

KEROLENE BARBOZA DA SILVA

**Desenvolvimento de novas técnicas de processamento da liga biodegradável Fe-35Mn
para aplicações biomédicas: estudos *in vitro***

Kerolene Barboza da Silva

**Desenvolvimento de novas técnicas de processamento da liga biodegradável Fe-35Mn
para aplicações biomédicas: estudos *in vitro***

Tese apresentada ao Conselho de Curso de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica da Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do diploma de Doutorado em Engenharia Mecânica na área de Materiais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Rosifini
Alves Claro

Guaratinguetá - SP
2022

S586d Silva, Kerolene Barboza da
Desenvolvimento de novas técnicas de processamento da liga biodegradável Fe-35Mn para aplicações biomédicas: estudos in vitro / Kerolene Barboza da Silva – Guaratinguetá, 2022.
85 f : il.
Bibliografia: f. 81 - 85

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, 2022.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Rosifini Alves Claro

1. Materiais biomédicos. 2. Ligas de ferro. 3. Metais - Análise. I. Título.

CDU: 691.16



KEROLENE BARBOZA DA SILVA

ESTA TESE FOI JULGADA ADEQUADA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
“DOUTORA EM ENGENHARIA MECÂNICA”

PROGRAMA: ENGENHARIA MECÂNICA
CURSO: DOUTORADO

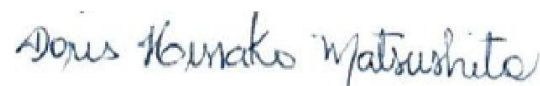
APROVADA EM SUA FORMA FINAL PELO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO


Prof. Dr. Manoel Cléber de Sampaio Alves
Coordenador

BANCA EXAMINADORA:


Profa. Dra. ANA PAULA ROSIFINI ALVES CLARO
Orientador - UNESP
participou por videoconferência


Prof. Dr. EDSON ANTONIO CAPELLO SOUSA
UNESP
participou por videoconferência


Profa. Dra. DORIS HISSAKO MATSUSHITA
UNESP
participou por videoconferência


Profa. Dra. MIRIAN DE LOURDES NORONHA MOTTA MELO
UNIFEI
participou por videoconferência


Profa. Dra. FÁTIMA RAQUEL MAIA
Universidade do Minho
participou por videoconferência

OUTUBRO de 2022

DADOS CURRICULARES

KEROLENE BARBOZA DA SILVA

NASCIMENTO	27.04.1988 – Aparecida / SP
FILIAÇÃO	Sebastião Apolônio da Silva Maria da Dores Barboza da Silva
2010/2015	Graduação em Engenharia de Materiais Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
2015/2017	Mestrado em Engenharia Mecânica Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Dedico este trabalho de modo especial,
aos meus familiares que, com muito carinho e
apoio, não mediram esforços para que eu
chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por me guiar, iluminar e me dar perseverança para seguir em frente com meus objetivos e não desanimar. Agradeço pela minha vida, minha inteligência, minha família e meus amigos.

À Prof^a. Dr^a. Ana Paula Rosifini Alves Claro pela dedicação na orientação deste trabalho, pelo incentivo, amizade e compreensão nos momentos de dificuldades e por estar sempre presente.

À minha família, meus pais Sebastião e Maria das Dores, que sempre incentivaram meus estudos e me apoiaram em todas as minhas escolhas. Espero um dia poder retribuir todo o carinho.

Aos amigos João Pedro Aquiles Carobolante, Johan Alexander Cortes Suarez e companheiros do grupo de Biomateriais, pelo conhecimento, apoio e cooperação prestados.

Aos funcionários da Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá.

E a todos que de alguma forma estiveram relacionados direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – código de financiamento 001.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

Nos últimos anos, o desenvolvimento de implantes metálicos temporários a partir de biomateriais biodegradáveis como o ferro e suas ligas tem sido alvo de várias pesquisas. Estes permitem que o implante degrade progressivamente após servir ao seu objetivo, eliminando os riscos de complicações associadas a um implante permanente. O ferro é particularmente atraente do ponto de vista estrutural e com a adição de manganês tem manifestado grande potencial para aplicações em implantes biodegradáveis, principalmente em *stents* cardiovasculares. A liga Fe-35Mn exibe um conjunto de propriedades mecânicas, magnéticas e de degradação que a tornam a melhor opção dentro do sistema Fe-Mn, entretanto, sua taxa de degradação ainda é considerada muito baixa. Assim sendo, novas técnicas de processamento podem ser incorporadas à liga a fim de melhorar suas propriedades. A objetivo desta pesquisa é avaliar a influência das condições de processamento propostas nas propriedades da liga Fe-35Mn. A liga experimental foi produzida em forno de fusão a arco voltaico, homogeneizada, forjada à quente e então solubilizada. Para a caracterização, empregou-se as técnicas de FRX, microscopia óptica, DRX, DSC, microdureza, ensaio de resistência à tração e à corrosão. A taxa de degradação foi determinada por meio do ensaio de imersão estática e espectroscopia de absorção atômica. Estudos *in vitro* com células de osteossarcoma humano foram realizados para avaliar a citotoxicidade. Os resultados indicaram que processamento estabelecido levou ao aumento das propriedades mecânicas, a uma taxa de degradação intermediária e viabilidade do crescimento celular.

PALAVRAS-CHAVE: Biomateriais. Metais biodegradáveis. Ligas de ferro-manganês. Processamento.

ABSTRACT

In the recent years, the development of temporary metallic implants from biodegradable biomaterials as iron and its alloys has been the subject of several studies. These biomaterials allow that the implant degrade gradually after serving its purpose, eliminating the risks of complications associated to a permanent implant. Iron is particularly attractive on the structural side and with the addition of manganese has shown a big potential for applications in biodegradable implants, especially in cardiovascular stents. The Fe-35Mn alloy exhibits a set of mechanical, magnetic and of degradation properties that become it the best choice in the Fe-Mn system, however, its degradation rate still is considered very slow. Therefore, new processing techniques can be incorporated into the alloy in order to improve its properties. The objective of this research is to evaluate the influence of the proposed processing conditions on the properties of the Fe-35Mn alloy. The experimental alloy was obtained by arc melting furnace, homogenized, worked by hot swaging and then quenched. For characterization, it was employed the FRX, optical microscopy, DRX, DSC, microhardness, tensile and corrosion test techniques. Degradation rate was evaluated by static immersion test and AAS. In vitro studies with human osteosarcoma cells were performed to assess cytotoxicity. The results indicated that established processing led to increased mechanical properties, an intermediate degradation rate and cell growth viability.

KEYWORDS: Biomaterials. Biodegradable metals. Iron-manganese alloys. Processing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação gráfica da movimentação financeira de biomateriais no mundo, em bilhões de dólares.	15
Figura 2 – Evolução dos biomateriais	22
Figura 3 – Dispositivos metálicos implantáveis para aplicação temporária (a) atuação de parafusos e pinos para fixação óssea e (b) esquema de implantação de um <i>stent</i> coronário...	27
Figura 4 – Mecanismo de biodegradação de metais.....	29
Figura 5 – Representação esquemática da relação ideal entre degradação e integridade mecânica de um <i>stent</i> biodegradável.	33
Figura 6 – Diagrama de fases do sistema Fe-Mn em equilíbrio.....	37
Figura 7 – Variação da fração volumétrica das fases presentes de acordo com o teor de manganês nas ligas de Fe-Mn fundidas.....	38
Figura 8 – Efeito da fração volumétrica de manganês nas temperaturas de transformação do sistema Fe-Mn: M_S ($\epsilon \rightarrow \gamma$ transformação no resfriamento), A_S (reverso $\gamma \rightarrow \epsilon$ transformação no aquecimento), T_N (ordem antiferromagnética ou temperatura Néel).	39
Figura 9 – Fluxograma da metodologia aplicada neste trabalho	42
Figura 10 – Metais utilizados para o preparo da liga Fe-35Mn: (a) ferro e (b) manganês.....	43
Figura 11 – (a) Forno de fusão a arco voltaico utilizado para fusão da liga Fe-35Mn e (b) Lingote obtido após a fusão.....	44
Figura 12 – Forno tubular utilizado para realização dos tratamentos térmicos.....	44
Figura 13 – Barras cilíndricas da liga Fe-35Mn obtidas após o forjamento a quente	45
Figura 14 – (a) Amostras da liga Fe-35Mn com 3 mm de espessura e (b) Microscópio óptico Epiphot 200 – Nikon.....	46

Figura 15 – Difratorômetro D8 <i>advance</i> – Brucker.....	47
Figura 16 – Microdurômetro 401 MVD - <i>Wilson Instruments</i>	48
Figura 17 – Forma e dimensões (mm) dos corpos de prova de tração.....	49
Figura 18 – Máquina universal de ensaios 8801 – Instron	49
Figura 19 - Sistema Sonelastic - ATP Engenharia Física, utilizado na medida do módulo de elasticidade pela técnica de excitação por impulso.....	50
Figura 20 – Célula eletroquímica convencional de três eletrodos.....	52
Figura 21 – (a) Disposição das amostras e (b) Monitoramento do pH durante o ensaio de imersão estática.....	53
Figura 22 – Espectrômetro de absorção atômica por chama AA 7000 – Shimadzu.....	54
Figura 23 – Microscopia óptica da liga Fe-35Mn em diferentes condições. (a) bruta de fusão, (b) homogeneizada, (c) forjada a quente e (d) solubilizada	58
Figura 24 – Difratorograma da liga Fe-35Mn após cada etapa de processamento – Fusão, homogeneização, forjamento à quente e solubilização.....	59
Figura 25 – Análise quantitativa de fases através do refinamento Rietveld.....	61
Figura 26 – Curvas correspondentes ao primeiro e segundo ciclos de aquecimento da investigação por calorimetria diferencial exploratória da liga Fe-35Mn	62
Figura 27 – Microdureza Vickers da liga Fe-35Mn durante as etapas do processamento – Fusão, homogeneização, forjamento à quente e solubilização.....	64
Figura 28 – Curvas tensão-deformação média em tração da liga Fe-35Mn após o processamento.....	65
Figura 29 – Curva média de evolução do potencial de circuito aberto (OCP) de amostras da liga Fe-35Mn durante 5400 segundos de imersão em solução de Hank a 37°C.....	67

Figura 30 – Curvas de polarização potenciodinâmica da liga Fe-35Mn em solução de Hank a 37°C.....	68
Figura 31 – Taxas de degradação média da liga Fe-35Mn obtidas a partir do ensaio de imersão estática em solução de Hank, após 3, 10 e 30 dias	70
Figura 32 - Ilustração dos mecanismos de corrosão para ligas Fe-Mn (a) reação de corrosão inicial, (b) formação de camada de hidróxido, (c) processo de corrosão do metal e (d) formação da camada de cálcio-fósforo.....	71
Figura 33 – Concentração de íons liberados (Fe e Mn) em solução de Hank após 3, 10 e 30 dias.....	72
Figura 34 – Variação do pH da solução de Hank durante o ensaio de imersão estática.....	73
Figura 35 – Micrografias das amostras da liga Fe-35Mn e de Fe puro após 1, 7 e 14 dias de cultura celular Saos-2.....	74
Figura 36 – Análise por EDS da liga Fe-35Mn após 14 dias de cultura celular Saos-2.....	75
Figura 37 – (a) Quantificação da liberação de íons de Fe e Mn a partir de amostras da liga Fe-35Mn no meio de cultura das células Saos-2 durante 14 dias e (b) Quantificação da liberação de íons de Fe e Mn a partir de amostras de Fe puro no meio de cultura das células Saos-2 durante 14 dias.....	76
Figura 38 – Atividade metabólica de células Saos-2 cultivadas sobre amostras da liga de Fe-35Mn e Fe ao longo de 14 dias. (δ representa estatisticamente diferente do dia 1; ϕ representa estatisticamente diferente do dia 3; * representa estatisticamente diferente do grupo indicado).....	77
Figura 39 – Coloração com actina F de células cultivadas sobre amostras da liga de Fe-35Mn e Fe para avaliar a adesão celular e espalhamento ao longo de 14 dias de cultura. F-actina das células foi corada com faloidina (cor verde) e os núcleos foram contra corados com DAPI (cor azul) (barra de escala = 50 μ m).....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo das principais vantagens e deficiências dos biomateriais metálicos.....	17
Tabela 2 – Potenciais padrão de redução em solução aquosa a 25 °C.....	30
Tabela 3 – Resumo das propriedades mecânicas das ligas a base de Mg e Fe, comparadas ao aço 316 L e ao osso.....	31
Tabela 4 – Comparação entre as taxas de degradação in vitro de ligas de Fe e Mg.....	34
Tabela 5 – Principais propriedades mecânicas, magnéticas e de degradação para ligas de Fe-Mn.....	40
Tabela 6 – Composição da solução de Hank	51
Tabela 7 – Análise da liga Fe-35Mn por fluorescência de raios X, expresso em percentual em massa de compostos, normalizados a 100%.....	57
Tabela 8 – Comparação entre as propriedades mecânicas da liga Fe-35Mn obtidas pelo ensaio de tração após o processamento e demais ligas metálicas para aplicações biomédicas	65
Tabela 9 – Parâmetros de corrosão da liga Fe-35Mn após o processamento.....	69

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVO	20
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1	BIOMATERIAIS	21
3.1.1	Biomateriais biodegradáveis	23
3.1.2	Biomateriais metálicos biodegradáveis	25
3.2	LIGAS DE FE-MN	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1	OBTENÇÃO DA LIGA Fe-35Mn	42
4.2	CARACTERIZAÇÃO MICRO(ESTRUTURAL)	45
4.2.1	Ensaio de Fluorescência de raios X	45
4.2.2	Microscopia óptica	46
4.2.3	Difração de raios X	47
4.2.4	Calorimetria exploratória diferencial	47
4.2.5	Ensaio de microdureza	48
4.3	CARACTERIZAÇÃO MECÂNICA	48
4.3.1	Ensaio de resistência à tração	48
4.3.2	Técnica de excitação por impulso	50
4.4	ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO	50
4.4.1	Ensaio de resistência à corrosão	50
4.4.2	Ensaio de imersão estática	52
4.4.3	Espectroscopia de absorção atômica	53
4.5	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i>	54
4.5.1	Microscopia eletrônica de varredura	54
4.5.2	Espectrometria de Plasma Acoplado Indutivamente	55
4.5.3	Atividade metabólica celular	55
4.5.4	Coloração de actina F	55
4.5.5	Análise estatística	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1	CARACTERIZAÇÃO MICRO(ESTRUTURAL)	57
5.2	COMPORTAMENTO MECÂNICO	64

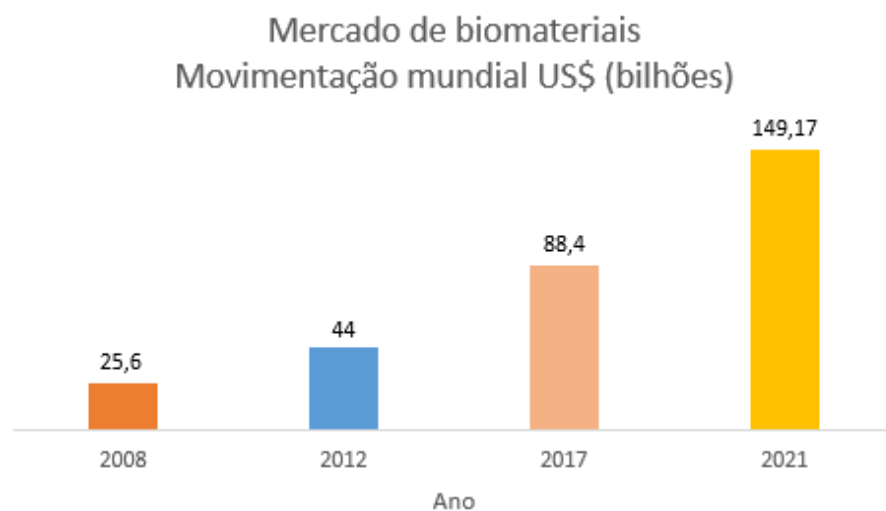
5.3	ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO.....	66
5.4	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i>	73
6	CONCLUSÃO.....	79
	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	80
	REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO

O uso de biomateriais para reparar as deficiências do corpo humano começou a ser aplicado na medicina no final dos anos 1940 e 1950 (GEETHA et al., 2009). Desde então, o progresso em diferentes áreas do conhecimento tem contribuído para a ascensão dos biomateriais. A melhoria na compreensão de doenças e condições crônicas anteriormente vistas como não tratáveis aliada aos avanços dos tratamentos clínicos têm levado ao aumento da expectativa de vida da população mundial, impondo demandas significativas no que se refere a intervenções cirúrgicas capazes de melhorar sua qualidade de vida.

O mercado dos biomateriais movimentou cerca de 25,6 bilhões de dólares em escala mundial no ano de 2008, 44 bilhões em 2012 e 88,4 bilhões em 2017. Para 2021, a projeção é chegar a 149,17 bilhões de dólares, como mostra a Figura 1. Para o mercado brasileiro de biomateriais (empregados em tratamentos cardiovasculares, ortopédicos, liberação de fármacos e urológicos) estima-se um crescimento anual de 18,3% entre 2017 e 2022 (FALEIROS-SANTOS et al.,2019).

Figura 1 – Representação gráfica da movimentação financeira de biomateriais no mundo, em bilhões de dólares.



Fonte: Adaptado de Faleiros-Santos et al. (2019).

Os valores estimados consideram a utilização de 1 a 2,5 milhões de unidades de joelho e ombro, próteses de quadril, *stents* cardiovasculares, placas de fixação óssea e parafusos.

Numa perspectiva global, 34,5% dos valores arrecadados está relacionado a aplicações cardiovasculares, mostrando a alta representatividade deste segmento (FALEIROS-SANTOS et al., 2019).

Deste modo, pesquisas buscando dispor de novos materiais ou mesmo a modificação dos já existentes, a fim de alcançar dispositivos médicos otimizados e melhorar a qualidade de vida dos pacientes, têm possibilitado a descoberta de materiais seguros e com propriedades atrativas para aplicações biomédicas (GOREJOVÁ et al., 2019).

No grupo dos biomateriais metálicos, atualmente, os aços inoxidáveis e ligas à base de cobalto-cromo e titânio são os mais utilizados. Devido as suas superiores propriedades mecânicas, biocompatibilidade e resistência à corrosão, estes materiais já são usados comercialmente e ocupam uma posição dominante no mercado de dispositivos implantáveis. Em geral, são destinados a substituir os tecidos originais e permanecer no corpo de maneira definitiva devido, também, a sua alta estabilidade no ambiente biológico (DARGUSCH et al., 2019).

Entretanto, algumas aplicações clínicas específicas como uma fratura óssea ou bloqueio de vasos sanguíneos, por exemplo, requerem apenas suporte temporário para o processo de cicatrização do tecido. Nestes casos, o uso de biomateriais que permanecem no corpo como um objeto estranho pode causar efeitos negativos diversos ao longo do tempo, tais como *stress-shielding*, enfraquecimento do osso, irritação prolongada, trombose, inflamação crônica, distorção de imagens de diagnóstico e ainda, uma segunda cirurgia para remover o implante que envolve riscos significativos e custos financeiros adicionais (LI; ZHENG; QIN, 2014) (HAN et al, 2018).

Como alternativa, em busca de melhor desempenho clínico, implantes a partir de biomateriais que são biodegradáveis têm sido desenvolvidos. Esses biomateriais permitem que o implante se degrade progressivamente após servir ao seu objetivo. Esta biodegradação elimina o risco de complicações associadas a um implante permanente mencionadas anteriormente (DARGUSCH et al., 2019).

Os biomateriais metálicos biodegradáveis são definidos por Zheng, Gu e Witte (2014) como aqueles que corroem gradualmente *in vivo*, com uma resposta apropriada do hospedeiro induzida pela liberação de produtos de corrosão, e dissolvem-se completamente após a cicatrização do tecido, sem nenhum resíduo. O principal componente de um metal biodegradável dever ser um elemento metálico essencial, que possa ser metabolizado pelo corpo humano e com taxa de degradação adequada.

Neste contexto, ligas a base de magnésio, ferro e zinco estão entre os sistemas metálicos biodegradáveis de reconhecido potencial para aplicações biomédicas, pois são elementos não tóxicos, que exibem comportamento de degradação e possuem vias de processamento conhecidas pelo corpo humano, além de superior biocompatibilidade e propriedades mecânicas apropriadas (KIANI; WEN; LI, 2020) (DARGUSCH et al., 2019). Contudo, nos últimos anos, estudos sobre o desenvolvimento de uma nova classe de metais biodegradáveis estão predominantemente concentrados em magnésio, ferro, e suas ligas, que têm demonstrado resultados promissores, alcançando estágios de testes em animais e clínicos nas áreas de ortopedia e cardiologia (DARGUSCH et al., 2019) (GOREJOVÁ et al., 2019). A Tabela 1 apresenta as principais vantagens e desvantagens das ligas à base de ferro e de magnésio, permitindo uma comparação com os demais biomateriais metálicos utilizados.

Tabela 1 - Resumo das principais vantagens e deficiências dos biomateriais metálicos.

Biomateriais		Vantagens	Desvantagens
Ligas de ferro	Fe puro, Fe-Mn, Fe-Fe ₂ O ₃	Boas propriedades mecânicas, biocompatibilidade apropriada, vários métodos de processamento, biodegradáveis	Baixas taxas de degradação, ferromagnetismo
Ligas de magnésio	Mg puro, Mg-Zn, Mg-Zn-Ca	Excelente biocompatibilidade, biodegradável, propriedades mecânicas semelhantes com osso	Taxas de degradação muito rápidas, Liberação de hidrogênio
Ligas de titânio	Ti puro, Ti-6Al-4V	Boas propriedades mecânicas e resistência à corrosão, excelente biocompatibilidade e alta resistência específica	Não degradável, Toxicidade dos elementos
Aço inoxidável	316L	Excelente resistência à corrosão, altas propriedades mecânicas, biocompatibilidade apropriada	Toxicidade dos elementos, não degradável, módulo de elasticidade muito alto, baixa ductilidade
Ligas de cobalto	Co-Cr-Mo, Co-Cr-W-Ni	Excelente resistência ao desgaste, biocompatibilidade adequada, alta resistência à corrosão	Módulo de elasticidade muito alto, baixa ductilidade, toxicidade dos elementos, não degradável

Fonte: Adaptado de He et al. (2016).

Apesar de suas excelentes propriedades, o magnésio apresenta baixa resistência à corrosão, especialmente em ambientes eletrolíticos e aquosos com alto teor de cloreto, onde,

de maneira geral, sua degradação ocorre rapidamente, comprometendo a integridade mecânica/funcional do implante em um curto período de tempo, limitando sua aplicação (ELIAZ, 2019) (HU et al., 2018).

O ferro e suas ligas são particularmente atraentes do ponto de vista estrutural, uma vez que exibem propriedades mecânicas mais próximas as do aço inoxidável 316L comumente usado como padrão de referência para avaliar outras ligas destinadas a aplicações biomédicas. Estudos conduzidos recentemente apontam que esses materiais têm demonstrado grande êxito para aplicações em implantes biodegradáveis, especialmente como *stents* cardiovasculares (CONTI et al., 2018). Porém, sua taxa de degradação em meios fisiológicos é considerada muito baixa (HU et al., 2018).

Segundo Cheng et al. (2013), a taxa de degradação ideal para os metais biodegradáveis deve estar entre o magnésio e o ferro. Dessa forma, a fim de melhorar a biodegradabilidade do ferro, a adição de elementos de liga e o emprego de novas técnicas de processamento são dois aspectos principais que têm sido considerados em várias pesquisas nos últimos anos.

As ligas do sistema ferro-manganês têm sido amplamente discutidas a partir das investigações de Hermawan et al. (2010). Os autores reportaram a obtenção de propriedades mecânicas adequadas e uma taxa de degradação superior ao ferro puro, ajustável a partir da concentração de manganês. Por ser um elemento menos nobre, com potencial eletroquímico menor, a adição de manganês torna a matriz de ferro mais propensa à corrosão e aumenta sua taxa de degradação em meios fisiológicos (DEHESTANI et al., 2017). Estudos recentes concordam que a composição Fe-35Mn exibe a melhor combinação de propriedades para aplicação em *stents* cardiovasculares biodegradáveis, no entanto, sua taxa de degradação ainda é inferior as ligas de magnésio e considerada lenta para aplicação em implantes temporários (DARGUSCH et al., 2021).

Alcançar elevada taxa de degradação para as ligas de Fe-Mn ainda é um grande desafio, sendo limitante no emprego destas em aplicações biomédicas. Desta forma, além da adição de elementos de liga, o processamento pode ser usado para aumentar a biocompatibilidade e degradabilidade destes metais.

As discussões sobre o emprego de novas técnicas de processamento têm revelado uma abordagem eficaz para melhorar as propriedades mecânicas e também de corrosão em ligas metálicas biodegradáveis (MOSTAED et al., 2014). Assim sendo, esta pesquisa foi elaborada a partir do amadurecimento das atividades do grupo de pesquisa de Biomateriais, e visa aplicar os conceitos adquiridos ao longo dos anos no processamento de ligas biomédicas a base de titânio, para o desenvolvimento de ligas metálicas biodegradáveis à base de ferro.

A escolha da liga biodegradável Fe-35Mn surgiu a partir de estudo prévios e também de uma pesquisa realizada pelo grupo do Dr. Diego Mantovani (Université Laval/Canadá) com quem o grupo de Biomateriais realizou trabalho de colaboração. O pesquisador avaliou o desempenho da liga processada a partir de técnicas de metalurgia do pó, verificando parâmetros como, taxa de degradação, propriedades mecânicas, biocompatibilidade e resistência à corrosão.

Esta pesquisa se propôs a avaliar a liga de mesma composição nominal, porém empregando diferentes técnicas de processamento, ou seja, a fusão em forno a arco voltaico e rotas de processamento similares às aquelas desenvolvidas para as ligas de titânio.

2 OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo geral estabelecer uma nova rota de processamento em forno a arco voltaico para a liga metálica biodegradável Fe-35Mn visando à obtenção de novos materiais biomédicos para fabricação de implantes não permanentes.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção da liga Fe-35Mn em forno a arco voltaico;
- Caracterizar a microestrutura após cada etapa definida para o processamento – fusão, forjamento e tratamento térmico;
- Caracterizar o desempenho mecânico da liga após o processamento;
- Estimar o comportamento em degradação;
- Avaliar a citotoxicidade, adesão e proliferação celular por meio de estudos *in vitro*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOMATERIAIS

Para Zhang e Chen (2019), um biomaterial pode ser definido como um material de origem natural ou artificial destinado a interagir com sistemas biológicos a fim de substituir, aumentar ou regenerar qualquer tecido, órgão ou função do corpo. Dispositivos médicos fabricados a partir destes materiais, como implantes ortopédicos, odontológico, cardiovasculares entre outros, podem ser usados em diferentes áreas do corpo de acordo com a aplicação específica (NIINOMI, 2018).

Os primeiros registros de que os humanos têm usado materiais artificiais para reparar fraturas, tecidos e órgãos doentes datam de 4000 anos atrás, quando gregos e egípcios esculpiram e implantaram próteses em madeira e ossos de animais para a substituição de extremidades amputadas no corpo. A evolução da tecnologia que existe nos dias de hoje, acerca do desenvolvimento de biomateriais, aconteceu gradualmente ao longo dos séculos e está relacionada ao desenvolvimento da medicina moderna e dos materiais avançados (ELIAZ, 2019).

A melhoria na compreensão de doenças e condições crônicas anteriormente vistas como não tratáveis aliada aos avanços dos tratamentos clínicos têm levado ao aumento da expectativa de vida da população mundial, que embora mais envelhecida do que as gerações anteriores, está mais ativa e impõe demandas significativas no que se refere a intervenções cirúrgicas capazes de melhorar sua qualidade de vida. Como resultado disso, o uso dos biomateriais têm crescido exponencialmente nos últimos anos (HAN et al, 2018).

O progresso em diferentes áreas do conhecimento também tem contribuído para a ascensão dos biomateriais. Pesquisas buscando dispor de novos materiais ou mesmo a modificação dos já existentes, a fim de alcançar dispositivos médicos otimizados e melhorar a qualidade de vida dos pacientes, têm possibilitado a descoberta de materiais seguros e com propriedades atrativas para aplicações biomédicas (GOREJOVÁ et al., 2019).

Além dos materiais naturais, os sintéticos como metais, polímeros, cerâmicas e compósitos podem ser utilizados como biomateriais. Estes devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos hospedeiros, de modo a estimular uma resposta adequada dos mesmos, não causando nenhuma reação inflamatória trombogênica, tóxica ou alérgica. Tais propriedades caracterizam a biocompatibilidade (ELIAZ, 2019).

A biocompatibilidade é um requisito essencial para qualquer material destinado a

aplicação biomédica e está relacionada com as reações ocorridas devido à interface com o sistema biológico (ROY, 2020). De acordo com o tipo de reação que acarretam nas células com as quais entram em contato, os biomateriais podem ser classificados em bioinertes, bioativos e biodegradáveis (ZAOKARI; PERSAUD; IBRAHIM, 2020).

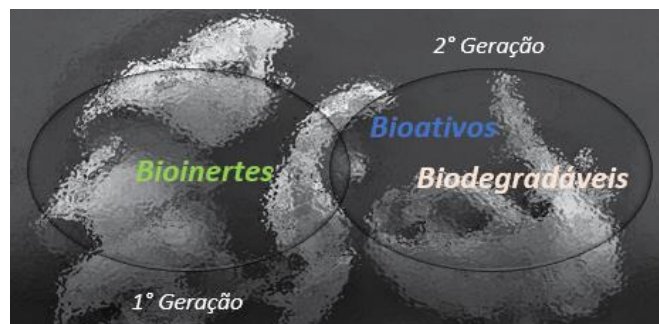
São considerados bioinertes aqueles que levam a formação de uma camada de tecido fibroso ao redor do implante, minimizando a resposta imunológica, mas impossibilitando a interação direta entre o tecido adjacente e o material. Titânio, tântalo, zircônio, alumina, polietileno, polipropileno e silicone são exemplos desta classe de biomateriais (AVERSA et al., 2016).

Os biomateriais classificados como bioativos têm a capacidade de interagir com o organismo, despertando o reconhecimento biológico e reações que favoreçam a adesão entre as partes. São exemplos, compostos a base de fosfato de cálcio e hidroxiapatita, vidro e vitro-cerâmicas (AVERSA et al., 2016).

Biomateriais que são degradados, fagocitados ou absorvidos pelo organismo após um período de tempo em contato com os tecidos hospedeiros são chamados biodegradáveis. Estes geram resíduos atóxicos e são degradados de forma concomitante com o reparo biológico. São exemplos de materiais biodegradáveis, poli (ϵ -caprolactona) (PCL), zinco, magnésio e ferro (AVERSA et al., 2016).

De acordo com Zaokari, Persaud e Ibrahim (2020) o desenvolvimento dos biomateriais pode ser dividido em duas gerações, representadas na Figura 2. Aqueles classificados como bioinertes integram a primeira geração dos biomateriais, enquanto os bioativos e biodegradáveis fazem parte de segunda geração, iniciada nos anos de 1980. É importante ressaltar que as gerações podem ser interpretadas de forma conceitual e não necessariamente cronológica, pois se referem à evolução nas propriedades dos materiais envolvidos.

Figura 2 – Evolução dos biomateriais.



Fonte: Autora

Nos últimos anos, os biomateriais da segunda geração têm se destacado devido a possibilidade de recuperação do tecido traumatizado através da atuação em metabolismos intra e extracelulares, responsáveis pela reprodução celular e propagação dos tecidos em crescimento. De modo especial, os materiais biodegradáveis têm recebido a atenção dos pesquisadores por sua capacidade de suportar temporariamente o processo de cicatrização e reconstrução de um tecido lesado, enquanto se degrada gradualmente no corpo. Os produtos desta degradação são compostos não alérgicos e não cancerígenos que podem ser facilmente excretados por processos biológicos naturais no ser humano (DEHESTANI et al., 2017).

3.1.1 Biomateriais biodegradáveis

O conceito de biodegradação é conhecido em aplicações médicas há muito tempo, com uso de suturas de polímero biodegradável (LI; ZHENG; QIN, 2014). No entanto, dispositivos como implantes que se degradam, podem ser considerados como uma recente inovação (LI; ZHENG; QIN, 2014).

A maioria dos implantes usados atualmente são projetados a partir de biomateriais bioinertes, destinados a substituir os tecidos originais e permanecer no corpo de maneira definitiva devido a sua alta resistência à corrosão e estabilidade no ambiente biológico (DARGUSCH et al., 2019). Entretanto, algumas aplicações clínicas específicas como uma fratura óssea ou bloqueio de vasos sanguíneos por exemplo, requerem apenas suporte temporário para o processo de cicatrização do tecido. Nestes casos, o uso de biomateriais bioinertes, que são permanentes, para cumprir a função de apoio temporário pode causar várias complicações ao longo do tempo, tais como *stress-shielding*, enfraquecimento do osso, irritação prolongada, trombose, inflamação crônica, distorção de imagens de diagnóstico e ainda, uma segunda cirurgia para remover o implante que envolve riscos significativos e custos financeiros adicionais (LI; ZHENG; QIN, 2014) (HAN et al, 2018).

Como alternativa, em busca de melhor desempenho clínico, implantes a partir de biomateriais que são biodegradáveis têm sido desenvolvidos. Esses biomateriais permitem que o implante se degrade progressivamente após servir ao seu objetivo. Esta biodegradação elimina o risco de complicações associadas a um implante permanente, mencionadas anteriormente (DARGUSCH et al., 2019).

Estudos realizados por Acklin, Michelitsch e Sommer (2016) mostraram que, em casos específicos, a remoção de implantes permanentes contribuiu em até 30% para o sucesso dos procedimentos eletivos analisados em ortopedia, assegurando assim, a viabilidade do emprego

de biomateriais biodegradáveis em implantes. Ainda, conforme Han et al. (2018), o uso de implantes biodegradáveis pode proporcionar a restauração temporária da função e também a completa cicatrização do tecido, enquanto o uso implante permanente irá restaurar a função mas não completamente o tecido, devido presença do próprio implante.

Os sistemas biodegradáveis oferecem grandes vantagens em aplicações específicas, como cardiovasculares, pediátricas e ortopédicas. No tratamento de doenças cardiovasculares, o conceito de biomateriais biodegradáveis em implantes foi introduzido a fim de atenuar ou evitar complicações isquêmicas pós-operatórias como trombose, inflamação crônica e reestenose (resposta exacerbada a injúria mecânica da parede do vaso, levando a uma formação excessiva de tecido em um segmento previamente tratado com stent) (FRANCIS et al., 2015).

Os benefícios de tais materiais quando relacionados a aplicações pediátricas estão associados a capacidade de se adaptar ao desenvolvimento das crianças, uma vez que o dispositivo implantado pode ser absorvido e não causaria nenhuma interferência ao crescimento do tecido e do paciente após a implantação (GOREJOVÁ et al., 2019).

Na ortopedia, os implantes biodegradáveis podem proporcionar suficiente integridade mecânica e permitir uma transferência gradual de carga para o osso em cicatrização conforme os materiais se degradam, reduzindo assim o fenômeno de *stress-shielding*, que consiste na redução das tensões atuantes no osso em razão da implantação e que pode levar gradativamente a atrofia óssea e perda da estabilidade do implante, e também fornecendo uma estrutura para a formação de novos tecidos antes de serem completamente substituídos por tecido natural saudável (GOREJOVÁ et al., 2019) (YEUNG; WONG, 2012).

Segundo Kiani, Wen e Li (2019) o período de cura de uma lesão vascular e fratura óssea consiste em três estágios principais, que se sobrepõem: inflamação, reparação e remodelação. No estágio inflamatório, as células do sistema imunológico dirigem-se para o local da lesão para remover o tecido danificado e liberam substâncias que atraem mais células imunológicas, aumentando o fluxo sanguíneo na área e fazendo com que mais líquidos entrem na área danificada. O estágio de reparação começa alguns dias após a lesão e é caracterizado pelo desenvolvimento dos novos tecidos substitutos. A remodelação é o estágio final, que para uma lesão vascular está relacionada a deposição de uma matriz extracelular e em uma fratura óssea envolve a deposição de cálcio no novo osso produzido (chamado calo), que passa a ficar mais rígido e forte.

Em uma recuperação vascular, a remodelação é normalmente finalizada em 90 a 120 dias, enquanto em uma fratura óssea pode levar de 4 a 24 semanas para ser concluída,

dependendo das características do paciente, localização, configuração e tipo de lesão. (KIANI; WEN; LI, 2019). Assim sendo, é essencial que qualquer material biodegradável para uso médico seja capaz de fornecer o suporte mecânico necessário e apoiar o processo de cicatrização até a cura da lesão, enquanto é lentamente degradado sem efeitos patofisiológicos e toxicológicos adversos (DEHESTANI et al., 2017).

Dehghan-Manshadi, StJohn e Dargusch (2019) apontam que os biomateriais ideais para aplicações em implantes temporários devem apresentar excelente biocompatibilidade, ser biodegradável, além de propriedade mecânicas adequadas, próximas aos tecidos naturais, para que possam ser inseridos com segurança no corpo humano.

Biomateriais biodegradáveis têm sido propostos a partir de materiais poliméricos, cerâmicos e metálicos (GOREJOVÁ et al., 2019). Polímeros sintéticos são os biomateriais biodegradáveis mais comuns disponíveis comercialmente, apresentam boa biocompatibilidade e excelente reabsorvibilidade, devido a decomposição estrutural e química causada pelo processo de hidrólise. Poli-L-ácido láctico (PLLA) e o poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) são, dentre estes, os mais estudados (DARGUSCH et al., 2019) (CONTI et al., 2018).

As cerâmicas biodegradáveis são compostas por materiais inorgânicos bioativos, que são capazes de interagir com os fluidos fisiológicos e se ligar ao osso por meio da formação de novas camadas de tecido ósseo. Isso leva a uma ampla biocompatibilidade desses materiais e o resultado implica na interação direta com o ambiente *in vivo*, onde são lentamente substituídas por células em crescimento. A hidroxiapatita (HA) e o beta fosfato tricálcico (β -TCP) são os biomateriais cerâmicos biodegradáveis mais importantes (CONTI et al., 2018).

Apesar de serem os primeiros biomateriais biodegradáveis desenvolvidos, tanto os polímeros quanto as cerâmicas exibem pobres propriedades mecânicas e taxas de degradação inadequadas, o que desafia a utilização destes, principalmente para a engenharia de tecidos duros. Por estas razões, pesquisadores têm apostado em metais biodegradáveis como uma alternativa promissora para uma série de aplicações biomédicas associadas aos ossos e vasos sanguíneos (DARGUSCH et al., 2019) (CONTI et al., 2018) (CHENG et al., 2013). Implantes fabricados a partir de biomateriais metálicos biodegradáveis são significativamente mais resistentes do que aqueles obtidos de biomateriais poliméricos ou cerâmicos, exibem boa biocompatibilidade e apropriadas taxas de degradação (HAN et al., 2018).

3.1.2 Biomateriais metálicos biodegradáveis

Atualmente, os aços inoxidáveis e ligas à base de cobalto-cromo e titânio são os biomateriais metálicos mais utilizados na área médica. Devido as suas superiores propriedades mecânicas, biocompatibilidade e resistência à corrosão, estes materiais já são usados comercialmente e ocupam uma posição dominante no mercado de dispositivos implantáveis. Entretanto, para aplicações temporárias, o fato de não serem biodegradáveis e permanecerem no corpo como um objeto estranho pode causar efeitos negativos diversos, como relatado anteriormente (HE et al., 2016).

Nos últimos anos, os biomateriais metálicos biodegradáveis têm emergido como uma opção frente aos tradicionais. Além de suas propriedades mecânicas atraentes e biocompatibilidade, a degradabilidade vem quebrando o paradigma do uso de biomateriais metálicos com elevada resistência à corrosão (ZHENG; GU; WITTE, 2014).

Os biomateriais metálicos biodegradáveis são definidos por Zheng, Gu e Witte (2014) como aqueles que corroem gradualmente *in vivo*, com uma resposta apropriada do hospedeiro induzida pela liberação de produtos de corrosão, e dissolvem-se completamente após a cicatrização do tecido, sem nenhum resíduo. O principal componente de um metal biodegradável deve ser um elemento metálico essencial, que possa ser metabolizado pelo corpo humano e com taxa de degradação adequada.

Sob a perspectiva da ciência dos materiais, os metais biodegradáveis podem ser classificados em metais puros, ligas biodegradáveis e matriz de compósitos (ZHENG et al., 2014).

A classe dos metais puros (*Biodegradable metals – Pure metal* - BM-PM) é constituída de metais formados por apenas um elemento metálico, com níveis de pureza mais baixos do que os limites de tolerância comercial. As taxas de corrosão dos metais biodegradáveis pertencentes a esta classe, são governadas, principalmente, pelos traços de impurezas incluídas.

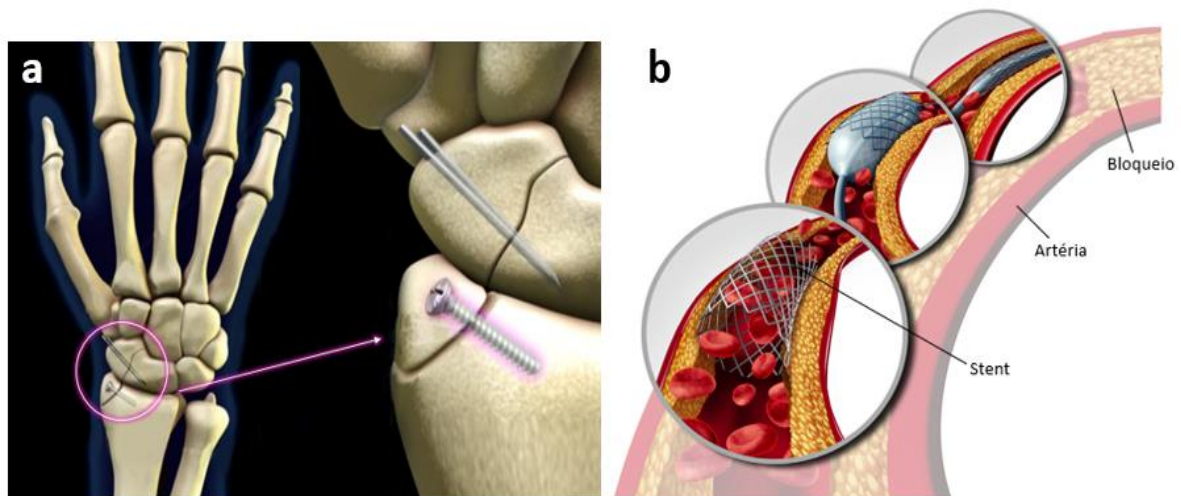
Já as ligas biodegradáveis (*Biodegradable metals - Biodegradable alloys* – BM-BA), englobam metais biodegradáveis com várias microestruturas, com um ou mais elementos de liga, onde suas quantidades devem ser controladas para evitar efeitos patofisiológicos e toxicológicos adversos. Este grupo abrange também os metais vítreos e metais monocristalinos.

Matriz de compósitos (*Biodegradable Metals - Matrix Composites* – BM-MC) requer que todos os componentes dentro dos compósitos formados sejam biodegradáveis, sendo que o componente que se apresenta em maior quantidade deve ser um metal biodegradável (ZHENG et al., 2014).

Kiani, Wen e Li (2020) apontam em seus estudos que entre as propriedades mecânicas fundamentais de um biomaterial metálico destacam-se o módulo de elasticidade, o limite de resistência à tração e a ductilidade. Da mesma forma, a resistência à fadiga é considerada um parâmetro chave na avaliação da eficácia mecânica, tendo em vista a possibilidade de falha prematura em níveis de tensões abaixo do esperado. Para os autores, é essencial que também os implantes metálicos biodegradáveis sejam capazes de suportar as condições de carga sem sofrer deformação permanente.

Sendo assim, devido à combinação de suas propriedades mecânicas, próximas dos biomateriais metálicos tradicionais (aços inoxidáveis e ligas à base de cobalto-cromo e titânio), os biomateriais metálicos biodegradáveis têm se mostrado interessantes para aplicação em dispositivos temporários de suporte de carga, como parafusos e placas de fixação óssea interna e também *stents* coronários, mostrados na Figura 3 (HERMAWAN; MANTOVANI, 2013).

Figura 3 – Dispositivos metálicos implantáveis para aplicação temporária (a) atuação de parafusos e pinos para fixação óssea e (b) esquema de implantação de um *stent* coronário.



Fonte: Adaptado de Mostaed et al., 2018 e Han et al., 2018.

Stent é um pequeno implante tubular expansível em forma de malha, cuja função é abrir um vaso arterial estreitado. Sua eficácia é comprovada no tratamento artérias coronárias. Os *stents*, atualmente, são fabricados a partir de materiais metálicos tradicionais (aço inoxidável 316L, ligas Co-Cr, Ti, Ni-Ti etc.), resistentes à corrosão e que são inseridos de maneira permanente. Contudo, após a implantação, o vaso passa pelo processo de remodelação que o permite encontrar um novo equilíbrio, tornando a presença do *stent* desnecessária.

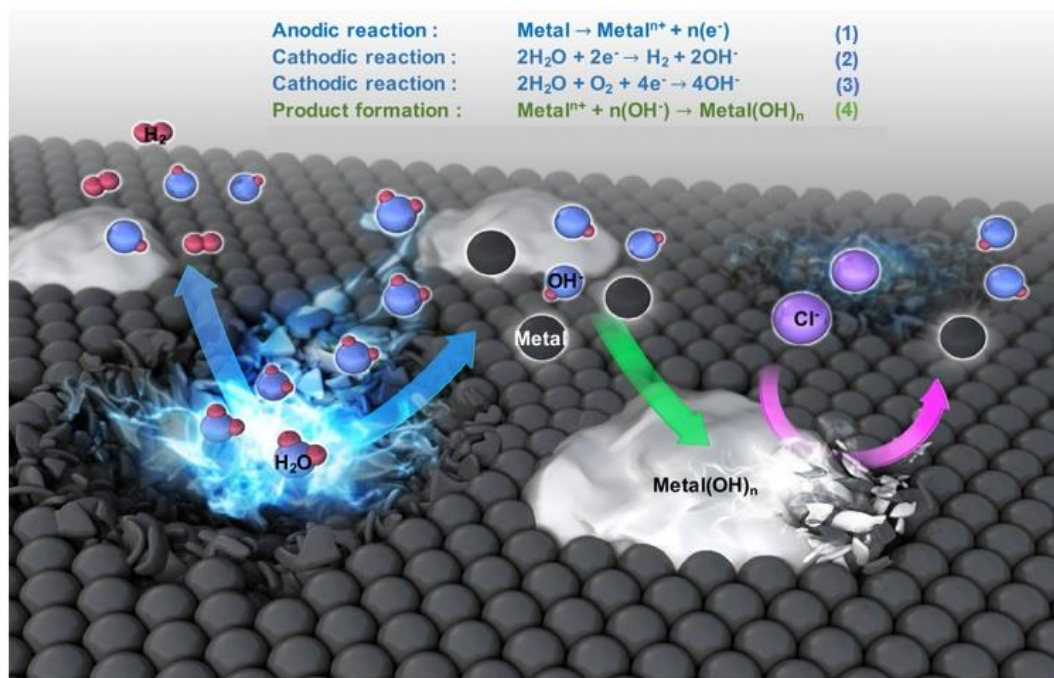
Placas, parafusos e pinos são usados na ortopedia para corrigir uma fratura. Geralmente, são inseridos por meio de intervenção cirúrgica que tem o objetivo de restituir a mobilidade do membro acometido. Estes dispositivos de fixação são originados por combinações de elementos metálicos, os quais se destacam por oferecerem excelente performance mecânica, como por exemplo, titânio e suas ligas. No entanto, muitos estudos relatam que a permanência destes após a consolidação óssea pode acarretar o efeito *stress-shielding* e também dor devido a sua localização subcutânea, sendo necessário, como consequência, a realização de um novo procedimento cirúrgico para retirada (VELIKOKHATNYI; KUMTA, 2018).

Assim, argumentos que indicam os benefícios de remover dispositivos implantáveis considerados de necessidade temporária, como os *stents*, pinos, placas e parafusos de fixação após a cicatrização, juntamente com a possibilidade de se evitar, de maneira segura, uma série de complicações anteriormente mencionadas, têm impulsionado o desenvolvimento de biomateriais metálicos capazes de interagir com o corpo humano, contribuir para a regeneração do tecido e se degradar ao longo do processo (HERMAWAN; MANTOVANI, 2013).

A degradação de metais biodegradáveis em meios fisiológicos acontece por meio de um processo corrosivo envolvendo a conversão do material metálico em um íon mais estável. A corrosão geralmente ocorre por uma reação eletroquímica com o eletrólito, e pode ser representada por de uma série de reações anódicas e catódicas apresentadas na Figura 4. Essas reações levam à liberação de gás de hidrogênio e produção de óxidos, hidróxidos e outros compostos, resultando na formação de uma camada protetora sobre a superfície (ZHENG; GU; WITTE, 2014) (HAN et al., 2018).

Imediatamente após entrar em contato com os fluidos corpóreos o metal é oxidado formando cátions metálicos, conforme descrito na equação (1). Os elétrons gerados são consumidos por reações catódicas, que dependendo do material metálico corresponde à equação de redução da água (2) ou à redução do oxigênio dissolvido (3). As reações ocorrem arbitrariamente sobre toda a superfície onde pares galvânicos se formam devido a diferença de potencial entre a matriz e as fases intermetálicas, ou contornos de grão. Simultaneamente, moléculas orgânicas (proteínas, aminoácidos e lipídios) são absorvidas pela superfície metálica influenciando na dissolução. Como produto da corrosão, forma-se sobre o metal uma camada de óxido/hidróxido metálico Metal(OH)_n (4) (ZHENG; GU; WITTE, 2014) (HAN et al., 2018).

Figura 4 – Mecanismo de biodegradação de metais.



Fonte: adaptado de Han et al. (2018).

Contudo, o meio fisiológico é extremamente agressivo, especialmente devido a elevada concentração de íons cloretos, que atacam a camada protetora de óxido/hidróxido levando a corrosão por pites. À medida que esse processo avança, cálcio e fosfato saturados no fluido corporal e a alcalinização localizada possibilitam a deposição de fosfato de cálcio na camada $\text{Metal}(\text{OH})_n$ não dissolvida, permitindo a adesão de células, que com o tempo, proliferam e originam os tecidos adjacentes. Enquanto isso, o metal biodegradável é corroído e se desprende da matriz na forma de partículas irregulares para ser liberado no meio circundante (ZHENG; GU; WITTE, 2014) (HAN et al., 2018).

Do ponto de vista da corrosão, o potencial padrão tem um efeito substancial na taxa de corrosão dos metais, pois fornecem uma maneira de comparar a relativa facilidade de diferentes elementos em perder elétrons para formar íons em soluções. Um elemento metálico tem maior tendência a perder elétrons e formar íons quanto mais negativo seu potencial padrão. Em outras palavras, o metal se degrada mais espontaneamente em solução aquosa quanto mais negativo se apresenta o valor do seu potencial padrão (CHENG et al., 2013) (ZHENG; GU; WITTE, 2014). A Tabela 2 apresenta as semirreações e os valores de potencial padrão de redução de alguns metais.

Tabela 2 – Potenciais padrão de redução em solução aquosa a 25 °C.

Semirreação	Potencial padrão (V)
$\text{Li}^+_{(\text{aq})} + \text{e}^- \rightarrow \text{Li}_{(\text{s})}$	- 3,04
$\text{K}^+_{(\text{aq})} + \text{e}^- \rightarrow \text{K}_{(\text{s})}$	- 2,93
$\text{Ba}^{2+}_{(\text{aq})} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Ba}_{(\text{s})}$	- 2,90
$\text{Sr}^{2+}_{(\text{aq})} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Sr}_{(\text{s})}$	- 2,89
$\text{Ca}^{2+}_{(\text{aq})} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Ca}_{(\text{s})}$	- 2,87
$\text{Na}^+_{(\text{aq})} + \text{e}^- \rightarrow \text{Na}_{(\text{s})}$	- 2,71
$\text{Mg}^{2+}_{(\text{aq})} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Mg}_{(\text{s})}$	- 2,37
$\text{Mn}^{2+}_{(\text{aq})} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Mn}_{(\text{s})}$	- 1,18
$\text{Zn}^{2+}_{(\text{aq})} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Zn}_{(\text{s})}$	- 0,76
$\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Fe}_{(\text{s})}$	- 0,44
$\text{Sn}^{2+}_{(\text{aq})} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Sn}_{(\text{s})}$	- 0,14

Fonte: adaptado de Zheng, Gu e Witte (2014).

Neste contexto, ligas a base de magnésio, ferro e zinco estão entre os sistemas metálicos biodegradáveis de reconhecido potencial para aplicações biomédicas, pois são elementos não tóxicos, que exibem comportamento de degradação e possuem vias de processamento conhecidas pelo corpo humano, além de superior biocompatibilidade e propriedades mecânicas apropriadas (KIANI; WEN; LI, 2020) (DARGUSCH et al., 2019). Entretanto, nos últimos anos, estudos sobre o desenvolvimento de uma nova classe de metais biodegradáveis estão predominantemente concentrados em magnésio, ferro, e suas ligas, que têm demonstrado resultados promissores, alcançando estágios de testes em animais e clínicos nas áreas de ortopedia e cardiologia (DARGUSCH et al., 2019) (GOREJOVÁ et al., 2019).

O magnésio é um mineral essencial e abundante no corpo humano. Ele atua em diversos órgãos e desempenha variadas funções que envolvem a metabolização da glicose e outros processos de produção de energia, formação da estrutura óssea e síntese de DNA e RNA (HAN et al., 2018) (HOU et al., 2016). A investidura em magnésio e suas ligas para obtenção de implantes é principalmente baseada em sua excelente biocompatibilidade, baixa densidade, alta resistência específica e módulo de elasticidade mais próximo do osso natural quando comparado aos demais biomateriais metálicos comumente usados, o que segundo diversos estudos é fundamental para evitar o fenômeno *stress-shielding* (HOU et al., 2016) (KIANI; WEN; LI, 2020). As propriedades mecânicas do magnésio e suas ligas podem ser observadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Resumo das propriedades mecânicas das ligas a base de Mg e Fe, comparadas ao aço 316 L e ao osso.

		Densidade (g/cm ³)	Módulo de elasticidade (GPa)	Limite de resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)
Ligas à base de Mg	Mg	1,74	41	86	13
	WE43	1,84	44	280	2
	AZ91	1,81	45	230	3
	AM60	1,80	45	220	6
Ligas à base de Fe	Fe	7,87	211	290	18
	Fe-35Mn	7,73	180	430	32
	Fe-10Mn-1Pd	7,86	60	1450	5
Osso	Osso cortical	1,99	10-30	70-150	0-8
Aço	316 L	8,00	190	490	40

Fonte: Adaptado de Hermawan, Dubé e Mantovani (2010).

Apesar disso, o magnésio apresenta baixa resistência à corrosão, evidenciada pelo seu potencial padrão muito negativo, especialmente em ambientes eletrolíticos e aquosos com alto teor de cloreto, onde, de maneira geral, sua degradação ocorre rapidamente, dentro de 2 a 3 meses após a implantação. Como consequência, significativa quantidade de gás hidrogênio é liberado excedendo o nível de saturação no local do implante, resultando na formação de cavidades de gás que podem causar necrose do tecido e resposta apoptótica nas células. Estudos têm mostrado que a presença de cavidades de gás perturba o equilíbrio dos parâmetros das células sanguíneas e ocasionou enfisema subcutâneo maciço em ratos testados, levando a uma diminuição da taxa de sobrevivência (HAN et al., 2018) (FRANCIS et al., 2015) (DARGUSCH et al., 2019) (VELIKOKHATNYI; KUMTA, 2018).

Durante o processo de corrosão, íons de magnésio liberados pelo implante são metabolizados, porém sua alta taxa de corrosão pode causar o acúmulo de subprodutos (íons e outras partículas de tamanho micron) no corpo humano, superando a concentração máxima no plasma sanguíneo (85-121 mg/l) que pode ser eliminada de forma inofensiva e eficiente na urina. Níveis séricos acima do tolerado, podem causar efeitos adversos como paralisia muscular, hipotensão, dificuldade respiratória e até parada cardíaca nos casos mais graves. Ademais, a degradação acelerada do magnésio compromete a integridade mecânica/funcional do implante em um curto período de tempo, limitando sua aplicação (ELIAZ, 2019) (HU et al., 2018).

No caso do ferro, estudos científicos de diversas áreas comprovam a importância desse elemento para a maioria dos organismos vivos. O ferro desempenha papéis significativos no metabolismo energético, na síntese de DNA e no transporte, ativação e armazenamento de

oxigênio molecular. Nos seres humanos, é utilizado principalmente para a síntese da hemoglobina nos eritroblastos, da mioglobina nos músculos e dos citocromos no fígado. A média de ferro no organismo de um indivíduo adulto é cerca de 3 a 5 g ou concentrações plasmáticas de 447 mg/l, sendo que aproximadamente 70% está na forma de hemoglobina, proteína responsável pelo transporte de oxigênio e coloração vermelha do sangue (ELIAZ, 2019).

Comparado com as ligas à base de magnésio, o ferro e suas ligas são particularmente mais atraentes do ponto de vista estrutural, uma vez que exibem propriedades mecânicas superiores e também mais próximas às do aço inoxidável 316L, comumente usadas como padrão de referência para avaliar outras ligas destinadas a aplicações biomédicas (HU et al., 2018) (DEHGHAN-MANSHADI; STJOHN; DARGUSCH, 2019). A Tabela 2 inclui informações acerca das propriedades mecânicas do ferro e suas ligas.

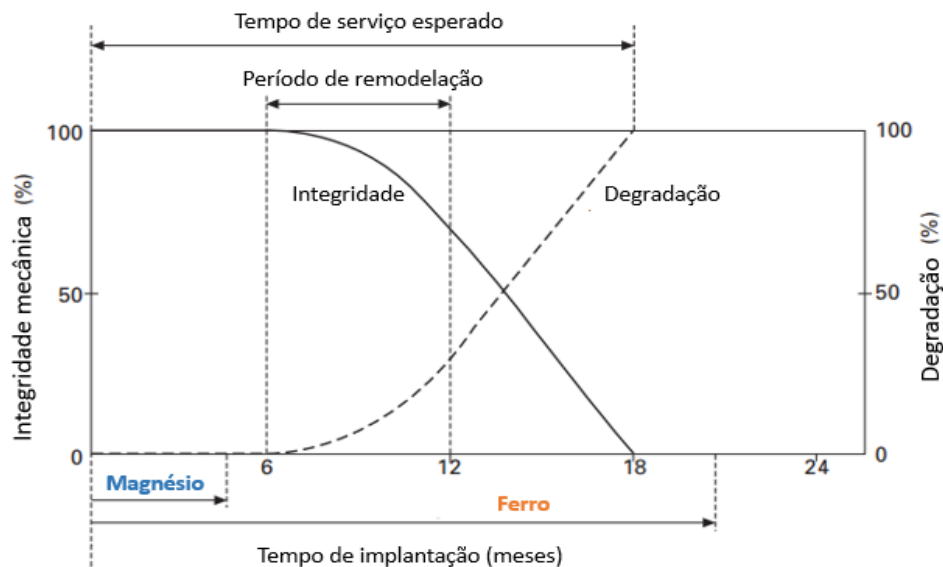
O processo corrosivo do ferro, diferente do magnésio, não gera o desprendimento de gás hidrogênio, porém sua taxa de degradação em meios fisiológicos é considerada muito baixa. Testes preliminares realizados em animais revelaram que, embora houvessem sinais aparentes de degradação, grande parte do ferro puro permaneceu intacta nos vasos sanguíneos mesmo 12 meses após a implantação. (GOREJOVÁ et al., 2019) (DARGUSCH et al., 2019). Diante desse cenário, Niinomi, Nakai e Hieda (2012) relatam em seus estudos que o uso de ferro em dispositivos implantáveis temporários pode provocar complicações semelhantes às aquelas encontradas em aplicações permanentes.

Bowen, Drelich e Goldman (2013) desenvolveram uma abordagem *in vivo* para avaliar a biodegradabilidade dos materiais candidatos a aplicações temporárias. No experimento, fios metálicos à base de magnésio e ferro foram implantados na aorta abdominal de ratos para simular uma haste de *stent*. Os autores observaram que o óxido superficial formado sobre os fios de magnésio após a exposição ao ar consiste principalmente de MgO (óxido de magnésio), e que este não apresenta estabilidade em soluções aquosas, permitindo a rápida corrosão do magnésio. Após a implantação, a degradação total ocorreu entre 1 e 3 meses. Ao contrário, os fios metálicos à base de ferro exibiram um óxido superficial denso e estável, que contribui para a resistência à corrosão do material no corpo, mantendo a taxa de degradação muito baixa após 12 meses.

Como mencionado anteriormente, um metal biodegradável ideal para aplicações biomédicas deve demonstrar um compromisso entre sua taxa de degradação e integridade mecânica com o tempo de recuperação no local do implante. A interação ideal entre a

degradação e integridade mecânica durante a implantação *in vivo* de um *stent* biodegradável pode ser observado na Figura 5.

Figura 5 – Representação esquemática da relação ideal entre degradação e integridade mecânica de um *stent* biodegradável. Os tempos para a completa degradação *in vivo* de *stents* a base de ferro e magnésio são mapeados na parte inferior.



Fonte: Adaptado de Hermawan, Dubé e Mantovani (2010).

De acordo com a Figura 5 e os trabalhos de Hu et al. (2018), a completa degradação de um biomaterial metálico usado para a fabricação de *stents*, deve ocorrer após a fase de remodelação do vaso, que normalmente leva de 6 a 12 meses. Nesse período, uma taxa de degradação muito baixa garante suporte mecânico suficiente para a cura da lesão. É considerado razoável para um *stent* ser totalmente degradado entre 12 e 24 meses após a implantação. Da mesma forma, os implantes ósseos devem ser mantidos por 6 a 18 meses, dependendo das condições clínicas (HE et al., 2016) (GOREJOVÁ et al., 2019).

A Figura 5 ainda, permite identificar os diferentes comportamentos apresentados por *stents* metálicos biodegradáveis. Dispositivos à base de magnésio se degradam completamente antes da fase de remodelação, enquanto aqueles de ferro continuam presentes e têm sua degradação total após este período.

Segundo Gorejová et al. (2019), a taxa de degradação adequada para dispositivos implantáveis biodegradáveis difere, dependendo principalmente, da aplicação clínica e do tempo de cicatrização do tecido em diferentes regiões do corpo. É considerado aceitável

menos de alguns anos até sua degradação total. Na Tabela 4 são apresentadas as taxas de corrosão das principais ligas de ferro e magnésio.

Tabela 4 - Comparação entre as taxas de degradação *in vitro* de ligas de Fe e Mg.

		Taxa de degradação <i>in vitro</i> (mm/ano)
Ligas à base de Mg	Mg	407
	WE43	1,35
	AZ91	10,39
	AM60	2,78
Ligas à base de Fe	Fe	0,23
	Fe-30Mn-6Si	0,30
	Fe-35Mn	0,44
	Fe-10Mn-1Pd	-

Fonte: adaptado de Bowen et al. (2016).

Apesar de suas excelentes propriedades mecânicas e biocompatibilidade, a taxa de degradação do magnésio e do ferro dificilmente podem atender aos requisitos para aplicações biomédicas. Como materiais biodegradáveis, a taxa de degradação do magnésio deve ser reduzida, enquanto a do ferro deve ser acelerada. Ou seja, a taxa de degradação ideal para metais deve situar-se entre magnésio e ferro puro (CHENG et al., 2013).

Outro problema relacionado ao uso de ferro em implantes temporários envolve sua natureza ferromagnética que causa incompatibilidade de geração de imagens usando técnicas magnéticas, como o exame de ressonância magnética, muito utilizado no diagnóstico de doenças cardíacas, ortopédicas, neurológicas e abdominais (DEHGHAN-MANSHADI; STJOHN; DARGUSCH, 2019).

Assim sendo, a fim de melhorar a biodegradabilidade do ferro e também suas propriedades não ferromagnéticas, uma seleção cuidadosa de elementos de liga em potencial como, tântalo, gálio, zinco, cromo, manganês, nióbio e zircônio tem sido extensivamente investigada (FRANCIS et al., 2015). Com o mesmo objetivo, várias pesquisas nos últimos anos têm adotado diferentes estratégias para viabilizar não somente o desenvolvimento de novos materiais à base de ferro, mas também diferentes processos de fabricação, tratamentos de superfície, microestruturas entre outros (DEHGHAN-MANSHADI; STJOHN; DARGUSCH, 2019).

3.2 LIGAS DE FE-MN

As ligas à base de ferro são de grande interesse na área biomédica. Estudos conduzidos recentemente apontam que esses materiais têm demonstrado grande êxito para aplicações em implantes biodegradáveis, especialmente como *stents* cardiovasculares (CONTI et al., 2018) (FRANCIS et al., 2015). Desde o trabalho pioneiro de Peuster et al. (2006) ao introduzir ferro puro como material de *stent*, as investigações têm revelado que o ferro e suas ligas têm propriedades mecânicas adequadas, bem como um comportamento de biodegradação uniforme e mais lento, comparado as ligas de magnésio (OBAYI et al., 2016).

Do ponto de vista mecânico, a viabilidade do emprego de ligas de ferro na fabricação de *stents* está associada à sua ductilidade e resistência, uma vez que possibilitam o uso de dispositivos cada vez mais finos e elevada deformação plástica durante o procedimento de implantação (HE et al., 2016).

Entretanto, a principal desvantagem do uso desses materiais está na sua baixa taxa de degradação. Ligas de ferro são consideradas uma alternativa se demonstrarem aumento da taxa de corrosão em comparação com o ferro puro quando expostas as condições fisiológicas (VELIKOKHATNYI; KUMTA, 2018).

Dentre todas as tentativas que têm sido amplamente discutidas para melhorar a biodegradabilidade do ferro, a adição de manganês parece uma solução promissora. O estudo precursor de Hermawan et al. (2010) deu início à numerosas investigações sobre as ligas do sistemas ferro-manganês (Fe-Mn). Os autores reportaram a obtenção de propriedades mecânicas similares ao aço inoxidável 316 L, convencionalmente usado na fabricação de *stents* permanentes, e uma taxa de degradação superior ao ferro puro, ajustável a partir da concentração de manganês.

Numa perspectiva biológica, o manganês é considerado um oligoelemento essencial para a função corporal de todos os mamíferos. Ele é necessário para muitas reações enzimáticas, funções cerebrais e nervosas, e desempenha um papel muito importante no crescimento, desenvolvimento e manutenção de ossos saudáveis. Sua superdosagem pode levar a intoxicação e neurotoxicidade, no entanto, devido a extensa ligação às proteínas plasmáticas que neutralizam o efeito de sua toxicidade, o excesso de manganês não é relatado como tóxico para o sistema cardiovascular. Além disso, considerando o baixo peso de um *stent*, entre 50 e 150 mg dependendo do projeto, a liberação de elemento de liga durante a degradação controlada deverá ser menor do que eventuais níveis tóxicos (HE et al., 2016) (DEHESTANI et al., 2017).

A adição de manganês na estrutura de um material a base ferro resulta no aumento da taxa de degradação. Por ser um elemento menos nobre, com potencial eletroquímico menor, o manganês torna a matriz de ferro mais propensa à corrosão e aumenta sua taxa de degradação em meios fisiológicos (DEHESTANI et al., 2017). O potencial padrão de redução para $\text{Mn} \rightarrow \text{Mn}^{2+} + 2\text{e}^-$ é $-1,18\text{V}$ e o potencial padrão de redução para $\text{Fe} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + 2\text{e}^-$ é $-0,44\text{V}$. Ferro e manganês formam uma solução sólida e apresentam um estado menos nobre onde os valores de potencial eletroquímico da liga diminuem com o aumento do teor de manganês (HE et al., 2016). Segundo Hermawan et al. (2010), a taxa média de degradação para a ligas do sistema ferro-manganês é aproximadamente $0,5 \text{ mm/ano}$, cerca de duas vezes maior que a taxa do ferro puro.

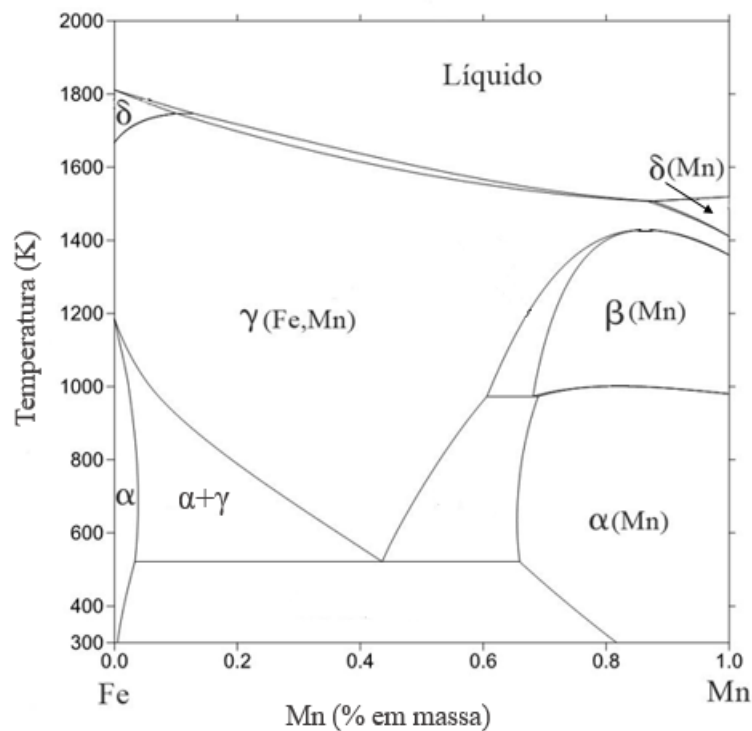
Além da taxa de degradação, vários autores trazem diferentes perspectivas sobre o mecanismo de corrosão das ligas Fe-Mn. Estas são geralmente conhecidas por se degradarem de maneira uniforme, sendo a corrosão iniciada nos contornos de grão devido a diferença de potencial que existe entre os grãos e seus contornos. O oposto ocorre com o ferro puro, onde os contornos de grão são mais resistentes à corrosão do que os grãos (CONTI et al., 2018). A corrosão uniforme sugere que uma possível falha prematura do implante pode ser evitada, tendo em vista que, enquanto este se degrada o suporte mecânico é parcialmente mantido e possibilita o processo de remodelação (GOREJOVÁ et al., 2019).

Hermawan et al. (2010) constataram uma degradação localizada em amostras da liga Fe-Mn em ambientes fisiológicos simulados. Corrosão intergranular, que ocorre preferencialmente nos contornos de grãos, mostrou-se mais evidente para algumas ligas do sistema. Os estudos de Nayak, Bismal e Sahoo (2020), apontam a corrosão por pites, na forma de cavidades sobre a superfície exposta, como principal mecanismo, resultante das espécies químicas reativas, como o cloreto, presente na solução de Hank.

Dargusch et al. (2019) relatam o papel positivo que o manganês desempenha nas propriedades mecânicas, de degradação e também magnéticas das ligas à base de ferro. O desenvolvimento de um comportamento antiferromagnético favorece a compatibilidade do material com técnicas de base magnética, como os exames de ressonância.

As propriedades citadas são fortemente governadas pelo teor de manganês presente na liga, assim como pelas fases constituintes e pela temperatura. A Figura 6 apresenta o diagrama de fases no equilíbrio termodinâmico do sistema Fe-Mn, mostrando a influência do manganês na existência de diferentes fases em temperaturas menores.

Figura 6 – Diagrama de fases do sistema Fe-Mn em equilíbrio.

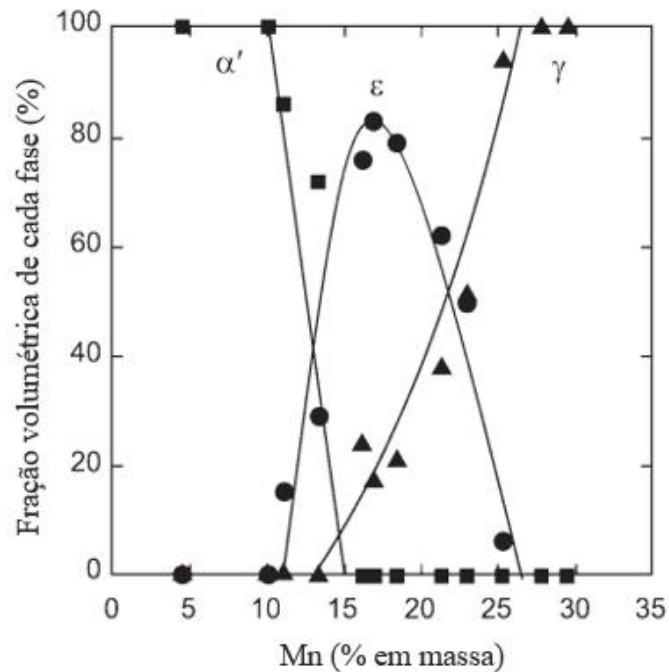


Fonte: Witusiewicz, Sommer e Mittemeijer (2004).

De maneira geral, a partir do diagrama é possível identificar áreas de estabilidade das fases austenita (γ - CFC), ferrita delta (δ - CCC) e ferrita alfa (α - CCC), como também as fases ricas em manganês, delta (δ - CCC), beta (β - Cúbica) e alfa (α - CCC). Devido ao seu efeito estabilizador, o aumento do teor de manganês expande significativamente o campo de fase austenita (γ). Em altas temperaturas, a formação de fase ferrita (δ) é suprimida pela adição de manganês em teores acima de 13% em massa, indicando uma solidificação completamente austenítica a partir deste ponto e com reduzida segregação de manganês, visto que a região de separação entre as fases líquido (L) e austenita (γ) é bastante estreita (SCHROEDER, 2015).

Em ligas metálicas de Fe-Mn, transformações adifusionais a partir de um estado austenítico podem levar a formação de fases fora do equilíbrio, chamadas metaestáveis. Estas, por sua vez, podem ser únicas ou uma combinação de austenita (γ - CFC), martensita hexagonal (ϵ - HCP) e martensita cúbica (α' - CCC) (DEHESTANI et al., 2017). A Figura 7 permite visualizar a fração volumétrica das fases metaestáveis em função da concentração de manganês presente nas ligas.

Figura 7 – Variação da fração volumétrica das fases presentes de acordo com o teor de manganês nas ligas de Fe-Mn fundidas.



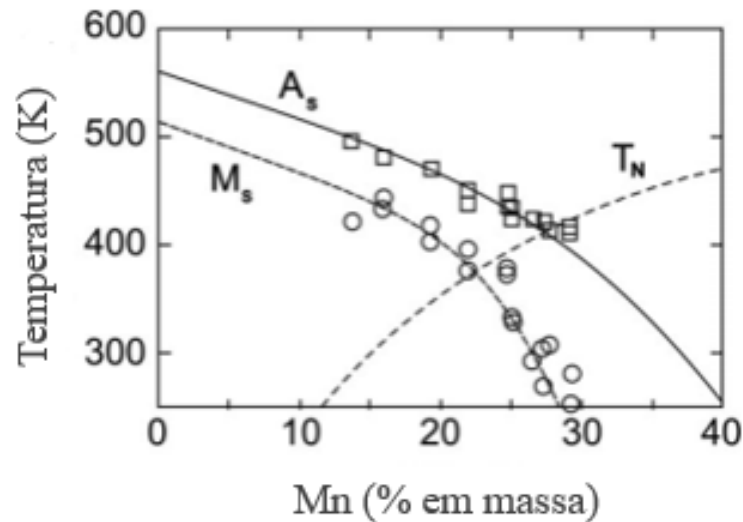
Fonte: Adaptado de Hermawan, Dubé e Mantovani (2010).

A faixa de composição entre aproximadamente 5 e 25% de Mn caracteriza um sistema multifásico, onde para teores mais baixos de manganês tem-se a predominância de martensita cúbica (α') e, para os mais elevados, martensita hexagonal (ϵ). Somente acima de 29% de Mn ocorre a formação de fase totalmente austenítica (γ) (SCHROEDER, 2015).

De acordo com os trabalhos de Hermawn, Dubé e Mantovani (2010), as ligas do sistema binário Fe-Mn que apresentam exclusivamente fases metaestáveis austenita (γ) e martensita (ϵ) são capazes de exibir propriedades antiferromagnéticas. Estas ligas, que compreendem um teor variável de manganês entre 20 e 35% em massa, têm sido avaliadas quanto ao seu potencial para aplicação em *stents* biodegradáveis.

Consequentemente, dentre as transformações de fase possíveis neste sistema, a transformação martensítica $\gamma \rightarrow \epsilon$ tem sido extensivamente estudada, tendo em vista seu potencial não magnético e sua forte influência em algumas propriedades importantes como dureza, densidade relativa e resistência mecânica. Esta transformação é atérmica por natureza e tem um efeito de fortalecimento na estrutura das ligas (DEHESTANI et al., 2017). Na Figura 8 é possível observar a faixa de temperatura em que ocorre o início da transformação martensítica para ligas com diferentes teores de manganês.

Figura 8 – Efeito da fração volumétrica de manganês nas temperaturas de transformação do sistema Fe-Mn: M_s ($\epsilon \rightarrow \gamma$ transformação no resfriamento), A_s (reverso $\gamma \rightarrow \epsilon$ transformação no aquecimento), T_N (ordem antiferromagnética ou temperatura Néel).



Fonte: Adaptado de Hermawan, Dubé e Mantovani (2010).

No diagrama da Figura 8 é possível identificar três temperaturas de transformação do sistema Fe-Mn, sendo M_s ($\gamma \rightarrow \epsilon$ transformação no resfriamento), A_s (reverso $\epsilon \rightarrow \gamma$ transformação no aquecimento) e T_N (ordem antiferromagnética ou temperatura Néel). A transformação $\gamma \rightarrow \epsilon$ é iniciada na temperatura inicial de transformação martensítica (M_s) e termina próximo a temperatura Néel (T_N). Ambas as temperaturas são diretamente influenciadas pela presença de manganês, ou seja, quanto maior a proporção do elemento de liga, maior será a temperatura de Néel (T_N) e menor a temperatura inicial de transformação martensítica (M_s). A transição paramagnética-antiferromagnética ocorre ao longo da T_N , abaixo desta temperatura o material torna-se antiferromagnético. Nessa região, a porção de fase austenita presente no sistema permanece estável. A transformação martensítica $\gamma \rightarrow \epsilon$ também pode ser influenciada pela deformação plástica, que aumenta consideravelmente os sítios de nucleação e a força motriz para a transformação durante o processo. A sensibilidade para esta transformação diminui à medida que o teor de manganês aumenta (HERMAWAN; DUBÉ; MANTOVANI, 2010). Em seus trabalhos, Hermawan et al. (2010) indicam ainda que todas as transformações de fases características do sistema, beneficiadas pela adição de manganês e ocorridas após o resfriamento ou deformação plástica, devem ser consideradas ao se projetar a estrutura de um *stent*.

Assim como o aumento do teor de manganês tende a inibir transformações martensíticas nas ligas de Fe-Mn, também pode estimular a estabilidade da fase austenita (γ) e consequentemente levar a diminuição da resistência e aumento na ductilidade do material. As propriedades de cada uma das fases constituintes do sistema estão associadas à sua estrutura cristalina que, considerando teores mais elevados de manganês, podem ser, respectivamente hexagonal compacta e cúbica de face centrada para as fases martensita (ϵ) e austenita (γ). Além das propriedades mecânicas, microestruturas austeníticas, como já mencionado, reduzem a suscetibilidade magnética e exibem superiores taxas de degradação quando comparadas ao ferro puro (DARGUSCH et al., 2019).

Diversos autores, atualmente, têm avaliado de maneira abrangente uma série de ligas dentro do sistema binário Fe-Mn (20 – 35% em massa de Mn) e concordam que a liga Fe-35Mn exibe a melhor combinação de propriedades mecânicas, magnéticas e de corrosão adequadas para aplicação em *stents* cardiovasculares biodegradáveis (DARGUSCH et al., 2021). A Tabela 5 detalha as principais propriedades mecânicas, magnéticas e de degradação para algumas ligas de Fe-Mn e permite a comparação destas com o aço inoxidável 316L.

Tabela 5 - Principais propriedades mecânicas, magnéticas e de degradação para ligas de Fe-Mn.

	Fase	Propriedades mecânicas			Magnética	Degradação
		Limite de resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Escoamento (MPa)	Susceptibilidade ($10^{-7}\text{m}^3/\text{kg}$)	Taxa (mm/ano)
Fe-20Mn	$\gamma + \epsilon$	702	7,5	421	1,9	1,3
Fe-25Mn	$\gamma + \epsilon$	723	4,8	361	1,9	1,1
Fe-30Mn	γ	518	19,0	239	1,9	0,7
Fe-35Mn	γ	428	32,0	230	1,8	0,4
Aço 316L	γ	490	40	190	5,2	-

Fonte: Hermawan et al. (2010).

De maneira geral as ligas de Fe-Mn exibem comportamentos antiferromagnéticos similares. O aumento do teor de manganês, reduz a suscetibilidade magnética ocasionando uma melhoria na compatibilidade com a imagem por ressonância magnética. Quando comparadas ao aço inoxidável 316L as ligas apresentem menor susceptibilidade, devido a magnetização de saturação mais baixa apresentada pela fase austenita (γ). Embora as ligas de Fe-Mn e o aço 316L possuam fase austenítica semelhante, seus elementos formadores são diferentes, sendo o manganês para as ligas Fe-Mn e o níquel para o aço 316L. A presença de

um elemento de liga como o manganês parece mais apropriado do que o níquel para uma liga à base de ferro destinada a implantes, uma vez que o primeiro é considerado essencial para o corpo humano e o último classificado como tóxico e cancerígeno (DARGUSCH et al., 2019).

As propriedades mecânicas demonstram que o manganês promove a diminuição da resistência máxima e aumento da ductilidade das ligas do sistema Fe-Mn. Devido a predominância de fase austenita (γ), menos densa e resistente do que a fase martensita (ϵ), a liga Fe-35Mn apresenta o melhor desempenho diante da deformação plástica, com o maior alongamento observado entre as ligas do sistema, além de parâmetros mecânicos mais próximo ao aço 316L que atualmente é usado na produção de *stents* (HERMAWAN et al., 2010). Para Dehghan-Manshadi, Stjohn e Dargusch (2019), valores razoáveis de alongamento juntamente com adequada resistência e módulo, sugerem que a liga contendo 35% Mn pode ser forte candidata a futuras aplicações biomédicas.

As ligas de Fe-Mn apresentam maiores taxas de degradação em comparação com o ferro puro. Em seus experimentos, Hermawan et al. (2010), indicam que a corrosão é progressivamente mais profunda e ampla no volume do material em função do tempo de degradação e isso pode estar relacionado à composição bifásica de algumas ligas do sistema. A coexistência das fases austenita (γ) e martensita (ϵ) favorecem o aparecimento de sítios micro galvânicos suscetíveis à iniciação de corrosão, levando a um aumento mais evidente da taxa de degradação em comparação com as ligas de fase única. Porém, a presença simultânea destas fases pode favorecer também a corrosão intergranular, que ataca preferencialmente os contornos de grãos, levando a uma degradação localizada e a falha prematura do implante. No desenvolvimento de materiais biodegradáveis, estudos de degradação investigam o mecanismo e a taxa de decomposição, deste modo, a liga monofásica Fe-35Mn embora não apresente a maior taxa de degradação do sistema, permite com seu mecanismo de corrosão atuante, apropriado desempenho.

Portanto, baseado no seu conjunto de propriedades mecânicas, magnéticas, de degradação e outras, a liga experimental Fe-35Mn apresenta características adequadas e relevante potencial para aplicação em dispositivos médicos (HERMAWAN et al., 2008).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Uma representação esquemática da metodologia empregada no desenvolvimento desta pesquisa é apresentada na Figura 9.

Figura 9 – Fluxograma da metodologia aplicada neste trabalho.



Fonte: Autora.

4.1 PROCESSAMENTO DA LIGA FE-35MN

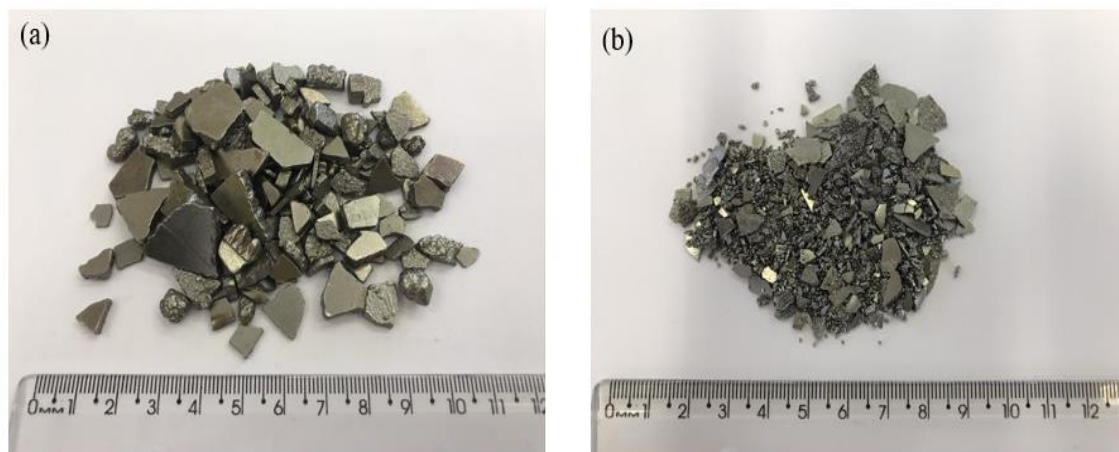
A rota de processamento empregada foi elaborada a partir da experiência adquirida ao longo dos anos pelo grupo de Biomateriais no processamento de ligas biomédicas à base de titânio (CAROBOLANTE, 2021; PEREIRA JÚNIOR, 2019). Algumas adaptações quanto aos tratamento térmicos e forjamento foram realizadas para o desenvolvimento de ligas biodegradáveis.

Para a obtenção da liga Fe-35Mn foram utilizados elementos precursores metálicos comercialmente puros, ferro (98% de pureza) e manganês (99% de pureza). Antes da imediata fusão da liga, o manganês metálico de partida foi submetido a uma decapagem química para

remoção de impurezas superficiais. O metal foi imerso em uma solução composta por 21 ml HF, 64 ml HCL, 106 ml HNO₃ e 160 ml H₂O durante aproximadamente 15 segundos, enxaguado com acetona e seco. A Figura 10 permite observar o aspecto superficial dos elementos metálicos utilizados no preparo da liga.

Os metais foram pesados em balança analítica para a obtenção de botões de 30g com estequiometria de Fe-35%p. Mn. No entanto, observada a perda de Mn durante o processo de fusão em testes anteriores, devido à sua alta pressão de vapor, para garantir a composição quantitativa da liga houve um acréscimo de aproximadamente 5% em massa na quantidade deste elemento.

Figura 10 – Metais utilizados para o preparo da liga Fe-35Mn: (a) ferro e (b) manganês.

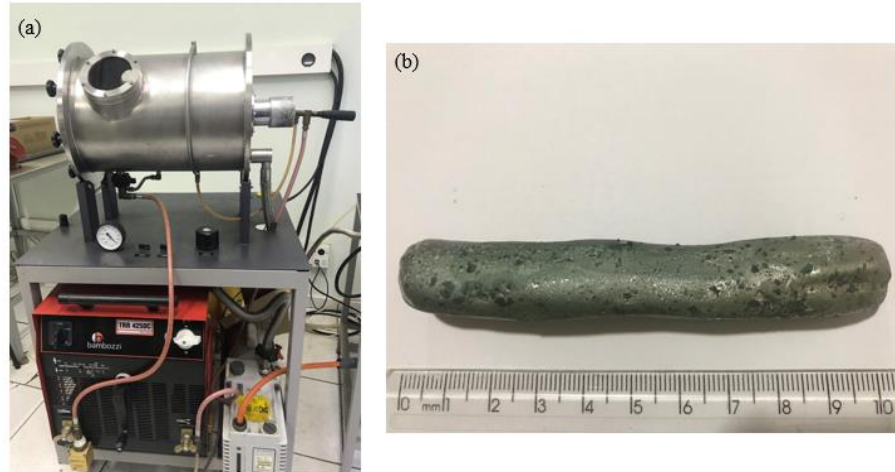


Fonte: Autora.

A fusão foi realizada em forno a arco voltaico com atmosfera inerte (gás argônio) e cadinho de cobre refrigerado, onde os materiais previamente preparados foram depositados de maneira que toda quantidade de Mn fosse envolvida pelo Fe. Após o fechamento do forno iniciou-se o procedimento de purga, comumente realizado para remoção de oxigênio do interior do forno evitando assim, possível oxidação do material. Neste, é alternado a injeção de gás argônio e realização de vácuo. Este procedimento foi repetido pelo menos 5 vezes.

Durante a fusão da liga, para garantir a homogeneidade da composição, os botões foram refundidos pelo menos 10 vezes. A Figura 11 apresenta o forno de fusão a arco voltaico e o lingote obtido após a união dos botões.

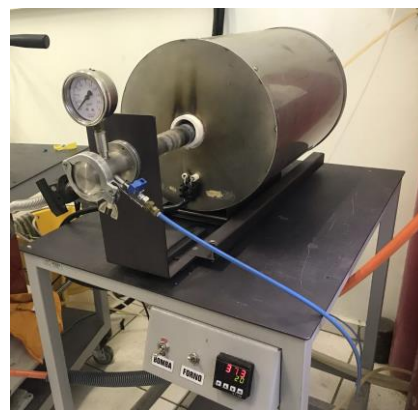
Figura 11 – (a) Forno de fusão a arco voltaico utilizado para fusão da liga Fe-35Mn e (b) Lingote obtido após a fusão.



Fonte: Autora.

Dando sequência ao processamento da liga, os lingotes foram submetidos ao tratamento térmico de homogeneização em forno tubular, como mostra a Figura 12, para eliminar as heterogeneidades do processo de solidificação. Os lingotes foram colocados em um cadinho de alumina e introduzidos em um tubo de quartzo dentro forno, para assim ser iniciado o processo de purga que antecede o tratamento. Feito isso, o material foi então aquecido a 1000 °C a uma taxa de 16,6 °C/min, mantido nesta temperatura por 1440 minutos (24 horas) e resfriado lentamente, dentro do forno, até a temperatura ambiente.

Figura 12 – Forno tubular utilizado para realização dos tratamentos térmicos.



Fonte: Autora.

Após a homogeneização, os lingotes foram forjados a quente no Departamento de Engenharia Mecânica do ITA - Instituto Tecnológico de Aeronáutica em São José dos Campos. Visando a obtenção de barras cilíndricas, como mostra a Figura 13, o forjamento a quente foi realizado em prensa rotativa alternando o aquecimento dos lingotes à 850 °C em forno resistivo e passes graduais com diversos martelos. Os lingotes foram alongados na sua direção axial e reduzidos na sua seção transversal até que o diâmetro de 10 mm fosse obtido, quando então, foram resfriados naturalmente ao ar.

Figura 13 – Barras cilíndricas da liga Fe-35Mn obtidas após o forjamento a quente.



Fonte: Autora.

Posteriormente, para alcançar a microestrutura austenítica, o tratamento térmico de solubilização foi realizado também em forno tubular mediante o aquecimento das barras forjadas à 1000 °C, com uma taxa de 16,3 °C/min, durante 180 minutos (3 horas). Após este tempo, o resfriamento rápido foi realizado em água.

4.2 CARACTERIZAÇÃO MICRO(ESTRUTURAL)

4.2.1 Ensaio de Fluorescência de raios X

A composição química da liga Fe-35Mn foi determinada por meio de Espectrometria de Fluorescência de Raios X (FRX). A análise quantitativa dos elementos químicos foi realizada no Laboratório de Caracterização Química do Departamento de Engenharia de Materiais –

EEL/USP, em um espectrômetro de FRX por comprimento de onda dispersivo Axios Max - PANalytical.

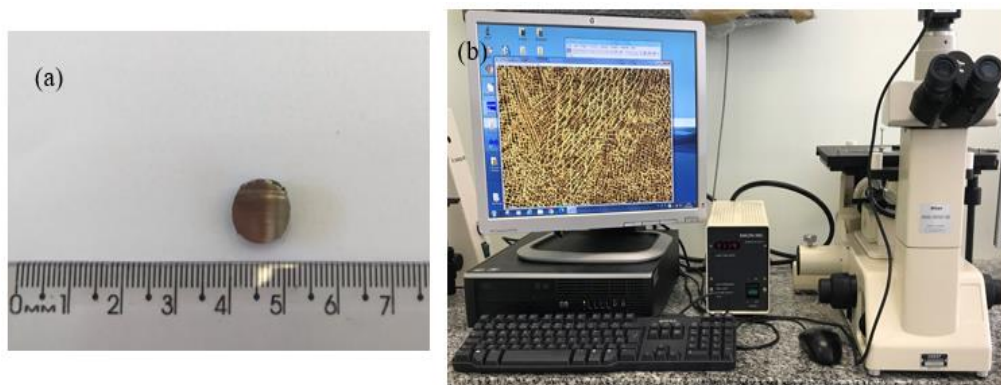
4.2.2 Microscopia óptica

As barras processadas da liga de Fe-35Mn foram seccionadas em discos com 3 mm de espessura (Figura 14 (a)), por meio da máquina de corte Isomet 4000 – Buehler, utilizando disco diamantado com velocidade de rotação e avanço controladas.

Na sequência, a preparação metalográfica das amostras foi realizada mediante lixamento úmido, polimento e ataque químico. Para o lixamento da superfície foram empregadas lixas d'água de carbeto de silício (SiC) com granulometria entre 100 e 1500 mesh. As amostras foram lixadas manualmente. Após o lixamento, as amostras foram limpas em banho ultrassônico com etanol durante 10 minutos e secas. O polimento foi realizado com pasta de diamante 0,25 μm e etanol. Quando finalizado, novamente as amostras foram limpas em banho ultrassônico e secas. Para revelar os contornos de grão, no ataque químico, as amostras foram imersas por cerca de 40 segundos em Nital 5% (5% em volume de ácido nítrico em etanol) e em seguida, lavadas em água corrente, etanol e por fim, secas.

A fim de analisar de maneira preliminar a morfologia das fases, as amostras foram levadas ao microscópio óptico de luz refletida Epiphot 200 - Nikon, Figura 14 (b), utilizando técnicas de campo claro e luz polarizada em ampliações variadas. Os tamanhos dos grãos foram medidos a partir das micrografias obtidas usando *software ImageJ*.

Figura 14 – (a) Amostras da liga Fe-35Mn com 3 mm de espessura e (b) Microscópio óptico Epiphot 200 – Nikon.



Fonte: Autora.

4.2.3 Difração de raios X

A identificação das fases constituintes da microestrutura foi realizada por meio da técnica de difração de raios X (DRX). A análise foi conduzida em um difratômetro D8 *advance* - Brucker, apresentado na Figura 15, utilizando radiação Cu-K α , com corrente de 25 mA, tensão de 40 kV, intervalo 2θ de medição de 20° a 100°, com passo de 0,02° e tempo de contagem de 0,35 segundos. Após a coleta, os dados foram refinados pelo método de Rietveld usando o *software Total Pattern Analysis Solution (TOPAS)* em sua versão acadêmica e a identificação das fases foi realizada com o auxílio do banco de dados ICSD (*Inorganic Crystal Structure Database*) e do *software Crystallographica Search-Match*.

Figura 15 – Difratômetro D8 *advance* – Brucker.



Fonte: Autora.

4.2.4 Calorimetria exploratória diferencial

Análise térmica via calorimetria exploratória diferencial foi realizada com o objetivo de investigar o comportamento térmico e as transformações de fases envolvidas no sistema em questão. Amostras com cerca de 80 mg da liga Fe-35Mn foram depositadas em cadinhos de alumina e submetidas a dois ciclos de aquecimento até 1000 °C e resfriamento, com taxa de 10 °C/min. Para as análises, foram utilizados cadinhos de alumina vazios como referência, fluxo de gás argônio no interior da câmara (100 ml/min) e um calorímetro STA 409 C –

NETZSCH, pertencente ao Laboratório de Metalurgia Física do Departamento de Manufatura e Materiais – FEM/Unicamp. Os dados foram convenientemente tratados e as curvas obtidas no *software OriginPro 2016 (OriginLab Corporation)*.

4.2.5 Ensaio de microdureza

Inicialmente, as propriedades mecânicas foram avaliadas por meio de medidas de microdureza Vickers. Os valores de microdureza foram obtidos de acordo com a norma ASTM E384 – 2017 em um microdurômetro 401 MVD - *Wilson Instruments*, apresentado na Figura 16. As medidas foram realizadas usando um indentador Vickers aplicado às amostras com uma carga de 1 kgf e tempo de permanência de 10 segundos. Uma média de pelo menos 10 medidas foi tomada para cada amostra.

Figura 16 - Microdurômetro 401 MVD - *Wilson Instruments*.



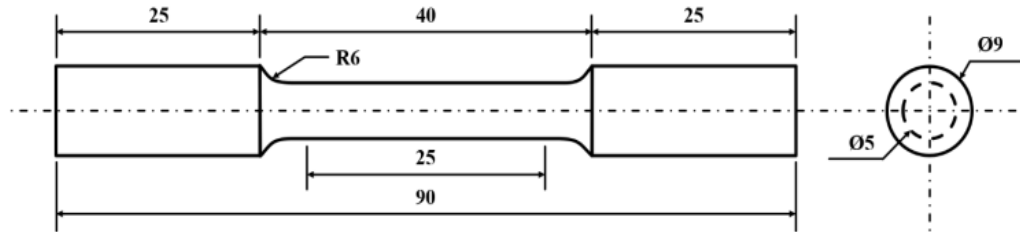
Fonte: Autora.

4.3 CARACTERIZAÇÃO MECÂNICA

4.3.1 Ensaio de resistência à tração

Corpos de prova padrão para a realização do ensaio de tração também foram cortados e usinados após o processamento da liga Fe-35Mn. O formato e as dimensões dos corpos de prova são apresentados no esquema da Figura 17.

Figura 17 – Forma e dimensões (mm) dos corpos de prova de tração.



Fonte: Autora.

O ensaio de tração foi conduzido de acordo com a norma ASTM E8M em uma máquina universal de ensaios 8801 – Instron, apresentada na Figura 18, equipada com extensômetro de comprimento nominal igual a 25 mm. Corpos de prova, previamente condicionados a temperatura ambiente, foram testados utilizando uma célula de carga de 50 kN a uma velocidade de 1 mm/min. O ensaio foi realizado em triplicata.

Figura 18 – Máquina universal de ensaios 8801 – Instron.

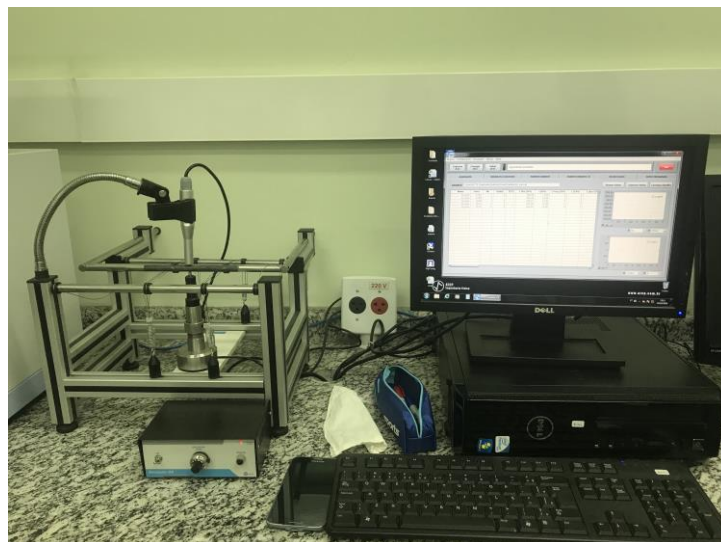


Fonte: Autora.

4.3.2 Técnica de excitação por impulso

O módulo de elasticidade da liga Fe-35Mn, após o processamento, foi obtido empregando a técnica de excitação por impulso, de acordo com a norma ASTM E1876. A técnica consiste em determinar o módulo de elasticidade com base na frequência de ressonância do material excitado por um curto impulso mecânico, seguido pela aquisição da resposta acústica por meio de um microfone. As medidas foram realizadas a temperatura ambiente, pelo modo flexional e utilizando o sistema Sonelastic – ATCP Engenharia Física, Figura 19. Corpos de prova com 10 mm de diâmetro e 100 mm de comprimento foram testados e o valor médio foi calculado a partir de cinco medidas realizadas.

Figura 19 - Sistema Sonelastic - ATCP Engenharia Física, utilizado na medida do módulo de elasticidade pela técnica de excitação por impulso.



Fonte: Autora.

4.4 ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO

4.4.1 Ensaio de resistência à corrosão

Medidas de potencial de circuito aberto e polarização potenciodinâmica foram usadas para avaliar o comportamento em corrosão da liga Fe-35Mn em solução salina balanceada de Hank (HBSS) H1387 – Sigma-Aldrich, cuja composição é apresentada na Tabela 6. A solução

eletrolítica foi preparada de acordo com as instruções do fabricante, em água deionizada a uma temperatura entre 15 e 20 °C. Bicarbonato de sódio foi adicionado à solução e hidróxido de sódio para ajustar o pH em 7,4.

Tabela 6 – Composição da solução de Hank.

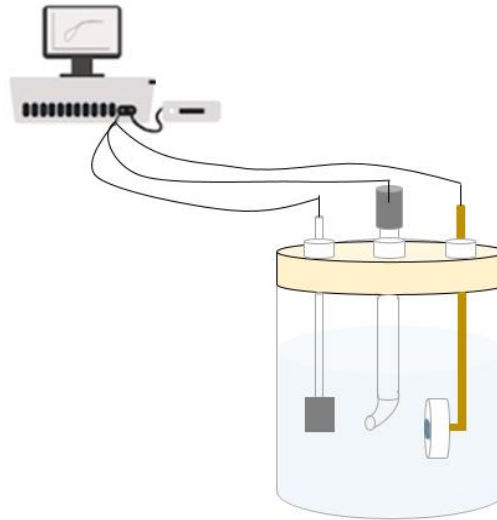
Componentes	Concentração (g/L)
Cloreto de cálcio	0,1396
Sulfato de magnésio	0,09767
Cloreto de potássio	0,4
Fosfato de potássio monobásico	0,06
Cloreto de sódio	8,0
Fosfato de sódio dibásico	0,04788
Glicose	1,0

Fonte: Autora.

Para o experimento, as amostras, constituídas por discos com 3 mm de espessura, foram embutidas em resina de polimerização a frio e submetidas ao lixamento úmido utilizando lixas d'água de carbeto de silício (SiC) com granulometria entre 100 e 1500 mesh, sem posterior polimento. Em seguida, foram lavadas em banho ultrassônico com etanol durante 10 minutos e secas.

Os testes foram realizados a 37 °C em uma célula convencional de três eletrodos (Figura 20), utilizando um eletrodo de platina como contra eletrodo, eletrodo de calomelano saturado (SCE) como eletrodo de referência e as amostras com 1 cm² de área exposta como eletrodo de trabalho. As medidas de potencial de circuito aberto (OCP) foram mantidas até 5400 s após as amostras serem imersas no eletrólito. Quando o OCP ficou estável, os testes de polarização potenciodinâmica foram iniciados. As curvas potenciodinâmicas foram registradas de - 0,3 V contra OCP a + 0,3 V com uma taxa de varredura de 1 mV/s. Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em triplicatas. O potencial de corrosão (E_{corr}) e a densidade da corrente de corrosão (I_{corr}) foram determinados a partir do método Tafel.

Figura 20 – Representação de uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos.



Fonte: Autora.

4.4.2 Ensaio de imersão estática

O comportamento em degradação foi determinado por meio do ensaio de imersão estática, realizado também em solução de Hank (Tabela 5) com pH 7,4 e de acordo com a norma ASTM G31-72.

Amostras com aproximadamente 3 mm de espessura e 10 mm de diâmetro tiveram todas as suas faces lixadas em lixas d'água de carbetto de silício (SiC) com granulometria entre 100 e 1500 mesh. Após, foram lavadas em banho ultrassônico com etanol durante 10 minutos, secas, medidas e pesadas. No ensaio, as amostras foram suspensas em 60 ml de solução, Figura 21 (a), e mantidas em banho maria a 37 °C durante 3, 10 e 30 dias. O ensaio foi realizado em triplicata, e os valores de pH foram monitorados diariamente, Figura 21 (b). Após cada intervalo, as amostras foram cuidadosamente enxaguadas com água deionizada, etanol e imediatamente secas.

Figura 21 – (a) Disposição das amostras e (b) Monitoramento do pH durante o ensaio de imersão estática.



Fonte: Autora.

Para a remoção dos produtos de corrosão da superfície das amostras, estas foram imersas por 10 minutos em uma solução de 500 ml de HCl, 3,5 g de hexametilenotetramina e água até completar um litro, conforme a norma ASTM G1-03. Após cada ciclo de limpeza, foram novamente enxaguadas com água deionizada e etanol, secas e pesadas para o cálculo da perda de massa. O procedimento foi repetido várias vezes até que uma estabilidade na perda de massa fosse alcançada.

A taxa de degradação da liga calculada através da equação 2.

$$TD = \frac{(8,76 \cdot 10^4) \times W}{A \times T \times D} \quad (2)$$

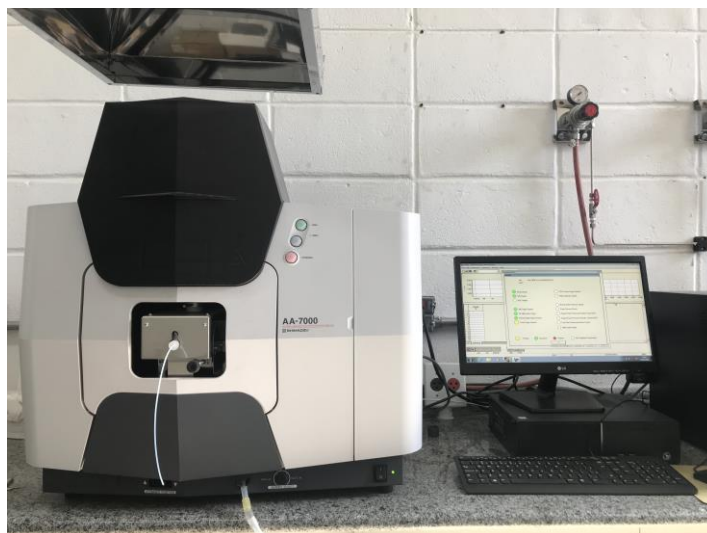
Onde, TD é a taxa de degradação em mm por ano, W é a perda de massa em g, A é a área exposta a solução em cm², T é o tempo de exposição em horas e D é a densidade da liga em g/cm³.

4.4.3 Espectroscopia de absorção atômica

A concentração de íons de Fe e Mn liberados na solução de Hank durante o ensaio de imersão estática foi determinada utilizando um espectrômetro de absorção atômica por chama AA7000 – Shimadzu, Figura 22. Amostras de solução após 3, 10 e 30 dias de imersão foram separadas, dissolvidas em ácido nítrico (HNO₃) e diluídas em água deionizada. A metodologia

empregada seguiu as orientações do manual do equipamento. As curvas padrão foram obtidas a partir de soluções padrão – SpecSol, de cada um dos elementos investigados. Lâmpadas de cátodo oco – Hamamatsu Photonic K.K, foram utilizadas nas medidas de absorbância.

Figura 22 – Espectrômetro de absorção atômica por chama AA 7000 – Shimadzu.



Fonte: Autora.

4.5 AVALIAÇÃO *IN VITRO*

Toda análise e caracterização *in vitro* foi realizado em parceria com o Prof. Dr. Joaquim Miguel Oliveira e o grupo de pesquisa I3B - Instituto de Investigação em Biomateriais, Biodegradáveis e Biomimética, da Universidade do Minho, Sede do Instituto Europeu de Excelência em Engenharia de Tecidos e Medicina Regenerativa, em Guimarães, Portugal.

Para avaliar a citotoxicidade da liga Fe-35Mn, foram utilizadas células da linhagem Saos-2 de osteossarcoma humano. Para isso, 200.000 células foram semeadas na superfície de cada amostra e mantidas em cultura por 14 dias a 37°C sob atmosfera umidificada de 5% v/v CO₂ em ar. O meio de cultura foi renovado duas vezes por semana. Nos dias 1, 3, 7 e 14 de cultura, a atividade metabólica, proliferação, diferenciação e morfologia das células foram analisadas. Amostras de Fe puro pertencentes ao grupo controle também foram avaliadas.

4.5.1 Microscopia eletrônica de varredura

Microscópio Eletrônico de Varredura de Alta Resolução Auriga Compact – Zeiss, com aceleração de voltagem de 5 kV, foi usado para analisar as amostras e observar a morfologia celular durante o período de cultura. Para esta análise, as amostras foram fixadas em formalina 10% reidratada com diferentes concentrações de etanol (50, 70, 90 e 100% v/v) por 15 min e colocados em hexametildissilazano – Sigma Aldrich durante a noite em temperatura ambiente para secar. Posteriormente, as amostras foram revestidas com platina (Pt) usando um revestidor EM ACE600 - *Leica Microsystems*. As superfícies das amostras foram analisadas semiquantitativamente por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) utilizando um espectrômetro - *Oxford Instruments* a 20,0 eV.

4.5.2 Espectrometria de Plasma Acoplado Indutivamente

A liberação de ferro (Fe) e manganês (Mn) das amostras utilizadas para o cultivo de células por até 14 dias foi avaliada por Espectrometria de Plasma Acoplado Indutivamente (ICP), em um espectrômetro Activa M - Horiba Jobin Yvon, usando um nebulizador Mira Mist - Burgener com 1000 W de potência. O meio de cultura foi coletado após o período de tempo (1, 3, 7 e 14 dias) e congelado a -80°C. Na preparação, 500 µL das amostras coletadas foram adicionadas a 9,5 ml de HNO₃ 5% e H₂O ultrapura, e depois filtradas com filtro de 0,45 µm – VWR. Soluções padrão de Fe (1.000 mg.L⁻¹, Specpure®) e Mn (1.000 mg.L⁻¹, Specpure®) foram usadas para preparar as soluções padrão diluídas.

4.5.3 Atividade metabólica celular

A atividade metabólica das células foi avaliada usando o reagente alamarBlue® - Bio-rad. Após cada período determinado, as células foram incubadas com 20% v/v do reagente em meio de cultura por 3 horas a 37°C. O sobrenadante foi então transferido para uma nova placa de 96 poços e as medições de fluorescência foram realizadas usando um leitor de microplacas Synergy HT – Biotek, a 530/20 nm (excitação) e 590/35 nm (emissão). O reagente AlamarBlue® no meio serviu como branco.

4.5.4 Coloração de actina F

A adesão e o espalhamento das células foram estudados através da coloração de actina F. As células foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato, PBS – Sigma Aldrich,

fixadas durante 20 minutos com formalina tamponada neutra 10% - ThermoFisher Scientific, e permeabilizadas com 0,1% v/v de Triton X-100 – Sigma Aldrich em PBS por 5 minutos. Em seguida, as células foram incubadas por 30 minutos com 1% de albumina de soro bovino, BSA – Sigma Aldrich em PBS para reduzir a coloração de fundo não específica. Finalmente, os filamentos de actina F foram corados com Alexa Fluor, 488 *Phalloidin* - *ThermoFisher Scientific*, 1:40, e os núcleos foram contra corados com 4,6-Diamidino-2-fenilindol, em solução de dilactato DAPI 300nM - *ThermoFisher Scientific*. As amostras foram analisadas em microscópio confocal TCS SP8 - *Leica Microsystems*.

4.5.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPad Prism 8. Inicialmente, o teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade dos dados. Os testes não paramétricos, o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, foram usados para analisar os resultados da atividade metabólica. O valor crítico de significância estatística foi $p < 0,05$. Os dados são citados como média $\pm$ erro padrão da média.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CARACTERIZAÇÃO MICRO(ESTRUTURAL)

Para o desenvolvimento desta pesquisa, obtenção da liga Fe-35Mn em forno a arco voltaico, foram utilizados elementos precursores metálicos comercialmente puros. Após o processamento, os lingotes obtidos tiveram sua composição química investigada por meio da técnica de fluorescência de raios X. O resultado da composição das amostras pode ser observado na Tabela 7.

Tabela 7 – Análise da liga Fe-35Mn por fluorescência de raios X, expresso em percentual em massa de compostos, normalizados a 100%.

Liga	Concentração				
	Mn	Si	Al	S	Fe
Fe-35Mn	35,18	0,15	0,08	0,07	Balanço

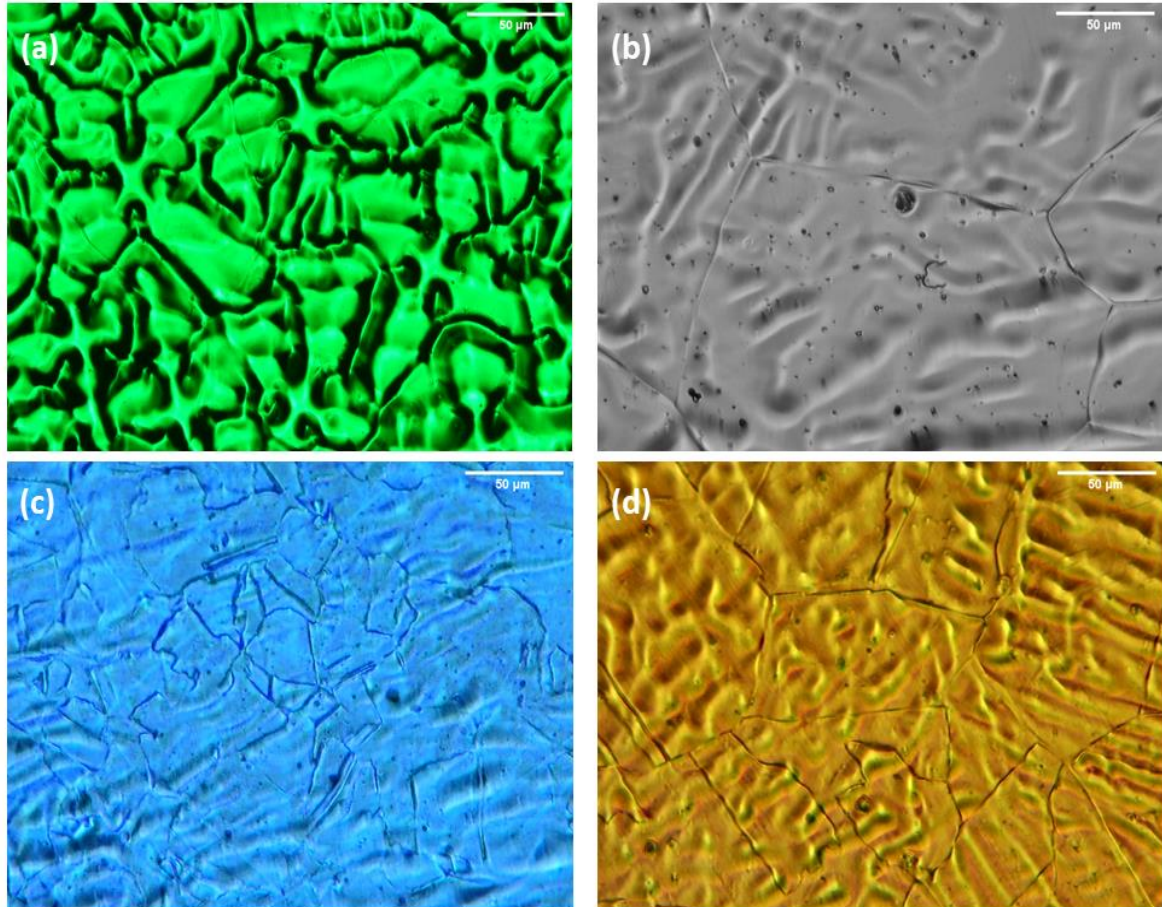
Fonte: Autora.

O resultado comprova a composição química da liga experimental e aponta a presença de outros elementos como Si, Al e S no sistema. Entretanto, em concentrações relativamente baixas não indicam a contaminação do metal e não influenciam na transformação martensítica. Essa transformação pode alterar as propriedades da liga, porém, seu efeito é diminuído à medida que teor de Mn aumenta (HERMAWAN; DUBÉ; MANTOVANI, 2010).

A avaliação da microestrutura e a investigação das fases presentes na liga foram realizadas após cada uma das etapas do processamento – fusão, homogeneização, forjamento e solubilização – e os resultados são apresentados nas Figuras 23 e 24.

As micrografias da Figura 23 ilustram a evolução da microestrutura da liga Fe-35Mn durante o processamento. Após a fusão, observa-se o crescimento dendrítico dos grãos resultante do resfriamento da liga dentro do forno, que conta com um sistema de refrigeração a base de água (Figura 23 (a)). Com o tratamento térmico de homogeneização a microestrutura passa a apresentar grãos equiaxiais com pequenas inclusões (Figura 23 (b)). A formação de maclas e bandas de deformação pode ser observada após o forjamento e a solubilização (Figura 23 (c) e (d)).

Figura 23 - Microscopia óptica da liga Fe-35Mn em diferentes condições. (a) bruta de fusão, (b) homogeneizada, (c) forjada a quente e (d) solubilizada.

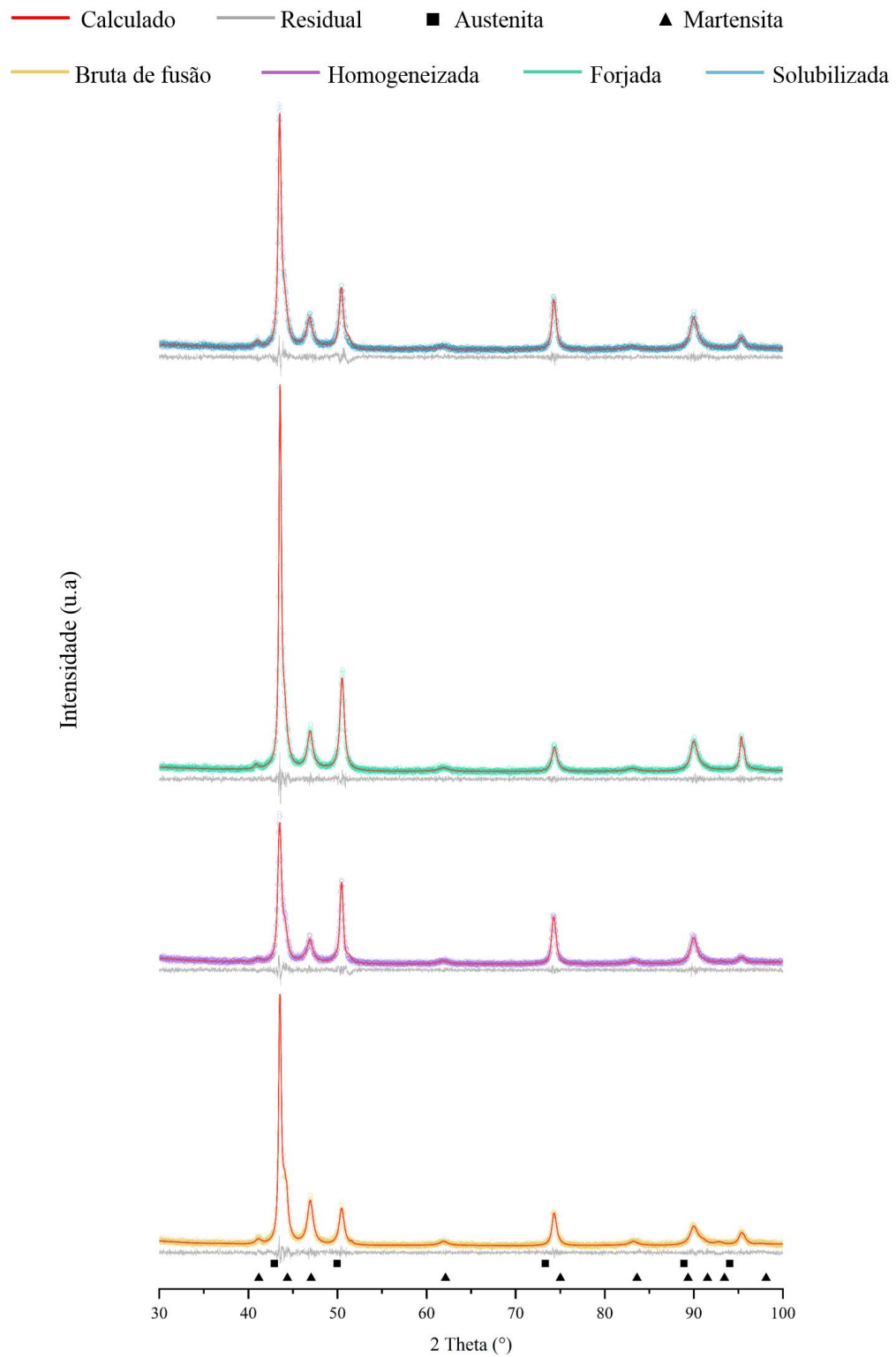


Fonte: Autora.

De acordo com Hermawan, Dubé e Mantovani (2010), o sistema Fe-Mn pode exibir diferentes microestruturas dependendo do grau de deformação plástica e do teor de Mn presente. A matriz que consiste de estruturas triangulares aponta a presença de fase austenita (γ) e martensita (ϵ), enquanto a ausência destas indica apenas fase austenita (γ). Na Figura 23 (d) é possível visualizar a microestrutura típica da liga Fe-35Mn, composta principalmente de grãos austeníticos, com tamanho médio de $102,38 \mu\text{m} \pm 46,69 \mu\text{m}$, distribuídos uniformemente após a rota de processamento estabelecida neste estudo.

Os padrões de difração de raios X apresentados na Figura 24, revelam que picos relativos às fases austenita (γ) e martensita (ϵ) foram encontrados durante o processamento da liga Fe-35Mn.

Figura 24 – Difratoograma da liga Fe-35Mn após cada etapa de processamento – Fusão, homogeneização, forjamento à quente e solubilização.



Fonte: Autora.

Segundo Nematia e Parsafar (2018), devido ao seu efeito estabilizador, o aumento do teor de manganês expande significativamente o campo de fase austenita (γ). As ligas do sistema que compreendem um teor de manganês acima de 29% exibem a formação de fase totalmente austenítica. No entanto, a presença inesperada de martensita (ϵ) também foi observada por outros autores que estudaram a liga Fe-35Mn, inclusive aquelas obtidas por metalurgia do pó. Para Zhang e Cao (2015), a existência desta fase sugere falta de homogeneidade local da composição, ou seja, algumas regiões podem ter uma composição inferior a 29% em massa de manganês e promover a formação da fase martensita (ϵ).

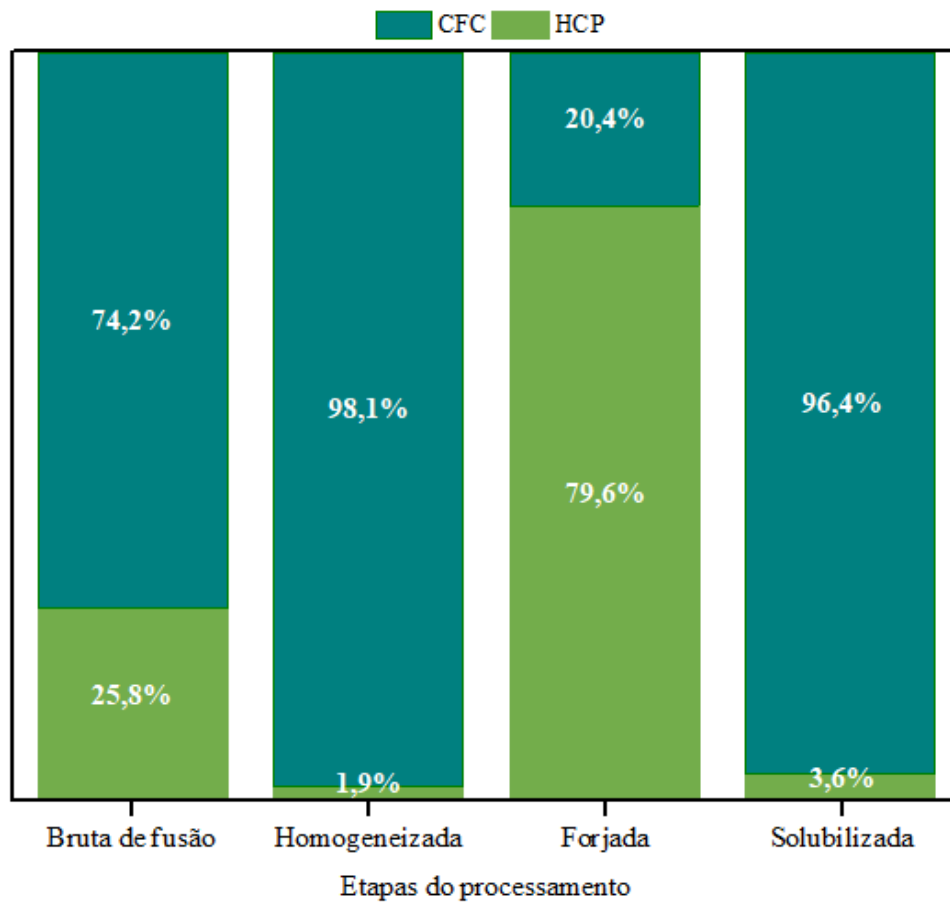
Liu et al. (2020) explica que o manganês é facilmente volatilizado em altas temperaturas. Sua pressão de vapor (aproximadamente 98 Pa) é significativamente maior do que o nível de vácuo dos fornos (5×10^{-3} Pa), fazendo com que a volatilização ocorra e forme sobre o material uma região de depleção de manganês, com concentração inferior (XU; HODGSON; CAO, 2016).

Analisando a intensidade dos picos, é possível perceber que após a homogeneização ocorre uma diminuição dos picos relativos a fase martensita (ϵ) e aumento daqueles relativos a fase austenita (γ), sugerindo uma transformação e maior homogeneidade da composição. Com o forjamento, picos de fase austenita (γ) foram reduzidos e tornaram-se novamente mais intensos após a solubilização. Segundo Dehestani et al. (2017), a formação de fase martensita (ϵ) nas ligas do sistema Fe-Mn também pode ser influenciada pela deformação plástica. A influência e a intensidade do pico aumentam com a diminuição do teor de manganês, entretanto, neste estudo, devido aos sucessivos passes de forjamento a presença de fase martensita (ϵ) foi detectada mesmo com 35% de manganês na composição.

Nas observações de Dargusch et al. (2019), a liga é composta principalmente de fase austenita (γ) com alguns picos menores atribuídos a fase martensita (ϵ) que podem ser negligenciados.

A análise quantitativa das fases foi obtida a partir dos dados de difração de raios X e através do refinamento pelo método Rietveld. Os resultados são apresentados na Figura 25, onde a estrutura cristalina cúbica de face centrada (CFC) corresponde a fase austenita (γ) e a estrutura hexagonal compacta (HCP) a fase martensita (ϵ).

Figura 25 – Análise quantitativa de fases através do refinamento Rietveld.



Fonte: Autora.

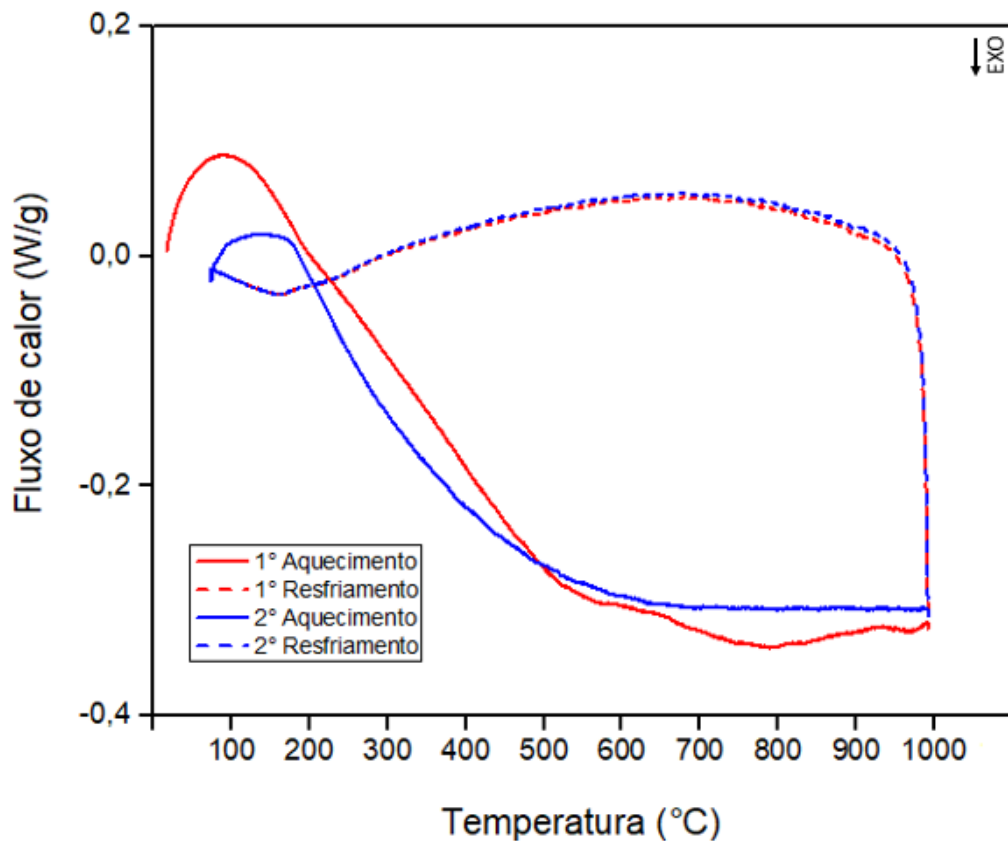
É possível notar mudanças significativas na quantidade das fases durante o processamento da liga Fe-35Mn. Inicialmente, após a fusão a liga apresenta cerca de 25,8% de fase martensita (HCP) em sua composição, justificada pela depleção de manganês anteriormente citada. Com o tratamento térmico de homogeneização possivelmente a homogeneidade da composição química foi corrigida, reestabelecendo o predomínio de fase austenita (CFC) e apenas 1,9% de fase martensita (HCP). Em seguida, o forjamento, que é um processo de deformação plástica, altera novamente a composição das fases favorecendo a transformação martensítica, elevando a fase martensita (HCP) para 79,6%. Por fim, o tratamento térmico de solubilização promove novamente a austenitização da liga, que é então formada com apenas 3,6% de fase martensita (HCP).

De acordo com Zhang e Cao (2015), a fase martensita (ϵ), assim como a fase austenita (γ), exibe comportamento antiferromagnético mostrando-se compatível com as técnicas de base magnética, como os exames de ressonância. Desta maneira, sua presença na liga Fe-

35Mn é benigna às propriedades magnéticas, importante requisito para um material biomédico.

A partir destes resultados, foi possível investigar as transformações de fase da liga em questão por meio de análise térmica, empregando a técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC), que permite observar eventos energéticos, como o rearranjo da estrutura cristalina, em função da variação da temperatura. Na Figura 26, as curvas de DSC obtidas para a liga Fe-35Mn ao final do processamento, com fase austenita (γ) retida a temperatura ambiente por meio de um resfriamento rápido, podem ser analisadas.

Figura 26 – Curvas correspondentes ao primeiro e segundo ciclos de aquecimento da investigação por calorimetria diferencial exploratória da liga Fe-35Mn.



Fonte: Autora.

As curvas apresentadas indicam que não houve transformação de fase em ambos os ciclos de aquecimento e resfriamento considerados. De acordo com os dados da literatura, a adição de alto teor de manganês ao ferro tende a diminuir a temperatura de transformação e ampliar a faixa de estabilidade da fase austenita (γ), o que pode ser notado pelos resultados de

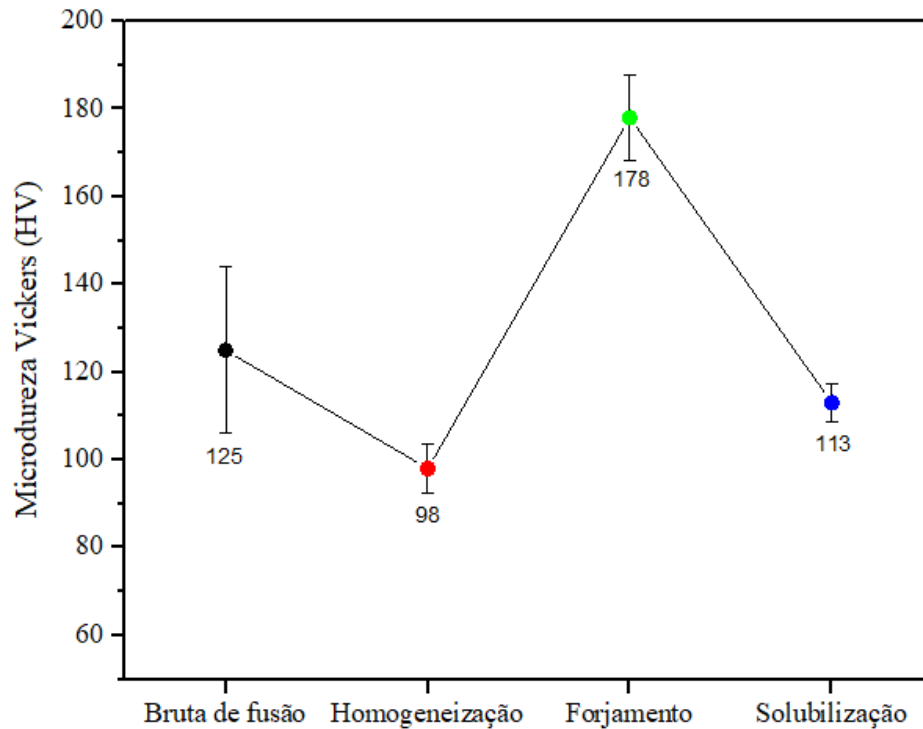
difratometria de raios X anteriormente apresentados, onde a fase austenita (γ) aparece em maior quantidade.

Witusiewicz, Sommer e Mittemeijer (2004) estudaram a variação da entalpia de formação das ligas γ -Fe-Mn em função do teor de Mn. Os autores concluíram que as transformações correspondem a variações endotérmicas e com elevados níveis energéticos. Ao analisar a curva de aquecimento referente ao primeiro ciclo, nota-se algumas transições exotérmicas mais nítidas e intensas entre as temperaturas de 500 e 1000 °C, que possivelmente indicam o alívio de tensões internas acumuladas ao final do processamento. Durante o resfriamento nenhuma alteração foi observada. No segundo ciclo, as curvas de aquecimento e resfriamento mantiveram-se também sem evidências de eventos térmicos.

As propriedades mecânicas do sistema Fe-Mn são fortemente influenciadas pela composição de fase. A fase austenita (γ), principal constituinte da liga Fe-35Mn, exibe grãos relativamente grandes que poderiam explicar sua superior ductilidade e baixa resistência (HERMAWAN; DUBÉ; MANTOVANI, 2010). Assim sendo, a avaliação da microdureza foi realizada após cada etapa do processamento a fim de verificar a influência das alterações microestruturais. Os valores encontrados podem ser visualizados na Figura 27.

Os valores de microdureza apresentaram variações durante o processamento da liga, no entanto, concordam com as mudanças inseridas na microestrutura em cada etapa. A fase martensita (ϵ) com estrutura HCP, que é mais dura e densa do que a fase austenita (γ) com estrutura FCC, é responsável pelo fortalecimento das ligas no sistema Fe-Mn (HERMAWAN; DUBÉ; MANTOVANI, 2010). Desta maneira, após as etapas de fusão e forjamento, onde houve um aumento da fração volumétrica de fase martensita (ϵ), verificam-se os maiores valores de microdureza. Com o tratamento térmico de homogeneização e solubilização os valores são relativamente menores, sendo 113 HV a microdureza obtida para o material.

Figura 27 – Microdureza Vickers da liga Fe-35Mn durante as etapas do processamento – Fusão, homogeneização, forjamento à quente e solubilização.



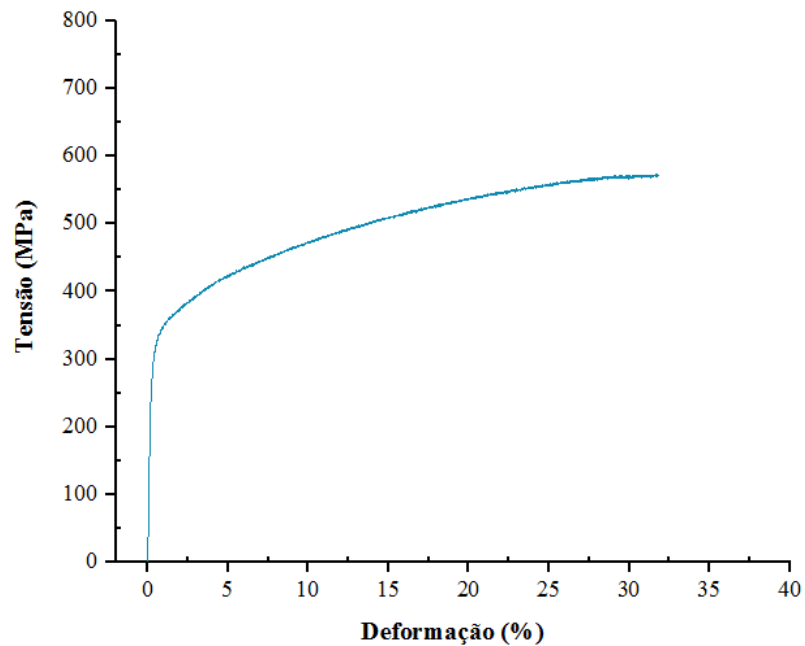
Fonte: Autora.

Comparado ao ferro comercialmente puro (185 HV), ao aço inoxidável 316L (195 HV) – considerado padrão de referência na fabricação de *stents* – e ainda a mesma composição de liga obtida por metalurgia do pó (143 HV), nota-se que houve uma redução no valor de microdureza da liga Fe-35Mn processada neste trabalho (113 HV), o que segundo Nayak, Biswal e Sahoo (2020) indica melhor desempenho para aplicação em implantes de aplicação temporária.

5.2 COMPORTAMENTO MECÂNICO

Além das medidas de microdureza, as propriedades mecânicas também foram estudadas por meio do ensaio de tração e excitação por impulso. A curva típicas de tensão-deformação em tração da liga Fe-35Mn após o processamento são apresentados na Figura 28, enquanto as respectivas propriedades obtidas através do ensaio são mostradas na Tabela 8, que permite a comparação desta com outras ligas metálicas consideradas para aplicações biomédicas.

Figura 28 – Curvas tensão-deformação média em tração da liga Fe-35Mn após o processamento.



Fonte: Autora.

Tabela 8 – Comparação entre as propriedades mecânicas da liga Fe-35Mn obtidas pelo ensaio de tração após o processamento e demais ligas metálicas para aplicações biomédicas.

Material	Tensão máxima (MPa)	Módulo de elasticidade (GPa)	Tensão limite de escoamento (MPa)	Deformação (%)
Fe-35Mn	$570 \pm 45,3$	$170,9 \pm 17$	$301 \pm 96,1$	$35 \pm 6,8$
Fe puro	210	200	150	40
Aço 316L	490	193	190	39
Fe-35Mn*	428	180	234	32

*Processada por metalurgia do pó.

Fonte: Adaptado de Hermawan, Dubé e Mantovani (2010).

Exceto pela deformação, os resultados do ensaio de tração mostraram que as propriedades mecânicas da liga estudada são superiores às do aço e do ferro puro, que apresentam, respectivamente, uma deformação de 39 e 40%, resistência máxima de 490 e 210

MPa, limite de escoamento de 190 e 150 MPa e um módulo de elasticidade de 193 e 200 GPa (HERMAWAN; DUBÉ; MANTOVANI, 2010) (HU et al., 2018). A redução observada do módulo de elasticidade da liga processada reforça seu potencial para aplicações biomédicas, uma vez que se aproxima mais do módulo de elasticidade do osso humano (10-30GPa) e o efeito *stress shielding* pode ser evitado.

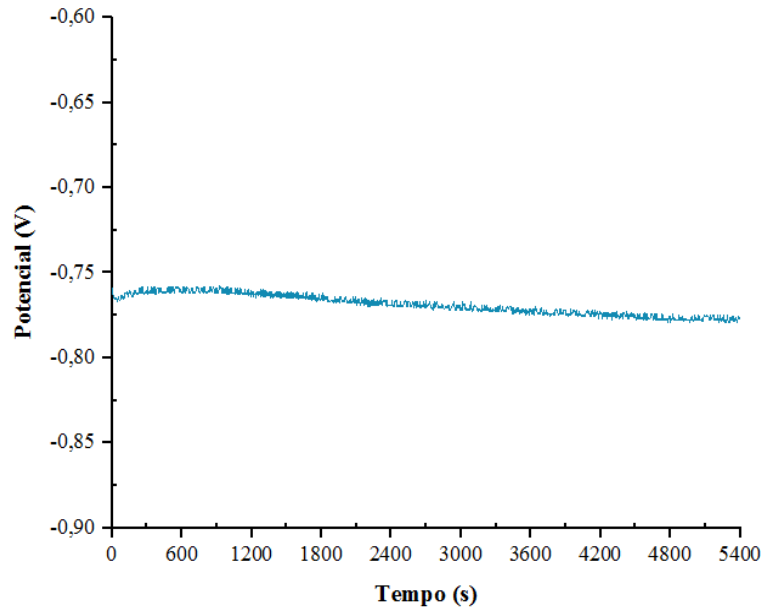
Comparando com a liga de mesma composição nominal produzida via metalurgia do pó, nota-se também um ganho de resistência mecânica. Embora esta exiba propriedades comparáveis ao aço inoxidável 316L, atualmente usado na maioria dos *stents* implantados, seus valores de tensão máxima (428 MPa), tensão limite de escoamento (234 MPa) e deformação (32%) estão abaixo do encontrado para liga Fe-35Mn processada neste estudo (HERMAWAN; DUBÉ; MANTOVANI, 2010).

A técnica de excitação por impulso foi empregada para confirmar o valor do módulo de elasticidade determinado a partir do ensaio de tração. Por ser uma técnica de simples execução, pode ser realizada em uma quantidade maior de corpos de prova e dessa maneira minimiza a perda de material e a ocorrência de desvios causados pelo processo de fabricação. Um valor médio de $176,98 \pm 3,20$ GPa foi encontrado para o módulo de elástico da liga experimental. Realizada a comparação com o valor obtido pelo ensaio de tração, é possível verificar que os valores foram similares, porém com um menor grau de dispersão entre as medidas.

5.3 ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO

A Figura 29 apresenta as medidas de potencial de circuito aberto em função do tempo de imersão para as amostras de Fe-35Mn em solução de Hank. Pode-se notar que as amostras exibiram um rápido aumento no potencial durante o período inicial de exposição, seguido de estabilização com algumas flutuações. O valor de OCP negativo das amostras de Fe-35Mn indica inferior estabilidade química da liga. Este comportamento pode ser atribuído à adição de Mn que reduz o potencial de eletrodo padrão do sistema e torna o filme passivo espontâneo mais instável termodinamicamente (LIU et al., 2018) (CHENG et al., 2013).

Figura 29 – Curva média de evolução do potencial de circuito aberto (OCP) de amostras da liga Fe-35Mn durante 5400 segundos de imersão em solução de Hank a 37°C.



Fonte: Autora.

As curvas de polarização potenciodinâmica da liga Fe-35Mn em solução de Hank, podem ser observadas na Figura 30. A média dos parâmetros relacionados à corrosão, como o potencial de corrosão e a densidade de corrente, determinados pelo método de extrapolação Tafel são apresentados na Tabela 9.

De acordo com Wang et al. (2017), a corrosão acontece com base no potencial (E_{corr}) em um sistema termodinâmico, onde maior potencial corresponde a superior resistência à corrosão, enquanto a taxa de corrosão é cineticamente medida pela densidade de corrente (I_{corr}), que quanto mais baixa indica menores taxas. Geralmente, menor potencial implica densidade de corrente de corrosão mais alta (CHENG et al., 2013).

As curvas demonstraram que todas as amostras analisadas exibiram comportamento de corrosão semelhante com ausência de passivação na região anódica. Os filmes de óxido tornaram-se instáveis e descontínuos no meio com o aumento do potencial, deixando o material mais propenso à corrosão (OBAYI et al., 2016).

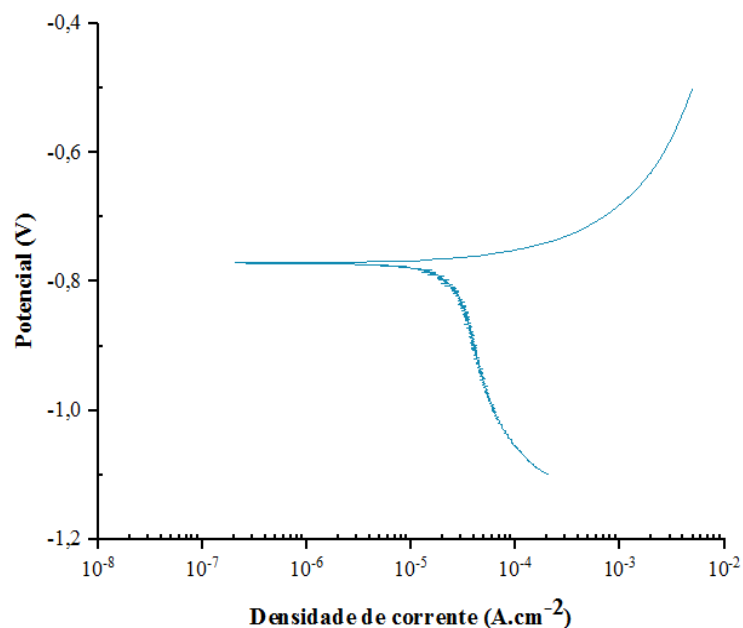
Dehestani et al. (2017) reportaram que a adição de manganês na estrutura de um material a base ferro resulta na diminuição da resistência à corrosão. Por ser um elemento menos nobre, com potencial eletroquímico menor, o manganês torna a matriz de ferro mais

propensa à corrosão em meios fisiológicos. Segundo Liu et al. (2018), mecanismos de corrosão galvânica, no qual um metal corrói preferencialmente a outro, podem ser introduzidos no sistema devido a diferença de potencial entre os elementos metálicos, aumentando também sua taxa de corrosão.

Os resultados obtidos neste estudo quando comparados aos apontados por Francis et al. (2015) para o aço 316L e principalmente para o ferro puro (Tabela 9), evidenciam que a adição de Mn causou menor estabilidade da liga em solução de Hank, levando a queda na resistência à corrosão. O aço apresenta potencial de -0,26 V e densidade de corrente de $0,454 \mu\text{A.cm}^{-2}$ e o ferro possui potencial de -0,38 V e densidade de corrente de $0,652 \mu\text{A.cm}^{-2}$, enquanto a liga Fe-35Mn apresentou potencial mais negativo de -0,77 V e alta densidade de corrente de $0,85 \mu\text{A.cm}^{-2}$. Estudos anteriores de Shuai et al. (2020) já demonstraram que um menor potencial de corrosão indica uma baixa resistência à corrosão da superfície e o aumento da densidade de corrente sugere uma taxa de corrosão melhorada.

Em comparação com os parâmetros de corrosão da liga Fe-35Mn obtida por metalurgia do pó estudada por Dargusch et al. (2019), observou-se uma pequena redução do potencial de corrosão de -0,74 V para -0,77 V, sugerindo maior susceptibilidade à corrosão. No entanto a densidade de corrente ainda permaneceu muito inferior, $0,85 \mu\text{A.cm}^{-2}$ contra $34 \mu\text{A.cm}^{-2}$ apresentado pelos autores, indicando menor taxa de corrosão.

Figura 30 – Curva média de polarização potenciodinâmica de amostras da liga Fe-35Mn em solução de Hank a 37°C.



Fonte: Autora.

Tabela 9 – Parâmetros de corrosão da liga Fe-35Mn após o processamento.

Eletrólito	Material	E_{corr} (V)	I_{corr} (μA/cm²)
Solução de Hank	Fe-35Mn	- 0,77 ± 0,001	0,85 ± 0,04
Solução de Hank	Fe puro	-0,38	0,652
Solução de Hank	Aço 316L	-0,26	0,454
Solução de Hank	Fe-35Mn*	-0,74	34

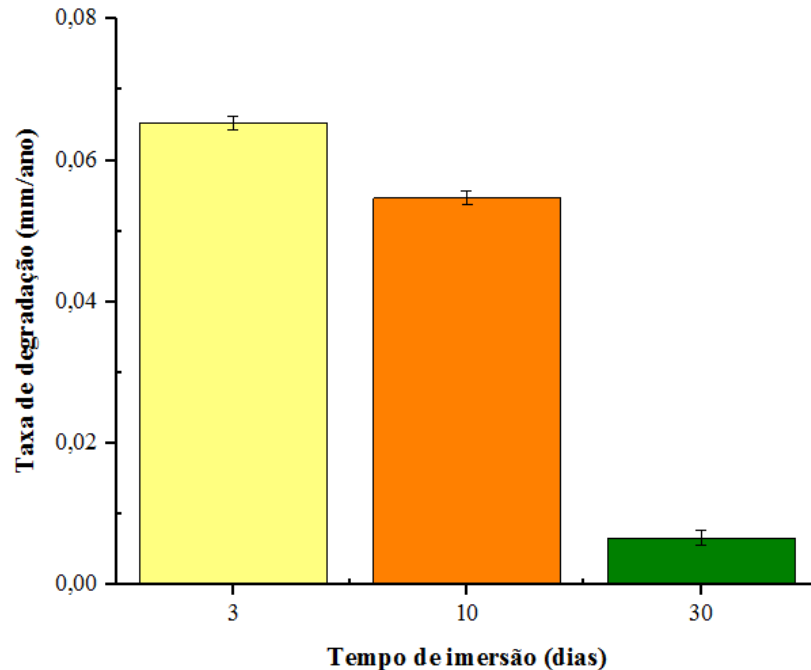
*Processada por metalurgia do pó

Fonte: Autora.

Os testes de polarização potenciodinâmica podem dar indícios sobre comportamento em corrosão das ligas e prever sua taxa de corrosão com base em um curto tempo de teste. No entanto, esses testes não podem mostrar os fenômenos dependentes do tempo, como a forma de corrosão e precipitação de espécies da solução, que foram observados nos testes de imersão estática (HERMAWAN et al., 2007).

No teste de imersão estática, o efeito do tempo de exposição da liga Fe-35Mn em solução de Hank foi observado. Houveram diferenças nas taxas de degradação obtidas entre os tempos avaliados, Figura 31. A liga mostrou uma diminuição da taxa de degradação depois de mais tempo de exposição. Comportamentos similares foram observados por Hermawan et al. (2007) e Zhang e Cao (2015) que relacionam o fato aos produtos de degradação da liga Fe-35Mn, que por serem insolúveis são aderidos e acumulados sobre a superfície da amostra, retardando a troca iônica entre o substrato e a solução corrosiva. Quanto maior o tempo de exposição, maior a quantidade de produtos de corrosão concentrados. Assim, embora a taxa de degradação seja maior que outros materiais metálicos como o ferro puro, sua completa degradação é dita muito difícil se não houver mecanismos eficazes para transportar esses produtos para fora do corpo (CHENG et al., 2013).

Figura 31 – Taxas de degradação média da liga Fe-35Mn obtidas a partir do ensaio de imersão estática em solução de Hank, após 3, 10 e 30 dias.



Fonte: Autora.

A diminuição da taxa de corrosão com o passar do tempo também pode ser atribuída a precipitação contínua de fosfato de cálcio, que se deposita na camada não dissolvida sobre a superfície metálica devido a alcalinização localizada e saturação de cálcio e fósforo na solução de Hank, inibindo o processo corrosivo (HERMAWAN et al., 2007).

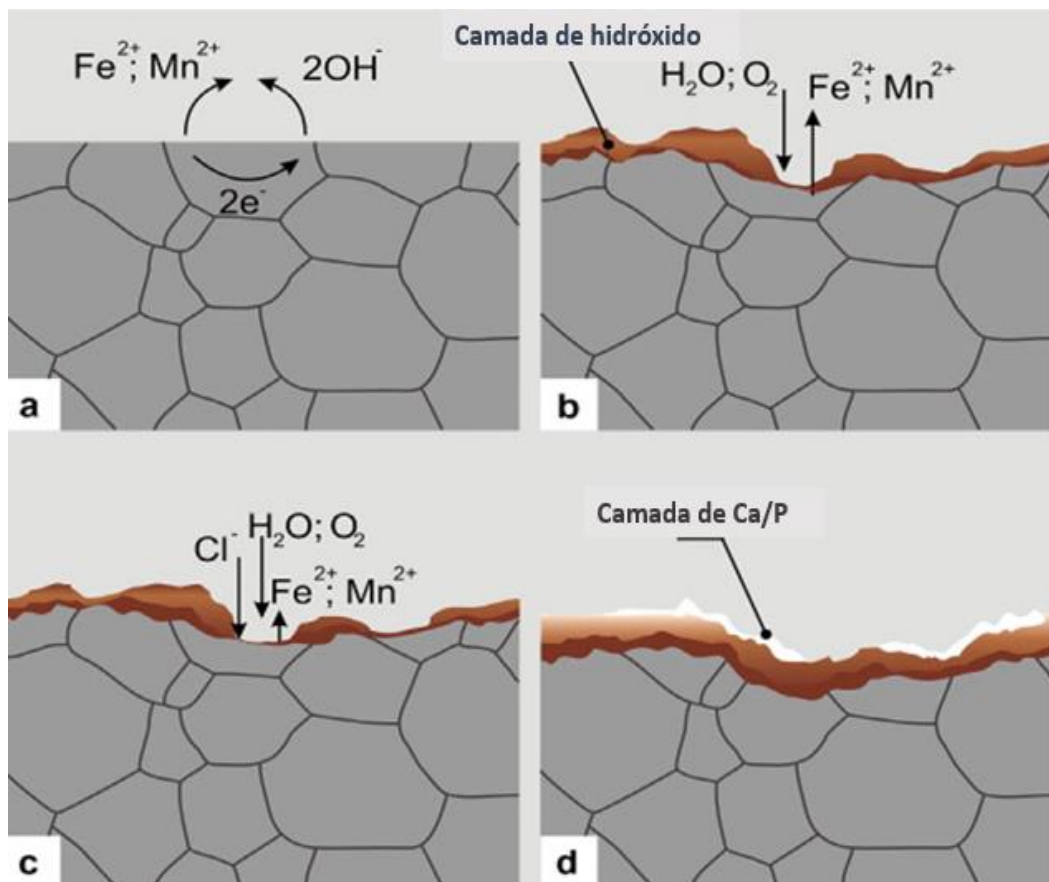
Kiai, Wen e Li (2020) explicaram o mecanismo de corrosão das ligas de ferro em solução de Hank através da representação esquemática da Figura 32. De acordo com os autores, os íons de Fe liberados reagem com íons hidroxila na superfície do metal, conforme descrito na reação 3, para formar $\text{Fe}(\text{OH})_2$ ou $(\text{FeO} \cdot n\text{H}_2\text{O})$.



Os produtos de degradação geralmente são estruturados em camadas que consistem em $\text{FeO} \cdot n\text{H}_2\text{O}$ na parte inferior, de interface com o metal, uma camada intermediária de $\text{Fe}_3\text{O}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ hidratado na parte superior. Os íons Cl^- entram na superfície devido presença de camadas de hidróxidos não homogêneas para compensar o aumento na

concentração de íons metálicos, formando cloreto de metal que, em seguida, é hidrolisado por água para formar HCl. A retenção local de HCl pode reduzir o pH da solução e intensificar o processo de corrosão (KIANI; WEN; LI, 2020).

Figura 32 - Ilustração dos mecanismos de corrosão para ligas Fe-Mn (a) reação de corrosão inicial, (b) formação de camada de hidróxido, (c) processo de corrosão do metal e (d) formação da camada de cálcio-fósforo.



Fonte: Kiani; Wen; Li (2020).

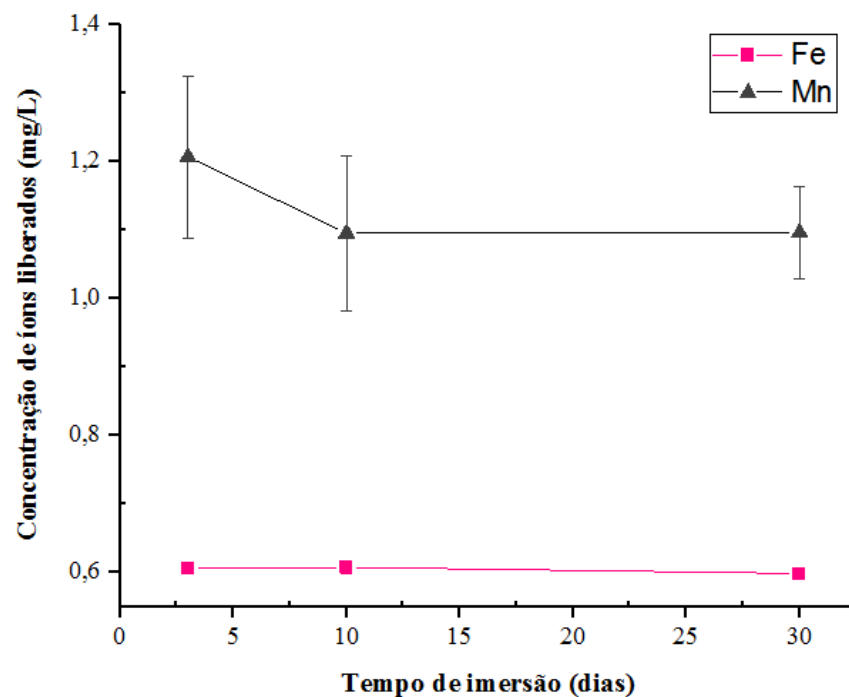
A Figura 33 revela as concentrações de íons liberados de ferro e manganês na solução de Hank nos diferentes intervalos de imersão considerados. A concentração de íons de Fe é muito menor que a concentração de Mn. De acordo com a literatura, a taxa de degradação do manganês é maior que a do ferro (HERMAWAN et al., 2007).

Entre 3 e 10 dias de imersão nota-se que a liberação de íons de Fe permanece quase inalterada, sofrendo um decréscimo após 30 dias. O manganês apresentou uma redução mais

acentuada na liberação de íons no período inicial que se manteve praticamente constante ao longo do tempo.

Cheng et al., (2013) observaram resultados semelhantes ao presente estudo, justificando a diferença na liberação de íons entre os elementos à insolubilidade apresentada pela maioria dos produtos de corrosão do ferro, como $\text{Fe}(\text{OH})_3$, que leva a baixa concentração de íons na solução e dificultam a liberação de manganês. Além disso, reforçam que os mesmos produtos de corrosão não são dissolvidos também por HNO_3 , usado na técnica de espectroscopia de absorção atômica.

Figura 33 – Concentração de íons liberados (Fe e Mn) em solução de Hank após 3, 10 e 30 dias.



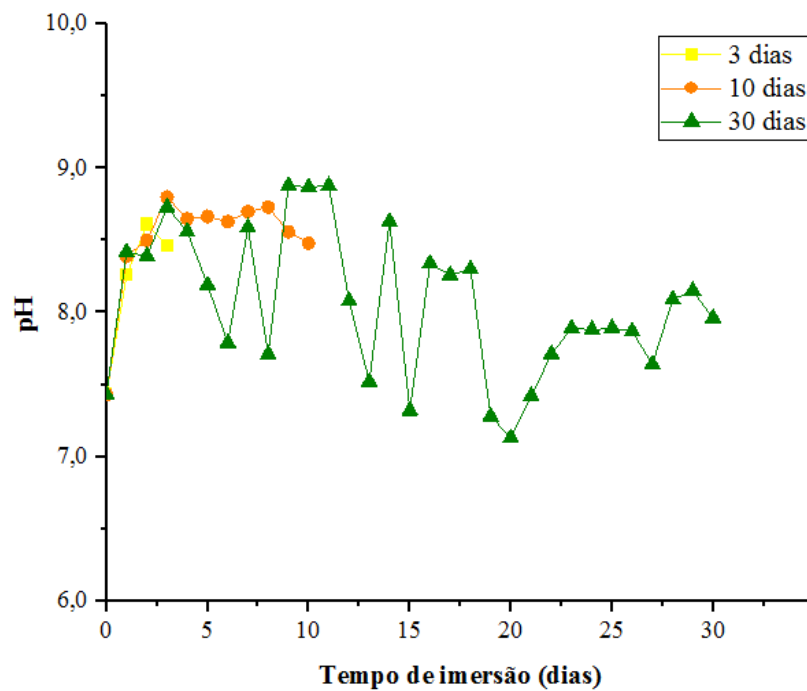
Fonte: Autora.

As características mais importantes dos fluidos corporais que influenciam a corrosão dos implantes metálicos são os níveis de cloreto, oxigênio dissolvido e pH. Assim, a estabilidade do pH próximo ao do ambiente fisiológico ($\sim 7,4$) é essencial para simular adequadamente o comportamento de degradação real dos materiais à base de ferro no corpo humano (ELIAZ, 2019). Mudanças no pH podem ter um grande impacto no comportamento de degradação dos implantes (XU; HODGSON; CAO, 2016).

Eliaz (2019) relatou que o pH ao redor de um implante recém-inserido pode atingir níveis inferiores a 4,0 devido ao acúmulo de hematomas entre outros, e a condição que pode durar várias semanas. A diminuição local do pH pode ser crítica e resultar em corrosão localizada severa do implante metálico.

A Figura 34 mostra que os valores de pH da solução de Hank, no ensaio de imersão estática, apresentaram uma variação entre 7,2 e 8,5 durante os diferentes períodos de imersão. Nos estudos de Liu e Zheng (2011) a mesma faixa de variação foi observada e reportada como não prejudicial ao corpo humano ou ao processo corrosivo do implante.

Figura 34 – Variação do pH da solução de Hank durante o ensaio de imersão estática.



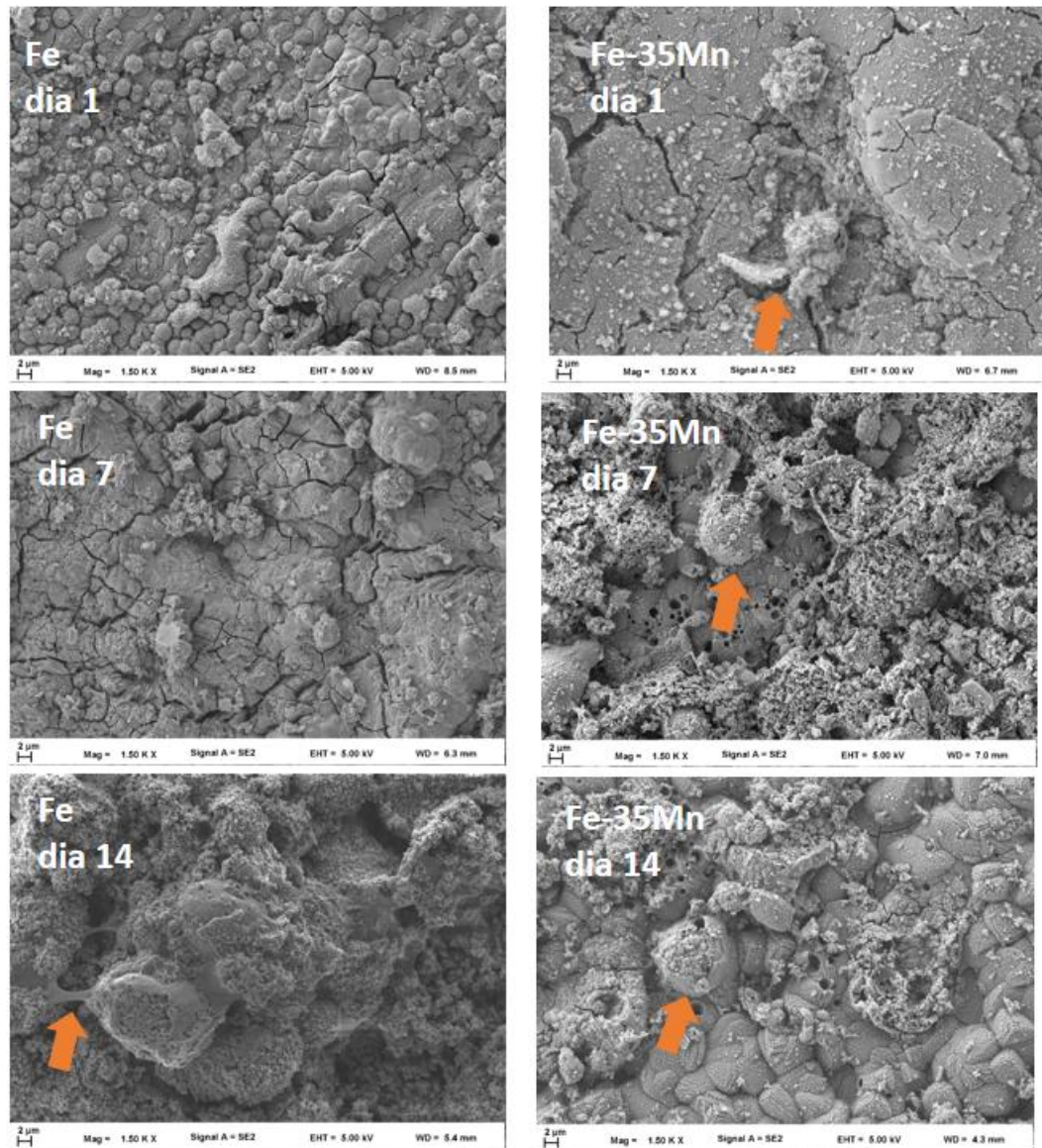
Fonte: Autora.

5.4 AVALIAÇÃO *IN VITRO*

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi usada para observar a topografia das amostras da liga Fe-35Mn e de Fe puro avaliadas e a morfologia desenvolvida pelas células cultivadas. Ao longo dos 14 dias, observou-se um aumento na quantidade dos produtos de corrosão tipicamente criados pela degradação das amostras, cobrindo as células cultivadas.

Nas micrografias da Figura 35 é possível identificar as estruturas celulares e o acúmulo de produtos de corrosão sobre as superfícies, indicados pela seta laranja.

Figura 35 – Micrografias das amostras da liga Fe-35Mn e de Fe puro após 1, 7 e 14 dias de cultura celular Saos-2.

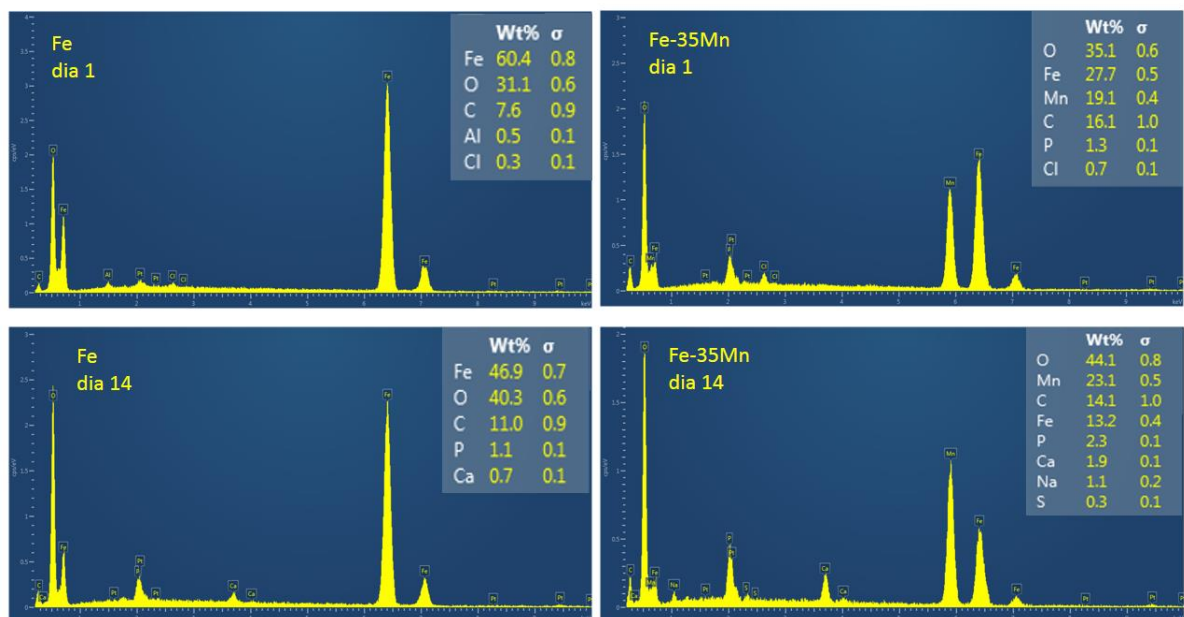


Fonte: Autora.

Ainda durante os dias de cultivo celular, a superfície das amostras estudadas foram analisadas semiquantitativamente por Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS). Os resultados (Figura 36) mostraram que além da presença de elementos típicos à composição das amostras como ferro, manganês, carbono, oxigênio entre outros, também foram

detectados cálcio e fosfato após 14 dias de cultivo, indicando um processo de mineralização onde células pré-osteoblásticas, como as Saos-2 utilizadas neste experimento, podem responder a superfície da amostra e continuar se diferenciando ao longo da linhagem osteoblástica (LISKOVA et al., 2015). Os osteoblastos são células capazes de armazenar fosfato de cálcio e responsáveis pela síntese da matriz óssea. Desse modo, a liga Fe-35Mn que apresentou a maior precipitação de cálcio e fosfato no meio durante o período considerado, demonstrou maior potencial de diferenciação osteogênica.

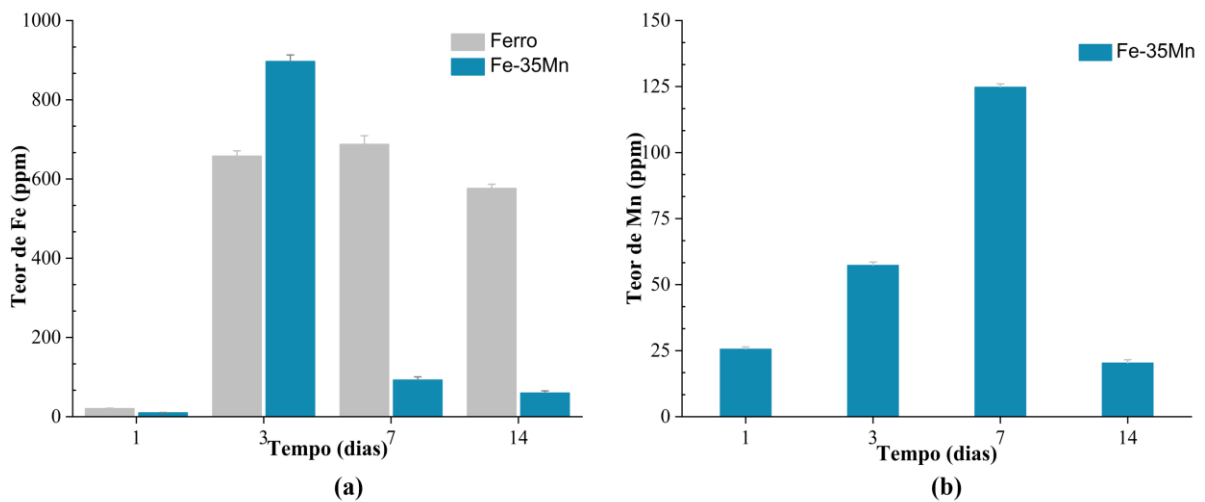
Figura 36 – Análise por EDS da liga Fe-35Mn após 14 dias de cultura celular Saos-2.



Fonte: Autora.

A liberação de íons de Fe e Mn no meio de cultura durante os 14 dias de cultivo celular foi avaliada por Espectrometria de Plasma Acoplado Indutivamente (ICP) e os dados obtidos podem ser observados na Figura 37. A liberação de Fe (Figura 37 (a)) a partir das amostras de Fe puro apresentou seus maiores níveis com 3 e 7 dias de cultura, seguido de um decréscimo após 14 dias. A partir das amostras da liga Fe-35Mn, a liberação atingiu seu ponto máximo com 3 dias de cultura, caindo consecutivamente nos dias posteriores avaliados. Em relação ao Mn (Figura 37 (b)), a liberação segue crescente até o sétimo dia, apresentando níveis mais baixos no décimo quarto dia.

Figura 37 – (a) Quantificação da liberação de íons de Fe e Mn a partir de amostras da liga Fe-35Mn no meio de cultura das células Saos-2 durante 14 dias e (b) Quantificação da liberação de íons de Fe e Mn a partir de amostras de Fe puro no meio de cultura das células Saos-2 durante 14 dias.

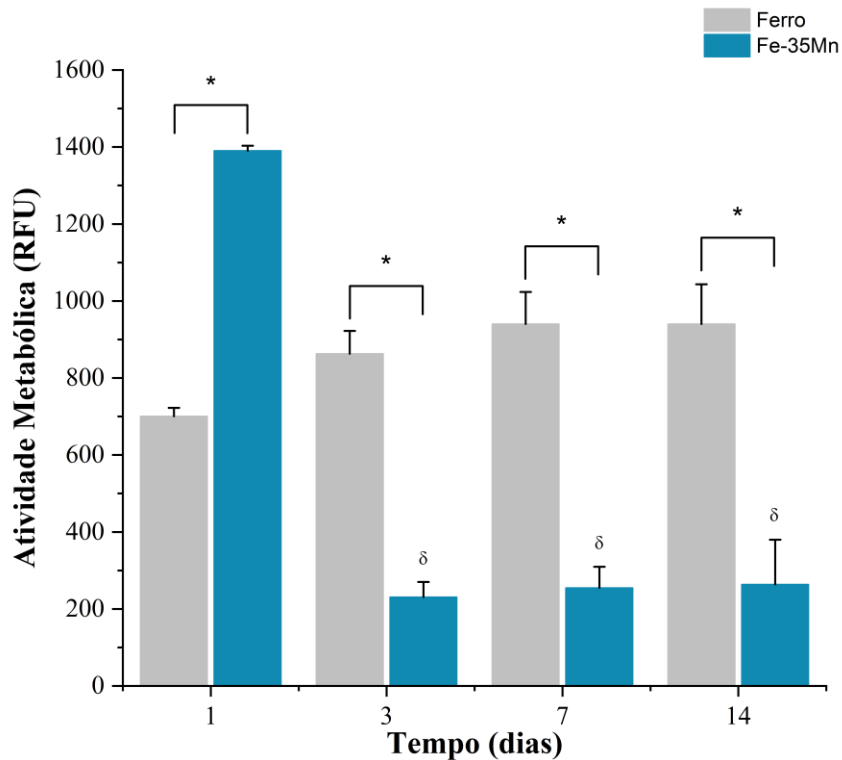


Fonte: Autora.

Os resultados reforçaram que ambos os materiais avaliados apresentam maiores taxas de degradação durante seu período exploratório inicial, diminuindo sua capacidade com o passar do tempo. A liga Fe-35Mn mostrou que se degrada/corre mais rapidamente do que o Fe puro, o que pode explicar a redução na quantidade de células observadas no decorrer do tempo de cultura e, consequentemente, a redução da atividade metabólica apresentada a seguir (HERMAWAN et al., 2010).

A atividade metabólica de células Saos-2 cultivadas foi avaliada pelo ensaio alamarBlue® (Figura 38). No primeiro dia, as células cultivadas sobre as amostras da liga de Fe-35Mn mostraram maior atividade metabólica do que aquelas cultivadas sobre amostras de Fe, mas reduziram significativamente sua atividade nos momentos posteriores, fazendo com que nos dias 3, 7 e 14 as células cultivadas sobre as amostras de Fe apresentassem maior atividade. De maneira geral, as células cultivadas sobre as amostras de Fe mostraram-se metabolicamente mais ativas do que aquelas cultivadas sobre as amostras da liga. No entanto, a maior taxa de degradação da liga pode explicar estas observações, uma vez que mais células podem se desprender mais facilmente junto com os produtos de degradação.

Figura 38 – Atividade metabólica de células Saos-2 cultivadas sobre amostras da liga de Fe-35Mn e Fe ao longo de 14 dias. (δ representa estatisticamente diferente do dia 1; ϕ representa estatisticamente diferente do dia 3; * representa estatisticamente diferente do grupo indicado).

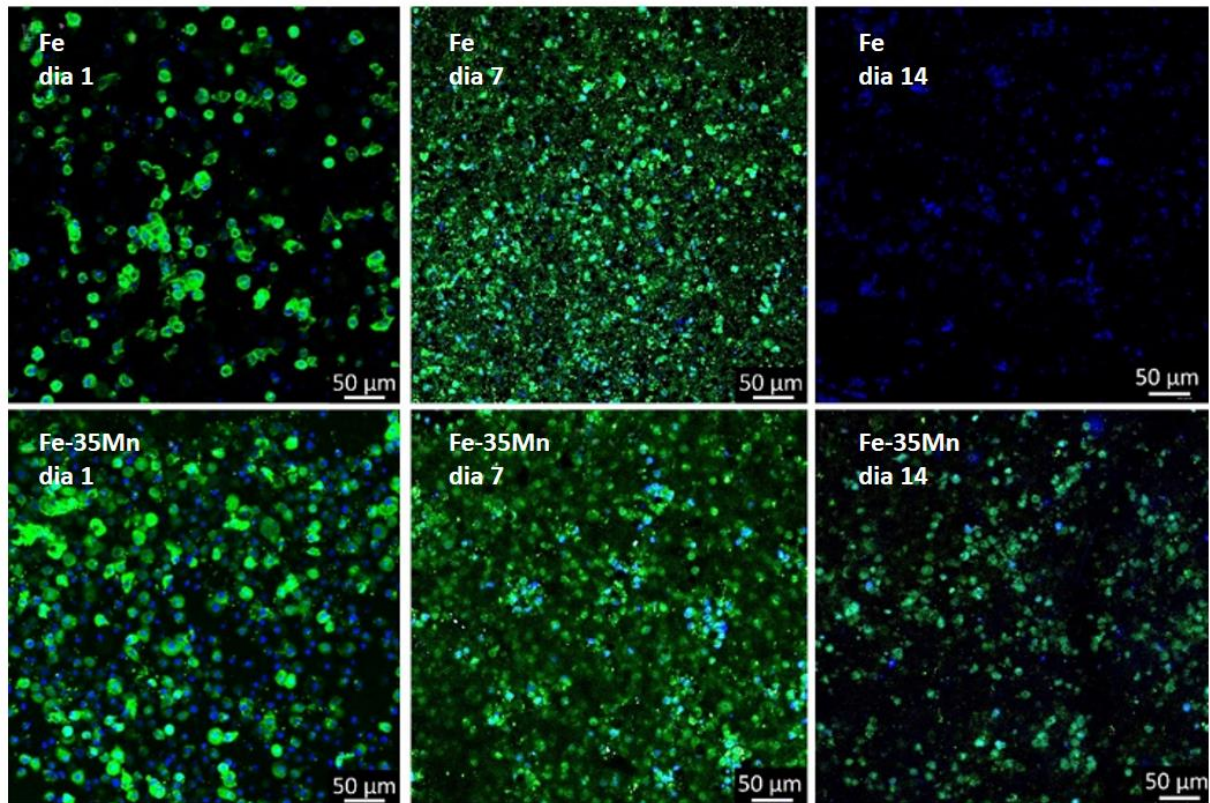


Fonte: Autora.

Apesar da diminuição da atividade metabólica da liga observada após o primeiro dia de cultivo, esta se manteve praticamente constante nos demais dias analisados, não evidenciando efeito citotóxico e sugerindo que a proliferação celular de alguma forma consegue acompanhar a degradação da liga.

A coloração com actina F foi realizada para avaliar a adesão e disseminação das células sobre as amostras estudadas. Em todas as amostras, as células foram capazes de aderir e se espalhar após o primeiro dia de cultivo. De acordo com as imagens da Figura 39, um número maior de células foi observado nas amostras da liga Fe-35Mn em comparação com as amostras de Fe.

Figura 39 – Coloração com actina F de células cultivadas sobre amostras da liga de Fe-35Mn e Fe para avaliar a adesão celular e espalhamento ao longo de 14 dias de cultura. F-actina das células foi corada com faloidina (cor verde) e os núcleos foram contra corados com DAPI (cor azul) (barra de escala = 50 μ m).



Fonte: Autora.

As células cultivadas em amostras de Fe se proliferaram e atingiram seu máximo com 7 dias de cultivo. Com 14 dias, as células se tornaram praticamente invisíveis e apenas seus núcleos podem ser notados. Nenhum filamento de actina F apresentou coloração. Para as amostras da liga Fe-35Mn a mesma tendência foi observada, sendo um número elevado de células também com 7 dias de cultivo, seguido de um decréscimo no dia 14. O desaparecimento das fibras de actina F também foi observado por Pavel et al. (2018). Eles observaram que as células malignas perdem as fibras de estresse actina F após atingir a confluência.

6 CONCLUSÃO

Considerando que o objetivo geral desta proposta foi estabelecer uma nova rota de processamento em forno a arco voltaico para a liga biodegradável Fe-35Mn, é possível concluir que a mesma mostrou-se adequada, uma vez que os resultados apresentados estão de acordo com a literatura e promoveram maior eficiência da liga quanto às propriedades mecânicas, com taxa de degradação intermediária, inferior às ligas de Fe-Mn obtidas pelo processamento por metalurgia do pó e superior ao ferro puro e ao aço 316L. Também não foram observados prejuízos às propriedades biológicas quando comparado aos materiais de referência. Portanto, há indícios favoráveis à aplicação da liga Fe-35Mn processada em forno a arco voltaico em dispositivos biomédicos temporários.

SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTUROS

A seguir são elaboradas algumas sugestões para trabalhos futuros a partir do apresentado deste estudo.

- i. Processamento da liga biodegradável Fe-35Mn empregando técnicas de deformação plástica severa como ECAP (Equal Channel Angular Pressing) para refino do grãos. Este é um trabalho em andamento. A liga desenvolvida foi processada por ECAP e algumas etapas de sua caracterização já foram concluídas.
- ii. Realização de estudos *in vitro* pelo método indireto nas mesmas condições usadas para a avaliação no método direto.
- iii. Modificação da superfície da liga Fe-35Mn utilizando oxidação anódica, antes e após ECAP.
- iv. Estudo *in vivo* com modelos animais de implantes bioabsorvíveis confeccionados a partir da liga Fe-35Mn.

REFERÊNCIAS

- AVERSA, R. *et al.* Hybrid ceramo-polymeric nanocomposite for biomimetic scaffolds design and preparation. **American Journal of Engineering and Applied Sciences**, Dubai, v. 9, n. 4, p. 1096-1115, 2016.
- AZUSHIMA, A. *et al.* Severe plastic deformation (SPD) processes for metals. **CIRP Annals**, Paris, v. 57, n. 2, p. 716-735, 2008.
- BOWEN, P. K.; DRELICH, J.; GOLDMAN, J. Zinc exhibits ideal physiological corrosion behavior for bioabsorbable stents. **Advanced Materials**, Weinheim, v. 25, n. 18, p. 2577-2582, 2013.
- BOWEN, P. K. *et al.* Biodegradable metals for cardiovascular stents: from clinical concerns to recent Zn-Alloys. **Advanced Healthcare Materials**, Weinheim, v. 5, n. 10, p. 1121-1140, 2016.
- CAROBOLANTE, João Pedro Aquiles. **Processamento de novas ligas quaternárias Ti10Mo8NbXZr (X= 4, 5 e 6) para aplicações biomédicas: avaliação do comportamento mecânico, (micro) estrutural e eletroquímico**. 2021. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2021. Disponível em:
https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/214997/carobolante_jpa_dr_guara_par.pdf?sequence=3&isAllowed=y
 Acesso em: 05 set. 2022.
- CHENG, J. *et al.* Comparative in vitro study on pure metals (Fe, Mn, Mg, Zn and W) as biodegradable metals. **Journal of Materials Science & Technology**, Pequim, v. 29, n. 7, p. 619-627, 2013.
- CONTI, M. C. *et al.* Influence of cold rolling on in vitro cytotoxicity and electrochemical behaviour of an Fe-Mn-C biodegradable alloy in physiological solutions. **Heliyon**, Cambridge, v. 4, n. 11, p. e00926, 2018.
- DARGUSCH, M. S. *et al.* In vivo evaluation of bioabsorbable Fe-35Mn-1Ag: first reports on in vivo hydrogen gas evolution in Fe-Based implants. **Advanced Healthcare Materials**, Weinheim, v. 10, n. 2, p. 2000667, 2021.
- DARGUSCH, M. S. *et al.* Exploring the role of manganese on the microstructure, mechanical properties, biodegradability, and biocompatibility of porous iron-based scaffolds. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, Washington, v. 5, n. 4, p. 1686-1702, 2019.
- DEHESTANI, M. *et al.* Effects of microstructure and heat treatment on mechanical properties and corrosion behavior of powder metallurgy derived Fe–30Mn alloy. **Materials Science and Engineering: A**, Paris, v. 703, p. 214-226, 2017.
- DEGHAN-MANSHADI, A.; STJOHN, D. H.; DARGUSCH, M. S. Tensile Properties and Fracture behaviour of biodegradable iron–manganese scaffolds produced by powder sintering. **Materials**, Basileia, v. 12, n. 10, p. 1572, 2019.

ELIAZ, N. Corrosion of metallic biomaterials: a review. **Materials**, Basileia, v. 12, n. 3, p. 407, 2019.

FALEIROS-SANTOS, M. H. *et al.* Evolução dos biomateriais na ortopedia e cardiologia. **Revista Processos Químicos**, Goiânia, v. 13, n. 26, p. 35-42, 2019.

FRANCIS, A. *et al.* Iron and iron-based alloys for temporary cardiovascular applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, Nápoles, v. 26, n. 3, p. 1-16, 2015.

FUKUDA, Y. *et al.* Processing of a low-carbon steel by equal-channel angular pressing. **Acta Materialia**, Cambridge, v. 50, n. 6, p. 1359-1368, 2002.

FURUKAWA, M. *et al.* Processing of metals by equal-channel angular pressing. **Journal of Materials Science**, Nova Iorque, v. 36, n. 12, p. 2835-2843, 2001.

FURUKAWA, M. *et al.* The shearing characteristics associated with equal-channel angular pressing. **Materials Science and Engineering: A**, Paris, v. 257, n. 2, p. 328-332, 1998.

GOREJOVÁ, R. *et al.* Recent advancements in Fe-based biodegradable materials for bone repair. **Journal of Materials Science**, Nova Iorque, v. 54, n. 3, p. 1913-1947, 2019.

HAN, H. *et al.* Current status and outlook on the clinical translation of biodegradable metals. **Materials Today**, Oxford, v. 23, p. 57-71, 2019.

HE, J. *et al.* Advances in Fe-based biodegradable metallic materials. **RSC Advances**, Hanover, v. 6, n. 114, p. 112819-112838, 2016.

HEIDEN, M. *et al.* Effect of microstructure and strain on the degradation behavior of novel bioresorbable iron–manganese alloy implants. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, Hoboken, v. 103, n. 2, p. 738-745, 2015.

HERMAWAN, H.; MANTOVANI, D. Process of prototyping coronary stents from biodegradable Fe–Mn alloys. **Acta Biomaterialia**, Cambridge, v. 9, n. 10, p. 8585-8592, 2013.

HERMAWAN, H. *et al.* Fe–Mn alloys for metallic biodegradable stents: degradation and cell viability studies. **Acta Biomaterialia**, Cambridge, v. 6, n. 5, p. 1852-1860, 2010.

HERMAWAN, H.; DUBÉ, D.; MANTOVANI, D. Degradable metallic biomaterials: design and development of Fe–Mn alloys for stents. **Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, Hoboken, v. 93, n. 1, p. 1-11, 2010.

HERMAWAN, H.; DUBÉ, D.; MANTOVANI, D. Developments in metallic biodegradable stents. **Acta Biomaterialia**, Cambridge, v. 6, n. 5, p. 1693-1697, 2010.

HERMAWAN, H. *et al.* Fe–Mn alloys for metallic biodegradable stents: degradation and cell viability studies. **Acta Biomaterialia**, Cambridge, v. 6, n. 5, p. 1852-1860, 2010.

HERMAWAN, H. *et al.* Degradation behaviour of metallic biomaterials for degradable stents. **Advanced Materials Research**. Trans Tech Publications Ltd, Hoboken, p. 113-118, 2007.

HOU, L. *et al.* A review on biodegradable materials for cardiovascular stent application. **Frontiers of Materials Science**, Nova Iorque, v. 10, n. 3, p. 238-259, 2016.

HU, T. *et al.* Biodegradable stents for coronary artery disease treatment: Recent advances and future perspectives. **Materials Science and Engineering: C**, Paris, v. 91, p. 163-178, 2018.

KIANI, F.; WEN, C.; LI, Y. Prospects and strategies for magnesium alloys as biodegradable implants from crystalline to bulk metallic glasses and composites—a review. **Acta Biomaterialia**, Cambridge, v. 103, p. 1-23, 2020.

LANGDON, T. G. The principles of grain refinement in equal-channel angular pressing. **Materials Science and Engineering: A**, Paris, v. 462, n. 1-2, p. 3-11, 2007.

LI, H.; ZHENG, Y.; QIN, L. Progress of biodegradable metals. **Progress in Natural Science: Materials International**, Oxford, v. 24, n. 5, p. 414-422, 2014.

LISKOVA, J. *et al.* Osteogenic cell differentiation on H-terminated and O-terminated nanocrystalline diamond films. **International Journal of Nanomedicine**, Londres, v. 10, p. 869-84, 2015.

LIU, P. *et al.* Microstructure, mechanical properties, degradation behavior, and biocompatibility of porous Fe-Mn alloys fabricated by sponge impregnation and sintering techniques. **Acta Biomaterialia**, Cambridge, v. 114, p. 485-496, 2020.

LIU, B.; ZHENG, Y. F. Effects of alloying elements (Mn, Co, Al, W, Sn, B, C and S) on biodegradability and in vitro biocompatibility of pure iron. **Acta Biomaterialia**, Cambridge, v. 7, n. 3, p. 1407-1420, 2011.

MOSTAED, E. *et al.* Zinc-based alloys for degradable vascular stent applications. **Acta Biomaterialia**, Cambridge, v. 71, p. 1-23, 2018.

MOSTAED, E. *et al.* Influence of ECAP process on mechanical and corrosion properties of pure Mg and ZK60 magnesium alloy for biodegradable stent applications. **Biomatter**, Londres, v. 4, n. 1, p. e28283, 2014.

NAYAK, P.; BISWAL, A. K.; SAHOO, S. K. Processing and characterization of Fe-35Mn biodegradable metallic materials. **Materials Today: Proceedings**, Oxford, v. 33, p. 5284-5289, 2020.

NEMATIA, N. H.; PARSAFAR, M. The effect of the third element on corrosion behavior and phase structure of Fe35Mn alloy fabricated by spark plasma sintering (SPS). **Journal of Modern Processes in Manufacturing and Production**, Najafabad, v. 7, n. 4, p. 31-39, 2018.

NIINOMI, M. Recent progress in research and development of metallic structural biomaterials with mainly focusing on mechanical biocompatibility. **Materials Transactions**, Hokkaido, v. 59, n. 1, p. 1-13, 2018.

NIINOMI, M.; NAKAI, M.; HIEDA, J. Development of new metallic alloys for biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, Cambridge, v. 8, n. 11, p. 3888-3903, 2012.

OBAYI, C. S. *et al.* Effect of grain sizes on mechanical properties and biodegradation behavior of pure iron for cardiovascular stent application. **Biomatter**, Londres, v. 6, n. 1, p. e959874, 2016.

PAVEL, M. *et al.* Contact inhibition controls cell survival and proliferation via YAP/TAZ-autophagy axis. **Nature Communications**, Nova Iorque, V. 9, n. 1 p.2961, 2018.

PEREIRA JÚNIOR, Adelvam. **Caracterização microestrutural e mecânica da liga Ti10Mo8Nb6Zr para aplicações biomédicas**. 2019. Dissertação (Mestrado em Engenharia mecânica) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2019. Disponível em:
https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/181754/pereirajunior_a_me_guara_int.pdf?sequence=7&isAllowed=y
 Acesso em: 01 set. 2022.

PEUSTER, M. *et al.* Long-term biocompatibility of a corrodible peripheral iron stent in the porcine descending aorta. **Biomaterials**, Cambridge, v. 27, n. 28, p. 4955-4962, 2006.

ROODPOSHTI, P. S. *et al.* Microstructural approach to equal channel angular processing of commercially pure titanium— a review. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**, Pequim, v. 25, n. 5, p. 1353-1366, 2015.

ROY, S. Functionally graded coatings on biomaterials: a critical review. **Materials Today Chemistry**, Oxford, v. 18, p. 100375, 2020.

SCHROEDER, Renan Muller. **Desenvolvimento de aço hadfield sinterizado contendo partículas de grafita no volume**. 2015. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2015. Disponível em:
<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/169576/338943.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
 Acesso em: 08 fev. 2022.

TOTH, L. S.; GU, C. Ultrafine-grain metals by severe plastic deformation. **Materials Characterization**, Cambridge, v. 92, p. 1-14, 2014.

VALIEV, R. Z.; LANGDON, T. G. Principles of equal-channel angular pressing as a processing tool for grain refinement. **Progress in Materials Science**, Paris, v. 51, n. 7, p. 881-981, 2006.

VALIEV, R. Z. *et al.* Producing bulk ultrafine-grained materials by severe plastic deformation. **Jom**, Nova Iorque, v. 58, n. 4, p. 33-39, 2006.

VELIKOKHATNYI, O. I.; KUMTA, P. N. First principles study of the elastic properties of magnesium and iron based bio-resorbable alloys. **Materials Science and Engineering: B**, Paris, v. 230, p. 20-23, 2018.

ZAOKARI, Y.; PERSAUD, A.; IBRAHIM, A. Biomaterials for adhesion in orthopedic applications: a review. **Engineered Regeneration**, Oxford, v. 1, p. 51-63, 2020.

ZHANG, Q.; CAO, P. Degradable porous Fe-35wt.% Mn produced via powder sintering from NH_4HCO_3 porogen. **Materials Chemistry and Physics**, Cambridge, v. 163, p. 394-401, 2015.

ZHANG, L.; CHEN, L. A review on biomedical titanium alloys: recent progress and prospect. **Advanced Engineering Materials**, Weinheim, v. 21, n. 4, p. 1801215, 2019.

ZHENG, Y. F.; GU, X. N.; WITTE, F. Biodegradable metals. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, Paris, v. 77, p. 1-34, 2014.

ZHU, Y. T.; LOWE, T. C. Observations and issues on mechanisms of grain refinement during ECAP process. **Materials Science and Engineering: A**, Paris, v. 291, n. 1-2, p. 46-53, 2000.

WANG, H. *et al.* In vitro corrosion properties and cytocompatibility of Fe-Ga alloys as potential biodegradable metallic materials. **Materials Science and Engineering: C**, Paris, v. 71, p. 60-66, 2017.

WITUSIEWICZ, V. T.; SOMMER, F.; MITTEMEIJER, E. J. Reevaluation of the Fe-Mn phase diagram. **Journal of Phase Equilibria and Diffusion**, Nova Iorque, v. 25, n. 4, p. 346-354, 2004.

YAMASHITA, A. *et al.* Influence of pressing temperature on microstructural development in equal-channel angular pressing. **Materials Science and Engineering: A**, Paris, v. 287, n. 1, p. 100-106, 2000.

YEUNG, K.W. K.; WONG, K.H. M. Biodegradable metallic materials for orthopaedic implantations: A review. **Technology and Health Care**, Amsterdã, v. 20, n. 5, p. 345-362, 2012.