

CORROSIÓN LOCALIZADA DEL ACERO INOXIDABLE AUSTENÍTICO EN MEDIO DE CULTIVO CELULAR Y EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS IONES LIBERADOS

LOCALIZED CORROSION OF AUSTENITIC STAINLESS STEEL IN CELL CULTURE MEDIUM AND EVALUATION OF THE CYTOTOXICITY OF THE RELEASED IONS

Julieta Parisi¹, Daniel Castrigiovanni¹, Jorge E. Grau², Ricardo W. Gregorutti², Cecilia I. Elsner³

¹ *IMBICE CICPBA-CONICET-CCT, La Plata, Argentina.*

² *LEMIT - CICPBA, La Plata, Argentina, metalurgia@lemit.gov.ar*

³ *CIDEPINT CICPBA-CONICET-CCT, UNLP, La Plata, Argentina; direccion@cidepint.ing.unlp.edu.ar*

RESUMEN

El acero inoxidable austenítico ASTM F745 ha sido sometido a corrosión localizada en medio de cultivo celular y solución acuosa de NaCl, cuyas concentraciones de cloruro fueron 4413,2 mg L⁻¹ y 5423,1 mg L⁻¹, respectivamente. Se ha observado que la susceptibilidad a la corrosión localizada fue menor en el medio de cultivo debido a su menor contenido de cloruros. El Fe fue el metal más liberado en ambos medios durante el proceso de corrosión. Las concentraciones fueron 0,570 mg L⁻¹ en la solución acuosa de NaCl y 0,480 mg L⁻¹ en el medio de cultivo. Las concentraciones de Cr y Mo fueron similares en ambos medios, habiendo sido 0,040 mg L⁻¹ y 0,010 mg L⁻¹, respectivamente, mientras que Ni solo se detectó en la solución acuosa de NaCl, 0,100 mg L⁻¹. Estas concentraciones de iones liberados no provocaron efectos citotóxicos en células similares a osteoblastos.

Palabras clave: *Corrosión localizada, Liberación de iones, Citotoxicidad, Acero inoxidable austenítico*

ABSTRACT

Austenitic stainless steel ASTM F745 has been submitted to localized corrosion in cell culture medium and NaCl aqueous solution, whose chloride concentrations were 4413,2 mg L⁻¹ and 5423,1 mg L⁻¹, respectively. It has been observed that the susceptibility to localized corrosion was lower in the culture medium due to its lower chloride content. Fe was the most released metal in both media during the corrosion process. The concentrations were 0,570 mg L⁻¹ in the NaCl aqueous solution and 0,480 mg L⁻¹ in the culture medium. The concentrations of Cr and Mo released were similar in both media, having been 0,040 mg L⁻¹ and 0,010 mg L⁻¹, respectively, while Ni was only detected in the NaCl

aqueous solution, 0,100 mg L⁻¹. These concentrations of ions released did not cause cytotoxic effects in osteoblast-like cells.

Keywords: *Localized corrosion, Ion release, Cytotoxicity, Austenitic stainless steel*

INTRODUCCIÓN

Uno de los aspectos más importantes con respecto al uso de biomateriales metálicos en el cuerpo humano es la resistencia a la corrosión, debido a que los fluidos biológicos contienen iones agresivos, como el Cl⁻, que pueden provocar corrosión localizada. Una preocupación adicional son los posibles efectos adversos que pueden causar los componentes de aleación presentes en los biomateriales metálicos. El acero inoxidable austenítico ASTM F745, tiene una composición de Cr y Ni que puede causar diferentes reacciones sistémico-tóxicas. El Cr, en el estado Cr⁺⁶ puede ser tóxico y cancerígeno en concentraciones suficientemente altas [1-5], mientras que el níquel, puede provocar efectos alérgicos, carcinogénicos y de cito y genotoxicidad [1,2,5,6-11]. Aunque la liberación de iones puede ocurrir espontáneamente, un eventual proceso de corrosión la incrementaría.

Las pruebas in vitro evalúan de forma rutinaria la resistencia a la corrosión de los biomateriales metálicos utilizando soluciones que simulan los fluidos corporales, que consisten principalmente en sales y medios inorgánicos con y sin adiciones de suero [12]. Sin embargo, los fluidos biológicos, además de las sales inorgánicas, contienen compuestos orgánicos, como proteínas, vitaminas, aminoácidos, hormonas y hemoglobina, razón por la cual algunos autores han mencionado que las pruebas in vitro pueden no representar de manera confiable los procesos que ocurren en el cuerpo y desarrollaron experimentos para evaluar la corrosión durante el cultivo de células [13-15].

El presente trabajo evalúa la corrosión localizada del acero inoxidable austenítico ASTM F745 (en adelante F745-SS), en un medio de cultivo celular que se asemeja a los fluidos corporales.

Los resultados se comparan con los obtenidos con una solución salina que contiene 0,9% de NaCl utilizada con frecuencia en pruebas in vitro. Se ha prestado especial atención a la concentración de cloruros en los medios utilizados, ya que es el anión más agresivo desde el punto de vista de la corrosión localizada en el acero inoxidable austenítico. Finalmente, se midió la concentración de Fe, Cr, Ni y Mo liberados por el efecto de la corrosión localizada, y posteriormente se evaluó el posible efecto citotóxico sobre la línea de células osteoblásticas UMR-106 (ATCC CRL-1661), mediante los ensayos de rojo neutro y MTT.

Materiales y métodos

Materiales

Se obtuvieron muestras de acero inoxidable austenítico F745-SS mediante un proceso de fundición a la cera perdida, técnicas utilizadas para fabricar implantes quirúrgicos [16]. La composición química fue la siguiente: 0,04% C, 18,09% Cr, 14,46% Ni, 2,02% Mo, 0,49% Si y 0,90% Mn. El acero inoxidable se sometió a un tratamiento térmico de recocido y solubilizado para disolver las fases de carburo no deseadas y la ferrita- δ que normalmente precipitan en los límites de los granos durante la solidificación.

Ensayo electroquímico

La susceptibilidad a la corrosión localizada se evaluó mediante pruebas de polarización cíclica. La celda de corrosión se ensambló con el material de prueba como electrodo de trabajo con 3 cm² de área, electrodo de calomel saturado (SCE) como referencia y un electrodo de Pt como auxiliar.

Se utilizaron dos electrolitos: 1) un medio de

cultivo completo compuesto por medio de Eagle modificado de Dubelco (DMEM) con alto contenido de glucosa, suplementado con suero de ternero fetal inactivado al 10% (en adelante, CCM) y 2) solución acuosa de NaCl al 0,9% en peso (en adelante, (NaCl-AqS)). Las pruebas se realizaron a pH = 7,4 y 37 ° C, utilizando Potenciostato / Galvanostato EG&G Modelo 273A controlado por el programa CorrWear®. Las muestras se mantuvieron durante 1 h a potencial de circuito abierto (Eoc), y posteriormente, se realizó un escaneo de potencial a 0,25 mVs⁻¹ en la dirección anódica desde un valor de potencial 0,200 V más catódico que Eoc, hasta alcanzar las condiciones de inversión ($E = 3 \text{ V} / \text{SCE}$ o $j = 10^{-4} \text{ A cm}^{-2}$). Después de las pruebas, las concentraciones liberadas de Fe, Cr, Ni y Mo se midieron mediante ICP-OES y la concentración de cloruro en el medio se midió mediante el método de Mohr.

Citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron empleando la línea celular osteoblástica de rata UMR-106 (ATCC, CRL-1661). Las células fueron expuestas al CCM que contenía los iones liberados en el ensayo de corrosión, evaluándose la viabilidad celular con los bioensayos de rojo neutro (RN) y ensayo de reducción del bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolico (MTT). Los efectos sobre las células se han comparado con controles positivos y negativos. El control negativo [CTR (-)] estuvo representado por el CCM sin exposición al F745-SS, mientras que el control positivo [CTR (+)] fue el CCM con un agente citotóxico (fenol al 0,01%).

Resultados

Corrosión localizada

Las curvas de polarización cíclica del F745-SS en los dos medios se muestran en la Figura 1. El ensayo evalúa la susceptibilidad a la corrosión localizada y la capacidad para su desarrollo determinando el potencial de corrosión (E_{Corr}), el potencial de picado (E_{Pit}) y el potencial de repasivación (E_b). El

rango de pasividad del material está determinado por la diferencia ($E_{\text{Pit}} - E_{\text{Corr}}$) y su capacidad de repasivación por la diferencia ($E_{\text{Pit}} - E_b$). Cuanto mayor es ($E_{\text{Pit}} - E_{\text{Corr}}$), menor es la susceptibilidad a la corrosión localizada. Por otro lado, cuanto menor sea ($E_{\text{Pit}} - E_b$), mayor será la capacidad de repasivación.

Los resultados obtenidos han mostrado que el F745-SS ha tenido mayor rango de pasividad (0,835 V) en CCM con respecto a su comportamiento en NaCl-AqS (0,460 V). La capacidad de repasivación, en cambio, ha sido similar en ambos medios, aunque ligeramente superior en CCM.

Otra característica a considerar es el amplio lazo de histéresis que se ha observado en ambas curvas de polarización, propio de materiales que tienen una mayor tendencia a sufrir corrosión localizada y/o corrosión por rendija.

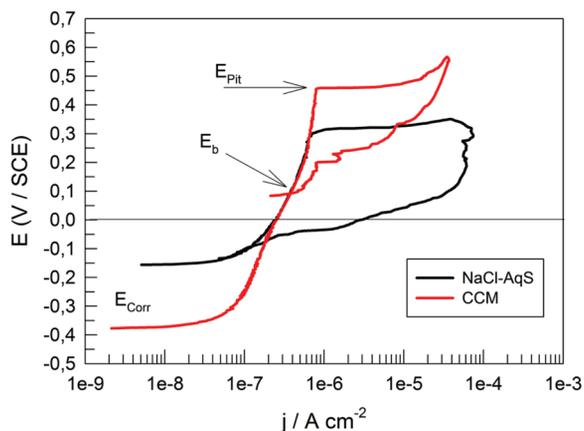


Figura 1: Curvas de polarización del F745-SS en CCM y en solución acuosa de NaCl.

En la Figura 2 se muestra el picado provocado por la corrosión localizada, donde se aprecia que el daño producido en NaCl-AqS parece ser mayor que en CCM.

También se ha observado indicios de picado por corrosión en la interfaz entre la matriz y las inclusiones no metálicas, como se muestra en la Figura 3.

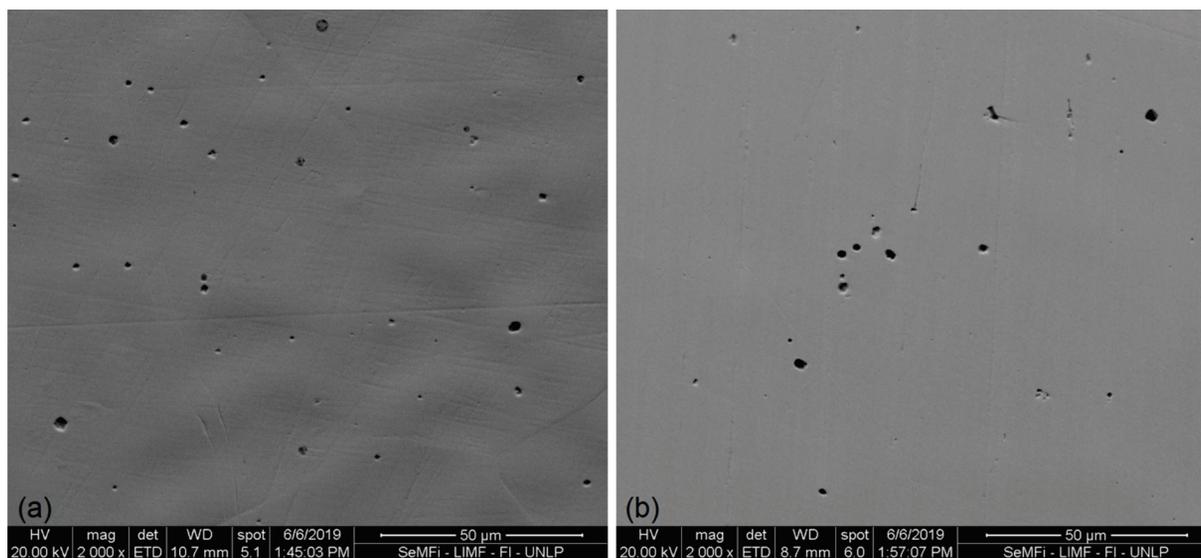


Figura 2: Daño por corrosión localizada causado en el ensayo de polarización cíclica; (a) en NaCl-AqS, (b) en CCM.

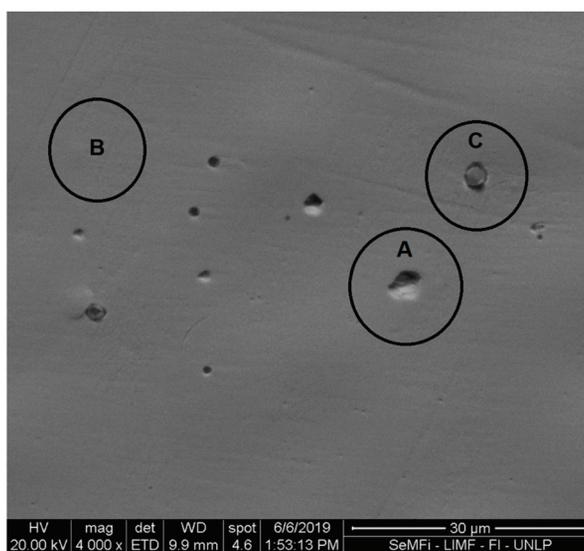


Figura 3: Imagen SEM de los daños por corrosión localizada y zonas de análisis EDS. A: zona de corrosión; B: matriz y C: corrosión iniciada en la interfaz matriz / inclusión.

Los análisis de EDS realizados en las regiones con picado indicaron la presencia de Cl y un mayor porcentaje de O con respecto a las áreas no afectadas por corrosión localizada, como se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Análisis EDS en la matriz y zona de corrosión. Concentraciones en% en peso.

Elementos [% en masa]	Matriz	Pit de corrosión
Fe	60,85	57,63
Cr	17,86	17,03
Ni	14,63	13,77
Mo	2,59	2,44
Si	0,39	1,32
O	0,48	3,61
Cl	-	0,10

Los iones liberados en el proceso de corrosión localizada han sido medidos por ICP-OES. Los valores reportados en la Tabla 2, indican que Fe fue el elemento más liberado en ambas experiencias, siendo mayor la cantidad registrada en NaCl-AqS. Las concentraciones de Cr y Mo fueron considerablemente inferiores a las de Fe y similares en ambos medios, mientras que Ni solo se detectó en NaCl-AqS, ya que en CCM su concentración estuvo por debajo del límite de detección (LD).

Tabla 2. Concentraciones de iones liberados en los ensayos de corrosión localizada.

	Fe	Cr	Ni	Mo
	[mg L ⁻¹]			
NaCl-AqS	0,570	0,040	0,100	0,010
CCM	0,480	0,040	< DL	0,010
LD ^[a]	0,018	0,003	0,011	0,002

^[a]Límite de detección

Ensayos de citotoxicidad

Los posibles efectos adversos de Fe, Cr, Ni y Mo en las células UMR-106 se han evaluado en los ensayos RN y MTT. Los resultados se muestran en las Figuras 4 y 5, donde el efecto de los iones liberados durante las pruebas de corrosión se compararon con CTR (-) y CTR (+).

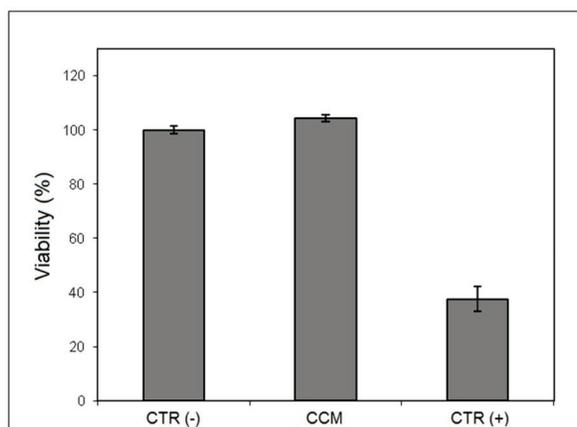


Figura 4: Ensayo de rojo neutro. CCM, medio obtenido del ensayo de corrosión localizada; CTR (-), medio sin exposición al material estudiado; CTR (+), medio con un agente tóxico (fenol al 0,01%).

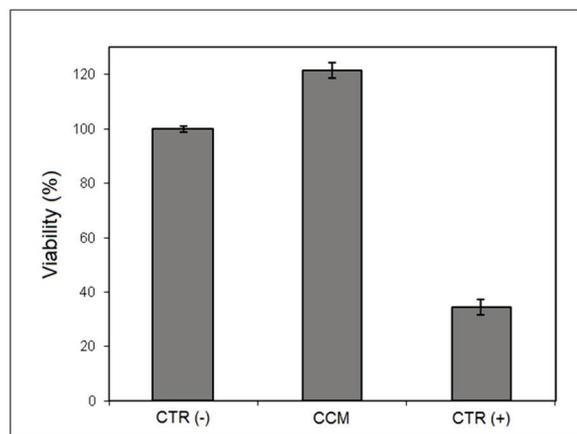


Figura 5: Ensayo MTT. CCM, medio obtenido del ensayo de corrosión localizada; CTR (-), medio sin exposición al material estudiado; CTR (+), medio con un agente tóxico (fenol al 0,01%).

El ensayo NR evalúa la viabilidad celular mediante la actividad lisosómica. Las células viables pueden absorber colorante NR (clorhidrato de 3-amino-7-dimetil-amino-2-metil-fenazina) en los endosomas y lisosomas, este es el fenómeno que evidencia la cantidad de células vivas presentes en el medio de cultivo, expuestas a un agente tóxico [17,18].

Las células expuestas al CCM han mostrado una alta viabilidad, comparable a la expuesta a CTR (-), mientras que las CTR (+) han mostrado el daño causado por el agente tóxico.

Por otro lado, el ensayo MTT evalúa la actividad metabólica mitocondrial de las células. Las células viables promueven la reducción del bromuro de tetrazolio 3-(4, 5-dimetiltiazolil-2)-2, 5-difeniltetrazolio (MTT) a formazán púrpura insoluble por la acción de la enzima succinato deshidrogenasa presente en las mitocondrias [17-19]. Las células con un metabolismo bajo reducen muy poco el MTT, mientras que las células que se dividen rápidamente exhiben una alta tasa de reducción.

Como en el caso del ensayo NR, los CCM que contienen los iones liberados por la prueba de corrosión localizada no han infligido ninguna alteración en la actividad mitocondrial y han presentado una alta viabilidad celular.

Análisis de los resultados

Las pruebas in vitro suelen utilizar soluciones inorgánicas para inducir los procesos de corrosión, emulando los fluidos corporales. Sin embargo, estos últimos se componen de soluciones complejas de constituyentes orgánicos e inorgánicos, así como de iones diversos. Entre ellos, el cloruro es el que más afecta la resistencia a la corrosión de los biomateriales metálicos, ya que desestabiliza la película pasiva, promoviendo formas locales de corrosión por picado y rendijas [20,21]. Según la norma ASTM F2129/17 [22], la concentración de cloruro varía en diferentes fluidos fisiológicos, siendo 4042 mg L⁻¹ en líquido intersticial, 3811 mg

L⁻¹ en sinovial y 3581 mg L⁻¹ en suero. Hanawa [23], en su trabajo sobre la liberación de iones de las aleaciones utilizadas en implantes ha reportado una concentración de cloruro de 117 mEq L⁻¹ en líquido intersticial y 113 mEq L⁻¹ en suero, tomando en consideración que estos valores implican un serio riesgo de corrosión. En el presente trabajo, las condiciones experimentales de las pruebas de corrosión en CCM se asemejaron a las del cuerpo humano, ya que su concentración de cloruro ha sido similar a las reportadas por Fotakis y Timbrell [18] y van Meerloo et al. [19]. El caso del NaCl-AqS es diferente en el sentido de que su concentración de cloruros supera considerablemente la de los fluidos corporales. Esa condición implica que los ensayos in vitro se realizan en condiciones más desfavorables que las del medio corporal.

De acuerdo con las curvas de polarización cíclica de la Figura 1, se podría argumentar que el cloruro tiene mayor incidencia en la corrosión localizada que las vitaminas, los aminoácidos y los componentes orgánicos.

En cuanto a la influencia de las sustancias orgánicas en la corrosión, Hanawa [23], basándose en otros trabajos [24,25], menciona que las proteínas y los aminoácidos aumentan la velocidad de disolución de la película pasiva de los aceros inoxidable, mientras que Eliaz [21] sostiene que el papel de las proteínas es ambiguo y depende de cuál se utilice en los experimentos. El origen de este comportamiento diferencial podría estar relacionado con el hecho de que algunos de estos compuestos contienen cloruro en su composición, como las proteínas L-Arginina. ClH, L-Cistina.2ClH, L-Histidina.ClH.2H₂O y L-Lisina.ClH que aparecen en el CCM utilizado en el presente trabajo.

El cloruro provoca la disolución de la película pasiva de Cr₂O₃ permitiendo el acceso de O a la zona dañada [26], como lo ha demostrado el análisis EDS en las zonas de corrosión, en las que se ha detectado la presencia de Cl y O. Así, la acumulación de O provocaría la oxidación de

los elementos constituyentes del acero inoxidable, lo cual se ha reflejado en la Tabla 1. En ambos medios se ha observado una mayor concentración de Fe liberado luego de las pruebas de corrosión localizada, posiblemente por ser el elemento mayoritario en la aleación con respecto al Cr, Ni y Mo.

En los aceros inoxidables tipo 316L, como es el caso del F745-SS, el Mo no solo mejora la resistencia a la corrosión por cloruros, sino que también favorece la restauración de la película pasiva [21,27]. Por ello, la capacidad de repasivación, dada por (EPit - Eb), ha sido similar en ambos medios, pues representa una característica intrínseca del material, particularmente del contenido de Mo. Por otro lado, la extensión de la región de pasividad depende de la resistencia a la corrosión localizada del material y de la agresividad del medio, que en este caso es función de la concentración de cloruro. Por otro lado, se ha evaluado el potencial efecto citotóxico de los iones Fe, Cr, Ni y Mo liberados por el F745-SS en el proceso de corrosión localizada, considerando que esto implica una situación crítica en el desempeño del material.

La línea de células osteoblásticas UMR-106 ha sido seleccionada para ensayos debido a sus características relacionadas con las células óseas. Las células fueron expuestas al CCM con la concentración de iones indicada en la Tabla 2.

El ensayo NR ha revelado que la cantidad de iones liberados durante la prueba de corrosión localizada no ha causado ningún efecto dañino sobre la función lisosomal, y se ha observado una alta viabilidad en las células expuestas a CCM. De manera similar, la actividad metabólica experimentada en el ensayo MTT ha sido lo suficientemente alta como para afirmar que no hay efectos adversos sobre las mitocondrias.

Estos ensayos de citotoxicidad no se han realizado a partir de medios de cultivo acondicionados según la norma ISO10993-5, sino con los medios obtenidos del ensayo de corrosión. Sin embargo, los

resultados han sido similares a los obtenidos en un trabajo anterior sobre el mismo acero inoxidable, que se ha realizado siguiendo las directrices de la citada norma [28]. En ambos casos, los resultados no han mostrado diferencias significativas con respecto al CTR (-). La evidencia de no toxicidad de F745-SS está de acuerdo con otros autores que han estudiado el efecto citotóxico del acero inoxidable austenítico AISI 316L / ASTM F138, utilizando diferentes líneas celulares, sin encontrar efectos adversos sobre la viabilidad celular [29-31].

CONCLUSIONES

La corrosión localizada sufrida por F745-SS ha dependido principalmente de la concentración de cloruro, más que de los componentes orgánicos del medio de cultivo. Estos resultados han revelado que las pruebas in vitro realizadas con la solución de NaCl al 0,9% son más agresivas desde el punto de vista de la corrosión.

El Fe ha sido el metal más liberado en el proceso de corrosión localizada, mientras que las concentraciones de Cr, Ni y Mo han sido similares en ambos medios. Por otro lado, el Ni sólo se ha detectado en la solución salina de NaCl.

Los resultados obtenidos de las pruebas RN y MTT han demostrado que la concentración de iones liberada por la corrosión localizada en el medio de cultivo no ha provocado efectos adversos sobre la viabilidad de las células osteoblásticas UMR-106.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CICPBA), bajo el Proyecto PIT-AP-BA 2016. Los autores desean agradecer a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

REFERENCIAS

- 1.- Sargeant A, Goswami T. Hip implants – Paper VI – Ion concentrations, Mater. and Design. 2007;28:155–171.
- 2.- Shettlemore MG, Bundy KJ.. Examination of in vivo influences on bioluminescent microbial assessment of corrosion product toxicity, Biomaterials. 2001;22:2215-2228.
- 3.- Achmad RT, Budiawan B, Auerkari EI. Effects of Chromium on Human Body, Annu. Res. Rev. Biol. 2017;13:1–8.
- 4.- Afolaranmi GA, Tettey J, Meek RMD, et al. Release of Chromium from Orthopaedic Arthroplasties, Open. Orthop. J. 2008;2:10-18.
- 5.- Hallab NJ, Jacobs JJ. Biologic effects of implant debris. Bull. NYU. Hosp. Jt. Dis. 2009;67:182–188.
- 6.- Tanaka R, Goi Y, Ishihara K, et al. Assessment of the release of nickel from biomaterials in vivo and in vitro: enhancement by lipopolysaccharide, Inflammation and Regeneration. 2011;31(3):302-306.
- 7.- Taira M, Toguchi MS, Hamada Y, et al. Studies on cytotoxic effect of nickel ions on three cultured fibroblast, J. Mater. Sci.: Mater. Med. 2001;12:373–376.
- 8.- Niinomi M. Recent metallic materials for biomedical applications. Metall. Mater. Trans. A, 2002;33A:477–485.
- 9.- Sumita M, Hanawa T, Teo SH. Development of nitrogencontaining nickel-free austenitic stainless steels for metallic biomaterials – review. Mater. Sci. Eng. C. 2004;C24:753–760.
- 10.- Lu X, Bao X, Huang Y, et al. Mechanisms of cytotoxicity of nickel ions based on gene expression profiles. Biomaterials. 2009;30:141–148.
- 11.- Yang K, Ren Y. Nickel-free austenitic stainless steels for medical applications. Sci. Technol. Adv. Mater. 2010;11:1–13.
- 12.- Hiromoto S. Corrosion of metallic biomaterials in cell culture environments, Electrochem. Soc. Interface. 2008;17:41–44.
- 13.- Nakayama Y, Yamamoto T, Kotoura Y, et al. Biomaterials. 1989;10:420. As quoted by Ref. 12.
- 14.- Hiromoto S, Noda K, Hanawa T. Development of electrolytic cell with cell-culture for metallic biomaterials. Corros. Sci. 2002;44:955-965.
- 15.- Bumgardner JD, Lucas LC. Corrosion and cell culture evaluations of nickel-chromium dental casting alloys. J. Appl. Biomater. 1994;5(3):203-213.

- 16.- Brunski JB. Classes of materials used in medicine. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, et al., editors. *Biomaterials science – An introduction to materials in medicine*. San Diego (CA): Academic Press; 1996. p. 37–50.
- 17.- Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Inter. J. of Pharm.* 2005;288:369-376.
- 18.- Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol. Lett.* 2006;160(2):171-177.
- 19.- van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol. Biol.* 2011;731:237-245.
- 20.- Wards R, Denaburg CR, Taylor DO. Corrosion failures. In: Boyer E., editor. *Failure Analysis and prevention*. ASM Handbook, Vol. 11. Ohio (OH): ASM International; 1975. p. 168-205.
- 21.- Eliaz N. Corrosion of Metallic Biomaterials: A Review, *Materials*. 2019;12(3);407.
- 22.- ASTM F2129–17: Standard Test Method for Conducting Cyclic Potentiodynamic Polarization Measurements to Determine the Corrosion Susceptibility of Small Implant Devices. West Conshohocken: ASTM International; 2017.
- 23.- Hanawa T. Metal ion release from metal implants, *Mater. Sci Engineer. C*. 2004;24:745–752.
24. Merritt K, Brown S.A. Effect of Proteins and pH on Fretting Corrosion and Metal Ion Release, *J. Biomed. Mater. Res.* 1988;22:111-120. As quoted by Reference 22.
- 25.- Williams RL, Brown SA, Merritt K. Electrochemical Studies on the Influence of Proteins on the Corrosion of Implant Alloys. *Biomaterials*. 1988;9:181-186. As quoted by Reference 22.
- 26.- Tihamiyu AA, Eduok U, Szpunar JA, et al. Corrosion behavior of metastable AISI 321 austenitic stainless steel: Investigating the effect of grain size and prior plastic deformation on its degradation pattern in saline media. *Scient. Rep.* 2019;9(1):1–18.
- 27.- Ha H-Y, Lee T, Bae J-H, et al. Molybdenum Effects on Pitting Corrosion Resistance of FeCrMnMoNC Austenitic Stainless Steels. *Metals*. 2018;8:653.
- 28.- Gregorutti RW, Grau JE, Castrogiovanni D, et al. Susceptibility to Localized Corrosion of ASTM F745 and UNS S32750 Stainless Steels Influence of pH and Cytotoxicity Evaluation. *Innovations in Corrosion and Materials Science (Discontinued)*. 2020;10:47- 57.
- 29.- Beloti MM, Rollo JMDA, Itman Filho A, et al. In vitro biocompatibility of duplex stainless steel with and without 0.2% niobium. *J. Appl. Biomater. Biomech.* 2004;2:162-168.

30. Sumarta NPM, Danudiningrat CP, Rachmat EA, et al. Cytotoxicity difference of 316L stainless steel and titanium reconstruction plate. *Dent. J.* 2011;44(1):7-11.

31. Wang YB, Li H. F, Zheng YF, et al. Corrosion performances in simulated body fluids and citotoxicity evaluation of Fe-based bulk metallic glasses. *Mater. Sci. and Eng. C.* 2012;32:599-606.