

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



**Processos de corrosão em materiais de
aplicação biomédica e crescimento
bacteriano em salivas artificiais**

Sara Raquel Mota Merelo de Aguiar

Mestrado em Química
(Especialização em Química, Saúde e Nutrição)

2011

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



**Processos de corrosão em materiais de
aplicação biomédica e crescimento
bacteriano em salivas artificiais**

Sara Raquel Mota Merelo de Aguiar

Dissertação orientada pela Doutora Anabela Gomes Boavida e

Prof. Doutora Marise Almeida

Mestrado em Química

(Especialização em Química, Saúde e Nutrição)

2011

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer às minhas orientadoras, Doutora Anabela Boavida e Doutora Marise Almeida, por toda a ajuda, paciência e dedicação com que me transmitiram os conhecimentos que me vão acompanhar ao longo da vida, muito obrigado.

Agradeço à Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa e à Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa por permitirem a concretização deste estudo.

Ao departamento de prótese dentária da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa pelo fornecimento das ligas de Crómio-Cobalto.

Agradeço ao Professor Jorge Correia pela amabilidade de ter disponibilizado o equipamento que me permitiu completar este trabalho.

À Professora Inês Fonseca pela ajuda com o fornecimento de água Millipore com a qual realizei os ensaios.

Queria também agradecer a todos os meus colegas de laboratório, pela companhia e pela partilha de experiências. Em especial à minha grande amiga, Tânia, tanto pela amizade como pelo apoio e paciência mesmo nos piores momentos.

Aos meus amigos, que apesar de tudo me deram apoio e motivação para continuar.

À minha família pelo apoio e carinho, em especial à minha mãe pela amizade incondicional ao longo de toda a minha vida.

O meu Muito obrigado.

Resumo

Os estudos dos fenómenos de corrosão em materiais de aplicação biomédica constituem uma temática de investigação actual e relevante dada a importância da biocompatibilidade destes materiais, de forma a permitir uma posterior aplicação clínica.

Assim, o principal objectivo deste trabalho foi estudar o processo de corrosão das ligas de Crómio-Cobalto (Cr-Co) utilizadas na área da medicina dentária em diferentes salivas artificiais.

A liga de Cr-Co foi caracterizada morfológica e quimicamente, sendo assim possível observar macro e microscopicamente a superfície da liga e conhecer a sua composição química que além dos elementos bases possui Mo W e Si.

Recorrendo aos estudos electroquímicos, nomeadamente medidas de potencial em circuito aberto, polarização potenciodinâmica e voltametria cíclica, foi estudada a corrosão da liga de Cr-Co em diversas salivas artificiais, contendo diferentes componentes que mimetizam os substituintes da saliva humana. Os resultados sugerem que na presença do tampão fosfato a glucose promove um meio mais corrosivo do que os outros componentes. Constatou-se assim que para a saliva II+glucose, que contem iões cloreto, tampão fosfato e glucose e para a saliva III, que contem todos os componentes estudados (iões cloreto, tampão fosfato, ureia, mucina e glucose) a resistência à corrosão é menor do que para as outras salivas artificiais estudadas, visto apresentar valores mais elevados de densidade de corrente de corrosão, $8,8634 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ e $8,4739 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, respectivamente, em comparação às outras salivas artificiais em que o valor ronda os $1,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Em relação à mucina e à ureia, os resultados sugerem que estes componentes estabilizam a saliva tornando-a menos corrosiva para a liga de Cr-Co.

Além destes estudos, foram efectuados ensaios de crescimento microbiano de duas espécies de *Streptococcus* na saliva artificial III, visto possuir todos os componentes estudados. Estas experiências constituem estudos piloto para ensaios de biocorrosão nesta saliva. Constatou-se que o

crescimento das espécies *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus mutans* só é significativo desde que haja uma suplementação extra de glucose.

Palavras-chave: Corrosão, Liga de Crómio-Cobalto, Saliva artificial, microrganismos orais

Abstract

The studies of the phenomena of corrosion in materials of biomedical application are a topic of current and relevant research given the importance of biocompatibility of these materials, to allow a later clinical application. Thus, the main objective was to study the corrosion process of cobalt-chromium alloy (Co-Cr) used in the area of dentistry in different artificial saliva.

The Co-Cr alloy was morphologically and chemically characterized, so it is possible to observe the macroscopic and microscopic surface of the alloy and to know its chemical composition that beyond its base element has Mo, W and Si.

Using the electrochemical studies, including measures of open circuit potential, potentiodynamic polarization and cyclic voltammetry, we studied the corrosion of Co-Cr alloy in different artificial saliva that containing different components that mimic the constituent's human saliva. The results suggest that in presence of phosphate buffer the glucose promotes a more corrosive surroundings than the other components. It was found that for saliva glucose + II, which contains chloride ions, phosphate buffer and glucose and for saliva III, which contains all the components studied (chloride ions, phosphate buffer, urea, mucin and glucose) corrosion resistance is lower than for other artificial salivas studied, since it shows higher values of corrosion current density, $8.8634 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ and $8.4739 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, respectively, compared to other artificial saliva that the value round the $1.7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. In relation to mucin and urea, the results suggest that these compounds stabilize the saliva making its surroundings less corrosive to the Co-Cr alloy.

In addition to these studies, testing has been conducted of microbial growth for two *Streptococcus* species in artificial saliva III, since it has all the components studied. These experiments are pilot studies to test this saliva in biocorrosion.

It was found that the growth of the species *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* is only meaningful if provided an extra glucose supplementation.

Keywords- Corrosion, alloys of Cr-Co, artificial saliva, oral microorganism

Símbolos e Abreviaturas

a	Actividade
b_a	Coeficiente angular do ramo anódico
b_c	Coeficiente angular do ramo catódico
γ	Coeficiente de actividade
α_a	Coeficiente de transferência de carga da região anódica
α_c	Coeficiente de transferência de carga da região catódico
F	Constante de Faraday
R	Constante dos gases perfeitos
β_a	Declive de Tafel anódico
β_c	Declive de Tafel catódico
i	Densidade de corrente
i_a	Densidade de corrente anódica
i_c	Densidade de corrente catódica
i_{cor}	Densidade de corrente de corrosão
OD	Densidade Óptica (do inglês optical density)
NHE	Eléctrodo normal de hidrogénio
EDS	Espectroscopia de dispersão de energia (do inglês Energy Dispersive Xray Spectroscopy)
glc	Glucose
GTF	Glucosiltransferase
h	Hora
I	Intensidade de corrente
I_p	Intensidade de corrente de passivação
I_{cor}	Intensidade de corrente de corrosão
$I_{p,a}$	Intensidade de corrente do pico anódico
$I_{p,c}$	Intensidade de corrente do pico catódico
SEM	Microscopia Electrónica de Varrimento (do inglês Scanning Electron Microscopy)
MO	Microscopia Óptica (do inglês Optical Microscopy)
n	Número de electrões envolvidos no processo redox
pl	Ponto isoeléctrico

E	Potencial
ocp	Potencial em circuito aberto (do inglês open circuit potencial)
E_{cor}	Potencial de corrosão
E_e	Potencial de equilíbrio
E_p	Potencial de passivação
$E_{p,a}$	Potencial do pico anódico
$E_{p,c}$	Potencial do pico catódico
E^0	Potencial eléctrodo padrão
E_f	Potencial final
E_i	Potencial inicial
E_{max}	Potencial máximo
E_{min}	Potencial mínimo
PRP	Proteínas Ricas em Prolina (do inglês proline rich proteins)
VEGh	Proteína da glândula de Von Ebner
SPLI	Proteína inibidora da serina protease
SWS	Saliva estimulada
UWS	Saliva não estimulada
EPS	Substancias poliméricas extracelulares
T	Temperatura absoluta
Tg	Tempo de geração
v	Velocidade de varrimento
μ	Velocidade específica de crescimento
CV	Voltametria Cíclica (do inglês Cyclic Voltammetry)

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iv
Símbolos e Abreviaturas	v
Índice de figuras	ix
Índice de tabelas	xiii
Capítulo 1 - Introdução	1
1.1. Cavidade oral	3
1.2. A saliva	4
1.2.1. Composição orgânica da saliva	5
1.2.2. Composição inorgânica da saliva	8
1.2.3. A saliva como solução tampão	8
1.3. Materiais metálicos usados em aplicações biomédicas	11
1.4. Corrosão química de ligas de Crómio-Cobalto	13
1.5. Biofilmes	25
1.5.1. Composição do biofilme	30
1.5.2. Formação do biofilme	31
1.6. Corrosão microbiana de ligas de Crómio-Cobalto	33
Capítulo 2 - Parte experimental	35
2.1. Reagentes	36
2.2. Salivas Artificiais	37
2.3. Célula e Eléctrodos	39
2.4. Técnicas electroquímicas	41
2.4.1. Medidas de Potencial em Circuito Aberto (ocp)	42
2.4.2. Polarização Potenciodinâmica	42
2.4.3. Voltametria Cíclica (CV)	43
2.5. Microscopia Óptica (OM)	45
2.6. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)	46
2.7. Espectroscopia de Dispersão de Energia (EDS)	47
2.8. Material biológico e meios de cultura	48
2.9. Densidade Óptica	48

Capítulo 3 - Apresentação e discussão de resultados	50
3.1. Caracterização morfológica e química da liga de Crômio-Cobalto	51
3.2. Avaliação da corrosão química da liga de Crômio-Cobalto	54
3.2.1. Estudos em diversas salivas artificiais tamponadas	54
3.2.1.1. Medidas de Potencial em Circuito Aberto	54
3.2.1.2. Polarização Potenciodinâmica	57
3.2.1.3. Voltametria Cíclica	65
3.2.2. Influência de cada componente na saliva artificial	66
3.2.3. Influência do tampão fosfato	78
3.3. Avaliação do crescimento bacteriano em salivas artificiais	84
3.3.1. Viabilidade das estirpes em meio de manutenção	84
3.3.2. Crescimento em salivas artificiais	86
Capítulo 4 - Conclusões Gerais e Perspectivas Futuras	88
Capítulo 5 – Referências Bibliográficas	91
Capítulo 6 – Anexos	104

Índice de Figuras

Figura 1 - Representação das estruturas anatómicas da Cavidade oral	3
Figura 2 - Diagrama de Pourbaix da estabilidade da água	16
Figura 3 - Diagrama de Pourbaix para o sistema Co-H ₂ O a 25 °C	17
Figura 4 - Diagrama de Pourbaix modificado para o sistema Co-H ₂ O a 25 °C	18
Figura 5 - Diagrama de Pourbaix para o sistema Cr-H ₂ O a 25°C, em soluções que contem iões cloro (Considerando Cr(OH) ₃ .H ₂ O)	19
Figura 6 - Diagrama de Pourbaix modificado para o sistema Cr-H ₂ O a 25 °C	19
Figura 7 - Representação da curva de Tafel (A) e do diagrama de Evans (B)	21
Figura 8 - Curva de Tafel	21
Figura 9 - Curva de polarização anódica para o material exibindo um comportamento activo-passivo	22
Figura 10 - Material metálico antes (--) e depois (—) da corrosão galvânica	23
Figura 11 - Material metálico antes (--) e depois (—) da corrosão por picada	24
Figura 12 – Material metálico antes (--) e depois (—) da corrosão por fenda	24
Figura 13 – Material metálico antes (--) e depois (—) da corrosão por fadiga	25
Figura 14 – Material metálico antes (--) e depois (—) da corrosão por atrito	25
Figura 15 - Imagem de SEM de <i>Streptococcus mutans</i>	28
Figura 16 - Imagem de SEM de <i>Streptococcus sobrinus</i>	29
Figura 17 - Curva de Crescimento típica. Adaptado de	29
Figura 18 - Representação esquemática do desenvolvimento temporal de um biofilme	32
Figura 19 - Representação esquemática do desenvolvimento temporal da placa bacteriana	33
Figura 20 - Célula electroquímica de três eléctrodos	40
Figura 21 - Célula electroquímica de três eléctrodos e equipamento utilizados para as experiencias electroquímicas	41
Figura 22 - Curvas de polarização anódica (i_a) e catódica (i_c) num diagrama em que as densidades de corrente assumem valores relativos: i_a é positivo e i_c é negativo. E_e = potencial de equilíbrio	43

Figura 23 - Variação do potencial aplicado com o tempo em voltametria cíclica, mostrando o potencial inicial E_i , o potencial final E_f , e os potenciais máximo E_{max} , e o mínimo E_{min} . A velocidade de varrimento é dada por $ dE/dt = v$	44
Figura 24 - Voltamograma cíclico para um sistema reversível	44
Figura 25 - Imagens de microscopia óptica da superfície da liga de Crômio-Cobalto em diferentes ampliações: A) 10x; B) 70x	51
Figura 26 - Imagens de SEM da liga de Crômio-Cobalto em diferentes ampliações: A) 150x; B) 5000x e B1) ampliação de uma falha da superfície da liga (10000x)	52
Figura 27 - Espectro de EDS da liga de Cr-Co utilizada nos ensaios experimentais	53
Figura 28 - Variação do potencial em circuito aberto (ocp) durante 24 h de imersão para a liga de Cr-Co, nas diversas salivas artificiais em estudo	55
Figura 29 - Curvas de polarização potenciodinâmica para a liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais num intervalo de potencial de -650 mV a -150 mV vs Ag/AgCl	57
Figura 30 - Valores de potencial de corrosão (A) e densidade de corrente de corrosão (B), declive de Tafel anódico (C) e declive de Tafel catódico (D) para a liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais	58
Figura 31 - Curvas de polarização potenciodinâmica para a liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais após a imersão durante 24h	60
Figura 32 - Curvas de polarização potenciodinâmica para a liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais num intervalo de potencial de -650 mV a 900 mV vs Ag/AgCl	63
Figura 33 - Voltamogramas cíclicos obtidos para a liga de Cr-Co em diferentes salivas artificiais, a uma velocidade de varrimento de 0,5 mV/s	65
Figura 34 - Curvas de polarização potenciodinâmica para a liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais com pH ajustado	67
Figura 35 - Valores de potencial de corrosão (A) e densidade de corrente de corrosão (B), declive de Tafel anódico (C) e declive de Tafel catódico (D) para a liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais com pH ajustado	68

Figura 36 - Curvas de polarização potenciodinâmica para a liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais com pH ajustado num intervalo de potencial de -650 mV a 900 mV vs Ag/AgCl	71
Figura 37 - Voltamogramas cíclicos obtidos para a liga de Cr-Co em diferentes salivas artificiais, a uma velocidade de varrimento de 0,5 mV/s	72
Figura 38 - Curvas de polarização potenciodinâmica para a liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais com pH ajustado contendo diversas concentrações de mucina	74
Figura 39 - Valores de potencial de corrosão (A) e densidade de corrente de corrosão (B), declive de Tafel anódico (C) e declive de Tafel catódico (D) para a liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais com pH ajustado contendo diversas concentrações de mucina	75
Figura 40 - Curvas de polarização potenciodinâmica para a liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais com pH ajustado contendo diversas concentrações de mucina num intervalo de potencial de -650 mV a 900 mV vs Ag/AgCl	76
Figura 41 - Voltamogramas cíclicos para a liga de Cr-Co em diferentes salivas artificiais com pH ajustado com diversas concentrações de mucina, a uma velocidade de varrimento de 0,5 mV/s	77
Figura 42 - Curvas de polarização potenciodinâmica para a liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas não tamponadas	78
Figura 43 - Valores de potencial de corrosão (A) e densidade de corrente de corrosão (B), declive de Tafel anódico (C) e declive de Tafel catódico (D) para a liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais não tamponadas	79
Figura 44 - Curvas de polarização potenciodinâmica para a liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais não tamponadas num intervalo de potencial de -650 mV a 900 mV vs Ag/AgCl	82
Figura 45 - Voltamogramas cíclicos para a liga de Cr-Co em diferentes salivas artificiais não tamponadas, a uma velocidade de varrimento de 0,5 mV/s	83
Figura 46 - Perfis de crescimento em meio YGLPB das bactérias em estudo	85
Figura 47 - Crescimento de <i>S. mutans</i> e <i>S. sobrinus</i> em meio BHI	86

Figura 48 - Crescimento de *S. mutans* e *S. sobrinus* na saliva artificial suplementada com glucose (glc)

87

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Classe de materiais utilizados no corpo humano	11
Tabela 2 - Espécies orais do género <i>Streptococcus</i>	27
Tabela 3 - Características dos reagentes utilizados	36
Tabela 4 - Composição das diferentes salivas artificiais	38
Tabela 5 - Composição das diferentes salivas artificiais não tamponadas	39
Tabela 6 - Composição do meio BHI	48
Tabela 7 - Comparação da composição química da liga de Crómio-Cobalto em estudo com outras ligas de aplicação biomédica	53
Tabela 8 - Valores iniciais e finais de pH e de potencial em circuito aberto nas diferentes salivas artificiais	55
Tabela 9 – Valores do potencial de corrosão e da densidade de corrente de corrosão da liga de Cr-Co imersa durante 24h em diversas salivas artificiais	61
Tabela 10 – Parâmetros do crescimento bacteriano referentes à figura 46	85
Tabela 11 - OD finais da adaptação progressiva à saliva artificial (OD inicial para as duas culturas = 0,1)	87
Tabela 12 – Valores de pH e parâmetros cinéticos, e os seus desvios, da liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais	105
Tabela 13 – Declives de Tafel para a liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais	106
Tabela 14 – Valores de pH e parâmetros cinéticos, e os seus desvios, da liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais com pH ajustado	107
Tabela 15 – Declives de Tafel para a liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais com pH ajustado	107
Tabela 16 – Valores de pH e parâmetros cinéticos, e os seus desvios, da liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais com pH ajustado contendo diversas concentrações de mucina	108
Tabela 17 – Declives de Tafel para a liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais com pH ajustado contendo diversas concentrações de mucina	108
Tabela 18 – Valores de pH e parâmetros cinéticos, e os seus desvios, da liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais não tamponadas	109

Tabela 19 – Declives de Tafel para a liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais não tamponadas

110

Capítulo 1

Introdução

O estudo dos fenómenos de corrosão de materiais de natureza metálica, constitui uma temática de investigação relevante e actual na área dos biomateriais, dada a importância de se conhecerem aprofundadamente os seus mecanismos de forma a avaliar a biocompatibilidade destes materiais e a sua aplicabilidade à prática clínica.

A escolha de um material metálico para a manufactura de estruturas de reabilitação oral está condicionada por um conjunto de factores tais como o seu comportamento à corrosão, as suas propriedades mecânicas, o seu custo, a sua disponibilidade, a sua biocompatibilidade e o aspecto estético. Assim, a procura de materiais mais eficientes e com baixos custos continua a ser um dos principais objectivos da investigação científica nesta área.

O ambiente oral é maioritariamente constituído pela saliva, um fluido complexo, quimicamente agressivo, constituído maioritariamente por água, moléculas e vários tipos de iões. Os estudos efectuados em salivas exigem uma compreensão aprofundada das suas propriedades reológicas e biológicas, que dependem maioritariamente da presença de certos compostos. Assim, a necessidade de criar diferentes salivas artificiais que mimetizem as salivas humanas continua a ser também uma área importante de investigação.

Além da saliva humana, os biofilmes microbianos formados na cavidade oral apresentam características que potenciam o processo de corrosão. Deste modo, o estudo de microrganismos orais e dos processos subjacentes à formação de biofilmes é da maior relevância.

Neste capítulo iremos abordar os últimos desenvolvimentos na área da corrosão e biocorrosão de materiais metálicos, em especial de ligas de cromo-cobalto, em meios que mimetizam o ambiente oral.

1.1. Cavidade Oral

A cavidade oral é considerada um ambiente único do corpo humano, porque oferece uma variedade de condições, de onde se destacam a atmosfera húmida, o pH próximo da neutralidade e a temperatura relativamente constante. Condições essas, importantes para a colonização microbiana e sobrevivência quer de bactérias, quer de vírus e fungos [1, 2].

Na realidade, a cavidade oral é constituída por estruturas anatómicas de diferentes graus de dureza: dentes, osso alveolar e mucosas tal como se ilustra na figura 1.

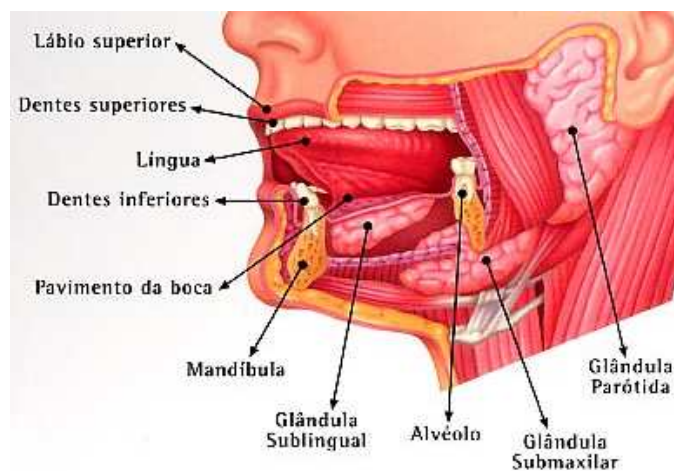


Figura 1 – Representação das estruturas anatómicas da Cavidade oral [3]

A mucosa oral, constituída por um epitélio e por tecido conjuntivo subjacente, tem uma função imunológica e bioquímica, além de servir como uma barreira física para o ambiente externo. No entanto, a mucosa permanece vulnerável a agressões ambientais, incluindo infecções microbianas, já que o ambiente oral e as suas estruturas oferecem diversos locais para a colonização bacteriana, quer em zonas de localização subgingival quer supragingival [4, 5].

As estruturas orais estão constantemente banhadas por dois importantes fluidos fisiológicos, a saliva e o fluido gengival crevicular. Estes fluidos são essenciais para a manutenção dos ecossistemas orais, fornecendo água, nutrientes, factores de adesão e factores antimicrobianos. O ambiente supragingival é banhado pela saliva, enquanto o ambiente subgingival é

maioritariamente banhado pelo fluido gengival crevicular. O fluido gengival passa através da gengiva (epitélio juncional) para atingir o sulco gengival e flui ao longo dos dentes. A composição do fluido gengival é semelhante ao do plasma, que contém proteínas, albumina, leucócitos e imunoglobulinas [2].

1.2. A saliva

A saliva é um fluido biológico que existe na cavidade oral e é produzido por três pares de glândulas salivares principais, a parótida, a submandibular e a sublingual e através de glândulas salivares secundárias sob o controlo do sistema nervoso autónomo simpático e parasimpático [2, 6, 7]. Os indivíduos adultos e saudáveis produzem entre 500 a 1500 mL de saliva por dia, a uma velocidade aproximada de 0,5 mL/min, no entanto várias condições fisiológicas, patológicas e iatrogénicas medicamentosas podem alterar a produção de saliva tanto quantitativamente como qualitativamente [8].

A saliva tem várias funções distintas, tais como, a lubrificação da cavidade oral, a auto-limpeza da superfície oral e influência no estado dos dentes, a remineralização do esmalte dos dentes, a integridade da mucosa oral, uma acção digestiva e antimicrobiana e a capacidade de efeito tampão [7].

A saliva é um fluido complexo maioritariamente composto por água (99%), moléculas e vários tipos de iões. A água é quantitativamente o elemento mais abundante na saliva e é o factor mais importante na regulação do fluxo salivar. Relativamente às moléculas e iões, estes apresentam concentrações distintas de indivíduo para indivíduo e até mesmo no próprio indivíduo ao longo do dia [2, 6, 9]. Diferentes autores, em estudos mais recentes, afirmam que o pH da saliva humana é 6,7 com um intervalo de 6,2 a 7,6, o que é dependente da velocidade de produção. A maioria dos autores afirma que o pH da saliva é mais baixo durante o sono, visto haver uma menor produção de saliva, e um aumento de pH durante as horas de refeição excepto quando há a ingestão de certos alimentos [10, 11].

1.2.1. Composição Orgânica da Saliva

A parte orgânica da saliva é composta por aminoácidos, proteínas, lipídios, glúcidos e outros compostos. Cada composto orgânico apresenta diferentes características e funções.

➤ **Aminoácidos e Proteínas:**

Os aminoácidos presentes na saliva são a serina, a alanina, a prolina, a glicina, o aspartato e o glutamato, no entanto só a alanina, a prolina e o aspartato é que se encontram em maiores concentrações. A glicina e o glutamato estão envolvidos no metabolismo dos microrganismos [12, 13].

De todos os compostos que constituem a parte orgânica da saliva, as proteínas são o grupo que se apresenta em maior percentagem, sendo que já foram identificadas mais de 400 proteínas [8, 9]. Estas proteínas podem ser agrupadas em três grandes famílias [6]:

- Proteínas de revestimento e protecção

As glicoproteínas conferem à saliva o seu carácter viscoelástico, dando origem a um filme lubrificante. De entre estas proteínas, um grupo que já foi reconhecido há mais de 30 anos, designado por mucinas, possui um importante papel tanto na integridade da mucosa oral como na modelação da microflora bucal, favorecendo ou contrariando a proliferação de certos microrganismos [6, 7, 14, 15]. Do ponto de vista bioquímico as mucinas são compostos de aproximadamente 15% a 20% (m/m) de proteína e até 80% (m/m) de polissacáridos, presentes em grande parte na forma de O-glicanos. A serina e a treonina são os aminoácidos mais abundantes e servem como pontos de ligação a estas cadeias de polissacáridos. A maioria das mucinas tem um peso molecular de monómero superior a 2 milhões de daltons e formam polímeros dez vezes maiores. O grande tamanho e o alto grau de glicosação conferem às mucinas uma função protectora [15].

Das proteínas mais relevantes de origem glandular encontram-se as proteínas ricas em prolina (PRP) [9]. Estas são normalmente divididas em três tipos as glicosiladas, as ácidas e as básicas pois possuem funções bastante distintas. As PRP ácidas contribuem para a manutenção da homeostasia do cálcio na cavidade oral. Além disso estão envolvidas na formação do biofilme oral. As PRP glicosiladas garantem a lubrificação oral e proporcionam a adesão das bactérias orais. Em relação as PRP básicas essas são capazes de interagir com os taninos, sendo a primeira linha de defesa contra os efeitos negativos dos taninos na dieta humana [16].

Além destas proteínas, também está presente na saliva humana a albumina, que funciona como inibidor de interações hidrofóbicas, afectando assim a adesão de microrganismos orais mediada por interações hidrofóbicas [17].

- Proteínas com acção antimicrobiana

Além das mucinas, existem outras glicoproteínas como é o caso das lactoferrinas e das imunoglobulinas que possuem um papel importante na acção antimicrobiana da saliva [7, 9], tal como a formação de uma barreira contra microrganismos ou bloqueio das bactérias que se ligam ao receptor da célula epitelial [16].

Os peptídeos catiónicos estão também presentes na saliva e encontram-se agrupados em três grandes famílias, as histatinas, as defensinas e as catelidicinas [17]. Outras proteínas, como a proteína da glândula de Von Ebner (VEGh) e a proteína inibidora da serina protease (SPLI), apresentam de igual forma actividade antimicrobiana [16].

- Enzimas

As enzimas também estão presentes na saliva humana. Estas incluem, por exemplo amilases, lipases, esterases, maltases, fosfatases, hialuronidasas, catalases, peroxidases, ribonucleases, desidrogenases, a lisozima e a anidrase carbónica [6,8,12, 18].

A amilase e a lipase actuam como enzimas digestivas, enquanto que as enzimas lisozima, lactoperoxidase e mieloperoxidase actuam como enzimas antimicrobianas [7, 16]. A anidrase carbónica é responsável pela manutenção da capacidade de tamponamento da saliva [13].

➤ **Lípidos**

Os lípidos também estão presentes na saliva em pequenas quantidades, no entanto o colesterol e os seus ésteres, os mono, di e triglicéridos, e os ácidos gordos livres representam 99% destes lípidos, sendo que os principais ácidos gordos são o ácido α -linoleico e o ácido araquidónico [6,8,9].

➤ **Glúcidos**

A glucose também está presente na saliva humana e é utilizada pelas glucosiltransferases extracelulares produzidas por certos microrganismos orais para formar glucanos. Também se encontram outros açúcares na saliva humana, como é o caso da sacarose e da frutose, no entanto esses são introduzidos pela dieta humana [19,20].

➤ **Outros compostos**

Outros compostos, como o ácido úrico, a ureia, a bilirrubina e a creatinina, estão presentes na saliva em pequenas quantidades, sendo o ácido úrico um dos compostos antioxidantes mais importantes na saliva.

Foi também observada a presença de amidas, destacando-se a cadaverina, a putrescina e o indol [8, 9].

Certas vitaminas, principalmente do grupo B também estão presentes na saliva humana [20].

1.2.2. Composição inorgânica da saliva

A parte inorgânica da saliva é composta por iões, sendo os mais importantes os catiões Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+ e os aniões Cl^- , HCO_3^- , H_2PO_4^- , SO_4^{2-} [5,8,9, 21], presentes em diferentes concentrações, produzindo-se um fluido hipotónico em relação ao plasma [8, 13]. Alguns destes iões são instáveis e podem participar na formação de precipitados, como é o caso do ião cálcio que participa na formação de fosfato de cálcio e por conseguinte nos mecanismos de remineralização natural dos dentes [13, 22]; podem também ser responsáveis pelo efeito tampão da saliva [8].

1.2.3. A saliva como solução tampão

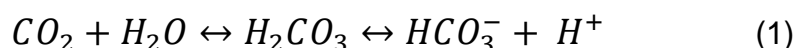
A capacidade de tamponamento da saliva estimulada (SWS) e não estimulada (UWS), envolve três sistemas tampão principais, ou seja, o sistema bicarbonato, o sistema fosfato e o sistema tampão de proteínas, visto possuírem diferentes intervalos de pH de capacidade de tamponamento máxima [7,8, 23].

A saliva não estimulada é maioritariamente produzida pelas glândulas submandibular e a saliva estimulada pelas glândulas parótidas. A contribuição da glândula sublingual é baixa para ambas as salivas [24].

A concentração do tampão bicarbonato depende da velocidade do fluxo salivar, no entanto as concentrações de fosfato na saliva não estimulada são mais elevadas do que na saliva estimulada.

Analisando o sistema bicarbonato sabe-se, em primeiro lugar, que a pressão parcial do CO_2 na atmosfera é menor do que na saliva, em particular na saliva estimulada. E em segundo lugar, que o efeito tampão do ião HCO_3^- envolve uma mudança de fase, da fase dissolvida para a fase gasosa.

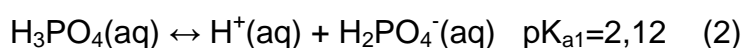
Sendo assim, o equilíbrio do sistema tampão HCO_3^- é traduzido pela equação (1).



A reacção de formação do ácido carbónico a partir do CO₂ é catalisada pela enzima anidrase carbónica presente na saliva. O HCO₃⁻ liga-se aos protões para formar o ácido carbónico e portanto o CO₂. Se a saliva é exposta à atmosfera, o equilíbrio da equação 1 desloca-se para a esquerda, resultando na perda de HCO₃⁻ e protões e conseqüentemente uma mudança de pH para valores mais alcalinos [23].

Tal como a concentração do tampão bicarbonato, a concentração do tampão fosfato também depende da velocidade do fluxo salivar, no entanto as concentrações de fosfato na saliva não estimulada são mais elevadas do que na saliva estimulada.

Dependendo do pH da saliva, os fosfatos estão presentes em diferentes formas de acordo com o pKa das diferentes formas iónicas, demonstrado nas equações (2, 3 e 4) [23, 25].



Na faixa do pH fisiológico, em torno de pH 7, a maioria dos iões fosfato presente na saliva apresenta-se na forma de dihidrogenofosfato (H₂PO₄⁻) e de hidrogenofosfato (HPO₄²⁻). O tampão fosfato tem um pKa, ou seja, uma capacidade de tamponamento máxima de 7,21 a 25°C [23, 25]. Em geral, este tampão possui uma boa capacidade de tamponamento num intervalo de ± 1 pH do seu valor de pK_a [26].

Na saliva existe uma variedade imensa de proteínas que podem ser diferentes tanto em relação à sua função como à sua composição. Estas proteínas podem actuar como um tampão quando o pH esta acima ou abaixo do ponto isoeléctrico (pI). Abaixo do ponto isoeléctrico as proteínas podem aceitar protões e acima podem libertar protões [23]. A maioria das proteínas salivares tem o seu ponto isoeléctrico entre o pH 5 e 9 e por isso são bons tampões a pH alcalino mas especialmente a pH ácido [26].

Salivas artificiais para estudos de corrosão e biocorrosão

Na medicina dentária é muitas vezes necessário à simulação das condições químicas da cavidade oral para se efectuarem diversos estudos, recorrendo-se assim à utilização de salivas artificiais.

A saliva artificial é constituída por diversos componentes que substituem os da saliva humana, de modo a mimetiza-la. No entanto, a saliva humana consiste numa mistura altamente complexa quase impossível de uma duplicação exacta, sendo por isso a optimização da composição das salivas artificiais um assunto de importância e relevância de investigação na área da medicina dentária [27].

Classicamente os estudos efectuados nesta área, utilizam apenas salivas artificiais compostas por componentes inorgânicos e usando técnicas e metodologias experimentais da área da química e da electroquímica. A facilidade de condução de corrente eléctrica em soluções iónicas potenciou o uso exaustivo destas técnicas para estudar os efeitos de corrosão química em materiais por salivas artificiais [11, 21].

No entanto, os componentes orgânicos da saliva humana também são importantes aspectos a considerar. Para tal é necessário um desenvolvimento eficaz desses substituintes o que exige uma compreensão aprofundada de ambas as propriedades reológicas e biológicas da saliva humana, que dependem maioritariamente da função de certos compostos orgânicos como é o caso das glicoproteínas [7, 28].

De entre as glicoproteínas as que mais se destacam são as mucinas, que são as responsáveis pela viscosidade da saliva artificial, tal como o são na saliva humana, influenciando desta forma as taxas de difusão de outros solutos e conseqüentemente a velocidade das reacções [27, 28].

Em relação à glucose, esta é importante na síntese de glucanos que promovem a formação da placa bacteriana visto conferirem aos microrganismos a capacidade de aderirem à superfície dentária [29].

1.3. Materiais metálicos usados em aplicações biomédicas

Os biomateriais tem uma importância crescente para a humanidade, visto promover tanto uma maior qualidade de vida como uma maior longevidade. São materiais (sintéticos ou naturais) idealmente inertes, utilizados em dispositivos médicos, em implantes ou em dispositivos inseridos temporariamente no corpo humano, de uma maneira segura e económica. Estes materiais estão em contínuo contacto com os fluidos biológicos do corpo humano [30, 31]. Na tabela 1 encontram-se ilustrados os diversos tipos de biomateriais, as suas vantagens e desvantagens e as suas aplicações [30].

Tabela 1 - Classe de materiais utilizados no corpo humano [30]

Materiais	Vantagens	Desvantagens	Aplicações
Polímeros (nylon, silicone, borracha, poliéster)	Fácil de fabricar e elasticidade	Não resistente, degradação e deformação	Suturas, vasos sanguíneos
Metais (Ti e as suas ligas, ligas de Cr-Co, Au, Aço)	Resistente e difícil flexibilidade	Difícil de fabricar, resistente à corrosão e alta densidade	Articulações, implantes dentários
Cerâmicas (alumina, dióxido de zircónio)	Boa biocompatibilidade	Não resistente, frágil e fraco em zonas de tensão	Implantes dentários e ortopédicos
Compósitos (carbono-carbono, fio ou fibra que reforça o cimento ósseo, resinas acrílicas)	Resistente e fabricado à medida	Difícil de fabricar	Cimento ósseo, resina dentária

O sucesso de um biomaterial depende de três factores principais (i) das suas propriedades mecânicas, químicas e tribológicas (fricção, desgaste e lubrificação), (ii) da sua biocompatibilidade e (iii) do estado de saúde do receptor [32].

A biocompatibilidade, refere-se à capacidade do material ser compatível com os tecidos e fluidos corporais, sendo assim o biomaterial não deve causar efeitos adversos como inflamação, alergia ou toxicidade. Além disso, o

biomaterial deve possuir resistência mecânica suficiente para sustentar as forças a que é submetido, como por exemplo as articulações, no caso de aplicações ortopédicas e possuir uma alta resistência à corrosão e ao desgaste. O biomaterial deve permanecer intacto no corpo humano por um longo período de tempo, excepto no caso em que seja pretendido a sua biodegradação [32].

Há mais de um século que os metais têm sido utilizados como biomateriais na medicina dentária. Geralmente, a maioria dos metais são suficientemente resistentes ao ambiente químico adverso que se faz sentir na cavidade oral, isto é, a corrosão que ocorre nestes materiais não é significativa não sendo prejudicial nem para o metal nem para o ser humano [33, 34]. Estes materiais dentários são empregues em restaurações *full-cast* e metal-cerâmica, em próteses parcialmente removíveis e em aparelhos ortodônticos [35, 36].

Actualmente, os materiais metálicos mais utilizados na medicina dentária são o aço inoxidável, o titânio e respectivas ligas, e as ligas de cromo-cobalto. As ligas que contêm cobalto (Co), Crómio (Cr) e Níquel (Ni), são de ampla utilização devido ao seu baixo custo mas principalmente devido às suas propriedades mecânicas. No entanto, os estudos electroquímicos realizados nestas ligas são bastante inferiores comparativamente aos outros materiais metálicos utilizados em medicina dentária [34]. Estas ligas são amplamente utilizadas em próteses esqueléticas devido à sua excelente resistência à corrosão em fluidos corporais e à sua biocompatibilidade [37]. Apesar destas excelentes propriedades, a dureza das ligas de Cr-Co é uma desvantagem que pode ser ultrapassada quando se utiliza uma pequena percentagem de metais preciosos (Au, Pt, Ru) e/ou metais não preciosos (In, Ga, Mn, W) na sua constituição, podendo também melhorar a resistência mecânica [38]. Mediante a percentagem de elementos metálicos e da sua diversidade, as ligas de Cr-Co apresentam diferentes propriedades, existindo alguns estudos científicos efectuados com estas ligas que apresentam resultados satisfatórios na resistência ao processo de corrosão em ambiente oral [37, 39], estando inclusivamente em fase de investigação a possível aplicação destas ligas à área da implantologia [40].

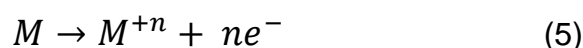
1.4. Corrosão química de Ligas de Crómio-Cobalto

A corrosão é uma reacção interfacial irreversível de um material (metal, cerâmica ou polímero) com o seu ambiente que resulta no consumo do material ou na dissolução do mesmo no meio envolvente [41].

A corrosão dos materiais metálicos é um dos aspectos mais condicionante da biocompatibilidade visto haver a hipótese da formação de óxidos e de hidróxidos na superfície do metal quando este está em contacto com um sistema extremamente corrosivo, como é o caso da saliva na cavidade oral. Sendo assim, a corrosão dos biomateriais promove a libertação de iões metálicos acompanhado pela formação de produtos de corrosão que podem ter como efeito a redução do tempo de vida do material. No caso particular das ligas de Cr-Co, estas libertam iões de cobalto e de crómio que se podem acumular nos tecidos ou serem transportados para outras partes do corpo humano provocando assim infecções e alergias [42].

A corrosão é uma reacção química espontânea e que pode ser indesejada, de um metal com o ambiente envolvente, sendo que o entendimento das interacções do material com o meio assume uma dimensão química e electroquímica. As reacções que ocorrem no processo de corrosão são afectadas pelo pH, pela pressão parcial do oxigénio, pela condutividade da solução e pela composição tanto do meio como do metal [30, 43, 44].

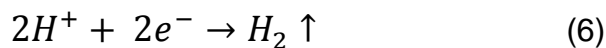
Durante a corrosão os metais são oxidados a um estado de valência superior, o que resulta na formação de iões metálicos dos elementos da liga, representado pela equação 5.



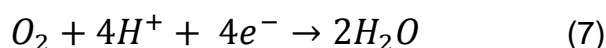
Metais que são capazes de exhibir múltiplos estados de valência podem passar por vários estados de oxidação durante o processo de corrosão. Os electrões que são libertados durante o processo anódico, na dissolução do metal, são consumidos no processo catódico, envolvendo a libertação de hidrogénio ou a redução do oxigénio. Quanto mais rápido for a dissolução do metal mais rápido é o fluxo de corrente.

As reacções catódicas, envolvendo a redução do oxigénio ou a libertação do hidrogénio podem ocorrer quer em meio ácido quer em meio básico [43, 44].

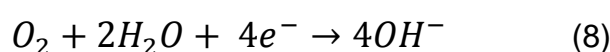
✓ Em meio ácido



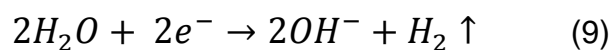
e/ou



✓ Em meio alcalino



e/ou



Na superfície do metal as áreas anódicas e catódicas podem mudar de local. Na verdade, é exactamente isso que acontece quando ocorre corrosão geral ou uniforme, as áreas anódicas movimentam-se uniformemente sobre a superfície do metal [43].

A tendência de um metal à corrosão é baseada muito simplesmente na série electroquímica, através dos potenciais de eléctrodo padrão. Estes potenciais são obtidos em medidas electroquímicas em condições de equilíbrio, medidos em relação ao eléctrodo normal de hidrogénio (NHE), sendo o seu potencial definido como zero, tendo todas as espécies actividade unitária.

Através da equação de Nernst, representada na equação 10, é possível relacionar o potencial de eléctrodo padrão com o potencial de equilíbrio do par redox [30, 44].

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln (a_{M^{n+}}) \quad (10)$$

onde R é a constante dos gases perfeitos, E^0 é o potencial de eléctrodo padrão, T a temperatura absoluta, F a constante de Faraday e n o número de electrões envolvidos no processo redox. Na maioria das vezes é necessário

empregar concentrações em vez de actividades, onde $a=\gamma c$ sendo γ o coeficiente de actividade.

A termodinâmica e a cinética dos processos de eléctrodo serão descritas de forma sucinta em seguida.

Aspectos termodinâmicos

Os diagramas de Pourbaix, também conhecidos como os diagramas de potencial-pH, são uma representação gráfica da estabilidade de um metal e dos seus produtos de corrosão em função do potencial e do pH da solução aquosa [43]. Estes diagramas são construídos a partir de cálculos baseados na equação de Nernst, dos dados de solubilidade dos produtos de degradação e das constantes de equilíbrio da reacção [30, 43].

Cada linha do diagrama de Pourbaix representa condições de equilíbrio termodinâmico para alguma reacção. As linhas horizontais representam reacções de transferências de electrões que apenas dependem do potencial. Estas linhas estendem-se pelo diagrama até que o pH seja alto o suficiente para facilitar a formação de hidróxidos, representando as linhas verticais. Portanto podemos concluir que nas linhas verticais não há transferência de electrões sendo as reacções envolvidas unicamente dependentes do pH, isto é, reacções de hidrólise. As linhas inclinadas representam equilíbrios que envolvem a combinação dos dois fenómenos [43, 45].

Além destas linhas, existem linhas diagonais tracejadas que representam as linhas do hidrogénio e do oxigénio. A linha de hidrogénio representa o equilíbrio em soluções ácidas através da equação 6 ou em soluções neutras ou alcalinas pela equação 9 [43] e corresponde à equação 11.

$$E_{H^+/H_2} = E_{H^+/H_2}^o - 0,059pH \quad (11)$$

Em relação ao equilíbrio do oxigénio em água, a linha a tracejado no diagrama corresponde às reacções que a um pH básico e ácido são representadas pelas equações 7 e 8 respectivamente, e à equação 12.

$$E_{O_2/H_2O} = E_{O_2/H_2O}^{\circ} - 0,059pH \quad (12)$$

No diagrama de Pourbaix da estabilidade da água, representado na figura 2, observa-se que abaixo da linha de hidrogénio, a, este é reduzido a gás, e acima da linha de oxigénio, b, este é oxidado originando moléculas de água [41, 43].

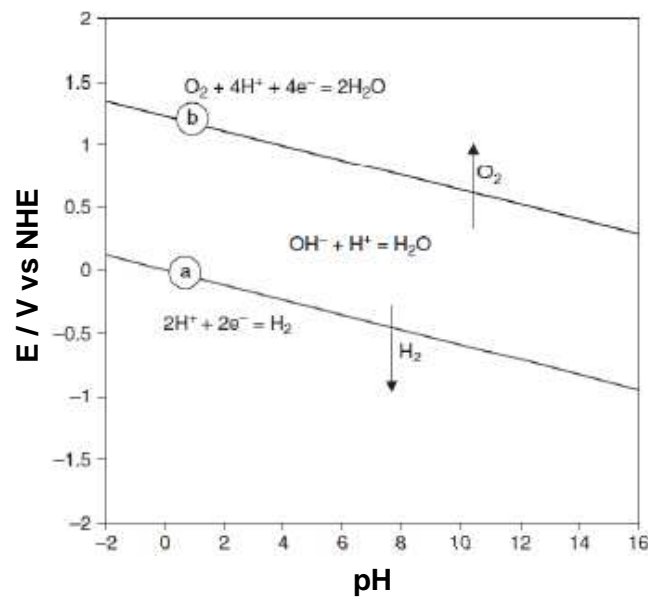


Figura 2 – Diagrama de Pourbaix da estabilidade da água [31]

Os diagramas de Pourbaix das espécies metálicas estão divididos em três zonas distintas [30, 41, 43]:

- ✓ Imunidade: sob estas condições de potencial e pH, os metais permanecem na sua forma metálica.
- ✓ Corrosão: sob estas condições de potencial e pH, os metais oxidam-se formando iões metálicos.
- ✓ Passivação: sob estas condições de potencial e pH, os metais formam óxidos e hidróxidos que originam uma camada fina à superfície do metal,

designada por filme passivante, que diminuem a corrosão podendo mesmo pará-la.

Diagrama de Pourbaix do sistema Cobalto-H₂O

O diagrama de Pourbaix do sistema cobalto-água está representado na figura 3. Este diagrama mostra as condições de estabilidade termodinâmica do cobalto e dos seus derivados que podem existir na presença de água ou de soluções aquosas livres de substâncias que possam formar complexos solúveis ou sais insolúveis com o cobalto.

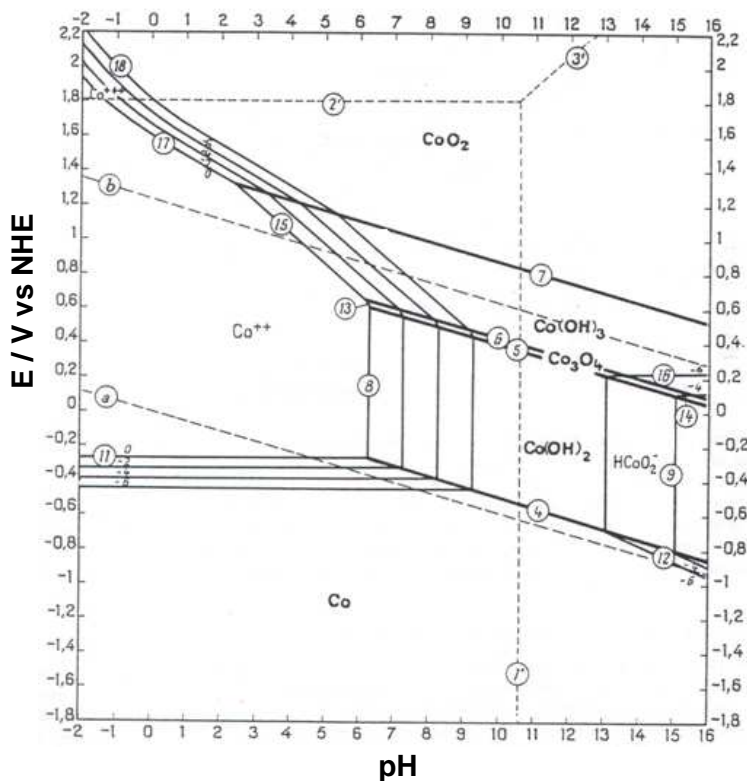


Figura 3- Diagrama de Pourbaix para o sistema Co-H₂O a 25 °C [46]

A figura 4 deriva da figura 3 e representa as condições teóricas das zonas de corrosão, imunidade e passivação do cobalto.

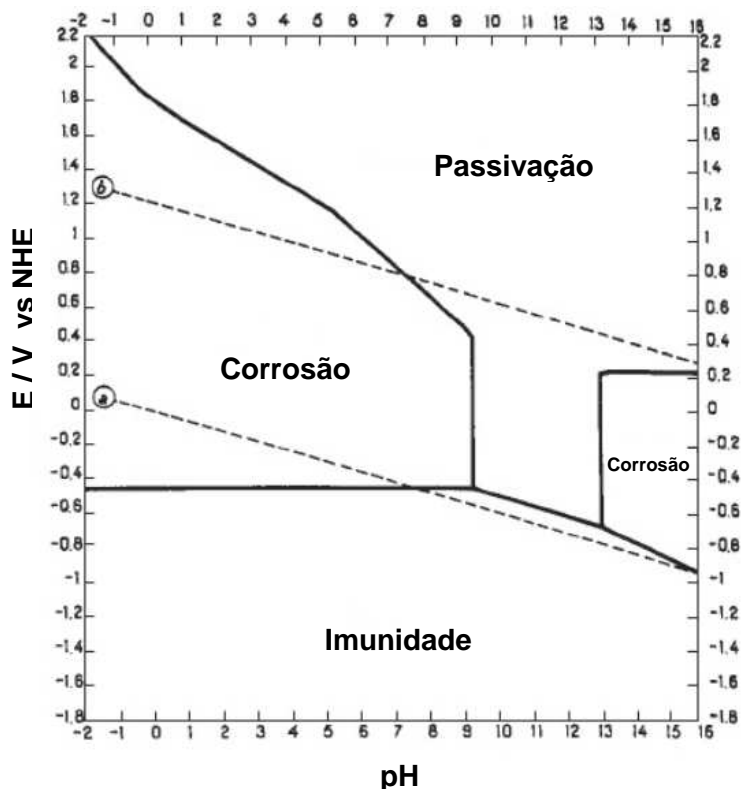


Figura 4 - Diagrama de Pourbaix modificado para o sistema Co-H₂O a 25 °C [46]

Com base nos diagramas das figuras 3 e 4, pode verificar-se que o cobalto apresenta uma grande zona de imunidade, a pH ácido e neutro o metal poderá sofrer corrosão a potenciais acima de -0,5V vs NHE. A zona de passivação é bastante alargada em especial a potenciais positivos e pH mais básico.

Diagrama de Pourbaix do sistema Crómio-H₂O

Devido à complexidade do sistema crómio-água, dois diagramas de Pourbaix podem ser traçados, para soluções com e sem iões cloreto. No entanto só se apresenta o diagrama de soluções com iões cloreto pois é esse o necessário para o actual estudo.

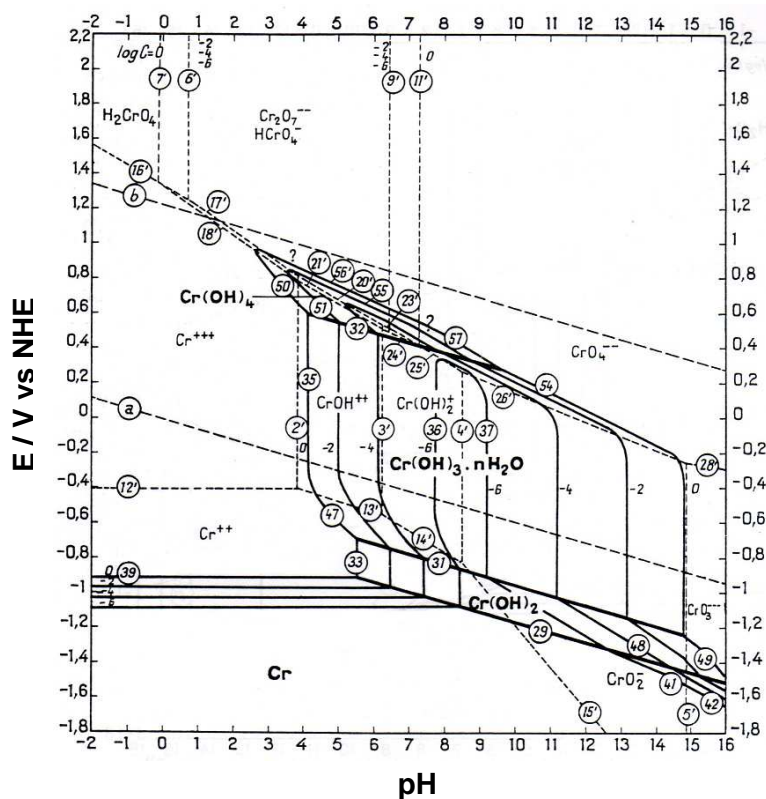


Figura 5 – Diagrama de Pourbaix para o sistema Cr-H₂O a 25°C, em soluções que contêm iões cloro (Considerando Cr(OH)₃.H₂O) [46]

A figura 6 deriva da figura 5 e representa as condições teóricas das zonas de corrosão, imunidade e passivação do crómio.

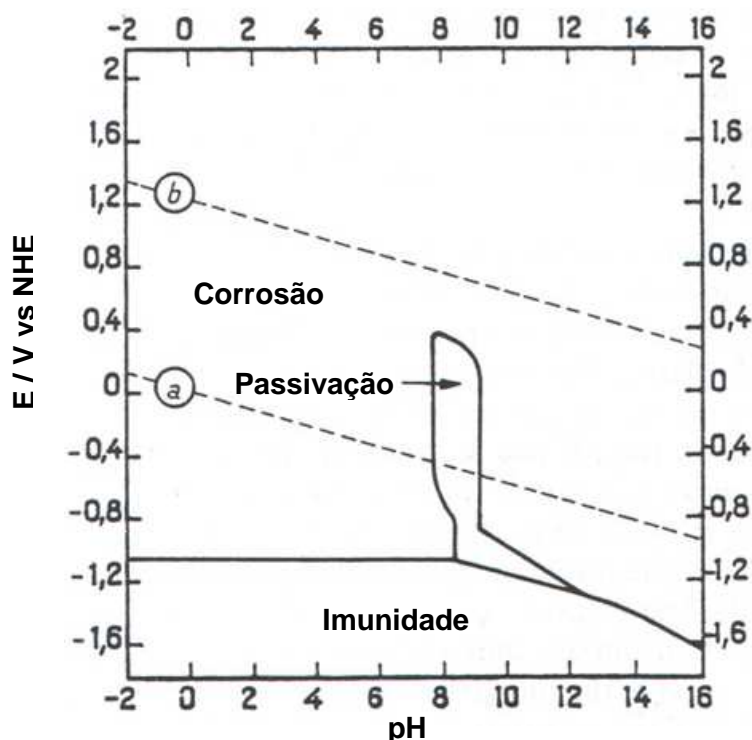


Figura 6 - Diagrama de Pourbaix modificado para o sistema Cr-H₂O a 25 °C [46]

Através da análise dos diagramas de Pourbaix do cobalto e do crómio podemos afirmar que a zona de imunidade do cobalto é maior que a do crómio. Para valores de pH ácidos e neutros o crómio oxida-se a potenciais acima de -1,2 V vs NHE, portanto a valores de potencial muito mais negativos do que aqueles relativos à zona de corrosão do cobalto.

Conclui-se também que a zona de passivação é mais pequena para o crómio do que para o cobalto.

Aspectos cinéticos

Os aspectos cinéticos podem tornar a corrosão mais difícil do que previsto através dos aspectos termodinâmicos. O potencial de corrosão é um dos parâmetros mais importantes a ter em consideração sendo este dependente das reacções anódicas e catódicas. Além disso a corrente de corrosão, outro aspecto importante, está directamente relacionada com a constante de velocidade da reacção e consequentemente relacionado com a resistência do metal ao meio envolvente [44].

A representação de potencial versus intensidade de corrente, E vs I , designa-se por diagrama de Evans, representado na figura 7B, e é útil para retirar conclusões qualitativas, sobretudo quando a cinética da redução do H^+ é fortemente dependente da identidade do metal. Para conclusões quantitativas utiliza-se a representação da curva de Tafel, representado na figura 7A, isto é, um diagrama de potencial versus o logaritmo da intensidade de corrente, E vs $\log|I|$. A vantagem da utilização da curva de Tafel, esta na maior exactidão com que se determina a intensidade de corrente de corrosão, I_c [44, 47].

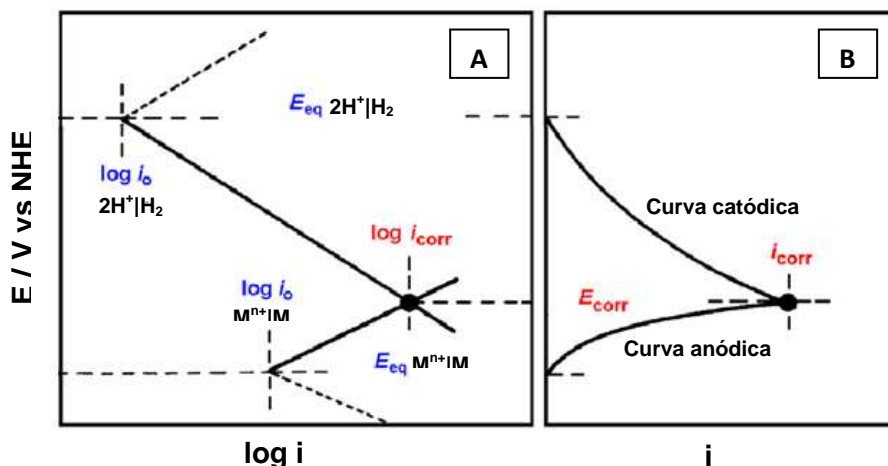


Figura 7 – Representação da curva de Tafel (A) e do diagrama de Evans (B) [41]

Através da curva de Tafel, obtêm-se os coeficientes angulares dos ramos anódico, b_a , e catódico, b_c , representados na figura 8, que permitem calcular o declive de Tafel [44, 47]:

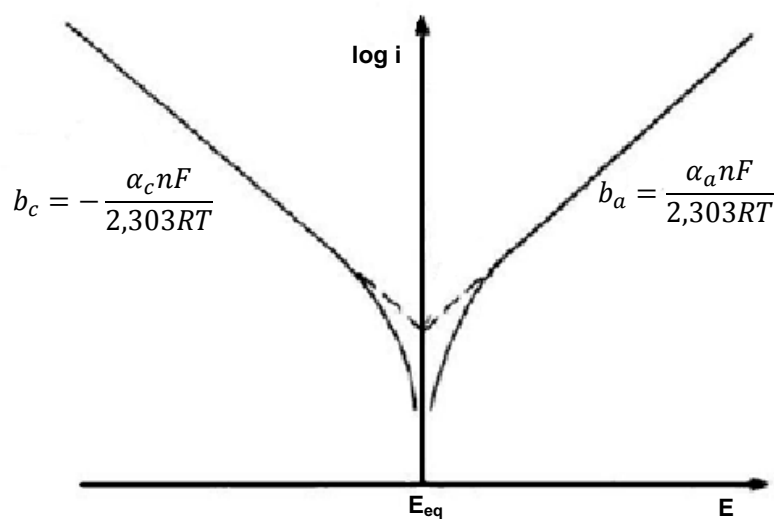


Figura 8 – Curva de Tafel [44]

Para potenciais perto do potencial de corrosão podemos obter uma relação que nos permite calcular a intensidade de corrente de corrosão a partir da equação 13, a equação de Butler-Volmer.

$$I = I_{cor} \left\{ \exp \left[\alpha_a \frac{nF}{RT} (E - E_{cor}) \right] - \exp \left[-\alpha_c \frac{nF}{RT} (E - E_{cor}) \right] \right\} \quad (13)$$

O comportamento activo-passivo de um metal é esquematizado pela curva de polarização anódica representada na figura 9. Esta curva está dividida em três regiões distintas, a activa, a passiva e a transpassiva. Na região activa, ao varrer o potencial no sentido positivo há um aumento gradual da corrente até a um certo valor de potencial aplicado, o potencial de Flade, ponto A da figura 9. Depois de alcançar este valor de potencial ocorre a passivação. A passivação deve-se a dois factores, atinge-se o produto de solubilidade de um hidróxido ou há uma mudança estrutural num filme de hidróxido que já existe numa forma porosa e que muda para uma forma não-porosa. Na região de passivação atinge-se um valor de intensidade de corrente que é praticamente constante, a intensidade de passivação, i_p , durante um intervalo de potencial, designado por potencial de passivação, E_p . Quando se atinge o ponto B ocorre a ruptura do filme passivante havendo assim um aumento da intensidade da corrente, zona transpassiva [43, 44].

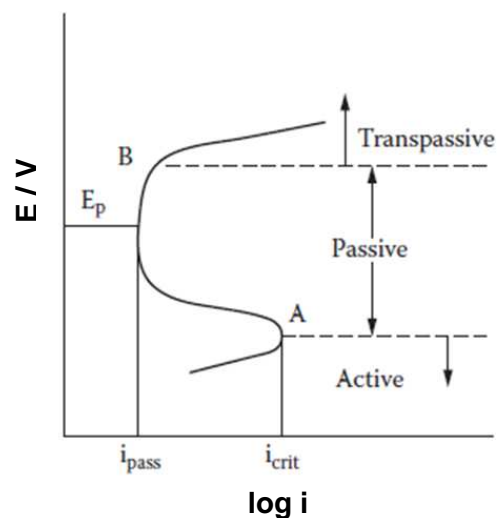


Figura 9 - Curva de polarização anódica para o material exibindo um comportamento activo-passivo [43].

No ambiente oral, muitos tipos de corrosão são possíveis pois a magnitude do processo de corrosão é controlado pelas propriedades electroquímicas da saliva que dependem da concentração dos componentes, do pH e da capacidade do tampão e também dependem da natureza do material metálico. Além desses factores as flutuações de temperatura (refeições quentes e frias), as mudanças no pH por causa da dieta (leite ou

produtos ácidos), e a decomposição de alimentos contribuem para o processo de corrosão [36, 48].

Em diversos estudos da liga de crómio-cobalto em salivas artificiais efectuados por diferentes autores, a corrosão galvânica, por picada, por fenda, por fadiga e por atrito (um tipo de corrosão por erosão) são as mais observadas [42]. No entanto, os estudos revelam que de entre estes tipos de corrosão, a corrosão por picada é a mais observada nas ligas de Crómio-Cobalto imersas em salivas artificiais com diferentes composições [33,49, 50].

Deste modo, faz-se uma breve descrição dos tipos de corrosão observados neste tipo de ligas.

✓ Corrosão galvânica, representada na figura 10, ocorre quando dois ou mais metais ou diferentes ligas (ou até a mesma liga submetida a tratamentos diferentes), entram em contacto, enquanto expostos a fluidos orais. A diferença entre os seus potenciais de corrosão resulta num fluxo de corrente eléctrica entre eles, originando assim a corrosão [36].

Um factor importante na corrosão galvânica é a relação entre a área anódica e a catódica. Se a área catódica é maior que a área anódica existe uma alta densidade de corrente no ânodo originando assim uma maior taxa de corrosão da zona anódica.

Na medicina dentária, é muito comum utilizar-se duas ligas diferentes com distintos potenciais de corrosão em arcos e braquetes, o que promove a libertação de iões metálicos do metal anódico ou da liga. Assim a corrente galvânica pode ter um efeito nocivo sobre os tecidos moles da cavidade bucal, de acordo com o estudo de vários investigadores [33, 36].

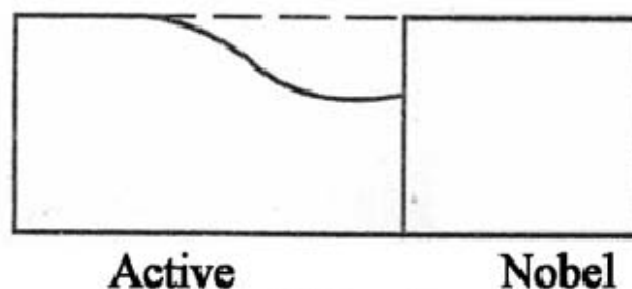


Figura 10 – Material metálico antes (--) e depois (—) da corrosão galvânica [33]

✓ Corrosão por picada, representada na figura 11, é uma forma de corrosão localizada com a formação de cavidades na superfície do metal. Este tipo de corrosão geralmente ocorre após a formação do filme passivante, ocorrendo assim a ruptura deste. O aumento da concentração de iões cloreto é um factor essencial na iniciação e propagação deste tipo de corrosão. Dentro da picada dá-se a oxidação e à superfície do metal a redução, conforme o processo evolui a concentração da solução no fundo de cada picada aumenta [33, 36].

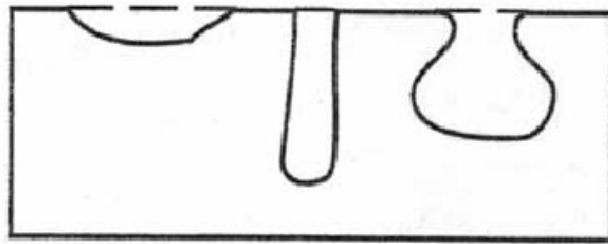


Figura 11 – Material metálico antes (--) e depois (—) corrosão por picada [33]

✓ Corrosão por fenda, ilustrada na figura 12, ocorre entre duas superfícies próximas ou em locais apertados onde a troca de oxigénio não está disponível. Muitas vezes ocorre pela aplicação de peças não metálicas em metais ou ligas. A redução do pH e aumento na concentração de iões cloreto são dois factores essenciais na iniciação e propagação deste tipo de corrosão. Quando a acidez do meio aumenta com o tempo o filme fino na superfície da liga dissolve-se acelerando assim o processo de corrosão localizada [36].

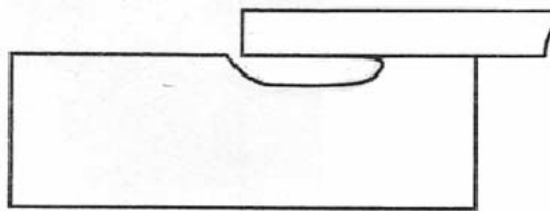


Figura 12 – Material metálico antes (--) e depois (—) corrosão por fenda [33]

✓ Corrosão por fadiga ocorre devido à acção combinada de tensões mecânicas e ataque química. Quando um metal ou uma liga é moldado e inserido na cavidade oral aplica-se uma tensão ao material que se traduz na formação de pequenas fendas. Nessas zonas dá-se a oxidação do metal propagando assim as fendas [33, 36].

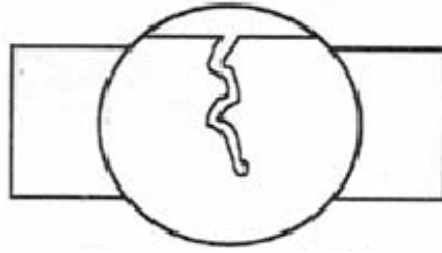


Figura 13 – Material metálico antes (--) e depois (—) corrosão por fadiga [33]

✓ Corrosão por atrito é o resultado da acção conjunta de ataques químicos e mecânicos. Este tipo de corrosão ocorre em áreas de contacto entre materiais que estão submetidos a vibrações e deslizamento. Um exemplo deste tipo de corrosão é inserção de um implante dentário [33, 36]

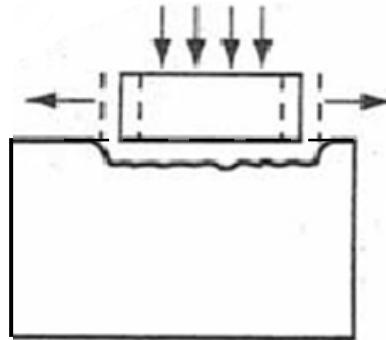


Figura 14 – Material metálico antes (--) e depois (—) corrosão por atrito [33]

1.5. Biofilmes Oraís

De um modo geral, podemos definir biofilme como sendo uma matriz polimérica, de aspecto gelatinoso, aderente a uma superfície sólida, quase sempre imersa num meio líquido e que é essencialmente constituída por aglomerados de células microbianas, água e por substâncias poliméricas extracelulares (EPS) [51, 52].

Os microrganismos estão presentes nos mais diversos habitats, capazes de desenvolverem comportamentos bastante complexos. Estima-se que mais de 90% dos microrganismos vivam sob a forma de biofilmes e praticamente não existe nenhuma superfície que não possa ser ou vir a ser colonizada por bactérias [53, 54].

Em ambientes aquosos apresentam-se, tanto como uma população planctónica, suspensos e dispersos no meio, como uma população sésil, aderidos a superfícies sólidas sob a forma de biofilme [53, 55].

As características ambientais da cavidade oral humana, tais como a humidade, a temperatura, o pH e a disponibilidade de nutrientes, permitem estabelecer uma comunidade biótica bastante complexa constituída por bactérias, leveduras, protozoários e alguns vírus. Segundo alguns especialistas, na comunidade biótica oral predominam as bactérias anaeróbias ou anaeróbias facultativas, dos géneros *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Micrococcus*, *Peptostreptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium* e *Leptotriquia* [3, 56]. Geralmente em biofilmes orais verifica-se a prevalência de espécies do género *Streptococcus* e outros microrganismos produtores de ácidos como os lactobacilos e as leveduras, no entanto é o género *Streptococcus* o mais predominante na superfície dos dentes [57].

Apesar dos diversos estudos ao longo dos últimos anos a clarificação da taxonomia das bactérias do género *Streptococcus* ainda não está completa, podendo-se ainda esperar a descoberta de novas espécies. Até à data, existem 18 espécies orais do género *Streptococcus*, tal como está representado na tabela 2 [58].

Tabela 2 – Espécies orais do género *Streptococcus*

Género	Espécie
<i>Streptococcus</i>	<i>S. mutans</i>
	<i>S. sobrinus</i>
	<i>S. cricetus</i>
	<i>S. rattus</i>
	<i>S. ferus</i>
	<i>S. macacae</i>
	<i>S. downei</i>
	<i>S. anginosus</i>
	<i>S. constellatus</i>
	<i>S. intermedius</i>
	<i>S. sanguis</i>
	<i>S. parasanguis</i>
	<i>S. gordonii</i>
	<i>S. mitis</i>
	<i>S. oralis</i>
<i>S. cirsia</i>	
<i>S. salivarius</i>	
<i>S. vestibularis</i>	

Destas espécies, as mais frequentemente isoladas na cavidade oral são o *Streptococcus mutans* e o *Streptococcus sobrinus*. Um dos factores virulentos mais importantes destas duas espécies é a sua enzima, glucosiltransferase (GTF). Esta pode existir na forma extracelular, intracelular ou associada à superfície da parede celular [19, 59], classificam-se em GTF-I que sintetiza glucanos insolúveis em água com ligações α -(1→3); a GTFSI que tanto produz glucanos insolúveis como solúveis em água; e a GTF-S que forma glucanos solúveis em água com ligações α -(1→6) [60]. É de salientar a importância dos glucanos pois estes promovem a formação da placa bacteriana visto conferirem aos microrganismos a capacidade de aderirem à superfície dentária [61].

A distinção entre estas duas espécies, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* é importante porque estes dois microrganismos têm diferentes mecanismos de colonização e virulência [19].

Streptococcus mutans

O *Streptococcus mutans*, representados na figura 15, é uma bactéria Gram positiva, microaerófila, que se apresenta como cocos em cadeia, não hemolítico, produtor de polissacarídeos (glucanos) extra e intracelulares. Os glucanos insolúveis facilitam a acumulação de *Streptococcus mutans* na superfície dentária e a sua agregação intercelular via receptores da superfície celular.

Streptococcus mutans segrega três tipos de glicosiltransferase (GTF-I, GTF-SI, GTF-S). O gene *gtfB* codifica a enzima GTF-I a qual participa da síntese de glucano a partir da sacarose [19].

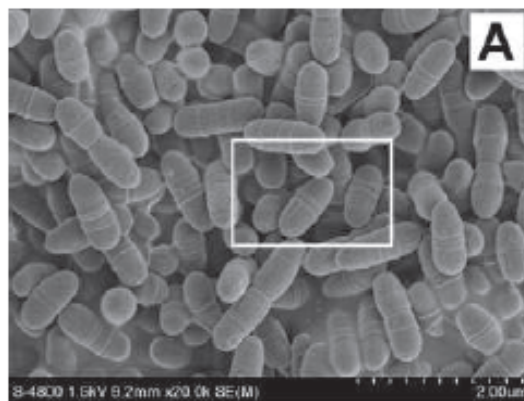


Figura 15 – Imagem de SEM de *Streptococcus mutans* [62]

Streptococcus sobrinus

O *Streptococcus sobrinus*, representados na figura 16, é uma bactéria Gram positiva, que se apresenta como cocos em cadeia, produtor de polissacarídeos (glucanos) extra e intracelulares e é umas das bactérias mais cariogénicas devido ao seu potencial acidogénico que promove a desmineralização dos dentes, e ao facto de possuir enzimas, glicosiltransferases, que sintetizam glucanos extracelulares solúveis e insolúveis em água a partir da sacarose [19, 57, 63].

Streptococcus sobrinus secreta quatro tipos de glicosiltransferase (GTF-I, GTF-S, GTF-SA, GTF-SB) e o gene *gtfI* codifica a enzima GTF-I, que participa da síntese de glucanos insolúveis em água [19].

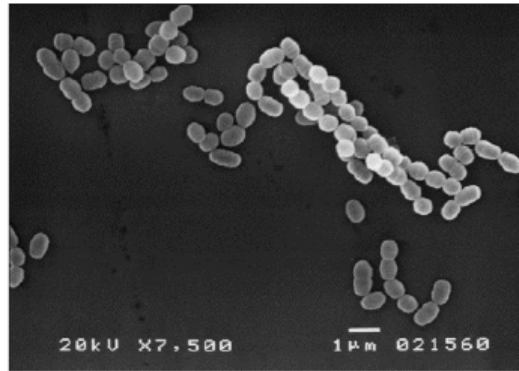


Figura 16 – Imagem de SEM de *Streptococcus sobrinus* [64]

Quando se realizam estudos com microrganismos é necessário ter em consideração o crescimento das espécies, neste caso as duas espécies de *Streptococcus*.

Em microbiologia, o termo crescimento refere-se a um aumento do número de células microbianas numa população. Logo, a variação de crescimento será a variação no número de células ou massa por unidade de tempo. Sendo que o tempo necessário para observar um ciclo de crescimento completo nas bactérias é muito variável pois depende de vários factores nutricionais e genéticos [65].

Uma curva de crescimento bacteriano típica, em cultura líquida, é caracterizada pela existência de quatro fases distintas: a fase “lag” ou de adaptação, a fase “log” ou exponencial, a fase estacionária e a fase de declínio ou de morte (figura 17) [65].

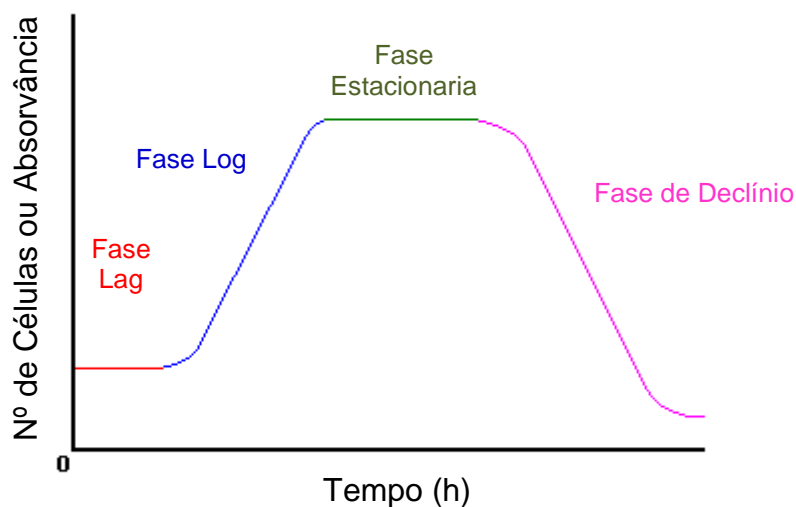


Figura 17 – Curva de Crescimento típica. Adaptado de [65]

A primeira das fases, fase “lag”, é um período onde o número de microrganismos permanece praticamente inalterado. Este pode demorar mais ou menos tempo, conforme o tipo de inóculo inicial, isto é, se é proveniente de culturas mais antigas ou não. A fase “lag” ocorre porque as células encontram-se desprovidas de várias coenzimas essenciais e/ou outros constituintes celulares necessários à absorção dos nutrientes presentes no meio. Esta fase também é observada quando as células sofrem traumas físicos (choque térmico, radiações) ou químicos (produtos tóxicos) [65].

Na seguinte fase, fase “log”, as células estão plenamente adaptadas, absorvendo os nutrientes, sintetizando os seus constituintes e possuindo uma rápida multiplicação. É de ter em conta também que a quantidade de produtos finais de metabolismo ainda é pequena. A taxa de crescimento exponencial é variável, de acordo com o tempo de geração do microrganismo em questão [65].

A fase estacionária, é a etapa onde não há um crescimento da população ou seja, o número de células que se divide é equivalente ao número de células que morre. Isto dá-se porque num sistema fechado o crescimento exponencial não pode ocorrer indefinidamente devido à escassez de nutrientes e à abundância de produtos tóxicos. Também é nesta fase que são sintetizados metabolitos secundários [65].

Por último, a fase de declínio onde a maioria das células está em processo de morte, devido à escassez de nutrientes e há presença de um nível elevado de produtos tóxicos. A contagem total de células permanece constante, enquanto as viáveis caem lentamente [65].

1.5.1. Composição do biofilme

O biofilme oral, tal como todos os outros biofilmes, é constituído por água, substâncias poliméricas, células, partículas e precipitados inorgânicos, iões e moléculas adsorvidas. O seu constituinte maioritário é água (~97%), a qual pode estar associada às cápsulas das células microbianas ou existir sob a forma de solvente [52]. A mobilidade desta dentro do biofilme é determinante para os processos de difusão que neles ocorrem [66].

As macromoléculas que constituem as EPS, polímeros produzidos pelos microrganismos bem como os produtos da lise celular, podem capturar e adsorver vários tipos de moléculas e iões, tornando-os parte integral do biofilme. No entanto, devido à natureza dinâmica dos biofilmes, a quantidade de cada um dos componentes varia de acordo com os microrganismos presentes, as condições em que se desenvolvem e a própria actividade do biofilme [67].

A matriz polimérica é a responsável pela morfologia, estrutura, coesão e integridade funcional dos biofilmes e a sua composição determina a maioria das propriedades físico-químicas e biológicas dos biofilmes [68]. Sendo assim, os microrganismos formam o biofilme para otimizar a sua sobrevivência uma vez que este lhes confere um grau de protecção contra condições ambientais e nutricionais adversas e um maior grau de resistência à acção de agentes químicos e físicos.

1.5.2. Formação do biofilme

A primeira teoria sobre biofilmes é apresentada por Costerton *et al.*, que explica os mecanismos através dos quais os microrganismos aderem às superfícies e as vantagens deste tipo de associação [69].

Apesar de os biofilmes possuírem uma variedade estrutural e composicional enorme, todos são formados pela mesma sequência de eventos físicos, químicos e biológicos [70, 71]:

- i) Formação de um filme condicionante de material orgânico, inicialmente presente no meio aquoso;
- ii) Transporte de microrganismos e nutrientes para a superfície de aderência através de movimentos brownianos, gravitação, difusão, convecção ou através da mobilidade intrínseca dos microrganismos;
- iii) Adesão microbiana, que passa de reversível a irreversível através da produção das EPS;
- iv) Divisão celular que resulta no aparecimento de novas células unidas entre si através da matriz de EPS;
- v) Co-adesão entre microrganismos com um elevado grau de especificidade inter-espécies;

- vi) Acumulação de células, nutrientes, produtos metabólicos e matéria particulada;
- vii) Desprendimento de porções do biofilme para o meio aquoso.

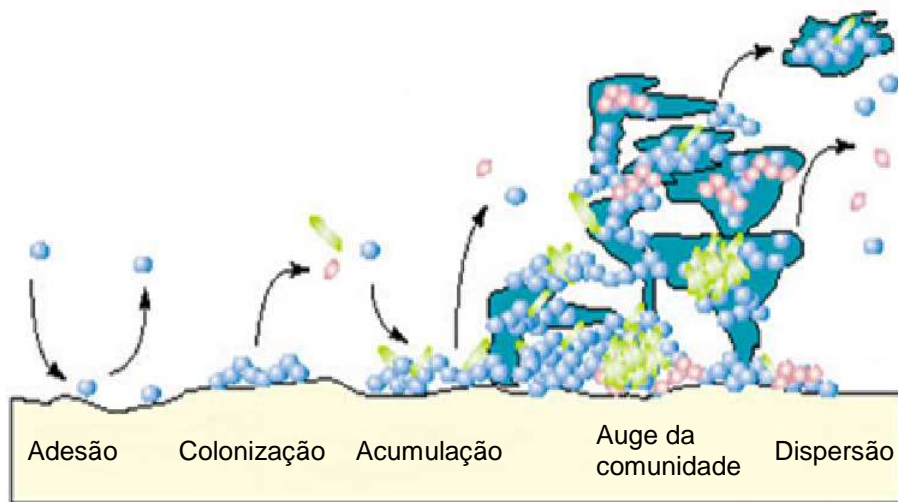


Figura 18 – Representação esquemática do desenvolvimento temporal de um biofilme. Adaptado de [72]

No caso específico do biofilme oral, a dinâmica de formação inicia-se com a adesão de microrganismos à superfície do dente - denominados colonizadores primários. Esses desenvolvem-se, originando microcolónias que sintetizam a matriz de EPS actuando então como substrato para a aderência de outros microrganismos - colonizadores secundários. Estes podem aderir directamente aos primários ou promoverem a formação de coagregados com outros microrganismos e só aderirem aos primários posteriormente [73].

Este processo, que constitui o desenvolvimento temporal da placa bacteriana, pode ser visualizado na figura 19.

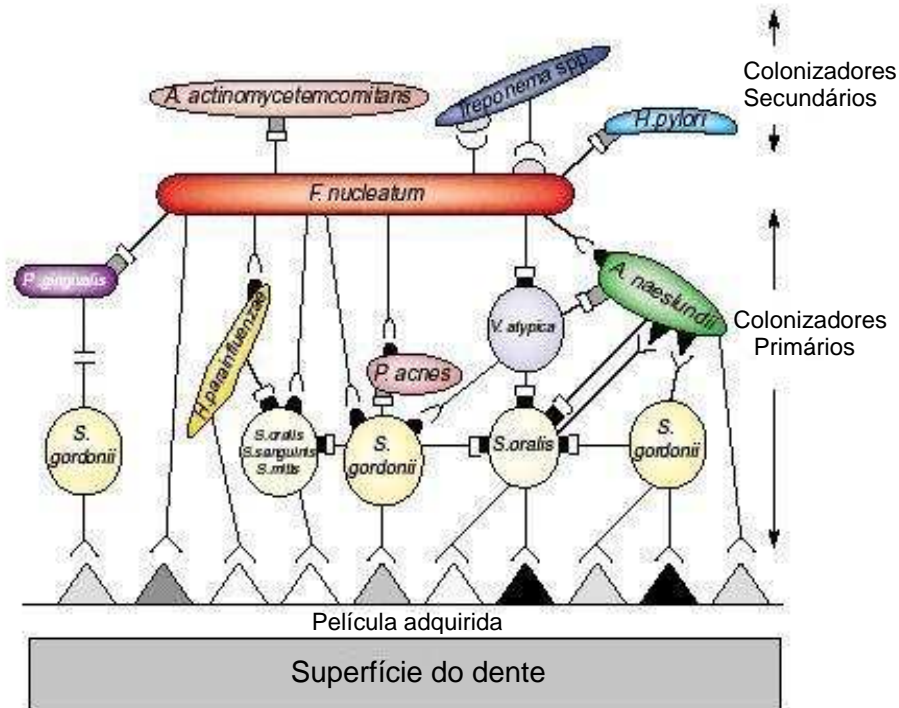


Figura 19 – Representação esquemática do desenvolvimento temporal da placa bacteriana. Adaptado de [73]

Existem diversos factores que afectam a formação do biofilme e respectivas propriedades, no entanto os que mais se destacam são: as características dos microrganismos; a composição e rugosidade das superfícies; a composição do fluido (o pH, a temperatura, a velocidade e a turbulência do fluido); e a presença de partículas inorgânicas.

1.6. Corrosão microbiana de ligas de Crómio-Cobalto

O biofilme oral é constituído por centenas de espécies microbianas, sendo a sua investigação *in vivo* muito complexa devido à sua heterogeneidade, pequenas quantidades disponíveis, acesso limitado, e um ambiente oral incontrolável e variado. No entanto o biofilme oral apresenta as características ideais para o processo de biocorrosão dos materiais metálicos. Assim desenvolveram-se estudos *in vitro*, em salivas artificiais que permitem o crescimento de microrganismos orais e a formação do biofilme oral, fornecendo as condições de crescimento e os nutrientes necessários, de maneira a superar a maioria dos problemas associados *in vivo* [74, 75].

Em estudos *in vitro*, verificou-se que os microrganismos orais se multiplicam rapidamente e aderem com facilidade à superfície do material metálico, existindo um complexo mecanismo de interacção entre as bactérias aeróbias e anaeróbias em várias zonas do material, favorecendo assim produtos de corrosão. Não só os microrganismos mas seus subprodutos, como é o caso do ácido láctico metabolizado pelo *S. mutans*, podem favorecer a corrosão [76]. Devido essencialmente aos microrganismos, dá-se a formação do biofilme oral na superfície do metal, que cria áreas com diferentes exposições à quantidade de oxigénio. Os locais menos oxigenados actuam como ânodo, sofrendo assim corrosão e libertando iões metálicos no ambiente envolvente. Esses iões metálicos combinam-se com os produtos finais dos microorganismos e juntamente com iões cloreto presentes no electrólito (saliva) formam mais produtos corrosivos, tais como $MnCl_2$, $FeCl_2$, entre outros [36].

Dos estudos efectuados sabe-se que os subprodutos da espécie *S. mutans* aumentam significativamente a intensidade de corrente de corrosão da liga de Cr-Co-Mo, isto traduz uma menor resistência da liga a esse meio. No entanto a investigação nesta área ainda se encontra pouco explorada [76].

Em resumo pode-se dizer que a presente investigação está dividida em duas partes. A primeira parte deste trabalho foca-se na caracterização da liga de crómio-cobalto e no processo de corrosão da liga quando imersa em diferentes salivas artificiais, tendo em consideração os diferentes componentes da saliva. E uma segunda parte que se baseia no estudo do crescimento microbiano em meio salivar artificial, de modo a iniciar futuras investigações na área da biocorrosão.

Capítulo 2

Parte Experimental

Este capítulo visa a descrição de todos os procedimentos experimentais realizados no âmbito desta investigação, para uma melhor compreensão dos resultados experimentais apresentados no próximo capítulo (apresentação e discussão de resultados). Além disso todos os reagentes e instrumentação utilizados também se encontram aqui descritos.

2.1. Reagentes

Na tabela 3, encontra-se resumida a informação relativa aos reagentes utilizados na realização dos ensaios experimentais.

Tabela 3 – Características dos reagentes utilizados

Reagente	Fórmula Molecular	Massa Molar (g/mol)	Grau de Pureza (%)	Marca	Riscos e Segurança
Cloreto de Sódio	NaCl	58,44	≥99,0	Merck	-
Cloreto de Potássio	KCl	74,55	≥99,0	Merck	S: 22-24/25
Cloreto de Cálcio Dihidratado	CaCl ₂ .2H ₂ O	147,01	≥99,0	Merck	R: 36 S: 22-24
Dihidrogenofosfato de sódio monohidratado	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	137,99	-	Sigma	-
Hidrogenofosfato dissódico	Na ₂ HPO ₄	141,96	≥99,0	Sigma	-
Ureia	NH ₂ CONH ₂	60,06	≥ 99,0	Panreac	-
Mucina¹	-	-	-	Sigma	-
Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,16	96,0	Sigma	-
Hidróxido de Sódio	NaOH	40,00	-	Merck	R: 35 S: 2-26-37/39

¹ Características específicas da Mucina: composição (15%-20% m/m proteína e até 80% m/m de hidratos de carbono); tipo III proveniente do estômago suíno.

A balança utilizada para a pesagem de todos os compostos químicos foi uma balança digital tipo ABS 220-4 da KERN & Sohn GmbH (Max = 220 g e com erro = 0,1 mg).

2.2. Salivas Artificiais

No estudo realizado pretendeu-se estudar a influência de cada componente de uma saliva artificial no processo de corrosão de uma liga de cromo-cobalto. Para tal, desenvolveram-se várias salivas artificiais, cada uma contendo componentes que mimetizem os substituintes da saliva humana, que tem diversas funções, como é o caso da função de adesão e de lubrificação, da saliva humana. No fim criou-se uma saliva artificial contendo todos esses componentes de forma a mimetizar de maneira mais exacta a saliva humana.

Além da escolha dos componentes mais importantes, o pH é um factor a ter em consideração quando se mimetiza a saliva humana. Sendo assim, as salivas artificiais estudadas apresentam um pH idêntico ao pH da saliva humana, que ronda a neutralidade, sendo necessário a utilização de um tampão fosfato. Nos casos em que se estuda cada componente separadamente, o pH é ajustado com uma solução de NaOH (0,1 M).

De modo a preparar o tampão fosfato é necessário ter em consideração as equações de ionização e as constantes de ionização ácida. Neste caso, o sistema tampão mais adequado é o $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$, visto que o pK_a do ácido H_2PO_4^- é o mais próximo do pH desejado. Sendo assim, utilizando a equação de Henderson-Hasselbalch obtêm-se:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{base conjugada}]}{[\text{ácido}]} \Leftrightarrow 7,0 = 7,21 + \log \frac{[\text{HPO}_4^{2-}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]} \Leftrightarrow \quad (14)$$

$$\log \frac{[\text{HPO}_4^{2-}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]} \Leftrightarrow -0,21 \Leftrightarrow \frac{[\text{HPO}_4^{2-}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]} = 0,6$$

Então, para preparar o tampão fosfato dissolve-se hidrogenofosfato dissódico (Na_2HPO_4) e dihidrogenofosfato de sódio hidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) em água Millipore Milli-Q ($R = 18\text{M}\Omega$) na razão molar 0,6.

Tabela 4 – Composição das diferentes salivas artificiais

Saliva Artificial	Concentração (g/ L)							
	NaCl (0,563)	KCl (0,608)	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,091)	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,431)	Na_2HPO_4 (0,266)	Ureia (1,000)	Mucina (0,100)	Glucose (0,100)
I	✓	✓	✓	-	-	-	-	-
I+ureia	✓	✓	✓	-	-	✓	-	-
I+mucina	✓	✓	✓	-	-	-	✓	-
I+mucina ₁	✓	✓	✓	-	-	-	0,050	-
I+mucina ₂	✓	✓	✓	-	-	-	0,010	-
I+glucose	✓	✓	✓	-	-	-	-	✓
II	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	-
II+ureia	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	-
II+mucina	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-
II+glucose	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	✓
II+ureia+ mucina	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-
III	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Na cavidade oral acontece muitas vezes variações de pH, que podem ocorrer devido por exemplo à ingestão de certos tipos de alimentos. Deste modo, prepararam-se salivais artificiais idênticas anteriores, contendo iguais concentrações totais de iões cloreto, iões fosfato e dos compostos orgânicos, mucina, ureia e glucose. No entanto os iões fosfato não se apresentam como sistema tampão e desta forma o pH das salivas artificiais ronda os 4,5. Esta saliva teve como base a saliva artificial de Fusayama Meyer.

Tabela 5 – Composição das diferentes salivas artificiais não tamponadas

Saliva Artificial	Concentração (g/ L)						
	NaCl (0,400)	KCl (0,400)	CaCl ₂ .2H ₂ O (0,906)	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O (0,690)	Ureia (1,000)	Mucina (0,100)	Glucose (0,100)
A	✓	✓	✓	-	-	-	-
B	✓	✓	✓	✓	-	-	-
B+ureia	✓	✓	✓	✓	✓	-	-
B+mucina	✓	✓	✓	✓	-	✓	-
B+glucose	✓	✓	✓	✓	-	-	✓
B+ureia+ mucina	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-
C	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Todas as salivas artificiais utilizadas nos ensaios experimentais foram preparadas diariamente com água Millipore Milli-Q ($R = 18M\Omega$) e as leituras de pH realizadas num aparelho de pH MeterLab PHM 240 da *Radiometer Analytical*. Estas foram utilizadas nos ensaios experimentais sem serem desarejadas.

2.3. Célula e Eléctrodos

Nos ensaios electroquímicos utilizou-se uma célula de vidro de três eléctrodos com dupla parede (Figura 20).



Figura 20 – Célula electroquímica de três eléctrodos

O eléctrodo de trabalho utilizado nos ensaios realizados foi um disco de uma liga de Crómio-Cobalto com um diâmetro de 1,0 cm (fornecida pelo departamento de prótese dentária da FMDUL) e uma espessura de 0,9 mm.

De modo a remover substâncias que pudessem estar adsorvidas à superfície do eléctrodo houve a necessidade de realizar um tratamento prévio na liga. Sendo assim, o disco sofre um polimento com uma lixa abrasiva (Water proof, Silion Carbide, P1200,IA) e uma posterior lavagem com água Milli-Q. Em seguida é submetido a um banho de Ultra-Sons Elmasonic S30 em água Milli-Q durante 3 minutos. Por último sofre uma lavagem com água Milli-Q e é seco com um fluxo de N_2 .

Para a realização dos ensaios experimentais, o eléctrodo de trabalho foi introduzido num cilindro, deixando uma superfície exposta de 0,6 cm de diâmetro. Este cilindro é constituído por aço inox, que permite estabelecer o contacto eléctrico, e por um revestimento de teflon.

O eléctrodo secundário utilizado nos ensaios é um fio de platina em forma de espiral. Este é utilizado para completar o circuito electroquímico, para que a corrente eléctrica que atravessa a célula passe entre o eléctrodo de trabalho e o eléctrodo secundário.

O eléctrodo de referência utilizado nos ensaios realizados foi um eléctrodo de Ag/AgCl Radiometer Analytical, cujo potencial de equilíbrio é 0,197 V vs NHE (a 25 °C). O eléctrodo de referência possui um potencial fixo durante toda a experiência e serve para medir as diferenças de potencial apresentadas pelo eléctrodo de trabalho, devendo ser idealmente não polarizável.

Os ensaios experimentais foram sempre realizados a uma temperatura de 37°C, igual à temperatura da cavidade oral da maioria dos seres humanos, controlada através de um banho/circulador termoestabilizado modelo Grant W14, ligado à célula de vidro de dupla parede, representado na figura 21.

Em todos os ensaios experimentais os eléctrodos estiveram submersos nas respectivas salivas artificiais, durante 15 minutos de modo a estabilizar o sistema.

O equipamento utilizado para a realização dos ensaios electroquímicos foi um potencióstato modelo Voltalab 10 (PGZ 100) da Radiometer Analytical, representado na figura 21, com aquisição automática de dados através do software Voltmaster 4.



Figura 21 – Célula electroquímica de três eléctrodos e equipamento utilizados para as experiências electroquímicas

2.4. Técnicas Electroquímicas

De modo a estudar o comportamento do biomaterial Cr-Co, utilizam-se diversas técnicas electroquímicas, nomeadamente medidas de potencial em circuito aberto, polarização potenciodinâmica e voltametria cíclica. Estas são as

técnicas mais utilizadas quando se efectuam estudos de corrosão e biocorrosão de matérias metálicas em medicina dentária.

2.4.1. Medidas de Potencial em Circuito Aberto (ocp)

O potencial em circuito aberto (ocp) consiste na medição da diferença entre o potencial do eléctrodo de trabalho e o eléctrodo de referência na ausência da passagem de corrente.

O valor obtido corresponde ao valor do potencial de equilíbrio entre as espécies que constituem o eléctrodo de trabalho e a solução electrolítica, sendo o registo feito em função do tempo de exposição do eléctrodo no electrólito.

Os ensaios de potencial em circuito aberto foram realizados durante um período de 24h. Foram os únicos onde se aplicou agitação para promover a transferência de massa. Após cada ensaio foi realizado uma curva de polarização potenciodinâmica e leitura de pH.

2.4.2. Polarização Potenciodinâmica

O desvio do valor de equilíbrio do potencial de eléctrodo em consequência da passagem de corrente é designado por polarização [77].

No método de polarização potenciodinâmica, o potencial do eléctrodo de trabalho em relação ao eléctrodo de referência varia de maneira continua em função do tempo enquanto é medido o valor da corrente entre o eléctrodo de trabalho e o eléctrodo auxiliar. Para se poder variar o potencial aplicado é necessário um potenciostato.

Uma melhor visualização da influência da polarização sobre a densidade de corrente é obtida através da representação gráfica em diagramas de potencial de eléctrodo (E) *versus* densidade de corrente (i). A figura 10 ilustra as curvas de polarização anódica e catódica num diagrama em que as densidades de corrente assumem valores positivos, i_a , e valores negativos, i_c , respectivamente. Observe-se que no potencial de equilíbrio E_e a densidade de corrente assume valor nulo [47].

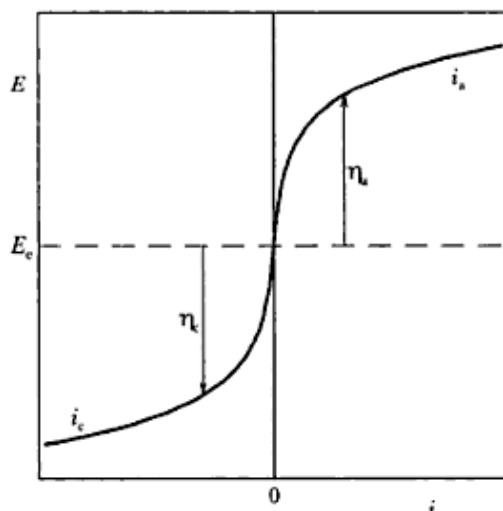


Figura 22 – Curvas de polarização anódica (i_a) e catódica (i_c) num diagrama em que as densidades de corrente assumem valores relativos: i_a é positivo e i_c é negativo. E_e = potencial de equilíbrio [47].

Os ensaios de polarização potenciodinâmica foram realizados nos intervalos de potencial de -700 mV a -150 mV vs Ag/AgCl, intervalo escolhido através de um estudo de medidas em potencial de circuito aberto realizados durante 5 minutos, e -700 mV a 900 mV vs Ag/AgCl ambos a uma velocidade de varrimento de 0,5 mV/s. Todos os ensaios foram efectuados em triplicado.

2.4.3. Voltametria Cíclica (CV)

A versatilidade e facilidade de utilização da voltametria cíclica permitem o uso desta técnica em várias áreas científicas, principalmente na electroquímica [78].

Esta técnica consiste na aplicação ao eléctrodo de trabalho de um potencial que varia linearmente com o tempo a uma velocidade fixa, através de um potenciostato, que controla o potencial do eléctrodo de trabalho em relação a um eléctrodo de referência [16, 44].

Na voltametria cíclica, os parâmetros mais importantes são o potencial inicial, E_i , a direcção de varrimento inicial, a velocidade de varrimento, v , o potencial máximo, E_{max} , o potencial mínimo, E_{min} , e o potencial final, E_f . Ao atingir o E_{max} faz-se um varrimento em sentido contrário, voltando ao E_{min} , tal como se demonstra na figura 23. Dependendo da informação que se pretende, podem-se usar ciclos simples ou múltiplos [44].

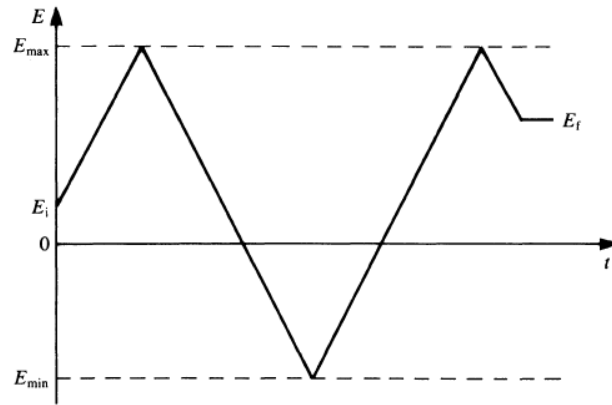


Figura 23 - Variação do potencial aplicado com o tempo em voltametria cíclica, mostrando o potencial inicial E_i , o potencial final E_f , e os potenciais máximo E_{max} , e o mínimo E_{min} . A velocidade de varrimento é dada por $|dE/dt| = v$ [44].

Do registo da densidade de corrente obtida, i , em função do potencial aplicado, E , obtém-se uma curva $i(E)$ denominada de voltamograma cíclico, como está esquematizado na figura 24.

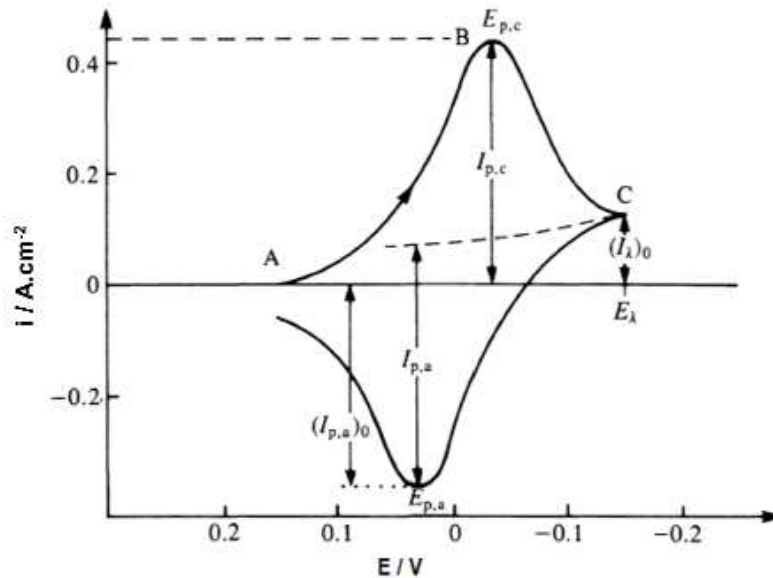


Figura 24 - Voltamograma cíclico para um sistema reversível [44].

Na zona interfacial do eléctrodo tanto podem ocorrer oxidações como reduções, sendo a reacção do tipo:



onde O e R são, respectivamente, as espécies oxidadas e reduzidas.

O varrimento catódico (varrimento que ocorre no sentido dos potenciais negativos) inicia-se a um potencial onde não se verifica redução. À medida que se aumenta o potencial, observa-se um máximo de intensidade do pico catódico ($i_{p,c}$) e atinge-se o potencial de redução da espécie ($E_{p,c}$). Posteriormente ao pico de redução da espécie, dá-se a inversão do potencial em E_{max} , e as espécies reduzidas (R) (geradas durante o varrimento catódico e acumuladas à superfície do eléctrodo e zona interfacial) são oxidadas dando origem ao pico anódico ($E_{p,a}$; $i_{p,a}$) [44].

No presente trabalho, os estudos de voltametria cíclica foram realizados no intervalo de potencial entre -700 e 900 mV vs Ag/AgCl e à velocidade de varrimento de 0,5 mV/s.

2.5. Microscopia Óptica (MO)

O aspecto de uma superfície e/ou revestimento verifica-se, em primeiro lugar, normalmente por uma inspecção visual e posteriormente através do microscópio óptico.

A técnica de Microscopia Óptica tem sido muito utilizada na investigação de materiais maiores que um 1 micrómetro. O microscópio apresenta dois sistemas de lentes convergentes, a objectiva e a ocular. A objectiva é um conjunto de lentes que apresenta uma pequena distância focal e que fornece uma imagem real e aumentada do objecto que é observado, e a ocular, que funciona como uma lupa, que nos dá uma imagem virtual e aumentada da imagem real que se formou na objectiva [79].

Esta técnica envolve a passagem de luz visível transmitida através ou reflectida pela amostra para uma ou mais lentes, permitindo a visualização da mesma. A imagem resultante pode ser detectada directamente a olho nu, por fotografia ou por captura digital [79]

O microscópio óptico utilizado para a aquisição de imagens foi um modelo SMZ 1500-FT da marca Nikon.

2.6. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)

Após uma visualização através da técnica de microscopia óptica e para obtenção de informações com elevada resolução lateral e/ou profundidade da topografia/morfologia utilizou-se a microscopia electrónica de varrimento (SEM).

Os microscópios electrónicos são instrumentos que permitem a observação e caracterização de um material com base nas radiações resultantes da interacção com um feixe de electrões. Esse feixe de electrões é acelerado, apresentando um comportamento ondulatório associado a um comprimento de onda que decresce com o aumento da energia cinética. É deste modo possível, sem efeitos de difracção apreciáveis, gerar um feixe electrónico de diâmetro e abertura angular muito reduzidos, permitindo obter um poder resolvente e uma profundidade de campo muito superiores aos obtidos em microscopia óptica [80].

O princípio da microscopia electrónica de varrimento consiste em realizar, o varrimento da superfície da amostra, por um feixe electrónico finamente focado, modulando o brilho em cada ponto da imagem obtida num monitor de visualização pelo sinal emitido pela amostra. Deste modo, verifica-se uma correspondência, ponto por ponto, entre a imagem e a região observada da amostra, dependendo da informação contida na imagem, da radiação e do detector utilizados [81].

A maioria das amostras a observar em SEM apresentam estabilidade em condições de alto-vácuo às quais são submetidas, uma boa condutividade eléctrica superficial, bem como uma estabilidade física e química, nas condições de análise.

Um microscópio electrónico de varrimento integrando uma unidade de detecção de raios-X (EDS), apresenta grande utilidade no apoio à investigação e no desenvolvimento e controlo de qualidade de materiais de aplicação tecnológica [80].

Na caracterização da liga de Crómio-Cobalto foi utilizado um microscópico de FEG-SEM da marca JEOL, modelo JSM-7001F com resolução 6 μm a 25 kV. Este aparelho estava acoplado a um detector de EDS de elementos leves, modelo INCA 250 da Oxford.

2.7. Espectroscopia de Dispersão de Energia (EDS)

A espectroscopia de raios-X de dispersão de energia (EDS) é uma técnica que permite a caracterização da composição elementar de um microvolume de material que tem por base a análise do respectivo espectro de emissão de raios-X.

O EDS aparece associado a uma grande diversidade de métodos, no entanto quer pela sua sensibilidade quer pelo seu modo de operação, esta técnica apresenta uma elevada compatibilidade com a operação dos microscópios electrónicos, a que é frequentemente acoplada, permitindo assim a realização de análises de microvolumes de materiais em simultâneo com a observação da amostra em condições de elevada resolução espacial.

A dispersão de energia, um dos métodos de microanálise por raios-X, aproveita as propriedades ionizantes dos raios-X para determinar a energia de cada fóton absorvido no detector de semiconductor, utilizando a medida da corrente eléctrica resultante da carga eléctrica gerada no processo. A energia de cada fóton que entra no detector é assim determinada e registada num espectro integral que acumula o número de fótons detectado em função da respectiva energia [81].

O espectro de emissão é obtido simultaneamente em toda a gama útil de energias de interesse, de forma que pode associar-se em tempo quase real a observação de imagens em SEM. A intensidade relativa das diferentes riscas espectrais observadas para além de depender das condições de excitação (tipo de radiação e energia) e da transição considerada entre, níveis de energia, específicos dos átomos de cada elemento, depende também das características do sistema de detecção. Esta técnica permite a detecção de riscas características, de todos os elementos do boro (B) ao urânio (U) [80, 81].

A microanálise por raios-X permite realizar três tipos de análise: quantitativa, qualitativa e semiquantitativa. A análise semiquantitativa (também designada “sem padrões”) é uma análise de execução muito rápida e que consiste em executar todo o procedimento de análise quantitativa com base em intensidades padrão calculadas teoricamente (tendo em atenção as características do detector e as condições de excitação) e/ou utilizando espectros de referência [80].

A espectroscopia de dispersão de energias tem especial interesse para a obtenção de uma primeira estimativa da composição, e em aplicações em que é menos importante o erro absoluto de análise. Tem a vantagem de permitir uma análise muito expedita, necessariamente normalizada a 100 %, e imune à flutuação da intensidade do feixe de electrões [80].

2.8. Material microbiológico e meios de cultura

Estes estudos iniciaram-se com culturas em suspensão. Utilizaram-se culturas puras de diferentes bactérias: *Streptococcus mutans* (ATCC 33478) e *Streptococcus sobrinus* (ATCC 25175) provenientes da Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) e que vieram liofilizadas em ampola. Foram revitalizadas e mantidas em meio de manutenção indicado para cada uma: *S. mutans*- Brain Heart Infusion (tabela 6), suplementado com glucose e extracto de levedura; *S. sobrinus*- YGLPB (caldo de extracto de levedura, glucose, lactose e peptona).

Tabela 6 – Composição do meio BHI

	Composição (g/L)
Infusão de cérebro de borrego	12,5
Infusão de coração de boi	5
Peptona	10
Cloreto de Sódio	5
D (+) – Glucose	2
Dihidrogenofosfato de Sódio	2,5

2.9. Densidade Óptica (OD)

A avaliação quantitativa da evolução do crescimento bacteriano ao longo do tempo efectua-se através de vários métodos. Porém no caso de microrganismos unicelulares esta avaliação é, normalmente, feita através da determinação da concentração celular pelo método de determinação de biomassa em suspensão ou de contagem do número de células [82]

A densidade óptica (OD) é um dos métodos mais utilizados para determinar a biomassa em suspensão. Este consiste na determinação da quantidade de luz que é transmitida através da cultura líquida. Quando um feixe de luz atravessa a suspensão, a redução da quantidade de luz transmitida possibilita a medição da densidade celular, uma vez que a densidade óptica registada é inversamente proporcional à biomassa celular em suspensão. Sendo assim, pode-se concluir que quanto maior for o número de células, menor será a quantidade de luz transmitida [83].

A evolução do crescimento bacteriano é seguida por leituras de densidade óptica a 600 nm realizadas num espectrofotómetro Hitachi 2000 e em células de quartzo.

No entanto, é de salientar que esta técnica não permite a determinação de células viáveis.

Capítulo 3

Apresentação e discussão de resultados

Capítulo 3 – Apresentação e discussão de resultados

Neste capítulo encontram-se expressos os resultados obtidos ao longo do desenvolvimento experimental deste trabalho. Iniciando-se pelos resultados obtidos durante a caracterização morfológica e química da liga de crómio-cobalto, seguido pelos resultados de caracterização electroquímica do processo de corrosão da liga imersa em diferentes salivas artificiais e por fim os resultados do crescimento microbiano de duas espécies de *Streptococcus* em saliva artificial.

3.1. Caracterização morfológica e química da liga de Crómio-Cobalto

Na medicina dentária, as ligas de Crómio-Cobalto (Cr-Co) são amplamente utilizadas devido à sua excelente resistência à corrosão e à sua biocompatibilidade. No entanto, os estudos electroquímicos destas ligas são escassos comparativamente com os estudos em aço inoxidável, titânio e ligas de titânio [38].

A microscopia óptica (MO) permite observar possíveis imperfeições macroscópicas à superfície da liga. Na figura 25 estão representadas as imagens de MO da liga de crómio-cobalto usada neste estudo, após o polimento.

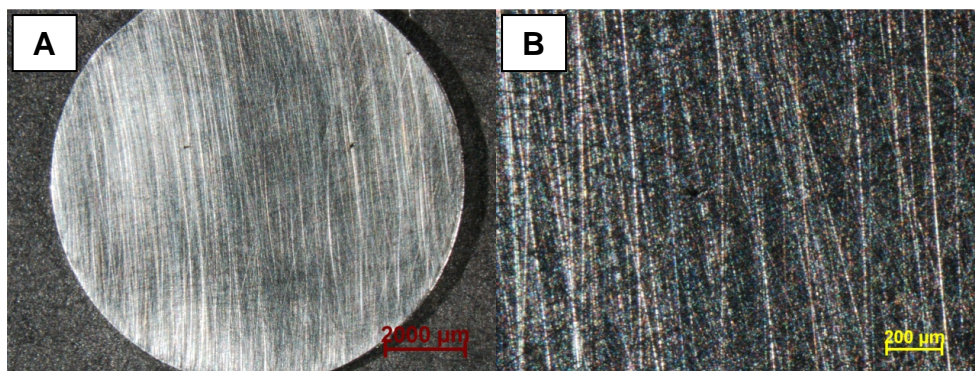


Figura 25 – Imagens de microscopia óptica da superfície da liga de Crómio-Cobalto em diferentes ampliações: A) 10x; B) 70x

Através da observação da figura 25 verifica-se que a liga de crómio-cobalto apresenta uma superfície brilhante e com irregularidades que são

Capítulo 3 – Apresentação e discussão de resultados

causadas pelo polimento. Por comparação com os resultados de MO apresentados no artigo de Ohida *et al.*, observa-se que após o polimento a superfície da liga apresenta irregularidades semelhantes [84].

Através da análise de microscopia electrónica de varrimento/espectroscopia de dispersão de energias (SEM/EDS) foi possível observar, a nível microscópico, a liga de Cr-Co e conhecer a composição química da mesma. Na figura 26 estão representadas as imagens de SEM da liga de Crómio-Cobalto em diferentes ampliações.

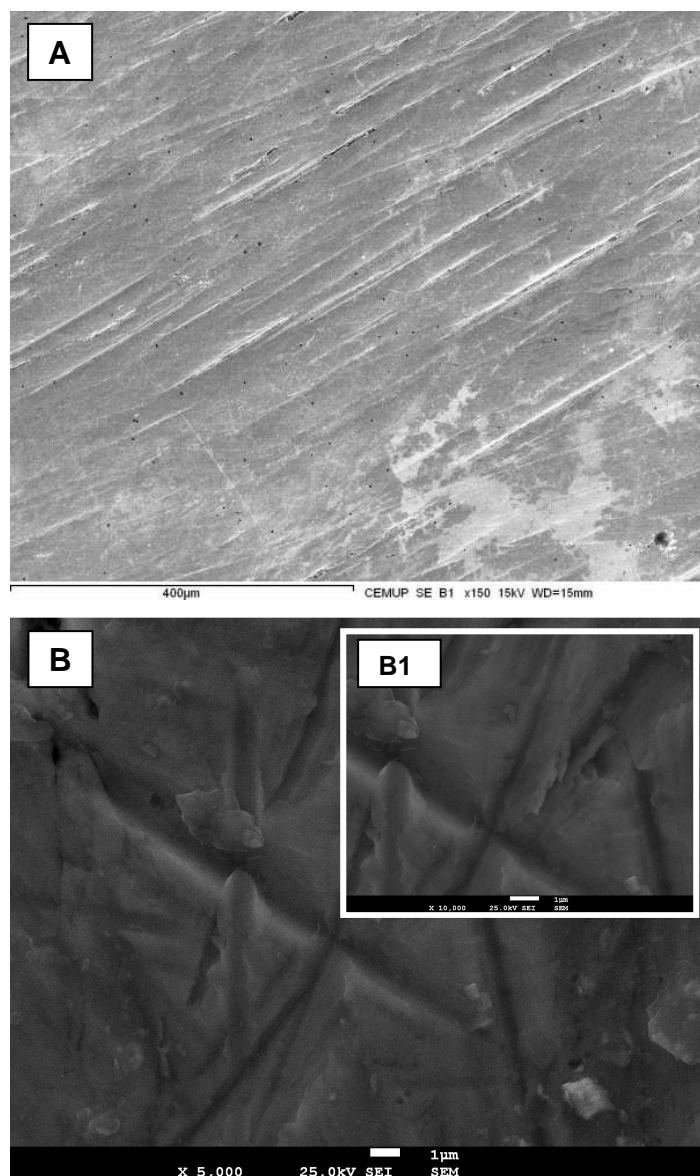


Figura 26 – Imagens de SEM da liga de Crómio-Cobalto em diferentes ampliações: A) 150x; B) 5000x e B1) ampliação de uma falha da superfície da liga (10000x)

Capítulo 3 – Apresentação e discussão de resultados

Em relação às imagens de SEM observa-se que as irregularidades que se verificavam nas imagens de MO são na realidade falhas na superfície da liga. Nestas falhas poderá ocorrer uma acumulação/estagnação do meio corrosivo o que causa diferenças nas concentrações de iões em diferentes locais da liga promovendo assim o processo de corrosão.

Na figura 27 está representado o espectro de EDS, a partir do qual foi possível conhecer-se a composição química da liga de Crómio-Cobalto em estudo.

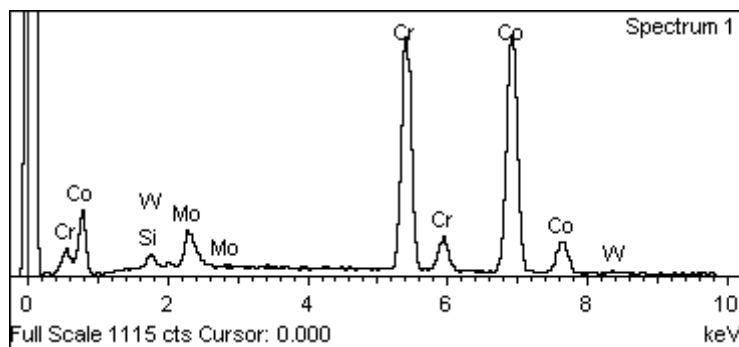


Figura 27 – Espectro de EDS da liga de Cr-Co utilizada nos ensaios experimentais

A composição química da liga utilizada nos ensaios realizados durante este trabalho encontra-se na tabela 7, bem como outros exemplos de ligas de Cr-Co utilizadas igualmente em medicina dentária.

Tabela 7 – Comparação da composição química da liga de Crómio-Cobalto em estudo com outras ligas de aplicação biomédica

Elemento	Massa (%)			
	Em estudo	IPS30 ^[85]	CoCr Ref. ^[38]	CoCrMo ^[86]
Cr	32,14	30,1	28,9	27,29
Co	54,90	60,2	63,7	65,21
Mo	9,26	0,6	5,3	5,54
W	2,71	-	0,1	-
Si	0,99	0,9	<0,1	0,69
Ga	-	3,9	-	-
Nb	-	3,2	-	-
Fe	-	<1,0	<0,1	0,22
Li, B, Al	-	<1,0	-	-
Sn	-	-	<0,1	-
Mn	-	-	-	0,65
Ni	-	-	-	0,13
N	-	-	-	0,18
C	-	-	-	0,089

Capítulo 3 – Apresentação e discussão de resultados

Observando a tabela 7 podemos afirmar que todas as ligas de crómio-cobalto apresentam o cobalto como o elemento em maior percentagem, sendo o segundo elemento, o crómio. Além disso todas as ligas apresentam também molibdénio embora numa menor. Quanto aos restantes elementos que constituem estas ligas observam-se diversidades e percentagens variadas.

3.2. Estudo da corrosão da liga de Crómio-Cobalto

O processo de corrosão dos materiais de natureza metálica, utilizados na medicina dentária, é um importante aspecto a considerar, dada a importância da biocompatibilidade destes materiais como a sua aplicabilidade.

De todas as técnicas electroquímicas, as mais utilizadas nestes estudos são as medidas de potencial de circuito aberto, a polarização potenciodinâmica e a voltametria cíclica.

3.2.1. Estudos em diversas salivas artificiais tamponadas

3.2.1.1. Medidas de potencial em circuito aberto

As medições de potencial em circuito aberto (ocp) são muito comuns quando se pretende obter informação sobre o estado da superfície de um eléctrodo e sua estabilidade em meio aquoso.

Na figura 28 estão representadas as variações das medidas de ocp durante 24 h para a liga de Crómio-Cobalto em diferentes salivas artificiais.

Relembrando a composição de cada saliva artificial, na saliva I estão presentes apenas iões cloreto, enquanto que na saliva II além dos iões cloreto está presente o tampão fosfato. Em relação à saliva III é constituída por todos os componentes estudados ao longo desta investigação. A saliva I foi a única que sofreu um ajuste de pH com NaOH (0,1M), ver tabela 4.

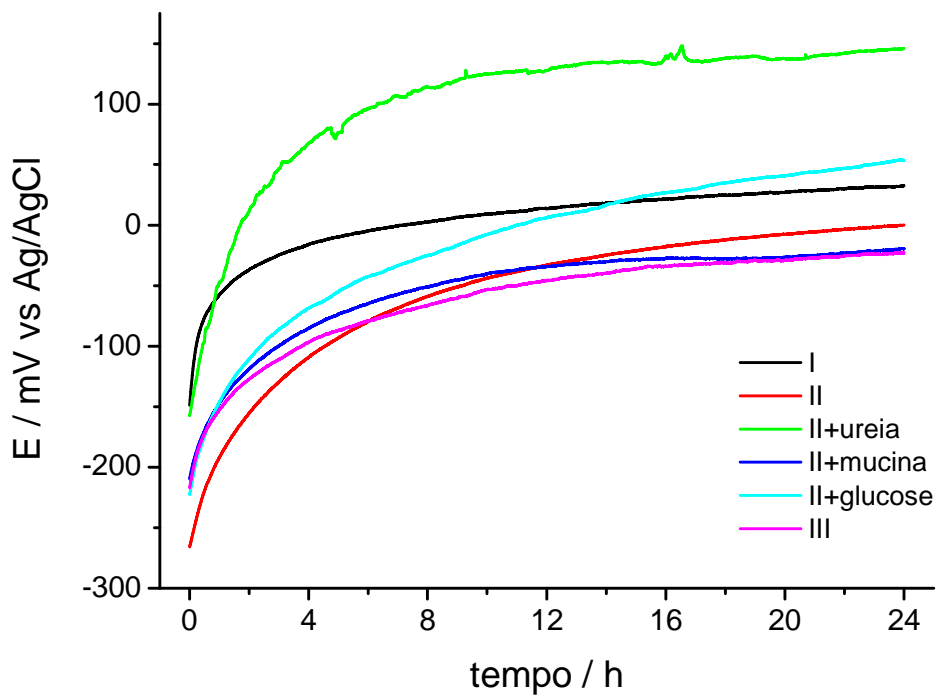


Figura 28 - Variação do potencial em circuito aberto (ocp) durante 24 h de imersão para a liga de Cr-Co, nas diversas salivas artificiais em estudo

A partir das medidas de ocp, obtiveram-se os valores iniciais e finais de potencial em circuito aberto nas diferentes salivas artificiais, demonstrados na tabela 8.

Tabela 8 – Valores iniciais e finais de pH e de potencial em circuito aberto nas diferentes salivas artificiais

Saliva Artificial	pH _{inicial}	pH _{final}	E _{0h} (mV)	E _{24h} (mV)
I	6,656	7,154	-148,8	32,4
II	6,680	6,673	-265,8	0,1
II+ureia	6,625	6,669	-156,9	146,3
II+mucina	6,660	6,677	-209,8	-19,6
II+glucose	6,664	6,668	-222,9	53,3
III	6,670	6,508	-217,1	-22,9

Capítulo 3 – Apresentação e discussão de resultados

Da análise da figura 28 e da tabela 8 verifica-se que as curvas de ocp em função do tempo obtidas em diferentes salivas artificiais se iniciam sempre a potenciais negativos, entre -266 mV e os -145 mV vs Ag/AgCl, e com um pH muito semelhante tal como pretendido. No decorrer das medições observa-se um deslocamento dos potenciais, até valores positivos com a excepção nas salivas II+mucina e III. Em relação ao pH, verifica-se um aumento nos valores ao fim de 24 h. Este resultado está de acordo com Queiroz *et al* [87] onde se verificou que diversas salivas artificiais, ao final de 50 h, possuíam valores de pH ligeiramente mais elevados.

Além destes resultados, a saliva artificial III é a única que apresenta alterações a visíveis a olho nu, isto é, ao fim das 24 h apresenta-se turva e com um cheiro peculiar.

Observando os valores de E_{24h} de todos os ensaios verifica-se que cada componente altera a resposta da liga ao longo do tempo, no entanto quando mergulhada nas salivas artificiais II+mucina e III, apresenta os valores de E_{24h} mais baixos de todos. Este resultado pode significar que na presença do tampão fosfato a mucina é o composto que mais influencia o comportamento da liga quando imersa na saliva III, num tempo superior a 14h.

A partir dos valores do potencial de circuito aberto é possível estabelecer os equilíbrios dominantes à superfície do eléctrodo, (ver diagrama de Pourbaix, figuras 3 e 5 do capítulo 1). Analisando apenas a saliva III, visto possuir todos os componentes estudados, e tendo em conta o valor de E_{24h} e do pH desta saliva artificial, (ver tabela 8), admite-se que ambos os metais, cobalto e crómio, se encontram na zona de corrosão. Sendo assim para a liga de Cr-Co imersa na saliva artificial III durante 24h as espécies que se podem formar são o $Co(OH)_2$ e o $Cr(OH)_3.nH_2O$.

De acordo com diferentes investigadores, quando a liga Cr-Co se encontra exposta ao ar forma-se espontaneamente um fino filme passivante maioritariamente constituído por Cr_2O_3 com uma contribuição mínima de óxidos de Co e Mo. No entanto quando esta é imersa numa saliva artificial o filme passivante é constituído por Cr_2O_3 , $Cr(OH)_3$, $Co(OH)_2$ [86, 88, 89].

Sendo assim pode-se concluir que apesar de não terem sido feitos ensaios que demonstrem quais as espécies que se formam quando a liga está

Capítulo 3 – Apresentação e discussão de resultados

mergulhada na saliva artificial em estudo, as espécies mais prováveis são as indicadas pelos estudos referentes na literatura.

3.2.1.2. Polarização Potenciodinâmica

As curvas de polarização potenciodinâmica para a liga de Crômio-Cobalto em diferentes salivas artificiais, estão representadas na figura 29.

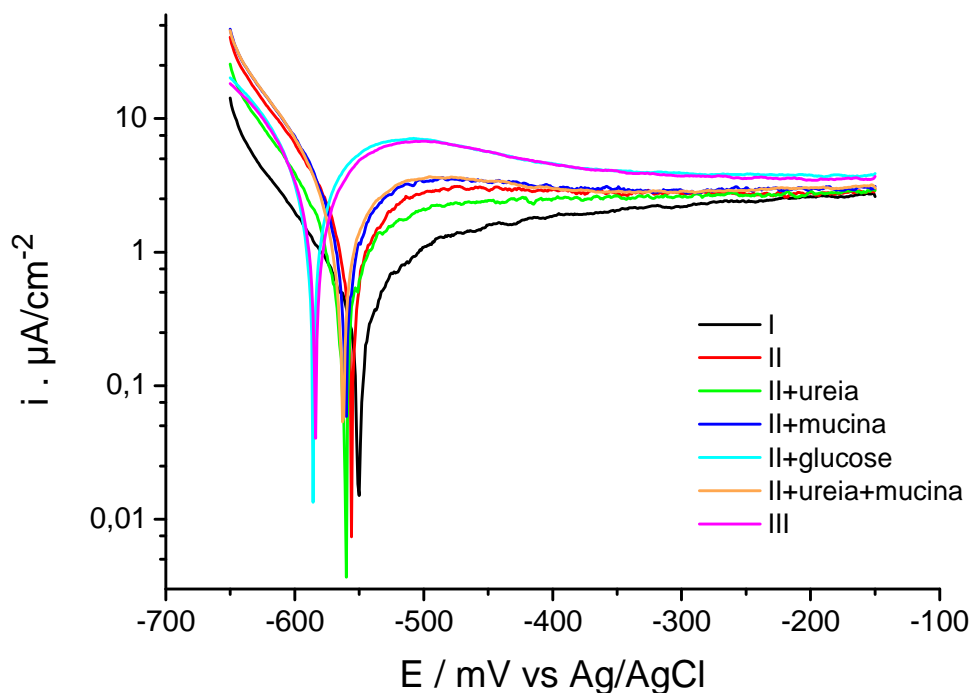


Figura 29 – Curvas de polarização potenciodinâmica para a liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais num intervalo de potencial de -650 mV a -150 mV vs Ag/AgCl

A partir das curvas de polarização potenciodinâmica obtiveram-se os parâmetros cinéticos, sendo eles o potencial de corrosão a densidade de corrente de corrosão e os declives de Tafel (presentes nas tabelas 12 e 13 em anexo), os quais se encontram graficamente representados na figura 30.

Capítulo 3 – Apresentação e discussão de resultados

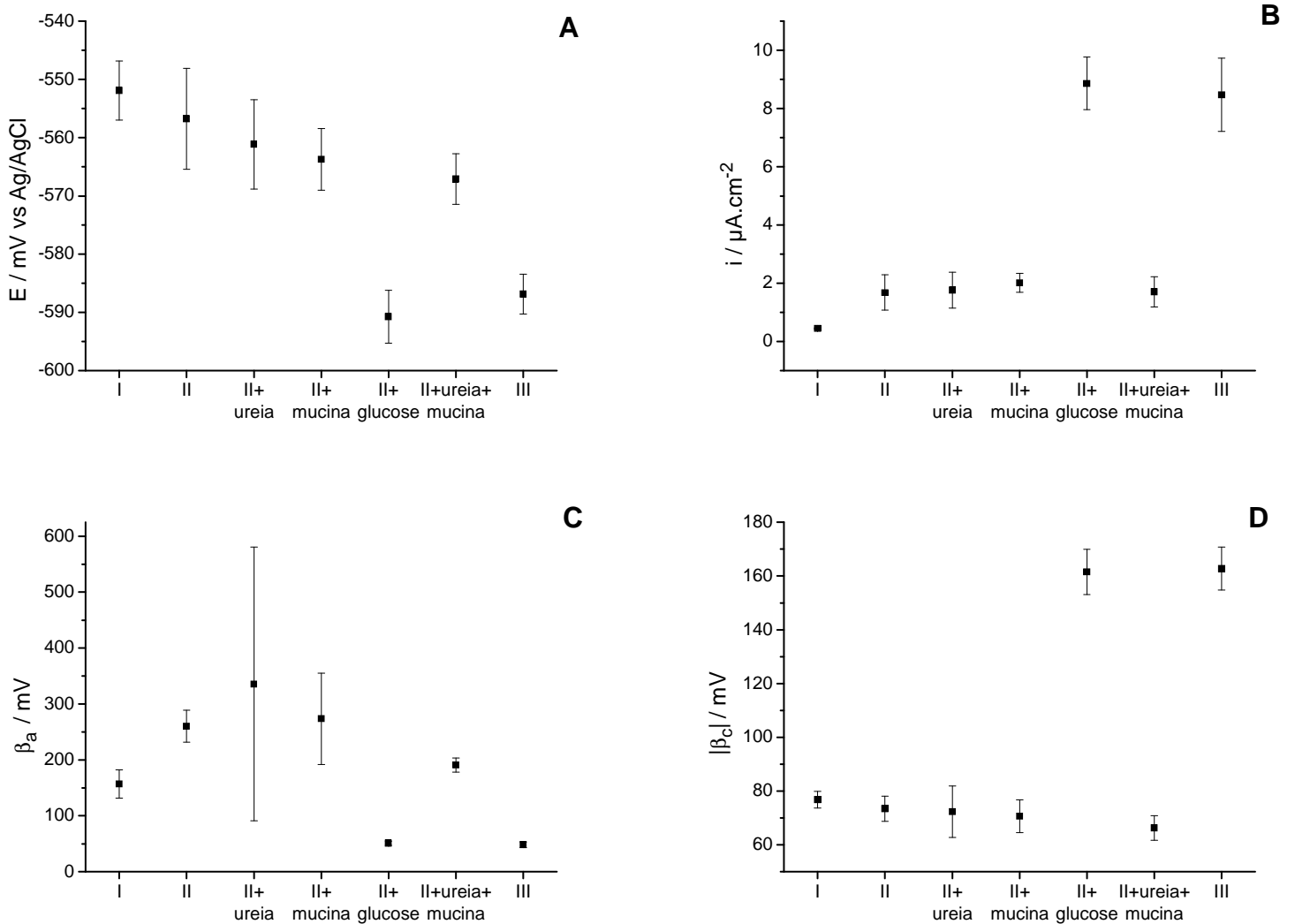


Figura 30 – Valores de potencial de corrosão (A) e densidade de corrente de corrosão (B), declive de Tafel anódico (C) e declive de Tafel catódico (D) para a liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais

Observando as figuras 29 e 30 verifica-se que a liga de Cr-Co apresenta diversos potenciais de corrosão e de densidade de corrente de corrosão quando imersa nos diferentes meios.

Para as salivas I, II, II+ureia, II+mucina e II+ureia+mucina, os potenciais de corrosão apresentam valores bastante aproximados, da ordem dos -560 mV vs Ag/AgCl, apesar de apresentarem uma ligeira diminuição conforme à adição de cada componente. Isto é, a adição da ureia e da mucina à saliva II provoca um ligeiro deslocamento para valores de potencial de corrosão mais negativos, tal como a associação de ambos os componentes. Essa diminuição também é observada em estudos efectuados por Bilhan *et al*, onde uma liga de cromo-

Capítulo 3 – Apresentação e discussão de resultados

cobalto é imersa em diversas salivas artificiais comparando assim o efeito da presença da mucina e da ureia na constituição da saliva [90].

Em relação à saliva II+glucose, a liga apresenta o menor de todos os valores de potencial de corrosão. Desta forma pode-se concluir que na presença do tampão fosfato, este componente actua como activador anódico. A literatura existente sobre este tipo de estudo em salivas artificiais contendo glucose é escassa. Existem estudos de corrosão de diversos aços imersos em salivas artificiais com e sem glucose no entanto a resposta do sistema é contraditória, isto é, dependendo do tipo de material tanto há um aumento como uma diminuição do valor de potencial de corrosão [91], não sendo possível uma comparação com os resultados obtidos.

Finalmente na saliva III, que apresenta todos os componentes, a liga apresenta um potencial de corrosão intermédio, isto é, acima do potencial provocado pela saliva II+glucose mas abaixo dos outros todos.

A liga de Cr-Co apresenta um ligeiro aumento da densidade de corrente de corrosão quando imersa nas salivas II, II+ureia, II+mucina e II+ureia+mucina em relação à saliva I, o que sugere que tanto o tampão fosfato, como a ureia, a mucina e a interacção destes componentes apresentam uma resposta muito semelhante à da saliva I. Esse aumento também é observado em estudos efectuados por Bilhan *et al* [90].

No entanto, para as salivas II+glucose e III a resistência à corrosão é menor, visto apresentarem valores de densidade de corrente de corrosão de $8,8634 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ e $8,4739 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, respectivamente, em relação às outras salivas artificiais em que o valor ronda os $1,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Estes resultados sugerem que na presença do tampão fosfato tanto a ureia como a mucina tentam estabilizar a corrosão da liga de crómio-cobalto enquanto que a glucose promove um meio mais corrosivo para esta liga.

Todas as curvas, da figura 29, apresentam dois ramos distintos, um catódico, referente às reacções catódicas que são reacções de transferência de carga controlada pela redução do H^+ e um anódico referente às reacções anódicas que traduz a oxidação da liga de crómio-cobalto. Os declives de Tafel anódicos referentes às diferentes salivas artificiais apresentam diferentes valores. A liga de Cr-Co quando imersa nas salivas II, II+ureia, II+mucina e II+ureia+mucina em relação à saliva I, apresenta um aumento no valor do

Capítulo 3 – Apresentação e discussão de resultados

declive, o que sugere que a presença tanto do tampão fosfato como da ureia, da mucina, ou da interação destes componentes contribuem para a inibição do processo anódico. Para as saliva II+glucose e III dá-se a activação do processo anódico visto apresentarem valores mais baixos de declive de Tafel.

Em relação aos declives de Tafel catódicos referentes às salivas II, II+ureia, II+mucina e II+ureia+mucina em comparação com a saliva I, apresentam uma ligeira diminuição. No entanto, para as salivas artificiais II+glucose e III os valores do declive de Tafel catódico são bastante mais altos. Estes resultados traduzem que na presença do tampão fosfato com a ureia ou com a mucina a barreira à reacção de redução é menor enquanto que nas salivas II+glucose e III há a inibição do processo catódico.

Ao fim de 24h de medição de potencial em circuito aberto foram realizados estudos de polarização potenciodinâmica, representados na figura 31. Estes foram realizados num intervalo de potencial igual ao utilizado a 0 h.

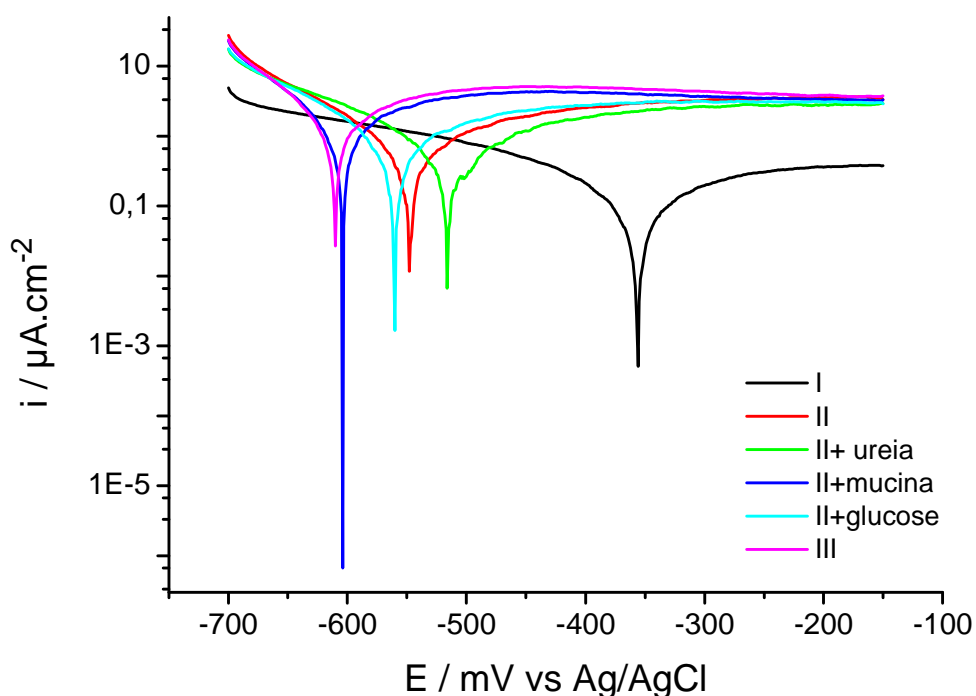


Figura 31 – Curvas de polarização potenciodinâmica para a liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais após a imersão durante 24h

Capítulo 3 – Apresentação e discussão de resultados

A partir das medições da polarização potenciodinâmica obtiveram-se os parâmetros cinéticos apresentados na tabela 9.

Tabela 9 – Valores do potencial de corrosão e da densidade de corrente de corrosão da liga de Cr-Co imersa durante 24h em diversas salivas artificiais

Saliva Artificial	E_{cor} (mV)	i_{cor} ($\mu A/cm^2$)	β_a (mV)	$ \beta_c $ (mV)
I	-359,1	0,1589	387,2	193,7
II	-550,6	0,6971	193,0	112,3
II+ureia	-519,5	0,8620	351,4	166,2
II+mucina	-606,9	1,1260	171,2	79,0
II+glucose	-563,1	0,9186	247,6	120,4
III	-613,3	1,2696	156,4	75,4

A partir da análise da figura 31 e da tabela 9 verifica-se que a liga de Cr-Co apresenta um menor valor de potencial de corrosão e um maior valor de densidade de corrente de corrosão que traduz uma menor resistência à corrosão deste material quando imerso na saliva artificial III.

Os potenciais de corrosão da liga de Cr-Co apresentam os valores mais negativos, da tabela 9, quando imersos nas salivas artificiais II+mucina e III, -606,9 mV vs Ag/AgCl e -613,3 mV vs Ag/AgCl respectivamente.

Os potenciais de corrosão da liga de Cr-Co ao final de 24h de estar imersa nas salivas artificiais, apresentam valores mais positivos do que os potenciais de corrosão a tempo 0h, excepto nas salivas II+mucina e III. Estes resultados sugerem que quanto maior o tempo que a liga de Cr-Co está em contacto com o meio mais o potencial de corrosão se desloca para valores positivos, excepto para as salivas II+mucina e III, o que traduz um meio menos agressivo para a liga de Cr-Co. Esse deslocamento para valores mais positivos de potencial, acontece porque quando a liga está mergulhada na saliva artificial por 24h forma espontaneamente um filme passivante que vai proteger a liga contra a corrosão.

Capítulo 3 – Apresentação e discussão de resultados

Em relação às densidades de corrente de corrosão da liga de Cr-Co, observando a tabela 9 verifica-se que a liga imersa na saliva III apresenta uma menor resistência ao processo de corrosão, visto apresentar um valor de densidade de corrente de corrosão maior em comparação com as outras salivas, enquanto que para a saliva II a liga apresenta uma maior resistência a corrosão. Comparando às densidades de corrente de corrosão obtidas a 0h e a 24h, existe uma diminuição acentuada dos valores ao fim de 24h de exposição da liga a todas as salivas, em comparação aos valores a tempo 0h. Estes resultados sugerem que a liga de Cr-Co apresenta uma maior resistência à corrosão quando imersa durante mais tempo nas salivas artificiais, visto formarem espontaneamente um filme passivante à superfície da liga. Em especial para a liga quando imersa nas salivas II+glucose e III, visto apresentarem uma maior discrepância no valor de densidade de corrente de corrosão.

Todas as curvas apresentam dois ramos distintos, um catódico e um anódico, sendo que a curva referente à saliva artificial I é a que possui um maior ramo catódico. Isto deve-se ao intervalo de potencial imposto, pois o seu potencial de corrosão é menos negativo do que o observado nas outras salivas artificiais.

Os declives de Tafel anódicos referentes às diferentes salivas artificiais apresentam valores bastante semelhantes. No entanto ao comparar com os declives de Tafel anódicos das curvas de polarização efectuadas a tempo 0h, verifica-se um aumento no valor em relação as salivas I, II+ureia, II+glucose e III. Enquanto que para a saliva II e II+mucina há uma ligeira diminuição, isto é, ao fim de 24h da liga Cr-Co estar imersa nestas salivas o intervalo de potencial da zona activa é menor do que quando se está a tempo zero, sendo o processo anódico mais activo.

Em relação aos declives de Tafel catódicos referentes às salivas I, II, II+ureia e II+mucina possuem valores mais altos em comparação com os declives apresentados a 0h. No entanto, para as saliva II+glucose e III os valores do declive de Tafel catódico são mais altos. Estes resultados mostram que no final de 24h de imersão da liga nas diferentes salivas artificiais ocorrem a activação ou a inibição do processo catódico, quando existe uma diminuição ou um aumento dos declives de tafel catódicos, respectivamente.

Capítulo 3 – Apresentação e discussão de resultados

As curvas de polarização demonstram que cada sistema apresenta uma resposta diferente, o que sugere que cada componente ou a interação destes estará a influenciar o sistema de forma diferente.

Na figura 32 estão representadas as curvas de polarização potenciodinâmica para a liga de Crómio-Cobalto em diferentes salivas artificiais num intervalo de potencial entre -650 mV e 900 mV vs Ag/AgCl.

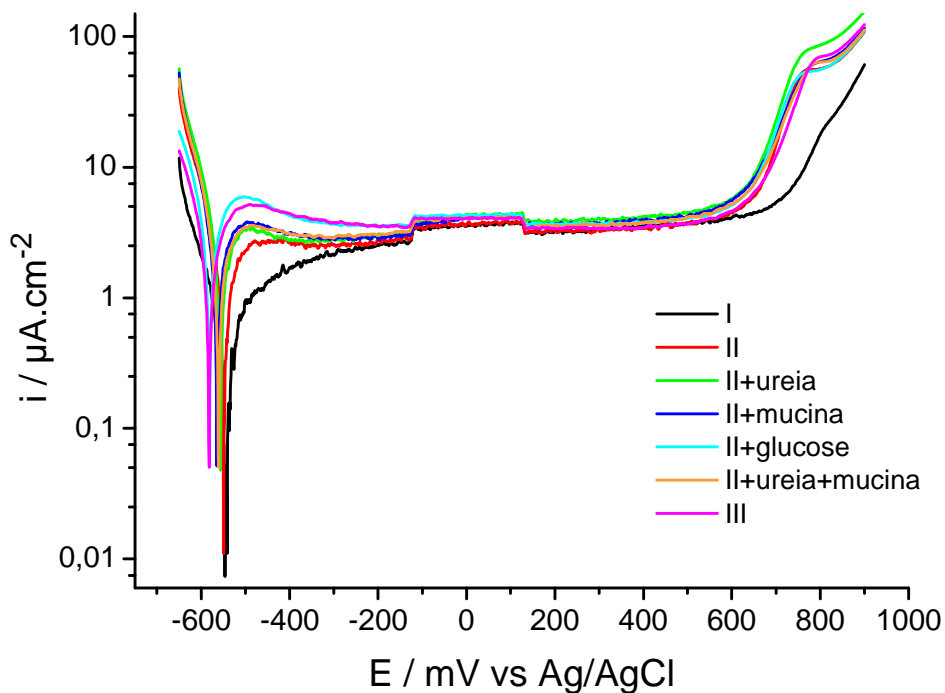


Figura 32 – Curvas de polarização potenciodinâmica para a liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais num intervalo de potencial de -650 mV a 900 mV vs Ag/AgCl

As curvas de polarização potenciodinâmica obtidas neste intervalo de potencial, demonstram as regiões activa, de passivação e de transpassivação.

Na zona activa, durante o varrimento o potencial no sentido positivo existe um aumento gradual da densidade de corrente até se atingir o potencial de Flade. Nesta zona ocorre a oxidação da liga e conforme o varrimento do potencial aumenta originam-se os óxidos e os hidróxidos à superfície da liga formando o filme passivante. Em todas as salivas artificiais, excepto para a saliva I, observa-se nitidamente a passagem entre a zona activa e a zona de passivação, isto é, há um aumento da densidade de corrente até um certo valor

Capítulo 3 – Apresentação e discussão de resultados

de potencial onde ocorre, em seguida, um decréscimo do valor de densidade de corrente.

Na zona de passivação, todas as curvas apresentam uma densidade de corrente praticamente idêntica, excepto na parte inicial onde se sobressaem as curvas II+glucose e III com maiores valores de densidade de corrente. Além disto, o intervalo de passivação de -500 mV a 600 mV vs Ag/AgCl, é igual para todas as curvas e a perturbação no intervalo de potencial de -100 mV a 0200 mV vs Ag/AgCl continua a ser visível, o que comprova ser uma propriedade da própria liga de Cr-Co. De acordo com diferentes investigadores, quando a liga Cr-Co se encontra imersa numa saliva artificial o filme passivante é constituído por Cr_2O_3 , $\text{Cr}(\text{OH})_3$, $\text{Co}(\text{OH})_2$, sendo que a potenciais mais positivos formam-se espécies Cr(VI) e Co(III) [86, 88, 89].

Na zona de transpassivação, a potenciais mais elevados os 600 mV vs Ag/AgCl todas as curvas apresentam um crescimento exponencial da densidade de corrente, que pode significar a quebra do filme passivante, que permite o contacto da saliva artificial novamente com a superfície da liga ou a libertação de oxigénio. Observa-se também a formação de um pico, na região entre os 650 mV e os 850 mV vs Ag/AgCl. Vários autores afirmam que as espécies de Cr(VI) que estavam no filme passivante são libertadas para o seio da solução na zona de transpassivação e que há a formação de complexos de fosfato-crómio. O pico observado na zona de transpassivação pode ser atribuído à formação desses complexos [86, 88, 89].

Em relação os pequenos desvios do potencial de pico apresentados podem ser devidos à interacção dos iões fosfatos com componentes adicionados em cada saliva artificial, que possam interferir com a formação dos complexos de fosfato-crómio.

3.2.1.3. Voltametria Cíclica

Os voltamogramas cíclicos obtidos para a liga de Crômio-Cobalto em diferentes salivas artificiais, estão representadas na figura 33.

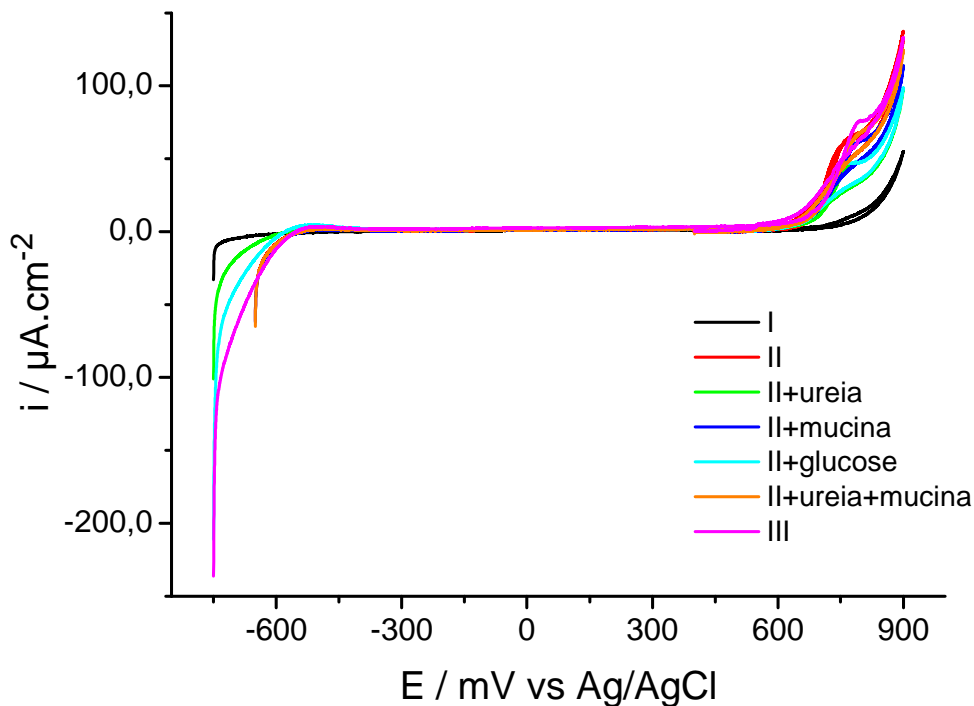


Figura 33 – Voltamogramas cíclicos obtidos para a liga de Cr-Co em diferentes salivas artificiais, a uma velocidade de varrimento de 0,5 mV/s

Observando a figura 33, verifica-se que todos os voltamogramas apresentam um perfil semelhante, possuindo um idêntico potencial de ruptura do filme passivante. No entanto, o pico anódico apresenta valores de potencial e densidades ligeiramente diferentes. Em relação ao voltamograma pertencente à saliva I, este possui um potencial de quebra do filme passivante mais positivo do que nas outras salivas artificiais, não apresenta nenhum pico anódico nem um efeito de cruzamento. Em estudos realizados por outros autores a liga de crômio-cobalto imersa numa saliva que apresenta apenas iões cloreto, não apresenta nenhum efeito de cruzamento [49].

A liga imersa nas restantes salivas artificiais apresentadas na figura 21 apresenta o efeito de cruzamento, que traduz a existência de corrosão localizada. POUND verificou que existe o efeito de cruzamento nos ensaios de

Capítulo 3 – Apresentação e discussão de resultados

voltametria cíclica de uma liga de crômio-cobalto imersa numa saliva composta por iões cloreto e por um tampão fosfato salino [92].

Comparando os resultados da literatura com os obtidos durante o decorrer desta investigação pode-se sugerir que a presença do tampão fosfato nas salivas artificiais promove a corrosão localizada.

Tendo em consideração os resultados apresentados, verifica-se que as respostas do sistema são diferentes conforme o tipo de saliva artificial utilizada, o que pode sugerir uma dependência do tipo de componentes que constituem o meio electroquímico ou da interacção deles, sendo assim necessário avaliar cada componente isoladamente.

3.2.2. Efeito de cada componente na saliva artificial

A saliva humana é constituída por vários componentes, sendo que cada um executa uma função diferente. Sendo assim é necessário estudar a influência de cada componente no processo de corrosão de materiais metálicos. Para tal prepararam-se salivas artificiais contendo cada componente individualmente sempre com uma base de iões cloreto. No entanto foi necessário ajustar o pH destas salivas de modo a permanecerem as mesmas condições experimentais que as salivas artificiais estudadas anteriormente.

Na figura 34 estão representadas as curvas de polarização potenciodinâmica para a liga de Crômio-Cobalto em diferentes salivas artificiais com o pH ajustado, para o estudo da influência de cada componente.

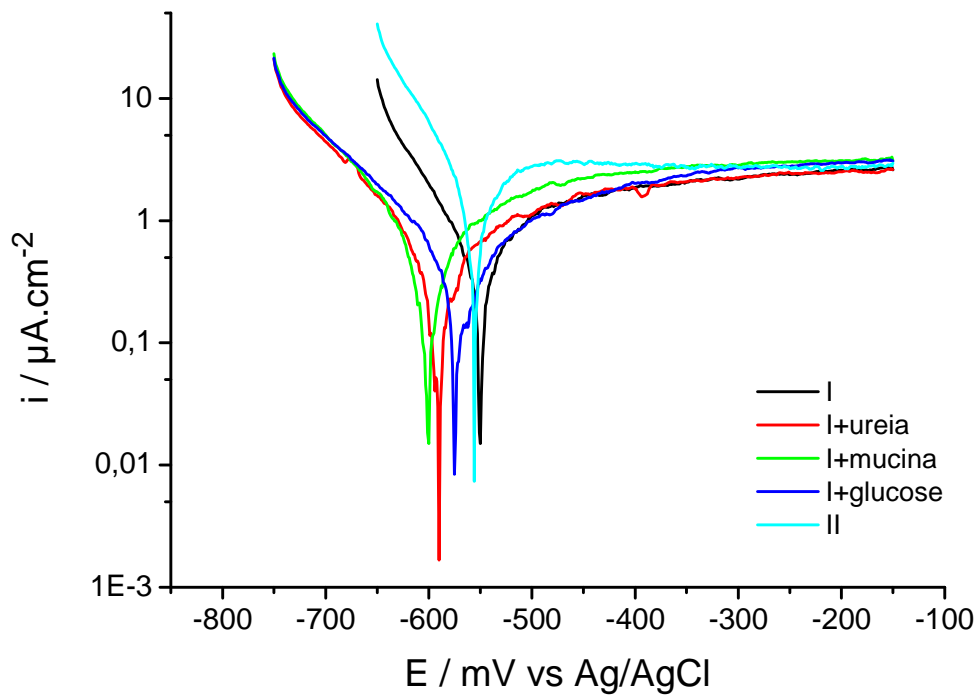


Figura 34 – Curvas de polarização potenciodinâmica para a liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais com pH ajustado

A partir das curvas de polarização potenciodinâmica, da figura 34, obtiveram-se os parâmetros cinéticos, sendo eles o potencial de corrosão a densidade de corrente de corrosão e os declives de Tafel (presentes nas tabelas 14 e 15 em anexo) e que estão graficamente representados na figura 35.

Capítulo 3 – Apresentação e discussão de resultados

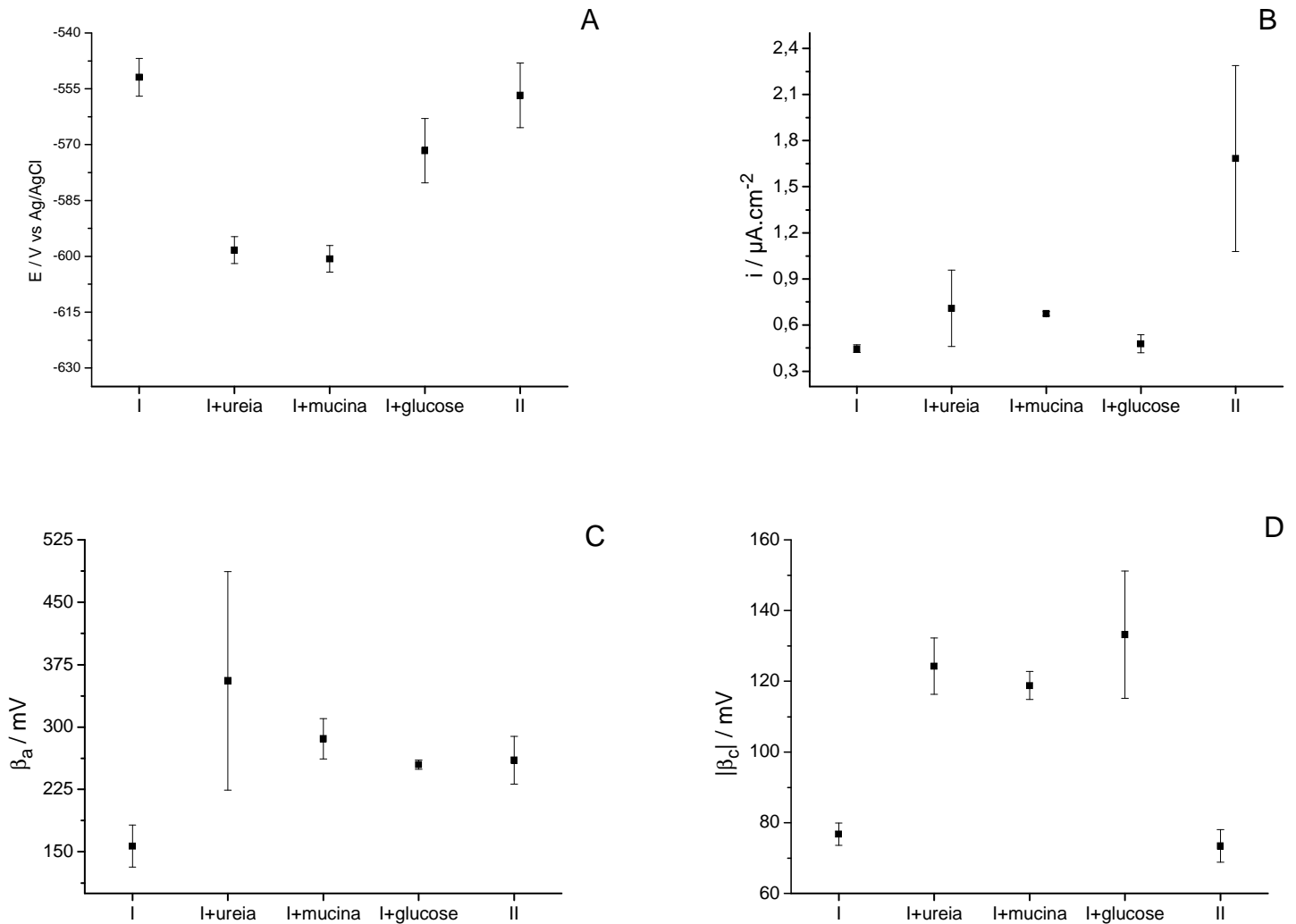


Figura 35 – Valores de potencial de corrosão (A) e densidade de corrente de corrosão (B), declive de Tafel anódico (C) e declive de Tafel catódico (D) para a liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais com pH ajustado

Observando as figuras 34 e 35 verifica-se que a liga de Cr-Co apresenta distintos potenciais de corrosão e de densidade de corrente de corrosão quando imersa nas diferentes salivas artificiais. Salivas essas que são compostas por iões cloreto e os respectivos componentes tal como o nome indica e que sofreram um ajuste de pH com NaOH (0,1M), e a saliva II que é composta por iões cloreto e o tampão fosfato.

Para as salivas I e II, os potenciais de corrosão apresentam valores negativos, -551,9 mV vs Ag/AgCl e -556,7 mV vs Ag/AgCl respectivamente, no entanto superiores aos potenciais no resto das salivas artificiais.

Capítulo 3 – Apresentação e discussão de resultados

Em relação às salivas artificiais I+ureia, I+mucina, e I+glucose, verifica-se um abaixamento dos valores de potencial de corrosão sendo que o ensaio na saliva I+glucose possui valores de potencial aproximados aos apresentados nas salivas I e II.

A liga de Cr-Co apresenta um ligeiro aumento da densidade de corrosão quando mergulhada nas salivas I+ureia, I+mucina e I+glucose em relação a saliva I, o que sugere que tanto a ureia, como a mucina, como a glucose não modificam a resposta do sistema muito significativamente em relação à saliva I. No entanto, para a saliva II a resistência à corrosão é menor visto apresentar uma densidade de corrente de corrosão de $1,6834 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, o que comprova que os íões fosfato promovem um meio mais corrosivo para a liga de crómio-cobalto.

Comparando estes resultados de potenciais de corrosão e de densidade de corrente de corrosão com os apresentados na figura 30 verifica-se que a mucina, a ureia e a glucose na presença do tampão fosfato alteram a resposta do sistema. Em todos os casos há um aumento dos valores de potencial de corrosão, no caso da mucina e da ureia o potencial de corrosão sofre uma variação para valores idênticos ao da saliva II, enquanto que para o caso da glucose a variação é menor apresentando valores na ordem dos $-590 \text{ mV vs Ag/AgCl}$. De igual modo, as densidades de corrente de corrosão sofrem um aumento de valores. No caso da ureia e da mucina a intensidade é semelhante à da saliva II, no entanto para o caso da glucose a variação de densidade de corrente de corrosão é mais acentuada, de $0,4779 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ para $8,8634 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Estes resultados podem significar uma maior interação do tampão fosfato com a glucose, do que com os outros componentes, visto observar-se neste caso um comportamento mais distinto que nos restantes sistemas.

Os declives de Tafel anódicos, apresentados na figura 35, das curvas de polarização da liga de Cr-Co quando imersa nas salivas I+ureia, I+mucina e I+glucose e II demonstram valores mais altos que o declive de Tafel anódico em relação à saliva I. Isto significa que os componentes, ureia, mucina, glucose e tampão fosfato, promovem a inibição do processo anódico. Em comparação com as salivais artificiais que além de apresentarem os íões cloreto também possuem o tampão fosfato pode-se observar que todas apresentam um declive de Tafel anódico semelhante excepto para a saliva que contém glucose, isto é,

Capítulo 3 – Apresentação e discussão de resultados

a liga de Cr-Co imersa na saliva II+glucose apresenta um declive de Tafel anódico menor do que quando imersa na saliva I+glucose, o que pode ser justificado por maior interacção do tampão fosfato com a glucose, do que com os outros componentes, tal como referido anteriormente.

Em relação aos declives de Tafel catódicos referentes às salivas I+ureia, I+mucina e I+ureia+glucose apresentam valores mais altos em comparação com a saliva I e II, isto significa que o declive da curva catódica é menos acentuado. O que traduz uma inibição da reacção catódica. Em comparação com os declives de Tafel catódicos da figura 30 observa-se que na presença do tampão fosfato os declives de Tafel catódicos para as salivas artificiais que possuem mucina e ureia aumentam, quanto que para a saliva que possui glucose os declives mantêm-se semelhantes. O que sugere que na presença do tampão fosfato a mucina e a ureia actuam como activadores da reacção catódica.

Na figura 36 estão representadas as curvas de polarização potenciodinâmica para a liga de Crómio-Cobalto em diferentes salivas artificiais com pH ajustado.

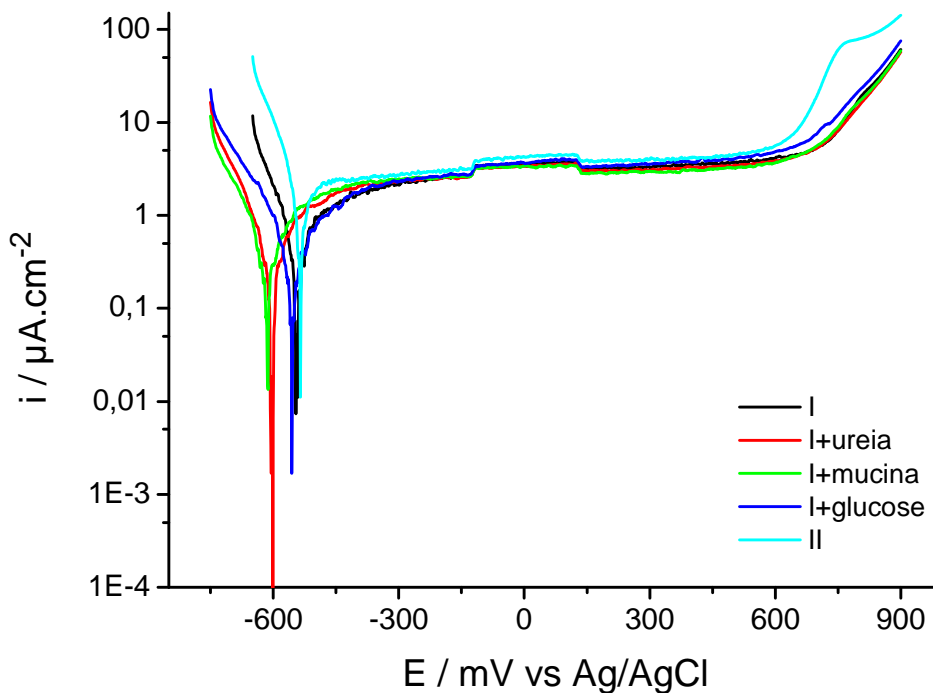


Figura 36 – Curvas de polarização potenciodinâmica para a liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais com pH ajustado num intervalo de potencial de -650 mV a 900 mV vs Ag/AgCl

Observando a figura 36 constata-se que apenas para a saliva II se verifica a passagem entre a zona activa e a zona de passivação, enquanto que nas outras salivas há um crescimento contínuo da densidade de corrente até um valor de potencial onde a densidade de corrente é praticamente estável.

Na zona de passivação, da figura 36, verifica-se que todas as curvas de polarização potenciodinâmica com um intervalo de potencial entre -650 mV e 900 mV vs Ag/AgCl revelam uma intensidade de corrente praticamente idêntica, aproximadamente $3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, e em todas elas há uma perturbação no intervalo de potencial de -100 V e os 200 V vs Ag/AgCl que pode traduzir uma propriedade da própria liga de Cr-Co. No entanto, o intervalo de passivação não é igual para todas as curvas, a curva II apresenta um intervalo de passivação inferior em relação as outras curvas, o que corrobora o facto dos iões fosfato tornarem o meio mais corrosivo.

Na zona de transpassivação, também é a curva II que apresenta um comportamento distinto das outras curvas, sendo possível visualizar-se um crescimento mais exponencial e a formação de um pico entre os 650 mV e os

Capítulo 3 – Apresentação e discussão de resultados

850 mV vs Ag/AgCl, sendo atribuído à formação de complexos de fosfato-crómio, de acordo com o que já foi dito anteriormente

Na Figura 37 estão representados os voltamogramas cíclicos para a liga de cromo-cobalto, obtidas em diferentes salivas artificiais.

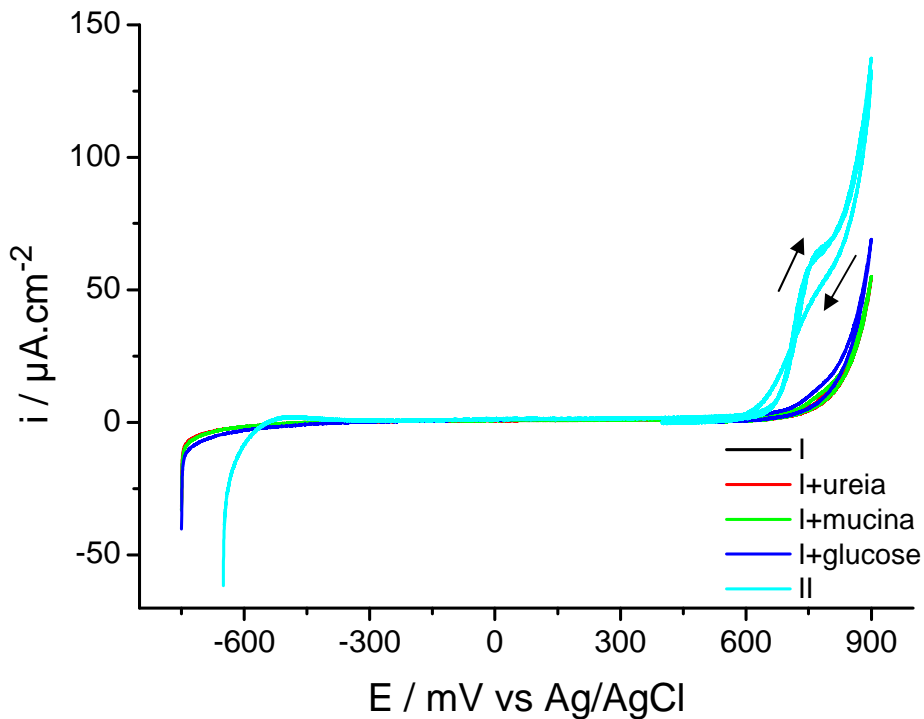


Figura 37 – Voltamogramas cíclicos obtidos para a liga de Cr-Co em diferentes salivas artificiais, a uma velocidade de varrimento de 0,5 mV/s

Observando a figura 37 verifica-se que todos os voltamogramas apresentam o mesmo perfil excepto quando a liga está imersa na saliva artificial II. Para esta saliva, o voltamograma cíclico apresenta um pico anódico centrado no potencial 750 mV vs Ag/AgCl, atribuído à formação de iões complexos entre o grupo de fosfato e o cromo(VI). Além disto, esta saliva é o único meio em que a liga apresenta um potencial de ruptura do filme passivante menos positivo e um efeito de cruzamento o que traduz a existência de corrosão localizada. Esta observação está de acordo com os estudos efectuados por Pound, que verifica o efeito de cruzamento nos ensaios de voltametria cíclica de uma liga de cromo-cobalto imersa numa saliva composta por iões cloreto e por um tampão fosfato salino [92].

Capítulo 3 – Apresentação e discussão de resultados

Tendo em consideração todos os resultados obtidos para as salivas artificiais com pH ajustados, podemos afirmar que a saliva II é a mais corrosiva em relação as restantes salivas artificiais com pH ajustado, isto é, a presença do tampão fosfato em relação aos outros componentes promove um meio mais corrosivo para a liga de Cr-Co. No entanto em comparação com as salivas artificiais anteriormente estudadas a presença do tampão fosfato promove um meio ligeiramente mais corrosivo em comparação com as salivas artificiais II+glucose e III. Sendo assim é possível supor que a glucose na presença do tampão fosfato é o componente que torna o meio mais corrosivo.

➤ **Influência da concentração de mucina**

De modo, a compreender o papel da concentração da mucina no processo de corrosão da liga de crómio-cobalto em salivas artificiais com pH ajustado, efectuaram-se diversos ensaios de polarização potenciodinâmica e voltametria cíclica.

Na figura 38 estão representadas as curvas de polarização potenciodinâmica para a liga de Crómio-Cobalto em diferentes salivas artificiais contendo diversas concentrações de mucina, 0,10g/L ; 0,05g/L e 0,01 g/L, respectivamente para as salivas I+mucina; I+mucina₁ e I+mucina₂.

Capítulo 3 – Apresentação e discussão de resultados

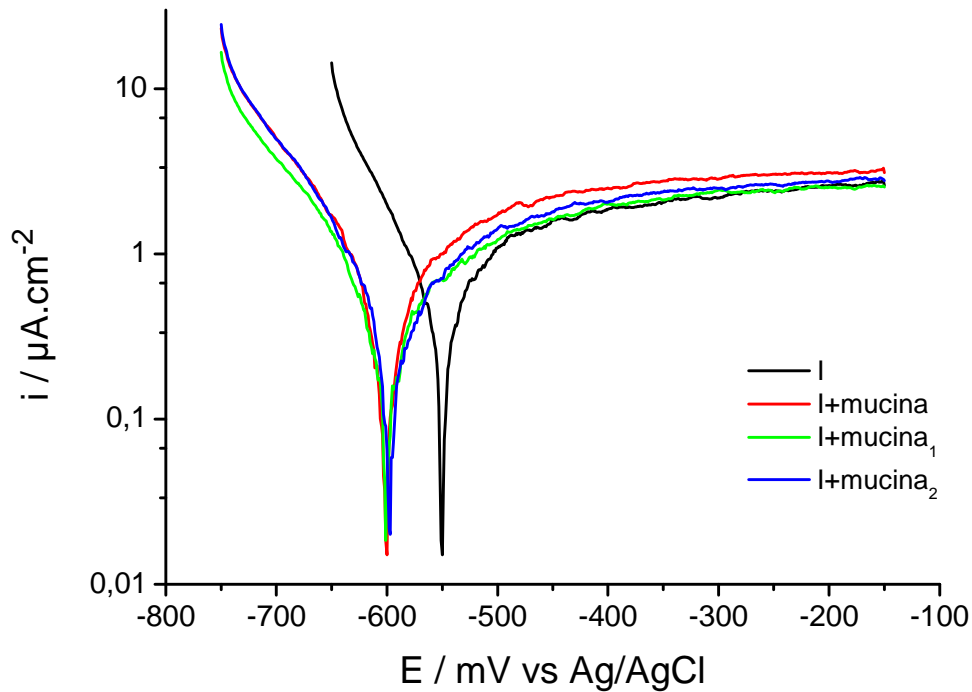
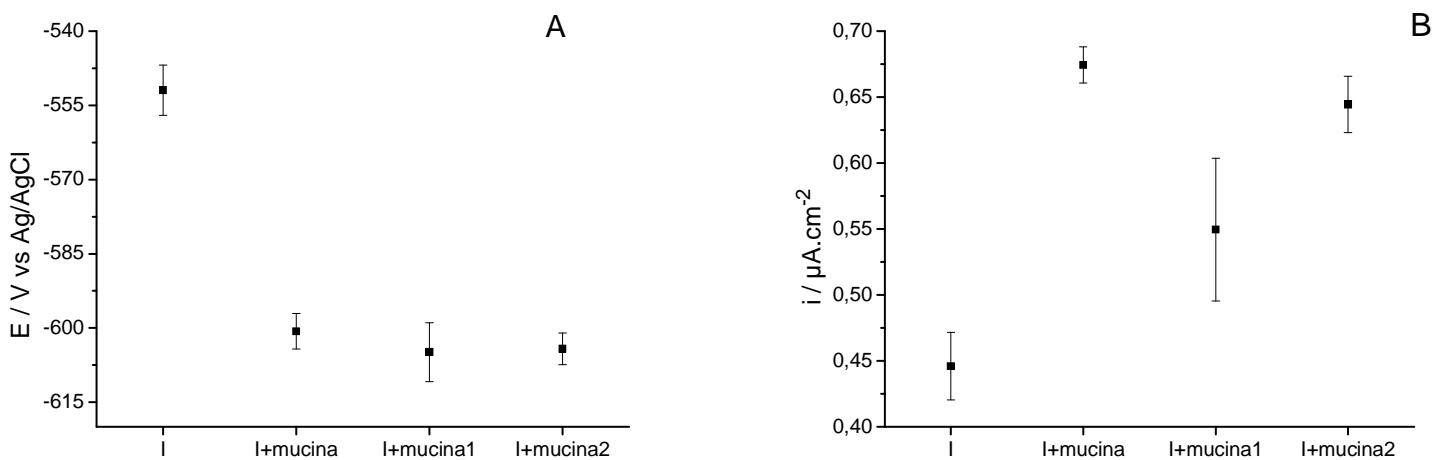


Figura 38 – Curvas de polarização potenciodinâmica para a liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais com pH ajustado contendo diversas concentrações de mucina

A partir dos parâmetros cinéticos das curvas de polarização potenciodinâmica (presentes nas tabelas 16 e 17 em anexo), efectuaram-se os gráficos representados na figura 39.



Capítulo 3 – Apresentação e discussão de resultados

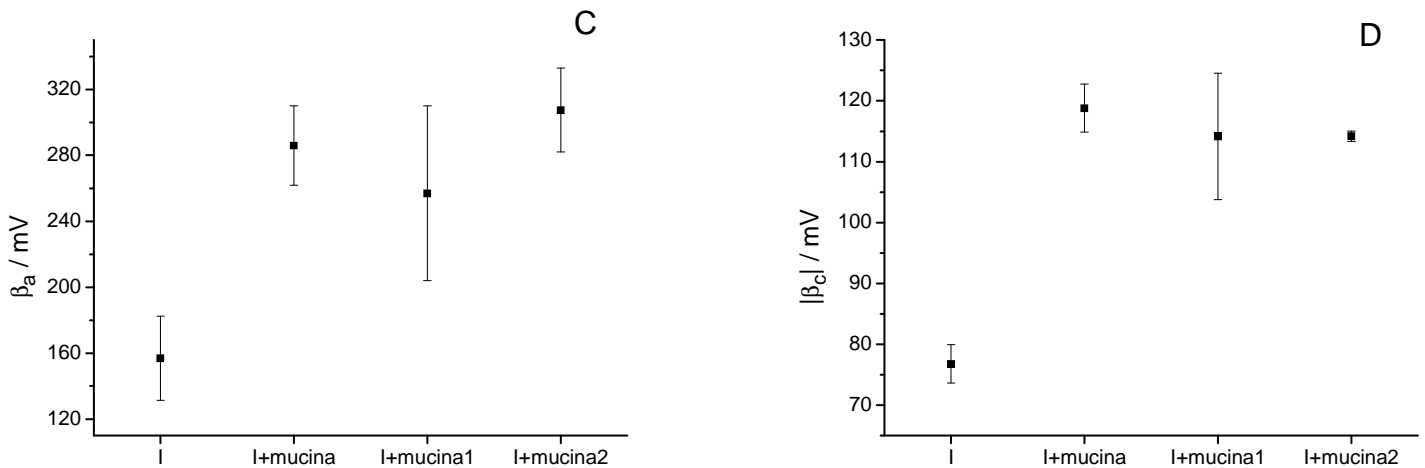


Figura 39 – Valores de potencial de corrosão (A) e densidade de corrente de corrosão (B), declive de Tafel anódico (C) e declive de Tafel catódico (D) para a liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais com pH ajustado contendo diversas concentrações de mucina

Observando as figuras 38 e 39 verifica-se que a liga de Cr-Co apresenta potenciais de corrosão idênticos que rondam a ordem dos -600 mV vs Ag/AgCl quando imersa em salivas artificiais com diferentes concentrações de mucina. Esta semelhança de valores pode significar que as ligeiras alterações na concentração da mucina não afectam o sistema. Em comparação com a saliva I podemos observar que todas apresentam uma variação de potencial de corrosão idêntica.

Em relação às densidades de corrente de corrosão também se observa valores idênticos entre si, no entanto para a saliva I+mucina₁, a densidade ocorre a valores mais baixos. Esta diminuição pode não ser muito significativa visto estar associada a um erro elevado. Observando a saliva artificial I, verifica-se que a sua densidade de corrente de corrosão possui um valor mais baixo do que as restantes salivas no entanto seria de esperar que quanto mais baixo fosse a concentração de mucina na saliva artificial mais o valor de densidade de corrente de corrosão se aproxime da saliva I.

Os declives de Tafel anódicos referentes às salivas artificiais com diferentes concentrações de mucina apresentam valores muito semelhantes, no entanto inferiores ao referente à saliva I. Esta informação sugere que as ligeiras alterações na concentração da mucina não afectam o sistema, isto é,

Capítulo 3 – Apresentação e discussão de resultados

que as alterações na concentração da mucina continuam a inibir o processo anódico. Tal como os declives de Tafel anódicos, os declives de Tafel catódicos são muito semelhantes, o que traduz a inibição do processo catódico visto apresentarem valores de declive de Tafel mais altos que os apresentados para os iões cloreto.

Na figura 40 estão representadas as curvas de polarização potenciodinâmica para a liga de Crómio-Cobalto em diferentes salivas artificiais contendo diversas concentrações de mucina num intervalo de potencial entre -750 mV e 900 mV vs Ag/AgCl.

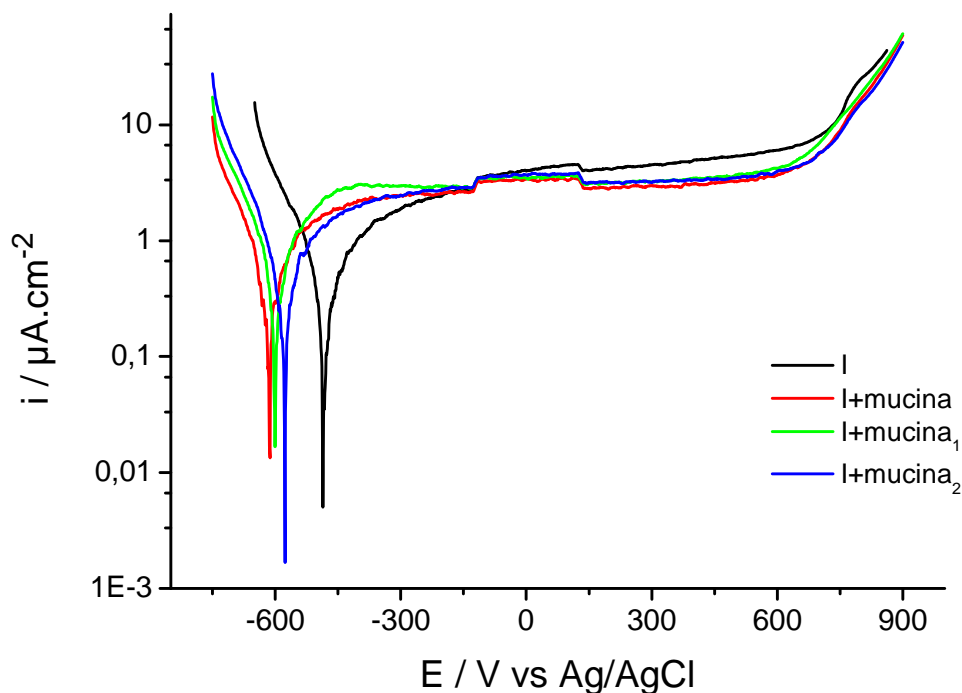


Figura 40 – Curvas de polarização potenciodinâmica para a liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais com pH ajustado contendo diversas concentrações de mucina num intervalo de potencial de -650 mV a 900 mV vs Ag/AgCl

As curvas de polarização potenciodinâmica no intervalo de potencial indicado apresentam uma semelhança muito grande apesar da variação da concentração de mucina presente no meio salivar.

Na zona de passivação, todas as curvas revelam uma intensidade de corrente praticamente idêntica, aproximadamente $3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, e em todas elas há uma perturbação no intervalo de potencial entre -100 mV e 200 mV vs Ag/AgCl.

Capítulo 3 – Apresentação e discussão de resultados

No entanto, na parte inicial da zona de passivação a curva Ib_1 apresenta um ligeiro aumento dos valores da intensidade de corrosão.

Na zona de transpassivação, também é a curva $I+mucina_1$ que apresenta um ligeiro aumento dos valores de intensidade de corrosão no intervalo de potencial entre 600 mV e 750 mV vs Ag/AgCl.

Os voltamogramas cíclicos para a liga de Crómio-Cobalto em diferentes salivas artificiais com diferentes concentrações de mucina, estão representadas na figura 41.

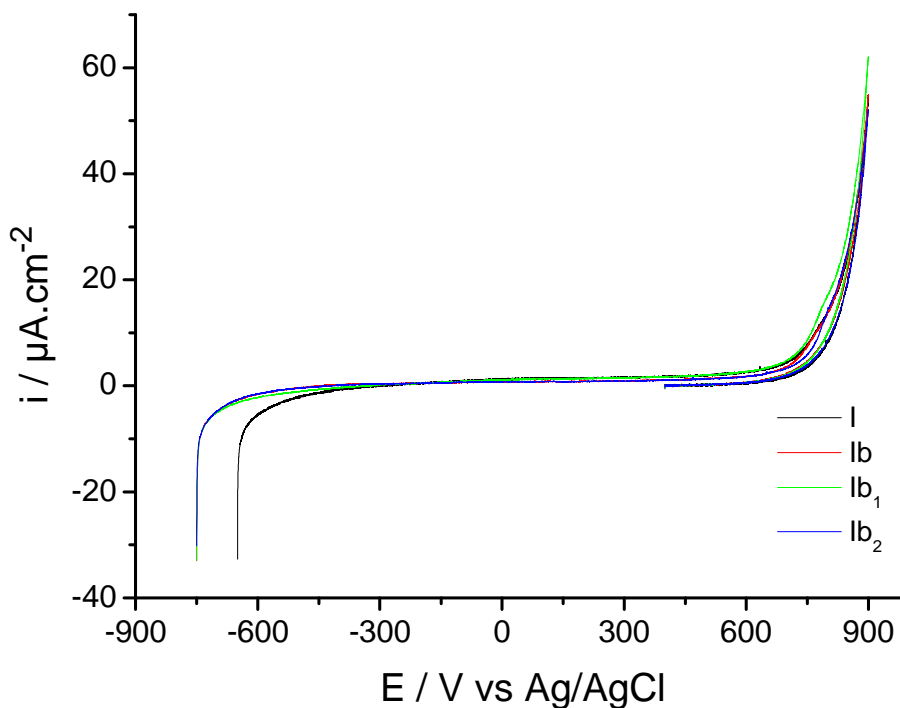


Figura 41 – Voltamogramas cíclicos para a liga de Cr-Co em diferentes salivas artificiais com pH ajustado com diversas concentrações de mucina, a uma velocidade de varrimento de 0,5 mV/s

Observando a figura 41 verifica-se que todos os voltamogramas apresentam uma evolução idêntica ao longo de todo o intervalo de potencial. Sendo que o potencial de quebra do filme passivante ronda os 700 mV vs Ag/AgCl.

Da comparação dos voltamogramas cíclicos com os estudos efectuados a partir das curvas de potencial potenciodinâmico pode-se concluir que as

Capítulo 3 – Apresentação e discussão de resultados

alterações de concentração de mucina efectuadas não alteram a resposta do sistema de forma significativa, sendo talvez necessário utilizar concentrações mais distintas para se obter uma resposta diferente no sistema.

3.2.3. Influência do tampão fosfato

Na cavidade oral acontece muitas vezes variações de pH, sendo assim para compreender o que a acidez do meio salivar pode afectar o processo de corrosão prepararam-se salivas artificiais baseadas na saliva artificial de Fusayama Meyer, onde não existe a presença do sistema tampão e o pH ronda os 4,5.

Na figura 42 estão representadas as curvas de polarização potenciodinâmica para a liga de Crómio-Cobalto em diferentes salivas artificiais não tamponadas.

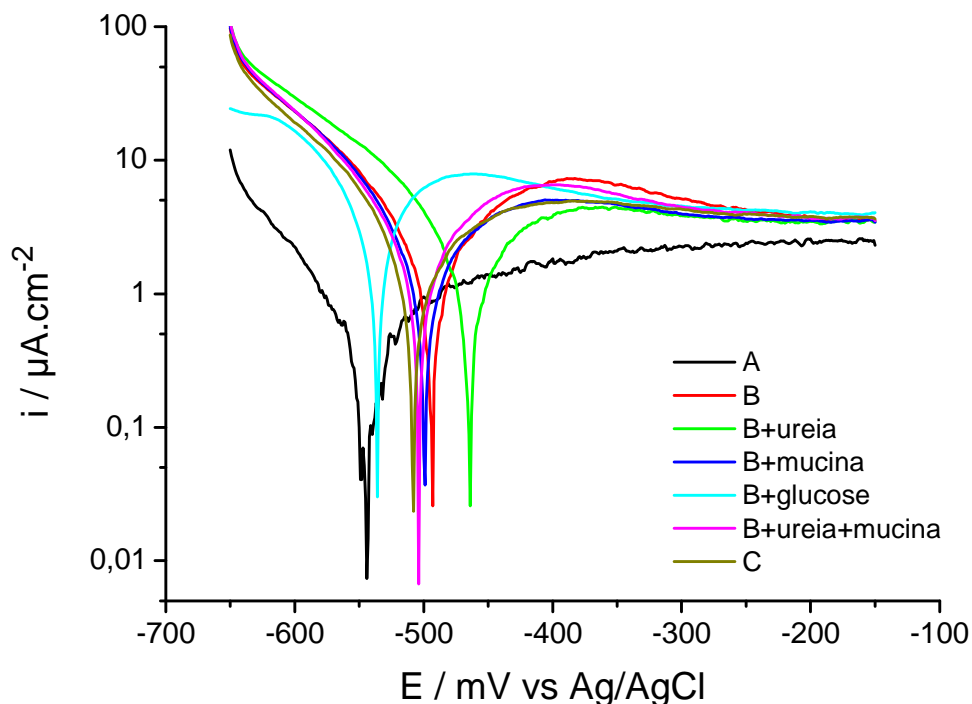


Figura 42 – Curvas de polarização potenciodinâmica para a liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas não tamponadas

Capítulo 3 – Apresentação e discussão de resultados

A partir das medições da polarização potenciodinâmica obtiveram-se os parâmetros cinéticos, presentes nas tabelas 18 e 19 em anexo, que estão representados na figura 43.

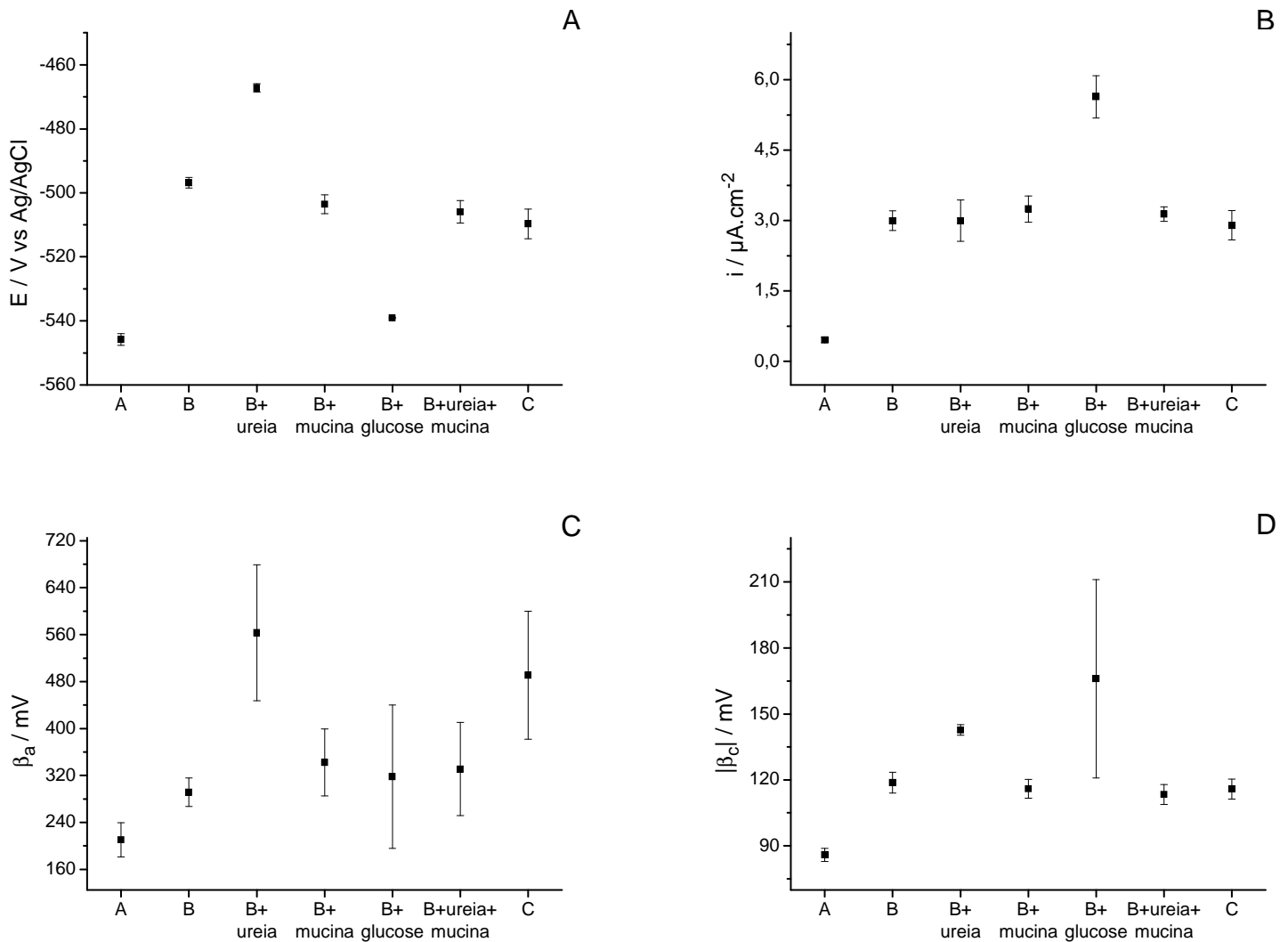


Figura 43 – Valores de potencial de corrosão (A) e densidade de corrente de corrosão (B), declive de Tafel anódico (C) e declive de Tafel catódico (D) para a liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais não tamponadas

Observando as figuras 42 e 43 verifica-se que a liga de crômio-cobalto apresenta diversos potenciais de corrosão e de densidade de corrente de corrosão quando imersa em diferentes salivas artificiais não tamponadas. Tal como as salivas artificiais tamponadas, estas salivas apresentam as mesmas concentrações totais de iões cloreto, iões fosfato e dos compostos orgânicos, mucina, ureia e glucose. No entanto os iões fosfato não se apresentam como sistema tampão e desta forma o pH das salivas artificiais ronda os 4,5.

Capítulo 3 – Apresentação e discussão de resultados

Para as salivas B, B+mucina, B+ureia+mucina, e C os potenciais de corrosão apresentam valores bastante aproximados, da ordem dos -500,0 mV vs Ag/AgCl. Em relação à saliva B+ureia, a liga apresenta o potencial de corrosão menos negativo comparativamente com os restantes. Adicionalmente, quando a liga esta mergulhada nas salivas A e B+glucose, os valores de potencial de corrosão são os mais negativos

Comparando estes resultados com os obtidos para as salivas tamponadas, pode-se afirmar que para estas salivas artificiais a liga apresente potenciais de corrosão de valores mais positivos, excepto para a saliva que apenas possui iões cloreto. Giacomelli *et al* verificaram que quanto menor o valor de pH mais positivo será o valor de potencial de corrosão da liga [93]. Sendo assim, esta variação dos potenciais de corrosão está de acordo com estudos apresentados na literatura. Além disso, a ausência de um tampão ou o baixo valor de pH, faz com que ureia apresente um comportamento bastante diferente, sendo nesta saliva B+ureia, onde se verifica os menores valores de potencial de corrosão. A saliva C também apresenta um comportamento diferente, visto os valores de potencial de corrosão estarem mais próximos das salivas B, B+mucina e B+ureia+mucina.

Em relação à densidade de corrente de corrosão, a liga de Cr-Co apresenta valores idênticos quando mergulhada nas salivas B, B+ureia, B+mucina, B+ureia+mucina e C. No entanto para as salivas A e B+glucose, a densidade de corrente de corrosão apresenta os valores mais baixos, 0,4597 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, e mais altos, 5,6387 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, respectivamente, o que significa que a saliva A é o meio onde a liga possui maior resistência à corrosão, e a saliva B+glucose é o meio onde a liga tem menor resistência a corrosão, isto é, é o meio mais corrosivo.

Em semelhança ao parâmetro anterior, estes resultados comparados com os resultados das salivas artificiais tamponadas, apresentam um aumento das densidades de corrente de corrosão, excepto para a saliva apenas constituída por iões cloreto em que a densidade é mais ou menos idêntica à da saliva I e para as salivas B+glucose e C onde os valores de densidade são mais baixos em relação às salivas II+glucose e III. Observando os estudos de Maria Sovar *et al*, verifica-se que os valores de densidade de corrente de

Capítulo 3 – Apresentação e discussão de resultados

corrosão sofrem um aumento quando as experiências são efectuadas a um pH mais ácido (2,2) [94].

Os declives de Tafel anódicos referentes às diferentes salivas artificiais apresentam valores muito diferentes no entanto são todos mais altos que o declive referente à saliva artificial I. Através da figura 39 observa-se que para estas salivas artificiais a presença da ureia promove um aumento do declive de Tafel anódico, isto é, a presença da ureia faz com que haja uma inibição do processo anódico quando a liga de Cr-Co está imersa na saliva artificial B+ureia. Comparando estes resultados com os resultados da figura 30, que para as salivas I e A os declives de Tafel anódicos são semelhantes. As maiores diferenças são observadas nas salivas que contem glucose e na que é composta por todos os componentes.

Em relação aos declives de Tafel catódicos quando a liga de cromo-cobalto está imersa nas diferentes salivas artificiais não tamponadas, estes apresentam valores superiores aos observados para a saliva A. Estes resultados traduzem uma inibição do processo catódico. No entanto comparando com os resultados das salivas artificiais tamponadas pode-se afirmar que só existe uma diminuição no valor de declive de Tafel catódico para as salivas II+glucose e III.

Na figura 44 estão representadas as curvas de polarização potenciodinâmica para a liga de Cromo-Cobalto em diferentes salivas artificiais não tamponadas num intervalo de potencial entre -650 mV e 900 mV vs Ag/AgCl.

Capítulo 3 – Apresentação e discussão de resultados

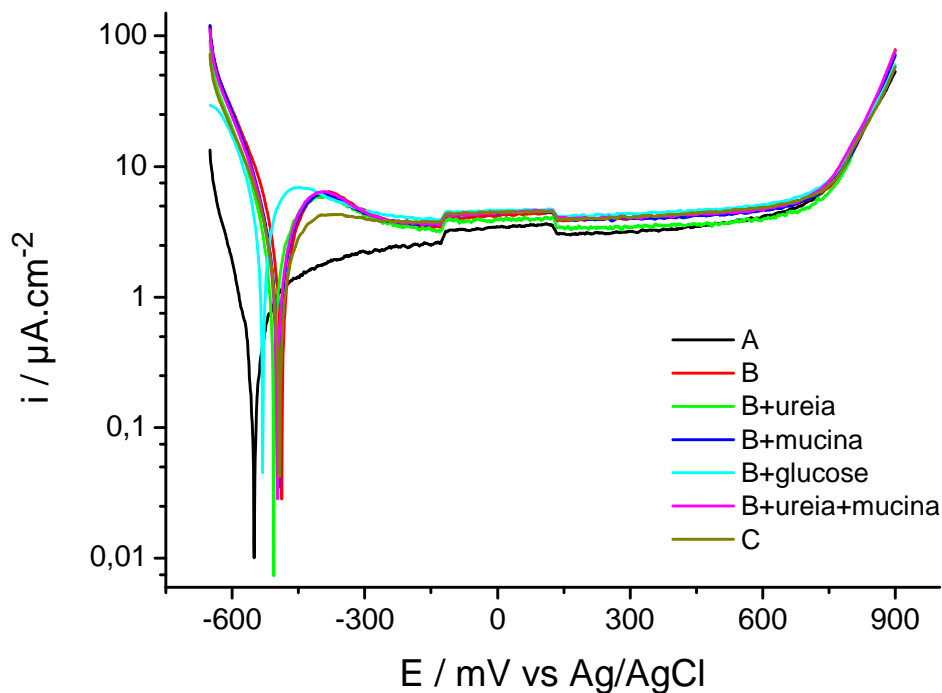


Figura 44 – Curvas de polarização potenciodinâmica para a liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais não tamponadas num intervalo de potencial de -650 mV a 900 mV vs Ag/AgCl

As curvas de polarização potenciodinâmica com um intervalo de potencial entre -650 mV e 900 mV vs Ag/AgCl, apresentam a zona de passivação no intervalo de potencial entre -400 mV vs Ag/AgCl a 700 mV vs Ag/AgCl. Este possui uma densidade de corrente praticamente idêntica, que ronda entre os $3,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ e os $4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$.

Na parte inicial da zona de passivação a curva C apresenta o mesmo potencial mas uma intensidade de corrente de corrosão mais baixa, no entanto a curva B+glucose apresenta um valor de intensidade de corrente ligeiramente maior e um potencial mais negativo. Por último a curva A, não apresenta uma transição entre a zona activa e passiva bem definida.

Em relação a zona de transpassivação, todas as curvas apresentam um crescimento exponencial e não se observa nenhum pico.

Comparando as curvas de polarização com as efectuadas em salivas tamponadas podemos afirmar que o intervalo de passivação têm igual valor no entanto está deslocado para a direita, isto é, em vez de se apresentar entre -500 mV e 600 mV vs Ag/AgCl, aparece entre -400 mV e 700 mV vs Ag/AgCl

Capítulo 3 – Apresentação e discussão de resultados

aproximadamente. Em relação à zona de transpassivação das salivas não tamponadas, esta não apresenta nenhum pico no entanto possui uma exponencial semelhante as apresentadas pela liga de Cr-Co quando imersa nas salivas tamponadas. Estes resultados apontam que não há a formação dos complexos de fosfato-crômio característicos do pico apresentado na zona de transpassivação, isto pode sugerir que não há a formação de espécies de Cr(VI) na gama de potencial que se aplica, quando estamos perante este tipo de salivas artificiais.

Os voltamogramas cíclicos para a liga de Crômio-Cobalto em diferentes salivas artificiais não tamponadas, estão representadas na figura 45.

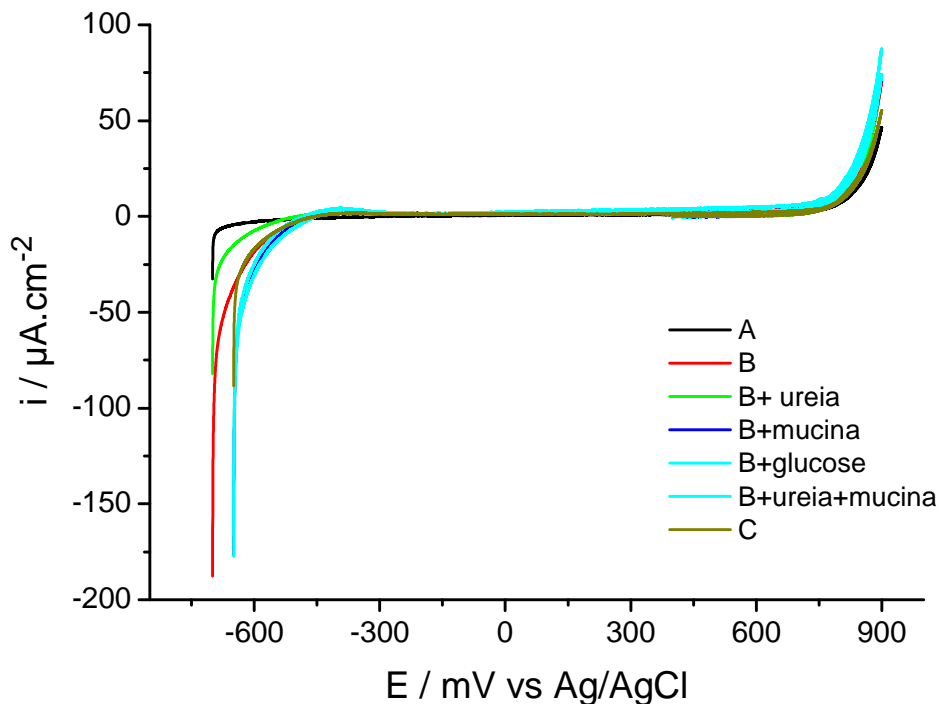


Figura 45 – Voltamogramas cíclicos para a liga de Cr-Co em diferentes salivas artificiais não tamponadas, a uma velocidade de varrimento de 0,5 mV/s

Observando a figura 45, verifica-se que todos os voltamogramas apresentam um perfil idêntico. O sistema nunca apresenta o efeito de cruzamento quando a liga de crômio-cobalto está mergulhada nas salivas artificiais não tamponadas.

Capítulo 3 – Apresentação e discussão de resultados

Comparando os voltamogramas da saliva III com C, podemos afirmar que o potencial de quebra da camada passivante da saliva III é mais positivo que o da saliva C, da ordem dos 750 mV vs Ag/AgCl e dos 650 mV vs Ag/AgCl respectivamente.

Em relação as salivas artificiais não tamponadas podemos concluir que a glucose continua a ser o componente que mais interfere no processo de corrosão, no entanto devido à ausência do tampão fosfato a sua contribuição, quando os componentes estão todos presentes na saliva artificial, saliva C, é pouco prenunciada. De um modo geral pode-se afirmar que na ausência do sistema tampão as salivas artificiais apresentam-se como um meio menos corrosivo para a liga de Cr-Co.

3.3. Avaliação do crescimento bacteriano em salivas artificiais

Após os estudos de corrosão química em salivas artificiais importa avaliar, para futuros estudos de biocorrosão, o crescimento de microrganismos do ambiente oral na saliva artificial que melhor mimetize a saliva humana. Para tal escolheu-se a saliva artificial III que contem todos os componentes, que têm a intenção de agir como substituintes das diversas funções, como é o caso da função de adesão e de lubrificação, da saliva humana.

Desta forma foi em primeiro lugar feita a revitalização das culturas seguida da avaliação da viabilidade das mesmas em meio de manutenção. Após este estudo, fizeram-se os ensaios de crescimento na saliva artificial em teste.

3.3.1. Viabilidade das estirpes em meio de manutenção

A viabilidade das estirpes usadas neste estudo foi confirmada pela avaliação do perfil de crescimento no meio YGLPB (Figura 46). Este foi monitorizado por medidas da densidade óptica (OD) ao longo do tempo. Foram

Capítulo 3 – Apresentação e discussão de resultados

também calculados a velocidade específica de crescimento (μ) e o tempo de geração (T_g) no final da fase de crescimento exponencial (tabela 10).

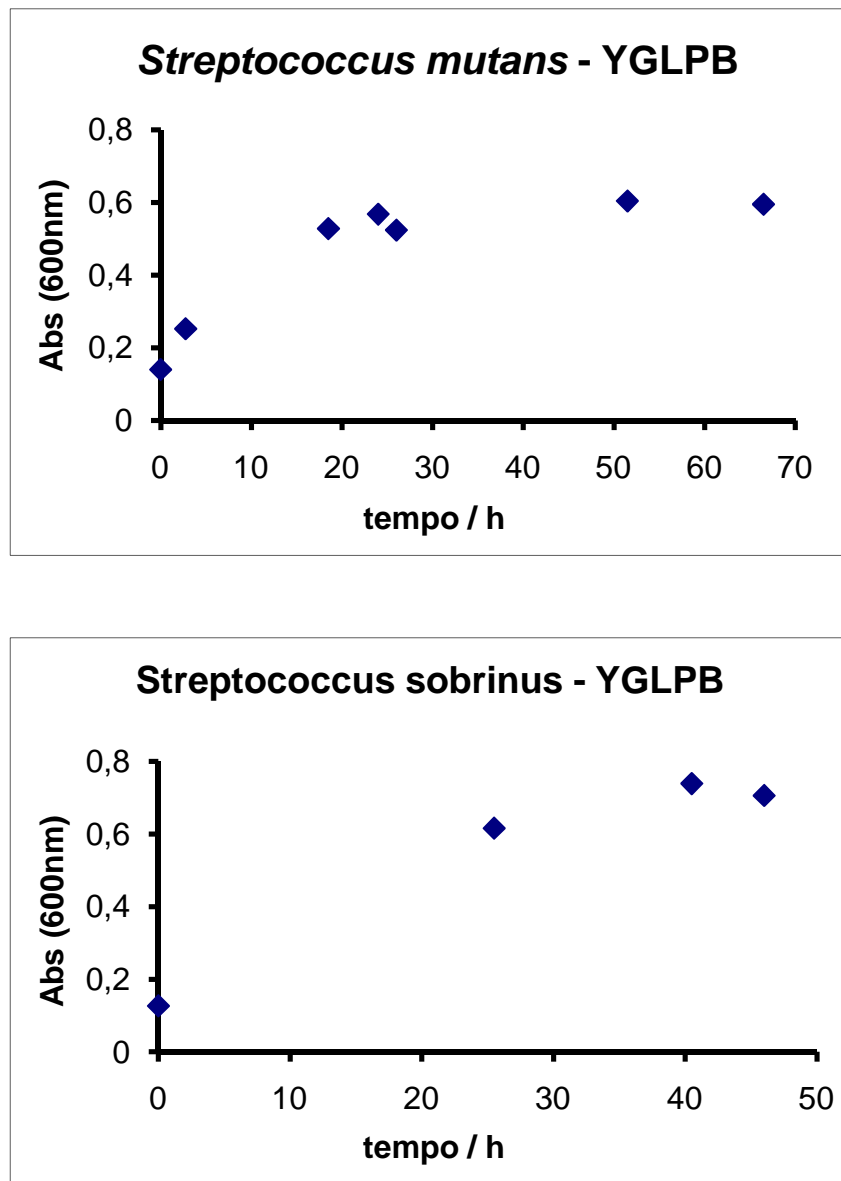


Figura 46- Perfis de crescimento em meio YGLPB das bactérias em estudo

Tabela 10 - Parâmetros do crescimento bacteriano referentes à figura 46

Parâmetros	<i>S. sobrinus</i>	<i>S. mutans</i>
μ (h^{-1})	0,049	0,039
T_g (h)	15,43	16,29
O.D.(600 nm)	0,73	0,59

Capítulo 3 – Apresentação e discussão de resultados

Estes resultados mostram claramente que estes microrganismos se encontram viáveis, podendo desta forma ser iniciado o estudo do estabelecimento das condições de crescimento na saliva artificial.

3.3.2. Crescimento em saliva artificial

As culturas (*S. mutans* e *S. sobrinus*) foram inicialmente crescidas em meio de manutenção BHI e o seu crescimento foi seguido por leituras de OD a 600 nm (Figura 47).

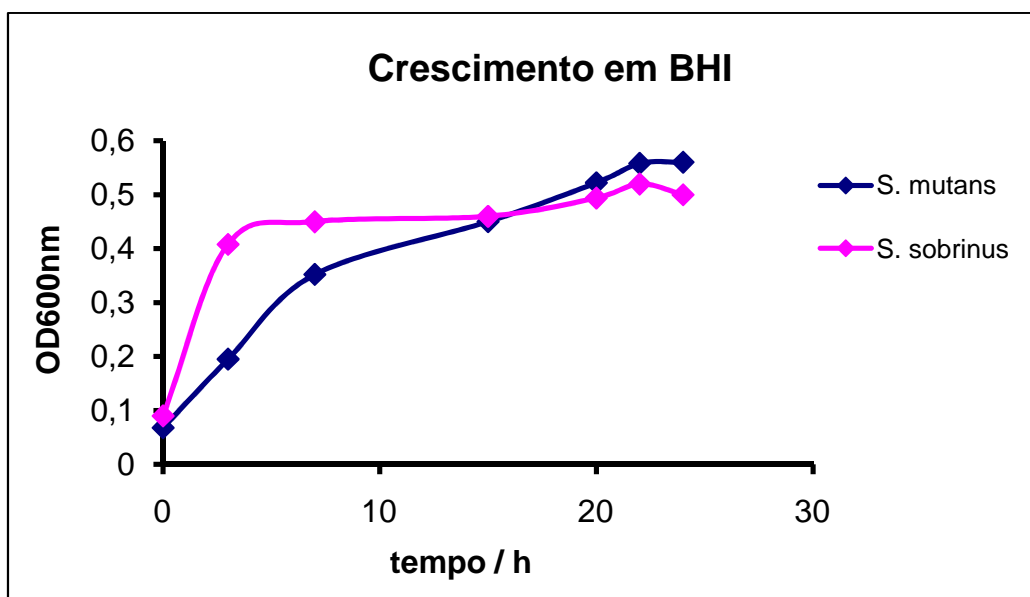


Figura 47- Crescimento de *S. mutans* e *S. sobrinus* em meio BHI

As culturas em meio BHI, foram adaptadas de forma gradual à saliva artificial utilizada. A adaptação gradual consistiu na utilização de percentagens crescentes da saliva artificial em BHI (20%, 40%, 60% 80% e finalmente 100%), fazendo-se 3 repicagens para cada concentração de saliva (tabela 11).

Capítulo 3 – Apresentação e discussão de resultados

Tabela 11 - OD finais da adaptação progressiva à saliva artificial (OD inicial para as duas culturas = 0,1)

	<i>S. mutans</i>	<i>S. sobrinus</i>
20% saliva	0,416	0,438
40% saliva	0,334	0,340
60% saliva	0,317	0,328
80% saliva	0,240	0,218
100% saliva- SC*	0,190	0,177

* SC- "Saliva Completa"

Tendo em conta as baixas OD obtidas nos crescimentos realizados com a saliva artificial, esta foi suplementada com glucose (0,2% (p/v)) e o crescimento celular foi seguido através de leituras de OD_{600nm} (figura 48).

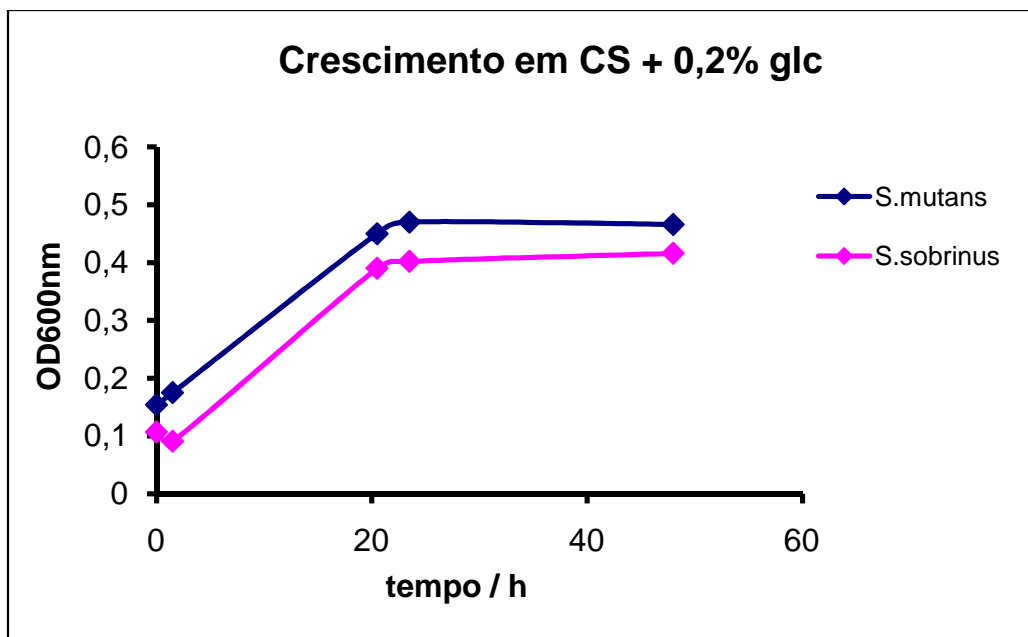


Figura 48- Crescimento de *S. mutans* e *S. sobrinus* na saliva artificial suplementada com glucose (glc)

Os resultados obtidos permitem concluir que na saliva artificial testada o crescimento é significativo desde que haja uma suplementação extra com glucose.

Capítulo 4

Conclusões Finais e Perspectivas Futuras

Tendo em consideração, que o objectivo principal deste trabalho foi o estudo do processo de corrosão da liga de Crómio-Cobalto imersa em diferentes salivas artificiais, pode-se afirmar que o objectivo foi alcançado.

Na primeira fase do trabalho foi realizado a caracterização morfológica e química da liga de Cr-Co, de forma a observar-se a nível macroscópico e microscópico a superfície da liga e conhecer a sua composição química.

Em seguida, recorrendo aos estudos electroquímicos, nomeadamente às medidas de potencial em circuito aberto, à polarização potenciodinâmica e à voltametria cíclica, foi estudado a corrosão da liga de Cr-Co em diversas salivas artificiais.

Em primeiro lugar estudou-se a interacção de cada componente numa saliva artificial tamponada com um tampão fosfato. Verificou-se que a glucose na presença do tampão fosfato confere à saliva artificial propriedades que a tornam mais corrosiva para a liga de Cr-Co. Além disso verificou-se que esta interacção prevalece mesmo quando estão presentes outros componentes da saliva, o que significa que a saliva III, que possui todos os componentes e por isso mais próxima à saliva humana, é o meio mais corrosivo de todas as salivas artificiais. Sendo assim foi necessário perceber como é que cada componente influencia o processo de corrosão e para isso efectuaram-se estudos em salivas artificiais que apresentavam apenas um componente e iões cloreto como base. Concluiu-se então que individualmente cada componente não influencia muito a resposta do sistema, nas concentrações estudadas, sendo a saliva com o tampão fosfato a que mais se destaca.

Por último, efectuou-se um estudo de corrosão, para salivas artificiais baseadas na saliva de Fusayama Meyer, que não tem na sua constituição o tampão fosfato e o seu pH é mais ácido. Verificou-se ainda que a glucose continua a ser o componente que mais altera a resposta do sistema, isto é, a liga de Cr-Co tem uma menor resistência a saliva artificial que contém glucose. No entanto quando estão presentes todos os componentes numa só saliva, a saliva C, a influência da glucose é pouco evidenciada, sugerindo assim que a mucina e a ureia conseguem estabilizar o meio. Em comparação com as salivas artificiais tamponadas, as salivas não tamponadas apresentam um deslocamento para potenciais mais positivos e valores de densidades de

corrente de corrosão menores, sendo assim pode-se considerar que as salivas não tamponadas são um meio menos corrosivo.

Em relação aos estudos efectuados sobre o crescimento bacteriano permitem concluir que na saliva artificial testada o crescimento é significativo desde que haja uma suplementação extra de glucose. Comparando estes resultados com os resultados anteriores, sabendo que a saliva estudado foi a saliva III, podemos afirmar que para haver um crescimento de microrganismos adequado é necessário aumentar a concentração de glucose, o que poderá influenciar o processo da corrosão da liga de Cr-Co.

Numa fase futura, de forma a completar o estudo do processo de corrosão será necessário efectuar a quantificação dos iões metálicos presentes nas salivas artificiais após as medidas em potencial de circuito aberto além da análise da superfície da liga através das técnicas de espectroscopia de fotoelectrões-X e difracção de raios-X. Além disso seria uma mais valia estudar mais aprofundadamente factores que alterem as condições da cavidade oral, como por exemplo, a temperatura, visto poderem afectar o processo de corrosão da liga de Cr-Co.

Em relação aos microrganismos, tendo em conta a utilização de um suplemento extra de glucose, efectuarem-se estudos de biocorrosão para a liga de Crómio-Cobalto. Eventualmente será necessário alterar-se as concentrações dos componentes da saliva artificial, de modo a obter-se um meio mais adequado para o crescimento dos microrganismos orais.

Capítulo 5

Referências bibliográficas

- [1] Hottíng, José Francisco; Betros, Letícia Monteiro de; Alves, Ana Cláudia B. Amoras; Mariano, Priscilla de Laet S.; Gonçalves, Reginaldo Bruno; *Colonização bucal por espécies de Candida-Parte I-Prevalência e colonização*; Revista da Faculdade de Odontologia; 2003
- [2] Marcotte, Harold; Lavoie, Marc C.; *Oral Microbial Ecology and the Role of Salivary Immunoglobulin A*, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62, 71–109; 1998
- [3] http://dentaldesign.planetaclix.pt/cavidade_oral.htm, consultado em 15/9/2011
- [4] Dale, Beverly A.; Fredericks, L. Page; *Antimicrobial Peptides in the Oral Environment: Expression and Function in Health and Disease*; Curr. Issues Mol. Biol. 7, 119–134; 2005
- [5] Rouabhia, Mahmoud; *Interactions between host and oral commensal microorganisms are key events in health and disease status*; Can J Infect Dis. 13, 47–51; 2002
- [6] Lac, G.; *Saliva assays in clinical and research biology*; Pathol Biol; 49, 660-7; 2001
- [7] Preetha, A.; Banerjee, R.; *Comparison of Artificial Saliva Substitutes*; Trends Biomater. Artif. Organs, 18, 178-186; 2005
- [8] Chiappin, Silvia; Antonelli, Giorgia; Gatti, Rosalba; Palo, Elio F. De; *Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation*; Clinica Chimica Acta 383, 30–40; 2007
- [9] Lima, Daniela Pereira; Diniz, Diego Garcia; Moimaz, Suzely Adas Saliba; Sumida, Dóris Hissako; Okamoto, Ana Claudia; *Saliva: reflection of the body*; International Journal of Infectious Diseases 14, 184-188; 2010

- [10] Jasen Van Rensburg, B. G.; *Oral Biology*; Quintessence Publishing Co, Inc; 1995
- [11] Mareci, Daniel; Chelariu, Romeu; Gordin, Doina-Margareta; Ungureanu, Gina; Gloriant, Thierry; *Comparative corrosion study of Ti-Ta alloys for dental applications*; *Acta Biomaterialia* 5, 3625–3639; 2009
- [12] Nagata, Yoko; Higashi, Masatoshi; Ishii, Yutaka; Sano, Hiroaki; Tanigawa, Minoru; Nagata, Kumiko; Noguchi, Kazuma; Urade, Masahiro; *The presence of high concentrations of free d-amino acids in human saliva*; *Life Sciences* 78, 1677 – 1681; 2006
- [13] Schipper, Raymond G.; Silletti, Erika; Vingerhoeds, Monique H.; *Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects*; *archives of oral biology* 52, 1114 – 1135; 2007
- [14] Tabak, Lawrence A.; *Structure And Function of Human Salivary Mucins*; *Oral Biology and Medicine*, 1, 229-234; 1990
- [15] Offner, G.D.; Troxler, R. F.; *Heterogeneity of High-molecular-weight Human Salivary Mucins*; *Adv Dent Res* 14, 69-75; 2000
- [16] MIZOBE-ONO, Lia; ARAÚJO, João Luiz Pereira de; DOS-SANTOS, Maria Cristina; *Componentes das imunidades inata e adaptativa presentes na saliva humana*; *Revista de Odontologia da UNESP.*; 35, 253-261; 2006
- [17] Steinberg, Doron; Klinger, Avigdor; Kohavi, David; Adsorption of human salivary proteins to titanium powder. I. Adsorptions of human salivary albumin; *Biomaterials* 16, 1339-1343; 1995
- [18] Beal, A.M.; *Enzyme activity in parotid and mandibular saliva from red kangaroos, Macropus rufus*; *Archives of Oral Biology* 43, 695-699; 1998

- [19] Amoroso, Patrícia; Franco e Franco, Teresa C. C.; Marin, José M.; Ávila, Fernando A.; *Comparative study on PCR and fenotypic on the detection of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus and transmission study*; *Cienc Odontol Bras*; 7, 30-40; 2004
- [20] Schuster; George S.; *Oral microbiology & infectious disease*; B. C. Decker; 1990
- [21] Brett, Christopher M.A.; Muresan, Ioana; *The Influence of Artificial Body Fluids on Metallic Corrosion*; *Key Engineering Materials* 230-232, 459-462; 2002
- [22] Lu, Xiong; Leng, Yang; *Theoretical analysis of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid*; *Biomaterials* 26, 1097–1108; 2005
- [23] Bardowa, Allan; Moea, Dennis; Nyvad, Bente; Nauntofte, Birgitte; *The buffer capacity and buffer systems of human whole saliva measured without loss of CO₂*; *Archives of Oral Biology* 45, 1-12; 2000
- [24] Mahvash, Navazesh; Satish, K.S. Kumar; *Measuring salivary flow- Challenges and opportunities*; *JADA*, 139, 35S-40S; 2008
- [25] Shang, Raymond; *Química*, McGraw-Hill, Inc.; 1994
- [26] Fejerskov, Ole; Kidd, Edwina; *Dental Caries – The Disease and its Clinical Management*; Blackwell Munksgaard Ltd; 2008
- [27] Gal, Jean-Yves; Fovet, Yannick; Adib-Yadzi, Myriam; *About a synthetic saliva for in vitro studies*; *Talanta* 53, 1103–1115; 2001
- [28] Park, Moon-Soo; Chang, Ji-Youn; Kim, Yoon-Young; Kang, Jeong-Hyun; Kho, Hong-Seop; *Physical and biological properties of yam as a saliva Substitute*; *archives of oral biology* 55, 177–183; 2010

[29] Tsai, Po-Jung; Tsai, Tzung_Hsun; Ho, Su-Chen; *In vitro* inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sobrinus*, Food Chemistry 105, 311-316; 2007.

[30] Park, Joon; Lakes, R. S.; *Biomaterials - An Introduction*; Springer; 2007

[31] Boavida, Anabela; *Material de Apoio das aulas de biocorrosão da disciplina de Sistemas Químicos e Reactividade*; Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa; 2011

[32] Manivasagam, Geetha; i Dhinasekaran, Durgalakshmi; Rajamanickam, Asokamani; *Biomedical Implants: Corrosion and its Prevention - A Review*; Recent Patents on Corrosion Science, 2, 40-54; 2010

[33] Upadhyay, Deepti; Panchal, Manoj A.; Dubey, R.S.; Srivastava, V.K.; *Corrosion of alloys used in dentistry: A review*; Materials Science and Engineering A 432, 1–11; 2006

[34] Sharma, Mohit; Kumar, A. V. Ramesh; Singh, Nirbhay; *Electrochemical corrosion behaviour of dental/implant alloys in saline medium*; J Mater Sci: Mater Med 19, 2647–2653; 2008

[35] Sharma, Mohit; Kumar, A.V. Ramesh; Singh, Nirbhay; Adya, Nidhi; Saluja, Bobin; *Electrochemical Corrosion Behavior of Dental/Implant Alloys in Artificial Saliva*; JMEPEG 17, 695–701; 2008

[36] Chaturvedi, T.P.; *Corrosion behavior of orthodontic alloys- a review*; Division of Orthodontics, Faculty of Dental Sciences, Institute of Medical Science, Banares Hindu University, Varanasi

- [37] El-Bediwia, A.; Saada, M.; El-Fallal, A.A.; El-Helaly, T.; *Electrochemical corrosion behavior, Vickers microhardness, and microstructure of Co–Cr and Ni–Cr dental alloys*; *Radiation Effects & Defects in Solids* 164, 712–718; 2009
- [38] Reclaru, Lucien; Lüthy, Heinz; Eschler, Pierre-Yves; Blatter, Andreas; Susz, Christian; *Corrosion behaviour of cobalt–chromium dental alloys doped with precious metals*; *Biomaterials* 26, 4358–4365; 2005
- [39] Mareci, D.; Sutiman, D.; Cailean, A.; Bolat, G.; *Comparative corrosion study of Ag–Pd and Co–Cr alloys used in dental applications*; *Bull. Mater. Sci.*, 33, 491–500; 2010
- [40] Rodrigues, Wilson Corrêa; Broilo, Luiz Roberto; Schaeffer, Lírio; Knörnschild, Gerhard; Espinoza; Fidel R. M.; *Powder metallurgical processing of Co–28%Cr–6%Mo for dental implants: Physical, mechanical and electrochemical properties*; *Powder Technology* 206, 233–238; 2011
- [41] Correia, Jorge; *Material de Apoio das aulas de corrosão da disciplina de Sistemas Químicos e Reactividade*; Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa; 2011
- [42] Raghuvir Singh & Narendra B. Dahotre; *Corrosion degradation and prevention by surface modification of biometallic materials*; *J Mater Sci: Mater Med* 18, 725–751; 2007
- [43] Schweitzer, Philip A.; *Fundamentals of Corrosion- Mechanisms, Causes, and Preventative Methods*; CRC Press, Taylor & Francis Group; 2010
- [44] Brett, A. M. O.; Brett, C. M. A.; *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications*, Oxford University Press, New York; 1994
- [45] Revie, R. Winston; Uhlig, Herbert H.; *Corrosion and corrosion control- an introduction to corrosion science and engineering*, Wiley; 2008

- [46] Pourbaix, Marcel; *Atlas of electrochemical equilibria in aqueous solutions*, National Association of corrosion engineers, USA; 1974
- [47] Wolyneć, Stephan; *Técnicas de Electroquímica em Corrosão*, Editora da Universidade de São Paulo; 2003
- [48] Ciszewski, Aleksander; Baraniak, Marek; Urbanek-Brychczyńska, Magdalena; *Corrosion by galvanic coupling between amalgam and different chromium-based alloys*; dental materials 23, 1256–1261; 2007
- [49] Banu, Alexandra; Radovici, Octavian; Marcu, Maria; *The Alloying Influence on corrosion behavior of Chromium surgical alloys*; Revue Roumaine de Chimie, 53, 947–953; 2008
- [50] Bunea, D.; Bojin, D.; Zamfir, S.; Miculescu, F.; Miculescu, M.; *Experimental researches concerning Co-Cr-Mo alloys used in implantology*; European Cells and Materials Vol. 5, 53-54; 2003
- [51] Allison, D.G.; *The Biofilm Matrix*; Biofouling, 19, 139–150; 2003
- [52] Sutherland, I. W.; *Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework*. Microbiology. 147, 3-9; 2001
- [53] Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M. e Marrie, T.J.; *Bacterial biofilms in nature and disease*. Ann. Ver. Microbiol. 41, 435-464; 1987
- [54] Characklis, W.G., Marshall, K.C.; *Biofilms: A basis for an interdisciplinary approach*; In: Characklis WG, Marshall KC (eds) Biofilms. New York: John Wiley and Sons Inc.; 1990

[55] Characklis, W.G., Wilderer, P.A.; *Structure and Function of Biofilms*. New York: John Wiley e Sons Inc.; 1982

[56] Moreira, A.C.A., Carvalho M.R., Cisalpino, E.I., Damasceno, C.A.; *Cocos gram-positivos anaeróbios estritos da cavidade oral e do trato intestinal de primatas Calitriquídeos (Callithrix jacchus e Callithrix penicillata) mantidos em cativeiro* R. Ci. méd. biol., Salvador, 2, 94-10; 2003

[57] Hamada, S., Slade, H.D.; *Biology, Immunology and Cariogenicity of Streptococcus mutans*, Microbiological Reviews, 44; 331-384; 1980

[58] Mouton, C., Robert, J.C.; *Bacteriologia bucodental*, Masson, S.A.; 1995

[59] Wiater, A., Choma, A., Szczodrak, J.; *Insoluble glucans synthesized by cariogenic streptococci: a structural study*, J. Basic Microbiol., 39, 265-273; 1999.

[60] Huang, B.B., Fan, M.W., Wang, S.L., Han, D.X., Chen, Z., Bian, Z.; *The inhibitory effect of magnolol from Magnolia officinalis on glucosyltransferase*, Archives of Oral Biology 51, 899—905; 2006

[61] Tsai, Po-Jung; Tsai, Tzung_Hsun; Ho, Su-Chen; *In vitro* inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sobrinus*, Food Chemistry 105, 311-316; 2007

[62] Tong, Zhongchun; Tao, Rui; Jiang, Wenkai; Li, Jie; Zhou, Lin; Tian, Yu; *In vitro* study of the properties of *Streptococcus mutans* in starvation conditions; archives of oral biology ; 2011

[63] Liljemark, W.F., e Bloomquist, C.; *Human oral microbial ecology and dental caries and periodontal disease*, Critical Reviews in Oral Biology and Medicine, 7, 180–198; 1996

- [64] Takahashi, Y.; Imazato, S.; Russell, R.R.B.; Noiri, Y.; Ebisu, S.; *Influence of Resin Monomers on Growth of Oral Streptococci*; J Dent Res 83, 302-306; 2004
- [65] Brock, T.D., Smith, S.D.T; Madigan, M.T.; *Biology of Microorganisms*, 4th ed., Prentice-Hall Internacional, inc., 213-221; 1984
- [66] Vogt, M.; Flemming, H.C.; Veeman, W.S.; *Diffusion of Pseudomonas aeruginosa biofilms: a pulsed field gradient NMR study*; J. Biotechnol. 77, 137-146; 2000
- [67] Spaeth, R., Wuertz, S.; *Extraction and Quantification of Extracellular Polymeric Substances from Wastewater. In: Biofilms: Investigative Methods & Applications*. Flemming, H-C.; Szewzyk, U.; Griebe, T.; (Eds.). Lancaster, Pennsylvania, Technomic Publishing Company Inc. 51-68; 2000
- [68] Flemming, H-C., Wingender, J.; *Extracellular polymeric substances (EPS): the biofilme construction material*. In: Weber, J., W. eds. *Biofouling and Materials*: COST 520 Workshop. Bern: EDMZ, 2-18; 1999
- [69] Costerton, J.W., Geesey, G., Cheng, K.J.; *How bacteria stick*. Sci. Am. 238, 86-95; 1978
- [70] Characklis, W.G.; *Biofilm processes. In: Biofilms. W. G. Characklis and K. C. Marshall, (Eds.)* New York. John Wiley e Sons , 195-231; 1990
- [71] Schachter, B.; *Slimy business: the biotechnology of biofilms*. Nat Biotech 21, 361-365; 2003
- [72] Kyaw, Cynthia Maria; Apontamentos da disciplina de Microbiologia; <http://vsites.unb.br/ib/cel/microbiologia/biofilme/biofilme.html>; consultado em 21/9/2011

[73] Rickard, A. H., Gilbert, P., High, N. J., Kolenbrander P. E. and Handley P. S.; *Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms*. Trends in Microbiology 11; 2003

[74] Wong, L.; Sissions, C.H.; *A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva*; Archives of Oral Biology 46, 477–486; 2001

[75] Tanga, Gaoyan; Yipb, Hak-Kong; Cutressc, Terry W.; Samaranayake, Lakshman P.; *Artificial mouth model systems and their contribution to caries research: a review*; Journal of Dentistry 31, 161–171; 2003

[76] Chang, Jui-Chung; Oshida, Yoshiki; Gregory, Richard L.; Andres, Carl J.; Barco, Thomas M.; Brown, David, T.; *Electrochemical study on microbiology-related corrosion of metallic dental materials*; Bio-Medical Materials and Engineering 13, 281-295; 2003

[77] Bard, Allen J.; Faulkner, Larry R.; *Electrochemical methods – fundamentals and applications*; John Wiley & Sons, Inc.; 2001

[78] K. Kalyanasundaram, J. Kiwi, M. Gratzel, Helv. Chim. 61, 2720; 1987

[79] Davidson, Michael W.; Abramowitz, Mortimer; *Optical Microscopy*; <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/pdfs/microscopy.pdf> consultado em 24/8/2011

[80] Frade, Tânia; *Preparação e caracterização de nanomateriais para serem utilizados como fotocatalizadores no tratamento de águas contaminadas por medicamentos*; Tese de Mestrado de Química da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa; 2010

[81] Monteiro, Fernando; de Sá, C. P. M.; Técnicas de caracterização morfológica, microestrutural e microanalítica de superfície aplicadas aos biomateriais materiais, Apontamentos do Curso do Centro de Materiais da Universidade do Porto; <http://www.agarrados.com/apontamentos/data/MIEMM/TCM-FM1.pdf> consultado em 24/8/2011

[82] Stanier, R. Y., Doudoroff, M., Adelberg, E. A., *General Microbiology*. Third Edition, Macmillan Student Editions; 1971

[83] de Aguiar, Sara R. M. M.; *Efeitos inibitórios das espécies de Plectranthus e do ácido rosmarínico no crescimento, na formação de biofilme e na actividade da glucosiltransferase de Streptococcus sobrinus*; Cadeira de Projecto de Quimica da Faculdade de Ciencias da Universidade de Lisboa; 2008

[84] Ohida, Masahito; Yoda, Keita; Nomura, Naoyuki; Hanawa, Takao; Igarashi, Yoshimasa; *Evaluation of the static frictional coefficients of Co-Cr and gold alloys for cone crown telescope denture retainer applications*, *Dental Materials Journal*; 29, 706–712; 2010

[85] Al-Hity, Rafah R.; Kappert, Heinrich F.; Viennot, St´ephane; Dalard, Francis; Grosogeat, Brigitte; *Corrosion resistance measurements of dental alloys, are they correlated?*; *dental materials* 23, 679–687; 2007

[86] Ouerd, Aziz; Alemany-Dumont, Catherine; Normand, Bernard; Szunerits, Sabine; *Reactivity of CoCrMo alloy in physiological medium: Electrochemical characterization of the metal/protein interface*; *Electrochimica Acta* 53, 4461–4469; 2008

[87] de Queiroz, Gláucia Maria Oliveira; Silva, Leandro Freitas; Ferreira, José Tarcísio Lima; Gomes, José Antônio da Cunha P.; Sathler, Lúcio; *Electrochemical behavior and pH stability of artificial salivas for corrosion tests*; Braz Oral Res, 21, 209-15; 2007

[88] Miloše, I.; Strehblow, H.-H.; *The composition of the surface passive film formed on CoCrMo alloy in simulated physiological solution*; Electrochimica 48, 2767_ 2774; 2003

[89] Muñoz A. Igual; Mischler, S.; *Interactive Effects of Albumin and Phosphate Ions on the Corrosion of CoCrMo Implant Alloy*; Journal of The Electrochemical Society, 154, C562-C570; 2007

[90] Bilhan, H.; Bilgin, T.; Cakir, A.F.; Yuksel, B.; Fraunhofer, J.A. Von; *The Effect of Mucine, IgA, Urea, and Lysozyme on the Corrosion Behavior of Various Non-precious Dental Alloys and Pure Titanium in Artificial Saliva*; J Biomater Appl 22, 197-221; 2007

[91] Rajendran, S.; Uma, V.; Krishnaveni, A.; Jeyasundari, J.; Shyamaladevi, B.; Manivannan, M.; *Corrosion behavior of metals in artificial salive in presence of D-glucose*; The Arabian Journal for Science and Engineering, 34, 147-158; 2009

[92] Pound, Bruce G.; *Electrochemical behavior of cobalt–chromium alloys in a simulated physiological solution*; Journal of Biomedical Materials Research Part A 94, 93-102; 2010

[93] Giacomelli, Fernando Carlos; Giacomelli, Cristiano; Spinelli, Almir; *Behavior of a Co-Cr-Mo Biomaterial in Simulated Body Fluid Solutions Studied by Electrochemical and Surface Analysis Techniques*; J. Braz. Chem. Soc., 15, 541-547; 2004.

Capítulo 5 – Referências bibliográficas

[94] Sovar, Maria Magalena; Tihan, Gratiela Teodora; Miculescu, Florin; Mitran, Valentina; *Effect of Saliva pH on Electrochemical Stability of Co-Cr-Mo Bioalloy with a Bio-chemically Modified Surface*; REV. CHIM. 58, 886-889; 2007

Capítulo 6

Anexos

Ao longo da presente investigação efectuaram-se estudos de polarização potenciodinâmica em diferentes salivas artificiais. Os valores dos parâmetros cinéticos obtidos encontram-se nas tabelas 12-19.

Tabela 12 – Valores de pH e parâmetros cinéticos, e os seus desvios, da liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais

Saliva Artificial	pH	E (i=0) (mV)	E (i=0) (mV)	i _c (µA/cm ²)	i _c (µA/cm ²)
I	6,610	-556,2 -553,2 -546,3	-551,9 ± 5,1	0,4529 0,4176 0,4675	0,4460±0,0257
II	6,671	-564,3 -547,3 -558,6	-556,7 ± 8,7	2,3415 1,1515 1,5573	1,6834±0,6050
II+ ureia	6,659	-564,2 -552,4 -566,8	-561,1 ± 7,7	1,0464 2,0963 2,1476	1,7634±0,6215
II+mucina	6,661	-569,3 -563,2 -558,7	-563,7 ± 5,3	2,3627 1,9671 1,7162	2,0153±0,3259
II+glucose	6,632	-595,9 -588,9 -587,4	-590,7 ± 4,5	7,8220 9,3737 9,3946	8,8634±0,9019
II+ureia+ mucina	6,675	-572 -563,6 -565,7	-567,1 ± 4,8	1,9586 1,1101 2,0566	1,7084±0,5205
III	6,704	-587 -583,4 -590,2	-586,9 ± 3,4	7,6345 9,9126 7,8747	8,4739±1,2517

Tabela 13 – Declives de Tafel para a liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais

Saliva Artificial	β_a / mV	β_a / mV	β_c / mV	$ \beta_c $ / mV
I	164,1	156,9 ± 25,4	-76,6	76,8± 3,2
	128,6		-73,7	
	177,9		-80,0	
II	278,3	260,1±28,6	-69,6	73,4±4,6
	227,1		-78,6	
	274,9		-72,1	
II+ ureia	204,0	335,6±244,7	-68,5	72,3±9,5
	618,0		-83,2	
	184,9		-65,3	
II+mucina	207,7	273,6±81,5	-64,7	70,6±6,1
	248,3		-70,3	
	364,8		-76,9	
II+glucose	55,0	50,7±3,9	-151,8	161,5±8,4
	49,7		-166,1	
	47,5		-166,6	
II+ureia+mucina	184,1	191,0±12,7	-61,0	66,3±4,6
	183,2		-68,6	
	205,6		-69,2	
III	50,5	48,3±5,2	-159,0	162,8±8,0
	42,3		-172,0	
	52,0		-157,4	

Tabela 14 – Valores de pH e parâmetros cinéticos, e os seus desvios, da liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais com pH ajustado

Saliva Artificial	pH	E (i=0) (mV)	E (i=0) (mV)	i _c (μA/cm ²)	i _c (μA/cm ²)
I	6,610	-556,2 -553,2 -546,3	-551,9 ± 5,1	0,4529 0,4176 0,4675	0,4460±0,0257
I+ureia	6,637	-600,1 -594,2 -600,7	-598,3 ± 3,6	0,9890 0,5191 0,6182	0,7088± 0,2477
I+mucina	6,658	-603,2 -602,2 -596,6	-600,7 ± 3,6	0,6858 0,6783 0,6592	0,6745± 0,0137
I+glucose	6,629	-561,6 -576,7 -576,5	-571,6 ± 8,7	0,4816 0,5347 0,4176	0,47790±0,0587
II	6,671	-564,3 -547,3 -558,6	-556,7 ± 8,7	2,3415 1,1515 1,5573	1,6834±0,6050

Tabela 15 – Declives de Tafel para a liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais com pH ajustado

Saliva Artificial	β _a / mV	β _a / mV	β _c / mV	β _c / mV
I	164,1 128,6 177,9	156,9± 25,4	-76,6 -73,7 -80,0	76,8± 3,2
I+ureia	507,2 272,4 287,6	355,7±131,4	-132,7 -116,8 -123,4	124,3±8,0
I+mucina	258,2 302,0 297,8	286,0±24,2	-115,0 -118,5 -122,9	118,8±4,0
I+glucose	258,4 257,5 248,6	254,8±5,4	-152,3 -130,7 -116,6	133,2±18,0
II	278,3 227,1 274,9	260,1±28,6	-69,6 -78,6 -72,1	73,4±4,6

Tabela 16 – Valores de pH e parâmetros cinéticos, e os seus desvios, da liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais com pH ajustado contendo diversas concentrações de mucina

Saliva Artificial	pH	E (i=0) (mV)	E (i=0) (mV)	i _c (μA/cm ²)	i _c (μA/cm ²)
I	6,610	-556,2 -553,2 -546,3	-551,9 ± 5,1	0,4529 0,4176 0,4675	0,4460±0,0257
I+mucina	6,658	-603,2 -602,2 -596,6	-600,7 ± 3,6	0,68577 0,67834 0,65924	0,6745±0,0137
I+mucina ₁	6,643	-600,0 -603,1 -611,5	-604,9 ± 6,0	0,61217 0,51982 0,51699	0,5497 ± 0,0542
I+mucina ₂	6,666	-607,5 -604,2 -601,0	-604,2 ± 3,3	0,61996 0,65464 0,65888	0,6445 ± 0,0214

Tabela 17 – Declives de Tafel para a liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais com pH ajustado contendo diversas concentrações de mucina

Saliva Artificial	β _a / mV	β _a / mV	β _c / mV	β _c / mV
I	164,1 128,6 177,9	156,9±25,4	-76,6 -73,7 -80,0	76,8±3,2
I+mucina	258,2 302,0 297,8	286,0±24,2	-115,0 -118,5 -122,9	118,8±4,0
I+mucina ₁	317,3 235,6 217,9	256,9±53,0	-125,9 -110,3 -106,3	114,2±10,4
I+mucina ₂	279,4 314,2 328,8	307,5±25,4	-113,4 -114,1 -115,1	114,2 ±0,9

Tabela 18 – Valores de pH e parâmetros cinéticos, e os seus desvios, da liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais não tamponadas

Saliva Artificial	pH	E (i=0) (mV)	E (i=0) (mV)	i_c ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	i_c ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
A	5,592	-547,2 -546,4 -543,8	-545,8 \pm 1,8	0,4915 0,3946 0,4929	0,4597 \pm 0,0564
B	4,735	-496,6 -498,6 -495,3	-496,8 \pm 1,7	3,2247 2,9568 2,8100	2,9972 \pm 0,2103
B+ureia	4,849	-465,8 -467,3 -468,4	-467,2 \pm 1,3	3,1493 3,3386 2,5021	2,9967 \pm 0,4387
B+mucina	4,875	-501,5 -502,2 -506,9	-503,5 \pm 2,9	3,4738 3,3323 2,9342	3,2468 \pm 0,2798
B+glucose	4,780	-539,1 -539,2 -538,9	-539,1 \pm 0,2	5,6660 5,1773 6,0729	5,6387 \pm 0,4484
B+ureia+mucina	4,950	-506,7 -509 -502,1	-505,9 \pm 3,5	3,2902 3,1447 2,9809	3,1386 \pm 0,1547
C	4,921	-513,4 -504,5 -511,1	-509,7 \pm 4,6	2,5510 2,9866 3,1596	2,8990 \pm 0,3136

Tabela 19 – Valores de pH e parâmetros cinéticos, e os seus desvios, da liga de Cr-Co imersa em diferentes salivas artificiais não tamponadas

Saliva Artificial	β_a / mV	β_a / mV	β_c / mV	$ \beta_c $ / mV
A	204,4	210,4± 29,2	-87,4	86,0± 3,0
	184,7		-82,5	
	242,2		-88,0	
B	282,2	291,4±24,3	-124,2	118,8±4,8
	318,9		-115,4	
	273		-116,7	
B+ureia	453,6	563,4±115,8	-144,8	142,7±2,4
	684,4		-143,2	
	552,1		-140,1	
B+mucina	333,1	342,2±57,1	-117,6	116,0±4,3
	403,3		-119,2	
	290,1		-111,1	
B+glucose	332,7	318,2±122,0	-177,2	166,0±45,1
	189,6		-116,4	
	432,2		-204,4	
B+ureia+mucina	274,4	331,0±79,5	-113,1	113,4±4,5
	296,7		-109,0	
	421,8		-118,0	
C	433,3	490,8 ±109,2	-110,9	115,9 ±4,5
	422,4		-119,7	
	616,7		-117,0	