

RITA DE CÁSSIA REIS RANGEL

**Funcionalização da superfície de ferro empregando a oxidação anódica para o
processamento de materiais biomédicos biodegradáveis**

Guaratinguetá – SP
2021

Rita de Cássia Reis Rangel

**Funcionalização da superfície de ferro empregando a oxidação anódica para o
processamento de materiais biomédicos biodegradáveis**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia do Campus de Guaratinguetá,
Universidade Estadual Paulista, para
obtenção do título de Mestre em
Engenharia Mecânica na área de
materiais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula
Rosifini Alves Claro
Coorientadora: Dr^a. Ana Lúcia do Amaral
Escada

Guaratinguetá – SP
2021

Rangel, Rita de Cássia Reis
R196f Funcionalização da superfície de ferro empregando a oxidação anódica
para o processamento de materiais biomédicos biodegradáveis / Rita de Cássia Reis
Rangel – Guaratinguetá, 2021.
102 f : il.
Bibliografia: f. 97-102

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Engenharia de Guaratinguetá, 2021.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Rosifini Alves Claro Coorientadora:
Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia do Amaral Escada

1. Materiais biomédicos. 2. Metais Oxidação anódica.
3. Biodegradação. I. Título.

CDU 620.1(043)

RITA DE CÁSSIA REIS RANGEL

**ESTA DISSERTAÇÃO FOI JULGADA ADEQUADA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
“MESTRE EM ENGENHARIA MECÂNICA”**

**PROGRAMA: ENGENHARIA MECÂNICA
CURSO: MESTRADO**

APROVADA EM SUA FORMA FINAL PELO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO



Prof. Dr.ª Ivonete Ávila
Coordenadora

BANCA EXAMINADORA:



PROFA. DRA. ANA PAULA ROSIFINI ALVES CLARO

Orientador / UNESP/FEG

participou por videoconferência



PROFA. DRA. CÉLIA REGINA TOMACHUK DOS SANTOS CATUOGNO

USP/EEL

participou por videoconferência



PROFA. DRA. DORIS HISSAKO MATSUSHITA

UNESP/Araçatuba

participou por videoconferência

Julho 2021

DADOS CURRICULARES

RITA DE CÁSSIA REIS RANGEL

NASCIMENTO	16.02.1994 – Guaratinguetá/SP
FILIAÇÃO	Andre Luiz Corread Rangel Graça de Fatima Xavier Reis Rangel
2013/2018	Curso de Graduação Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP)
2019/2021	Curso de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, nível de mestrado Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá - UNESP

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora *Prof^a. Dr^a. Ana Paula Rosifini Alves Claro* por todo incentivo e apoio;

aos meus pais, *André, Graça e Fátima*, por todo amor, compreensão e motivação durante toda minha vida, e aos meus irmãos, *André, Victória e Ana Laura*, pelo companheirismo e carinho;

a minha madrinha *Cristina* por sempre torcer e rezar por mim;

aos amigos do Grupo de Biomateriais pelo apoio e ajuda;

ao Departamento de Materiais e Tecnologia - UNESP/FEG, especialmente aos técnicos, pela dedicação e colaboração na realização das etapas deste trabalho;

a minha coorientadora *Dr^a. Ana Lúcia do Amaral Escada* por todo apoio e aprendizado;

ao *Prof. Dr. Roberto Zenhei Nakazato* por toda a ajuda durante o desenvolvimento do trabalho;

ao *Prof. Dr. Luís Rogério de Oliveira Hein* pela colaboração na microscopia eletrônica de varredura;

ao *Prof. Dr. Javier Andrea Munoz Cortez* pelo auxílio na discussão dos resultados de DRX e Raman;

ao *Prof. Dr. João Paulo Barros Machado* do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais pela colaboração nas caracterizações e auxílio na discussão dos resultados;

a *Prof^a. Dr^a. Célia Regina Tomachuk dos Santos Catuogno* do Departamento de Ciências Básicas e Ambientais da Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, pela colaboração no ensaio de degradação;

aos alunos de pós-graduação *Adelvam Pereira Junior* pela colaboração no processamento da liga, *João Pedro Aquiles Carobolante* pelo auxílio dado durante a realização dos experimentos e *Roberto Ferreira Motta Junior* pelo suporte e toda ajuda de sempre;

Ao *Dr. Célio Junior da Costa Fernandes e mestre Gerson Santos de Almeida* do Laboratório de Bioensaios e Dinâmica Celular (LaBIO), do Instituto de Biociências da Unesp/Botucatu, pela colaboração nos ensaios celulares e na discussão dos resultados.

à CNPq pela bolsa de estudos.

RESUMO

Nos últimos anos, o desenvolvimento de metais biodegradáveis para implantes médicos temporários tem sido alvo de várias pesquisas. Os implantes degradáveis necessitam apenas de uma intervenção, evitando uma segunda operação de remoção e diminuindo potencialmente os riscos a longo prazo e efeitos colaterais causados por dispositivos permanentes. A aplicação do ferro como material biodegradável foi demonstrada por estudos *in vivo*, e apesar de não encontradas indicações de toxicidade local ou sistêmica, a taxa de degradação do ferro puro foi considerada muito baixa. Novas técnicas de processamento e modificação de superfície, como crescimento de nanoestruturas de óxido de ferro, são utilizadas para alterar as propriedades de mecânicas e de degradação desses materiais permitindo melhor resposta. A proposta dessa pesquisa, é a modificação de superfície de uma amostra de ferro puro a partir do crescimento de nanoestruturas, empregando a oxidação anódica. Na tentativa de padronizar os parâmetros de anodização, variou-se a composição do eletrólito, tensão, tempo e também a agitação da solução. Após o tratamento de oxidação anódica as amostras foram recozidas em diferentes temperaturas. As superfícies foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios X (DRX), espectroscopia Raman e ângulo de contato. Estudos *in vitro*, como viabilidade e adesão celular, foram realizados para avaliar a resposta desse tratamento e a degradabilidade foi avaliada por ensaio de imersão estática em solução de Hanks. O melhor filme de óxido nanoestruturado foi obtido para a condição com potencial de 50 V, tempo de 30 min, agitação de 100 rpm e após o tratamento a 350°C. Foram obtidas superfícies hidrofílicas para todas as condições de anodização e recozimento. A superfície anodizada e recozida a 350°C não apresentou efeito citotóxico. Além disso, exibiu taxa de degradação superior à do substrato de ferro puro.

PALAVRAS-CHAVE: Biomateriais biodegradáveis. Ferro puro. Tratamento de superfície.

ABSTRACT

In recent years, the development of biodegradable metals for temporary medical implants has been the subject of several studies. Degradable implants require only one intervention, avoiding a second removal operation and decreasing the long-term risks and side effects caused by permanent devices. The application of iron as a biodegradable material has been demonstrated by in vivo studies, and although no indications of local or systemic toxicity were found, the rate of degradation of pure iron was considered very low. New processing and surface modification techniques, such as the growth of iron oxide nanostructures, are used to alter the mechanical and degradation properties of these materials, allowing for a better biological response. The purpose of this research is to modify the surface of a pure iron sample from the growth of nanostructures, using anodic oxidation. In an attempt to standardize the anodizing parameters, the electrolyte composition, anodizing voltage, time and the solution agitation were varied. After the anodic oxidation treatment, the samples were annealed to air at different temperatures. The surfaces were analyzed by scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), Raman spectroscopy and contact angle. In vitro studies, such as cell viability and adhesion, were performed to assess the response of this treatment and degradability was assessed by static immersion test in Hank's solution. The best-nanostructured oxide film was obtained for the condition with a potential of 50 V, time of 30 min, agitation of 100 rpm and after treatment at 350°C. Hydrophilic surfaces were obtained for all anodizing and annealing conditions. The surface anodized and annealed at 350°C had no cytotoxic effect. Furthermore, it exhibited a higher degradation rate than the pure iron substrate.

KEYWORDS: Biodegradable biomaterials. Pure iron. Surface treatment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Evolução da funcionalidade e desenvolvimento do potencial regenerativo dos biomateriais ao longo do tempo.....	15
Figura 2- Classificação de materiais biomédicos, biomateriais e materiais biológicos.	21
Figura 3 - Diagrama esquemático da biocorrosão na interface metal biodegradável/meio	24
Figura 4 - Aorta de coelho com stent de ferro degradável após 12 meses de implantação (seção longitudinal) apresentando pontos de corrosão (setas).....	26
Figura 5 - Fotografia de um stent de ferro corrosível no desenho de um stent Saxx periférico (CR Bard, Tempe, AZ, EUA), após o corte a laser e eletropolimento e antes da montagem no cateter balão.	27
Figura 6 - Representação de uma célula eletrolítica utilizada durante a oxidação anódica.....	30
Figura 7 - a) mecanismo de formação do óxido no metal, b) morfologias obtidas por anodização eletroquímica - um filme de óxido compacto, uma camada de óxido porosa desordenada, uma camada nanoporosa ordenada ou uma camada nanotubular ordenada.	31
Figura 8 - (a) representação esquemática da anodização; (b) representação esquemática da estrutura de óxido de ferro porosa obtida via anodização.	32
Figura 9 - Camada de nanotubos alinhada formada a partir da anodização do ferro em solução etilenoglicol (40 V, 15 min). A superfície do ferro foi eletropolida com ácido sulfúrico (0,5 mol/L 6V) antes da anodização.....	33
Figura 10 - Densidade de corrente vs. tempo durante a anodização do ferro em uma solução de etilenoglicol contendo 0,1 mol/L NH_4F e 3 vol% H_2O , a 50 V durante 15 min.	34
Figura 11 (a-c) - Imagens das camadas de óxido de ferro fabricadas durante a anodização durante 300s a 60°C, sob tensão de 50 V em eletrólito contendo etilenoglicol + 0,5% em massa de NH_4F , e nas seguintes condições: sem adição de água (a), e com diferentes concentrações de água variando de 1%(b) e 3%(b) em volume. ...	35

Figura 12 - (a-d) - Imagens das camadas de óxido de ferro fabricadas durante a anodização a 50 V em etilenoglicol + 3% em volume de água por 300s a 60°C com diferentes concentrações de NH_4F , variando de 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0% em massa, respectivamente.	36
Figura 13 (a-d) - Imagens das nanoestruturas sintetizadas durante a anodização em solução de etilenoglicol + 0,1 mol/L NH_4F + 3,0% em volume de água por 15 min sob agitação de 1000 rpm, em diferentes potenciais (30, 40, 50 e 60 V).	38
Figura 14 (a-c) - Imagens das nanoestruturas sintetizadas durante a anodização a 40 V em solução de etilenoglicol + 0,1 mol/L NH_4F + 1M de H_2O por 60, 90 e 120 min.	39
Figura 15 (a-d) - Imagens das nanoestruturas obridas por anodização em solução de etilenoglicol + 0,1 mol/L NH_4F + 3% vol de água a 50 V por 15 min nas diferentes velocidades de agitação (0, 1000, 2000 e 3000 rpm).	40
Figura 16(a-f) - Morfologia das camadas de nanotubos de óxido de ferro anódico após o recozimento por 2 h em (a) 200°C, (b) 300°C, (c) 400°C, (d) 500°C, (e) 600°C e (f) 700°C. O eletrólito utilizado foi à base de etilenoglicol contendo 0,5% em massa de NH_4F + 3% em vol H_2O agitado a uma velocidade de 90 rpm a 50 V durante 30 min.	42
Figura 17 - Padrão de XRD dos nanotubos de óxido de ferro recozidos a 300, 400, 500, 600 e 700°C.	43
Figura 18 – Mecanismo de produção de $\text{HO} \bullet$ produzidos da corrosão de materiais à base de ferro. Os íons Fe^{2+} e H_2O_2 formados durante a corrosão de Fe^0 , conduzem uma reação de Fenton e geram radicais hidroxila ($\text{OH} \bullet$).	45
Figura 19 - Ilustração dos mecanismos de corrosão para ligas Fe-Mn: a) reação de corrosão inicial, b) formação de camada de hidróxido, c) formação de pits, e d) formação de camada de cálcio / fósforo (Ca/P).	47
Figura 20 - Ilustração esquemática do processo de biodegradação das diferentes matrizes nanoestruturadas de óxido de ferro em solução SBF.	49
Figura 21 - Imagens de microscopia de fluorescência de células MG-63 cultivadas por 48 h em extratos de (a) ferro puro; anodizadas sob tensão de 60V durante 90s (b) e durante 150s (c) ambas em um eletrólito composto por 1,3 mol/L H_2O ; 0,09 mol/L NH_4F em ET e (d) controle positivo.	50

Figura 22 – Etapas do projeto de pesquisa.	51
Figura 23 - Forno a arco voltaico utilizado no processo de fusão dos lingotes de ferro (a) Forno de fusão, e (b) vista interna do forno, onde são mostrados os eletrodos de tungstênio utilizados para abertura do arco elétrico e o cadinho de cobre com o material para fusão.....	52
Figura 24 -(a) botão de ferro fabricado por fusão, (b) lingote de ferro fabricado após a união dos botões.	53
Figura 25 - (a) Forja rotativa utilizada no processamento dos lingotes de ferro e (b) lingote de ferro após o forjamento.....	54
Figura 26- a) Equipamento para anodização, constituído por uma fonte corrente contínua, um eletrodo auxiliar de platina e o eletrodo de trabalho contendo a amostra de ferro, colocado sobre um agitador magnético b) superfícies das amostras antes e após a anodização.	55
Figura 27 - Microscópios Eletrônicos de Varredura utilizados na obtenção de imagem. a) Zeiss EVO LS15/LAIMat e b) TESCAN MIRA 3/LABAS.	58
Figura 28 - Goniômetro modelo DSA 100S utilizado na avaliação de molhabilidade. Em detalhe uma gota de água deionizada sendo depositada.....	59
Figura 29 - (a) amostra suspensa por um fio de nylon em tubo Falcon (b) banho termostatzado mantido a 37°C por 3, 10 e 30 dias de imersão.....	61
Figura 30 - Espectroscópio de absorção atômica, Shimadzu, modelo AA7000.....	62
Figura 31 - (a-d) – Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) das amostras anodizadas em solução de etilenoglicol + 0,5 %NH ₄ F + 10% em volume de água por 15 min, em diferentes potenciais (20, 30, 40 e 50 V).	65
Figura 32 - (a-b) - Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) das amostras anodizadas em solução de etilenoglicol + 0,5 % NH ₄ F + 10% em volume de água por 180 min, em diferentes potenciais (30 e 50 V).	66
Figura 33 (a-c) - Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) das amostras anodizadas em solução de etilenoglicol + 0,3 %NH ₄ F + 3% em volume de água por 20 min, em diferentes potenciais (30, 40 e 50 V).	67

Figura 34 (a-h) - Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) das amostras anodizadas em solução de etilenoglicol + 0,3 %NH₄F + 3% em vol de água, sob 40 V e variação do tempo de 15 min e 30 min e agitação de 100 rpm e 1000 rpm. 69

Figura 35 (a-h) - Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) das amostras anodizadas em solução de etilenoglicol + 0,3 %NH₄F + 3% em vol de água, sob 50 V e variação do tempo de 15 min e 30 min e agitação de 100 rpm e 1000 rpm. 70

Figura 36 - Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura (MEV-FEG) da superfície do ferro puro após oxidação anódica em eletrólito à base de etilenoglicol + 0,3% NH₄F + 3% em volume de água, sob tensão de 50 V, agitação de 100 rpm durante 15 min e recozidas a (a) 150 °C, (b) 200 °C, (c) 250 °C, (d) 300 °C, (e) 350°C e (f) 400°C. 72

Figura 37- Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura (MEV-FEG) da superfície e lateral (detalhe) do ferro após oxidação anódica em eletrólito de etilenoglicol + 0,3 %NH₄F + 3% em vol. de H₂O, tensão de 50 V, agitação de 100rpm, durante 30 min e recozidas a (a) 150 °C, (b) 200 °C, (c) 250 °C, (d) 300 °C, (e) 350°C e (f) 400 °C. 75

Figura 38 – a) Espectro da difração de raios X das amostras de ferro após a anodização por 15 min e recozidas por 2 h em diferentes temperaturas. b) Zoom nas regiões de interesse demarcadas com as linhas vermelhas tracejadas. 76

Figura 39 - a) Espectro da difração de raios X das amostras de ferro após a anodização por 30 min e recozidas por 2 h em diferentes temperaturas. b) Zoom nas regiões de interesse demarcadas com as linhas vermelhas tracejadas. 77

Figura 40 -Espectros Raman das amostras de ferro após a anodização por 15 min(a) e 30 min (b) e recozidas por 2 h em diferentes temperaturas. 79

Figura 41 -Imagens por microscopia estereoscópica (0,80x) das amostras de substrato de ferro e das amostras anodizadas e recozidas a 350°C e 400°C, respectivamente, antes (a) e após a limpeza de produtos de corrosão formados durante a imersão por 3(b), 10(c) e 30(d) dias em solução de Hanks. 82

Figura 42 - Curvas dos valores de pH da solução de Hanks para os três grupos estudados (substrato, amostra anodizada e recozida a 350°C, amostra anodizada e recozida a 400°C) para os três tempos de imersão (a) 30 dias, (b) 10 dias e (c) 3 dias. 84

Figura 43 - Perda de massa e taxa de perda de massa do (a) substrato, (b) amostra anodizada e recozida a 350°C e (c) amostra anodizada e recozida a 400°C em solução de Hanks.	85
Figura 44- Média da taxa de degradação em mm/ano do substrato, amostra anodizada e recozida a 350°C e da amostra anodizada e recozida a 400°C, em função do tempo de imersão (30, 10 e 3 dias).....	86
Figura 45 - Imagens da amostra de substrato antes (a) e após (b) a imersão em solução de Hanks por 30 dias.	88
Figura 46- (a) Concentração de íons de ferro na solução de ensaio em função do tempo de imersão medida pelo AAS para as amostras de substrato e amostras anodizadas e recozidas a 350°C e 400°C; (b) perda de massa após o enxágue em água deionizada. .	90
Figura 47 - Ensaio MTT indireto do substrato e das amostras recozidas a 350°C e 400°C.	91
Figura 48 - Ensaio de adesão celular por Cristal Violeta.	92
Figura 49 - Expressão gênica de genes relacionados à adesão celular: Integrina- β 1 (a), Integrina- α 1 (b), Fak (c), Src (d), e Cofilina (e), utilizando a tecnologia q-PCR. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao controle.	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantidade e efeito de Mg, Fe e Zn no corpo humano.	16
Tabela 2 - Propriedade mecânica dos metais propostos para stents biodegradáveis em comparação aço inoxidável 316.	17
Tabela 3 - Composição solução de Hanks (Sigma Aldrich).....	60
Tabela 4 - Expressão gênica, sequência de primer e condições de reação da PCR.....	64
Tabela 5 - Dimensões das nanoestruturas formadas após a oxidação anódica e recozidas a diferentes temperaturas.	73
Tabela 6 - Dimensões das nanoestruturas formadas após a oxidação anódica e recozidas a diferentes temperaturas.	74
Tabela 7 - Valores de ângulo de contato para diferentes condições de anodização e recozimento.	80

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVO	19
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	20
3.2	BIOMATERIAIS METÁLICOS À BASE DE FERRO.....	25
3.3	TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS.....	28
3.3.1	Modificação de superfície por oxidação anódica.....	29
3.3.2	Eletrólito.....	34
3.3.3	Potencial de anodização.....	37
3.3.4	Tempo de anodização.....	38
3.3.5	Velocidade de agitação do eletrodo.....	39
3.3.6	Efeito da temperatura de recozimento na morfologia das camadas de ferro anódico.....	41
3.4	ESTUDOS <i>IN VITRO</i> EM MATERIAIS BIODEGRADÁVEIS À BASE DE FERRO.....	43
4	MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1	PROCESSAMENTO DO LINGOTE.....	52
4.2	OXIDAÇÃO ANÓDICA.....	54
4.3	CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE.....	58
4.3.1	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	58
4.3.2	Ângulo de contato.....	59
4.3.3	Análise de Difração de Raios X (XRD).....	59
4.4	ENSAIO DE DEGRADAÇÃO.....	60
4.5	ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	63
4.5.1	Cultura celular.....	63
4.5.2	Ensaio de viabilidade celular.....	63
4.5.3	Ensaio de adesão celular.....	63
4.5.4	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR).....	64
5	RESULTADOS	65
5.1	ANODIZAÇÃO.....	65

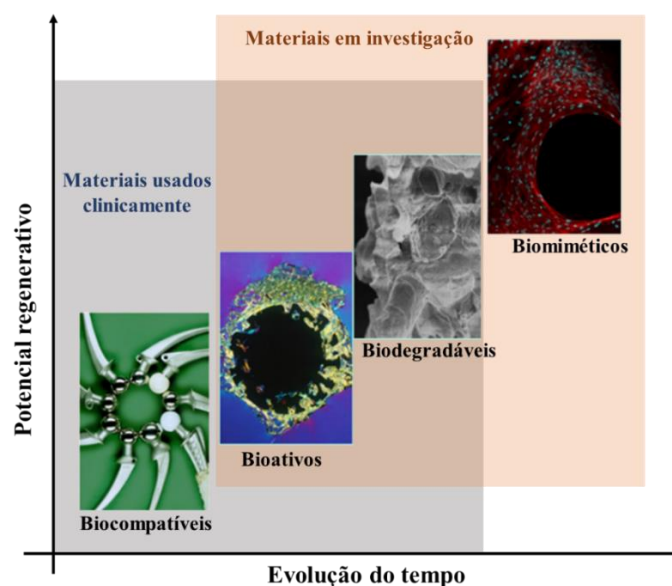
5.2	ENSAIO DE DEGRADAÇÃO – IMERSÃO ESTÁTICA EM SOLUÇÃO DE HANKS.....	81
5.3	ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	91
5.3.1	Viabilidade celular por metil tiazol tetrazolium (MTT)	91
5.3.2	Adesão celular.....	92
5.3.3	qPCR.....	93
6	CONCLUSÃO.....	96
	REFERÊNCIAS.....	97

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. Desde então houve muito progresso e o desenvolvimento de novos biomateriais e dispositivos médicos que possam melhorar a qualidade de vida da população, vem concentrando esforços e estudos por toda parte do mundo.

Inicialmente, entre as décadas de 1960 e 1970, os biomateriais eram projetados para serem bioinertes, ou seja, buscava-se obter materiais biocompatíveis que auxiliassem no crescimento do tecido danificado, promovendo suporte mecânico e com a mínima capacidade de resposta ao meio. Com o passar do tempo, os estudos passaram a considerar a bioatividade desses materiais, principalmente por meio da biointeração controlada com a interface do tecido hospedeiro, e também com o desenvolvimento de materiais biodegradáveis capazes de se dissolverem por completo após auxiliarem na cura do tecido. Uma outra geração mais recente de biomateriais são os chamados biomiméticos, que são materiais biodegradáveis que participam de forma ativa no processo de recuperação de tecidos, atuando de forma específica com estimulação em nível molecular (HOLZAPFEL et al., 2013; PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015; RATNER, 2019). O processo evolutivo do desenvolvimento dos biomateriais é ilustrado na Figura 1.

Figura 1 - Evolução da funcionalidade e desenvolvimento do potencial regenerativo dos biomateriais ao longo do tempo.



Fonte: Adaptado de Holzapfel et al. (2013).

Dentro deste cenário, o estudo de novos materiais biodegradáveis é essencial. Diferentemente dos materiais bioinertes, em que geralmente após o processo de cicatrização óssea é necessário realizar uma segunda cirurgia para retirada do dispositivo de fixação, os materiais biodegradáveis são degradados lentamente no corpo humano e substituídos pelo novo osso formado, podendo ser usados na fabricação de implantes cujas funções no corpo sejam temporárias, como placas de fixação, parafusos e *stents*.

Entre os implantes biodegradáveis estudados, o grupo de biomateriais metálicos apresentam vantagens como maior resistência, dureza e tenacidade quando comparados, por exemplo, aos polímeros biodegradáveis alternativos. Estes materiais devem conter elementos metálicos que podem ser metabolizados pelo corpo humano e devem apresentar uma boa biocompatibilidade com os tecidos a serem restaurados. Portanto, estas condições restringem os possíveis metais para aplicações biodegradáveis a três: magnésio, zinco e ferro (VOJTĚCH et al., 2015). Na Tabela 1 estão listados todos os elementos que podem ser encontrados no corpo humano, a dose diária e os efeitos causados por uma alta concentração desses elementos no organismo.

Tabela 1 – Quantidade e efeito de Mg, Fe e Zn no corpo humano.

Elemento	Quantidade Humana (g)	Função	Toxicidade	Permissão diária (mg)
Mg	25	Ativador de muitas enzimas; co-regulador da síntese de proteínas e contração muscular; estabilizador de DNA e RNA	Mg excessivo leva a náuseas	700
Fe	4-5	Componente de várias metaloproteínas; crucial em atividades bioquímicas vitais, ou seja, detecção e transporte de oxigênio	A toxicidade do ferro dá origem a lesões no trato gastrointestinal, choque e danos ao fígado	10-20
Zn	2	Elemento de rastreamento; aparece em todas as classes de enzimas; a maior parte do Zn aparece no músculo	Neurotóxico e impede o desenvolvimento ósseo em concentrações mais altas	15

Fonte: Adaptado de Zheng; Gu; Witte (2014).

Recentemente as ligas de magnésio e ferro têm sido propostas para a fabricação de *stents* biodegradáveis, e apesar de ambos os metais apresentarem desempenhos biológicos apropriados, as ligas de magnésio possuem taxas de degradação muito rápidas enquanto que o ferro puro apresenta taxa de degradação lenta. Apesar de alguns estudos relatarem que o zinco tem uma taxa de corrosão ideal e suas propriedades mecânicas são próximas às do magnésio, as pesquisas in vivo ainda estão em estágio inicial (GONG et al., 2015).

As propriedades mecânicas do ferro são mais atraentes do que as das ligas à base de magnésio, se comparadas ao aço inoxidável (Tabela 2). Além disso, estas propriedades podem ser aprimoradas através de modificações químicas, microestruturais e superficiais, podendo chegar a uma resistência de até 1450 MPa e a uma alta ductilidade (80% de alongamento) (HERMAWAN; DUBÉ; MANTOVANI, 2010a; LI; ZHENG; QIN, 2014).

Tabela 2 - Propriedade mecânica dos metais propostos para *stents* biodegradáveis em comparação aço inoxidável 316.

Material	Resistência ao escoamento (MPa)	Resistência à tração máxima (MPa)	Alongamento na ruptura (%)
Aço inoxidável 316L	190	490	40
Liga de Mg WE43	150	250	4
Ferro	150	210	40

Fonte: adaptada de Hermawan; Dubé; Mantovani (2010).

Os materiais biodegradáveis à base de ferro podem ter sua biocompatibilidade aprimorada através de novas rotas de processamento e tratamentos de modificação de superfície.

Uma forma de fornecer um equilíbrio entre o desempenho biomecânico e biofunção, é através da produção de estruturas porosas na superfície do material implantado. Propriedades como osteoindução, bioabsorção, biocompatibilidade e biodegradabilidade podem ser obtidas pela produção de nanoestruturas na superfície do material, proporcionando propriedades que forneçam uma melhor interação do implante com as células (CHEN; THOUAS, 2015; KROPF; MARIA; ANTUNES, 2018; LI et al., 2020).

A técnica eletroquímica conhecida como oxidação anódica é um mecanismo bem estabelecido para a fabricação de superfícies nanoestruturadas em metais. Este processo envolve a adsorção do oxigênio da solução eletrolítica no metal, formando uma camada óxida

sobre o substrato. Dependendo da composição do material, potencial, eletrólito entre outros parâmetros, o resultado pode variar de formação de nanoporos à nanotubos ordenados (WANG et al., 2014).

Este tratamento eletroquímico pode ser usado para funcionalizar os materiais biodegradáveis à base de ferro, fabricando nanoestruturas na superfície anodizada. Tais arranjos nanotubulares de óxido de ferro ainda não foram investigados como biomateriais. Portanto, para considerar a sua aplicação biomédica, é essencial investigar a influência das características nanoestruturadas no processo de degradação e biocompatibilidade do substrato de ferro (YANG et al., 2018).

2 OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo principal a produção de nanotubos na superfície de uma amostra de ferro puro empregando a oxidação anódica, buscando sua aplicação para posterior obtenção de materiais biomédicos biodegradáveis que tenham excelente resposta biológica após a implantação.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

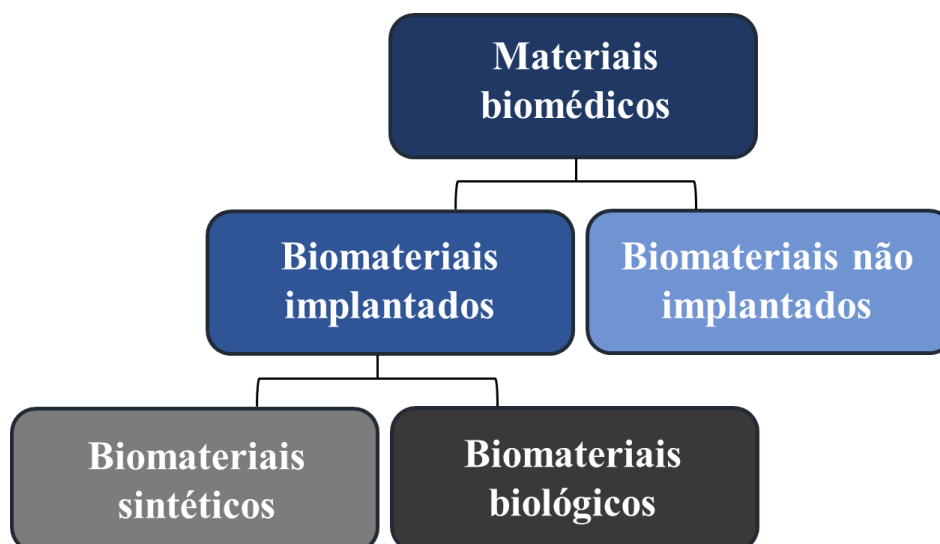
- Processamento do material;
- Estudo dos parâmetros de anodização para o crescimento de nanotubos de óxido de ferro na superfície do ferro puro;
- Caracterização da camada de óxido de ferro por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), ângulo de contato, análise de difração de raios X e espectroscopia de espalhamento Raman; para avaliar a morfologia e microestrutura formada;
- Realização de ensaio de degradação e estudos *in vitro* (MTT, Cristal Violeta e qPCR) com o objetivo de avaliar a viabilidade e adesão celular.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O termo “biomaterial” foi definido em 1986 como “um material não viável usado como dispositivo médico destinado a interagir com sistemas biológicos” (WILLIAMS, 1987). Outra definição mais aprimorada do termo, designa biomaterial como “qualquer substância (exceto drogas) ou combinação de substâncias de origem sintética ou natural, que pode ser usada por qualquer período de tempo, como um todo ou como parte de um sistema que trata, aumenta ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo” (WILLIAMS, 1999). A necessidade de redefinir o termo surgiu do fato de que os biomateriais foram sendo usados em muitas aplicações que não abrangiam apenas dispositivos implantados, mas também sistemas de administração de medicamentos, agentes de contraste de imagem e construções de engenharia de tecidos. A opinião da conferência realizada em 2018 em Chengdu, China, e organizada pela *International Union of Societies for Biomaterials Science & Engineering*, é a seguinte: “um material projetado para assumir uma forma que possa direcionar, por meio de interações com sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico” (GHASEMI-MOBARAKEH et al., 2019). Em outras palavras, um biomaterial é qualquer material biocompatível, sintético ou de ocorrência natural, que é usado para substituir ou auxiliar parte de um órgão ou tecido, enquanto em contato íntimo com ele. Deve-se ressaltar que o prefixo “bio” de biomateriais se refere a “biocompatível”, e não à “material biológico” ou “biomédico”. Geralmente, um material biológico é um material, como pele ou artéria, produzido por um sistema biológico. O estudo de biomateriais é chamado “ciência de biomateriais” ou “biomateriais de engenharia”, que engloba elementos de medicina, biologia, química, engenharia de tecidos e ciência de materiais (CHEN; THOUAS, 2015; RAGHAVENDRA; VARAPRASAD; JAYARAMUDU, 2015). A Figura 2 demonstra as classificações de “materiais biomédicos”, “biomateriais” e “materiais biológicos” definidos por Chen e Thouas (2015).

Figura 2- Classificação de materiais biomédicos, biomateriais e materiais biológicos.



Fonte: adaptado de Chen; Thouas (2015).

As propriedades dos biomateriais usados na medicina regenerativa dependem muito das propriedades dos materiais utilizados para sua fabricação (polímero, cerâmica, metal, carbono ou sua combinação), formas: material sólido, material poroso, assim como suas propriedades físicas e químicas. Os biomateriais usados para funções diferentes geralmente têm necessidades diferentes, portanto, suas propriedades ideais precisam ser julgadas em seu contexto específico de aplicação. (HUDECKI; KIRYCZYŃSKI; ŁOS, 2018). Os biomateriais metálicos se destacam em relação às demais classes de materiais, devido à sua ampla faixa de propriedades mecânicas, químicas e físicas. Os metais apresentam uma combinação de alta resistência mecânica e tenacidade a fratura, além de resistência ao desgaste e à fadiga, o que os tornam mais adequados para aplicações de suporte de carga quando comparados aos materiais cerâmicos ou poliméricos. Além disso, podem ser processados por tecnologias já estabelecidas como fundição, conformação, metalurgia do pó e usinagem (VOJTĚCH et al., 2015; ZENG et al., 2008).

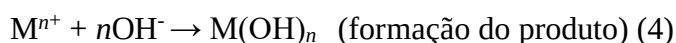
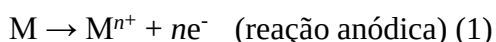
Atualmente, os biomateriais metálicos mais utilizados são os aços inoxidáveis (316L), ligas de titânio (Ti-6Al-4V) e ligas à base de cobalto-cromo. Todos esses materiais apresentam uma alta resistência à corrosão aos fluidos corpóreos, sendo considerados materiais bioinertes e são aplicados, principalmente, para a fabricação de implantes permanentes.

A maioria dos implantes metálicos é projetada considerando que o dispositivo permanecerá no corpo por toda a vida do paciente ou até que a vida útil do dispositivo chegue ao fim e necessite de uma cirurgia para sua remoção. Entretanto, existem algumas situações

clínicas específicas, como fratura óssea e bloqueio de vasos, que necessitam apenas de suporte temporário durante o processo de cicatrização do tecido e a utilização de um dispositivo biodegradável seria favorável. Os materiais biodegradáveis corroem gradualmente *in vivo*. Os produtos desta degradação não são tóxicos, podendo ser metabolizados ou assimilados por células ou tecido, e após cumprirem sua função no corpo, se dissolvem completamente e são eliminados pelo metabolismo normal do paciente (VOJTĚCH et al., 2015; WITTE, 2020).

Os metais biodegradáveis podem ser usados quando os tecidos de suporte de carga são acidentalmente ou cirurgicamente feridos e sua cura completa é realizada por dispositivos implantáveis auxiliares, que fornecem suporte mecânico até que o processo de cicatrização do tecido seja concluído. Nestes casos os metais biodegradáveis são vantajosos devido à sua força específica (força/densidade), que permite que os implantes metálicos biodegradáveis finos e de baixo volume tenham uma maior resistência em comparação aos polímeros biodegradáveis alternativos (por exemplo, ácido polilático - PLA), que apresentam menor resistência mecânica e dureza. Portanto, essas propriedades mecânicas dos metais biodegradáveis são viáveis, por exemplo, para minimizar a espessura da haste para *stents* cardiovasculares ou para parafusos de fixação de baixo volume em ossos pequenos (WITTE, 2020).

Quando os metais reagem com o fluido corpóreo, há a liberação de elétrons na solução e formação de íons positivos. Com base nos conceitos de eletroquímica sobre potencial de eletrodo padrão, reatividade e série galvânica (potencial de corrosão), todos os elementos metálicos que tenham potencial de eletrodo padrão abaixo de zero, exibem potencial para dar início a corrosão em um meio aquoso neutro (WITTE, 2020). A corrosão geralmente ocorre por meio de uma reação eletroquímica com eletrólito para produzir óxidos, hidróxidos, gás hidrogênio e outros compostos no ambiente fisiológico quase neutro. As reações de corrosão, que conduzem o processo de degradação dos materiais biodegradáveis, envolvem a dissolução anódica do metal e a reação de redução (reação catódica), como mostradas a seguir:



A Figura 3 demonstra o mecanismo de degradação do material biodegradável em um ambiente fisiológico. Após entrar em contato com o fluido corpóreo, o metal é oxidado em cátions metálicos de acordo com a reação anódica (reação 1). Os elétrons resultantes são

consumidos por uma reação catódica correspondente à reação de redução da água (reação 2) para materiais biodegradáveis à base de magnésio, e à reação de redução do oxigênio dissolvido (reação 3) no caso de materiais biodegradáveis à base de ferro. Essas reações ocorrem de maneira arbitrária sobre toda a superfície, aonde os pares galvânicos se formam devido as diferenças entre os potenciais da matriz metálica e a fase intermetálica, ou contorno de grão, como mostrado na Figura 3a. Simultaneamente a isso, as moléculas orgânicas como proteínas, aminoácidos e lipídios, serão adsorvidas pela superfície do metal influenciando desse modo, a dissolução do metal biodegradável (Figura 3a e 3b). A camada do produto de corrosão $M(OH)_n$ irá se formar na superfície metálica (reação 4). No entanto, o meio fisiológico é profundamente agressivo, principalmente devido a elevada concentração de íons cloretos que reagem com a camada de hidróxido metálico. A adsorção de cloreto ocasiona a quebra da camada protetiva $M(OH)_n$ e resulta na corrosão por pites (Figura 3c). Conforme o processo de degradação continua, o fosfato de cálcio se deposita na camada $M(OH)_n$ não dissolvida devido a alcalinização localizada e a saturação de cálcio e fosfato no fluido corpóreo. Também se observa que as células se aderem à superfície, e com o tempo, se proliferam para formar tecidos adjacentes à camada resultante a corrosão. Enquanto isso, o metal biodegradável pode se separar da matriz na forma de partículas irregulares e cair no meio circundante. Este fenômeno é frequentemente observado em materiais biodegradáveis à base de magnésio, mas raramente notado em materiais biodegradáveis à base de ferro (Figura 3d) (ZHENG; GU; WITTE, 2014).

biocompatibilidade. No entanto, as principais desvantagens da maioria das ligas biodegradáveis de magnésio estão relacionadas às elevadas taxas de corrosão *in vivo*. O ferro puro foi analisado principalmente para implantes cardiovasculares e *stents* de artéria coronária e apesar de apresentarem propriedades mecânicas superiores às ligas de magnésio, a desvantagem no emprego desses materiais está na sua baixa taxa de degradação. Ou seja, a taxa de degradação ideal para metais biodegradáveis deve estar entre magnésio e ferro puro. (CHENG et al., 2013; HERMAWAN et al., 2008; VOJTĚCH et al., 2015).

Portanto, muitas questões devem ser investigadas no desenvolvimento de novos materiais biodegradáveis, incluindo ajustes de propriedades microestruturais e mecânicas, mecanismos de biodegradação e seus fatores de influência, assim como o controle das taxas de degradação e melhoria da biocompatibilidade *in vivo* (ZHENG; GU; WITTE, 2014).

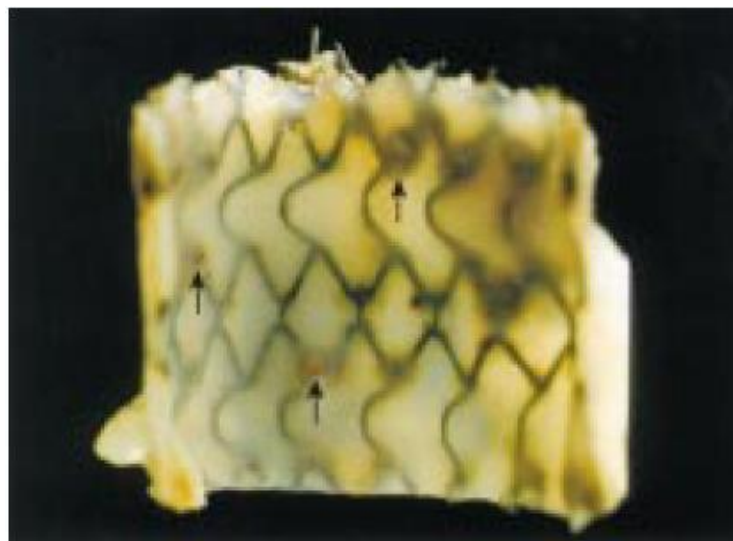
3.2 BIOMATERIAIS METÁLICOS À BASE DE FERRO

A primeira aplicação registrada do ferro para reparar o corpo humano foi em um implante dentário encontrado na Europa que datava de 200 d.C. Este implante foi devidamente integrado ao osso, e mesmo que não houvesse conhecimento biológico por trás desses procedimentos, sua resposta ao organismo foi impressionante (RATNER et al., 2004). Em 1647 Hieronymus Fabricius usava fios de ferro como material de sutura apropriado para tratar falhas de tecidos moles. Em 1775, foi aplicado com sucesso fios de ferro para apoiar a cicatrização de fraturas (SEITZ et al., 2015). Em 1906, Lambotte investigou pela primeira vez o uso de placas de ferro e parafusos para a fixação da fratura em um jovem de 17 anos, mas este tratamento resultou em uma falha clínica devido às extremidades fraturadas estarem frouxamente fixadas quatro meses após a cirurgia (WITTE, 2015). Em 1924, Zierold relatou um estudo sobre a reação do tecido ósseo a vários metais e constatou que o ferro e aço corroíam rapidamente levando à reabsorção do osso adjacente e que o magnésio e zinco descoloriam o tecido circundante (RATNER et al., 2004).

Naquela época, o ferro não se destinava a ser um implante biodegradável e foi escolhido devido às suas propriedades mecânicas. A biodegradabilidade do ferro puro foi explorada pela primeira vez por Peuster et al. em 2001. Foi avaliado a viabilidade de Fe (99,8%) através da implantação de *stents* de ferro nas aortas descendentes de coelhos brancos da Nova Zelândia. Além dos estudos *in vivo*, em que investigaram a aplicabilidade dos *stents* metálicos, também foram avaliadas as taxas de degradação *ex vivo* em uma solução eletrolítica de *ringer*. Uma

superfície endotelial intacta e continuamente lisa foi encontrada no implante, sem formação de trombo ou estreitamento significativo da artéria com *stent* em qualquer um dos animais. A superfície do *stent* cortado variou de marrom e preta, a parede vascular adjacente ao material implantado também apresentou uma coloração acastanhada (Figura 4) e todas as junções das hastes exibiram um acúmulo pronunciado de produtos de degradação, resultando em uma leve elevação das paredes dos vasos e uma descoloração acastanhada focal da íntima. Os pesquisadores também verificaram uma taxa de degradação lenta do ferro puro, superior a 6 meses (PEUSTER et al., 2001).

Figura 4 - Aorta de coelho com *stent* de ferro degradável após 12 meses de implantação (seção longitudinal) apresentando pontos de corrosão (setas).



Fonte: adaptado de Peuster et al.(2001).

Posteriormente, os pesquisadores avaliaram a viabilidade de um *stent* Fe puro (> 99,5%) na aorta descendente porcina por 360 dias em comparação aos *stents* produzidos em aço inoxidável. A Figura 5 mostra um *stent* de ferro típico investigado por Peuster et al., 2006. Os resultados obtidos estavam em concordância com os que foram apresentados em 2001. Os *stents* de ferro mostraram boa biocompatibilidade, baixa proliferação neointimal, comparável ao produzido a partir do aço inoxidável, sem sinais de toxicidade local ou sistêmica e assim como relatado no estudo anterior, o processo de degradação do ferro puro foi lento (PEUSTER et al., 2006).

Figura 5 - Fotografia de um *stent* de ferro corrosível no desenho de um *stent* Saxx periférico (CR Bard, Tempe, AZ, EUA), após o corte a laser e eletropolimento e antes da montagem no cateter balão.



Fonte: adaptado de Peuster et al. (2006).

Apesar da limitação relacionada a baixa taxa de degradação, os implantes de metal biodegradáveis à base de ferro podem fornecer alta resistência (até 1450 MPa) e alta ductilidade (até 80% de alongamento). A elevada resistência possibilita a fabricação de hastes finas, enquanto a alta ductilidade permite uma boa deformação plástica que auxilia na implantação vascular (LI; ZHENG; QIN, 2014).

Além da baixa taxa de degradação *in vivo*, revelada em testes preliminares em animais, uma outra limitação dos implantes de ferro é sua característica ferromagnética que prejudica a compatibilidade com alguns dispositivos de imagem, como por exemplo, a imagem por ressonância magnética. Deste modo, o desenvolvimento de novos tipos de metais biodegradáveis à base de ferro deve considerar tanto o aumento da taxa de degradação quanto o aumento das propriedades mecânicas. Esse efeito pode ser alcançado a partir da modificação da composição química do material, do controle da microestrutura ou através da modificação da superfície do ferro através da produção de micro porosidade. (ZHENG; GU; WITTE, 2014).

Portanto, o comportamento de degradação e biocompatibilidade das ligas à base de ferro podem ser aprimorados através das técnicas de processamento e modificação de superfície.

3.3 TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Avaliar as técnicas de modificação de superfície, buscando melhor interação entre o meio biológico e o implante é um fator muito importante no desenvolvimento de biomateriais. Quando um implante metálico é inserido ao corpo, sua superfície fica em contato direto com o tecido biológico resultando em uma sequência de interações físico-químicas e bioquímicas, que envolvem macromoléculas de tecidos e fluidos corporais. As características da superfície influenciam o comportamento das moléculas presentes no ambiente biológico, podendo controlar a formação de novos tecidos, já que a proliferação e diferenciação celular dependem da condição da adesão celular inicial (BAGNO; DI BELLO, 2004). Caso a superfície implantada seja incapaz de se integrar com o osso/ tecido adjacente há o risco de ocorrer a soltura do material implantado. Ou seja, o implante só poderá ser bem-sucedido se houver uma boa osseointegração, e o desenvolvimento desse processo depende de fatores como a química, rugosidade e topografia da superfície (GEETHA et al., 2009). Por todas essas razões, as técnicas de modificação de superfície têm sido sugeridas e aplicadas com o objetivo de tornar os implantes metálicos ainda mais eficientes e duradouros. Os tratamentos são divididos em três principais categorias: mecânicas, físicas e químicas.

- Métodos mecânicos: os tratamentos mecânicos de superfície levam a alteração da rugosidade superficial favoráveis a biomineralização sem afetar a sua composição. Estes tratamentos incluem lixamento, polimento e jateamento;
- Métodos físicos: os métodos físicos de modificação de superfície incluem processos como pulverização térmica, deposição física de vapor, implantação iônica e plasma *spray*. As alterações superficiais podem melhorar a resistência ao desgaste e resistência à corrosão;
- Métodos químicos: métodos que fornecem características bioativas à superfície através das reações químicas que acontecem na interface entre o metal e a solução. Estes tratamentos incluem ataques ácidos ou básicos, deposição química de vapor, oxidação anódica e recobrimento por *dip coating* e *spin coatings* (SOBIESZCZYK, 2010).

Todos os tratamentos de superfície podem levar a diferentes graus de bioativação, capazes de melhorar as propriedades mecânicas, químicas e biológicas dos implantes. A oxidação anódica é um método muito promissor para a produção de uma superfície nanoporosa e nanotubular em diferentes substratos metálicos, possibilitando a esses materiais um amplo espectro de aplicações.

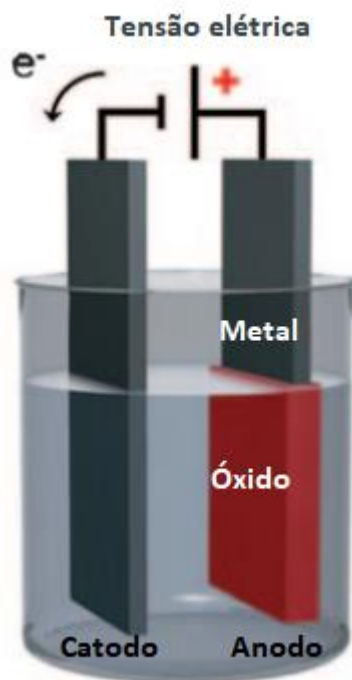
3.3.1 Modificação de superfície por oxidação anódica

Tratamentos eletroquímicos usados para produzir superfícies nanoestruturadas, especialmente óxido de titânio e nanotubos de carbono, têm atraído atenção para aplicações biomédicas. Devido à estrutura porosa, os nanotubos podem ser usados como reservatórios fármacos que podem ser carregados com diferentes medicamentos dependendo de sua aplicação, além de serem eficientes para funcionalizar diferentes biomateriais. As superfícies nanoestruturadas de óxido e arranjos nanotubulares de diferentes espessuras podem ser fabricadas pelo método de oxidação anódica.

Mesmo que os materiais à base de ferro tenham sido apontados como biomateriais biodegradáveis promissores, os arranjos nanotubulares de óxido de ferro ainda não foram explorados como biomateriais, mas espera-se que essa camada de óxido se degrade *in vivo* ao mesmo tempo que o substrato de ferro. Portanto, a fabricação de nanoestruturas biodegradáveis de óxido de ferro na superfície do material, pode ser uma maneira promissora para funcionalizar e melhorar a biocompatibilidade dos substratos de ferro para várias aplicações biomédicas (YANG et al., 2018).

A técnica eletroquímica conhecida como oxidação anódica ou anodização consiste em uma modificação de superfície que produz camadas de óxido protetoras em metais. Muitos estudos usaram a anodização para produzir filmes óxidos na superfície de titânio usados como implantes ortopédicos, obtendo novos avanços para a fabricação de superfícies nanoestruturadas (GHICOV; SCHMUKI, 2009; WANG et al., 2014). O processo de oxidação anódica, consiste na aplicação de uma diferença de potencial elétrico em dois eletrodos, um ânodo constituído do metal a ser anodizado e um cátodo de material inerte, imersos em um eletrólito (Figura 6).

Figura 6 - Representação de uma célula eletrolítica utilizada durante a oxidação anódica.



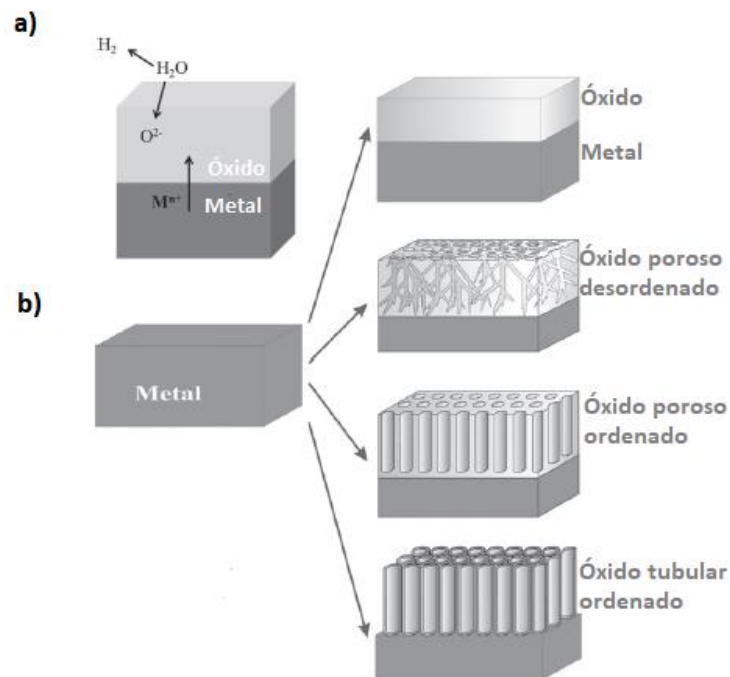
Fonte: adaptado de Roy et al. (2011).

Matrizes de óxido nanoporosas e nanotubulares altamente organizadas podem ser obtidas utilizando as condições anódicas adequadas. Quando os metais são expostos a uma tensão anódica em uma configuração eletroquímica, conforme mostrado na Figura 6, uma reação de oxidação $M \rightarrow M^{n+} + ne^-$ será iniciada na interface do metal-óxido. Dependendo do eletrólito e dos parâmetros de anodização, três possibilidades de reações podem existir:

- I) Os íons M^{n+} dos metais são dissolvidos no eletrólito e a corrosão, ou eletropolimento é observado;
- II) Os íons M^{n+} reagem com o O^{2-} (fornecido pela água presente no eletrólito) e formam uma camada de óxido compacta, não solúvel no eletrólito;
- III) Sob algumas condições eletroquímicas, a competição entre dissolução e formação de óxido é estabelecida, levando à formação de uma camada de óxido porosa (ROY; BERGER; SCHMUKI, 2011).

Sob condições experimentais mais específicas ocorrerá a auto-organização dos poros durante o crescimento e conjuntos de poros organizados ou estruturas nanotubulares alinhadas e ordenadas podem ser obtidas. A princípio, quatro morfologias de óxidos diferentes podem ser formadas controlando as condições anódicas, como mostrado esquematicamente na Figura 7b.

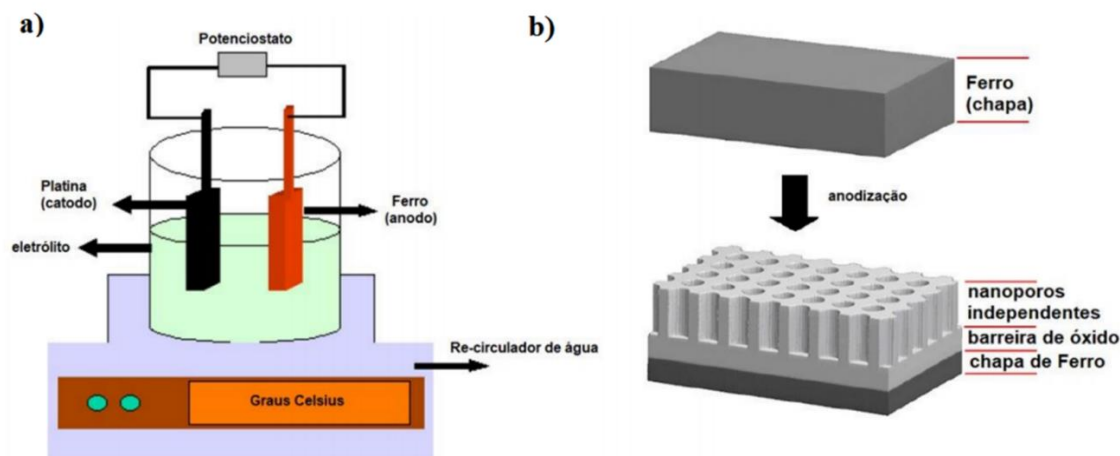
Figura 7 - a) mecanismo de formação do óxido no metal, b) morfologias obtidas por anodização eletroquímica - um filme de óxido compacto, uma camada de óxido porosa desordenada, uma camada nanoporosa ordenada ou uma camada nanotubular ordenada.



Fonte: Adaptado de Ghicov; Schmuki (2009).

Os primeiros estudos que relataram a formação de nanoporos alinhados na superfície do ferro foram realizados por Prakasam et al. (2006), e o eletrólito utilizado continha fluoreto e glicerol. A anodização foi realizada em um sistema de dois eletrodos, sendo a folha de ferro usada como anodo e a platina como contra-eletrodo (Figura 8a) e a estrutura do filme anodizado é mostrada esquematicamente na Figura 8b. A temperatura do banho de anodização foi controlada com o conjunto eletrolítico imerso em um refrigerador de água de recirculação

Figura 8 - (a) representação esquemática da anodização; (b) representação esquemática da estrutura de óxido de ferro porosa obtida via anodização.



Fonte: Adaptado Prakasam et al. (2006).

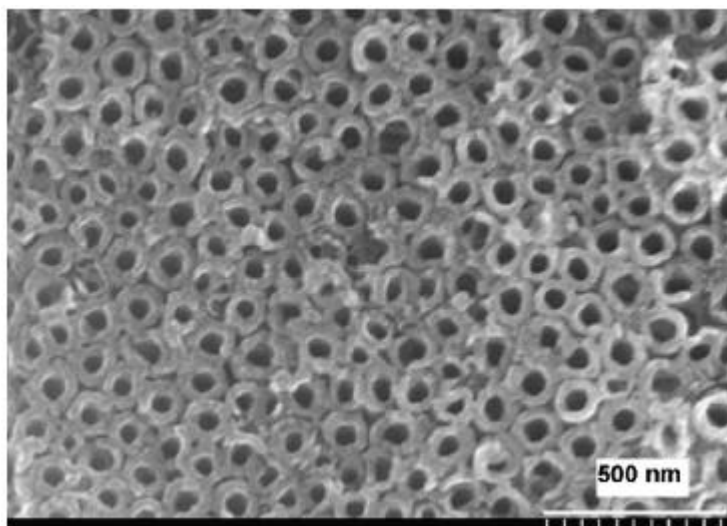
Nanoporos independentes foram obtidos em um eletrólito composto por $\text{HF} + \text{NH}_4\text{F} + \text{HNO}_3$ em glicerol. O tamanho médio dos poros variou de 50 a 250 nm no diâmetro de 300 a 600 nm no comprimento alterando de acordo com as condições de anodização, incluindo o potencial, tempo e temperatura do eletrólito. Além disso, os tratamentos térmicos também influenciaram na morfologia, sendo que períodos de recozimento mais longos e temperaturas mais altas resultaram no preenchimento dos poros (PRAKASAM et al., 2006).

Em eletrólito de glicerol contendo fluoreto, apenas uma camada nanoporosa de óxido de ferro é formada durante o processo de anodização. Em soluções à base de etilenoglicol, água e NH_4F , a transição da estrutura nanoporosa para nanotubular pode ser obtida a partir da variação de parâmetros como potencial e tempo de anodização, além da concentração de água e fluoreto na solução.

Rangaraju et al. (2010) sintetizaram nanotubos de óxido de ferro por anodização eletroquímica em solução de etilenoglicol com composição variando de 0,05-0,1 M NH_4F + 0-10% em volume de água deionizada (DI). O eletrólito foi agitado a uma velocidade de 100 rpm com uma barra magnética de 25 mm de comprimento e a anodização foi realizada sob um potencial constante na faixa de 10-60 V para tempos variando de 5 a 45 min. O conteúdo de água desempenhou um papel importante na formação da estrutura nanotubular. Estruturas nanoporosas foram obtidas a partir da adição de 1,5% de água, 0,1M de NH_4F a um potencial de 60 V. Quando a quantidade de água aumentou para 3% em volume, a evolução da estrutura

nanotubular foi observada após 15 min de anodização aplicando um potencial de 40 V (Figura 9). O eletropolimento do substrato de ferro em ácido sulfúrico 0,5 mol/L em 6 V por 5 min antes da anodização ajudou a formação de arranjos nanotubulares (RANGARAJU et al., 2010).

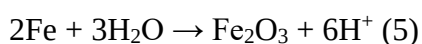
Figura 9 - Camada de nanotubos alinhada formada a partir da anodização do ferro em solução etilenoglicol (40 V, 15 min). A superfície do ferro foi eletropolida com ácido sulfúrico (0,5 mol/L 6V) antes da anodização.



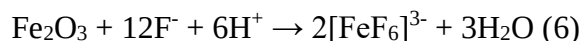
Fonte: Adaptado de Rangaraju et al. (2010).

Para analisar com mais detalhes o comportamento eletroquímico do filme anódico durante a formação do óxido nanotubular de ferro, foi registrada a curva de densidade de corrente versus tempo (Figura 10) para a anodização realizada em uma solução de etilenoglicol contendo 0,1 mol/L NH_4F e 3% em volume de água a 50 V por 15 min (LUCAS-GRANADOS et al., 2016). O comportamento corrente-tempo é semelhante ao observado na anodização de alumínio e titânio e três estágios são claramente observados. Inicialmente há uma queda da corrente devido a rápida formação de uma camada de óxido compacta no substrato (Fe_2O_3), seguido do aumento da corrente devido a corrosão do óxido por íons fluoreto presentes na solução.

Para eletrólitos ácidos e aquosos, uma camada de óxido inicial é formada por meio da seguinte reação geral (5):

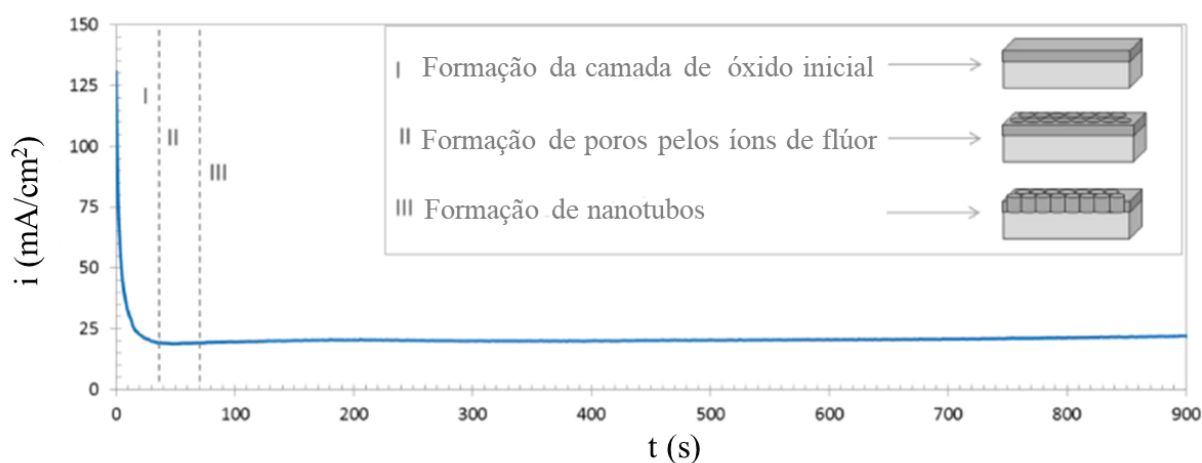


Em contrapartida, durante a segunda fase ocorre um aumento lento de densidade de corrente relacionada a uma dissolução química localizada devido aos íons de fluoreto:



Esse processo ocorre porque a presença de íons de fluoreto combinado com o alto potencial aplicado leva à dissolução parcial da camada compacta de Fe_2O_3 , e consequentemente, a formação uma estrutura nanoporosa.

Figura 10 - Densidade de corrente vs. tempo durante a anodização do ferro em uma solução de etilenoglicol contendo 0,1 mol/L NH_4F e 3 vol% H_2O , a 50 V durante 15 min.



Fonte: Adaptado Lucas-Granados et al. (2016).

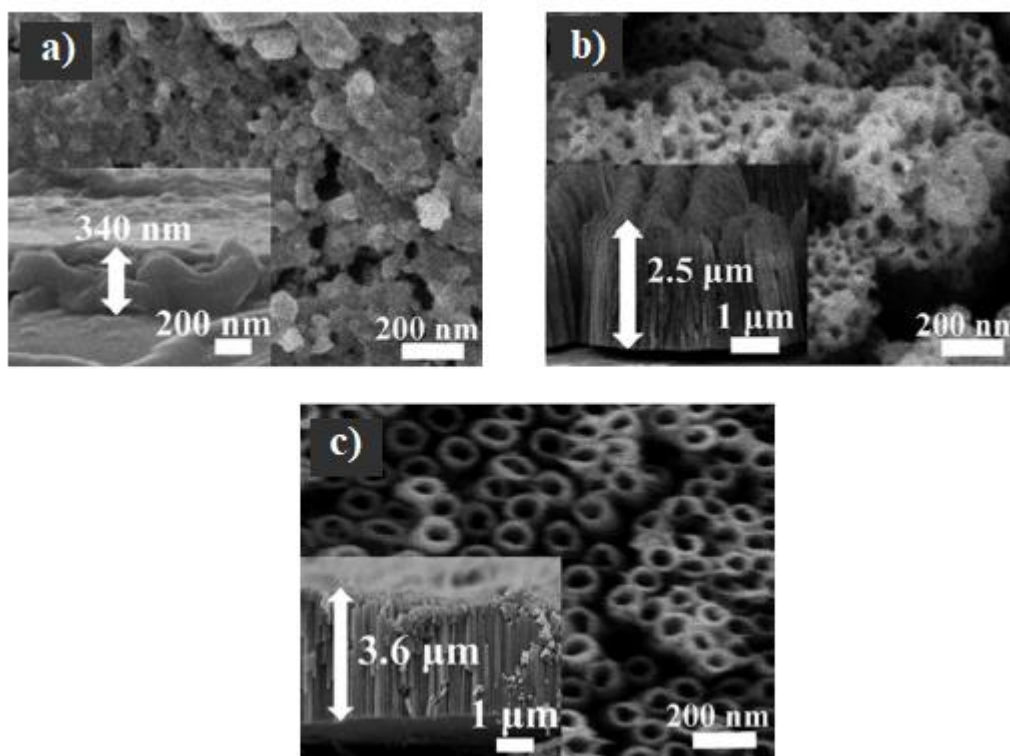
No terceiro estágio, a densidade de corrente se mantém, implicando um equilíbrio dinâmico entre a formação da camada de óxido e sua dissolução química por íons fluoreto o que resulta na formação da estrutura nanotubular. Esta transição na morfologia da superfície pode ser atribuída à dissolução seletiva da camada rica em fluoreto nos limites da estrutura porosa ordenada, porém para que haja sucesso na formação de nanotubos, a dissolução química deve estar aliada a uma série de outros fatores, como temperatura, teor de água e concentração de fluoretos na solução (LATEMPA et al., 2009; XIE et al., 2014).

3.3.2 Eletrólito

A natureza do eletrólito influencia fortemente na formação das matrizes nanoestruturadas. Dependendo da composição do eletrólito, podem ser produzidas diferentes intensidades de campo elétricos, além de variar a taxa de dissolução química da camada de óxido (INDIRA et al., 2015).

Para estudar a influência do teor de água na estrutura de óxido de ferro anódico, uma série de experimentos foram realizados com diferentes concentrações de água, variando de 0 a 10% em volume, em etilenoglicol + 0,5% em massa de NH_4F por 300 s a 60°C e com potencial de 50 V. Os resultados obtidos demonstraram como a concentração de água é determinante para o desenvolvimento de uma estrutura nanotubular. A estrutura formada na amostra de ferro anodizada sem água apresenta apenas uma camada densa de óxido com espessura de 340 nm (Figura 11a). Para os eletrólitos contendo 1 e 3% em volume de água, Figura 11b e Figura 11c, respectivamente, foi possível obter arranjos de nanotubos de óxido de ferro. O teor de 3% em volume de água (Figura 11c), se mostrou ideal para que o equilíbrio entre a formação e dissolução da camada de óxido seja alcançada, possibilitando a formação de nanotubos de alta qualidade (XIE et al., 2014).

Figura 11 (a-c) - Imagens das camadas de óxido de ferro fabricadas durante a anodização durante 300s a 60°C , sob tensão de 50 V em eletrólito contendo etilenoglicol + 0,5% em massa de NH_4F , e nas seguintes condições: sem adição de água (a), e com diferentes concentrações de água variando de 1%(b) e 3%(b) em volume.

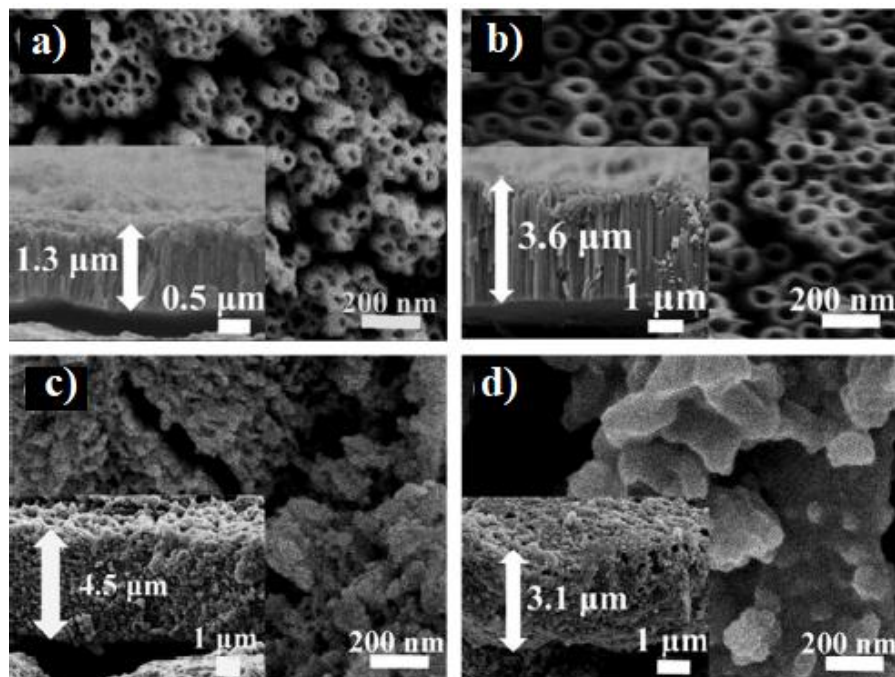


Fonte: Adaptado de Xie et al. (2014).

Para avaliar a influência do teor de NH_4F na formação da estrutura de óxido de ferro, foram realizados experimentos com diferentes concentrações de NH_4F , variando de 0,25 a 2,0%

em massa, em etilenoglicol + 3,0% em volume de água DI por 300 s a 60°C e potencial de 50 V. Foi possível observar que para concentrações de NH_4F superiores a 0,5% em massa, há a formação de camadas de óxido mais densas. A espessura da camada de óxido aumenta de 1,3 μm para 4,5 μm , conforme a concentração de NH_4F varia de 0,25 para 1,00% em massa, conforme observado na Figura 12a e Figura 12c. Para alta concentração de NH_4F (2,00% em massa) o efeito de dissolução é mais expressivo o que leva à diminuição da espessura da camada de óxido (Figura 12d).

Figura 12 - (a-d) - Imagens das camadas de óxido de ferro fabricadas durante a anodização a 50 V em etilenoglicol + 3% em volume de água por 300s a 60°C com diferentes concentrações de NH_4F , variando de 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0% em massa, respectivamente.



Fonte: adaptado de Xie et al. (2014).

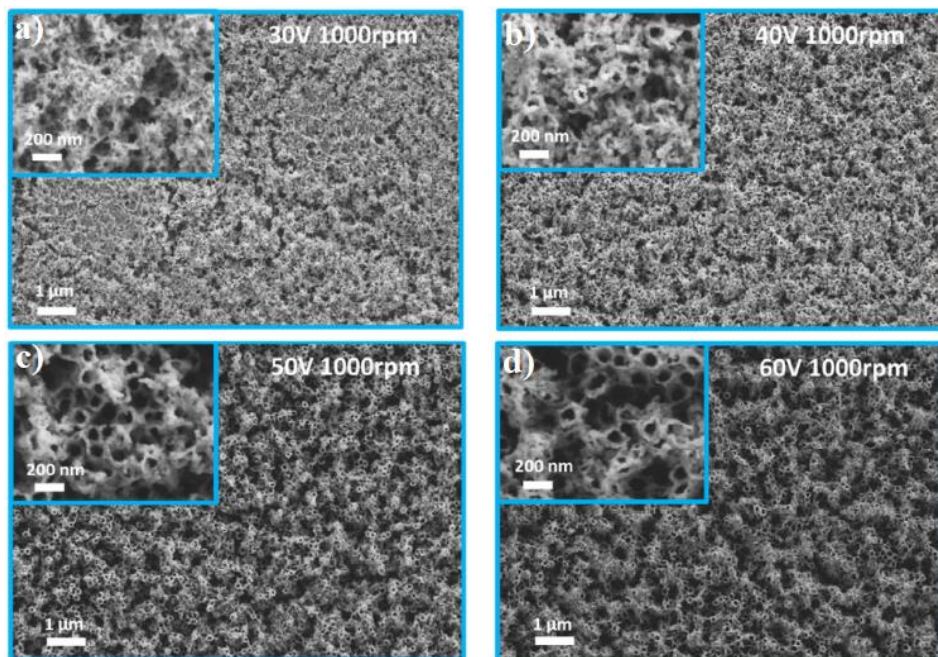
Portanto as concentrações de água e NH_4F podem levar a um processo de dissolução mais elaborado, não dissolvendo apenas as nanoestruturas na direção vertical, mas também criando espaços intermediários entre os poros que evoluem para uma estrutura nanotubular (YANG et al., 2018).

3.3.3 Potencial de anodização

De modo geral, o diâmetro nanotubular é relatado para muitos sistemas como sendo linearmente dependente do potencial anódico aplicado (GHICOV; SCHMUKI, 2009).

Para estudar o efeito do potencial de anodização na morfologia nas nanoestruturas sintetizadas, uma série de experimentos foram realizados nas tensões aplicadas de 30, 40, 50 e 60 V em uma solução de etilenoglicol + 0,1 mol/L NH_4F + 3,0% em volume de água DI. A anodização eletroquímica foi realizada em temperatura ambiente por 15 min sob agitação de 1000 rpm. As amostras anodizadas a 30 V (Figura 13a), apresentou uma estrutura que não estava bem definida, isto é, o potencial não foi capaz de formar uma estrutura nanotubular clara. O potencial de 40 V formou nanoestruturas mais homogêneas (Figura 13b) e mesmo não estando completamente formadas, a estrutura nanotubular começou a aparecer. As amostras anodizadas a 50 V apresentaram diferenças mais notáveis na morfologia (Figura 13c) apresentando uma nanoestrutura tubular bem definida e toda sua superfície homogênea. O mesmo pode ser observado para as estruturas resultantes da anodização a 60 V (Figura 13d), porém as nanoestruturas se mostraram mais empilhadas. Isso pode ser devido ao fato de que a taxa de dissolução de óxido de ferro na interface óxido/eletrólito é mais rápida que a taxa de formação do óxido de ferro na interface metal/óxido para potenciais superiores a 50 V (LUCAS-GRANADOS et al., 2019).

Figura 13 (a-d) - Imagens das nanoestruturas sintetizadas durante a anodização em solução de etilenoglicol + 0,1 mol/L NH_4F + 3,0% em volume de água por 15 min sob agitação de 1000 rpm, em diferentes potenciais (30, 40, 50 e 60 V).



Fonte: adaptado de Lucas-Granados et al. (2019).

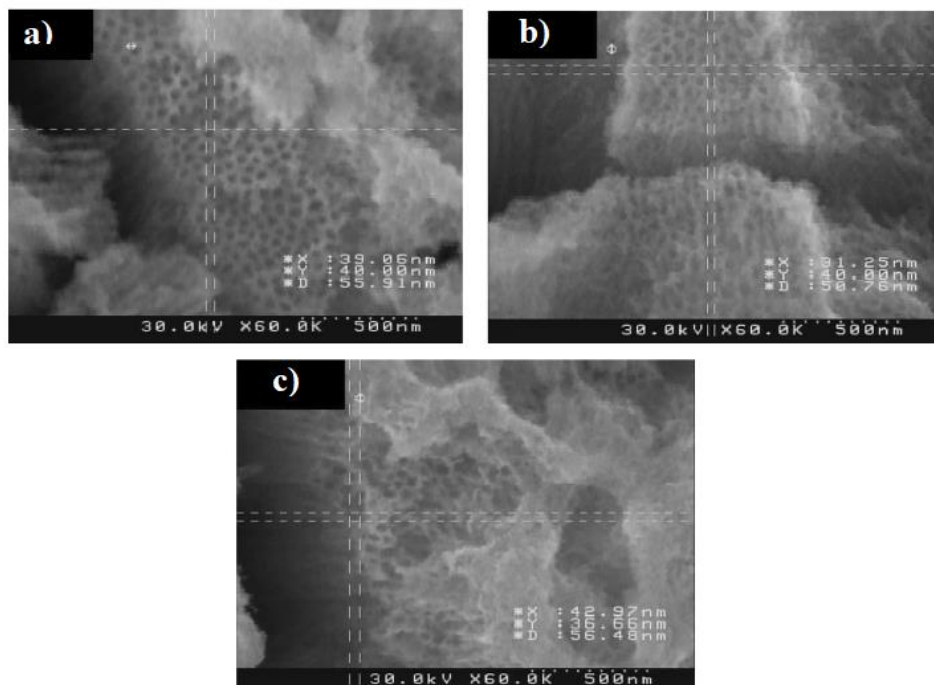
Além disso, outros estudos sobre a influência do potencial de anodização nas estruturas características do óxido de ferro anódico, mostraram que o diâmetro interno médio dos nanoporos/nanotubos exibem uma relação linear com o potencial de anodização (XIE et al., 2014).

3.3.4 Tempo de anodização

A espessura dos nanotubos depende linearmente do tempo de anodização, porém, isso só é apropriado até um certo período de tempo. Se a anodização for realizada por períodos muito longos as paredes nanotubulares podem ser perfuradas e o topo dos tubos podem ser recobertos por uma camada de óxido (WANG et al., 2014). Para melhorar o entendimento entre o tempo de anodização e as características da estrutura nanotubar do óxido de ferro, foi realizado anodização eletroquímica na folha de ferro em uma solução de etilenoglicol contendo 0,1 mol/L de NH_4F + 1 mol/L de H_2O sob uma tensão constante de 40 V para diferentes tempos. A partir da Figura 14(a-c), é possível observar que o tamanho médio dos poros foi de 39 nm para 60 min, 31 nm para 90 min e 43 nm para

120 min, ou seja, ao aumentar o tempo de anodização o comprimento dos nanotubos também aumenta, assim como o número de fissuras (MOMENI; GHAYEB; MOHAMMADI, 2015).

Figura 14 (a-c) - Imagens das nanoestruturas sintetizadas durante a anodização a 40 V em solução de etilenoglicol + 0,1 mol/L NH_4F + 1M de H_2O por 60, 90 e 120 min.



Fonte: adaptado de Momeni et al. (2015).

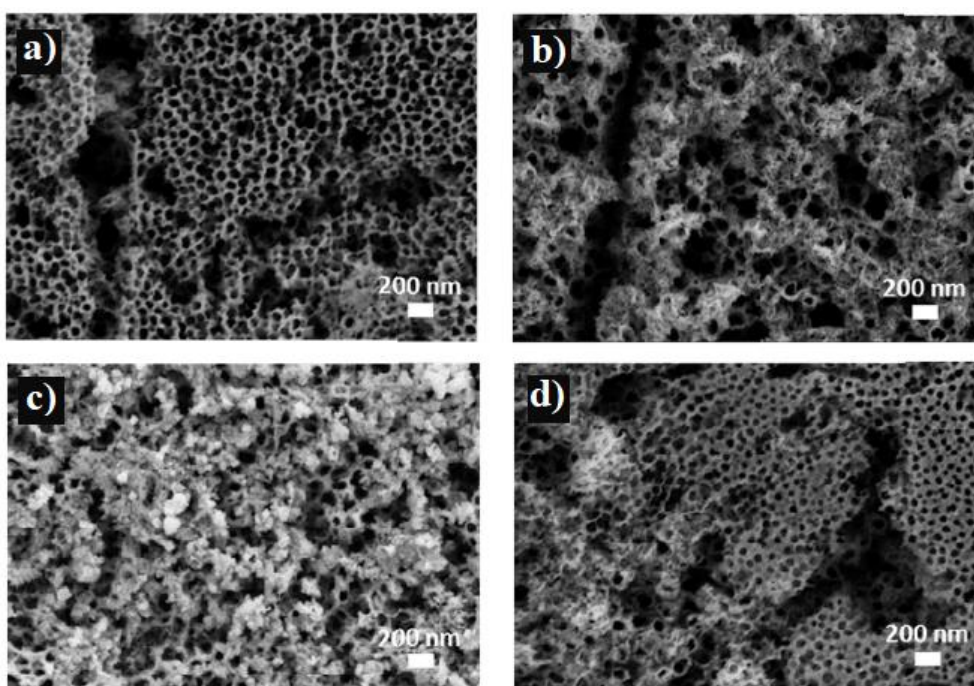
Uma superfície nanoporosa é obtida para tempos de anodização mais curtos, porém, durante o processo o eletrólito sofre autoaquecimento e a formação de nanotubos torna-se propícia com o crescente tempo de anodização (LATEMPA et al., 2009).

3.3.5 Velocidade de agitação do eletrodo

A maior parte dos estudos relacionados a anodização do ferro puro foram praticados em situações estáticas. Porém alguns autores relataram que as condições hidrodinâmicas controladas podem melhorar o processo de difusão e consequentemente facilitar o crescimento de nanoestruturas. A influência da velocidade de agitação do anodo durante o processo de anodização eletroquímica, foi estudada em uma solução de etilenoglicol contendo 0,1 mol/L (NH_4F) e 3% vol de água a 50 V por 15 min. O anodo (barra de ferro) foi conectado a um eletrodo de disco rotativo e diferentes velocidades de agitação foram aplicadas, variando de 0, 1000, 2000 e 3000 rpm.

A morfologia da camada anodizada em condição estática (Figura 15a) apresenta uma camada porosa rachada que cobre parcialmente os nanotubos, diminuindo a qualidade das nanoestruturas. Esta camada de iniciação parece desaparecer da morfologia formada para a amostra anodizada a 1000 rpm (Figura 15b), o que torna as entradas dos nanotubos mais acessíveis e melhor comportamento de transporte de elétrons. As amostras anodizadas a 2000 rpm (Figura 15c) exibem uma estrutura nanotubular colapsada e empilhada. Para a velocidade de agitação de 3000 rpm (Figura 15d), a morfologia apresenta em algumas partes uma camada de iniciação porosa, além de também apresentar nanotubos colapsados e empilhados. No entanto, é possível observar que a espessura das nanoestruturas não é afetada pela velocidade de agitação (LUCAS-GRANADOS et al., 2017).

Figura 15 (a-d) - Imagens das nanoestruturas obtidas por anodização em solução de etilenoglicol + 0,1 mol/L NH_4F + 3% vol de água a 50 V por 15 min nas diferentes velocidades de agitação (0, 1000, 2000 e 3000 rpm).



Fonte: adaptado de Lucas-Granados et al. (2017).

Outros estudos promoveram estruturas anodizadas em condições hidrodinâmicas através da agitação do eletrólito com uma barra magnética que também auxiliaram no processo de difusão e possibilitaram a formação de nanoestruturas mais homogêneas e bem ordenadas (RANGARAJU et al., 2010; SARMA et al., 2015).

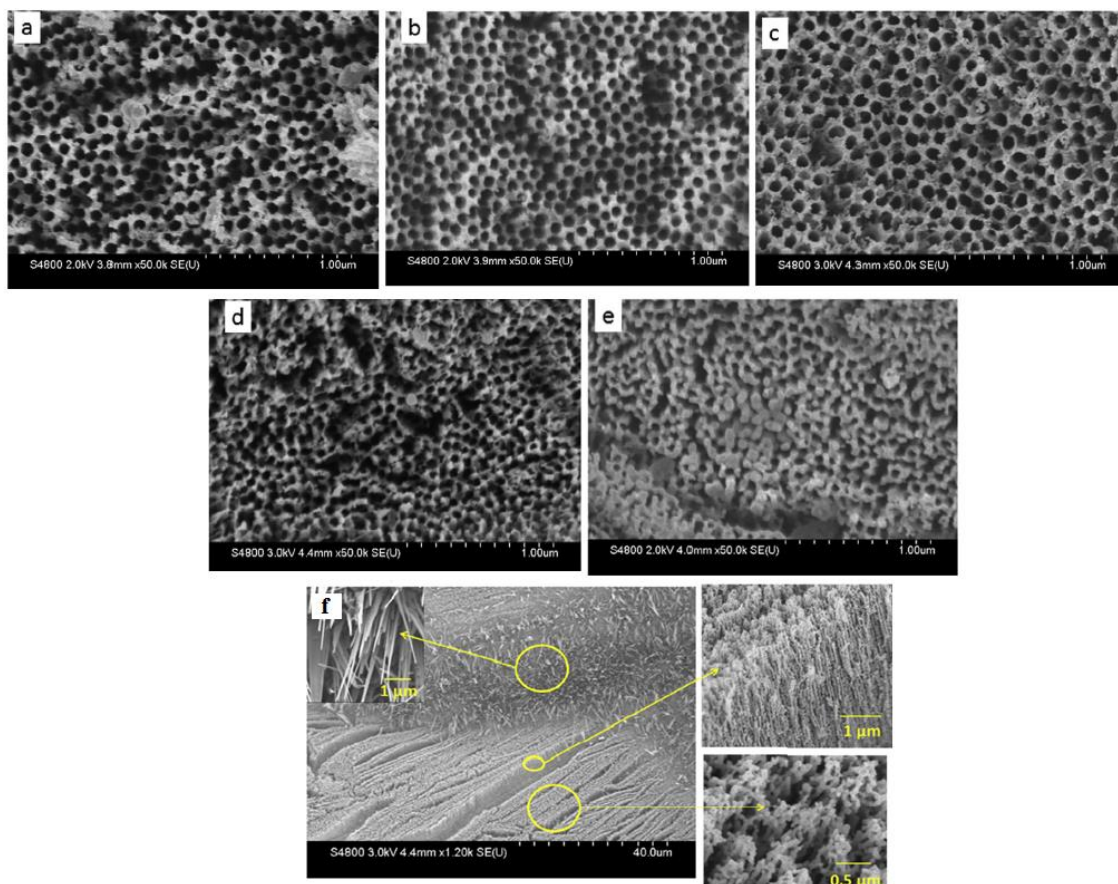
3.3.6 Efeito da temperatura de recozimento na morfologia das camadas de ferro anódico

A estrutura das amostras anodizadas em soluções à base de etilenoglicol são amorfas independentemente dos parâmetros usados durante o processo de anodização e, portanto, um tratamento de recozimento é necessário para conduzir a cristalização do óxido de ferro anódico. É possível obter camadas nanoporosas organizadas de Fe_2O_3 em até 60°C , porém a mudança da morfologia porosa para tubular pode ser atingida em temperaturas mais elevadas. Nestas condições, o material presente entre os poros está suscetível à dissolução e com isso tubos individuais com distâncias entre poros idênticas podem ser obtidos. Albu et al. mostraram que as estruturas nanoporosas consistem principalmente de FeO_x e FeF_x . No entanto, o processo de recozimento térmico reduz o conteúdo de fluoreto da estrutura amorfa, levando à obtenção de diversos tipos de óxido de ferro, como por exemplo hematita e magnetita (ALBU; GHICOV; SCHMUKI, 2009; DENG et al., 2015; PAWLIK et al., 2017).

Para investigar os efeitos dos tratamentos térmicos sobre a morfologia e estrutura cristalina dos nanotubos do óxido de ferro, Sarma et al. (2014) prepararam as amostras por anodização e as submeteram ao processo de recozimento ao ar a 200, 300, 400, 500, 600 e 700°C . A temperatura foi elevada a uma taxa de $5^\circ\text{C}/\text{min}$ e mantida por 2 h seguido de um resfriamento natural. As amostras recozidas foram anodizadas em um eletrólito constituído de etilenoglicol com 0,5% em massa de NH_4F e 3% em volume de água. O eletrólito foi agitado a 90 rpm e a anodização foi realizada a uma tensão constante de 50 V durante 30 min.

Após o recozimento a 200, 300 e 400°C (Figura 16a-c), as estruturas de nanotubos de óxido de ferro se apresentaram bem conectadas e uniformemente ordenadas, sem mudanças no diâmetro do tubo e na espessura da parede. Porém, quando a temperatura aumentou para 500°C a morfologia apresentou uma pequena desordem nas matrizes nanotubulares (Figura 16d), ainda que integridade da estrutura nanotubular tenha sido razoavelmente mantida. Quando o arranjo nanotubular de óxido de ferro anodizado foi recozido a 600 e 700°C (Figura 16e, Figura 16f), ocorre o colapso dos nanotubos, que são alterados para uma estrutura de *nanorod* (NR), isto é, nanoestruturas em formato de bastões. Por isso, para que a morfologia nanotubular seja mantida, a temperatura de recozimento não deve ser superior a 500°C (SARMA et al., 2014).

Figura 16(a-f) - Morfologia das camadas de nanotubos de óxido de ferro anódico após o recozimento por 2 h em (a) 200°C, (b) 300°C, (c) 400°C, (d) 500°C, (e) 600°C e (f) 700°C. O eletrólito utilizado foi à base de etilenoglicol contendo 0,5% em massa de NH_4F + 3% em vol H_2O agitado a uma velocidade de 90 rpm a 50 V durante 30 min.



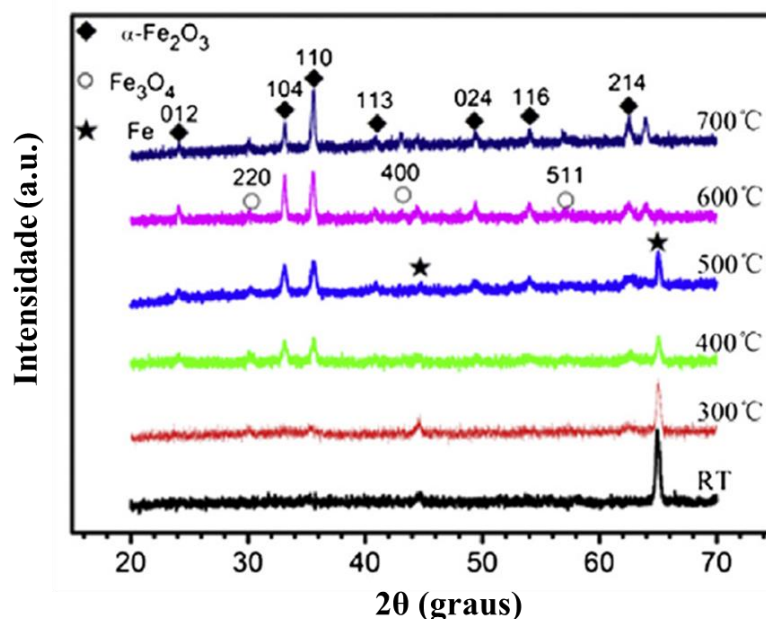
Fonte: Adaptado de Sarma et al., (2014).

Um efeito semelhante da temperatura de recozimento sobre a morfologia e estrutura cristalina das camadas anódicas, foi observado por Pawlik et al. (2017). As amostras preparadas foram recozidas ao ar a 200, 300, 400 e 500°C por 2 h. Foi possível observar um desprendimento das camadas de óxido para as amostras que foram recozidas acima de 500°C, e isso pode ser explicado pelo processo de oxidação térmica direta no substrato metálico, levando a formação de uma camada espessa de óxido que é destacável com facilidade (PAWLIK et al., 2017).

Os efeitos da temperatura de recozimento na cristalização dos nanotubos de óxido de ferro, também foram analisados por Xie et al. (2014), para as amostras preparadas após a anodização em eletrólito à base de etilenoglicol com 0,5% em massa de NH_4F e 3,0% em volume de água DI durante 300 s a 50 V e 60°C. As amostras foram recozidas em 300, 400, 500, 600 e 700° C no ar por 2 h com taxas de aquecimento e resfriamento de 2°C/min. As

composições da fase dos nanotubos de óxido de ferro antes e após o recozimento em diferentes temperaturas, foram analisadas pela técnica de difração de raios X (XRD). O resultado obtido (Figura 17) mostra que o óxido de ferro anodizado passou de amorfo e após os tratamentos de recozimento foi gradualmente cristalizado na fase hematita $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Os picos observados em $24,12^\circ$; $33,17^\circ$; $35,60^\circ$ (mais intenso); $40,91^\circ$; $49,41^\circ$; $53,98^\circ$ e $62,56^\circ$ são atribuídos aos respectivos planos de hematita (012), (104), (110), (113), (024), (116) e (214). Também pode ser observado uma quantidade muito pequena de magnetita (Fe_3O_4) como fase secundária (XIE et al., 2014).

Figura 17 - Padrão de XRD dos nanotubos de óxido de ferro recozidos a 300, 400, 500, 600 e 700°C .



Fonte: Adaptado de Xie et al. (2014).

3.4 ESTUDOS *IN VITRO* EM MATERIAIS BIODEGRADÁVEIS À BASE DE FERRO

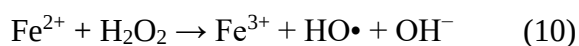
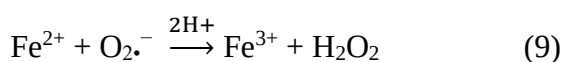
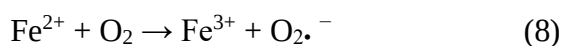
O ferro é um cofator indispensável para inúmeras enzimas envolvidas em diversos processos fisiológicos, tais como síntese de DNA, ligação de oxigênio atômico e atividades redox de enzimas (ZHU et al., 2009).

A concentração média de ferro no corpo humano é de aproximadamente 35 a 45 mg/kg em mulheres e homens adultos respectivamente (LIEU et al., 2001). Embora desempenhe um

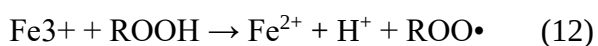
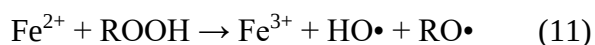
papel crucial na saúde, principalmente nas funções neuronais e imunológicas, a deficiência de ferro é um problema mundial. Um relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 46% das crianças de 5 a 14 anos no mundo são anêmicas (ARREDONDO; NÚÑEZ, 2005).

Assim como a deficiência do ferro pode afetar a saúde humana, sua saturação no organismo pode acarretar risco de toxicidade e morte celular através da formação de radicais livres e peroxidação lipídica (EATON; QIAN, 2002).

Os processos eletroquímicos que ocorrem na superfície do material implantado têm um importante efeito no sistema biológico local. Após o implante de um *stent* à base de ferro, o oxigênio dissolvido promove a corrosão do metal, que leva à formação de Fe^{2+} e do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que participam das reações Fenton e de Haber-Weiss, produzindo radicais hidroxila ($\text{HO}\bullet$), como mostrado na Figura 18. A principal fonte de $\text{HO}\bullet$, em pH neutro, causa a formação de ânion superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) por meio da conhecida reação de Fenton, que envolve uma série de reações de transferência de um elétron como descritas a seguir (SCARCELLO et al., 2020).

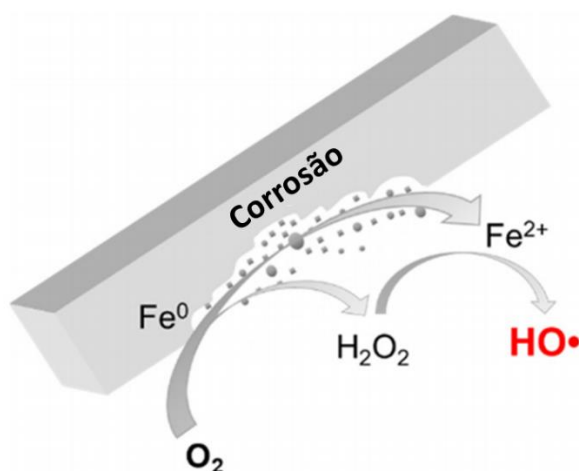


Os íons ferrosos produzidos pela corrosão do Fe (0) também podem gerar radicais orgânicos, como radicais peroxil ($\text{ROO}\bullet$) pelo ciclo de Haber-Weis:



O $\text{HO}\bullet$ é o oxidante mais reativo encontrado em sistemas biológicos e com propriedades pró-inflamatórias significativas, capaz de induzir peroxidação lipídica, estresse oxidativo e modificação do DNA (SCARCELLO et al., 2020).

Figura 18 – Mecanismo de produção de $\text{HO} \bullet$ produzidos da corrosão de materiais à base de ferro. Os íons Fe^{2+} e H_2O_2 formados durante a corrosão de Fe^0 , conduzem uma reação de Fenton e geram radicais hidroxila ($\text{OH} \bullet$).



Fonte: adaptado de Scarcello et al. (2020).

Os radicais hidroxila ($\text{HO} \bullet$), superóxido ($\text{O}_2 \bullet^-$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são os intermediários reativos de oxigênio (ROIs) e subprodutos inevitáveis da respiração aeróbica. Porém, a corrosão descrita nas reações 7-10 ocorrem da mesma maneira que para um material à base de ferro implantado em uma artéria, podendo gerar uma quantidade relevante de ROIs que reagem com qualquer molécula nas proximidades de sua formação, promovendo a morte celular e lesão do tecido (SCARCELLO; LISON, 2020; SCHINHAMMER et al., 2013).

Ainda que o ferro seja um elemento essencial para várias funções metabólicas do corpo e seus produtos de degradação não induzam toxicidade local ou sistêmica (PEUSTER et al., 2006), a função do tecido arterial não foi avaliada. Embora as partículas de ferro inaladas tenham sido consideradas perigosas para o pulmão devido a produção de ROS, incluindo $\text{HO} \bullet$, a ligação entre os radicais gerados a partir da corrosão dos materiais à base de ferro e como esses produtos podem impactar o tecido vascular, permanece pouco explorada no campo dos materiais biodegradáveis para dispositivos médicos (SCARCELLO; LISON, 2020). O mecanismo de toxicidade de implantes de titânio relacionado aos intermediários reativos do oxigênio, foi recentemente explorado por Tsaryk et al. (2013), e os estudos demonstraram que as ROS formadas pela corrosão do metal induzem um estresse oxidativo nas células endoteliais.

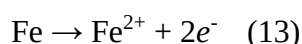
Zhang et al. (2010) realizaram experimentos *in vitro* em ferro puro com a finalidade de avaliar a biocorrosão e compatibilidade sanguínea deste material. A citotoxicidade foi avaliada por contato indireto por meio da técnica do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil

brometo de tetrazolina). Com base no mecanismo de toxicidade (devido ao acúmulo de ROS e seus efeitos) e avaliando os resultados de viabilidade celular obtidos, uma conclusão importante foi revelada: a toxicidade do ferro é provocada somente quando a concentração de ferro nas células atinge um determinado valor. Neste caso, a concentração segura de ferro deveria ser inferior a 0,075 mg/ml, valor próximo a concentração segura calculada por Zhu et al. (2009), que relataram um efeito favorável na atividade metabólica para uma concentração de 0,01 mg/ml de íons de ferro, enquanto que concentrações maiores a 0,050 mg / ml poderiam provocar citotoxicidade nas células. Portanto, é muito importante detectar e confirmar o valor seguro da concentração de íons de ferro e para isso mais pesquisas sobre a taxa de degradação do ferro *in vivo* são necessárias.

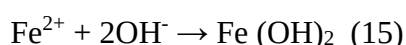
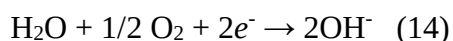
Além de todos estes mecanismos oxidativos, deve-se levar em consideração que as ligas à base de ferro possuem uma lenta taxa de dissolução, característica esta que também pode estabelecer algumas limitações em aplicações clínicas. Portanto, para que seja possível desenvolver novas ligas com melhores propriedades de degradação, um sistema de corrosão *in vitro* que simule o processo de degradação *in vivo* deve ser estabelecido, e assim as propriedades de biocorrosão das novas ligas podem ser avaliadas (ZHEN; XI; ZHENG, 2013).

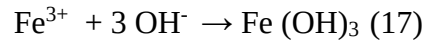
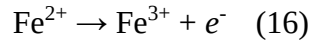
Os ensaios de corrosão *in vitro* possibilitam analisar as propriedades de corrosão *in vitro* dos materiais biometálicos e simular o processo de degradação *in vivo* destes materiais por meio de métodos como testes eletroquímicos e ensaio de perda de massa. Geralmente, são selecionados dois tipos de fluidos para a realização dos ensaios: solução balanceada de Hank's (HBSS) e fluido corporal simulado (SBF) (YANG; ZHANG, 2009).

Moravej et al.(2010) avaliaram o mecanismo de degradação do ferro por ensaio de imersão estática em solução de Hanks. As amostras foram retiradas após 14 dias e então caracterizadas. Baseado nos produtos de corrosão detectados por EDS e DRX na superfície do ferro corroído, o mecanismo de degradação sugerido é: quando o Fe é imerso na solução, ele é oxidado a Fe^{2+} de acordo com a seguinte reação:

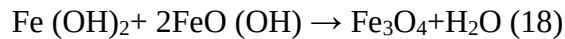


Alguns íons Fe^{2+} podem ser transformados em íons Fe^{3+} sob a condição de pH alcalino combinado com ao ambiente de oxigênio da solução de Hanks, e $\text{Fe}(\text{OH})_3$ é produzido:



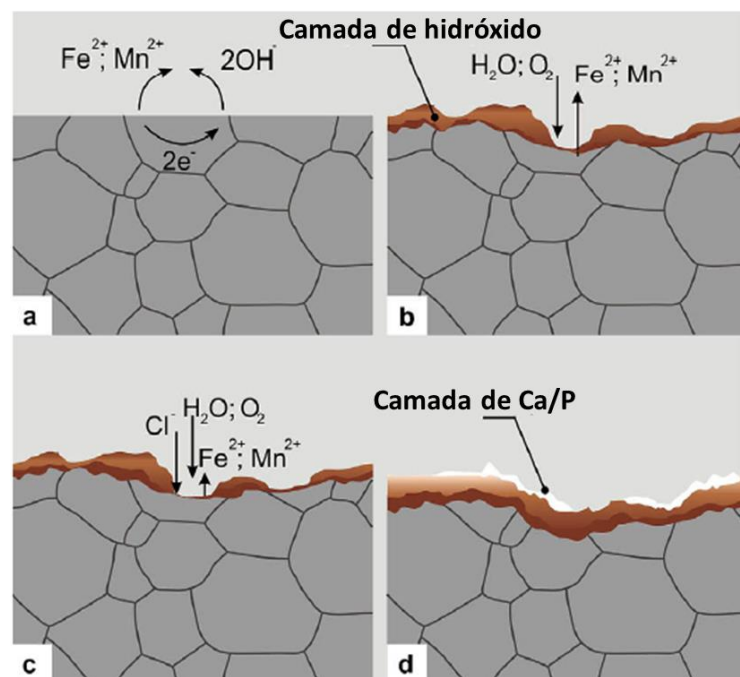


Conforme a solução é aerada e na presença de íons cloreto, o hidróxido férrico, $\text{Fe}(\text{OH})_3$, é hidrolisado e a goethita ($\alpha\text{-FeO}(\text{OH})$) precipita. O hidróxido ferroso ($\text{Fe}(\text{OH})_2$) irá reagir com parte de $\text{FeO}(\text{OH})$ e então é formada a magnetita:



Precipitação de cálcio e fósforo da solução junto com o óxido e hidróxido formado na superfície do ferro é responsável pela diminuição da taxa de liberação de íons após os primeiros dias de ensaio (ZHEN; XI; ZHENG, 2013). A Figura 19 demonstra o mecanismo de degradação da liga Fe-Mn durante o ensaio de degradação dinâmico na solução de Hank's (HERMAWAN et al., 2010).

Figura 19 - Ilustração dos mecanismos de corrosão para ligas Fe-Mn: a) reação de corrosão inicial, b) formação de camada de hidróxido, c) formação de pits, e d) formação de camada de cálcio / fósforo (Ca/P).



Fonte: adaptado de Hermawan et al. (2010).

No caso da implantação in vivo de um material à base de ferro, a presença de uma camada de degradação em sua superfície não seria uma preocupação, pois foi demonstrado na implantação de *stent* de ferro, que os produtos de degradação foram eliminados e não houve

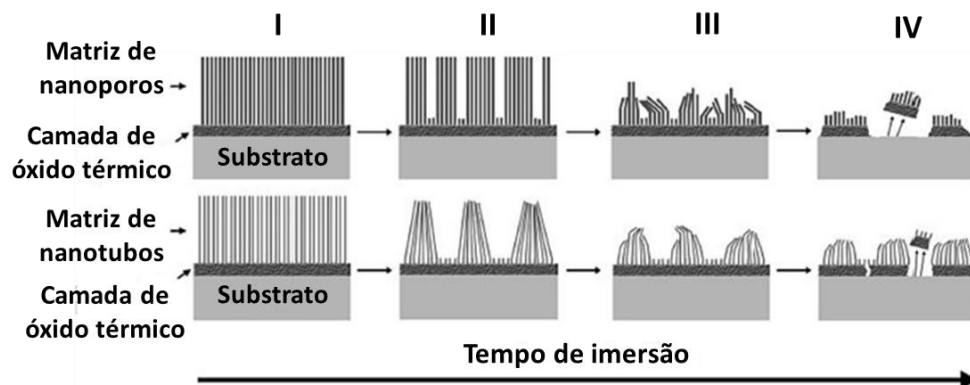
toxicidade sistêmica devido ao acúmulo local de produtos de corrosão (PEUSTER et al., 2001). Além disso, esta camada de aglomerados com quantidades significativas de cálcio e fósforo é interessante, pois a presença desses dois elementos pode formar hidroxiapatita, considerada biocompatível e um constituinte mineral natural encontrado no osso (HERMAWAN et al., 2010; ZHEN; XI; ZHENG, 2013).

O aprimoramento nas propriedades de corrosão pode ser alcançado por meio de vários tratamentos de superfície, como como lixamento, revestimento ou oxidação que alteram a rugosidade superficial e consequentemente a taxa de corrosão dos materiais. Além de que, a rugosidade da superfície tem efeito sobre a proliferação e diferenciação celular (ZHEN; XI; ZHENG, 2013). A partir da literatura, verifica-se que o efeito das nanoestruturas formadas na superfície das ligas à base de ferro aplicando-se a da técnica de oxidação anódica, assim como sua influência nas propriedades de degradação para esta classe de metais biodegradáveis, ainda não foi explorado.

Yang et al. (2018) analisaram como as matrizes nanoestruturadas de óxido de ferro com morfologias diferentes (nanotubular e nanoporosa) fabricados na superfície de amostras de ferro puro por anodização, podem influenciar no comportamento de degradação do material. Para avaliar a resistência à corrosão das amostras anodizadas foram realizados testes eletroquímicos e de imersão em solução de fluido corporal simulado (SBF). Para o ensaio de imersão, as amostras foram imersas em SBF por até 28 dias e analisada a cada 7 dias pra posterior análise da composição, morfologia da superfície e adesão/descolamento das camadas nanoestruturadas de óxido de ferro. Além disso, para avaliar a citocompatibilidade *in vitro* do material, foram realizados experimentos com células de contato indireto empregando amostragens da solução de imersão das nanoestruturas de óxido de ferro em células MG-63 semelhantes a osteoblastos humanos (YANG et al., 2018).

A Figura 20 ilustra os 4 estágios do o processo de biodegradação das matrizes nanoestruturadas de óxido de ferro em substratos de ferro puro.

Figura 20 - Ilustração esquemática do processo de biodegradação das diferentes matrizes nanoestruturadas de óxido de ferro em solução SBF.



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

I) As nanoestruturas de óxido de ferro são destacadas parcialmente da camada de óxido térmico e as rachaduras formadas originalmente durante o processo de anodização, aumentam;

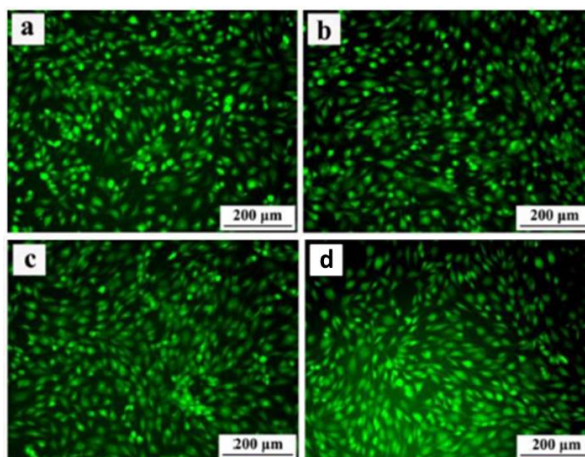
II) As nanoestruturas de óxido de ferro restantes entram em colapso e se deteriorizam, principalmente na parte superior das matrizes nanoestruturadas. Este efeito pode ser atribuído a dissolução do óxido de ferro, assim como a formação de produtos de degradação que se depositam nas nanoestruturas;

III) As camadas de óxido térmico começam a quebrar e se desprender do substrato. Esta camada se destaca com mais facilidade das matrizes nanoporoas, provavelmente devido às altas tensões internas e, portanto, menor estabilidade da estrutura;

IV) Camadas inteiras de óxido se desprendem do substrato.

Os resultados obtidos demonstraram que os arranjos nanoestruturados de óxido de ferro se deformam e se desprendem do substrato após períodos relativamente curtos de imersão em SBF, o que os tornam adequados em aplicações específicas de liberação de drogas a curto prazo. Espera-se que combinado a outros tratamentos de superfície, ou até mesmo com a adição de elementos de liga, os arranjos nanoestruturados tenham sua estabilidade aprimorada (YANG et al., 2018).

Figura 21 - Imagens de microscopia de fluorescência de células MG-63 cultivadas por 48 h em extratos de (a) ferro puro; anodizadas sob tensão de 60V durante 90s (b) e durante 150s (c) ambas em um eletrólito composto por 1,3 mol/L H_2O ; 0,09 mol/L NH_4F em ET e (d) controle positivo.



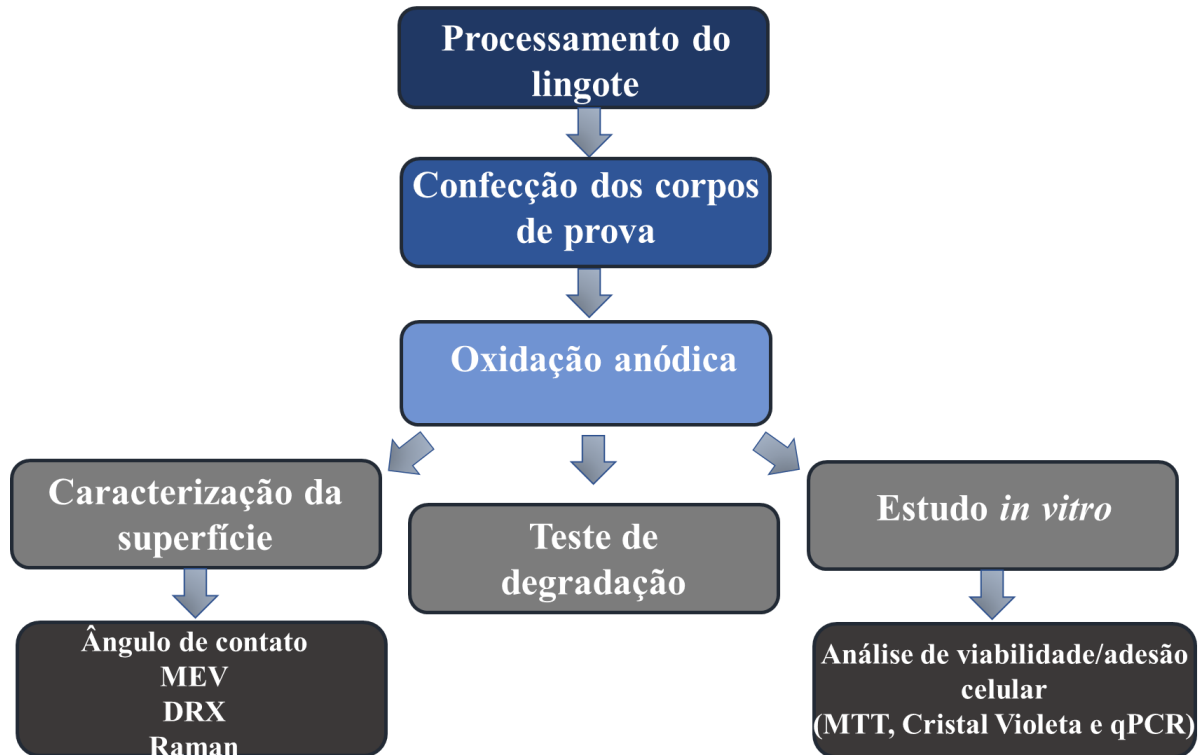
Fonte: adaptado de Yang et al. (2018).

A Figura 21 mostra as morfologias das células MG-63 sob um microscópio de fluorescência após 48 h de cultivo em diferentes extratos. Os resultados dos estudos celulares *in vitro* não indicam diferenças significativas entre os grupos analisados, as densidades celulares em todos os extratos são semelhantes e os arranjos nanoestruturados de óxido de ferro não causam influência adversa na viabilidade e morfologia das células MG-63 após 48h de cultivo. Logo, a partir de ensaios indiretos os resultados de citotoxicidade, das matrizes nanoestruturadas de óxido de ferro confirma que esses arranjos são promissores para funcionalizar biomateriais à base de ferro (YANG et al., 2018).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O fluxograma a seguir (Figura 22) retrata a metodologia utilizada na elaboração deste trabalho.

Figura 22 – Etapas do projeto de pesquisa.

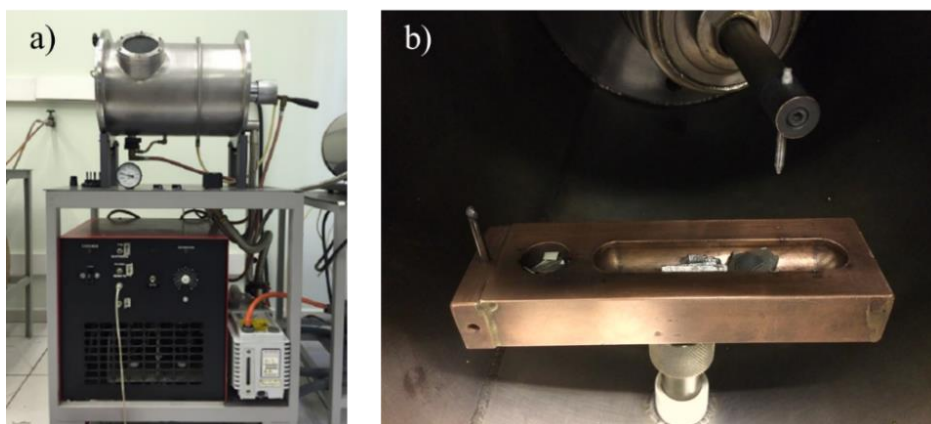


Fonte: autoria do próprio autor.

4.1 PROCESSAMENTO DO LINGOTE

Os lingotes de ferro foram obtidos a partir da fusão de chapas de ferro comercialmente puro em forno a arco voltaico (marca BABOZZI, modelo TRR425DC - localizado no Laboratório Processamento de Materiais, Departamento de Materiais e Tecnologia, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, Unesp) sob atmosfera inerte (gás argônio) e utilizando eletrodo de tungstênio e cadinho de cobre refrigerado por fluxo de água (Figura 23).

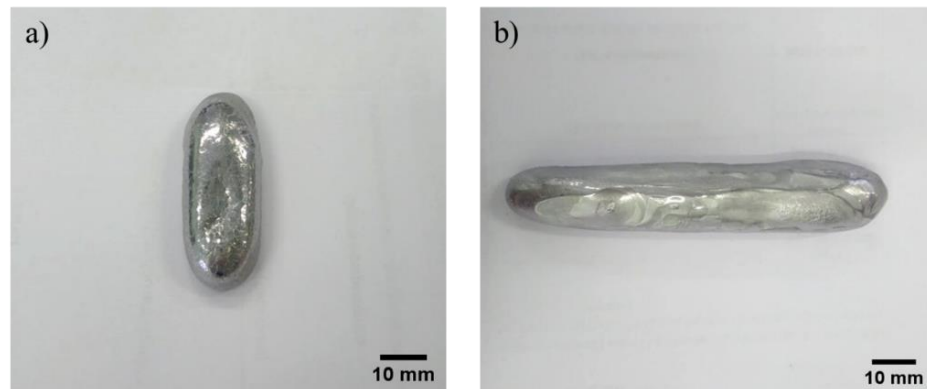
Figura 23 - Forno a arco voltaico utilizado no processo de fusão dos lingotes de ferro (a) Forno de fusão, e (b) vista interna do forno, onde são mostrados os eletrodos de tungstênio utilizados para abertura do arco elétrico e o cadinho de cobre com o material para fusão.



Fonte: autoria do próprio autor.

Para garantir que a atmosfera dentro da câmara fosse inerte e evitar que a oxidação durante a fusão ocorresse, foi realizado o processo de purga com argônio. O forno foi fechado e com o auxílio de uma bomba de vácuo os gases em seu interior foram retirados e então substituídos por argônio. Esse processo foi repetido por pelo menos cinco vezes. A fusão do material foi realizada em duas etapas. Primeiro, 4 botões de ferro foram fundidos separadamente, cada um com cerca de 25g, e posteriormente, estes botões foram unidos para formar um lingote de aproximadamente 100g. Para garantir a homogeneidade da amostra final, cada botão sofreu ao menos 10 fusões, sendo que após o término de cada uma o botão foi rotacionado a 90°, assegurando uma composição mais homogênea e livre de defeitos. Os botões de ferro e um lingote formado pela união desses botões são apresentados na Figura 24, como exemplo.

Figura 24 -(a) botão de ferro fabricado por fusão, (b) lingote de ferro fabricado após a união dos botões.

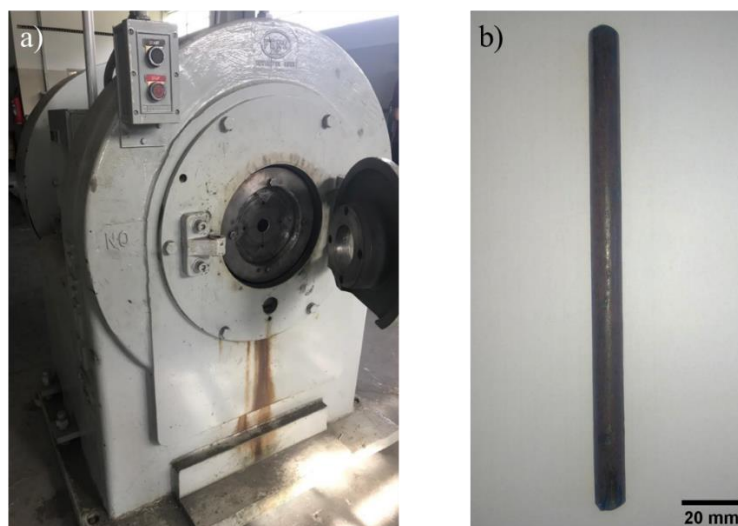


Fonte: autoria do próprio autor.

Após a fusão da amostra, foi realizado o tratamento térmico de homogeneização em um forno um forno resistivo de câmara tubular de quartzo (Laboratório de Processamento de Materiais, Departamento de Materiais e Tecnologia, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, Unesp), com atmosfera inerte de argônio a uma temperatura de 1000 °C durante 24 h, e o resfriamento ocorreu naturalmente, mantendo-se o lingote dentro do forno ao final do tratamento.

A etapa seguinte foi realizada para dar formato ao lingote e para isso foi realizado o forjamento a quente em uma prensa rotativa (equipamento FEN 5F) – presente no Instituto Tecnológico Aeronáutico (ITA). Os lingotes foram aquecidos em um forno até a temperatura de 850°C onde permaneceram durante 15 min e empregando martelos de diferentes circunferências foi possível obter uma barra com diâmetro de cerca de 10 mm (Figura 25). Após o forjamento, o lingote é novamente submetido a um tratamento térmico de solubilização, com o objetivo de eliminar os efeitos sobre a estrutura após o processo de forjamento. O forno foi aquecido com uma taxa de 16,3 °C/min até 1000 °C durante 180 min com resfriamento brusco em água.

Figura 25 - (a) Forja rotativa utilizada no processamento dos lingotes de ferro e (b) lingote de ferro após o forjamento.



Fonte: autoria do próprio autor.

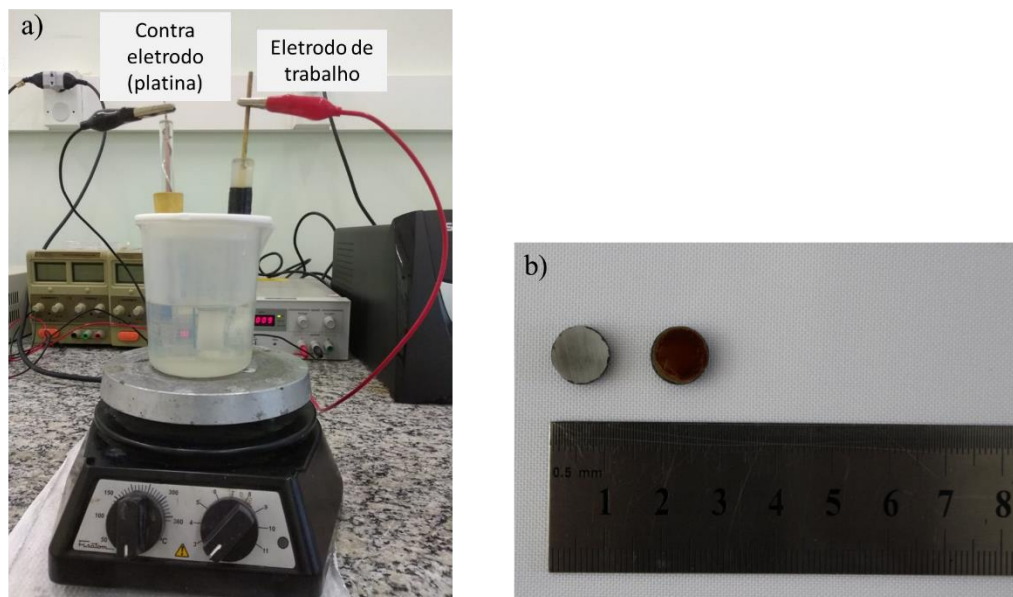
Discos com 10 mm de diâmetro e 3 mm de espessura foram seccionados das barras utilizando um equipamento de eletroerosão a fio (Agie Charmilles, FW 2U - Laboratório de Usinagem, Departamento de Materiais e Tecnologia, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, Unesp).

4.2 OXIDAÇÃO ANÓDICA

Os discos de ferro foram submetidos a diversas condições de preparo de superfície, com diferentes eletrólitos, potenciais e tempos de tratamento. Antes da oxidação anódica as amostras foram lixadas na bancada de lixamento, sob fluxo de água, utilizando lixas de carbetto de silício de granulometrias de 220 a 1200. Em seguida, as amostras foram lavadas em banho ultrassônico em água deionizada e em álcool isopropílico por 15 min e secas com secador.

Após este procedimento, as amostras foram levadas para a célula eletroquímica composta por dois eletrodos, um de trabalho (ânodo) e um contra eletrodo de platina, ligados a uma fonte de tensão e um recipiente para conter o eletrólito. Para algumas análises a célula eletroquímica foi colocada sobre um agitador magnético da marca Fisatom modelo 752A (Figura 26). O potencial foi ajustado atingir a tensão de trabalho desejada e então mantido durante o tempo determinado para cada análise. O processo de anodização foi realizado no laboratório de Biomateriais da FEG/UNESP.

Figura 26- a) Equipamento para anodização, constituído por uma fonte corrente contínua, um eletrodo auxiliar de platina e o eletrodo de trabalho contendo a amostra de ferro, colocado sobre um agitador magnético b) superfícies das amostras antes e após a anodização.



Fonte: autoria do próprio autor.

Para a modificação da superfície foram testadas diversas condições, variando o potencial, o tempo e o eletrólito durante a anodização conforme pode ser visto no Quadro 1. Para o preparo da solução foi utilizado etilenoglicol (99,5% pureza), fluoreto de amônio (NH_4F) (98% de pureza) e água deionizada. Seguindo as concentrações estabelecidas no quadro 1, para o preparo de 100 ml de solução é necessário 90 ml de etilenoglicol, 0,5 g de NH_4F e 10 ml de água.

Quadro 1- Parâmetros empregados para o crescimento da nanoestrutura na superfície das amostras de ferro.

Potencial (V)	Eletrólito	Tempo (min)
20	Etilenoglicol + 10% H ₂ O + 0,5% em peso de NH ₄ F	15
30	Etilenoglicol + 10% H ₂ O + 0,5% em peso de NH ₄ F	15
		180
40	Etilenoglicol + 10% H ₂ O + 0,5% em peso de NH ₄ F	15
50	Etilenoglicol + 10% H ₂ O + 0,5% em peso de NH ₄ F	15
		180

Fonte: autoria do próprio autor.

Após a utilização dos parâmetros para a anodização mostrados no Quadro 1, um segundo grupo variando o eletrólito foi estudado (Quadro 2). Acrescentou-se ainda um terceiro grupo com uma outra variante, a agitação (Quadro 3). Seguindo as concentrações estabelecidas nos quadros 1 e 2, para o preparo de 100 ml de solução é necessário 97 ml de etilenoglicol, 0,3 g de NH₄F e 3 ml de água.

Quadro 2- Parâmetros empregados para o crescimento da nanoestrutura na superfície das amostras de ferro, utilizando um segundo eletrólito.

Potencial (V)	Eletrólito	Tempo (min)
30	Etilenoglicol + 3% H ₂ O + 0,3% em peso de NH ₄ F	20
40	Etilenoglicol + 3% H ₂ O + 0,3% em peso de NH ₄ F	20
50	Etilenoglicol + 3% H ₂ O + 0,3% em peso de NH ₄ F	20

Fonte: autoria do próprio autor.

Quadro 3- Parâmetros empregados para o crescimento para o crescimento da nanoestrutura na superfície das amostras de ferro, utilizando agitação magnética.

Potencial (V)	Eletrólito	Tempo (min)	Agitação (rpm)
40	Etilenoglicol + 3% H ₂ O + 0,3% em peso de NH ₄ F	15	100
			1000
		30	100
			1000
50	Etilenoglicol + 3% H ₂ O + 0,3% em peso de NH ₄ F	15	100
			1000
		30	100
			1000

Fonte: autoria do próprio autor.

Decorrido o tempo de anodização, as amostras foram retiradas e limpas em água deionizada por enxágue e o excesso foi removido com o auxílio de um soprador térmico.

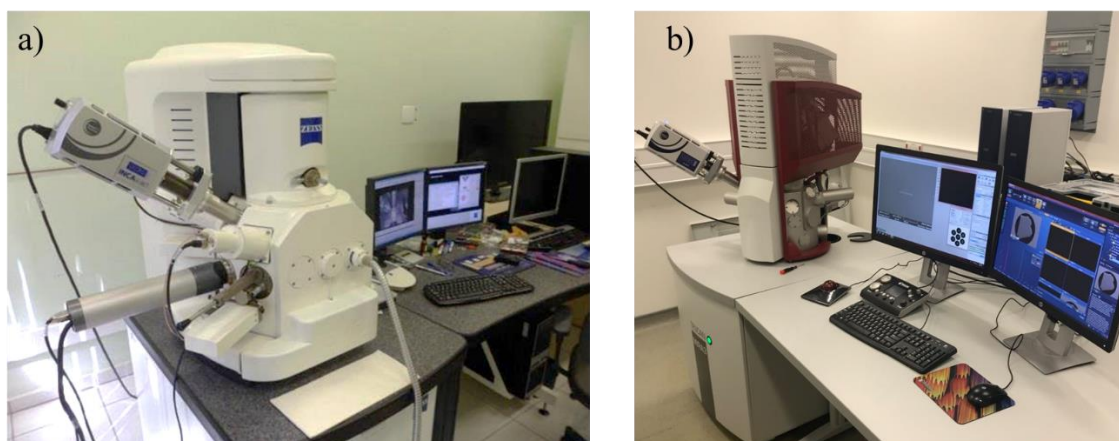
Para analisar a influência da temperatura de recozimento nas nanoestruturas de ferro anódico, as amostras anodizadas sob os mesmos parâmetros demonstrados no quadro 3 foram recozidas ao ar a 150, 200, 250, 300, 350 e 400°C em um forno do tipo mufla. A temperatura foi elevada a uma taxa de 5°C/min e mantida por 2 h seguido de um resfriamento natural dentro do forno.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE

4.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para avaliar a morfologia da superfície da amostra após o tratamento de oxidação anódica e após os tratamentos térmicos foi utilizada a microscopia eletrônica. As imagens foram coletadas por microscópios com filamentos de tungstênio (Zeiss EVO LS15 pertencente ao LAIMat -Laboratório de Imagens de Materiais, Unesp - Guaratinguetá) e *field emission gun* (FEG) (TESCAN/MIRA 3, pertencente ao Laboratório Associado de Sensores e Materiais (LABAS) do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, INPE). A Figura 27 apresenta ver os equipamentos utilizados.

Figura 27 - Microscópios Eletrônicos de Varredura utilizados na obtenção de imagem. a) Zeiss EVO LS15/LAIMat e b) TESCAN MIRA 3/LABAS.

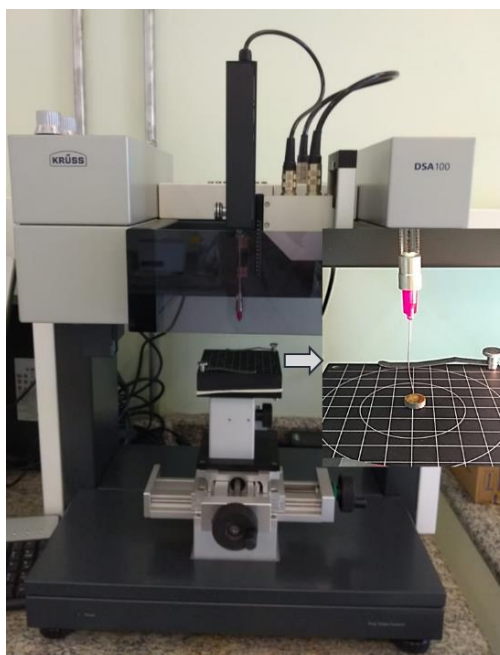


Fonte: autoria do próprio autor.

4.3.2 Ângulo de contato

Para medição do ângulo de contato das superfícies anodizadas foi utilizado um equipamento da marca Krüss, modelo DSA 100S do Departamento de Materiais e Tecnologia, Faculdade de Engenharia – UNESP, Campus de Guaratinguetá. A molhabilidade foi investigada empregando o método de gota séssil. Para cada medida utiliza-se de 10 μL de água deionizada gotejada sobre a superfície. A gota dispensada é fotografada pela câmera acoplada ao aparelho e o ângulo fotografado é analisado pelo programa.

Figura 28 - Goniômetro modelo DSA 100S utilizado na avaliação de molhabilidade. Em detalhe uma gota de água deionizada sendo depositada.



Fonte: autoria do próprio autor.

4.3.3 Análise de Difração de Raios X (XRD)

A análise das fases cristalinas formadas após a oxidação anódica foi realizada por meio da difração de raios X. O equipamento utilizado para as análises foi o Panalytical X'Pert e detector X'Celerator pertencente ao Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – INPE, em São José dos Campos – SP. Para análise foi utilizado radiação $\text{Cu K}\alpha$, corrente de 40 mA e tensão de 45 kV, com intervalo 2θ de medição de 10° até 90° , passo de $0,02^\circ$ e tempo de contagem de 5 s. Para complementar as análises das fases formadas na superfície, foi utilizada a espectroscopia de espalhamento Raman, realizada no Instituto Nacional de Pesquisas

Espaciais (INPE) – São José dos Campos/SP. As medidas das amostras foram realizadas no espectrômetro da marca Horiba Scientific T64000 e modelo LabRAM HR Evolution, acoplado a uma câmera Olympus BX41, utilizando como fonte de excitação um feixe de argônio com 514 nm de comprimento de onda e a medição ocorreu em temperatura controlada a 20°C.

As fases foram identificadas utilizando fichas da *Inorganic Crystal Structure Database* (ICSD) e com auxílio do *software* HighScore (versão 3.0.1, da PANalytical B. V.).

4.4 ENSAIO DE DEGRADAÇÃO

A degradabilidade das amostras foi medida através do ensaio de imersão estática conforme descrito por Cheng et al. (2013). O ensaio de imersão estática foi realizado em solução de Hanks da Sigma Aldrich (Tabela 3) tendo composição iônica e concentração consideravelmente semelhante à do plasma sanguíneo humano e o procedimento foi realizado de acordo com a norma ASTM G31-72.

Tabela 3 - Composição solução de Hanks (Sigma Aldrich).

Componentes	Quantidade (g/l)
Cloreto de cálcio (anidro)	0,1396
Sulfato de magnésio (anidro)	0,09767
Cloreto de potássio	0,4
Fosfato de potássio monobásico (anidro)	0,06
Cloreto de Sódio	8,0
Fosfato de sódio dibásico (anidro)	0,04788
D-Glucose	1,0

Fonte: autoria do próprio autor.

O reagente foi dissolvido em água deionizada (1 L), mantida a 15°C com agitação magnética. Foi adicionado à solução 0,35 g de bicarbonato de sódio e o pH foi ajustado para 7.5 adicionando hidróxido de sódio. O pH da solução foi verificado diariamente.

Três amostras de cada grupo foram testadas para os diferentes tempos de imersão. Antes do ensaio as amostras foram pesadas em uma balança analítica e amarradas em fio de nylon, de forma que nenhuma superfície ficasse em contato com a parede do tubo Falcon, como mostra a Figura 29a.

As amostras foram imersas em 50 ml de solução a 37 °C em banho termostatzado, Solab como é observado na Figura 29b. Após 3, 10 e 30 dias de imersão as amostras foram retiradas da solução de Hanks, lavadas com água destilada, secas e pesadas em uma balança analítica. Posteriormente, as amostras foram lavadas em banho ultrassônico em etanol por 10 min, secas com secador e pesadas novamente. O procedimento de banho ultrassônico e pesagem foi repetido até que a massa registrada deixasse de variar.

A perda de massa e a taxa de perda de massa foram calculadas da seguinte maneira: perda de massa = (massa antes da imersão - massa após a limpeza) / área de superfície, taxa de perda de massa = (massa antes imersão - massa após limpeza) / (área de superfície x tempo de imersão). A taxa de degradação (DR) em mm/ano das amostras foi calculada com base nos procedimentos estabelecidos pela ASTM G31-72 que prescreve o uso dos seguintes parâmetros: tempo de exposição (t) à solução em horas, área da amostra (A) em cm², perda de massa (W) em gramas e densidade (ρ) em g/cm³, combinados na seguinte equação 1:

$$DR = 8,76 \times 10^4 W / A t \rho \quad (\text{equação 1})$$

Para calcular a taxa de degradação somente da área anodizada, foi feita uma média ponderada, a partir do cálculo da porcentagem da área anodizada em relação a porcentagem de área total.

As mudanças de morfologia na superfície das amostras foram caracterizadas pelo microscópio estereoscópio binocular, modelo Stemi 2000, Carl Zeiss, no Laboratório de Microscopia Óptica, Departamento de Materiais e Tecnologia, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, Unesp.

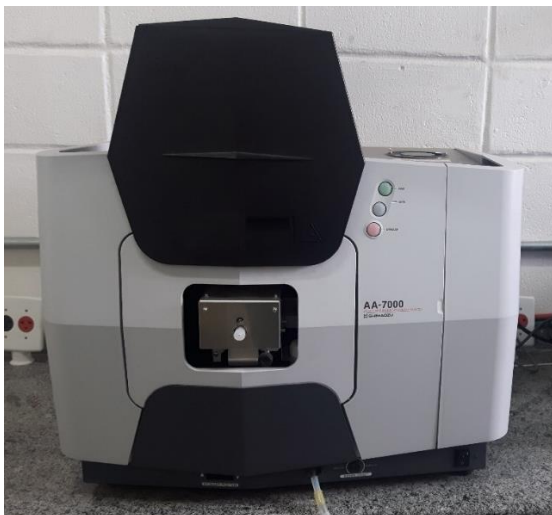
Figura 29 - (a) amostra suspensa por um fio de nylon em tubo Falcon (b) banho termostatzado mantido a 37°C por 3, 10 e 30 dias de imersão.



Fonte: autoria do próprio autor.

Após a completa dissolução dos produtos da corrosão por HNO_3 , a concentração de íons liberados na solução de Hanks foi determinada por meio de um espectroscópio de absorção atômica por chama, Shimadzu, modelo AA7000 (Figura 30) – presente no Laboratório de Caracterização de Materiais, Departamento de Materiais e Tecnologia, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, Unesp.

Figura 30 - Espectroscópio de absorção atômica, Shimadzu, modelo AA7000.



Fonte: autoria do próprio autor.

Três medições de absorbância serão realizadas para cada amostra, em cada um dos grupos estudados. A metodologia empregada seguirá as orientações do manual do equipamento. A curva padrão será obtida a partir das soluções padrão (marca SpecSol®) de cada elemento investigado. Lâmpadas de cátodo oco (marca Hamamatsu Photonic K. K.) específicas para cada elemento serão utilizadas nas medidas de absorbância.

4.5 ESTUDOS *IN VITRO*

4.5.1 Cultura celular

Essa etapa foi realizada com a colaboração do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Willian Fernando Zambuzzi, do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu.

Utilizou-se a linhagem MC3T3-E1 (pre-osteoblastos, subcone 4). Resumidamente, as células foram cultivadas em meio Alpha-MEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS) e antibiótico (Penicilina 100 U/mL e Estreptomicina 100 mg/mL) (Nutricell, Campinas,

SP, Brasil). Durante todo o experimento as células foram mantidas em estufa a 37°C e à atmosfera de 5% de CO₂.

4.5.2 Ensaio de viabilidade celular

O ensaio de citotoxicidade tem como objetivo avaliar a interferência de um material ou dispositivo nos processos metabólicos celulares e investigar o seu potencial em produzir efeitos letais ou subletais em sistemas biológicos a nível celular. Todas as categorias de biomateriais devem ser submetidas a este ensaio.

Assim, para verificarmos o potencial citotóxico, as amostras foram mantidas em meio de cultura por 24 h, seguindo as normas da ISO:10993. Após o período de condicionamento, o meio foi coletado e suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS) e utilizado para tratar pré-osteoblastos da linhagem MC3T3-E1 subclone 4 pelo período de 24 h. As células foram plaqueadas 24 h antes do tratamento, em placa de 96 poços e na densidade de 5,104 células/mL. Após o tempo determinado de exposição ao meio condicionado, a viabilidade destas células foi avaliada através de um teste colorimétrico utilizando Thiazolyl Blue Tetrazolium (MTT). Onde o meio de cultura foi removido, adicionado o sal Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (Sigma Aldrich #M5455-1G) 1 mg/mL e levado em estufa por 3 h a 37°C. Durante esse período a atividade mitocondrial transforma o colorante em cristais de formazam. Após a incubação, o meio foi removido e adicionado 0,1 mL de DMSO para solubilização do corante formado por células viáveis. Após isso, a absorbância foi medida a 570 nm utilizando um leitor de microplacas (SYNERGY-HTX multi-mode reader, Biotek, USA).

4.5.3 Ensaio de adesão celular

A adesão celular é uma característica muito importante e tem um efeito significativo na proliferação e diferenciação das células. Para estudar a adesão celular, os pré-osteoblastos foram plaqueadas com meio condicionado pelas ligas. As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 5,104 células/ml. Após 24 h de tratamento, o meio foi removido e a adesão medida pela incorporação de Violeta de Cristal. A absorvância foi medida a 540 nm em um leitor de microplacas (leitor multimodo SYNERGY-HTX, Biotek, EUA).

4.5.4 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)

Para análise de PCR em tempo real, as células foram coletadas em TriZOL e após extração de RNA foi realizada a síntese de cDNA com o Kit de Transcrição Reversa de cDNA

de Alta Capacidade (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de RNA e cDNA para normalização das análises, foram quantificadas em leitor de placa (SYNERGY-HTX multi-mode reader, Biotek, USA). A sequência de primers e detalhes técnicos desenvolvidos nos ensaios de qPCR para os diferentes genes estudados em contato com pré-osteoblastos são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Expressão gênica, sequência de primer e condições de reação da PCR.

Gene	Primer	5'-3' Sequência	Condição de reação
Integrin $\alpha 1$	Forward	TATCCTCCTGAGCGCCTTT	95°C-15; 60°C-30s; 72°C-60s
	Reverse	TGGCCTTTTGAAGAATCCAA	
Integrin $\beta 1$	Forward	CTGATTGGCTGGAGGAATGT	95°C-15; 60°C-30s; 72°C-60s
	Reverse	TGAGCAATTGAAGGATAATC ATAG	
Src	Forward	TCGTGAGGGAGAGTGAGAC	95°C-15; 60°C-30s; 72°C-60s
	Reverse	GCGGGAGGTGATGTAGAAA C	
FAK	Forward	TCCACCAAAGAAACCACCTC	95°C-15; 60°C-30s; 72°C-60s
	Reverse	ACGGCTTGACACCCTCATT	
Cofilin	Forward	CAGACAAGGACTGCCGCTAT	95°C-15; 60°C-30s; 72°C-60s
	Reverse	TTGCTCTTGAGGGGTGCATT	
GAPDH	Forward	AGGCCGGTGCTGAGTATGTC	95°C-15; 60°C-30s; 72°C-60s

Fonte: produzida pelo próprio autor.

Análise estatística: Os resultados foram representados como média $\pm$ desvio padrão (DP). Eles foram verificados utilizando One-Way ANOVA (paramétrico) com pós teste de Tukey, a fim de comparar todos os pares de grupos. Neste caso, com $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo e $p < 0,0001$ considerado altamente significativo. O software utilizado foi GraphPad Prism 6.

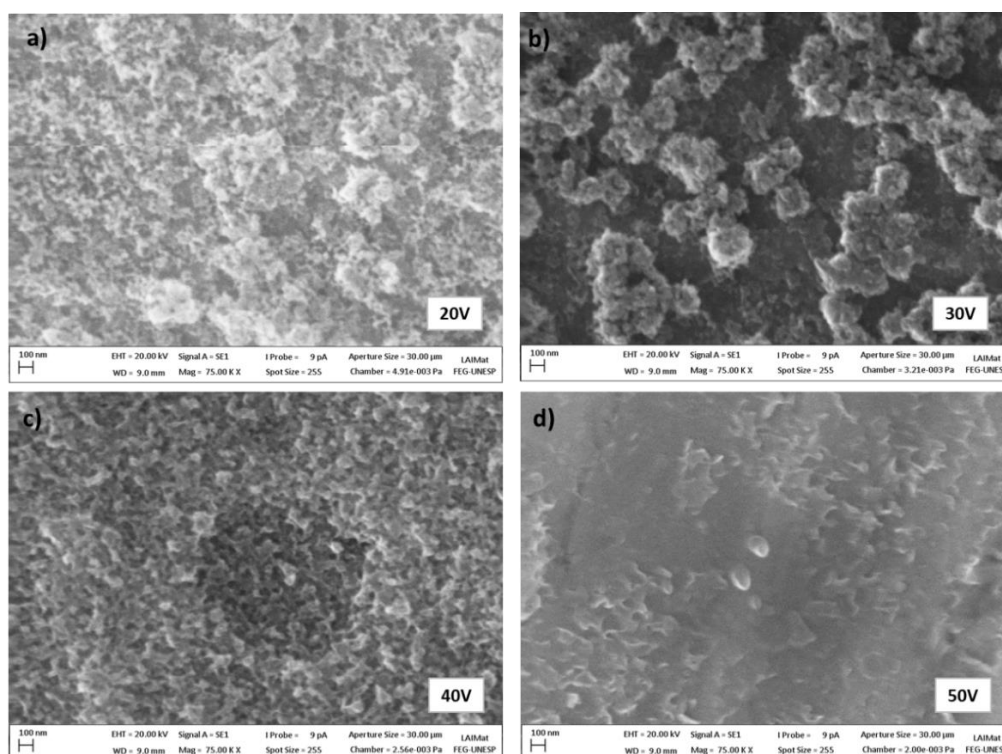
5 RESULTADOS

5.1 ANODIZAÇÃO

Na primeira etapa do trabalho as condições de anodização foram avaliadas variando-se a tensão de 20 V, 30 V, 40 V e 50 V durante 15 min (Figura 31) e aplicando um potencial de 30 V e 50 V para o tempo de 180 min (Figura 32), em um eletrólito contendo etilenoglicol + 0,5 % em massa de NH_4F + 10% em volume de água.

Na Figura 31 é possível observar o aspecto da superfície do ferro após a anodização no eletrólito mencionado acima, com o tempo fixo de 15 min e a variação apenas do potencial (20 V, 30 V, 40 V e 50 V). O processo de anodização para o potencial de 20 V e 30 V, gerou na superfície do ferro um filme grosseiro com aglomerados sobrepostos. Para a condição de 40 V é possível observar a presença de pequenos pits, enquanto que para o potencial de 50 V ocorreu a formação de um filme com formas semelhantes a escamas. Pode ser constatado pelas imagens que em nenhuma condição ocorreu a formação de uma estrutura nanoporosa ou nanotubular.

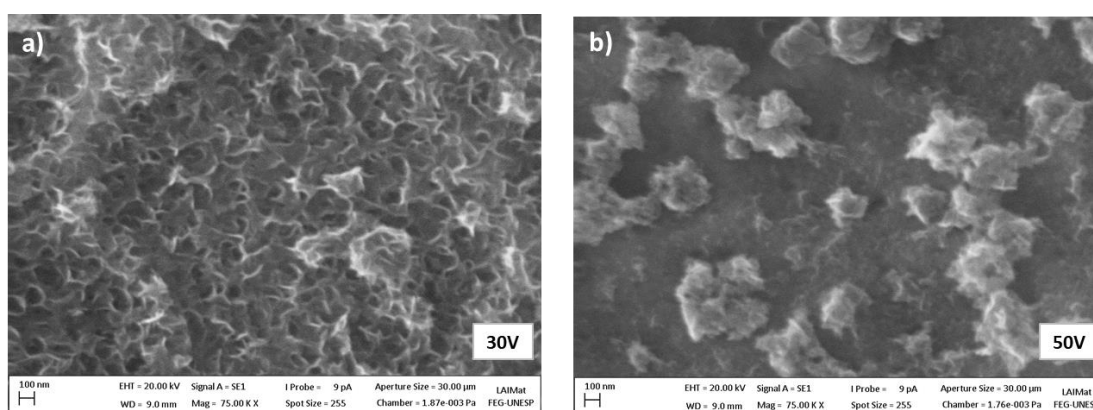
Figura 31 - (a-d) – Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) das amostras anodizadas em solução de etilenoglicol + 0,5 % NH_4F + 10% em volume de água por 15 min, em diferentes potenciais (20, 30, 40 e 50 V).



Fonte: autoria do próprio autor.

Na Figura 32 é possível observar a morfologia da superfície de ferro anodizado em etilenoglicol + 10% H₂O + 0,5 % em massa de NH₄F com o tempo fixo de 180 min com variação do potencial (30 V e 50 V). Para o potencial de 30 V é possível observar a presença de um filme poroso homogêneo sobre a superfície, enquanto que para o potencial de 50 V observa-se um filme grosseiro, com aglomerados sobrepostos. Portanto, a partir do estudo dos parâmetros iniciais selecionados, observa-se que em nenhuma condição ocorreu a formação de uma estrutura de nanotubos ou nanoporos na superfície das amostras.

Figura 32 - (a-b) - Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) das amostras anodizadas em solução de etilenoglicol + 0,5 % NH₄F + 10% em volume de água por 180 min, em diferentes potenciais (30 e 50 V).



Fonte: autoria do próprio autor.

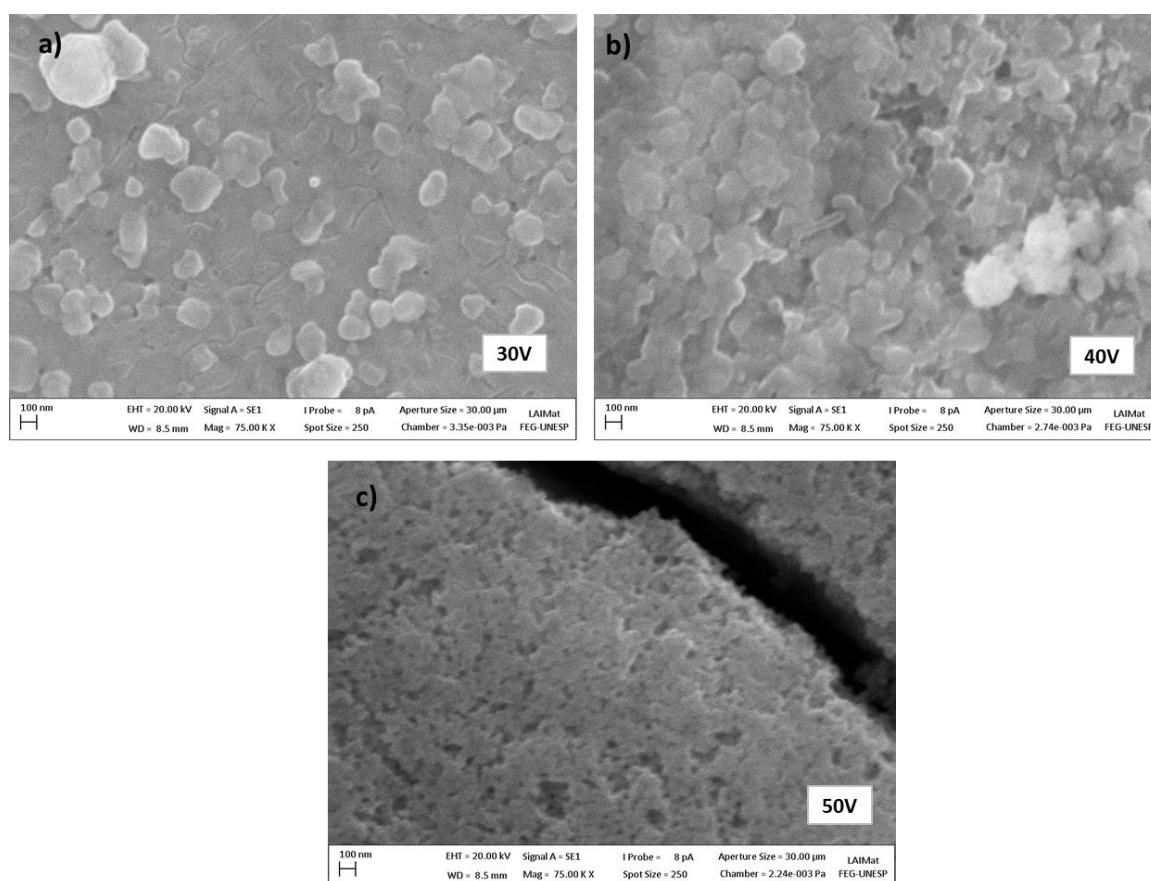
De acordo com Xie et al., 2014, a concentração de água e fluoreto no eletrólito, exercem uma função significativa na morfologia e estrutura das camadas de óxido de ferro formadas durante a anodização. Quanto mais alta a concentração de água, maior será a taxa de formação do óxido de ferro, enquanto que a maior concentração de NH₄F leva a dissolução acelerada das bocas dos nanotubos, resultando na formação de camadas de óxido de ferro extremamente espessas e densas.

Portanto, sabendo que a escolha do eletrólito é ideal para a formação de uma camada nanotubar de alta qualidade, um segundo grupo de parâmetros de anodização foi avaliado. Essa segunda condição de oxidação anódica para o ferro puro foi realizada com o eletrólito contendo etilenoglicol + 3% H₂O + 0,3 % em massa de NH₄F, variando o potencial (30 V, 40 V e 50 V) e com o tempo de anodização fixo de 20 min.

A Figura 33 exhibe o aspecto das superfícies das amostras de ferro após a anodização para as 3 condições estudadas, e é possível observar em todas elas, a formação de um filme denso e

compacto. As amostras anodizadas com potencial de 30 V e 40 V apresentam morfologias muito semelhantes, com muitos aglomerados de óxido sobrepostos e bem distribuídos, sem evidências de nanoporos ou nanotubos. Já para a amostra anodizada a 50 V, a superfície formada apresenta um filme de óxido bem denso e esbranquiçado, parecendo formar alguns nanoporos muito discretos, semelhantes ao encontrado por Momeni et al., 2015.

Figura 33 (a-c) - Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) das amostras anodizadas em solução de etilenoglicol + 0,3 %NH₄F + 3% em volume de água por 20 min, em diferentes potenciais (30, 40 e 50 V).



Fonte: autoria do próprio autor.

Apesar das condições estudadas acima não apresentarem a formação de nanotubos, existem estudos que evidenciam que para estas mesmas condições, quando a anodização é realizada sob agitação (entre 100 rpm e 1000 rpm) é possível obter estruturas que variam de nanoporos a nanotubos, uma vez que a agitação do eletrólito pode aprimorar o processo de difusão auxiliando na formação de nanoestruturas mais homogêneas (Rangaraju et al 2010, Lucas-Granados et al., 2017, 2018).

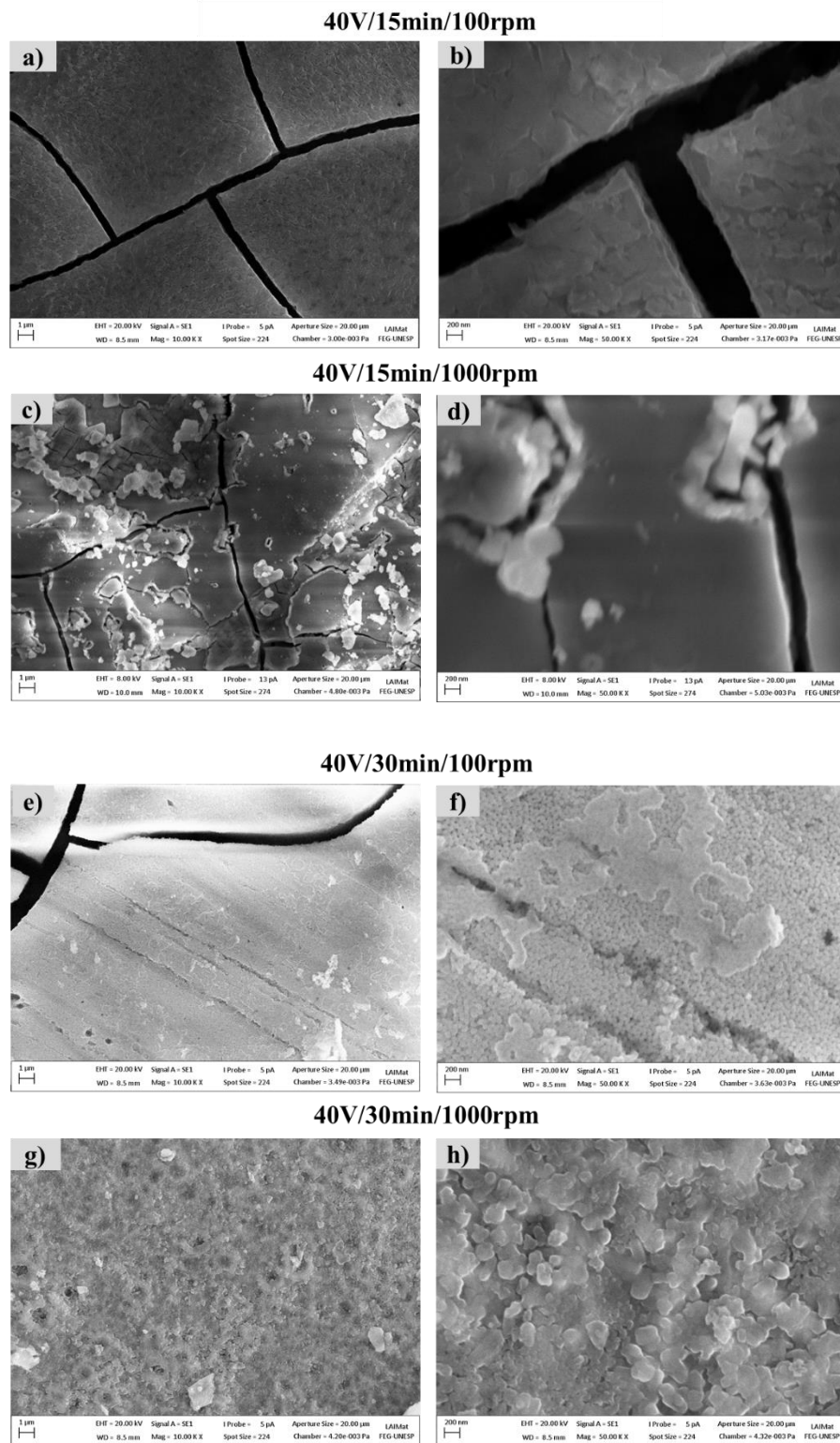
A Figura 34 exibe as imagens adquiridas em diferentes ampliações das amostras anodizadas sob um potencial de 40 V, com variação do tempo de 15 min e 30 min e agitação magnética de 100 rpm e 1000 rpm. Na Figura 35 temos o grupo com potencial de 50 V, variação do tempo de 15 min e 30 min e agitação de 100 rpm e 1000 rpm.

Para as amostras anodizadas com o potencial fixo de 40 V nas condições de 15 min com agitação de 100 rpm e 1000 rpm (Figura 34a, 34b, 34c e 34d), as morfologias observadas são muito semelhantes, apresentando um filme compacto e com trincas, sendo que para a agitação de 1000 rpm o filme apresenta-se mais denso (Figura 34c e 34d). Para a condição de 40 V, com tempo de 30 min e agitação de 100 rpm (Figura 34e e 34f), houve a formação de uma camada com a presença de nanoporos fechados. Já para a amostra de 40 V, com tempo de 30 min e agitação de 1000 rpm, o filme apresenta-se com muitos aglomerados de óxido sobrepostos e bem distribuídos (Figura 34g e 34h).

No grupo anodizado sob o potencial de 50 V, as estruturas formadas com o tempo de 15 min e agitação de 100 e 1000 rpm (Figura 35a, 35b, 35c, 35d, respectivamente), apresentam filmes densos e com trincas semelhantes, assim como observado nas amostras anodizadas por 30 min com agitação de 1000 rpm (Figura 35g e 35h), que além destas características, apresentaram pits espalhados sobre a superfície. Para o tempo de 30 min e agitação de 100 rpm, é possível observar na imagem com menor aumento (Figura 35e), um filme homogêneo com a presença de trincas, enquanto que na imagem com o maior aumento (Figura 35f), é possível visualizar a formação de uma estrutura nanonubular, com diâmetro médio interno dos tubos de aproximadamente 39 nm.

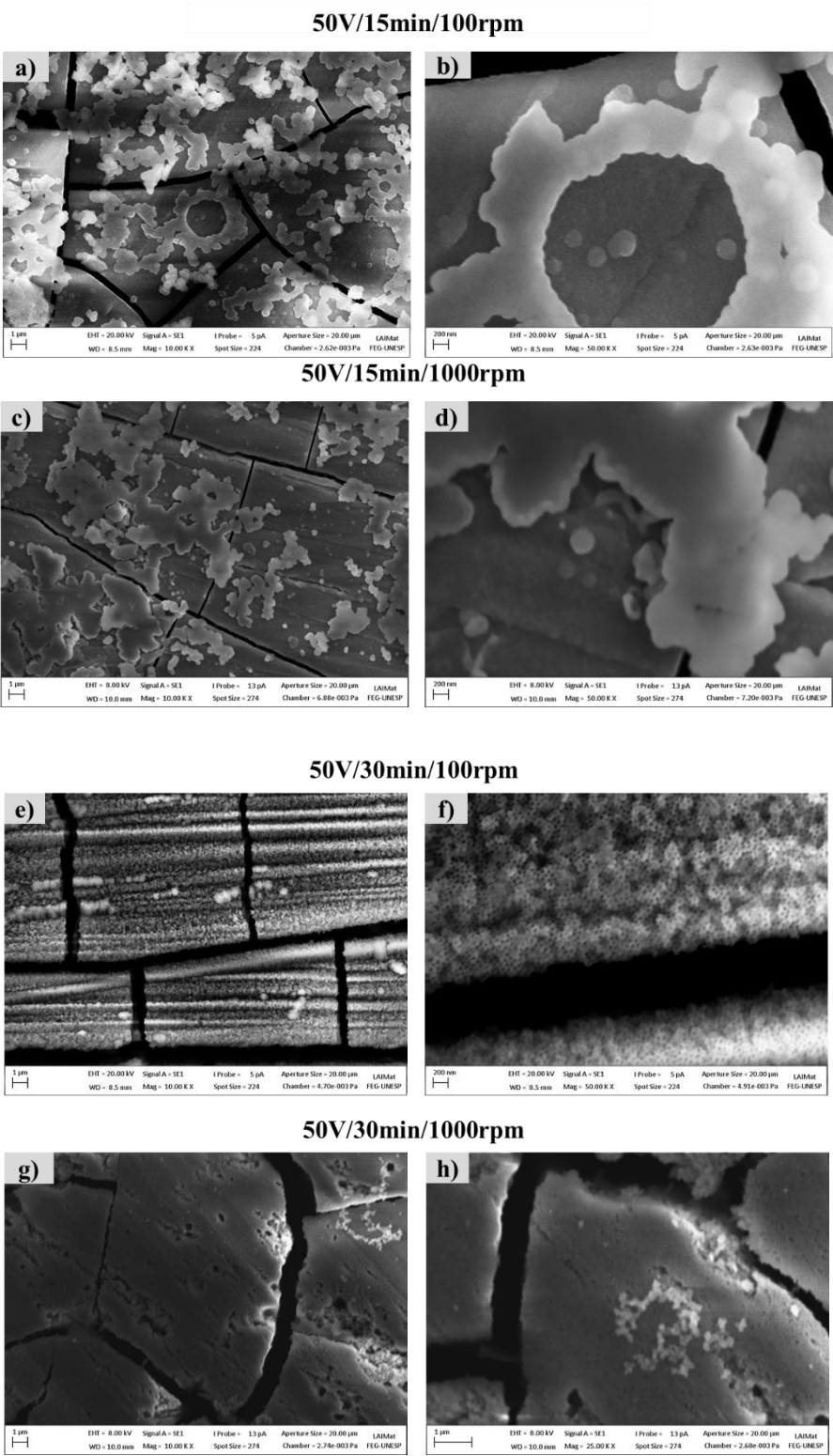
Assim como relatado em estudos anteriores, a agitação do eletrólito durante a anodização, aumenta a taxa de corrosão química por íons de fluoreto, auxiliando na formação de uma estrutura nanoporosa. Porém as condições hidrodinâmicas devem ser controladas, uma vez que velocidades de agitação muito altas podem levar à destruição da estrutura nanoporosa, já que para essas condições a dissolução do óxido é aprimorada. (LUCAS-GRANADOS et al., 2017; PAWLIK et al., 2017). Portanto, com base nos resultados obtidos para as diferentes condições de agitação estudadas, a velocidade de agitação do eletrólito mais adequada está na faixa de 100 rpm, pois permitiu a obtenção de uma nanoestrutura mais homogênea, tanto para a tensão de 40 V quanto para 50 V.

Figura 34 (a-h) - Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) das amostras anodizadas em solução de etilenoglicol + 0,3 %NH₄F + 3% em vol de água, sob 40 V e variação do tempo de 15 min e 30 min e agitação de 100 rpm e 1000 rpm.



Fonte: autoria do próprio autor.

Figura 35 (a-h) - Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) das amostras anodizadas em solução de etilenoglicol + 0,3 %NH₄F + 3% em vol de água, sob 50 V e variação do tempo de 15 min e 30 min e agitação de 100 rpm e 1000 rpm.



Fonte: autoria do próprio autor.

As camadas nanoestruturadas que crescem nos substratos de ferro durante a anodização, apresentam natureza amorfa e para que ocorra a cristalização destas estruturas, é necessário que elas sejam submetidas ao processo de recozimento.

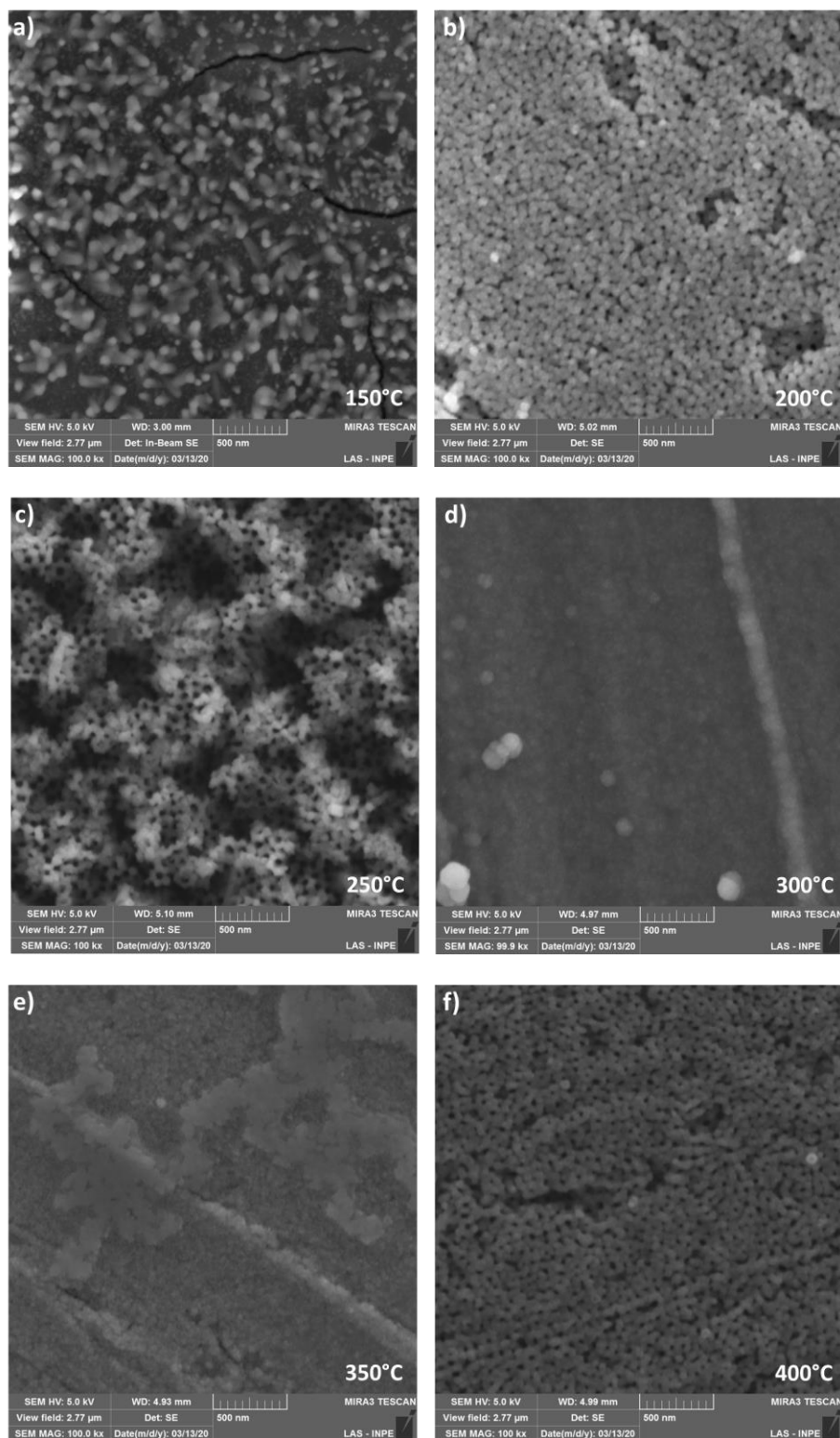
Para avaliar a influência da temperatura sobre as estruturas das camadas de óxido de ferro anódico, as amostras foram recozidas ao ar em diferentes temperaturas (150, 200, 250, 300, 350 e 400°C) por um período fixo de tempo (2 h). As amostras foram anodizadas em um eletrólito à base de etilenoglicol contendo 0,3 % em massa de NH_4F , 3% em volume de água, potencial fixo de 50 V, agitação magnética de 100 rpm durante o tempo de 15 e 30 min.

As morfologias desenvolvidas após anodização e subsequentes recozimentos foram caracterizadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura (MEV) com filamento *field emission gun* (FEG), e as imagens são mostradas nas Figura 36 e Figura 37. Com a ajuda do software de processamento de imagens *ImageJ*, foram quantificadas as dimensões das nanoestruturas e os resultados são expostos na Tabela 5 e Tabela 6.

As Figura 36(a-f) correspondem às morfologias das amostras anodizadas em condições de 50 V, agitação de 100 rpm, tempo de 15 min e tratadas em diferentes temperaturas de recozimento. As morfologias observadas após o recozimento a 150°C (Figura 36a), 300°C (Figura 36d) e 350°C (Figura 36e) apresentam a formação de um óxido compacto e denso, e por isso o cálculo do diâmetro interno das estruturas não foi aplicável. Para o recozimento a 200°C (Figura 36b) é possível observar a formação de uma camada com a presença de nanoporos fechados. Já para a temperatura de 250°C (Figura 36c) houve a formação de uma estrutura nanonubular, enquanto que para temperatura de recozimento a 400°C (Figura 36f), os tubos começaram a fechar e uma estrutura nanoporosa é reestabelecida.

As mudanças na morfologia do óxido anódico são mais significativas para temperaturas de recozimento mais altas. A estrutura nanotubular pode ser completamente colapsada e alterada para uma camada de óxido compacta, dependendo da temperatura. Alguns estudos relataram que temperaturas de recozimento maiores que 500°C, podem gerar distorções nos os arranjos nanotubulares além de ocasionarem o desprendimento completo das camadas de óxido anódico do substrato (PAWLIK et al., 2017; SARMA et al., 2014).

Figura 36 - Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura (MEV-FEG) da superfície do ferro puro após oxidação anódica em eletrólito à base de etilenoglicol + 0,3% NH_4F + 3% em volume de água, sob tensão de 50 V, agitação de 100 rpm durante 15 min e recozidas a (a) 150 °C, (b) 200 °C, (c) 250 °C, (d) 300 °C, (e) 350°C e (f) 400°C.



Fonte: autoria do próprio autor.

Apesar das dimensões das nanoestruturas formadas para essas condições de anodização serem bem próximas, o diâmetro médio interno da estrutura nanotubular (amostra recozida a 250°C) é maior do que o diâmetro de nanoporos observados para as amostras recozidas a 200 e 400°C, como pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5 - Dimensões das nanoestruturas formadas após a oxidação anódica e recozidas a diferentes temperaturas.

Condições de anodização	Tratamento (°C)	Diâmetro interno (nm)
Potencial de 50V	200	26,68 ± 4,80
Agitação de 100rpm	250	34,21 ± 2,14
Duração de 15 min	400	27,80 ± 0,68

Fonte: produzida pelo próprio autor.

A Figura 37 mostra as imagens de topo e vista lateral (detalhe) obtidas em microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo, das superfícies anodizadas e recozidas ao ar por 2 h em diferentes temperaturas. A oxidação anódica foi realizada sob potencial de 50 V, agitação de 100 rpm e tempo de 30 min.

As morfologias obtidas após o recozimento em todas as temperaturas analisadas (150°C, 200°C, 250°C, 300°C, 350°C e 400°C, Figura 37a-f) não demonstraram diferenças óbvias. A estrutura nanotubular obtida após a anodização e tratamento térmico, permaneceram estáveis e uniformemente ordenada para todas as amostras. As dimensões das nanoestruturas estão demonstradas Tabela 6, e é possível observar que tratamento resultou em diâmetros médios internos variando de 43 a 70 nm, e o comprimento (medido pela vista lateral dos nanotubos), variando de 3 a 6 µm.

As medidas das nanoestruturas obtidas foram similares às encontradas em um estudo realizado por Albu et al. (2009), sobre o crescimento de nanoporos de óxido de ferro altamente ordenados crescidos anodicamente em eletrólitos de etilenoglicol contendo fluoreto.

A estrutura dos arranjos nanotubulares, incluindo o diâmetro, a espessura e a morfologia da superfície, é crucial para todo o sistema de reservatório de medicamentos. Estudos mostram que em geral, o aumento da espessura da nanoestrutura leva ao aumento da área superficial total, que gera matrizes nanotubulares com melhor capacidade de carregamento de

medicamento (ZHOU et al., 2018). Neste sentido, as dimensões alcançadas para as amostras recozidas a 350°C e 400°C são mais vantajosas.

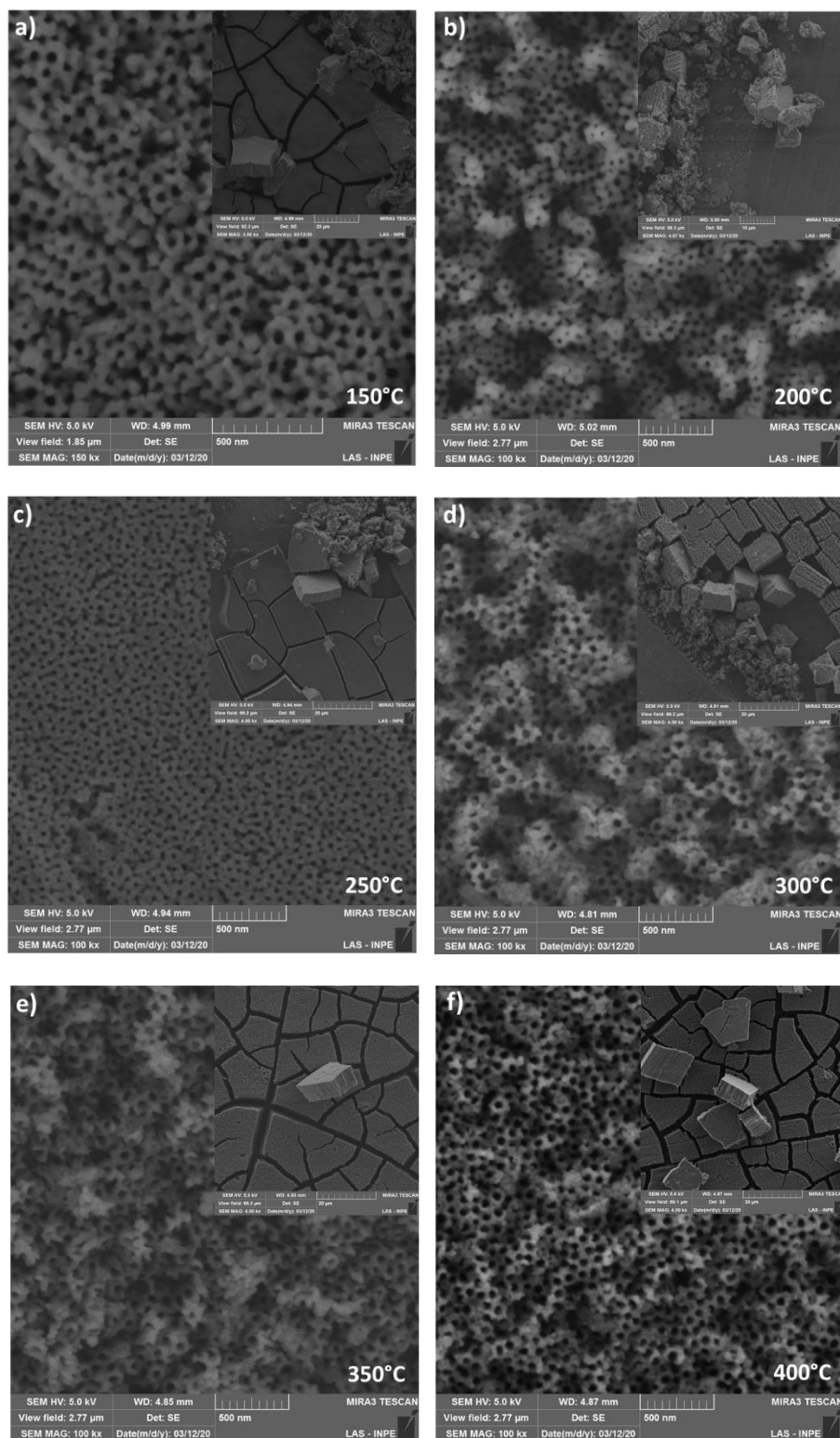
Tabela 6 - Dimensões das nanoestruturas formadas após a oxidação anódica e recozidas a diferentes temperaturas.

Condições de anodização	Temperatura (°C)	Diâmetro interno (nm)	Altura (µm)
Potencial 50V Agitação 100rpm Tempo 30min	150	56,16 ± 4,34	5,98 ± 0,10
	200	49,2 ± 7,48	5,1 ± 0,49
	250	43,62 ± 3,62	3,66 ± 0,33
	300	62,71 ± 0,54	5,18 ± 0,13
	350	70,02 ± 1.13	6,25 ± 0,18
	400	60,46 ± 4,74	5,92 ± 0,13

Fonte: autoria do próprio autor.

Analisando a morfologia das matrizes nanoestruturadas em menor ampliação (imagens mostradas nas inserções da Figura 37a-h), é possível observar rachaduras distribuídas sobre a superfície anodizada, semelhantes as que foram encontradas por Yang et al. (2018). Seus estudos relataram que essas rachaduras são desenvolvidas durante o processo de anodização, e podem ser formadas devido ao aumento de tensões internas das matrizes de óxido nanoestruturada.

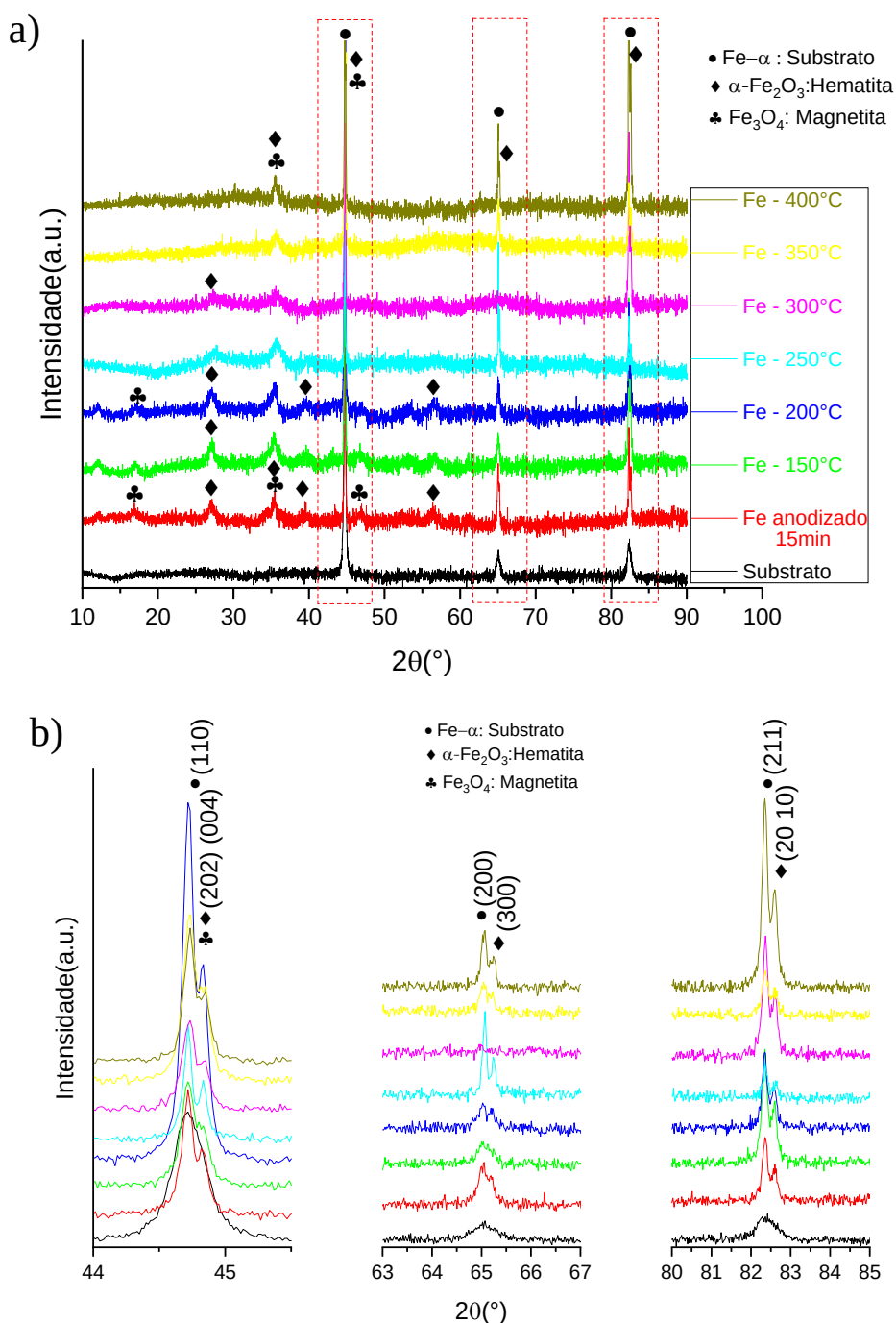
Figura 37- Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura (MEV-FEG) da superfície e lateral (detalhe) do ferro após oxidação anódica em eletrólito de etilenoglicol + 0,3 % NH_4F + 3% em vol. de H_2O , tensão de 50 V, agitação de 100rpm, durante 30 min e recozidas a (a) 150 °C, (b) 200 °C, (c) 250 °C, (d) 300 °C, (e) 350°C e (f) 400 °C.



Fonte: autoria do próprio autor.

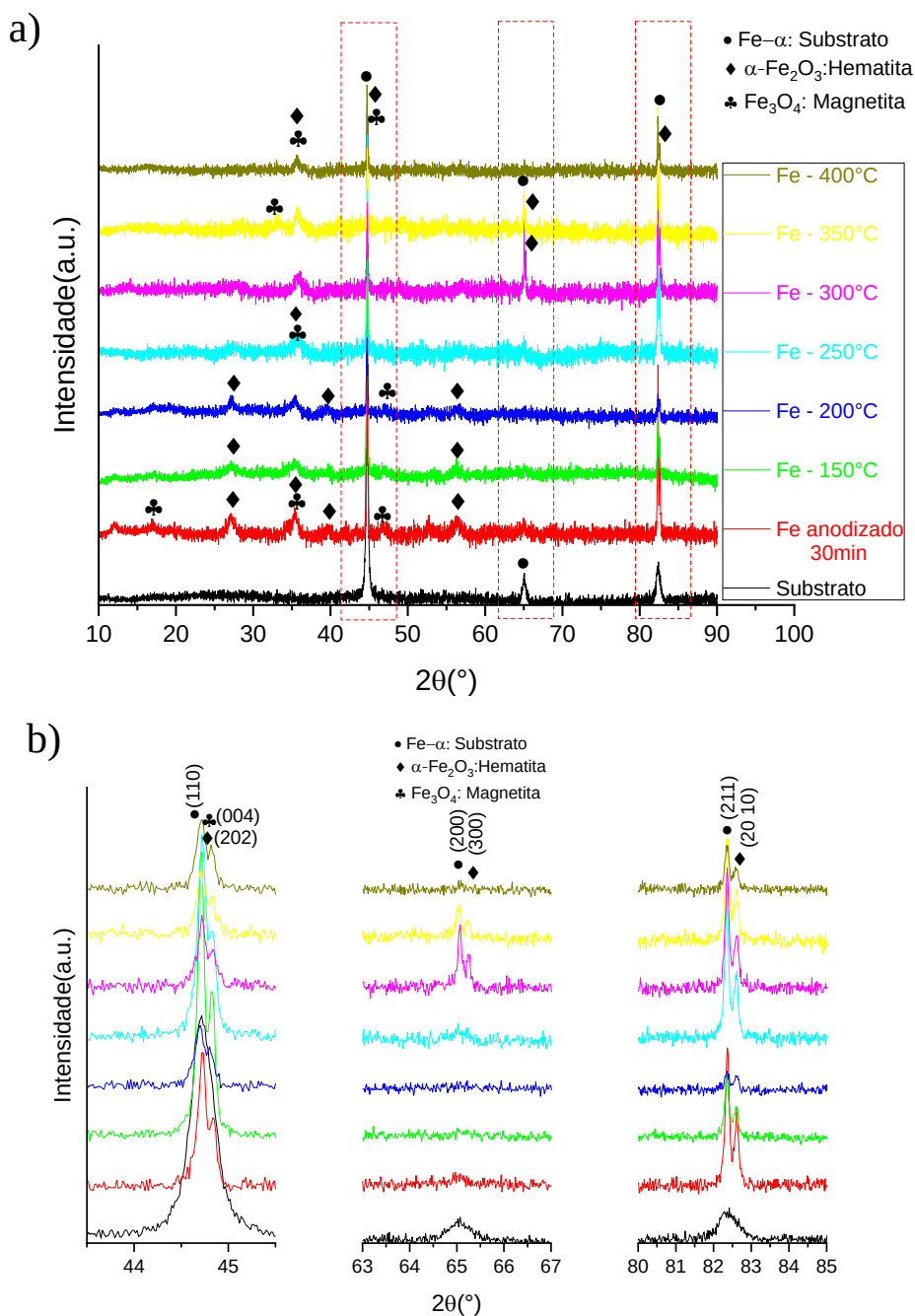
As Figura 38 e Figura 39 apresentam os difratogramas de raios X das amostras de Fe anodizadas e tratadas termicamente a temperaturas de 150, 200, 250, 300, 350 e 400°C durante 2 h. De forma geral, no substrato foi identificada a fase ferro- α (ICSD 53451) caracterizada pelos planos de difração (110), (200) e (112) em 44,7°, 65,1° e 82,4°.

Figura 38 – a) Espectro da difração de raios X das amostras de ferro após a anodização por 15 min e recozidas por 2 h em diferentes temperaturas. b) Zoom nas regiões de interesse demarcadas com as linhas vermelhas tracejadas.



Fonte: autoria do próprio autor.

Figura 39 - a) Espectro da difração de raios X das amostras de ferro após a anodização por 30 min e recozidas por 2 h em diferentes temperaturas. b) Zoom nas regiões de interesse demarcadas com as linhas vermelhas tracejadas.



Fonte: autoria do próprio autor.

Nas amostras na condição anodizadas, tanto a de 15min quanto a 30min, é possível observar a presença dos óxidos de ferro, denominadas de hematita (α -Fe₂O₃) e magnetita (Fe₃O₄) que possuem estruturas romboedral (ICSD 15840) e cúbica (ICSD 26410)

respectivamente. A magnetita (Fe_3O_4) foi caracterizada pela presença dos planos (111) e (133) ao redor de 17° e 47° , respectivamente. Além disso, a assimetria do pico ao redor de 35.5° pode estar composta pela difração dos planos (113) da magnetita e (110) da hematita. No zoom da região entre 44° e 45° se observa a presença do plano (110) em 44.7° do substrato, no entanto, de seu lado direito existe a presença de um pico que pode ser atribuído a presença da magnetita (004) assim como da hematita (202).

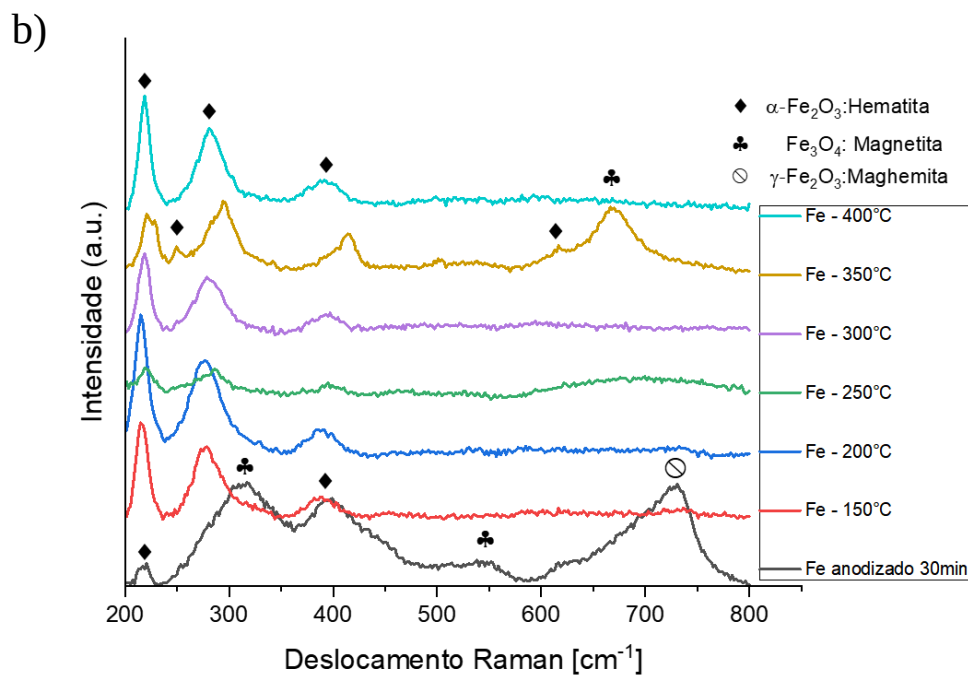
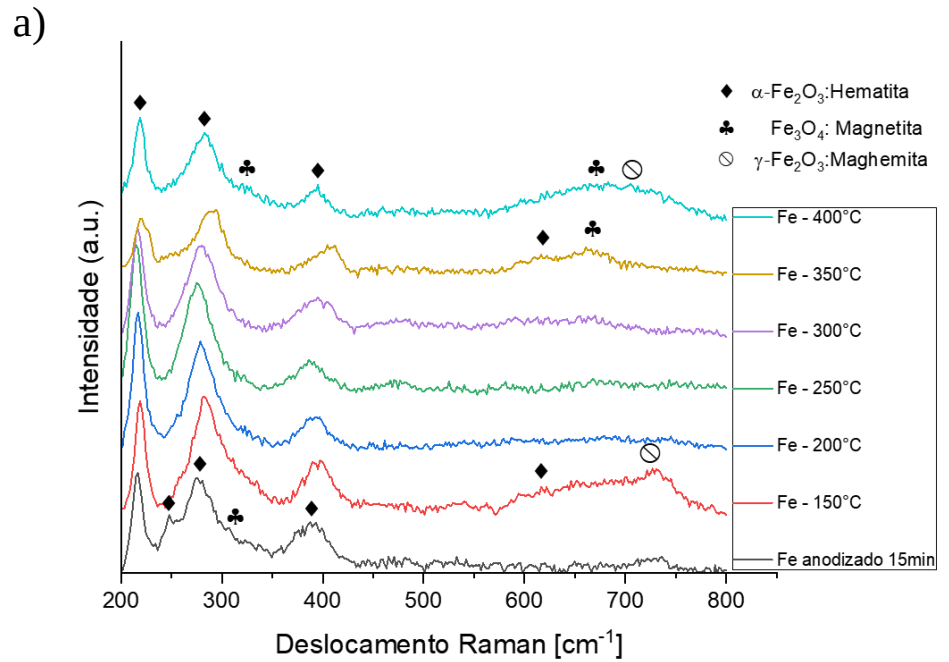
A hematita aparenta ter uma maior proporção dentre as fases dos óxidos de ferro, pois esta foi caracterizada pelos planos de difração (012) $\sim 27^\circ$, (113) 39.7° e (116) $\sim 55.4^\circ$. Além disso, no zoom das regiões ao redor de 65° e 82.5° , pode ser observada a presença de ombros até o desdobramento em dois picos pela difração dos planos (300) e (20 10) da hematita.

As Figura 40(a-b) mostram os espectros Raman das amostras anodizadas durante 15 min(a) e 30 min(b) e tratadas termicamente nas temperaturas já mencionadas.

De forma geral, observa-se uma concordância com os difratogramas de raios X das Figura 38 e Figura 39, pois é possível observar a hematita (α - Fe_2O_3) como a fase representativa da nanoestrutura. Esta fase pertence ao grupo espacial D_{3d}^6 e sete modos de vibração bem estabelecidos são esperados no espectro Raman, dois modos A_{1g} (225 e 498 cm^{-1}) e cinco modos E_g (247 , 293 , 299 , 412 e 613 cm^{-1}) (CHAMRITSKI; BURNS, 2005; LU; TSAI, 2014). Dentre estes, os espectros das amostras anodizadas e tratadas termicamente mostraram a presença de picos ao redor de 219 cm^{-1} (A_{1g}), 247 cm^{-1} (E_g), 290 cm^{-1} (E_g), 400 cm^{-1} (E_g) e 615 cm^{-1} (E_g).

A magnetita, considerada para estar em menor proporção na nanoestrutura formada e que está em concordância com os difratogramas de raios X, pertence ao grupo espacial O_h^7 pelo que são esperadas 5 bandas Raman: três T_{2g} , uma E_g e uma A_{1g} (CHAMRITSKI; BURNS, 2005; LU; TSAI, 2014). Vale destacar que existem algumas divergências nos valores reportados para a indexação dos picos (DE FARIA; VENÂNCIO SILVA; DE OLIVEIRA, 1997), no entanto, com base na literatura foram estabelecidos picos ao redor de 310 cm^{-1} (T_{2g}), 554 cm^{-1} (T_{2g}) e 672 cm^{-1} (A_{1g}) (JUBB; ALLEN, 2010; LUCAS-GRANADOS et al., 2018).

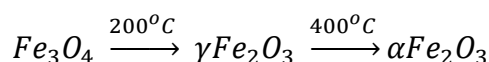
Figura 40 -Espectros Raman das amostras de ferro após a anodização por 15 min(a) e 30 min (b) e recozidas por 2 h em diferentes temperaturas.



Fonte: autoria do próprio autor.

Em particular, a partir dos espectros é possível observar uma aparente amorficidade da nanoestrutura na amostra anodizada durante 30 min, o qual é associado à presença de picos alargados e não muito bem definidos. No entanto, vale destacar que foram identificados picos principalmente da magnetita (Fe_3O_4) e hematita (α - Fe_2O_3), assim como a possível presença da maghemita (γ - Fe_2O_3), que pode ser considerada uma fase de transição entre a magnetita e a hematita (CAN; COŞKUN; FIRAT, 2012; DE FARIA; VENÂNCIO SILVA; DE OLIVEIRA, 1997).

Com o aumento da temperatura, existe uma tendência à estabilização da hematita a qual está em acordo com os difratogramas de raios X e com o que foi reportado por De faria et al. (1997), que consideram que as transformações de fase em função da temperatura destes óxidos de ferro seguem a sequência :



Finalmente, cabe destacar que é reportado na literatura (LEE et al., 2014; YANG et al., 2018) que durante o tratamento térmico é formada uma camada compacta de óxido de ferro de magnetita (Fe_3O_4) entre a nanoestrutura e o substrato. Nesse sentido, a presença da magnetita em altas temperaturas pode estar associada ao fato de que os raios X ou laser no Raman, atingem esta camada.

A molhabilidade da superfície da amostra lixada, amostra controle e das amostras anodizadas e tratadas termicamente foi testada pelo ângulo de contato e seus valores são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 - Valores de ângulo de contato para diferentes condições de anodização e recozimento.

50V - 15min -100 rpm								
	Amostra lixada	Amostra anodizada	Amostras anodizadas e recozidas					
			150°C	200°C	250°C	300°C	350°C	400°C
Ângulo de contato (°)	52.2	5.3	11.6	19.2	8.6	3.8	13.9	4.8
50V - 30min -100 rpm								
	Amostra lixada	Amostra anodizada	Amostras anodizadas e recozidas					
			150°C	200°C	250°C	300°C	350°C	400°C
Ângulo de contato (°)	52.2	8.8	10.8	12.1	11.3	8.6	4.4	1.4

Fonte: autoria do próprio autor.

A molhabilidade é um fator essencial para o espalhamento celular e proliferação eficaz *in vitro*. Geralmente, quanto menor o valor do ângulo de contato, maior o é caráter hidrofílico da superfície e também mais propícia à adesão celular. Quando este ângulo é menor que 90°C, o material é denominado hidrofílico e quando é maior que 90°, é denominado hidrofóbica.

Como pode ser observado, o crescimento de nanotubos ocasionou uma relevante mudança na hidrofiliabilidade da superfície independente da temperatura de recozimento utilizada. Apesar do substrato de ferro já apresentar ângulo de contato inferior a 90°, o que o caracteriza como hidrofílico, depois do tratamento a molhabilidade é consideravelmente maior, sendo que após o recozimento a temperatura de 350°C e 400°C essas superfícies se tornam superhidrofílica. Esta característica é importante para a aplicação de *stents* cardiovasculares e contribui para a adesão celular na superfície do material (CHENG et al., 2013).

A partir dos resultados obtidos o melhor filme de óxido nanoestruturado foi obtido para anodização em eletrólito à base de etilenoglicol contendo 0,3 % em massa de NH_4F , 3% em volume de água, potencial fixo de 50 V, agitação magnética de 100 rpm durante o tempo de 30 min. Combinando os resultados obtidos pelo ângulo de contato e analisando as morfologias resultantes do recozimento a 350°C e 400°C, essas duas condições foram escolhidas para prosseguir com os estudos *in vitro* com o objetivo de avaliar a viabilidade e adesão celular, assim como a análise da degradabilidade das amostras através do ensaio de imersão estática.

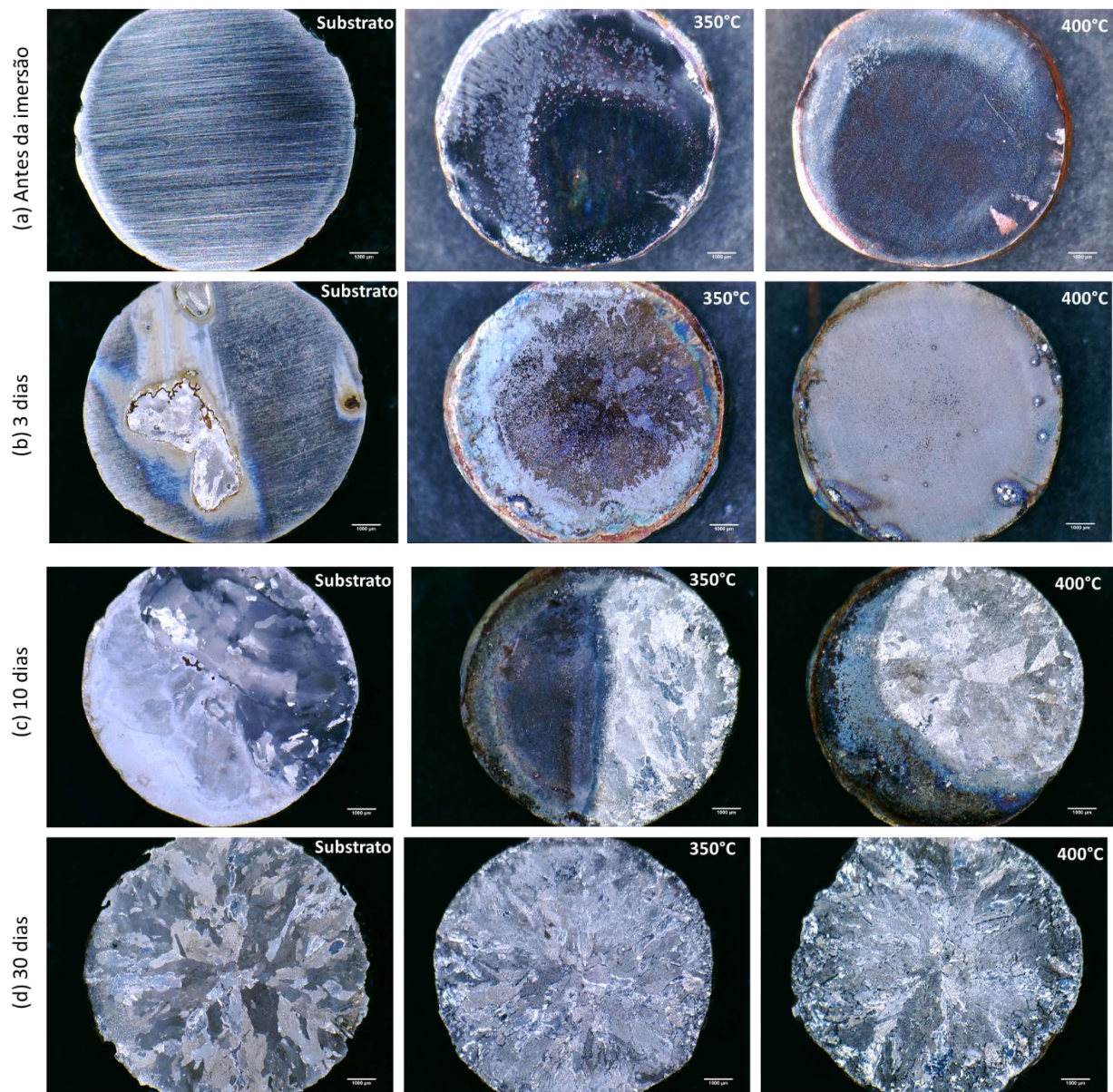
5.2 ENSAIO DE DEGRADAÇÃO – IMERSÃO ESTÁTICA EM SOLUÇÃO DE HANKS

A Figura 41 mostra as macrografias das superfícies do substrato de ferro e das amostras anodizadas e recozidas a 350°C e 400°C, respectivamente, antes da imersão e após a limpeza dos produtos de degradação formados durante a imersão por 3, 10 e 30 dias em solução de Hanks. O progresso da degradação pode ser claramente observado nas imagens, onde o ataque de corrosão foi progressivamente mais amplo na maior parte da superfície do material em função do tempo de imersão.

Após a limpeza dos produtos de corrosão resultantes da imersão por 3 dias em solução de Hanks (Figura 41b), observa-se que ainda há na superfície das amostras anodizadas uma camada de óxido formado originalmente durante o processo de anodização, enquanto que na superfície do substrato de ferro é possível notar algumas áreas iniciais de corrosão. Após 10 dias de imersão (Figura 41c), fica claro nas superfícies anodizadas que uma maior parte da camada de óxido de ferro foi destacada do substrato, assim como, também é possível observar

na superfície do substrato uma maior área corroída. Já para a imersão durante 30 dias (Figura 41d), nota-se que a camada de óxido de ferro das superfícies anodizadas foi totalmente dissolvida e totalmente separada do substrato. O aspecto das superfícies para todos os grupos após 30 dias de degradação é muito semelhante, já que após esse tempo de imersão a corrosão acontece na mesma superfície de substrato de ferro.

Figura 41 -Imagens por microscopia estereoscópica (0,80x) das amostras de substrato de ferro e das amostras anodizadas e recozidas a 350°C e 400°C, respectivamente, antes (a) e após a limpeza de produtos de corrosão formados durante a imersão por 3(b), 10(c) e 30(d) dias em solução de Hanks.



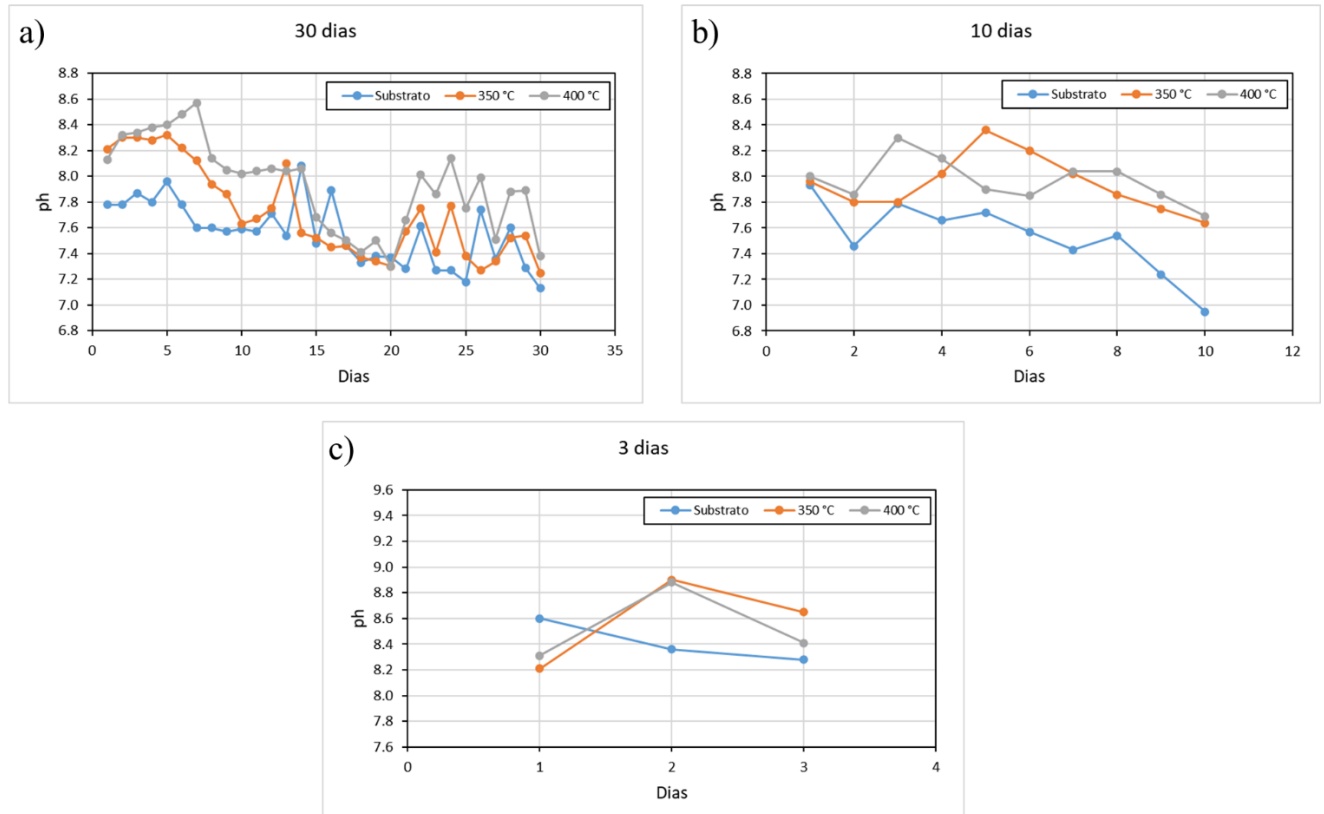
Fonte: autoria do próprio autor.

As imagens obtidas sugerem que o ensaio de imersão em solução de Hanks corroeu as amostras de ferro puro de maneira uniforme, presumindo que este material após implantado, não perderia a função devido à corrosão, sendo capaz de exercer todas as suas vantagens de propriedades mecânicas, assim como observado por Zhang et al. (2010). Porém, para um maior entendimento das morfologias, microestruturas e composição química da superfície das amostras após a imersão em solução de Hanks, análises como caracterização por MEV, EDS e DRX deveriam ser realizadas.

A Figura 42 mostra os valores de pH da solução de Hanks para os diferentes grupos analisados (substrato, amostra anodizada e recozida a 350°C, amostra anodizada e recozida a 400°C) no tempo de imersão de 30 dias (Figura 42a), 10 dias (Figura 42b) e 3 dias (Figura 42c). Nota-se que as amostras exibiram uma tendência semelhante durante o ensaio: há um aumento no valor de pH da solução de Hanks nos primeiros dias de imersão, que vai diminuindo ao longo dos primeiros 10 dias. Para maiores tempos de imersão, como no caso de 30 dias (Figura 42a), é possível observar que este valor oscila durante o ensaio, ele tende a aumentar por volta do décimo segundo dia, e diminui até o vigésimo dia. Após isso, o pH volta a subir e tende a diminuir até o final dos 30 dias. Pode-se concluir que o aumento no valor de pH da solução de Hanks é parcialmente causado pela corrosão do material, assim como observado por Zhang et al. (2010) para as amostras de ferro puro. Observou-se também que para as amostras com as superfícies anodizadas, os valores de pH são superiores quando comparados aos valores do pH do substrato, provavelmente devido à corrosão mais pronunciada nestas superfícies modificadas. Além disso, os valores mais altos no início do ensaio de imersão, pressupõem que a taxa de degradação inicial é mais alta.

É importante ressaltar que a corrosão do ferro aumentou ligeiramente o pH da solução, ou seja, provocou uma branda alcalinização do meio incapaz de causar danos ao ambiente corporal, diferentemente, por exemplo, da corrosão dos implantes de magnésio observada por Song (2007), que ocasionou um aumento do valor de pH da solução e consequentemente uma alcalinização local em torno do implante capaz de afetar desfavoravelmente os balanços das reações fisiológicas dependentes do pH, e até mesmo levar a um efeito de envenenamento alcalino.

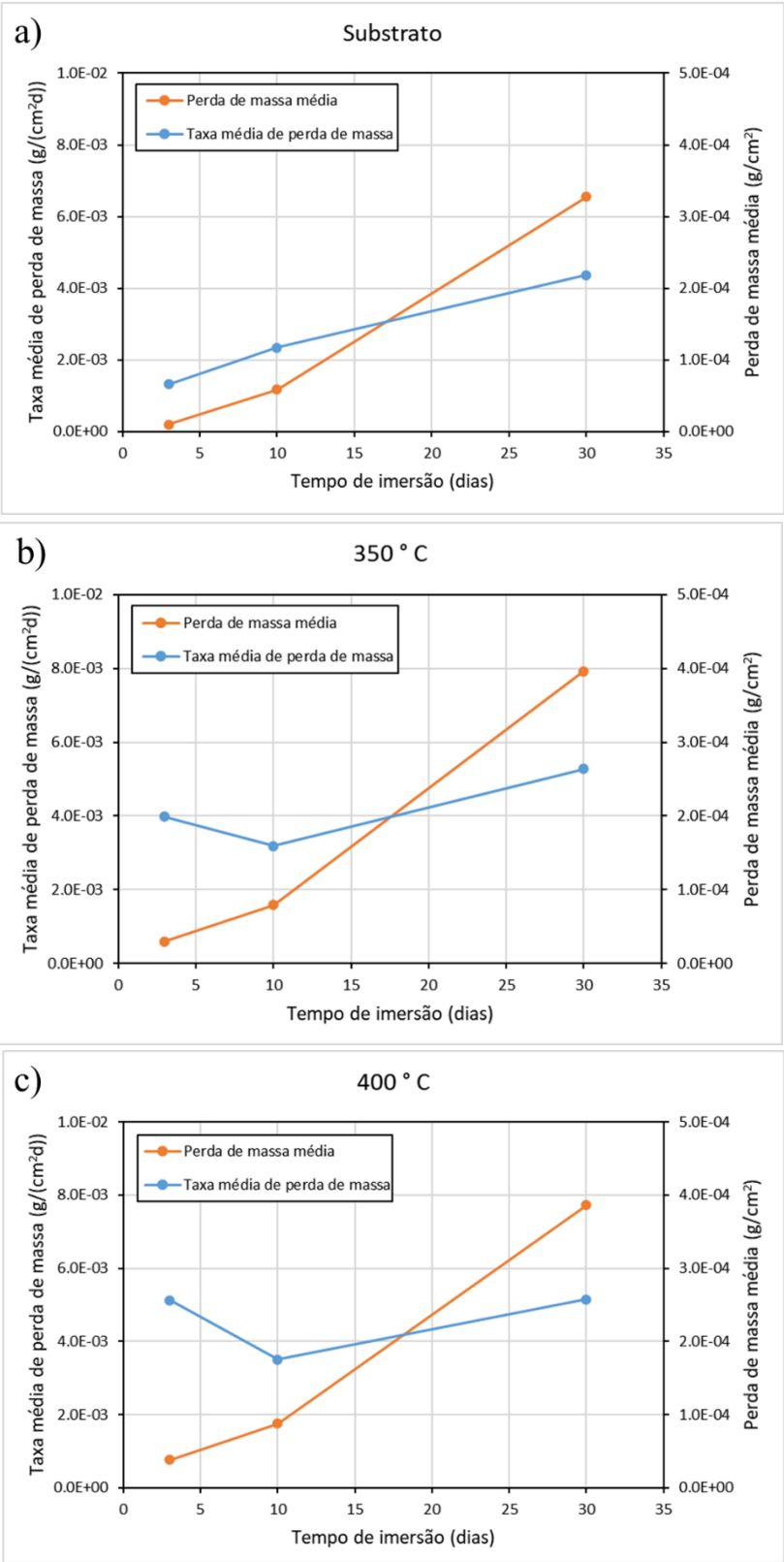
Figura 42 - Curvas dos valores de pH da solução de Hanks para os três grupos estudados (substrato, amostra anodizada e recozida a 350°C, amostra anodizada e recozida a 400°C) para os três tempos de imersão (a) 30 dias, (b) 10 dias e (c) 3 dias.



Fonte: autoria do próprio autor.

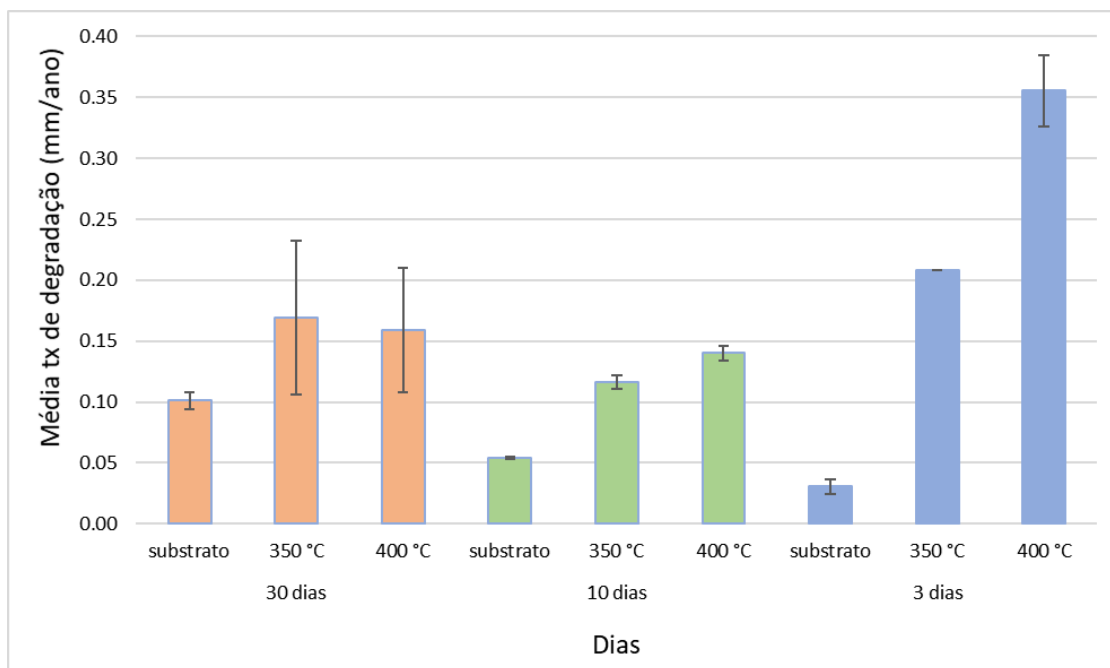
A Figura 43 mostra a perda de massa (g/cm^2) e as curvas de taxa de perda de massa ($\text{g/cm}^2\text{d}$) das amostras de ferro para os três grupos estudados: substrato (Figura 43a), amostra anodizada e recozida a 350°C (Figura 43b) e amostra anodizada e recozida a 400°C (Figura 43c) nos tempos de 3, 10 e 30 dias de imersão em solução de Hanks. A Figura 44 apresenta os resultados da média da taxa de degradação em mm/ano obtidos pelo ensaio de imersão das amostras de ferro nos tempos estabelecidos de 3, 10 e 30 dias. Neste estudo, a taxa de degradação foi medida quantitativamente a partir da profundidade corroída em função do tempo de degradação.

Figura 43 - Perda de massa e taxa de perda de massa do (a) substrato, (b) amostra anodizada e recozida a 350°C e (c) amostra anodizada e recozida a 400°C em solução de Hanks.



Fonte: autoria do próprio autor.

Figura 44- Média da taxa de degradação em mm/ano do substrato, amostra anodizada e recozida a 350°C e da amostra anodizada e recozida a 400°C, em função do tempo de imersão (30, 10 e 3 dias).



Fonte: autoria do próprio autor.

Nota-se na Figura 43a que nos primeiros 10 dias as amostras de substrato apresentaram uma maior perda de massa, correspondendo a uma maior taxa de perda de massa, assim como um aumento no valor do pH nos primeiros dias de imersão, como discutido anteriormente. Após isso, a perda de massa aumentou gradativamente com a extensão do ensaio. Já para as amostras anodizadas e recozidas a 350°C (Figura 43b), e a 400°C (Figura 43c) uma tendência de mudança semelhante foi observada: nota-se uma grande perda de massa nas primeiras 72h, seguida de uma diminuição imediata na taxa média de perda de massa até o décimo dia, e logo após volta a aumentar gradativamente até o final do ensaio. Vale ressaltar que a taxa média de perda de massa no final dos 30 dias de imersão foi 20% maior para a amostra anodizada e recozida a 350°C em relação ao substrato, e cerca de 18% maior para a amostra recozida a 400°C em relação ao substrato. Não há uma diferença significativa entre os valores da taxa média de perda de massa das amostras anodizadas, a amostra recozida a 350°C apresentou um valor 3% maior do que a amostra recozida a 400°C.

Os valores da taxa média de degradação (mm/ano) demonstrados na Figura 44, seguiram a mesma tendência dos resultados de perda de massa (g/cm^2) e taxa de perda de massa ($\text{g}/\text{cm}^2\text{d}$). Para a imersão em solução de Hanks durante 30 dias, as amostras anodizadas e recozidas a

350°C apresentaram um valor de taxa de degradação (0,17 mm/ ano) um pouco maior do que as amostras recozidas a 400°C (0,16 mm / ano) e ambas apresentaram taxas de degradação maiores que a do substrato de ferro (0,10 mm/ano). A taxa de degradação do ferro puro em solução de Hanks foi compatível com a descrita por Cheng et al. (2013), cerca de 0,105 mm/ano.

Já para o tempo de imersão de 10 dias, as amostras com superfícies anodizadas e recozidas a 400°C apresentaram uma taxa média de degradação de 0,14 mm/ano e as amostras recozidas a 350°C, aproximadamente 0,12 mm/ano. Já o substrato apresentou o valor médio de taxa de degradação de 0,05 mm/ano para a imersão em 10 dias. Como já discutido anteriormente, as amostras anodizadas apresentaram uma maior perda de massa quando comparadas ao substrato, e este evento é ainda mais pronunciado nos primeiros dias de imersão para as amostras com a superfície nanoestruturada. Para o ensaio de imersão durante 3 dias, o maior valor da taxa média de degradação foi obtido para a amostra anodizada e recozida a 400°C (0,36 mm/ano). Para amostra recozida a 350°C, o valor da taxa média de degradação foi de 0,21 mm/ano, e assim como para a amostra recozida a 400°C, os valores da taxa média de degradação são maiores que os valores obtidos para o substrato (0,03 mm/ano) após 3 dias de imersão em solução de Hanks.

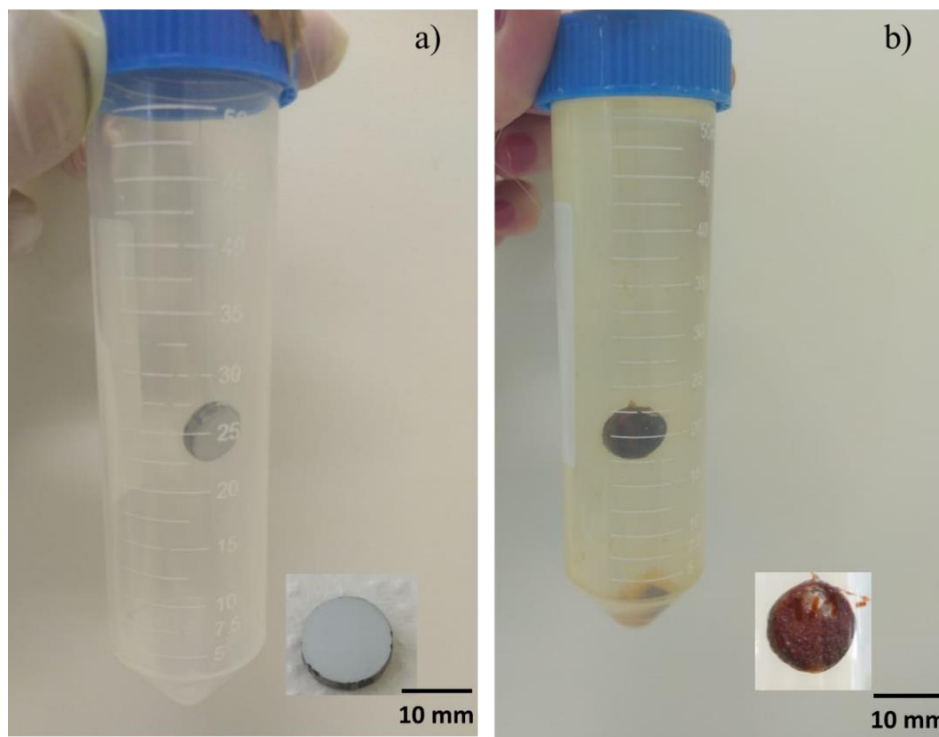
Resumidamente, o resultado do ensaio de imersão em solução de Hanks ilustra a rápida perda de massa nos primeiros dias, principalmente para as amostras com superfícies anodizadas, enquanto que a taxa de degradação tende a diminuir a longo prazo, à medida que a camada nanoestruturada corrói. O comportamento de degradação aprimorado observado nas amostras anodizadas é devido à natureza porosa da superfície que aumenta a área de superfície específica exposta do metal (TUNCER; ARSLAN, 2007).

Outra observação importante é em relação à formação de produtos de degradação que se depositam nas superfícies das amostras durante a imersão em solução de Hanks. Foi possível observar que para maiores tempos de imersão (30 dias) maior é a quantidade de produtos de degradação que se precipita na superfície do material, como é possível observar para a amostra de substrato após 30 dias de imersão (Figura 45).

Dependendo da espécie e quantidade de íons/substâncias dissolvidas na solução, diversas camadas e produtos de degradação podem ser formados. Compostos orgânicos e alguns íons, como por exemplo os íons cloreto, desempenham um papel importante no aumento da taxa de degradação. Por outro lado, soluções que contenham proteínas, íons de Ca, Mg, fosfato e

carbonato, como é o caso da solução de Hanks, podem favorecer a formação de uma camada passiva (MOUZOU et al., 2016).

Figura 45 - Imagens da amostra de substrato antes (a) e após (b) a imersão em solução de Hanks por 30 dias.



Fonte: autoria do próprio autor.

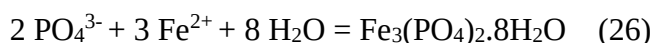
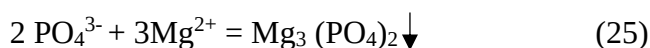
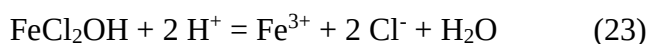
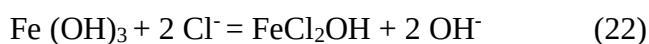
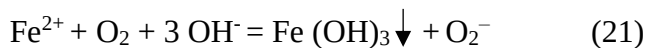
Um estudo feito sobre o tratamento de fosfatação em uma liga de Mg – Mn – Zn para aplicação biomédica, mostrou por ensaios de imersão que a camada de fosfato pode proteger a liga de magnésio da corrosão rápida (XU; ZHANG; YANG, 2009).

Da mesma forma, um processo de fosfatização foi aplicado ao aço e a camada de fosfato também diminuiu a sua taxa de corrosão (LI GY, NIU LY, LIAN JS, 2004).

Um estudo anterior sobre o comportamento de corrosão do ferro puro em solução de Hanks detectou a deposição de produtos compostos por fosfatos incluindo $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$.

A solução de Hanks é composta de cloretos, sulfato e fosfatos. A corrosão de ferro puro (acelerada pelos íons Cl^-), resulta na liberação de OH^- e no aumento do valor do pH. Por outro lado, o aumento do valor do pH promove a precipitação e deposição de fosfatos que, por sua

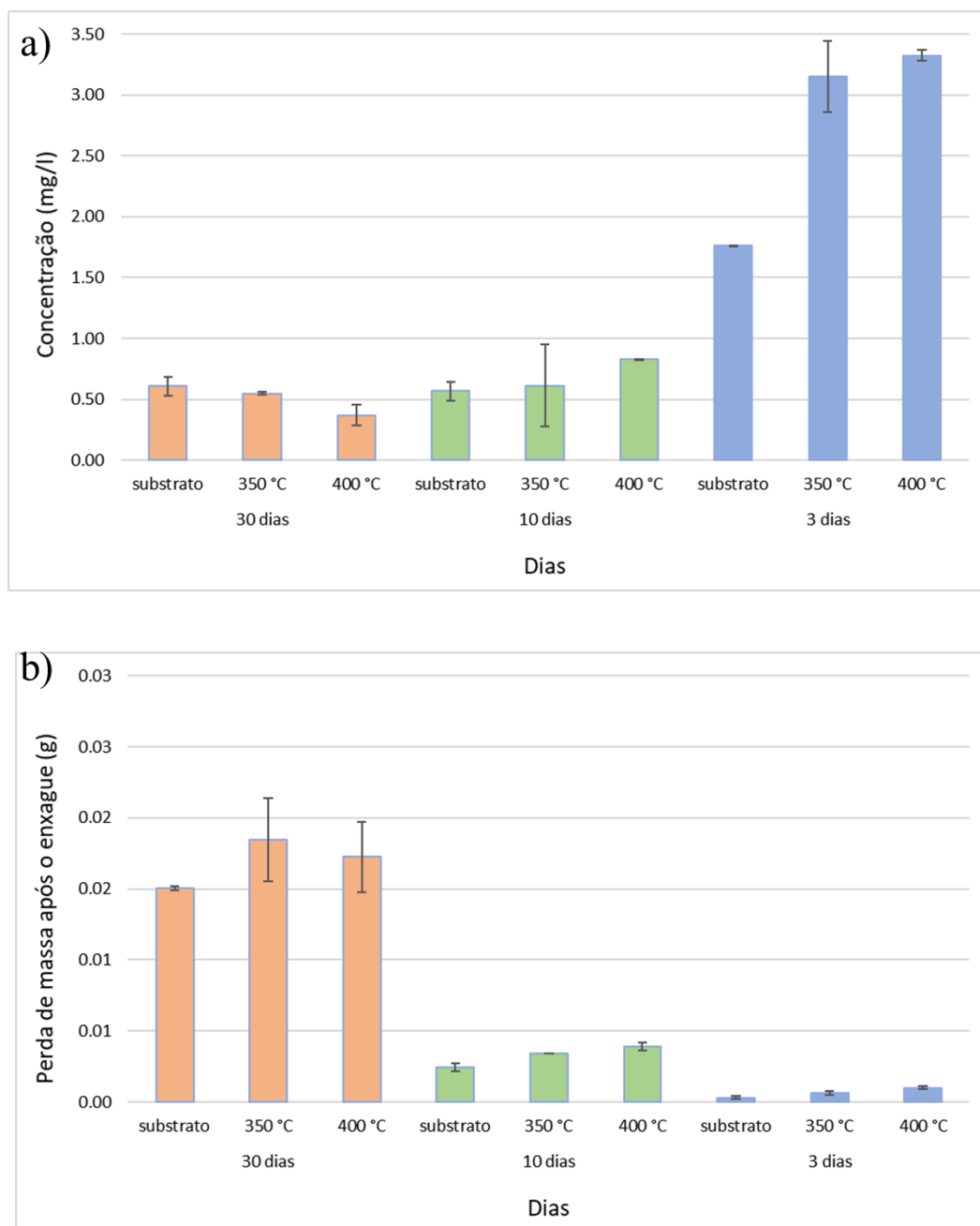
vez, resiste à dissolução do ferro e por isso a taxa de degradação tende a diminuir com o tempo de imersão. Portanto, pode-se propor que durante a imersão em solução de Hanks, as seguintes reações na superfície do ferro ocorram (ZHANG; CHEN; SHEN, 2010).



Esse mecanismo de degradação se encaixa no que foi observado para os resultados do ensaio de imersão em solução de Hanks das amostras de ferro em suas diferentes condições. Porém para a confirmação desta hipótese, a caracterização deste produto de corrosão deve ser realizada.

A Figura 46a mostra a concentração de íons de ferro em solução de Hanks para os diferentes dias de imersão. Nota-se que a concentração de íons para as amostras imersas durante 3 dias foi maior do que para as amostras imersas durante 10 e 30 dias. Este resultado contrasta com os valores de mudança de massa após o enxague (Figura 46b), etapa em que grande parte do produto de degradação aderido à superfície das amostras é removida. Este valor é mais alto para as amostras que foram imersas durante 30 dias, pois como observado na Figura 45, para maiores tempos de imersão, maior a camada de precipitados na superfície do material. Portanto, a baixa quantidade de ferro na solução após a imersão por 30 dias pode ser relacionada à formação de produtos de degradação, como compostos de fosfato de ferro que se precipitam na superfície, levando ao esgotamento dos íons de Fe na solução. Esses produtos de degradação estavam presentes em quantidades reduzidas na superfície do metal para menores tempos de imersão (3 e 10 dias) e, portanto, a concentração de íons livres na solução é maior.

Figura 46- (a) Concentração de íons de ferro na solução de ensaio em função do tempo de imersão medida pelo AAS para as amostras de substrato e amostras anodizadas e recozidas a 350°C e 400°C; (b) perda de massa após o enxágue em água deionizada.



Fonte: autoria do próprio autor.

Esses resultados confirmaram que o processo de anodização é capaz de produzir superfícies nanoporosas com maiores taxas de corrosão, o que pode facilitar a biodegradação de amostras de ferro.

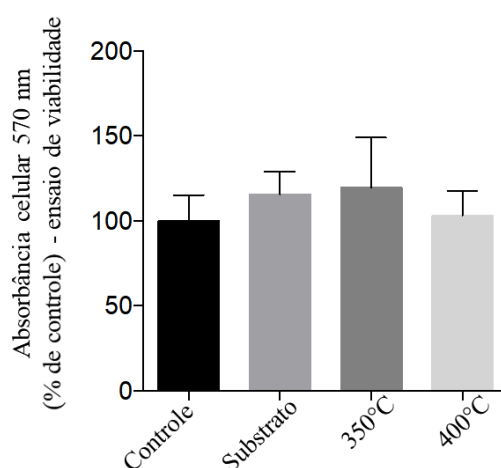
Em determinadas aplicações, a superfície nanoestruturada de óxido de ferro pode ser preparada para se degradar e se desprender do substrato após o término de sua função, como é o caso por exemplo, de uma liberação temporária localizada do medicamento. No presente estudo, as superfícies nanoestruturadas de óxido de ferro se degradam após períodos relativamente curtos em solução de Hanks, de forma que sua aplicação seja adequada apenas para a liberação de medicamentos a curto prazo. Porém, combinado com outros tratamentos de superfície, como revestimentos de polímeros, ou até mesmo com a adição de elementos de liga, espera-se as matrizes nanoestruturadas se tornem mais estáveis e assim, as aplicações a longo prazo também sejam possíveis (KONNO et al., 2016).

5.3 ESTUDOS *IN VITRO*

5.3.1 Viabilidade celular por metil tiazol tetrazolium (MTT)

A viabilidade celular e citotoxicidade das amostras de ferro foram avaliadas após 24 h de cultura através de ensaio MTT. Este ensaio quantifica a atividade mitocondrial das células através da medição de cristais de formazam, produto formado pela redução de sal de tetrazolium (MOSMANN, 1983). Os resultados podem ser verificados na Figura 47.

Figura 47 - Ensaio MTT indireto do substrato e das amostras recozidas a 350°C e 400°C.



Fonte: autoria do próprio autor.

Nenhuma diferença significativa na viabilidade celular foi observada entre os diferentes grupos em relação ao controle, tanto para o substrato de ferro quanto para as amostras que foram anodizadas e recozidas a diferentes temperaturas (350°C e 400°C). Isso nos permite inferir que o crescimento de nanotubos não resulta em citotoxicidade e embora não haja diferença

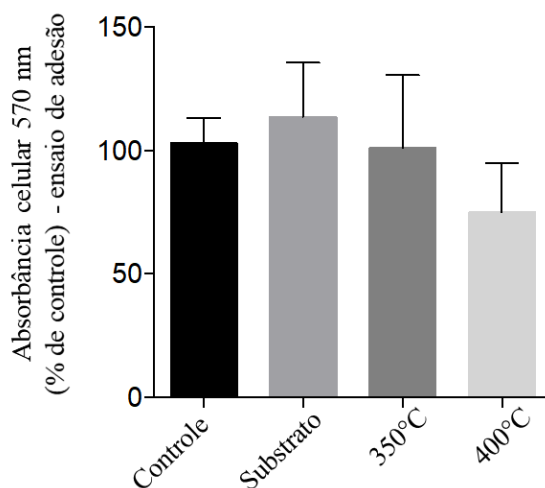
significativa entre a viabilidade das células, a amostra recozida a 350°C mostra uma pequena vantagem quando comparada as demais condições e ao controle. Conforme estabelecido no protocolo ISO 10993 para ensaios de citotoxicidade, uma viabilidade celular de 75% ou mais é normalmente classificada como uma boa representação de não toxicidade. Assim, o ensaio de citotoxicidade indireto de MTT demonstrou a boa viabilidade celular para todos os grupos.

5.3.2 Adesão celular

O ensaio de adesão celular por cristal violeta é utilizado como um ensaio confirmatório dos resultados do ensaio do MTT, uma vez que também possibilita determinar o número de células viáveis a crescer em monocamada.

Portanto, para avaliar a capacidade das superfícies de promover a adesão de osteoblastos foi realizado o ensaio de cristal violeta, e o resultado pode ser visto na Figura 48.

Figura 48 - Ensaio de adesão celular por Cristal Violeta.



Fonte: autoria do próprio autor.

Embora os resultados não tenham sido estatisticamente significativos entre os grupos analisados, há uma tendência de aumento na adesão de pré-osteoblastos nas diferentes superfícies das amostras de ferro. Assim, a associação dos resultados de viabilidade celular e adesão celular demonstram que o material analisado, mesmo que em diferentes condições superficiais, não é citotóxico e também não é capaz de interferir na adesão celular.

Estes resultados preconizam um comportamento metabólico diferencial das células osteoblásticas que interagem com as diferentes superfícies de ferro estudadas e essa confirmação nos levou a discutir melhor o comportamento molecular destas células.

5.3.3 qPCR

Tendo em vista os resultados obtidos, é possível notar um repertório de genes associados à adesão celular e para compreender melhor os mecanismos intracelulares envolvidos neste evento, a tecnologia qPCR foi utilizada para avaliar os genes relacionados à adesão celular.

Entre as moléculas de adesão celular, as integrinas constituem a maior família de receptores que intermedeiam interações entre células e matriz extracelular (MEC). A família integrina é composta por 22 heterodímeros de dois tipos de subunidades α e β , que estão correlacionadas com a transdução de sinais do meio para a célula, conectando-se às proteínas da MEC e outras moléculas de sinalização intracelular importantes em vários processos, incluindo proliferação e migração celular (AIYELABEGAN; SADRODDINY, 2017)

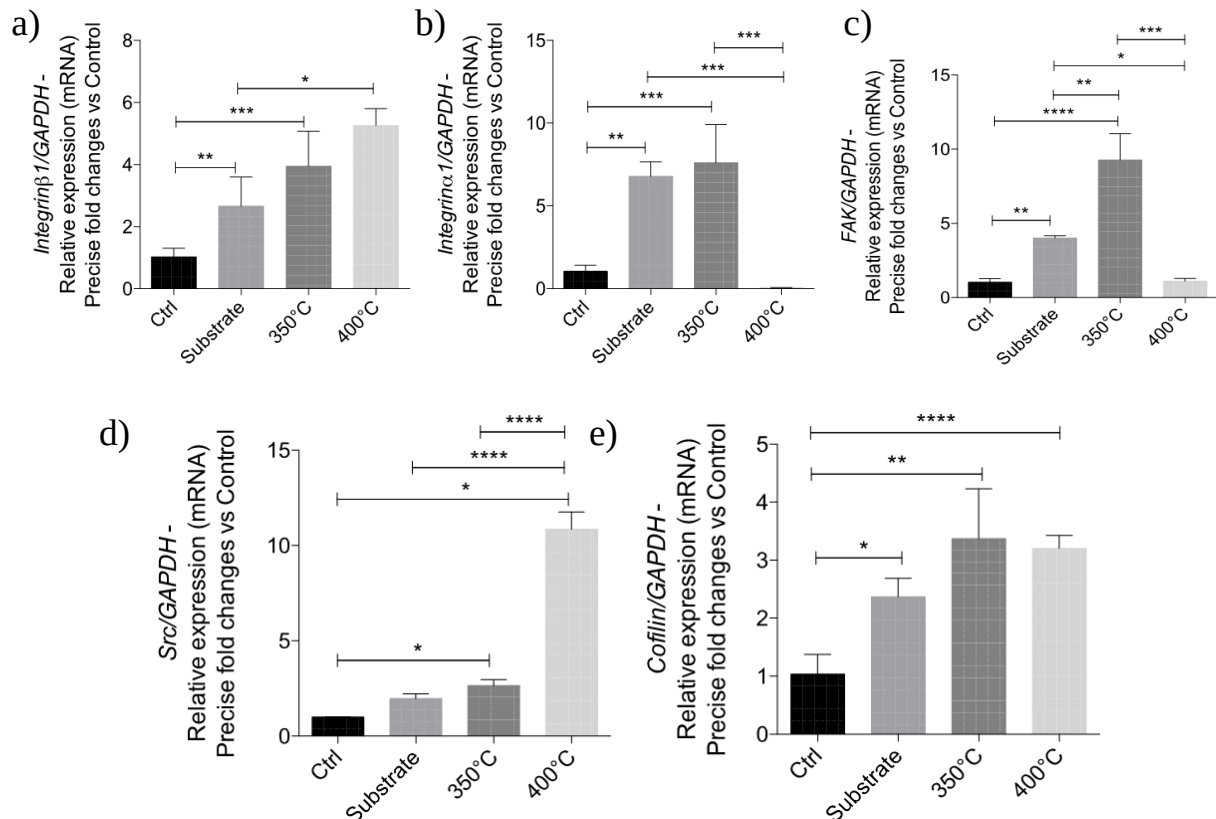
As integrinas $\beta 1$ parecem ser os receptores predominantemente utilizados por células semelhantes a osteoblastos humanos na adesão ao colágeno e laminina e parcialmente na adesão à fibronectina. O gene da integrina- $\alpha 1$ é conhecido por mediar a adesão de vários tipos de células ao colágeno e outras proteínas da matriz extracelular (ANSELME, 2000; GRONTHOS et al., 1997).

A análise de qPCR mostra que houve um aumento na expressão gênica de Integrina- $\beta 1$ em todos os grupos analisados (Figura 49a). Já a Figura 49b demonstra uma redução significativa da expressão da Integrina- $\alpha 1$ para o grupo de amostras recozidas a 400°C.

É necessário ressaltar que ao analisar a adesão celular mediante ao envolvimento de integrinas (sendo elas compostas por duas subunidades), pode-se afirmar que nem todos os seus membros são requeridos para guiar os eventos biológicos relacionados à adesão, e para que haja um melhor entendimento deste contexto, é necessário realizar ensaios que envolvam outros genes codificantes de outros membros desta família (PARK et al., 2015).

Para isso, foram analisadas as expressões gênicas de Fak (Figura 49c) e Src (Figura 49d), pois após a ativação das integrinas, a interação com estas proteínas que estão envolvidas na cascata de sinalização celular é favorecida (ZAMBUZZI et al., 2011).

Figura 49 - Expressão gênica de genes relacionados à adesão celular: Integrina- β 1 (a), Integrina- α 1 (b), Fak (c), Src (d), e Cofilina (e), utilizando a tecnologia q-PCR. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao controle.



Fonte: autoria do próprio autor.

Assim, a Figura 49c mostra um panorama da expressão semelhante à Integrina- α 1, onde há uma redução significativa desta ativação gênica para o grupo de amostras recozidas a temperatura de 400°C, enquanto que a Figura 49d é similar ao padrão de expressão observado na Integrina- β 1. É importante ressaltar que ambos os genes, Fak e Src, em resposta ao grupo de amostras recozidas à 350°C, apresentaram um padrão de expressão superior ao controle. Estes resultados evidenciam que esses genes são modulados consideravelmente durante as alterações fenotípicas dessas células.

Um evento muito importante durante a adesão celular é o rearranjo do citoesqueleto promovido em respostas a estímulos ao gene da cofilina. Estas alterações no citoesqueleto promovem adaptações celulares a diferentes superfícies (adaptado de ZAMBUZZI et al., 2011). Assim, a atividade da Cofilina (Figura 49e) foi avaliada para melhor compreender o

envolvimento desse gene durante a adesão de pré-osteoblastos nas superfícies estudadas. Os resultados mostram que a expressão de Cofilina aumentou significativamente em resposta a todos os grupos analisados.

De maneira geral, as análises biológicas indicaram uma melhora na viabilidade e adesão celular, juntamente com a expressão de genes relacionados à adesão (Integrina- β 1, Integrina- α 1 Fak, Src e Cofilina) nas amostras, principalmente para a condição de recozimento a temperatura de 350°C que demonstrou uma vantagem em relação aos outros grupos estudados, após combinar os resultados dos ensaios *in vitro*.

6 CONCLUSÃO

Por meio dos resultados obtidos foi possível concluir:

- a) A oxidação anódica permite o crescimento de nanotubos de óxido de ferro sobre a amostra de ferro puro, utilizando um eletrólito de etilenoglicol e fluoreto de amônio a 0,3% em massa, 3% em volume de água, sob potencial de 50 V e agitação de 100 rpm durante o tempo de 30 min.
- b) Para as temperaturas de recozimento empregadas (150 °C a 400 °C), em todos os grupos verificou-se que os principais componentes dos arranjos nanoestruturados de óxido de ferro foram α -Fe₂O₃ e Fe₃O₄. E as dimensões das matrizes nanotubulares mais vantajosas para a reserva de medicamentos foram obtidas a 350°C e 400°C.
- c) Para todas as temperaturas de recozimento, superfícies hidrofílicas foram obtidas, no entanto, as melhores condições de molhabilidade foram observadas quando as temperaturas de 350°C e 400°C foram empregadas.
- d) As amostras anodizadas e recozidas a 350°C e 400°C, exibiram taxas de degradação superiores à do substrato, sendo que para o maior tempo de imersão (30 dias), a amostra recozida a 350°C apresentou valores de perda de massa e taxa de degradação superiores aos outros grupos.
- e) Os resultados dos estudos celulares *in vitro*, indicaram que as superfícies nanoestruturadas de óxido de ferro não causam influência adversa na viabilidade e adesão das células MC3T3-E1, sendo que após combinar os resultados a superfície anodizada e recozida a 350°C se mostra mais vantajosa que as demais.

Dessa forma, os arranjos nanoestruturados de óxido de ferro desenvolvidos neste estudo são promissores para a funcionalização de biomateriais à base de ferro. Porém, esses resultados biológicos preliminares *in vitro* exigem perspectivas *in vivo* para validar hipóteses para uso em protocolos clínicos e de bioengenharia de tais superfícies.

REFERÊNCIAS

- AIYELABEGAN, H. T.; SADRODDINY, E. Fundamentals of protein and cell interactions in biomaterials. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 88, n. 88, p. 956–970, 2017.
- ALBU, S. P.; GHICOV, A.; SCHMUKI, P. High aspect ratio, self-ordered iron oxide nanopores formed by anodization of Fe in ethylene glycol/NH₄F electrolytes. **Physica Status Solidi - Rapid Research Letters**, v. 3, n. 2–3, p. 64–66, 2009.
- ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, v. 21, n. 7, p. 667–681, 2000.
- ARREDONDO, M.; NÚÑEZ, M. T. Iron and copper metabolism. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 4–5, p. 313–327, 2005.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM G31-72**: Standard Practice for Laboratory Immersion Corrosion Testing of Metals. West Conshohocken, PA: ASTM, 2004.
- BAGNO, A.; DI BELLO, C. Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 15, n. 9, p. 935–949, 2004.
- CAN, M. M.; COŞKUN, M.; FIRAT, T. A comparative study of nanosized iron oxide particles; Magnetite (Fe₃O₄), maghemite (γ -Fe₂O₃) and hematite (α -Fe₂O₃), using ferromagnetic resonance. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 542, p. 241–247, 2012.
- CHAMRITSKI, I.; BURNS, G. Infrared- And raman-active phonons of magnetite, maghemite, and hematite: A computer simulation and spectroscopic study. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 11, p. 4965–4968, 2005.
- CHEN, Q.; THOUAS, G. A. Metallic implant biomaterials. **Materials Science and Engineering R: Reports**, v. 87, p. 1–57, 2015.
- CHENG, J. *et al.* Comparative in vitro study on pure metals (Fe, Mn, Mg, Zn and W) as biodegradable metals. **Journal of Materials Science and Technology**, v. 29, n. 7, p. 619–627, 2013.
- FARIA, D. L. A.; VENÂNCIO SILVA, S.; OLIVEIRA, M. T. Raman microspectroscopy of some iron oxides and oxyhydroxides. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 28, n. 11, p. 873–878, 1997.
- DENG, H. *et al.* Photocathodic protection of iron oxide nanotube arrays fabricated on carbon steel. **Surface and Coatings Technology**, v. 266, p. 183–187, 2015.
- DEY, A. *et al.* Nanoindentation study of microplasma sprayed hydroxyapatite coating. **Ceramics International**, v. 35, n. 6, p. 2295–2304, 2009.

EATON, J. W.; QIAN, M. Molecular bases of cellular iron toxicity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 9, p. 833–840, 2002.

GEETHA, M. *et al.* Ti based biomaterials , the ultimate choice for orthopaedic implants: a review. **Progress in Materials Science**, v. 54, n. 3, p. 397–425, 2009.

GHASEMI-MOBARAKEH, L. *et al.* Key terminology in biomaterials and biocompatibility. **Current Opinion in Biomedical Engineering**, v. 10, p. 45–50, 2019.

GHICOV, A.; SCHMUKI, P. Self-ordering electrochemistry: a review on growth and functionality of TiO₂ nanotubes and other self-aligned MO_x structures. **Chemical Communications**, n. 20, p. 2791–2808, 2009.

GONG, H. *et al.* In vitro biodegradation behavior, mechanical properties, and cytotoxicity of biodegradable Zn-Mg alloy. **Journal of Biomedical Materials Research – Part B Applied Biomaterials**, v. 103, n. 8, p. 1632–1640, 2015.

GRONTHOS, S. *et al.* Integrin expression and function on human. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 12, n. 8, p. 1189–1197, 1997.

HERMAWAN, H. *et al.* Iron–manganese: new class of metallic degradable biomaterials prepared by powder metallurgy. **Powder Metallurgy**, v. 51, n. 1, p. 38–45, 2008.

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

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

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**, v. 93, n. 1, p. 1–11, 2010b.

HOLZAPFEL, B. M. *et al.* How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 4, p. 581–603, 2013.

HUDECKI, A.; KIRYCZYŃSKI, G.; ŁOS, M. J. Biomaterials, definition, overview. *In*: HUDECKI, A. **Stem cells and biomaterials for regenerative medicine**. Cambridge, MA: Elsevier, 2019. P. 85–98.

INDIRA, K. *et al.* A Review on TiO₂ Nanotubes: Influence of anodization parameters, formation mechanism, properties, corrosion behavior, and biomedical applications. **Journal of Bio- and Tribo-Corrosion**, v. 1, n. 4, p. 1–22, 2015.

JUBB, A. M.; ALLEN, H. C. Vibrational spectroscopic characterization of hematite, maghemite, and magnetite thin films produced by vapor deposition. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 2, n. 10, p. 2804–2812, 2010.

KONNO, Y. *et al.* Formation of porous anodic films on carbon steels and their application to corrosion protection composite coatings formed with polypyrrole. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 163, n. 7, p. C386–C393, 2016.

KROPF, M.; MARIA, A.; ANTUNES, D. S. The nanobiotechnology: based development of new orthopedic implants. **Nanomedicine and Nanotechnology Journal**, Rio de Janeiro, v.1, n.1, p. 111, 2017.

LATEMPA, T. J. *et al.* Temperature-dependent growth of self-assembled hematite (α -Fe₂O₃) nanotube arrays: Rapid electrochemical synthesis and photoelectrochemical properties. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 36, p. 16293–16298, 2009.

LEE, C. Y. *et al.* Anodic nanotubular/porous hematite photoanode for solar water splitting: Substantial effect of iron substrate purity. **ChemSusChem**, v. 7, n. 3, p. 934–940, 2014.

GUANGYU LI, LIYUAN NIU, JIANSHE LIAN, Z. J. A black phosphate coating for C1008 steel. **Surface and Coatings Technology**, v. 176, n. 2, p. 215–221, 2004.

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

LI, J. *et al.* Materials evolution of bone plates for internal fixation of bone fractures: a review. **Journal of Materials Science and Technology**, v. 36, n. July, p. 190–208, 2020.

LIEU, P. T. *et al.* The roles of iron in health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 22, n. 1–2, p. 1–87, 2001.

LU, J. FENG; TSAI, C. J. Hydrothermal phase transformation of hematite to magnetite. **Nanoscale Research Letters**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2014.

LUCAS-GRANADOS, B. *et al.* Study of the annealing conditions and photoelectrochemical characterization of a new iron oxide bi-layered nanostructure for water splitting. **Solar Energy Materials and Solar Cells**, v. 153, p. 68–77, 2016.

LUCAS-GRANADOS, B. *et al.* Controlled hydrodynamic conditions on the formation of iron oxide nanostructures synthesized by electrochemical anodization: Effect of the electrode rotation speed. **Applied Surface Science**, v. 392, p. 503–513, 2017.

LUCAS-GRANADOS, B. *et al.* Influence of electrolyte temperature on the synthesis of iron oxide nanostructures by electrochemical anodization for water splitting. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 16, p. 7923–7937, 2018.

LUCAS-GRANADOS, B. *et al.* Iron oxide nanostructures for photoelectrochemical applications: Effect of applied potential during Fe anodization. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 70, p. 234–242, 2019.

MOMENI, M. M.; GHAYEB, Y.; MOHAMMADI, F. Solar water splitting for hydrogen production with Fe₂O₃ nanotubes prepared by anodizing method: effect of anodizing time on performance of Fe₂O₃ nanotube arrays. **Journal of Materials Science: Materials in Electronics**, v. 26, n. 2, p. 685–692, 2014.

MORAVEJ, M. *et al.* Electroformed pure iron as a new biomaterial for degradable stents: in vitro degradation and preliminary cell viability studies. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 5, p. 1843–1851, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

MOUZOU, E. *et al.* In vitro degradation behavior of Fe-20Mn-1.2C alloy in three different pseudo-physiological solutions. **Materials Science and Engineering C**, v. 61, p. 564–573, 2016.

PARK, E. J. *et al.* Structural basis of blocking integrin activation and deactivation for anti-inflammation. **Journal of Biomedical Science**, v. 22, n. 1, p. 1–9, 2015.

PAWLIK, A. *et al.* Effects of anodizing conditions and annealing temperature on the morphology and crystalline structure of anodic oxide layers grown on iron. **Applied Surface Science**, v. 426, p. 1084–1093, 2017.

PEUSTER, M. *et al.* A novel approach to temporary stenting : degradable cardiovascular stents produced from corrodible metal — results 6 – 18 months after implantation into New Zealand white rabbits1. **Heart (British Cardiac Society)**, v. 86, n. 5, p. 563–569, 2001.

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

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Â. M. Biomateriais: Tipos, aplicações e mercado. **Quimica Nova**, v. 38, n. 7, p. 957–971, 2015.

PRAKASAM, H. E. *et al.* Synthesis and photoelectrochemical properties of nanoporous iron (III) oxide by potentiostatic anodization. **Nanotechnology**, v. 17, n. 17, p. 4285–4291, 2006.

RAGHAVENDRA, G. M.; VARAPRASAD, K.; JAYARAMUDU, T. Biomaterials: design, development and biomedical applications. In: RAGHAVENDRA, G. M. **Nanotechnology applications for tissue engineering**. Oxford: Elsevier, 2015. P. 21–44.

RANGARAJU, R. R. *et al.* An investigation on room temperature synthesis of vertically oriented arrays of iron oxide nanotubes by anodization of iron. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 3, p. 785–793, 2010.

RATNER, B. D. *et al.* **An introduction to materials in medicine**. 2. Ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press, 2004.

RATNER, B. D. Biomaterials: been there, done that, and evolving into the future. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 21, p. 171–191, 2019.

ROY, P.; BERGER, S.; SCHMUKI, P. TiO₂ nanotubes: synthesis and applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 13, p. 2904–2939, 2011.

SARMA, B. *et al.* Influence of annealing temperature on the morphology and the supercapacitance behavior of iron oxide nanotube (Fe-NT). **Journal of Power Sources**, v. 272, p. 766–775, 2014.

SARMA, B. *et al.* Electrochemical capacitance of iron oxide nanotube (Fe-NT): effect of annealing atmospheres. **Nanotechnology**, v. 26, n. 26, 2015.

SCARCELLO, E. *et al.* Endothelial dysfunction induced by hydroxyl radicals: the hidden face of biodegradable Fe-based materials for coronary stents. **Materials Science and Engineering C**, v. 112, n. May 2019, p. 110938, 2020.

SCARCELLO, E.; LISON, D. Are Fe-based stenting materials biocompatible? A critical review of in vitro and in vivo studies. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 11, n. 1, 2020.

SCHINHAMMER, M. *et al.* On the cytocompatibility of biodegradable Fe-based alloys. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 2, p. 782–789, 2013.

SEITZ, J. M. *et al.* Recent advances in biodegradable metals for medical sutures: a critical review. **Advanced Healthcare Materials**, v. 4, n. 13, p. 1915–1936, 2015.

SOBIESZCZYK, S. Surface modifications of ti and its alloys. **Advances in Materials Sciences**, v. 10, n. 1, 2010.

SONG, G. Control of biodegradation of biocompatible magnesium alloys. **Corrosion Science**, v. 49, n. 4, p. 1696–1701, 2007.

TSARYK, R. *et al.* The role of oxidative stress in pro-inflammatory activation of human endothelial cells on Ti6Al4V alloy. **Biomaterials**, v. 34, n. 33, p. 8075–8085, 2013.

TUNCER, N.; ARSLAN, G. Porous Metals and Metallic Foams. **MetFoam 2007**, p. 287–290, 2007.

VOJTĚCH, D. *et al.* Comparative mechanical and corrosion studies on magnesium, zinc and iron alloys as biodegradable metals. **Materiali in Tehnologije**, v. 49, n. 6, p. 877–882, 2015.

WANG, L. N. *et al.* Nanotubular surface modification of metallic implants via electrochemical anodization technique. **International journal of nanomedicine**, v. 9, p. 4421–4435, 2014.

WILLIAMS, D. F. Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials. **Elsevier Science Limited**, 1987.

WILLIAMS, D. F. The Williams dictionary of biomaterials. **Materials Today**, v. 2, n. 3, p. 29, 1999.

WITTE, F. Reprint of: The history of biodegradable magnesium implants: a review. **Acta Biomaterialia**, v. 23, n. S, p. S28–S40, 2015.

WITTE, F. Biodegradable metals. In: WITTE, F.. **Biomaterials science**. 4. Ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2020. P. 271–287.

XIE, K. *et al.* Fabrication of iron oxide nanotube arrays by electrochemical anodization. **Corrosion Science**, v. 88, p. 66–75, 2014.

XU, L.; ZHANG, E.; YANG, K. Phosphating treatment and corrosion properties of Mg-Mn-Zn alloy for biomedical application. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 4, p. 859–867, 2009.

YANG, L.; ZHANG, E. Biocorrosion behavior of magnesium alloy in different simulated fluids for biomedical application. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 5, p. 1691–1696, 2009.

YANG, Y. *et al.* Biodegradable nanostructures: degradation process and biocompatibility of iron oxide nanostructured arrays. **Materials Science and Engineering C**, v. 85, n. Oct. 2017, p. 203–213, 2018.

ZAMBUZZI, W. F. *et al.* Intracellular signal transduction as a factor in the development of “Smart” biomaterials for bone tissue engineering. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 6, p. 1246–1250, 2011.

ZENG, R. *et al.* Progress and challenge for magnesium alloys as biomaterials. **Advanced Engineering Materials**, v. 10, n. 8, p. 3–14, 2008.

ZHANG, E.; CHEN, H.; SHEN, F. Biocorrosion properties and blood and cell compatibility of pure iron as a biodegradable biomaterial. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, n. 7, p. 2151–2163, 2010.

ZHEN, Z.; XI, T. F.; ZHENG, Y. F. A review on in vitro corrosion performance test of biodegradable metallic materials. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China (English Edition)**, v. 23, n. 8, p. 2283–2293, 2013.

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

ZHOU, J. *et al.* A novel local drug delivery system: superhydrophobic titanium oxide nanotube arrays serve as the drug reservoir and ultrasonication functions as the drug release trigger. **Materials Science and Engineering C**, v. 82, p. 277–283, 2018.

ZHU, S. *et al.* Biocompatibility of pure iron: in vitro assessment of degradation kinetics and cytotoxicity on endothelial cells. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 5, p. 1589–1592, 2009.