

Outra dificuldade no processo de fundição do titânio é consequência da sua reatividade com a atmosfera e o revestimento, levando à formação de uma camada denominada α -case, com diferentes propriedades mecânicas. Segundo o estudo realizado por Ferenczi et al. (1998), esta camada se forma pela reação do titânio com o hidrogênio, que fragiliza materiais metálicos fundidos.

Ohkubo et al. (2000) estudaram o Ti cp e Ti-6Al-4V com relação à usinabilidade (facilidade de remoção de materiais), diante da presença da camada α -case e nos casos em que esta era removida. A avaliação da usinabilidade foi feita através da microdureza, avaliação da perda de massa dos corpos-de-prova e da morfologia das brocas utilizadas e dos lingotes formados, após realização de acabamento com pontas abrasivas de carbeto de silício (SiC) e brocas de fissura. Conclui-se que a presença da camada α -case foi significativa para os casos em que o acabamento foi feito com brocas de fissura, sendo mais fácil o acabamento sem a camada; no entanto, o acabamento com pontas abrasivas de SiC demonstrou ser mais efetivo na remoção de metais e não foi influenciado pela camada α -case.

O efeito da atmosfera de fundição na qualidade das peças foi investigado por Traini et al. (2003), que comparam a atmosfera de argônio e a de ar na aderência do revestimento à superfície e na microestrutura de uma liga de ouro-prata-paládio, fundida em máquina a vácuo-pressão. Os autores concluíram que o argônio reduzia a aderência do revestimento à superfície do metal, facilitando o acabamento e diminuindo a probabilidade de danificar as margens das peças, além de aumentar os grãos formados na microestrutura, que facilitarão o polimento.

Para a fundição de ligas de cobalto-cromo, é necessário utilizar equipamentos de alta temperatura para sua fundição. Nestes casos, fusão com chama de oxigênio-acetileno e fontes elétricas como arcos de carbono, arcos de argônio e indução elétrica são usados com vantagem. Nos procedimentos de fundição, tanto com chama carburante de oxi-acetileno como com arco de carbono, há a possibilidade de adição de carbono à liga, interferindo nas propriedades de resistência e diminuindo a ductilidade (O'BRIEN & RYGE, 1981).

Segundo Osborne & Lammie, em 1953, o carbono é um elemento crítico dentre os constituintes da liga, pois pequenas variações no seu conteúdo influenciam resistência, dureza

e ductilidade da liga. Assim, o conteúdo de carbono altera as propriedades mecânicas e a estrutura microscópica das ligas; daí a importância em se controlar o conteúdo de carbono da liga durante a fundição. O excesso de carbono pode levar à fragilidade severa (STRANDMAN, 1976; ANUSAVICE, 2005).

Na fundição com o uso de chamas, fica difícil prevenir o superaquecimento da liga, daí a necessidade de grande experiência do operador para o correto controle da chama, permitindo assim a obtenção de fundições satisfatórias. O superaquecimento da liga durante a fundição leva a uma estrutura granular grosseira e propriedades mecânicas impróprias, enquanto é desejável uma estrutura granular fina para se conseguir boas propriedades mecânicas, tanto à temperatura ambiente como também na temperatura da boca (EARNSHAW, 1956).

Leinfelder & Lemmons (1988) observaram que a fundição por indução, além de evitar a contaminação, gasta menos tempo durante o processo de fundição e o controle é mais exato da temperatura de fusão, do que na fundição por chama de oxigênio-acetileno.

Em 1960, Jones recomendava o uso de chamas neutras, na fundição por chamas de oxigênio-acetileno, para prevenir a oxidação da liga durante o processo de fundição. No entanto, as chamas neutras seriam obtidas da totalidade da queima do acetileno, o que é difícil; assim há uma tendência de que a fundição seja realizada sob chama levemente oxidante, podendo resultar em oxidação do cromo, diminuindo a resistência à corrosão e aumentando a fragilidade da liga.

Um estudo realizado por Carter & Kidd (1965) avaliou a influência da temperatura do molde e da liga no momento da fundição, sobre a microestrutura e propriedades mecânicas das ligas de cobalto-cromo. Concluiu-se por este estudo que, ao diminuir a temperatura da liga, obtêm-se grãos finos e maior resistência à tração, assim como na diminuição da temperatura

do molde. Assim, o controle da temperatura de fundição resultou em grandes benefícios em termos de aspereza superficial e propriedades de resistência, assim como as baixas temperaturas dos moldes poderiam ser vantajosas para a melhoria das qualidades de superfície e resistência nas fundições destas ligas.

Harcourt & Cotterill (1965) compararam a fundição por indução e por chama e concluíram que a fundição por indução não era superior à feita por chama, a não ser que fosse utilizada atmosfera inerte controlada, por exemplo, de argônio. No entanto, os autores ressaltaram que a fundição por indução é um procedimento mais seguro, recomendado para uso laboratorial quando altas temperaturas fossem necessárias.

Em 1977, Lewis pesquisou o padrão de porosidades das estruturas fundidas, de acordo com a técnica de fusão da liga; e concluiu que a fundição por indução resultou em padrão grosseiro, provavelmente proveniente de um superaquecimento da menor parte do metal junto com o aumento da quantidade de gases atmosféricos e os melhores resultados foram encontrados na fundição por chama de oxigênio-acetileno.

Segundo Anusavice, em 2005, a maioria das ligas de metais básicos requer máquinas de fundição especiais, como as por indução eletromagnética ou por arco voltaico, embora chama de oxigênio-acetileno seja comumente utilizada. No entanto, o último método requer alguns procedimentos para diminuir os riscos de oxidação excessiva ou interação do molde de revestimento com as ligas fundidas.

Um trabalho realizado por Ahmed & Rack (1998) demonstra a importância da velocidade de resfriamento da liga Ti-6Al-4V na sua microestrutura.

Diante do aumento do preço das ligas preciosas e das dificuldades econômicas, Al-Hiyasat & Darmani (2005) decidiram avaliar se a refundição de ligas para aproveitá-las influenciaria o padrão de liberação de íons e a citotoxicidade de ligas metálicas à base de

níquel-cromo, níquel-cromo-cobre, cobalto-cromo e cobre, comparando amostras fundidas com 100% de liga nova, 50% liga nova/50% refundida e 100% refundida em cultura de fibroblastos. Os resultados mostraram que as ligas que apresentavam cobre em sua composição apresentavam piores resultados, e que, as ligas à base de níquel-cromo eram melhores do que as de cobalto-cromo. Além disso, a refundição aumentou significativamente a citotoxicidade das ligas e a liga de cobalto-cromo foi mais afetada pela refundição do que as de níquel-cromo.

São várias as propriedades importantes para utilização de uma liga, como: o tamanho dos grãos formados durante o esfriamento da liga; a estrutura de fase; a resistência ao escoamento, dureza e módulo de elasticidade; a cor; a corrosão e propriedades de combinação à porcelana.

Quando considerada a estética, a reação de corrosão pode produzir compostos químicos que resultam em manchas na superfície do metal e até manchamento de tecidos que margeiam esta prótese (GEIS-GERSTORFER, 1994). O manchamento é, freqüentemente, precursor do processo de corrosão (ANUSAVICE, 2005).

Em 1986, Brune avaliou a corrosão de ligas utilizadas na confecção de aparelhos ortodônticos em saliva e solução salina, detectando que a liberação de metais na saliva era de cinco a sete vezes maior do que na solução salina.

Muitas ligas já foram estudadas quanto à sua capacidade de corrosão, como as ligas com alto teor de ouro (que possuem boa resistência à corrosão quando comparadas a outras ligas), as ligas de amálgama, níquel-cromo e cobalto-cromo. Apesar de materiais não-preciosos apresentarem propriedades mecânicas interessantes, a susceptibilidade à corrosão e os efeitos biológicos dos produtos da corrosão representam grande desvantagem para estes materiais (KEDICI et al., 1998).

A resistência à corrosão de ligas de paládio-cobalto, paládio-prata, paládio-cobre, cobalto-cromo e níquel-cromo fundidas por diferentes métodos foi estudada por Mulders, Darwish & Holze (1996). Os autores concluíram que o método de fundição foi significativo somente para a resistência à corrosão das ligas de paládio-prata.

A corrosão de um metal ou liga metálica pode ser descrita como sendo um processo químico ou eletroquímico de ataque por agentes naturais (ar e água, por exemplo), pelos quais elementos na liga ionizam, resultando em dissolução, deterioração ou enfraquecimento parcial ou completo, refletindo na resistência, estética e biocompatibilidade das ligas (BRÄNEMARK et al., 1977; ADELL et al., 1981; GEIS-GERSTORFER, 1994; ANUSAVICE, 2005; WATAHA, 2000; WATAHA, 2002).

Estes materiais estão sujeitos a biodegradação no meio oral, já que há dissolução e destruição pela saliva, destruição físico-química, desgaste e erosão, causados por alimentação, mastigação e atividade bacteriana, sendo a corrosão a principal causadora desta biodegradação (SYRJÄNEN et al., 1985; LYGRE, 2002). Mjor & Christensen (1993) apud Lygre (2002) ressaltam que não existe metal inerte e que todos os metais podem ser atacados pelo meio em que se encontram. Além disso, a variedade de fatores físicos e químicos do meio em que a liga se encontra, tais como os produtos de corrosão, pode acelerar, retardar ou não influenciar a corrosão (ANUSAVICE, 2005). O meio bucal é propício à formação de produtos de corrosão, pois a boca é úmida e continuamente está sujeita a oscilações de temperatura. Os alimentos e líquidos ingeridos têm ampla variação de pH, e ácidos são liberados durante sua decomposição. Os fragmentos alimentares freqüentemente ficam aderidos tenazmente a restaurações metálicas, estabelecendo, então, uma condição localizada extremamente favorável a uma reação acelerada entre os produtos de corrosão e o metal ou liga (GEIS-GERSTORFER, 1994; ANUSAVICE, 2005).

Sabendo da influência dos ácidos provenientes da placa bacteriana e de alimentos na liberação de elementos das ligas de metais básicos, Wataha et al. (1998) estudaram o efeito do pH na liberação de elementos das ligas altamente nobres, nobres e de metais básicos. Por este estudo os autores concluíram que as ligas nobres e altamente nobres eram estáveis em pH baixo ou diante de mudança de pH, enquanto as ligas à base de níquel eram mais susceptíveis ao pH baixo e à mudança de pH, havendo uma maior liberação de elementos nestas circunstâncias. Reafirmando a importância do pH na liberação de íons metálicos das ligas está o trabalho de Syverud et al. (2001), que avaliou a corrosão e biocompatibilidade de ligas de paládio.

Sendo as ligas à base de níquel apontadas como as mais susceptíveis ao efeito dos ácidos e da escovação, em 2003, Wataha et al. decidiram investigar a influência da escovação com ou sem dentífrico na liberação de elementos das ligas à base de níquel. Para isso foram utilizadas duas ligas à base de níquel, sendo que uma continha berílio em sua composição e menor porcentagem de cromo; e a outra não apresentava berílio na composição e uma porcentagem de cromo mais alta do que na primeira, que segundo os fabricantes, melhoraria sua resistência à corrosão. As amostras foram escovadas durante 48 horas, o que simulava um tempo clínico de dois anos, e as soluções provenientes do período da escovação e da imersão das amostras durante sete dias após a escovação foram avaliadas por espectrometria de absorção atômica. Neste estudo foi concluído que a escovação por si só não altera o padrão de liberação de elementos das ligas, mas o uso de dentífricos aumenta esta liberação, sendo o níquel e o zinco os elementos mais liberados, inclusive nos casos de imersão após escovação, em que somente nas amostras escovadas com dentífricos houve maior liberação de elementos. No entanto, não houve diferença entre as duas ligas testadas com relação à liberação de elementos.

A corrosão pode ser acentuada ou não pela composição química das ligas ou pela microestrutura apresentada na superfície do material. Estas liberações de íons metálicos gerados pela corrosão são dependentes de várias características como aspereza superficial, grau de oxidação, o potencial da liga e a presença de inibidores, a presença de um ponto de solda, fossas e fendas (UHLIG, 1967; AKSÜT & BILGIÇ, 1992; AKSÜT & BAYRAMOUGLU, 1994; WATAHA, 2000).

As fases de uma liga, ou seja, as áreas que apresentam a mesma composição e estrutura cristalina diferem em ligas de simples fase e múltipla fase. Assim, as ligas de simples fase apresentam composição mais ou menos similar em sua estrutura, enquanto as de múltipla fase têm em algumas áreas, composição diferente de outras, ou seja, ela não é homogênea através de sua estrutura. Em geral, ligas de múltipla fase são mais propensas à corrosão do que ligas de simples fase, devido efeito galvânico entre áreas microscópicas de diferentes composições. Um estudo realizado por Wataha, Lockwood & Nelson (1999), comparando elementos liberados no meio de cultura em ligas nobres de simples fase e múltipla fase durante um período de quatro semanas, em intervalos semanais, mostrou diminuição na liberação de elementos das ligas de simples fase, enquanto as de múltipla fase apresentaram aumento ou liberação constante, sugerindo que testes realizados em períodos menores do que uma semana podem não ser apropriados para avaliação da liberação de elementos por períodos mais longos.

Diante destes resultados, outro estudo foi realizado por Wataha et al. (1999), avaliando a citotoxicidade das ligas até um período de oito meses, sendo que o meio de cultura em que as amostras das ligas ficavam imersas era recolhido a cada trinta dias para análise química destas soluções; e, antes de se completar cada intervalo de trinta dias, o meio de cultura era substituído 72 horas antes para ser utilizado como extrato a ser colocado em cultura de

células. Os resultados deste estudo sugeriram que para a maioria das ligas testadas, a citotoxicidade demonstrou ser constante e que testes de citotoxicidade em períodos de sete dias poderiam dar indícios do comportamento de muitas ligas dentais por longos períodos. No entanto, há exceções, visto que esta propensão depende da natureza da segunda fase e da alta porcentagem de elementos não nobres na liga. Assim, a estrutura de fase é crítica para a corrosão e biocompatibilidade da liga, já que sua interação com o meio biológico que determina os elementos a serem liberados (WATAHA, 2000). Daí o efeito da corrosão poder ser observado em amplitude maior em certas áreas em relação a outras, na mesma prótese, pois a presença de uma estrutura heterogênea faz com que certas áreas resistam melhor à corrosão do que outras (HSU & YEN, 1998).

Pensando em diminuir a perda de elementos das ligas em um período inicial, pesquisadores tentaram acelerar a perda de elementos ao imergir metais em três diferentes soluções biológicas: salina; meio de cultura de células D-MEM e salina com albumina de soro bovino, antes de se realizar teste de citotoxicidade. Desta forma foi possível avaliar se as diferenças na quantidade de proteínas e a complexidade destes meios alterariam a liberação de elementos e conseqüentemente a citotoxicidade destes materiais. A partir deste estudo, concluiu-se que o condicionamento em meios biológicos acelerou a liberação de elementos das ligas, mas o comportamento destes meios foi diferente, sendo que a solução salina com albumina de soro bovino foi a mais efetiva, ao apresentar resultados semelhantes a citotoxicidade em 10 meses. Desta forma, os pesquisadores sugerem que o condicionamento prévio aos ensaios de citotoxicidade pode fornecer resultados mais precisos de citotoxicidade em longo prazo; e se realizado antes da instalação ou entrega das próteses, pode diminuir a exposição dos tecidos bucais aos elementos liberados pelas ligas (NELSON, WATAHA & LOCKWOOD, 1999).

É possível aumentar a resistência à corrosão de uma liga através de fortes ligações químicas com o oxigênio, gerando uma camada de óxido estável, tal como acontece no titânio e no aço inoxidável (RUPP, GEIS-GERSTOFER & GECKELER, 1996 apud LYGRE, 2002). A resistência à corrosão é extremamente importante, porque dela deriva a resistência à fratura e a estética da reabilitação protética (ADELL et al., 1981; GEIS-GERSTORFER, 1994; CAI, VERMILYEA & BRANTLEY, 1999; NOMOTO, ANO & ONESE, 1979; BAYRAMOGLU et al., 2000). Quando em função, a dissolução dos íons metálicos causada pelo processo de corrosão pode diminuir em muito a função da liga, resultando, em casos mais avançados na falência da prótese, com fraturas e quebras (BRUNE, 1986; GEIS-GERSTORFER, 1994).

Bayramoglu et al. (2000) investigaram a corrosão de várias ligas odontológicas e concluíram que o titânio e liga de níquel-cromo são resistentes à corrosão, mas que elementos como cobre, estanho, prata e ferro aumentam a corrosão das ligas e são mais susceptíveis à mudança de pH, enquanto a maior porcentagem de metais nobres, cobalto e molibdênio aumentavam a resistência à corrosão.

O comportamento corrosivo de ligas à base de níquel-cromo-molibdênio foi estudado em meio ácido por Huang (2002), que levantou a hipótese de que a maior quantidade de molibdênio no conteúdo da liga aumentaria a resistência à corrosão, pois ligas contendo cromo, níquel e molibdênio eram resistentes à corrosão. A composição da camada passiva, contendo Ni(OH)_2 , NiO , Cr_2O_3 e MoO_3 , é responsabilizada por tal comportamento destas ligas. Assim, o autor aponta que ligas contendo pelo menos 16-22% de cromo e 9-14% de molibdênio podem formar uma camada de óxido passiva mais estável, por formar Cr_2O_3 e Cr(OH)_3 , que protegem dez vezes mais do que NiO e Ni(OH)_2 . No entanto, a presença de 14% de cromo na liga não tem efeito significativo na melhora do seu comportamento, mesmo que um conteúdo de 8% de molibdênio, alto segundo o autor, esteja presente. Ele relata ainda

que a presença de titânio em porcentagem inferior a 4% em ligas a base de níquel-titânio não influencia a resistência à corrosão destas ligas, mesmo que TiO_2 seja detectado na superfície destes materiais. Enfim, concluiu-se por este estudo que a resistência à corrosão da liga está ligada à camada passiva que se forma na superfície e que esta depende da composição química da liga.

Craig & Hanks (1990) atribuíram a biocompatibilidade da liga Ti-6Al-4V, Ni-Cr e aço inoxidável à camada de óxido protetora de cromo e/ou titânio que se forma na superfície do material, afirmando a idéia de que a superfície é mais crítica do que a composição na citotoxicidade dos materiais.

O comportamento eletroquímico do titânio foi avaliado em um trabalho que comparou placas palatinas confeccionadas em titânio e em cobalto-cromo após seis meses de uso com estruturas que não foram levadas à boca do paciente. Embora os autores tenham encontrado melhores resultados de resistência à corrosão para o cobalto-cromo, este resultado pode ser atribuído a algumas limitações na fundição do titânio, como a sua reatividade com atmosfera e revestimento, responsável por alta porosidade superficial e dureza, o que acarreta em maior dificuldade de acabamento das peças e aumenta a susceptibilidade à corrosão (CANAY et al., 1998).

Considerações a respeito do polimento do titânio também foram tratadas por Lautenschlager & Monaghan, em 1993, que apontaram o uso de pó abrasivo de TiO_2 como a melhor opção para polimento de titânio, mas o polimento químico em várias concentrações de solução de Kroll também foi recomendado.

Diante da possibilidade de contaminação da superfície do titânio com óxido de alumínio após jateamento, Diniz et al (2005) realizaram um estudo em que era avaliada a superfície do titânio após limpeza em banho de ultra-som seguida de tratamento usando

solução de ácido fluorídrico a 4% durante 60 segundos num primeiro instante e solução de ácido fluorídrico 4%/peróxido de hidrogênio 8% durante 15 segundos posteriormente. Os autores concluíram que este procedimento demonstra remover de forma significativa o óxido de alumínio do jateamento, embora permaneçam alguns resíduos.

Um dos requisitos fundamentais aplicados a qualquer metal ou liga que será utilizado na boca é que não deve formar produtos de corrosão prejudiciais ao organismo, pois a corrosão das ligas odontológicas pode resultar em efeitos biológicos, como toxicidade, alergia e mutagenicidade, efeitos funcionais e estéticos. Em adição, o processo de corrosão libera íons metálicos que podem entrar em contato com as células e tecidos que se encontram na proximidade, e que serão distribuídos pelo corpo através de vasos sanguíneos, chegando a outros órgãos. Se esses íons metálicos não forem compatíveis com o organismo, gerarão toxicidade e grande risco de sensibilidade, desde que ingeridos em quantidade suficiente e expostos durante um tempo crítico (SARKAR, FUYS & SANTFORD, 1979; BRÄNEMARK, ADELL & ALBREKTSSON, 1983; ERICSSON et al., 1986; RECLARU & MEYER, 1994; ANUSAVICE, 2005; WATAHA et al., 1999; WATAHA, 2000).

O estudo dos efeitos tóxicos das substâncias constituintes das ligas odontológicas é extremamente importante, já que estes componentes podem ser absorvidos no trato gastrointestinal, na mucosa oral, na pele ou no sistema respiratório, e que o mecanismo de absorção depende da natureza das propriedades químicas dos elementos liberados, isto é, íons, componentes hidrofílicos ou lipofílicos, substâncias voláteis ou partículas. Os metais encontrados em níveis sistêmicos são baixos e não há estudos evidenciando que se possa atribuí-los ao uso de coroas protéticas. No entanto, ao se pensar em toxicidade local, a concentração necessária para se ter efeito adverso pode ser muito mais baixa do que para a sistêmica, pois é criado um microambiente próximo desta coroa (sulco gengival, por exemplo)

e de uma estrutura metálica de prótese parcial removível, e neste local o fluxo salivar é reduzido (WATAHA, 2000; LYGRE, 2002).

Elevados níveis de cobalto e cromo foram observados na saliva e raspagem (esfregaço) de língua de pacientes com próteses parciais removíveis em liga de cobalto-cromo (STENBERG, 1982 apud HENSTEN-PETTERSEN, 1992; DE MELO, GJERDET & ERICHSEN, 1983 apud HENSTEN-PETTERSEN, 1992).

Kansu & Aydin (1996) pesquisaram a biocompatibilidade de sete categorias de ligas odontológicas através de análise histopatológica após implantação subcutânea em ratos, de discos fundidos, por 15, 30 e 60 dias. As ligas estudadas foram de alto e baixo conteúdo de ouro, à base de paládio, paládio-prata, níquel-cromo, cobalto-cromo e ouro 22 quilates. A resposta tecidual mais severa foi verificada com as amostras em liga de níquel-cromo e a mais leve, com a liga de ouro 22 quilates. Embora a liga de cobalto-cromo faça parte das ligas de metais básicos, apresentou respostas teciduais menos severas que a liga de níquel-cromo e por isso os autores recomendaram que o uso de ligas contendo níquel fosse evitado.

O alumínio é um elemento que não desempenha nenhum papel na fisiologia do corpo humano e é potencialmente perigoso, se absorvido em pequenas quantidades, podendo causar lesões ao sistema nervoso, rins e medula óssea (YOKEL & Mc NAMARA apud RODRIGUES et al., 2003). A possível liberação de vanádio e alumínio da liga de Ti-6Al-4V questiona sua biocompatibilidade (ANUSAVICE, 2005).

É importante ressaltar a diferença dos conceitos exposição e toxicidade, pois a exposição significa que o indivíduo é exposto a um corpo estranho, mas não necessariamente há uma resposta tóxica para este contato (LYGRE, 2002). Para haver efeitos biológicos adversos, é necessário que a liga perca elementos através da corrosão; no entanto, a corrosão não é determinante para a ocorrência de efeitos adversos, já que os efeitos adversos estarão

associados aos elementos liberados, à quantidade destes e duração da exposição. A tendência à liberação de íons varia entre os elementos, dependendo da composição da liga.

Há casos em que a reação alérgica acontece sem haver a corrosão; e quando há reações alérgicas, na verdade os metais se ligam a moléculas, formando um complexo que o corpo encara como “estranho”. Há testes cutâneos para avaliar se um paciente é alérgico aos metais, mas Hasseus et al. (1999) apud Wataha (2000) relata em seu estudo que células responsáveis por gerar a resposta imunológica do epitélio oral são mais efetivas na resposta imune do que as células da pele (WATAHA, 2000). No entanto, há diferenças fundamentais entre a pele e a cavidade oral que podem contribuir para a falta de reações ao níquel na mucosa da boca, como o filme de glicoproteínas salivares que se forma na superfície exposta, agindo como uma barreira de difusão (WOLFAARDT & PETERS, 1992). Há ainda dificuldade em reconhecer se a resposta inflamatória é mediada por um mecanismo alérgico, tóxico ou a combinação de ambos; e para isso usa-se a dose como parâmetro para reconhecimento, já que a resposta alérgica independe da dose.

A concentração e o tempo em que os íons estarão expostos são críticos para a toxicidade, podendo alterar as funções biológicas normais dos tecidos circundantes. Algumas ligas destruirão células em cultura, devido à liberação de elementos da liga no meio de cultura (WATAHA, 2000).

Embora o uso clínico mostre que há tolerância significativa a baixos níveis de metais liberados das ligas avaliados em curto prazo (de meses a anos), as respostas em longo prazo ainda não foram esclarecidas e o risco de irritações locais deve ser avaliado cuidadosamente contra os benefícios do uso destes materiais. É sabido que os metais ou os radicais livres gerados por eles podem alterar o DNA e várias mutações podem levar a carcinogenicidade, por onde as células irão crescer e se dividir descontroladamente. Apesar de faltarem

evidências de que ligas fundidas contribuem para a formação de neoplasias, é prudente evitar o uso de ligas que contenham cádmio, cobalto e berílio (WATAHA, 2000). Segundo Anusavice (2005), níquel, cobre e berílio são reconhecidos como mutagênicos; o que não significa que tais metais sejam carcinogênicos, pois as mutações podem ser reparadas ou irrelevantes.

Em 1992, Hensten-Petersen avaliou relatos de 32.550 pacientes dermatológicos e apenas 0,5% destes relacionaram a reação de hipersensibilidade a materiais odontológicos. Embora reações adversas não sejam tão freqüentes em Odontologia (1,4 para 1000 pacientes), algumas áreas da Odontologia têm incidências mais altas, sendo o tratamento protético a segunda, com freqüência de 2,5 para 1000 pacientes; ou seja, 27% das reações estavam relacionadas a ligas metálicas (JACOBSEN, AASENDEN & HENSTEN-PETTERSEN, 1991 apud LYGRE, 2002). Scott et al. (2004), relataram que os metais são os maiores responsáveis por reações adversas no pacientes, após fazer um levantamento das reações adversas aos materiais odontológicos no Reino Unido. No entanto, existe a possibilidade do número de reações adversas ser subestimado na odontologia, já que em geral elas se manifestam em locais distantes de onde o material é colocado por: vermelhidão, edema, dor em mucosa oral e lábios, erosão em mucosa e reações liquenóides, que podem ou não ser de origem alérgica. Reações generalizadas estão presentes em poucos casos. Além disso, a habilidade do cirurgião-dentista de relacionar estas reações adversas a causas específicas é necessária (HENSTEN-PETTERSEN, 1992; LYGRE, 2002) A alergia por contato parece ser a maior reação adversa a partir de biomateriais protéticos(WATAHA, 2000).

Todas as ligas fundidas, exceto o titânio comercialmente puro, parecem ter potencial para gerar reações adversas em indivíduos sensíveis. Segundo HENSTEN-PETTERSEN, em 1992, próteses parciais removíveis feitas com ligas de metais básicos tem o potencial de gerar

reações adversas em pacientes alérgicos ao cobalto, ao cromo e ao níquel, embora a incidência seja incerta. Os sintomas podem ser locais, como gengivite e estomatite; ou em locais distantes ou generalizadas, como eczema na pele. Com relação à utilização em próteses fixas, as reações pareciam ser proporcionais ao número de dentes restaurados e ao tempo de uso; e os pacientes se queixavam de xerostomia, queilite, gosto metálico e erosão local da membrana mucosa, além de urticária e eczema na pele, presentes em alguns casos. O autor alerta que, as reações locais são mais facilmente relacionadas ao contato com os metais do que as reações extra-orais, tanto pelo paciente, como pelos cirurgiões-dentistas e dermatologistas.

Há relatos de exacerbação de líquen plano erosivo adjacente a coroas metálicas e resolução da lesão sem recorrência após substituição das coroas (JONES, PINNELL & NETTI, 1991 apud HENSTEN-PETTERSEN, 1992).

É importante preparar os profissionais para a escolha e registro das ligas utilizadas na documentação, além de estender essa informação aos pacientes, pois diante de problemas futuros, estes registros serão fundamentais no diagnóstico e na defesa do profissional diante de processos judiciais (WATAHA & MESSER, 2004). Além disso, relatos de histórias positivas de alergia devem ser encaminhados para dermatologistas, para investigar resposta alérgica (WOLFAARDT & PETERS, 1992). Em 1986, Stanford já alertava que os dentistas deveriam incluir no prontuário histórias de sensibilidade a alguns metais, estar cientes dos sintomas relacionados à exposição do metal e relatar os casos de reações ou sensibilidade aos biomateriais. No entanto, para que estas reações sejam confirmadas, é preciso identificar o possível agente causador, avaliar a capacidade do paciente reagir, expor o paciente novamente ao agente causador e observar se os sintomas desaparecem diante da remoção do agente causador; mas esta reexposição entra em conflito com as considerações éticas, já que não é de

interesse do paciente. Então, os requisitos necessários para confirmar os casos e relatá-los são em parte responsáveis pelos poucos casos relatados na literatura (HENSTEN-PETTERSEN, 1992).

Dentre os metais utilizados em ligas odontológicas, o níquel, o cromo e o cobalto estão freqüentemente associados às alergias (SUZUKI, 1995 apud LYGRE, 2002). Namikoshi et al. (1990) apud Wataha (2000) relatam que 15% da população é sensível ao níquel, 8% ao cobalto e 8 % ao cromo; e ele atribui esta diferença de freqüência de hipersensibilidade à freqüência de exposição da população aos diferentes metais, a tendência deles a se soltarem das ligas e às interações biológicas dos íons metálicos com os tecidos. Além disso, a forma do metal é crítica para sua mutagenicidade, como por exemplo, a diferença entre o Cr^{+3} , que não é mutagênico e o Cr^{+6} , que é. Íons como o Sn^{+2} , Cu^{+2} ou Fe^{+2} são conhecidos por sua mutagenicidade, mas não há nada documentado sobre suas capacidades de induzir neoplasias. No entanto, o níquel, é pouco mutagênico na forma iônica, de NiCl_2 e NiSO_4 , mas muito como Ni_2S_3 , citado na literatura como carcinogênico, em casos de neoplasias no trato respiratório (COSTA, 1991 apud WATAHA, 2000).

Testes de biocompatibilidade prévios ao uso clínico são realizados em três estágios, englobando testes *in vitro*, utilizando cultura de células; testes *in vivo* e testes de uso, realizados em humanos. Desta forma, uma avaliação criteriosa da biocompatibilidade dos materiais por parte dos dentistas é negligenciada, pois se considera que estando o produto no mercado, este tipo de avaliação não precisa ser questionado (SCHMALZ, 1997 apud NELSON et al., 1999).

Em 1986, Stanford estabeleceu uma série de testes a serem realizados para utilização segura de ligas de níquel-cromo com mínimo custo. Assim, foram recomendados testes *in vitro*, para o material na forma sólida e para os produtos que se solubilizavam; e testes *in vivo*,

em que o material era colocado em contato com o tecido por determinado tempo e as reações eram observadas, também podendo ser chamado de teste secundário ou de uso. Na época não se mencionava a realização de testes para carcinogênese, devido aos custos, mas é importante notar como já havia atenção para a necessidade de realização de testes padronizados para determinação da biocompatibilidade, prévios ao uso clínico.

Para avaliar a biocompatibilidade de metais e ligas odontológicas, testes de citotoxicidade *in vitro* têm sido utilizados (WANG & LI, 1998; WATAHA, LOCKWOOD & NELSON, 1999; SJÖGREN, SLETTEN & DAHL, 2000; HORNEZ et al., 2002; WATANABE et al., 2004).

O objetivo destes testes é apresentar resultados em menor tempo e custo, e resultados menos controversos, quando comparado a testes que utilizam animais ou humanos; no entanto estes testes quantificam efeitos nas células durante as primeiras 12-24 horas depois da exposição às substâncias tóxicas, não levando em consideração que células do hospedeiro podem se recuperar de efeitos tóxicos através de reações inflamatórias e imunes (HANKS, WATAHA & SUN, 1996). Em 1996 estes autores fizeram um levantamento sobre avaliação de biocompatibilidade *in vitro* e relataram que os primeiros experimentos com cultura de células para avaliação de biocompatibilidade de materiais odontológicos são da década de 50 e a partir daí vários métodos foram desenvolvidos com esse objetivo. A partir da década de 80, organizações como a ADA e International Organization for Standardization (ISO) estabeleceram uma série de testes *in vitro* e *in vivo* para avaliar biocompatibilidade, estabelecendo normas para estes testes.

A citotoxicidade dos metais utilizados na boca, como bandas, arcos, braquetes ortodônticos, magnetos utilizados em próteses e outras aplicações dentais pode ser avaliada através de testes de contato direto e por extratos. Assim, os testes por extratos simulam a

interação de células da mucosa bucal e dos elementos que são liberados pelas ligas e se solubilizam na saliva; e os testes de contato direto simulam a interação entre metais e células da mucosa bucal, avaliando a influência da natureza físico-química do material sobre as células, além dos efeitos tóxicos do material (MOCKERS, DEROZE & CAMPS, 2002; HOPP, ROGASCHEWSKI & GROTH, 2003).

A importância de se avaliar a biocompatibilidade de materiais através de vários parâmetros foi enfatizada por Bumgardner, Lucas & Tilden (1989), ao relatarem que, em seus estudos, a proliferação celular se mostrou mais sensível à presença de íons metálicos do que a morfologia e a viabilidade celular, ao avaliarem ligas à base de cobre, em cultura de células. Linez-Bataillon et al. apud El Medawar et al. (2002) apontam possíveis causas para haver diminuição de número de células em cultura, em avaliações de proliferação celular, como morte celular, desaceleração do ciclo celular e/ou diminuição da divisão celular, sendo consequência de efeitos físicos, como energia ou morfologia de superfície desfavorável.

A biocompatibilidade de ligas metálicas vem sendo avaliada em cultura de fibroblastos através da proliferação celular e do arranjo de fibronectina, molécula envolvida na adesão celular (GRILL et al., 1997; GRILL et al., 2000; Grill et al., 2000).

Hornez et al. (2002) alertam para as limitações dos sistemas de cultura de células por realizarem testes em apenas um tipo de célula, impedindo a defesa natural pelo sistema imune e/ou a interação com outros tipos celulares, além de que a maioria das linhagens utilizadas em laboratórios apresenta resposta fisiológica diminuída. Embora culturas primárias provenientes de biópsias sejam vantajosas por apresentarem melhores respostas fisiológicas, há maior dificuldade em reproduzi-las devido a diferenças provenientes da origem, sexo, idade e outros parâmetros individuais. Em uma pesquisa da citotoxicidade de ligas preciosas e semi-preciosas, ligas experimentais e metais puros, ao avaliar a proliferação, viabilidade,

morfologia celular e reação inflamatória em cultura, utilizando linhagens de células epiteliais embrionárias e fibroblastos de ratos, os resultados obtidos mostraram que as ligas à base de titânio induzem menos resposta inflamatória do que as ligas que contêm níquel, cobalto, cromo e/ou cobre; e que as ligas preciosas e semi-preciosas são biocompatíveis.

Alguns metais, como níquel e cobalto são apontados na literatura como causadores de inflamação gengival e periodontal. Sabendo que citocinas, como a interleucina 6 (IL-6), estão envolvidas no desenvolvimento destas inflamações, Schmalz, Schuster & Schweikl (1998) avaliaram os níveis de liberação de IL-6 em culturas de fibroblastos-queratinócitos expostas aos metais utilizados em aplicações protéticas. Eles concluíram que íons metálicos estão envolvidos em atividade inflamatória, mesmo em níveis não tóxicos ou de baixa toxicidade e os mediadores envolvidos neste processo parecem ser IL-6 e PGE₂ (Prostaglandina E 2).

Além disso, a composição do meio de extração interfere na corrosão e biocompatibilidade de ligas metálicas, como foi comprovado por Wataha, Nelson & Lockwood (2001), que ao compararem a liberação de íons metálicos em solução salina, solução salina com albumina de soro bovino e meio de cultura com 3% de soro fetal bovino, encontraram maiores valores de liberação de elementos em geral na solução salina com albumina de soro bovino, exceto para as ligas de níquel-cromo. Embora a maior parte das proteínas encontradas no meio de cultura seja albumina de soro bovino, acredita-se que a presença de outras proteínas, tais como imunoglobulinas e fibronectina tenham interferido nos resultados e gerado esta diferença de resultados. O mecanismo pelo qual as proteínas ou outras pequenas moléculas alteram a corrosão destas ligas não é claro, sendo possível que haja adsorção de proteínas ou outras moléculas na superfície da liga; e os efeitos de superfície são importantes na liberação de elementos das ligas.

Assim, é importante estar atento aos fatores destes ensaios que possam interferir nos resultados. Wataha, Hanks & Sun (1994) avaliaram se havia diferença de resultados ao utilizar linhagens e passagens diferentes de células ao estudar a biocompatibilidade dos materiais *in vitro*. Para isso, foram utilizadas quatro diferentes linhagens contínuas de fibroblastos em diferentes passagens, cultivadas em mesmo meio de cultura, na presença de íons metálicos que são liberados de ligas. Concluiu-se que a linhagem de células utilizada interfere nos resultados, devendo ser escolhidas linhagens cujos resultados mais se aproximem dos resultados *in vivo*; e o número da passagem afeta a resposta citotóxica, sendo que as células que foram menos subcultivadas eram mais sensíveis à presença dos íons metálicos.

Em 1998, Wang & Li utilizaram testes de citotoxicidade e mutagenicidade *in vitro* para avaliar duas ligas experimentais a base de titânio, comparando-as com Ti cp e liga à base de níquel-cromo.

Messer & Lucas (1999) avaliaram a citotoxicidade de íons individuais em cultura de fibroblastos através de vários parâmetros, como viabilidade celular, integridade de membrana celular, consumo de oxigênio, síntese de DNA, síntese de RNA, síntese de proteínas, nível de ATP intracelular e atividade de glicose 6 fosfato dehidrogenase. Os autores concluíram que a proliferação celular, a síntese de proteínas, a síntese de RNA e a atividade de glicose 6 fosfato dehidrogenase são mais sensíveis e por isso são melhores ferramentas para se avaliar a biocompatibilidade, sendo que a morfologia celular era o menos sensível, não apresentando nenhuma alteração diante da presença de íons metálicos. Além disso, os autores observaram que os íons mais citotóxicos foram Cr^{6+} e Be^{6+} seguidos do Ni^{2+} , sendo os menos tóxicos o Cr^{3+} e Mo^{6+} , sendo que o Cr^{6+} cruza a membrana celular e o Cr^{3+} não, e por Cr^{6+} em solução se quebrar rapidamente em Cr^{3+} , quando se avalia a citotoxicidade destes íons em soluções, a

resposta citotóxica é maior nos períodos iniciais por não ter havido a quebra do Cr^{6+} . Desta forma, os autores concluíram que a concentração, a taxa de íons liberados pelas ligas, a valência destes íons, o tempo e a dose são determinantes nos resultados de testes *in vitro*. Em outro trabalho, os mesmos autores avaliaram a citotoxicidade de ligas de níquel-cromo com ou sem berílio em sua composição, utilizando os mesmo parâmetros descritos acima e concluíram que o berílio interfere na estrutura de fase do material, tornando-o mais susceptível à corrosão e liberando maior quantidade de berílio. Este comportamento pode ser atribuído à camada não homogênea de óxido formada na superfície, sendo preferencialmente corroídas as regiões em que o conteúdo de cromo está diminuído (MESSER & LUCAS, 2000).

Diferentes respostas diante de linhagens de células diferentes também são evidentes nos resultados de Wataha et al. (1999). Segundo estes autores, as pesquisas futuras na área de biocompatibilidade envolveriam o entendimento de biologia e química, para através da biologia molecular, tentar se entender as interações entre moléculas biológicas do tecido do hospedeiro em resposta aos materiais sintéticos.

Um estudo realizado por Es-Souni, Brandies & Es-Souni (2003) avaliou duas ligas à base de cobalto e as comparou à liga de Ni-Ti e Ti-Mo, utilizados em aplicações ortodônticas, através de experimentos *in vitro*, em que foi avaliada a resistência à corrosão, os elementos liberados na solução, a composição química e a morfologia da superfície das amostras e a biocompatibilidade em cultura de células, utilizando linhagem de fibroblastos de rato e cultura primária de fibroblastos e células epiteliais obtidos de explantes de tecido gengival sadio. Conclui-se que as ligas à base de cobalto eram menos biocompatíveis e corroíam mais do que as outras; e que estes resultados poderiam ser atribuídos a uma pior qualidade de superfície após acabamento e à presença de áreas de fases intermetálicas, inclusões não-metálicas como

sulfetos e óxidos, e precipitados como carbetos e nitretos, que tornam o material mais susceptível à corrosão.

Faccioni et al. (2003) fizeram um estudo *in vivo*, em que avaliaram o efeito de íons metálicos provenientes de aparelhos ortodônticos fixos, na mucosa oral destes pacientes. Constatou-se que, embora os níveis de íons cobalto e níquel, liberados dos aparelhos ortodônticos, não sejam tóxicos na ingestão diária, são capazes de induzir alterações no DNA de células da mucosa oral, tais como quebra do DNA que induzem à diminuição na capacidade de reparo dessas células.

Ligas experimentais de titânio (Ti-Cr, Ti-Mn, Ti-Pd e Ti-Cu) foram testadas e comparadas ao Ti cp, Ti-6Al-4V e Ti-6Al-7Nb com relação à citotoxicidade, avaliando a atividade de desidrogenase succínica em linhagem de fibroblastos, e comparando as ligas com e sem a camada superficial α -case, decorrente da reação do titânio com o revestimento durante a fundição, crítica de ser removida em coroas, próteses fixas e próteses removíveis, por comprometer a fidelidade dimensional das peças. Por este estudo, Watanabe et al. (2004) concluíram que estas ligas experimentais não eram citotóxicas, e que a presença da camada α -case não alterou a biocompatibilidade destas ligas.

A utilização de ligas na odontologia não está livre de riscos nem apresenta 100% de segurança, mas requer uma análise criteriosa do risco e do benefício (ANUSAVICE, 2005).

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi investigar a biocompatibilidade de ligas de metais básicos comerciais e do Ti cp utilizados em fundições odontológicas.

Objetivos específicos:

- Avaliar se o método de fundição influencia a biocompatibilidade destas ligas.
- Avaliar o efeito dos ciclos térmicos na biocompatibilidade dos materiais.

Para isto, foi realizada uma avaliação *in vitro*, utilizando uma linhagem de queratinócitos humanos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção dos corpos-de-prova

Para este trabalho foram utilizadas as seguintes ligas e metais, relacionados na Tabela

1.

Tabela 1. Ligas e metais utilizados, nome comercial, fabricante e composição.

<i>Liga / metal (base)</i>	<i>Nome comercial</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Composição * (% em peso)</i>
Ni-Cr-Be	Vera Bond	Aalba, Estados Unidos	Ni-77,95%(Máx.); Cr-12,60%; Be-1,95%(Máx.); Mo-5%; Al-2,90%; Co-0,45%
Ni-Cr	Vera Bond II	Aalba, Estados Unidos	Ni-75,55%(Máx.); Cr-11,50%; Mo-3,50%; Si-3,50%; Nb-4,025%; Al-2,25%
Co-Cr-Mo	ModellguB	Degudent, Brasil	Co-64%; Cr-28%; Mo-5%; Outros-5%
Co-Cr-Mo-W	Remanium 2000	Dentaurum, Alemanha	Co-61%; Cr-25%; Mo-7%; W-5%; Si-1,5%; Rest: Mn; C; Ce; N
Ni-Cr-Ti	Tilite Ômega	Talladium, Estados Unidos	Ni-60-76%; Cr-12-21%; Mo-4-14%; Ti-4-6%
Ti cp	Tritan	Dentaurum, Alemanha	Ti-99,48%; O-0,18%; Fe-0,2%; H-0,01%; C-0,1%; N-0,03%
Ni-Cr-Ti	Vi-Star	Talladium, Estados Unidos	Ni-72%; Cr-17%; Ti-6%, Mo-4,5%
Ti-6Al-4V	----	RMI Co., Estados Unidos	Ti-89,57%; N-0,02%; C-0,01%; H-0,003%; Fe-0,22%; O-0,17%; Al-6,2%; V-3,8%

Os corpos-de-prova foram obtidos a partir de padrões de cera em forma de pastilhas com 13 mm de diâmetro e 4 mm de espessura. Para isso foi utilizada cera Pico dip (Renfert, Alemanha), liquefeita em aparelho digital Hotty Led (Renfert, Alemanha), gotejada em excesso com auxílio de um conta-gotas de vidro dentro de uma matriz de teflon (Fig. 1 e 2) previamente vaselinada. A matriz foi confeccionada na oficina do Depto. de Materiais Dentários e Prótese – FORP-USP. Após solidificação, a superfície foi regularizada e alisada com auxílio de uma espátula plana (Fig. 3). Após solidificação total sob água corrente, o padrão de cera foi removido da matriz (Fig. 4), posicionado em base conformadora de cadinho e imediatamente incluído para fundição, após espatulação do revestimento em

equipamento eletromecânico a vácuo Turbo Mix (EDG Equipamentos e Controle Ltda, Brasil), seguindo as instruções do fabricante, com relação à relação pó-líquido e ao tempo de espatulação.

Figura 1. Matriz de teflon

Figura 2. Matriz de teflon montada

Figura 3. Matriz de teflon encerada

Figura 4. Corpo-de-prova encerado e fora da matriz

Os corpos-de-prova fundidos com as ligas de Ni-Cr, Ni-Cr-Be, Co-Cr-Mo, Co-Cr-Mo-W e Ni-Cr-Ti foram incluídos em revestimento fosfatado Rema Exakt (Dentaurum, Pforzheim, Alemanha); e os obtidos em Ti cp e liga Ti-6Al-4V, em revestimento especial Rematitan Plus (Dentaurum, Pforzheim, Alemanha). Após a presa do revestimento, as bases conformadoras de cadinho foram removidas e os moldes refratários foram levados ao forno (EDG-7000 10P-EDG Equipamentos e Controles Ltda) e submetidos aos ciclos térmicos preconizados pelo fabricante, para eliminação e volatilização da cera.

Os corpos-de-prova foram fundidos por dois métodos:

- Fundição por plasma, na máquina Discovery Plasma (EDG Equipamentos e Controles Ltda., Brasil) (Fig. 5), que faz fundição por arco voltaico, sob vácuo e atmosfera inerte de argônio, com injeção da liga/metálico no molde por vácuo-pressão;

- Fundição por chama de gás-oxigênio, com injeção da liga/metal no molde por centrifugação (Fig. 6).

Figura 5. Máquina Discovery Plasma (Visão externa -A e interna-B)

Figura 6. Máquina de fundição por chama de gás oxigênio (Visão externa-A e interna-B)

O Ti cp e a liga Ti-6Al-4V foram fundidos somente pelo primeiro método, devido à impossibilidade de fusão do titânio e suas ligas por chama de gás-oxigênio.

Após a fundição, as peças foram desincluídas e jateadas com óxido de alumínio (80 psi = 5,62 kgf/cm²) para remoção dos resíduos de revestimento. Posteriormente, os corpos-de-prova foram cortados dos lastros de fundição.

Os corpos-de-prova foram polidos em politriz mecânica (modelo PLF, Fortel, Brasil), sob refrigeração abundante, utilizando seqüencialmente lixas (Norton, Brasil) 320, 400, 600, 1200, 1500 e 2000. Nas ligas de Ni-Cr, Ni-Cr-Be, Co-Cr-Mo, Co-Cr-Mo-W e Ni-Cr-Ti, o polimento final foi feito em pano de polimento (Fortel, Brasil), utilizando pasta de diamante (Fortel, Brasil) na seqüência de granulações 3µm, 1µm e 0,25µm e pasta de alumina (Fortel, Brasil) nas granulações 1,0 µm, 0,5 µm e 0,3 µm. Os corpos-de-prova em Ti cp e Ti-6Al-4V foram polidos em pano especial para polimento de titânio (OP-CHEM, Struers A/S, Dinamarca), utilizando uma solução OPS (Struers A/S, Dinamarca) + H₂O₂ 30%.

Cultura de células

Na cultura de células foi utilizada a linhagem de queratinócitos provenientes de carcinomas espinocelulares bucais humanos (SCC9) (Fig. 7) da “American Type Culture Collection” (ATCC, EUA), cedidas pelo Prof. Dr. Edgar Graner do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

Para o cultivo desta linhagem de células, foi preparado o meio de cultura DMEM/Ham's F12 (Gibco/Life Technologies, Grand Island, NY, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino(FBS) (Gibco), 50µg/mL de gentamicina (Gibco) ou 50µg/mL de vancomicina (Acros Organics, New Jersey, EUA)/ 20µg/mL de ampicilina (USB Corporation, Clevelan, OH, EUA), 0,3µg/mL de fungizone (Gibco) e 0,4 µg/mL de hidrocortisona (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA).

Para descongelamento das células, os criotubos (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA) foram colocados em banho de água a 37° C e imediatamente transferidos para tubos de centrífuga (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA) contendo 10 mL de DMEM/Ham's F12 e

Figura 7. Cultura da linhagem SCC-9: após 1 dia (A), 3 dias (B), 9 dias (C) e 13 dias (D) em cultura respectivamente, vista por microscopia de luz. Aumento original 10x.

Figura 8. Incubadora

Figura 9. Microscópio de contraste de fase

centrifugadas durante 3 minutos na velocidade de 3000 r.p.m.. Os “pellets” foram ressuspensos em 5 mL de meio de cultura e colocados em frascos de 75 cm² (Fisher), contendo 15 mL de DMEM/Ham’s F12. As células foram cultivadas em frascos de 75 cm² a 37° C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade (Fig. 8). O meio de cultura foi trocado a cada 3 ou 4 dias. Quando as células atingiram a subconfluência, o meio de cultura foi removido dos frascos de 75 cm² e estes foram lavados três vezes com 20 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4 (Gibco) e então incubadas a 37°C com 10 mL de solução de tripsina 0,25% (Gibco) / EDTA 1 mM (Gibco), durante 10 minutos. Os frascos foram observados em microscópio de fase invertido (Axiovert 25, Zeiss, Jena, Alemanha) (Fig. 9), e estando as células soltas, a suspensão de células foi transferida para tubos de centrífuga estéreis, contendo 5 mL de DMEM/Ham’s F12 com 10% de FBS, que interrompeu a ação da tripsina. Após centrifugação, o sobrenadante foi removido e os “pellets” foram ressuspensos em DMEM/Ham’s F12 para serem plaqueados nas concentrações desejadas. Para manter o estoque de células congelado em nitrogênio líquido e trabalhar com células em passagens semelhantes, foram congeladas várias amostras da linhagem celular. Para isto, as células foram suspensas em solução 1/1 de DMEM/Ham’s F12 contendo 20% de di-metil-sulfóxido (DMSO) (Acros Organics) e DMEM/Ham’s F12 com 50% de FBS. Os criotubos foram colocados em freezer – 80° C overnight e em seguida passados para tambor de nitrogênio líquido.

Os experimentos foram realizados com células entre a 30^a e 32^a passagens. Poços sem corpos-de-prova foram utilizados como controle negativo e fenol a 0,0015%, como controle positivo.

Biocompatibilidade das ligas e efeito do método de fundição

Para avaliar se a composição e o método de fundição interferem na biocompatibilidade dos materiais propostos, corpos-de-prova fundidos nos materiais propostos, pelos métodos descritos anteriormente, foram lavados durante 15 minutos em álcool isopropílico e duas vezes em água destilada durante 10 minutos, em ultra-som. Então estes foram secos, embalados e autoclavados e colocados em cultura (Fig. 10 – A e B). Células foram plaqueadas sobre os corpos-de-prova das ligas e metais testados fundidos pelos dois métodos (Fig. 11 – A e B) na concentração de $0,5 \times 10^4$ por poço. Os discos polidos foram avaliados em cultura em dois períodos: 48 horas e 18 dias após o plaqueamento, sendo que os 18 dias foram determinados pela subconfluência nos poços controle. Nos períodos determinados, as células foram enzimaticamente liberadas e amostras da suspensão de células em solução enzimática foram incubadas com o mesmo volume de azul de *trypan* 1% (Sigma) durante 5 minutos e posteriormente contadas, utilizando um hemocitômetro (Fisher) (Fig. 12). As células não-viáveis eram evidenciadas pelo azul de *trypan* a 1%. Os resultados da contagem foram expressos como número de células por poço e a viabilidade celular como porcentagem de células viáveis contadas.

Os experimentos foram realizados em quintuplicata. A comparação entre os dois métodos de fundição foi feita por teste estatístico de Student e valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes. A avaliação da composição das ligas e metais foi feita submetendo os resultados ao teste estatístico análise de variância e resultados de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes e submetidos a teste de Duncan.

Figura 10. Posicionamento dos corpos de prova nas placas (A); preenchimento dos poços com meio de cultura (B).

Figura 11. Plaqueamento das células nos poços sobre os discos (A); placa de 24 poços com copos-de-prova posicionados e células plaqueadas (B).

Figura 12. Hemocitômetro

Efeito dos ciclos térmicos sobre a citotoxicidade.

Para avaliar se a variação de temperatura, uma das condições bucais relacionadas à degradação dos materiais no meio bucal, interfere na citotoxicidade das ligas propostas, foram selecionadas algumas ligas e um método de fundição a partir do experimento anterior. Foram selecionadas as ligas de Ni-Cr, Co-Cr-Mo, Ni-Cr-Ti (TO), Ti6Al4V fundidos por plasma.

Os corpos-de-prova foram imersos em tubos de vidro com tampa, em saliva artificial, que se assemelha à saliva natural, fórmula de *Fusayama*, cujo pH era 5,5 e a composição é descrita na Tabela 2.

Tabela 2. Composição química da solução *Fusayama* (g/l)

KCl	NaCl	CaCl ₂ .2H ₂ O	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	Na ₂ S.9H ₂ O	Uréia
0,4	0,4	0,906	0,690	0,005	1

A proporção entre a área da superfície dos corpos-de-prova e o volume de saliva artificial, veículo de extração, foi de 0,5, de acordo com norma da ISO 10993-5 Parte 5: Testes para citotoxicidade - métodos *in vitro*, que estabelece utilização desta proporção entre 0,5 e 6,0. Os corpos-de-prova e os tubos foram autoclavados e a saliva foi filtrada antes da preparação dos tubos, sendo que estes foram preparados em capela de fluxo de laminar e fechados, de forma que fosse mantida condição asséptica durante a extração.

Os corpos-de-prova acondicionados nos tubos foram levados à termocicladora (Fig.13) (Modelo MSCT-3, São Carlos-SP, Brasil) para a realização de 1700 ciclos térmicos, o que simulou a condição bucal por aproximadamente 4 meses. Em cada ciclo, os tubos inicialmente na cuba a 5° C passavam para as cubas a 37° C e 55° C, retornavam para a 37° C e 5° C, permanecendo 3 minutos em cada cuba e tendo um tempo de 7 segundos para a transferência entre as temperaturas (GALE & DARVELL, 1999). Diante de interrupções na realização dos ciclos, os tubos eram transferidos automaticamente para a cuba de 37° C e lá mantidos até que a realização dos ciclos fosse reiniciada. A realização dos 1700 ciclos térmicos durou um período de 24 dias.

Figura 13. Termocicladora

Tubos de vidro com tampa, contendo corpos-de-prova imersos em solução de saliva de *Fusayama*, foram mantidos em 37° C durante todo o período de termociclagem com o intuito de se obter um extrato controle, em que não havia variação de temperatura.

Para avaliar se a saliva por si só não sofria degradação nas condições de temperatura descritas acima, tubos contendo saliva de *Fusayama* foram preparados e submetidos às mesmas condições que os tubos contendo os corpos-de-prova.

Desta forma, a saliva que esteve em contato com os corpos-de-prova durante a termociclagem, tanto em 37° C como submetida aos ciclos térmicos, foi utilizada posteriormente como extrato, para realização de testes de citotoxicidade com extratos das ligas, nas duas diferentes condições de temperatura testadas.

Ao término da realização dos ciclos térmicos, os corpos-de-prova foram separados da saliva artificial. A saliva foi armazenada para posterior utilização em teste de citotoxicidade com extrato do material.

Testes em extratos, em que os produtos de degradação dos materiais são testados com relação a citotoxicidade por intermédio de um veículo de extração, foram realizados.

Para isso, $1,5 \times 10^4$ células foram plaqueadas em cada poço e cultivadas no mesmo meio descrito acima, em placas de 24 poços, durante 10 dias, período necessário para atingirem a subconfluência. Atingida a subconfluência, os meios foram removidos e substituídos pelos extratos das ligas, previamente filtrados em filtros Puradisc 0,2 μ m (Whatman Inc, Clifton, NJ, EUA), na concentração de 100%. As células permaneceram em contato com esse extrato durante o período de 6 horas, sendo em seguida, os poços lavados, as células enzimaticamente liberadas e contadas em hemocítômetro, evidenciando a viabilidade celular através da coloração com azul de *trypan* 1%. O período de exposição das células ao extrato foi determinado a partir de um experimento piloto, que utilizou saliva artificial em vários períodos de exposição e determinou que o período de 6 horas não foi crítico para a cultura de células, e poços contendo meio de cultura sem substituição por extrato foram utilizados como controle negativo.

Os resultados da citotoxicidade foram expressos como número de células por poço e da viabilidade celular como porcentagem de células viáveis.

Os experimentos foram realizados em quadruplicata. Os resultados foram submetidos ao teste estatístico análise de variância e resultados com $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes e submetidos a teste de Duncan.

5. RESULTADOS

Biocompatibilidade das ligas e efeito do método de fundição

Os resultados do experimento que avaliou a interferência da composição das ligas e do método pela qual elas são fundidas na biocompatibilidade com células da mucosa bucal, através de testes de contato direto com os corpos-de-prova são apresentados nos Gráfico 1 e 2. Os resultados foram analisados individualmente nos dois períodos avaliados, sendo que os métodos de fundição foram comparados por teste t de Student e os metais e ligas foram comparados com o controle, em seu método de fundição, por análise de variância. Ambos os testes foram feitos utilizando nível de significância de 5%.

A avaliação da biocompatibilidade dos metais e das ligas no período de 48 horas é apresentado no Gráfico 1. Não houve diferença significativa entre os métodos de fundição pelo qual as ligas foram fundidas, sendo os valores de p apresentados na tabela 3. Ao se comparar os metais e ligas com o controle, não houve diferença significativa entre os materiais e os poços controle, tanto para os materiais fundidos por chama ($p=0,140$) como aqueles fundidos por plasma ($p=0,135$). No período de 18 dias, o método de fundição da liga ou metal não foi significativo (valores de p na tabela 3) para a citotoxicidade das células, mas ao se comparar os materiais fundidos por chama de gás O_2 e o controle, foi encontrada diferença significativa entre os materiais e o controle ($p=0,0000$), sendo que todas as ligas foram piores do que o controle. A liga à base de Ni-Cr apresentou resultados melhores e estatisticamente diferentes de todas as outras ligas, exceto a liga à base de Co-Cr-Mo-W, que era estatisticamente semelhante a ela e todas as outras ligas, mas diferente da liga de Ni-Cr-Be, que apresentava resultados inferiores às ligas de Ni-Cr e Co-Cr-Mo-W ($p=0,0000$). Ao se comparar os materiais fundidos por plasma e o controle, Ti6Al4V e Ti6Al4V apresentaram resultados estatisticamente semelhantes ao controle e diferentes de todas as

outras ligas, exceto da liga à base de Ni-Cr, que por sua vez, foi semelhante a todas as outras, exceto a liga à base de Ni-Cr-Ti Vi Star que tinha resultados inferiores à liga de Ni-Cr ($p=0,0000$).

Tabela 3. Comparação dos métodos de fundição por teste estatístico de Student.

Valores de p ao comparar os métodos de fundição (plasma e chama de gás oxigênio) para a citotoxicidade		
	48 horas	18 dias
Ni-Cr-Be	$p= 0,626$	$p= 0,999$
Ni-Cr	$p= 0,626$	$p= 0,230$
Co-Cr-Mo	$p= 0,200$	$p= 1,000$
Co-Cr-Mo-W	$p= 0,107$	$p= 0,196$
Ni-Cr-Ti(TO)	$p= 0,163$	$p= 0,582$
Ni-Cr-Ti(VS)	$p= 0,463$	$p= 0,917$

* Valores de $p < 0,05$ indicam diferença significativa

Gráfico 1. Efeito da composição e método de fundição sobre a citotoxicidade das ligas e metais fundidos por plasma e por chama de gás-oxigênio em período de 48 horas após plaqueamento (n° inicial de células: $0,5 \times 10^4$ células por poço). Os resultados são expressos como número de células $\times 10^4$ por poço.

Gráfico 2. Efeito da composição e método de fundição sobre a citotoxicidade das ligas e metais fundidos por plasma e por chama de gás-oxigênio em período de 18 dias após plaqueamento (n° inicial de células: $0,5 \times 10^4$ células por poço). Os resultados são expressos como número de células $\times 10^4$ por poço.

A viabilidade celular foi comparada da mesma forma que a citotoxicidade dos materiais e os resultados são apresentados nos Gráficos 3 e 4. No entanto, ao se avaliar a porcentagem de células viáveis no período de 48 horas (Gráfico 3), o método de fundição foi significativo para a citotoxicidade das ligas de Ni-Cr-Ti, tanto para a Tilite Ômega ($p=0,03$) como para a Vi Star ($p=0,001$), enquanto não influenciou os outros materiais, cujos valores de p são apresentados na Tabela 4. A comparação da viabilidade celular entre as ligas e metais fundidos por chama de gás oxigênio e o controle não apresentou diferenças significativas ($p=0,1400$), assim como os materiais fundidos por plasma e o controle ($p=0,1350$). No período de 18 dias, as ligas e metais fundidos pelos dois métodos não foram diferentes, assim como a comparação entre as ligas e metais com o controle, tanto nos materiais fundidos por chama de gás oxigênio ($p=0,9521$) como nos fundidos por plasma ($p=0,9990$).

Tabela 4. Comparação dos métodos de fundição por teste estatístico de Student

Valores de p ao comparar os métodos de fundição (plasma e chama de gás oxigênio) para a viabilidade celular		
	48 horas	18 dias
Ni-Cr-Be	$p= 0,491$	$p= 0,107$
Ni-Cr	$p= 0,738$	$p= 0,337$
Co-Cr-Mo	$p= 0,729$	$p= 0,478$
Co-Cr-Mo-W	$p= 1,000$	$p= 0,334$
Ni-Cr-Ti(TO)	$p= 0,030^*$	$p= 0,731$
Ni-Cr-Ti(VS)	$p= 0,001^*$	$p= 0,910$

* Valores de $p < 0,05$ indicam diferença significativa

Gráfico 3. Efeito da composição e método de fundição das ligas e metais fundidos por plasma e por chama de gás oxigênio sobre a viabilidade celular em período de 48 horas após plaqueamento (n° inicial de células: $0,5 \times 10^4$ células por poço). Os resultados são expressos como porcentagem de células viáveis.

Gráfico 4. Efeito da composição e método de fundição das ligas e metais fundidos por plasma e por chama de gás oxigênio sobre a viabilidade celular em período de 18 dias após plaqueamento (n° inicial de células: $0,5 \times 10^4$ células por poço). Os resultados são expressos como porcentagem de células viáveis.

Efeito dos ciclos térmicos sobre a citotoxicidade

Para avaliar o efeito da variação de temperatura sobre a citotoxicidade, através de testes em extratos, saliva artificial foi utilizada como veículo de extração. Para isso foi necessário determinar o tempo de contato das células com a saliva, utilizada como extrato. Assim, foi realizado um experimento em que a saliva foi deixada em contato com as células em diferentes períodos de tempo, para avaliar se a saliva por si só não era citotóxica e qual o tempo pelo qual ela poderia ser utilizada como extrato sem ser crítica. Foi avaliada a possibilidade de se utilizar saliva diluída em meio de cultura (MC/S) e saliva na concentração de 100%(S). Os resultados mostraram que não havia diferença significativa para o número de células contados em cada poço, entre os tempos testados e o controle, exceto para a saliva utilizada durante 24 horas ($p=0,0003$). Os resultados são apresentados no Gráfico 5. Neste experimento foi avaliada também a viabilidade celular, cujos resultados são apresentados no Gráfico 6. Os resultados foram submetidos a testes estatístico de Análise de Variância e apontaram que não havia diferença estatisticamente significativa na viabilidade celular ($p=0,8596$). A partir destes resultados, foi determinado que a saliva seria deixada em contato com as células durante 6 horas e a utilização da saliva na concentração de 100% foi escolhida ao invés de utilizar a saliva diluída em meio de cultura, pois a primeira situação se aproximava mais da encontrada na boca.

Outro experimento foi realizado para verificar se a saliva submetida aos ciclos térmicos e mantida em 37°C durante o período de realização da termociclagem não alterava o comportamento biológico. Para isso, foram testadas: saliva, saliva submetida aos ciclos térmicos durante os 24 dias, saliva mantida em 37°C durante o mesmo período e o meio de

Gráfico 5. Experimento piloto para determinação do tempo de contato com a saliva com a cultura de células em período de 10 dias após plaqueamento (n° inicial de células: $1,5 \times 10^4$ células por poço). Avaliação da citotoxicidade. Os resultados são expressos em n° de células x 10^4 por poço.

Gráfico 6. Experimento piloto para determinação do tempo de contato com a saliva com a cultura de células em período de 10 dias após plaqueamento (n° inicial de células: $1,5 \times 10^4$ células por poço). Avaliação da viabilidade celular. Os resultados são expressos como porcentagem de células viáveis.

Gráfico 7. Efeito da saliva, da saliva mantida em 37°C e saliva termociclada sobre a citotoxicidade em período de 10 dias após plaqueamento (n° inicial de células: $1,5 \times 10^4$ células por poço). Os resultados são expressos como número de células $\times 10^4$ por poço.

Gráfico 8. Efeito da saliva, da saliva mantida em 37°C e saliva termociclada sobre a viabilidade celular em período de 10 dias após plaqueamento (n° inicial de células: $1,5 \times 10^4$ células por poço). Os resultados são expressos como porcentagem de células viáveis.

cultura utilizado DMEM-F12. Após período de 10 dias em cultura, quando havia confluência nos poços, os quatro extratos descritos acima foram colocados em cultura e os resultados são apresentados nos Gráfico 7, pela citotoxicidade e Gráfico 8, pela viabilidade celular.

Os resultados do Gráfico 7 demonstram que não há diferença estatisticamente significativa entre as condições a que a saliva foi submetida e o meio de cultura, com relação à sua citotoxicidade ($p=0,3299$), determinando que a saliva fosse utilizada como controle. No entanto, a viabilidade celular (Gráfico 8) apresentou resultados significativamente diferentes e menores para a saliva e a saliva termociclada em relação à saliva mantida em 37°C e o meio de cultura ($p=0,0067$).

O efeito dos ciclos térmicos sobre a citotoxicidade e viabilidade celular são apresentados nos Gráficos 9 e 10 respectivamente. Os resultados da citotoxicidade, quando submetidos a teste estatístico, não apresentaram diferenças significativas ao comparar os extratos provenientes dos materiais na condição termociclada ($p=0,5393$). No entanto, em 37°C houve diferença significativa entre a liga de Ni-Cr e todos os outros extratos, exceto o extrato de Ti cp; e este se mostrou diferente do controle e das ligas de Co-Cr-Mo e Ni-Cr-Ti, mas semelhante a todos os outros grupos. Ao se comparar o extrato de cada material nas duas condições de temperatura ao controle, não houve diferença significativa para a liga de Ni-Cr ($p=0,1229$), Co-Cr-Mo ($p=0,9482$), Ticp ($p=0,1009$) e Ti-6Al-4V ($p=0,3000$), sendo a diferença significativa somente para a liga de Ni-Cr-Ti ($p=0,0229$), em que a variação de temperatura apresentou resposta mais citotóxica.

Ao se avaliar a viabilidade celular, assim como na citotoxicidade, os extratos provenientes dos materiais na condição termociclada não apresentaram diferenças significativas ($p=0,3956$), enquanto os extratos mantidos em 37°C foram diferentes ($p=0,0000$), sendo as ligas de Co-Cr-Mo e Ni-Cr-Ti semelhantes e melhores do que todas as

Gráfico 9. Efeito dos ciclos térmicos sobre a citotoxicidade dos extratos, em período de 10 dias após plaqueamento (n° inicial de células: $1,5 \times 10^4$ células por poço). Os resultados são expressos como número de células x 10^4 por poço.

Gráfico 10. Efeito dos ciclos térmicos sobre a viabilidade celular dos extratos, em período de 10 dias após plaqueamento (n° inicial de células: $1,5 \times 10^4$ células por poço). Os resultados são expressos como porcentagem de células viáveis.

outras, inclusive o controle; e a liga de Ni-Cr foi diferente da liga Ti-6Al-4V. A comparação dos extratos de cada material nas diferentes condições de temperatura demonstrou não haver diferença significativa na liga de Ni-Cr ($p=0,0833$), Ticp ($p=0,6553$) e Ti-6Al-4V ($p=0,2402$), mas apresentou diferença de viabilidade entre o extrato da liga de Co-Cr-Mo ($p=0,0216$) mantida em 37°C e o controle, sendo a viabilidade menor no controle; e na liga de Ni-Cr-Ti ($p=0,0001$), o extrato da liga mantida em 37°C foi diferente e com maior viabilidade do que o extrato submetido aos ciclos térmicos e o controle.

6. DISCUSSÃO

A utilização de cultura de células vem sendo utilizada como parte de uma série de testes recomendados para avaliar o comportamento biológico dos materiais a serem colocados em contato com tecidos humanos. Neste estudo, testes de citotoxicidade seguindo as normas da ISO foram realizados para se fazer um levantamento da biocompatibilidade de ligas à base de metais básicos atualmente disponíveis no mercado odontológico brasileiro.

Embora o profissional tenha em mente que os materiais disponíveis no mercado sejam biocompatíveis, pois precisaram passar por uma série de testes prévios ao uso (NELSON, WATAHA & LOCKWOOD, 1999), um levantamento a respeito do comportamento biológico destes materiais se faz necessário pela dificuldade do profissional em selecionar um material, devido à variedade de materiais disponíveis no mercado, além de que o período pelo qual os materiais são formulados, testados e comercializados é cada vez mais curto, diante da exigência e competitividade do mercado.

A decisão dos fabricantes de testar os materiais de acordo com padrões nacionais e internacionais é voluntária e materiais utilizados em períodos inferiores a três anos fornecem poucas informações a respeito do seu desempenho clínico (ANUSAVICE, 2005).

Por serem as células epiteliais da mucosa bucal que estarão em contato com as ligas e metais utilizados para fundição de peças protéticas, seja em contato direto com a superfície destes materiais ou em contato indireto, por intermédio de resíduos que se solubilizam em saliva, estas foram as células de escolha para esta avaliação, embora estudos prévios tenham avaliado a biocompatibilidade de ligas metálicas com fibroblastos (CRAIG & HANKS, 1990; WANG & LI, 1998; NELSON, WATAHA & LOCKWOOD, 1999; GRILL et al, 2000; WATANABE et al, 2004).

Embora a linhagem de células utilizada seja proveniente de um carcinoma, a utilização de culturas primárias obtidas por explantes apresenta resultados menos reproduzíveis devido a diferenças provenientes de sexo, idade e outros parâmetros individuais peculiares do doador (GRILL et al., 2000; HORNEZ et al., 2002). Assim, a utilização de uma linhagem da ATCC possibilita reproduções. No entanto, é preciso levar em consideração as diferenças comportamentais de uma linhagem de célula contínua proveniente de um tumor, quando comparada a uma linhagem de célula finita, proveniente de uma cultura primária. As células tumorais são fenotipicamente heterogêneas e instáveis, apresentam variações no número de cromossomos, freqüentemente param de expressar genes específicos do tecido e apresentam tempo de duplicação menor. No entanto, não apresentam tempo de vida finita nem mudança de características decorrentes do envelhecimento *in vitro* (Mac DONALD, 2002).

Apesar da resposta citotóxica ser afetada pelo número da passagem no estudo realizado por Wataha, Hanks & Sun em 1994, os números de passagens comparadas foram o 4 e o 275, diferente do presente estudo que utilizou células entre a 30^o e 32^o passagens.

Os resultados encontrados nos testes de citotoxicidade dos materiais fundidos por dois diferentes métodos evidenciam que as ligas e metais não apresentam diferenças após um período de 48 horas, mas podem ser significativamente diferentes após dezoito dias em cultura, o que está de acordo com os resultados de Wataha, Lockwood & Nelson (1999), que alertam sobre a cautela necessária ao se utilizar períodos inferiores a uma semana para avaliar a citotoxicidade e a liberação de íons das ligas e metais, pelo fato destas não obedecerem um padrão na liberação de íons quando imersas em meio de cultura. Assim, é possível justificar a diferença de biocompatibilidade entre os materiais ao serem avaliados em 48 horas e dezoito dias. É provável que o período de 48 horas tenha sido insuficiente para

que as células pudessem manifestar comportamento diferente, tal como acontece aos dezoito dias. Desta forma, é possível justificar o comportamento semelhante das ligas, do Ti cp e do controle em um primeiro instante. Wataha et al. (1999) ao avaliarem a citotoxicidade de ligas por períodos mais longos, de até oito meses, concluíram que, a partir de uma semana em cultura, as células apresentavam resultados semelhantes durante os oito meses e por isso testes realizados em períodos de sete dias poderiam ser ferramentas úteis para se prever resultados por períodos prolongados. Assim, é possível afirmar que a avaliação da biocompatibilidade dos metais aos dezoito dias possibilita estimar o comportamento destes materiais por longo prazo.

É importante ressaltar que segundo pesquisa realizada por Nelson, Wataha & Lockwood (1999) e Wataha, Nelson & Lockwood (2001), a liberação de elementos metálicos das ligas em meio de cultura D-MEM foi mais baixa do que em solução salina com albumina de soro bovino, que simula o meio fisiológico e esta diferença se deve à proteína presente nesses meios. Baseado neste estudo poder-se-ia pensar que o meio de cultura geraria uma liberação de elementos inferior à situação *in vivo*, pois a solução que simulou o meio fisiológico foi mais degradante. No entanto, faltam subsídios para transportar tal comparação para as condições *in vivo*, visto que na boca há uma série de outros fatores que interfeririam na degradação, como a variação de pH, a presença de placa bacteriana, restaurações com diferentes metais, o atrito durante a mastigação e a escovação, que alteram a camada passiva constantemente, além de que a saliva seria o meio fisiológico presente, cuja composição é diferente dos meios estudados por estes autores.

A comparação dos métodos de fundição não apresentou diferença significativa na biocompatibilidade, embora máquinas de fundição especiais sejam apontadas como mais vantajosas para a fundição por haver menor contaminação e menos tempo ser gasto durante o

processo de fundição (Harcourt & Cotterill, 1965). O fato de ter sido utilizada uma máquina de fundição por arco voltaico, neste estudo, talvez justifique o comportamento semelhante da biocompatibilidade frente aos dois métodos, pois Anusavice (2005) relata que nestas máquinas a temperatura da liga pode exceder 4000°C, com alto risco de superaquecimento da liga e conseqüente estrutura granular grosseira, risco este semelhante ao da fundição por chama de gás-oxigênio.

Apesar da viabilidade celular das ligas de Ni-Cr-Ti em 48 horas ter demonstrado ser influenciada pelo método de fundição, sendo maior para as fundições por chama de gás oxigênio, a proliferação celular é apontada por Bumgardner, Lucas & Tilden (1989) e Messer & Lucas (1999) como mais sensível do que a viabilidade celular. No entanto, a diminuição da viabilidade em 48 horas pode ser decorrente de desaceleração do ciclo celular em decorrência de energia ou morfologia de superfície desfavorável. Hornez et al. (2002) relatam a dificuldade em se estabelecer correlação entre proliferação e testes de viabilidade, pois devido à dificuldade em se controlar parâmetros como energia de superfície e adesão celular, é difícil estabelecer se a diminuição do número de células é decorrente de morte celular, redução na divisão celular ou desaceleração do ciclo celular. Assim, o método de fundição não interfere na biocompatibilidade das ligas e metais testados, alterando somente a viabilidade celular das ligas de Ni-Cr-Ti em período de 48 horas. Estes resultados estão de acordo com os de Mulders, Darwish & Holze (1996), que não encontraram diferença na resistência à corrosão das ligas de Ni-Cr e Co-Cr fundidas por diferentes métodos.

Os resultados do Ti cp e da liga Ti-6Al-4V semelhantes ao controle no período de 18 dias confirma a biocompatibilidade destes materiais em cultura de células epiteliais e está de acordo com os resultados encontrados por Wang & Li (1998) e Watanabe et al. (2004),

que testaram ligas a base de titânio e Ti cp em culturas de fibroblastos da linhagem L929 e Balb/c 3T3.

A liga à base de Ni-Cr, apesar de não ser uma liga nobre e ter se mostrado inferior ao controle, apresentou resultados semelhantes ao Ti cp e Ti-6Al-4V na fundição por plasma e os melhores resultados da fundição por chama, sendo superior às outras ligas. Tal comportamento pode ser atribuído ao conteúdo de cromo, que leva à formação de uma camada passiva de óxido de cromo, que aumenta a resistência à corrosão da liga, segundo Craig & Hanks (1990) e Mareci et al. (2005). No entanto, ao se adicionar berílio nestas ligas, a camada de óxido formada não é homogênea, apresentando áreas ricas em cromo e outras deficientes, sendo as últimas mais propensas a perder maior concentração de íons, razão apontada por Messer & Lucas (2000) para a baixa biocompatibilidade destas ligas. Além disso, é preciso considerar a liberação de berílio, um metal altamente citotóxico, destas ligas.

A adição de titânio às ligas de Ni-Cr na tentativa de melhorar sua resistência à corrosão não foi efetiva ao se avaliar a biocompatibilidade de tais ligas que apresentaram resultados próximos à Ni-Cr-Be. Segundo Huang (2002), a presença de titânio em conteúdo inferior a 4% não melhorou a resistência à corrosão destas ligas, mesmo que TiO fosse detectado na superfície do metal. Embora este mesmo autor afirme que, para formar uma camada de óxido passiva estável, é necessário que as ligas de Ni-Cr apresentem pelo menos 16-22% de cromo e 9-14% de molibdênio, no presente estudo estas ligas apresentavam conteúdo de cromo e molibdênio inferiores aos citados e ainda assim apresentaram baixa citotoxicidade.

Embora as ligas de cobalto-cromo-molibdênio sejam citadas na literatura como resistentes à corrosão devido à presença de cromo e molibdênio (LIN & BUMGARDNER, 2004; MARECI et al., 2005) e o níquel seja considerado o mais alergênico de todos os metais

(WOLFAARDT & PETERS, 1992), os resultados deste trabalho apresentam melhores resultados para a liga de Ni-Cr, comparada à Co-Cr-Mo e Co-Cr-Mo-W, apesar de não serem estatisticamente diferentes.

Os testes de citotoxicidade com extratos utilizados por Nelson, Wataha & Lockwood (1999), Wataha et al. (1999) e Watanabe et al. (2004) são ferramentas úteis para avaliar a citotoxicidade de ligas e metais em períodos prolongados e foram utilizados no presente estudo com o objetivo de avaliar a citotoxicidade dos metais por intermédio de um veículo em que os materiais se solubilizam, quando degradados em meio bucal. No presente estudo, o extrato possibilitou avaliar o efeito da variação de temperatura na degradação dos materiais por colocar os extratos, provenientes das duas diferentes condições de temperatura, em cultura de células.

Antes da utilização da saliva como extrato, a avaliação da saliva em diferentes períodos demonstrou que a saliva poderia ser utilizada com segurança como extrato dos testes de citotoxicidade em extratos, pois não era citotóxica nem menos viável do que o controle, podendo ser utilizada como controle. No entanto, na realização dos experimentos, a saliva apresentou comportamento diferente do estudo prévio, em termos de viabilidade celular, embora a saliva tenha sido preparada no mesmo laboratório e seguindo os mesmos procedimentos para ambos os experimentos.

Ao comparar as diferentes condições de temperatura sobre a citotoxicidade, somente a liga de Ni-Cr-Ti apresentou piores resultados para os materiais submetidos aos ciclos térmicos. Tal resultado sugere que a liga de Ni-Cr-Ti possa ser mais susceptível a degradação diante das variações de temperatura presentes no meio bucal, mas é preciso cautela e maiores investigações, como avaliação química da saliva em que os materiais ficaram imersos, para averiguar se de fato há uma maior degradação. Com relação à viabilidade celular, são

encontradas algumas diferenças com relação ao controle, mas como a saliva, utilizada como controle, se comportou diferente neste experimento, as diferenças encontradas na viabilidade celular são questionáveis.

Uma comparação dos extratos provenientes de cada metal ou liga metálica em 37°C ou na condição termociclada também foi possível por este experimento e demonstrou que não havia diferença entre os extratos na condição termociclada, tanto na citotoxicidade como na viabilidade celular. Já em 37°C, o comportamento da liga de Ni-Cr esteve entre os piores, sendo acompanhado pelo Ticp. As ligas de Ni-Cr-Ti e Co-Cr-Mo apresentaram bons resultados, semelhante ao controle.

Diferente do experimento que avaliou a biocompatibilidade dos materiais por contato direto, os piores resultados encontrados nos testes em extratos foram para o Ti cp e a liga de Ni-Cr. Há várias hipóteses para tal diferença, como a diferença de pH do meio de cultura e da saliva, utilizada como veículo de extração, pois há estudos afirmando que a diminuição do pH aumenta a liberação de íons em ligas à base de níquel (Wataha et al, 1998). Embora não haja estudos comparando a liberação de metais em saliva e meio de cultura, um estudo de Brune (1986) relata que a liberação de metais em saliva é maior do que em solução salina. Além disso, é preciso considerar que nos testes em extratos há acúmulo dos metais solubilizados no extrato, enquanto no teste de contato direto, o meio de cultura e os elementos solubilizados são removidos a cada troca do meio de cultura. No entanto, apesar das diferenças encontradas no presente estudo, outras investigações parecem necessárias para verificar os elementos liberados na saliva durante o período de imersão, para que a toxicidade encontrada neste estudo seja averiguada.

Segundo Diniz et al (2005), a alumina residual do jateamento só é removida com tratamento em solução à base de ácido fluorídrico. Lautenschlager & Monaghan (1993)

recomendam pó abrasivo de óxido de titânio ou solução de Kroll para polimento de titânio. Apesar do Ti cp e da liga Ti-6Al-4V terem recebido polimento metalográfico, com uma solução à base de sílica e água oxigenada, seguindo as recomendações da Struers, é sabido que tal polimento não é capaz de remover contaminantes de superfície se estes estiverem presentes. Assim, outros estudos são necessários para verificar a presença de resíduos de revestimento, resíduos do jateamento com alumina ou de materiais de polimento na solução em que os materiais estiveram imersos, o que poderia estar interferindo nos resultados encontrados.

A comparação dos extratos provenientes das ligas não apresenta resultados conclusivos, sugerindo que outras investigações sobre a degradação destes materiais utilizando saliva como extrato sejam realizadas.

7. CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que o Ti cp e a liga Ti-6Al-4V não são citotóxicas, em cultura de células epiteliais da mucosa bucal, seguidas pela liga de Ni-Cr. As ligas de Co-Cr-Mo e Co-Cr-Mo-W apresentam citotoxicidade intermediária, seguidas pelas ligas de Ni-Cr-Ti; e a liga de Ni-Cr-Be demonstra ser citotóxica.

- O método de fundição não interfere na citotoxicidade dos materiais estudados, exceto na viabilidade celular das ligas de Ni-Cr-Ti.
- A variação de temperatura interfere somente na citotoxicidade da liga de Ni-Cr-Ti, mas outras investigações são necessárias para se afirmar com segurança se há maior degradação desta liga diante das variações de temperatura do meio bucal.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELL, R.; LEKHOLM, U.; ROCKLER, B.; BRANEMARK, P.I.. A 15-year study of Osseo integrated implants in the treatment of the edentulous jaw. **International Journal of Oral Surgery**, v. 6, n 10, p. 387 – 416. 1981.

AHMED, T.; RACK, H.J. Phase transformations during cooling in $\alpha + \beta$ titanium alloys. **Materials Science and Engineering**, v. A243, p. 206-211. 1998.

AKSÜT, A.A., BAYRAMOGLU, G. The effect of propargly alcohol on the pure aluminum and aluminum alloys in aqueous solutions. **Corrosion Science**, v. 36, p. 415. 1994.

AKSÜT, A.A., BILGIÇ, S. The effect of amino acids on the corrosion of nickel in H₂SO₄. **Corrosion Science**, v. 33, p. 379. 1992.

AL-HIYASAT, A.S.; DARMANI, H. The effects of recasting on the cytotoxicity of base metal alloys. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v.93, n.2, p.158-163, Feb. 2005.

ANUSAVICE, K.J. **Materiais Dentários de Phillips**. 11^a ed, Rio de Janeiro, Elsevier, 2005.

BAYRAMOGLU, G., ALEMDAROGLU, T.; KEDICI, S.; AKSÜT, A.A. The effect of ph on the corrosion of dental metal alloys. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 27, n. 7, p. 563-575. 2000.

BEZZON, O.L.; de MATTOS, M.G.C.; RIBEIRO, R.F.; ROLLO, J.M.D.A. Effect of beryllium on the castability and resistance of ceramometal bonds in nickel-chromium alloys. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v.80, p.570-574. 1998.

BEZZON, O.L.; RIBEIRO, R.F.; ROLLO, J.M.D.A.; CROSARA, S. Castability and resistance of ceramometal bonding in Ni-Cr and Ni-Cr-Be alloys. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v.85, n.3, p.299-304, March. 2001.

BOSS, J.H.; SHAJRAWI, I.; AUNULLAH, J.; MENDES, D.G. The relativity of biocompatibility. A critique of the concept of biocompatibility. **Israel Journal of Medical Sciences**, v. 31, p. 203-209. 1995.

BRÄNEMARK, P., ADELL, R., ALBREKTSSON, T. Osseointegrated titanium fixtures in the treatment of edentulous ness. **Adv Biomaterials**, v. 4, p. 133-141. 1983.

BRÄNEMARK, P.; HANSSON, I.; ADELL, R.; BREINE, U.; LINDSTROM, J.; HALLEN, O.; OHMAN, A. Osseo integrated implants in the treatment of the edentulous jaw, experience from a 10 - year period. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery**, v.11, suppl 16, 1977.

BRUNE, D. Metal release from dental biomaterials. **Biomaterials**, v. 7 n. 3, p. 193-175. 1986.

BUMGARDNER, J.D.; LUCAS, L.C.; TILDEN, A.B. Toxicity of copper-based dental alloys in cell culture. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 23, p. 1103-1114. 1989.

CAI, Z., VERMILYEA, S.G., BRANTLEY, W.A. *In vitro* corrosion resistance of high-palladium dental casting alloys. **Dental Materials**, v. 15, n. 3, p. 202-210, 1999.

CANAY, S.; HERSEK, N.; ÇULHA, A.; BILGIÇ, S. Evaluation of titanium in oral conditions and its eletrochemical corrosion behaviour. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 25, p. 759-764. 1998.

CARTER, T.J.; KIDD, J.N. The precision casting of cobalt-chromium alloy-Part II-The influence of casting on microstructure and mechanical properties. **British Dental Journal**, v.118, n.9, p.431-436, May. 1965.

CHAN, D.; GUILLORY, V.; BLACKMAN, R.; CHUNG, K.H. The effect of sprue design on the roughness and porosity of titanium castings. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 78, p. 400-404. 1997.

COSTA, M. Molecular mechanisms of nickel carcinogenesis. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 31, p. 321-37. 1991.

CRAIG, R.G. **Restorative Dental Materials**. 9 ed., St Louis, Mosby-Year Book Inc, 1993.

CRAIG, R.G.; HANKS, C.T. Cytotoxicity of experimental casting alloys evaluated by cell culture tests. **Journal of Dental Research**, v. 69, n.8, p. 1539-1542, Aug. 1990.

DE MELO, J.F.; GJERDET, N.R.; ERICHSEN, E.S. Metal release from cobalt-chromium partial dentures in the mouth. **Acta Odontology Scandinavian**, v. 41, p. 71-74. 1983.

DINIZ, M.G.; PINHEIRO, M.A.S.; ANDRADE Jr., A.C.C.; FISCHER, R.C. Characterization of titanium surfaces for dental implants with inorganic contaminant. **Brazilian Oral Research**, v.19, n.2, p.106-111, April/June. 2005.

EARNSHAW, R. Cobalt-chromium alloy in Dentistry. **British Dental Journal**, v.101, n.3, p.67-75, August. 1956.

EL MEDAWAR, L.; ROCHER, P.; HORNEZ, J.C.; TRAISNEL, M.; BREME, J.; HILDEBRAND, H.F. Eletrochemical and cytocompatibility assessment of NiTiNOL memory shape alloy for orthodontic use. **Biomolecular Engineering**, v.19, p. 153-160. 2002.

ERICSSON, I.; LEKHOLM, U.; BRÄNEMARK, P.; LINDHE, J.; GLANTZ, P.O.; NYMAN, S. A clinical evaluation of fixed bridge restorations supported by the combination of teeth and osseointegrated titanium implants. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 13, p. 307-312. 1986.

ES-SOUNI, M.; BRANDIES, H.F.; ES-SOUNI, M. On the *in vitro* biocompatibility of Elgiloy, a Co-Based alloy, compared to two titanium alloys. **Journal of Orofacial Orthopedics**, v.64, n.1, p. 16-26. 2003.

FACCIONI, F.; FRANCESCHETTI, P.; CERPELLONI, T.A.M.; FRACASSO, M.E. *In vivo* study on metal release from fixed orthodontic appliances and DNA damage in oral mucosa

cells. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v.124, n.6, p.687-693, December. 2003.

FERENCZI, A.M.; DEMRI, B.; MORITZ, M.; MUSTER, D. Casted titanium for dental applications: an XPS and SEM study. **Biomaterials**, v. 19, p. 1513-1515. 1998.

GALE, M.S.; DARVELL, B.W. Thermal cycling procedures for laboratory testing of dental restorations. **Journal of Dentistry**, v.27, p.89-99. 1999

GEIS-GERSTOFER, J. *In vitro* corrosion measurements of dental alloys. **Journal of Dentistry**, v. 22, p. 247-251. 1994.

GRILL, V.; SANDRUCCI, M.A.; BASA, M.; DI LENARDA, R.; DORIGO, E.; NARDUCCI, P.; MARTELLI, A.M.; DELBELLO, G.; BAREGGI, R. The influence of dental metal alloys on cell proliferation and fibronectin arrangement in human fibroblast cultures. **Archives of Oral Biology**, v.42, n.9, p. 641-647. 1997.

GRILL, V.; SANDRUCCI, M.A.; DI LENARDA, R.; BASA, M.; NARDUCCI, P.; MARTELLI, A.M.; BAREGGI, R. *In vitro* evaluation of the biocompatibility of dental alloys: Fibronectin expression patterns and relationships to cellular proliferation rates. **Quintessence International**, v.31, n.10, p.741-747. 2000.

GRILL, V.; SANDRUCCI, M.A.; DI LENARDA, R.; CADENARO, M.; NARDUCCI, P.; BAREGGI, R.; MARTELLI, A.M. Biocompatibility evaluation of dental metal alloys *in vitro*: expression of extracellular matrix molecules and its relationship to cell proliferation rates. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.52, p. 479-487. 2000.

HANKS, C.T.; WATAHA, J.C.; SUN, Z. *In vitro* models of biocompatibility: a review. **Dental Materials**, v. 12, p. 186-193, May. 1996.

HARCOURT, H.J.; COTTERILL, W.F. Induction melting of cobalt-chromium alloys. A comparisons with flame melting. **British Dental Journal**, v.118, n.8, p.323-329, April. 1965.

HARCOURT, H.J.; RIDDIHOUGH, M.; OSBORNE, J. The properties of nickel-chromium casting alloys containing boron and silicon. **British Dental Journal**, v. 129, n.3, p.419-423, November. 1970.

HÄSSEUS, B.; JONTELL, M.; BERGENHOLTZ, G.; EKLUND, C.; DAHLGREN, U.I. Langerhans cells from oral epithelium are more effective in stimulating allogenic t-cells *in vitro* than Langerhans cells from skin epithelium. **Journal of Dental Research**, v. 78, p. 751-8. 1999.

HENSTEN-PETTERSEN, A. Casting alloys: side effects. **Advanced Dental Research**, v.6, p. 38-43, Sep. 1992.

HOPP, M.; ROGASCHEWSKI, S.; GROTH, T.H. Testing of cytotoxicity of metal alloys used as magnetic prosthetic devices. **Journal of Materials Science**, v.14, p. 335-345. 2003.

HORATH, L. **Fundamentals of materials science for technologists: properties, testing and laboratory exercises.** New Jersey, Prentice Hall Inc., 1995.

HORNEZ, J.C.; LEFRÈVE, A.; JOLY, D.; HILDEBRAND, H.F. Multiple parameter cytotoxicity index on dental alloys and pure metals. **Biomolecular Engineering**, v. 19, p. 103-117. 2002.

HSU, H.C., YEN, S.K. Evaluation of metal ion release and corrosion resistance of ZrO₂ thin coatings on the dental Co-Cr alloys. **Dental Materials**, v. 5, n.14, p. 339-346, Sep. 1998.

HUANG, H.H. Effect of chemical composition on the corrosion behavior of Ni-Cr-Mo dental casting alloys. **Journal Biomedical Materials Research**, v.60, p. 458-465. 2002.

International Organization for Standardization. ISO 10993-5 Biological evaluation of medical devices- Part 5: Tests for cytotoxicity: *in vitro* methods, Switzerland, 1992.

JACOBSEN, N.; AASENDEN, R.; HENSTEN-PETTERSEN, A. Occupational health complaints and adverse patient reactions as perceived by personnel in public dentistry. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 19, p. 155-9. 1991.

JONES, D.W. Some chemical aspects of oxyacetylene flame. **Dental Technician**, v. 10, p. 89-95. 1960.

JONES, T.K.; PINNELL, D.C.; NETTI, C.A. Erosive lichen planus exacerbated by full-metal restorations. **General Dentistry**, v. 39, p. 28-30. 1991.

KANSU, G.; AYDIN, A.K. Evaluation of the biocompatibility of various dental alloys: Part 1-Toxic potentials. **European Journal of Prosthodontics and Restorative Dentistry**, v.4, n.3, p.129-136. 1996.

KEDICI, S.P.; ABBAS AKSÜT, A.; ALI KİLİÇARSLAN, M.; BAYRAMOĞLU, G.; GÖKDEMİR, K. Corrosion behaviour of dental metals and alloys in different media. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 25, p. 800-808. 1998.

KELLY, J.R.; ROSE, T.C. Nonprecious alloys for use in fixed prosthodontics: a literature review. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v.49, n.3, p.363-370. 1983.

LAUTENSCHLAGER, E.P.; MONAGHAN, P. Titanium and titanium alloys as dental materials. **International dental Journal**, v. 43, p. 245-253. 1993.

LEINFELDER, K.; LEMMONS, J.E. **Clinical restorative materials and techniques.** Philadelphia, Lea & Febiger, 1988.

LEWIS, A.J. The effect of variations in the technique of metal fusion on the development of internal porosity in cast structures. **Australian Dental Journal**, v.22, n.5, p.357-359, October. 1977.

LIN, H.Y.; BUMGARDNER, J.D. Changes in the surface oxide composition of Co-Cr-Mo implant alloy by macrophage cells and their released reactive chemical species. **Biomaterials**, v. 25, p. 1233-1238. 2004.

LINEZ-BATAILLON, P.; MONCHAU, F.; BIGERELLE, M.; HILDEBRAND, H.F. In vitro MC3T3 osteoblast adhesion with respect to surface roughness of Ti6Al4V substrates. **Biomolecular Engineering**, v. 19, n.2-6, p.133-141, August. 2002.

LYGRE, H. Prosthodontic biomaterials and adverse reactions: a critical review of the clinical and research literature. **Acta Odontology Scandinavian**, v. 60, p. 1-9. 2002.

MARECI, D.; NEMTOI, G.H.; AELENEI, N.; BOCANU, C. The eletrochemical behaviour of various non-precious Ni and Co based alloys in artificial saliva. **European Cells and Materials**, v. 10, p.1-7. 2005.

Mac DONALD, C. Primary culture and the establishment of cell lines. In: DAVIS, J.M. **Basic cell culture: a practical approach**. 2 ed, New York: Oxford University Press, 2002. Cap.6, p.191-226.

MESSER, R.L.W.; LUCAS. Evaluations of metabolic activities as biocompatibility tools: a study of individual ions' effects on fibroblasts. **Dental Materials**, v.15, p.1-6. 1999.

MESSER, R.L.W.; LUCAS, L.C. Cytotoxicity of nickel-chromium alloys: bulk alloys compared to multiple ion salt solutions. **Dental Materials**, v.16, p.207-212. 2000.

MJÖR, I.A. Reações adversas aos materiais de prótese dentária. In: ÖWALL, B.; KAISER, A.F.; CARLSSON, G.E. **Prótese dentária: princípios e condutas estratégicas**. São Paulo: Artes Médicas, 1997. Cap. 13, p. 179-186.

MJOR, I.; CHRISTENSEN, G.J. Assessment of local side effects of casting alloys. **Quintessence International**, v. 24, p. 343-51. 1993.

MOCKERS, O.; DEROZE, D.; CAMPS. J. Cytotoxicity of orthodontic bands, brackets and archwires *in vitro*. **Dental Materials**, v.18, p. 311-317. 2002.

MORI, T.; TOGAYA, T; JEAN-LOUIS, M.; YABUGAMI, M. Titanium for removable dentures. I, Laboratory procedures. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 24, p. 338-41. 1997.

MORRIS, H.F.; MANZ, M.; SOFFER, W.; WEIR, D. Casting alloys: the materials and the clinical effects. **Advances Dental Research**, v. 6, p. 28-31, September. 1992.

MÜLDERS, C; DARWISH, M; HOLZE, R. The influence of alloy composition and casting procedure upon the corrosion behaviour of dental alloys: an in vitro study. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 23, p. 825-831. 1996.

NAMIKOSHI, T.; YOSHIMATSU, T.; SUGA, K.; FUJII, H.; YASUDA, K. The prevalence of sensitivity to constituents of dental alloys. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 17, p. 377-81. 1990.

NELSON, S.K.; WATAHA, J.C.; LOCKWOOD, P.E. Accelerated toxicity testing of casting alloys and reduction of intraoral release of elements. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v.81, n. 6, p.715-720, June. 1999.

NOMOTO, S.; ANO, M.; ONESE, M. Microprobe for measurement of corrosion of metallic restoration of in mouth. **Journal of Dental Research**, v. 7, n. 58, p. 1688-1695. 1979.

O'BRIEN, W.J.; RYGE, G. **Materiais Dentários**. Rio de Janeiro, Interamericana, 1981.

OHKUBO, C.; WATANABE, I.; FORD, J.P.; NAKAJIMA, H.; HOSOI, T.; OKABE, T. The machinability of cast titanium and Ti-6Al-4V. **Biomaterials**, v. 21. p. 421-428. 2000.

OSBORNE, J.; LAMMIE, G.A. Some observations concerning chrome-cobalt denture bases. **British Dental Journal**, v.94, n.3, p.55-67, February. 1953.

RECLARU, L., MEYER, J.M. Study of corrosion between a titanium implant and dental alloys. **Journal of Dentistry**, v. 22, n. 3, p. 159-168. 1994.

RODRIGUES, L.E.A.; CARVALHO, A.A.V.F.; AZEVEDO, A.L.M.; CRUZ, C.B.B.V; MAIA, A.W.C. Odontologic use of copper/aluminum alloys: mitochondrial respiration as sensitive parameter of biocompatibility. **Brazilian Dental Journal**, v. 14, n.1, p.32-36. 2003.

RUPP, F.; GEIS-GERSTORFER, J.; GECKELER, K.E. dental implant materials: surface modification and interface phenomena. **Advanced Materials**, v. 8, p. 254-7. 1996.

SARKAR, N.K., FUYS, R.A., SANTFORD, J.W. Applications of electrochemical techniques to characterize the corrosion of dental alloys in Syrett B C, Acharya A (eds). **Corrosion Degradation Implant Materials ASTM**, p. 277-294. 1979.

SCHMALZ, G. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. **Clinical Oral Investigations**, v.1, p.154-162. 1997.

SCHMALZ, G.; SCHUSTER, U.; SCHWEIKL, H. Influence of metals on IL-6 release *in vitro*. **Biomaterials**, v.19, p.1689-1694. 1998.

SCOTT, A.; EGNER, W.; GAWKRODGER, D.J.; HATTON, P.V.; SHERRIFF, M.; VAN NOORT, R.; YEOMAN, C.; GRUMMITT, J. The national survey of adverse reactions to dental materials in the UK: a preliminary study by the UK Adverse Reactions Reporting Project. **British Dental Journal**, v.196, n.8, p.471-477, Apr. 2004.

SEAGLE, S.R.; YU, K.O.; GIANGIORDANO, S. Considerations in processing titanium. **Materials Science and Engineering**, v. A263, p. 237-242. 1999.

SJÖGREN, G.; SLETTEN, G.; DAHL, J. Cytotoxicity of dental alloys, metals and ceramics assessed by Milipore filter, agar overlay, and MTT tests. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v.84, n. 2, p. 229-236. 2000.

STANFORD, J. W. Recommendations for determining biocompatibility and safety for the clinical use of metals in dentistry. **International Dental Journal**, v. 36, n. 1, p. 45-48. 1986.

STENBERG, T. Release of cobalt from cobalt-chromium alloy constructions in the oral cavity of man. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v. 90. p. 472-79. 1982.

STRANDMAN, E. Influence of different types of acetylene-oxygen flames on the carbon content of a dental Co-Cr alloy. **Odontologisk Revy**, v.27, n.3, p.223-238. 1976.

SUZUKI, N. Metal allergy in dentistry: detection of allergen metals with x-ray fluorescence spectroscopy and its application toward allergen elimination. **International Journal of Prosthodontics**, v. 8, p. 351-69. 1995.

SYRJÄNEN, S.; HENSTEN-PETTERSEN, A.; KANGASNIEMI, K.; YLI-URPO, A. *In vitro* and *in vivo* biological responses to some dental alloys tested separately and in combinations. **Biomaterials**, v. 6, May. 1985.

SYVERUD, M.; DAHL, J.E.; HERO, H.; MORISBAK, E. Corrosion and biocompatibility testing of palladium alloy casting. **Dental Materials**, v. 17, p. 7-13. 2001.

TRAINI, T.; MURMURA, G.; DI LULLO, N.; CAPUTI, S. Adherence of investment to Au-Pd-Ag alloy using a vacuum-argon pressure casting machine. **Dental Materials**, v. 19, p. 732-738. 2003.

UHLIG, H.H. **Corrosion and Corrosion Control**, 4 ed, New York, John Wiley & Sons, 1967.

WANG, R.R.; LI, Y. *In vitro* evaluation of biocompatibility of experimental titanium alloys for dental restorations. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 80, n. 4, p. 495-500, Oct. 1998.

WATAHA, J.C. Biocompatibility of dental casting alloys: a review. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 83, n. 2, p. 223-234, Feb. 2000.

WATAHA, J.C. Alloys for prosthodontics restorations. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 87, n. 4, p. 351-363, Apr. 2002.

WATAHA, J.C.; HANKS, C.T.; SUN, Z. Effect of cell line on *in vitro* metal ion cytotoxicity. **Dental Materials**, v.10, p. 156-161, May. 1994.

WATAHA, J.C.; LOCKWOOD, P.E.; FRAZIER, K.B.; KHAJOTIA, S.S. Effect of toothbrushing on elemental release from dental casting alloys. **Journal of Prosthodontics**, v. 8, n. 4, p. 245-251, Dec. 1999.

WATAHA, J.C.; LOCKWOOD, P.E.; KHAJOTIA, S.S.; TURNER, R. Effect of pH on element release from dental casting alloys. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v.80, n. 6, p. 691-8, Dec. 1998.

WATAHA, J.C.; LOCKWOOD, P.C.; METTENBURG, D.; BOUILLAGUET, S. Toothbrushing causes elemental release from dental casting alloys over extended intervals. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 65, n.1, p. 180-185, Apr. 2003.

WATAHA, J.C.; LOCKWOOD, P.E.; NELSON, S.K. Initial versus subsequent release of elements from dental casting alloys. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 26, p. 798-803. 1999.

WATAHA, J.C.; LOCKWOOD, P.E.; NELSON, S.K.; RAKICH, D. In vitro cytotoxicity of dental casting alloys over 8 months. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 26, p. 379-387. 1999.

WATAHA, J.C.; LOCKWOOD, P.E. Release of elements from dental casting alloys into cell-culture medium over 10 months. **Dental Materials**, v. 14, p. 158-163, Mar. 1998.

WATAHA, J.C.; MESSER, R.L. Casting alloys. **Dental Clinics of North America**, v. 48, p. 499-512, 2004.

WATAHA, J.C.; NELSON, S.K.; LOCKWOOD, P.E. Elemental release from dental casting alloys into biological media with and without protein. **Dental Materials**, v. 17, n. 5, p. 409-414, Sep. 2001.

WATANABE, I.; WATAHA, J.C.; LOCKWOOD, P.E.; SHIMIZU, H.; CAI, Z.; OKABE, T. Cytotoxicity of commercial and novel binary titanium alloys with and without a surface-reaction layer. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 31, p. 185-189. 2004.

WEBER, H. The clinical acceptance of dental nickel-chrome alloys. **International Dental Journal**, v.33, n.1, p.49-54, March. 1983.

WHITTERS, C.J.; STRANG, R.; BROWN, D.; CLARKE, R.L.; CURTIS, R.V.; HATTON, P.V.; IRELAND, A.J.; LLOYD, C.H.; McCABE, J.F.; NICHOLSON, S.N.; SCRIMGEOUR, S.N.; SETCOS, J.C.; SHERRIFF, M.; VAN NOORT, R.; WATTS, D.C.; WOOD, D. Dental materials: 1997 literature review. **Journal of Dentistry**, v. 27, p. 401-35. 1999.

WOLFAARDT, J.F.; PETERS, E. The base metal alloy question in removable partial dentures – a review of the literature and a survey of alloys in use in Alberta. **Journal Canadian Dental Association**, v.58, n.2, Feb. 1992.

YOKEL, R.A.; McNAMARA, P.J. Aluminium toxicokinetics: an updated minireview. **Pharmacol Toxicol**, v.88, p. 159-167. 2001.

APÊNDICE

Tabela A 1. Valores originais da citotoxicidade em período de 48 horas expresso em número de células x 10⁴/poço

	IP	IC	IIP	IIC	IIP	IIC	IVP	IVC	VP	VC	VIP	VIC	VIIP	VIIP	Controle
1	0,167	0,167	0,333	0,667	0,000	0,333	0,000	0,333	0,333	0,167	0,167	0,000	0,167	0,333	0,167
2	0,333	0,167	0,167	0,500	0,500	0,167	0,667	0,167	0,167	0,000	0,000	0,500	0,333	0,167	0,667
3	0,167	0,167	0,333	0,333	0,167	0,667	0,167	0,167	0,333	0,167	0,500	0,500	0,167	0,000	0,833
4	0,167	0,333	0,333	0,167	0,167	0,167	0,500	0,000	0,333	0,333	0,167	0,167	0,500	0,167	0,667
5	0,167	0,667	0,167	0,333	0,667	0,000	0,167	0,667	0,500	0,000	0,167	0,000	0,500	0,333	0,500
Média	0,200	0,300	0,267	0,400	0,300	0,267	0,300	0,267	0,333	0,133	0,200	0,233	0,333	0,200	0,500
DP	0,075	0,217	0,091	0,190	0,274	0,253	0,274	0,253	0,118	0,139	0,183	0,253	0,167	0,139	0,167
															0,500
															0,500
															0,236

Tabela A 2. Valores originais da viabilidade celular em período de 48 horas expresso % de células viáveis

	IP	IC	IIP	IIC	IIP	IIC	IVP	IVC	VP	VC	VIP	VIC	VIIP	VIIP	Controle
1	83,333	0,000	0,000	83,333	0,000	0,000	0,000	62,500	50,000	0,000	0,000	0,000	0,000	166,667	33,333
2	83,333	0,000	0,000	83,333	55,556	62,500	222,222	0,000	0,000	0,000	0,000	214,286	100,000	83,333	0,000
3	83,333	55,556	125,000	83,333	55,556	187,500	0,000	62,500	0,000	125,000	250,000	214,286	0,000	0,000	66,667
4	0,000	55,556	0,000	41,667	55,556	0,000	55,556	0,000	0,000	125,000	0,000	71,429	100,000	0,000	66,667
5	83,333	55,556	62,500	83,333	166,667	0,000	55,556	187,500	0,000	0,000	83,333	0,000	150,000	83,333	33,333
Média	66,667	33,333	37,500	75,000	66,667	50,000	66,667	62,500	10,000	50,000	66,667	100,000	70,000	66,667	100,000
DP	37,268	30,429	55,902	18,634	60,858	81,490	91,287	76,547	22,361	68,465	108,653	108,327	67,082	69,722	33,333
															33,333
															45,833
															30,538

I- Co-Cr-Mo-W, **II-** Ni-Cr-Ti (TO), **III-** Ni-Cr-Be , **IV-** Ni-Cr, **V-** Ni-Cr-Ti (VS), **VI-** Co-Cr-Mo, **VII-** Ti cp, **VIII-** Ti-6Al-4V , **P**(Plasma) e **C**(Chama de gás oxigênio)

Tabela A 3. Valores originais da citotoxicidade em período de 18 dias expresso em número de células x 10⁴/poço

	IP	IC	IIP	IIC	IIP	IIC	IVP	IVC	VP	VC	VIP	VIC	VIIP	VIIP	Controle
1	3,333	3,833	2,667	0,833	3,167	1,500	0,333	5,167	1,833	2,667	4,833	1,167	6,167	8,000	9,833
2	3,667	5,333	2,500	0,833	1,333	0,500	10,833	5,167	0,167	2,000	2,500	1,167	8,167	6,833	8,000
3	2,000	3,833	2,667	1,000	1,833	0,833	4,333	2,333	1,500	3,000	2,667	1,167	7,333	6,833	8,500
4	2,833	2,333	0,833	1,833	2,167	0,000	6,000	6,833	1,333	1,000	2,833	1,667	9,333	9,000	10,000
5	1,833	1,500	2,833	1,833	1,833	0,000	4,333	5,167	4,167	0,333	3,667	3,667	9,667	7,167	6,667
Média	2,733	3,367	2,300	1,267	2,067	0,567	5,167	4,933	1,800	1,800	3,300	1,767	8,133	7,567	9,000
DP	0,805	1,488	0,828	0,522	0,683	0,630	3,793	1,623	1,464	1,121	0,968	1,084	1,440	0,932	10,333
															8,500
															8,854
															1,210

Tabela A 4. Valores originais da viabilidade celular em período de 18 dias expresso % de células viáveis

	IP	IC	IIP	IIC	IIP	IIC	IVP	IVC	VP	VC	VIP	VIC	VIIP	VIIP	Controle
1	60,976	89,109	79,710	52,632	129,032	205,882	3,226	84,459	64,815	111,111	121,212	56,604	47,131	79,295	84,706
2	109,756	133,663	94,203	39,474	32,258	29,412	158,065	77,703	9,259	74,074	40,404	47,170	69,672	63,877	71,529
3	42,683	69,307	94,203	26,316	72,581	88,235	64,516	30,405	55,556	120,370	75,758	56,604	69,672	70,485	75,294
4	67,073	49,505	21,739	78,947	56,452	0,000	80,645	114,865	55,556	46,296	50,505	84,906	84,016	90,308	103,529
5	60,976	34,653	101,449	78,947	64,516	0,000	51,613	77,703	157,407	18,519	85,859	169,811	96,311	70,485	54,588
Média	68,293	75,248	78,261	55,263	70,968	64,706	71,613	77,027	68,519	74,074	74,747	83,019	73,361	74,890	79,059
DP	24,918	38,569	32,568	23,538	35,794	86,752	56,309	30,255	54,228	42,933	31,822	50,540	18,408	10,213	96,000
															84,706
															81,176
															15,040

I- Co-Cr-Mo-W, **II-** Ni-Cr-Ti (TO), **III-** Ni-Cr-Be , **IV-** Ni-Cr, **V-** Ni-Cr-Ti (VS), **VI-** Co-Cr-Mo, **VII-** Ti cp, **VIII-** Ti-6Al-4V , **P**(Plasma) e **C**(Chama de gás oxigênio)

Tabela A 5. Valores originais da citotoxicidade do experimento piloto expresso em número de células x 10⁴/poço

	controle	MC/S(24h)	S(24h)	S(6h)	S(4h)	S(2h)
1	8,500	5,500	1,167	6,333	4,833	8,000
2	7,167	4,167	1,000	4,667	5,333	4,333
3	5,167	4,333	1,333	3,667	4,333	3,500
4	5,500	4,167	1,667	4,833	3,500	6,333
Média	6,583	4,542	1,292	4,875	4,500	5,542
DP	1,549	0,644	0,285	1,100	0,782	2,025

Tabela A 6. Valores originais da viabilidade celular do experimento piloto, expresso como % de células viáveis

	controle	MC/S(24h)	S(24h)	S(6h)	S(4h)	S(2h)
1	70,886	80,734	64,516	99,145	81,481	129,323
2	65,823	62,385	51,613	71,795	77,778	60,150
3	58,228	66,055	90,323	44,444	70,370	48,120
4	48,101	73,394	103,226	75,214	51,852	78,195
Média	60,759	70,642	77,419	72,650	70,370	78,947
DP	9,913	8,137	23,558	22,397	13,182	35,786

Tabela A 7. Valores originais da citotoxicidade dos testes em extratos expresso em número de células x 10⁴/poço

	CoCrMo		CoCrMo		NiCrTi-		Ti6Al4V-		Ti6Al4V-		DMEM/			
	NiCr-T	NiCr-37	-T	-37	NiCrTi-T	37	Ticp-T	Ticp-37	T	37	Saliva-T	Saliva-37	Sal Contr	H12
1	8,500	1,167	7,667	4,167	3,833	4,667	6,667	2,500	4,667	5,333	5,333	4,333	5,500	3,500
2	7,333	3,333	5,500	5,333	3,000	5,833	3,500	3,167	4,833	2,833	5,667	4,500	6,333	9,667
3	5,667	2,333	8,667	7,000	3,333	5,833	3,667	3,333	9,333	3,667	7,667	5,167	2,667	8,000
4	0,167	0,333	0,667	5,167	1,667	7,167	2,667	0,833	5,500	4,500	7,000	2,167	5,833	3,667
Média	5,417	1,792	5,625	5,417	2,958	5,875	4,125	2,458	6,083	4,083	6,417	4,042	5,083	6,208
DP	3,688	1,315	3,560	1,175	0,927	1,022	1,750	1,142	2,196	1,076	1,101	1,301	1,647	3,107

Tabela A 8. Valores originais da viabilidade celular dos testes em extratos, expresso como % de células viáveis.

	CoCrMo- CoCrMo-				NiCrTi-		Ti6Al4V- Ti6Al4V-		DMEM/H					
	NiCr-T	NiCr-37	T	37	NiCrTi-T	37	Ticp-T	Ticp-37	T	37	Saliva-T	Saliva-37	Sal Contr	12
1	104,615	0,000	59,259	46,154	5,634	51,064	36,364	6,780	8,219	48,980	20,779	74,227	6,557	48,322
2	55,385	0,000	26,667	67,692	28,169	82,270	20,202	33,898	41,096	16,327	20,779	57,732	9,836	136,913
3	27,692	0,000	59,259	89,231	22,535	79,433	20,202	0,000	60,274	12,245	10,390	98,969	9,836	115,436
4	0,000	0,000	0,000	55,385	16,901	82,270	4,040	6,780	32,877	28,571	15,584	20,619	29,508	53,691
Média	46,923	0,000	36,296	64,615	18,310	73,759	20,202	11,864	35,616	26,531	16,883	62,887	13,934	88,591
DP	44,615	0,000	28,663	18,632	9,622	15,189	13,196	15,033	21,573	16,496	4,974	32,882	10,497	44,329