Universidade Feevale
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Materiais e Processos Industriais

MAGALI PETRY

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SUPERFÍCIE ANODIZADA EM AÇO AISI 316L PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Novo Hamburgo

2022

Universidade Feevale
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Materiais e Processos Industriais

MAGALI PETRY

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SUPERFÍCIE ANODIZADA EM AÇO AISI 316L PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Materiais e Processos Industriais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Materiais e Processos Industriais.

Orientador: Prof. Dr. Cláudia Trindade Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Sandra Raquel Kunst

Novo Hamburgo

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Petry, Magali.
Obtenção e caracterização de superfície anodizada em aço AISI 316L para aplicações biomédicas / Magali Petry. – 2022.
146 f. ; il. color. ; 30 cm.

Trabalho de Conclusão (Mestrado Profissional em Tecnologia de Materiais e Processos Industriais) – Universidade Feevale, Novo Hamburgo-RS, 2022.
Inclui bibliografia.
"Orientador: Prof. Dr. Cláudia Trindade Oliveira; Coorientador: Prof. Dr. Sandra Raquel Kunst".

1. Anodização. 2. Biomateriais. 3. Aço inoxidável 316L. I. Título.

CDU 669.018

Bibliotecária responsável: Janice Moser Corrêa – CRB 10/2315

Universidade Feevale
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Materiais e Processos Industriais

MAGALI PETRY

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SUPERFÍCIE ANODIZADA EM AÇO AISI 316L PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Dissertação de mestrado aprovada pela banca examinadora em 24 de fevereiro de 2022, necessária para conferir ao autor o título de Mestre em Tecnologia de Materiais e Processos Industriais.

Componentes da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Cláudia Trindade Oliveira
(Orientador)
Universidade Feevale

Prof. Dr. Hugo Marcelo Veit
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Ana Luiza Ziulkoski
Universidade Feevale

AGRADECIMENTOS

Gratidão é a palavra-chave. Em primeiro lugar à Deus e a todos que de algum modo contribuíram para a execução desta pesquisa, meus sinceros agradecimentos.

À minha orientadora, professora Dr. Claudia Trindade Oliveira, pela grande honra e oportunidade de compartilhar seu conhecimento, por todo o apoio dedicado.

À professora Dr. Sandra Raquel Kunst pela coorientação, auxílio e dedicação durante a realização deste trabalho. Obrigada por todo apoio e por compartilhar seu conhecimento.

À Dr. Ana Luiza Ziulkoski pela dedicação em me auxiliar na realização da caracterização biológica.

Ao Dr. Fernando DalPont Morisso, pela disponibilidade e sempre dedicação em auxiliar os trabalhos desta pesquisa no Laboratório de Estudos Avançados em Materiais da Universidade Feevale ao qual é responsável. Da mesma forma agradeço a técnica de laboratório Ana Carolina Lima, pela disponibilidade, dedicação e auxílio para a execução das análises e solicitações necessárias para o andamento deste trabalho.

Ao colega de jornada na pesquisa Luã, pelo imenso auxílio na execução de análises, preparação de amostras e apoio para que este trabalho se realizasse.

Aos meus amados pais, Paulo e Valmi, por toda força, amor, apoio e compreensão a mim dedicada.

Ao meu querido esposo Angrigo por estar sempre ao meu lado ao longo desta trajetória, me incentivando e encorajando. Que compartilha comigo nosso maior presente, nossa amada pequena Camila, amor da minha vida!

A todos que de alguma forma estiveram presentes na realização desta pesquisa, deixo registrada minha gratidão.

RESUMO

Biomateriais metálicos possuem ampla utilização em diversos campos da medicina. Os desafios para esta classe de material giram principalmente em torno da biocompatibilidade, osseointegração, integridade mecânica e do custo. O objetivo deste estudo é buscar o aperfeiçoamento das propriedades de biocompatibilidade de um material já utilizado amplamente na área da medicina e de baixo custo que é o aço inoxidável austenítico AISI 316L. Os tratamentos de superfície como a anodização vem se mostrando como uma boa e acessível alternativa para criar superfícies com maior interação e menores danos aos tecidos humanos. Também o uso de nanocargas com propriedades antibacterianas nas superfícies de biomateriais se revelam como um fator importante para o desfecho positivo em aplicações biomédicas. Desta forma, determinou-se parâmetros para o processo de anodização para obtenção de uma camada nanoporosa de óxido (concentrações de eletrólito, densidade de corrente, temperatura, agitação, pH, condutividade), e realizou-se análise dos transientes de potencial por tempo e das colorações obtidas. Esta camada anodizada foi caracterizada por ensaio de ângulo de contato e caracterização eletroquímica, análises de morfologia de topo por microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG/EDS), microscopia de força atômica, espectroscopia de difração de raio-X. Em um segundo processo foram incorporadas cargas de prata na amostra anodizada com melhores resultados a fim de promover o aperfeiçoamento da biofuncionabilidade do aço inox 316L com propriedades bactericidas e antifúngicas. Para tanto, foram avaliadas propriedade citotóxicas, propriedades bactericidas e capacidade formação de hidroxiapatita. Como resultados obteve-se uma camada anodizada nanorugosa com hidrofilia e propriedades de resistência à corrosão e biofuncionalidade satisfatória para uso como biomaterial. Todavia, as amostras com prata não apresentaram resultado satisfatório de ação bactericida. O desempenho mais satisfatório atingido nas caracterizações foi apresentado pela amostra anodizada por cinco minutos em relação às propriedades de resistência à corrosão e molhabilidade, rugosidade, apresentando bons resultados para formação de hidroxiapatita. Desta forma, esta camada obtida se mostra como uma alternativa promissora para futuras aplicações em áreas biomédicas, principalmente em implantes ortopédicos quando comparada ao aço original AISI 316L utilizado atualmente para estas funcionalidades.

Palavras-chave: Anodização; biomateriais; aço inoxidável 316L.

ABSTRACT

Metallic biomaterials are widely used in many fields of medicine. The challenges for this class of material revolve mainly around biocompatibility, osseointegration, mechanical integrity and cost. The objective of this study is to seek the improvement of the biocompatibility properties of a material already widely used in medicine and have a low cost, which is austenitic stainless steel AISI 316L. Surface treatments such as anodizing are proving to be a good and affordable alternative to create surfaces with greater interaction and less damage to human tissue. Also, the use of nanofillers with antibacterial properties on the surfaces of biomaterials is revealed as an important factor for the positive outcome in biomedical applications. In this way, parameters for the anodizing process were determined to obtain a nanoporous oxide layer (electrolyte concentrations, current density, temperature, stirring, pH, conductivity), and an analysis of the potential transients by time and colorations was performed. This anodized layer was characterized by contact angle testing, electrochemical characterization, top morphology analyzes by scanning electron microscopy (SEM-FEG/EDS), atomic force microscopy, X-ray diffraction spectroscopy. In a second process, silver ladings were incorporated into the anodized sample with better results in order to improve the biofunctionality of 316L stainless steel with bactericidal and antifungical properties. Therefore, cytotoxic properties, bactericidal properties and hydroxyapatite formation capacity were evaluated. As a result, a nanowrinkled anodized layer with hydrophilicity and corrosion resistance properties and satisfactory biofunctionality for use as a biomaterial was obtained. However, the samples with silver did not present satisfactory results of bactericidal action. The most satisfactory performance achieved in the characterizations was presented by sample anodized for five minutes in relation to the properties of corrosion resistance and wettability, roughness, showing good results for the formation of hydroxyapatite. In this way, this layer obtained shows itself as a promising alternative for future applications in biomedical areas, especially in orthopedic implants when compared to the original AISI 316L steel currently used for these features.

Keywords: Anodizing; biomaterials; 316L stainless steel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplos de aplicações de biomateriais metálicos como dispositivos de fixação óssea. 23
Figura 2: Imagem da microestrutura do aço 316L com presença de ferrita delta.....26
Figura 3: Parede celular de bactérias Gram-positivas/negativas 29
Figura 4: Mecanismos de contaminação de bactérias e vírus em ambientes hospitalares por contaminação de EPIs 32
Figura 5: Micrografia ao MEV de superfície biomimética de aço 304 com cobertura de hidroxiapatita. 35
Figura 6: Micrografias ao MEV de camada com estruturas nanoporosa formadas sobre metais de transição (vista de topo e seção transversal). 42
Figura 7: Resultado das colorações das amostras anodizadas 43
Figura 8: Micrografia ao MEV da superfície do aço anodizado somente com eletrólito a base de ácido sulfúrico. 44
Figura 9: Micrografias de topo e seção transversal de anodização aço 304 com eletrólito 5M H_2SO_4| 2M H_2O_2 em tempos diferentes: (a/b) 15 minutos; (c/d) 120 minutos; (e/f) 240 minutos. 45
Figura 10: Micrografias ao MEV ensaio de formação de apatita artificial em diferentes eletrólitos 46
Figura 11: Micrografias da seção transversal das amostras anodizada a 50 V em tempos distintos 47
Figura 12: Micrografias de topo das amostras anodizadas em tempos diferentes na tensão de 50 V. 49
Figura 13: Modelo proposto de crescimento do poro da camada de óxido (a) anodização com tensão constante; (b) anodização com tensão por etapas. 49
Figura 14: Micrografia de topo da amostra de aço inox 304 anodizada e tratada termicamente....50
Figura 15: Micrografias da seção transversal de 316L anodizado destacando a espessura da camada de óxido: (A) condição catódica (B) condição anódica. 51
Figura 16: micrografia ao MEV de amostra anodizada a 2,0 V em eletrólito NaOH a 50°C. 53

Figura 17: Mecanismo proposto de crescimento das paredes de óxido na anodização de aço com eletrólito de 12,5M NaOH. 54
Figura 18: Micrografias ao MEV das microestruturas (aglomerados de hidroxiapatita) (a); maior magnificação da área em vermelho para destacar as nanopartículas de Ag (b). 55
Figura 19: Micrografias da morfologia das amostras sem prata e com concentrações variadas de prata. (b) 1% Ag; (c) 3% Ag e (d) 5% Ag. 57
Figura 20: Micrografias de topo das amostras somente com HA (a e b) e com HAAgMn (d e e); micrografia da seção tranversal da amostra com HAAgMn (c); esquema sugerido para a seção transversal da amostra HAAgMn (f). 59
Figura 21: Micrografia das amostras de titânio anodizado com cobertura de hidroxiapatita sem (a) e com dopagem de Ag (b); composição química da cobertura e ângulo de contato. 60
Figura 22: Diagrama de blocos representando o fluxograma de trabalho 61
Figura 23: Arranjo esquemático para o processo de anodização. 63
Figura 24: Representação esquemática do ângulo de contato formado por uma gota de um líquido sobre um sólido 64
Figura 25: Classificação do comportamento das superfícies de acordo com o ângulo de contato θ 65
Figura 26: Transientes de densidade de corrente e potencial de aço AISI 316L anodizado em solução 10 M NaOH 72
Figura 27: Comportamento da densidade de corrente e potencial de aço AISI 316L durante anodização em solução 10 M NaOH. 75
Figura 28: Mecanismos propostos para formação inicial de filmes passivos. 76
Figura 29: Imagem fotográfica das amostras após anodização em 79
Figura 30: Ângulo de contato obtido pela gota séssil. 82
Figura 31: Representação das curvas de polarização para as amostras de aço AISI 316L original, anodizada por 5 e 10 minutos em solução 10 M NaOH 84
Figura 32: Micrografia obtidas ao MEV após ensaio de polarização potenciodinâmica em SBF para amostras A-O (A), A-5 (B), A-10 (C) e ênfase aumento amostra A-10 (D). 88
Figura 33: Medidas de potencial de circuito aberto para as amostras de aço AISI 316L original, anodizada por 5 e 10 minutos. 90

Figura 34: Gráficos de EIE de Bode (a) ângulo de fase e (b) módulo de impedância para amostra de aço original (A-O). 93
Figura 35: Gráficos de EIE de Bode (a) ângulo de fase e (b) módulo de impedância para amostra de aço anodizada por 5 minutos em eletrólito de 10M NaOH (A-5). ...95
Figura 36: Gráficos de EIE de Bode (a) ângulo de fase e (b) módulo de impedância para amostra de aço anodizada por 10 minutos em eletrólito de 10M NaOH (A-10). 96
Figura 37: Micrografias obtidas ao MEV após EIE para amostra A-O.....99
Figura 38: Mapeamento por EDS após EIE para amostra A-O. 100
Figura 39: Micrografias obtidas ao MEV após EIE para amostra A-5.....101
Figura 40: Mapeamento por EDS após EIE para amostra A-5. 101
Figura 41: Micrografias obtidas ao MEV após EIE para amostra A-10.....102
Figura 42: Mapeamento por EDS após EIE para amostra A-10.....103
Figura 43: Diagrama de Ellingham de formação de óxidos. 104
Figura 44: Micrografia por MEV (seção transversal) e difratogramas evidenciado a presença de óxido de silício em região mais interna de camada de óxidos. 105
Figura 45: Varreduras obtidas por análise de EDS após EIE. 106
Figura 46: Micrografias obtidas ao MEV em vista de topo das amostras nas seguintes magnificações: (a,b,c) amostra A-O; (d,e,f) amostra A-5 e (g,h,i) amostra A-10 em 10 000, 20 000 e 100 000 vezes respectivamente. 108
Figura 47: Micrografias obtidas ao MEV em vista de topo da amostra A-5 (magnificação de 100 000 x) com as medições de comprimento de nanoplacas e ângulos entre nanoplacas realizadas no software ImageJ@. 109
Figura 48: Micrografias obtidas ao MEV em vista de topo da amostra A-10 (magnificação de 100 000 x) com as medições de comprimento de nanoplacas e ângulos entre nanoplacas realizadas no software ImageJ@. 110
Figura 49: Possível processo de formação das nanoplacas de óxido. 111
Figura 50: Imagens 2D obtidas por microscópio de força atômica com área de 5μm² das amostras: (a) A-O; (b) A-5 e (c) A-10.....112
Figura 51: Imagens 3D obtidas por microscópio de força atômica com área de 5μm² das amostras: (a) A-O; (b) A-5 e (c) A-10.....113
Figura 52: Análise de tamanho médio de partículas das amostras (a) A-5 e (b) A-10. 114
Figura 53: Difratograma da amostra A-O. 117

Figura 54: Difratograma das amostras (a) A-5 e (b) A-10. 118
Figura 55: Comparativo dos difratogramas das amostras A-O, A-5 e A-10. 120
Figura 56: Micrografia por MEV da amostra A-5 com EDS do ponto A. 120
Figura 57: Micrografia por MEV da amostra A-10 com EDS dos pontos 1, 2 e 3. ... 121
Figura 58: Micrografia ao MEV das amostras (a) A-5 e (b) A-O com magnificação de 1000x após ensaio de formação de hidroxiapatita. 122
Figura 59: Micrografia ao MEV e EDS das amostras (a) A-5 e (b) A-O com magnificação de 2500x após ensaio de formação de hidroxiapatita. 123
Figura 60: Micrografia ao MEV e mapeamento por EDS da amostra A-5 após incorporação da prata na superfície. 125
Figura 61: Citotoxicidade avaliada para as amostras aço original (A-O), aço anodizado (A-5) e aço anodizado com incorporação de prata (A-5 + Ag). 126
Figura 62: Avaliação do crescimento de biofilme para as amostras aço original (A-O), aço anodizado (A-5) e aço anodizado com incorporação de prata (A-5 + Ag) em percentual do controle negativo. 129
Figura 63: Avaliação do crescimento de biofilme para as amostras aço anodizado (A-5) e aço anodizado com incorporação de prata (A-5 + Ag) em percentual relativo ao aço original (A-O). 131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades do aço inoxidável austenítico AISI 316L.....25
Tabela 2: Composição química do fluido corpóreo simulado (SBF – simuleted body fluid) 30
Tabela 3: Principais propriedades mecânicas do osso cortical e biomateriais metálicos 34
Tabela 4: Definição das nomenclaturas das amostras. 63
Tabela 5: Espessura do filme dicróico estimado a partir de sua cor, comparando a sílica em silício. Espessura ótica = $n_0t_0 = n_1t_1$. 78
Tabela 6: Ângulo de contato obtido pelo método da gota séssil. 81
Tabela 7: Dados obtidos da extrapolação das curvas de polarização potenciodinâmica. 86
Tabela 8: Resultados medições em micrografias obtidas ao MEV-FEG em vista de topo da amostra A-5 e A-10 (magnificação de 100 000 x) comprimento de nanoplacas e ângulos entre nanoplacas realizadas no software ImageJ@. 110
Tabela 9: Resultados medições de tamanho médio de partículas. 114
Tabela 10: Resultados de rugosidade média das amostras analisadas. 115

LISTA DE SIGLAS E ABREVIAÇÕES

AISI	*American Iron and Steel Institute*
ASTM	*American Society for Testing and Materials*
ANS	Agência Nacional de Saúde
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Å	Angstrom
Ag	Elemento químico prata
AgNP	Nano partículas de prata
Ag^{+}	Íon prata
AFM	Microscopia de força atômica
$A.cm^{-2}$	Ampère por centímetro quadrado
CGU	Controladoria Geral da União
Cr	Elemento químico Cromo
Co	Elemento químico Cobalto
CFC	Cúbica de face centrada
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ESR	Refundição em banho de escoria
EPI	Equipamento de proteção individual
ECS	Eletrodo de calomelano saturado
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva
EIE	Espectroscopia de impedância eletroquímica
E_{corr}	Potencial de corrosão;
$E_{(ECS)}$	Potencial em relação ao eletrodo de calomelano saturado
Fe	Elemento químico Ferro
GPa	Giga Pascal
HC	Hexagonal compacta
HSV	Vírus herpes tipo 1
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HA	Hidroxiapatita
HAAgMn	Hidroxiapatita com prata e manganês
ISO	*International Organization for Standardization*

I_{corr}	Densidade de corrente de corrosão
Log f	Logaritmo da frequência
Log |Z|	Logaritmo da impedância
ME	Meio de extração
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MEV-FEG	Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução
µm	Micrômetro
M	Concentração Molar
Mo	Elemento químico Molibdênio
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
Ni	Elemento químico Níquel
nm	Nanômetro
NBR	Norma Técnica brasileira
OCP	Potencial de circuito aberto
pH	potencial hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
Rp	Resistência de polarização
Ra	Rugosidade média
RNA	Ácido ribonucleico
RBS	Espectroscopia de retrodispersão de Rutherford
SUS	Sistema Único de Saúde
SBF	*Simulated body fluid*
VAR	Refundição a arco em vácuo
γ	Fase austenita

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
1.1 OBJETIVO GERAL 19
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 19
2 REVISÃO DA LITERATURA 20
2.1 BIOMATERIAIS 20
2.1.1 Inox 316L como biomaterial 22
2.1.2 Prata em biomateriais 27
2.2 OSSEOINTEGRAÇÃO 32
2.2.1 Superfície biomimética 35
2.2.2 Molhabilidade 37
2.2.3 SBF e atividade corrosiva 37
2.3 ANODIZAÇÃO 39
2.3.1 Anodização para obtenção de nanoporos 40
2.3.2 Processos de anodização para obtenção de nanoporos em aço inoxidável 42
2.4 PROCESSO DE ADIÇÃO DE PRATA 55
3 METODOLOGIA 61
3.1 MATERIAIS 62
3.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS 62
3.3 PROCESSO DE ANODIZAÇÃO 62
3.5 CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE 64
3.5.1 Molhabilidade 64
3.5.2 Caracterização eletroquímica 65
3.5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV/EDS) 67
3.5.4 Microscopia de força atômica (AFM) 67
3.5.5 Microscopia eletrônica por emissão de campo (MEV-FEG) 67
3.5.6 Espectroscopia de difração de Raios-X (DRX) 68
3.5.7 Capacidade de formação de hidroxiapatita 68
3.6 INCORPORAÇÃO DE NANOCARGAS DE PRATA 68
3.6.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV/EDS) 69
3.6.2 Avaliação de citotoxicidade 69
3.6.3 Avaliação de ação bactericida e antifúngica 70
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 72

4.1 ANÁLISE DOS TRANSIENTES DE ANODIZAÇÃO 72
4.2 ANÁLISE DAS CORES 77
4.4 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA 83
4.4.1. Polarização potenciodinâmica 84
4.4.2 Análise morfológica das amostras A-0, A-5 e A-10 após ensaio de polarização potenciodinâmica em SBF, ao MEV. 87
4.4.3 Potencial de circuito aberto 88
4.4.5 Espectroscopia de impedância eletroquímica 91
4.4.6 MEV/EDS após EIE 98
4.5 ANÁLISE DA TOPOGRAFIA SUPERFICIAL POR MEV-FEG 107
4.6 ANÁLISE DA TOPOGRAFIA SUPERFICIAL POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATOMICA (AFM) 111
4.7 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DA CAMADA DE ÓXIDO POR DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DRX) E ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA (EDS) 116
4.8 FORMAÇÃO DE HIDROXIAPATITA 121
4.9 INCORPORAÇÃO DE NANOCARGAS DE PRATA NA SUPERFÍCIE 124
4.10 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE 125
4.11 AVALIAÇÃO DE AÇÃO BACTERICIDA E ANTIFUNGICA 128
5 CONCLUSÃO 133
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 135
7 PRODUÇÃO CIENTÍFICA ORIUNDA DESTE TRABALHO 136
REFERÊNCIAS 137

1 INTRODUÇÃO

O aço inoxidável austenítico AISI 316L é ainda um dos materiais mais usado em aplicações traumatológicas e ortopédicas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil, segundo dados de 2019 (DATASUS, 2020). Devido à sua alta disponibilidade, fácil processabilidade, boa resistência à corrosão em relação aos demais biomateriais disponíveis (W. D. CALLISTER, 2008) seu custo se torna mais baixo, sendo a alternativa mais empregada pelo sistema público de saúde. Ainda assim, os gastos do SUS com estes materiais é elevado, segundo dados do DATASUS em 2019 foram realizados 59978 procedimentos cirúrgicos do sistema osteomuscular envolvendo um gasto de aproximadamente 68 milhões de reais.

O aço inoxidável austenítico AISI 316L devido a suas propriedades de resistência à corrosão em diversos meios, já é muito utilizado em implantes, porém, ocorrem processos de oxidação em contato com o fluido corpóreo o que restringe sua vida útil para um tempo menor, agravando a saúde do paciente e consequentemente necessitando a realização da troca da prótese (SILVA, E. F.; OLIVEIRA, 2012). Além disso, em relação ao titânio comercialmente puro este apresenta um custo relativamente mais baixo e atende as propriedades requeridas de resistência mecânica e à corrosão (CHEN; THOUAS, 2015).

Nos últimos anos em razão da desaceleração da economia brasileira, o orçamento federal para a área da saúde não acompanhou as demandas de investimentos necessárias para a área (CGU, 2020). Outro fator relevante é o número crescente de brasileiros que recorre ao SUS em detrimento aos planos de saúde privados, devido a redução da renda ou desemprego, onerando mais ainda o sistema público (ANS, 2020).

Encontrar alternativas mais eficientes para os biomateriais empregados na atualidade na saúde pública é a motivação deste estudo. Diversos estudos apontam melhoras na osseointegração em superfícies de implantes ou próteses com presença de nanotubos ou nanoporos de óxidos de metais de transição (ASOH; NAKATANI; ONO, 2016). Além de favorecer o crescimento de osteoblastos pela topografia que mimetiza a superfície óssea, também deve ser considerado como segundo critério mais importante na seleção de biomateriais a resistência à corrosão (KOWALSKI;

KIM; SCHMUKI, 2013). Processos corrosivos são as principais causas de complicações pós cirúrgicos, como rejeições, inflamações, reações alérgicas, infecções, intoxicações, muitas vezes levando à necessidade de novas cirurgias e uso de medicações que consequentemente oneram mais o sistema de saúde (PINHEIRO *et al.*, 2010).

Neste sentido, muitos tratamentos de superfícies têm sido empregados sobre o aço inoxidável 316L com o intuito de otimizar suas propriedades superficiais para fins de otimização do processo de osseointegração sendo comparáveis ao titânio. O desenvolvimento e o uso dessas técnicas baseiam-se na teoria de que o aumento do contato osso/implante pode ser atingido pela mudança da topografia ou pelo aumento da rugosidade superficial do implante (LE GUÉHENNEC *et al.*, 2007). Esses tratamentos incluem processos de modificação da topografia e da rugosidade superficial, como jateamento, ataque ácido, oxidação anódica, recobrimento com camada de materiais biocompatíveis, técnicas de implantação iônica e técnicas de deposição de vapor de plasma. Algumas dessas técnicas são atualmente utilizadas em implantes comercializados no mercado mundial (MAHAPATRO, 2015). Delas, a oxidação anódica é um dos métodos mais comuns e flexíveis empregados para modificar superfícies metálicas em nanoescala. A oxidação anódica tem sido usada com sucesso para transformar superfícies metálicas em estruturas nanotubulares com diâmetros inferiores a 100 nm (KOWALSKI; KIM; SCHMUKI, 2013). Além disso, pelo simples ajuste de parâmetros do processo, tais como a composição do eletrólito e densidade de corrente e potencial aplicados, verifica-se que as propriedades químicas e topográficas da superfície podem ser precisamente moduladas, permitindo controle completo das características desta (VARIOLA *et al.*, 2010). Tais características peculiares ao processo tornam os tratamentos superficiais por oxidação anódica muito atrativos para emprego em escala industrial.

Também é possível ainda gerar aperfeiçoamentos destes tratamentos superficiais pela adição de nanopartículas funcionais como por exemplo a prata. A prata tem conhecido potencial como agente bactericida. Atualmente este material é utilizada numa infinidade de aplicações biomédicas como biomateriais ortodônticos, cateteres e como medicação para queimaduras graves (CHEN; THOUAS, 2015). Também são relatados estudos da ação bactericida, antiviral e antifúngica de íons de prata, causando um grande interesse de diversas áreas da medicina no uso deste material, principalmente na área cirúrgica e hospitalar que enfrenta grandes desafios

no campo das infecções por microrganismos patológicos (MIRZAEE; VAEZI; PALIZDAR, 2016).

1.1 OBJETIVO GERAL

Obter uma camada nanoporosa de óxido com incorporação de nanocargas de prata em aço inoxidável AISI 316L, visando melhorar as propriedades de biocompatibilidade associado a menor custo.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste projeto seguem abaixo:

- Verificar a melhor condição de anodização para obtenção de nano porosidade em aço inoxidável AISI 316L;
- Caracterizar as amostras quanto a morfologia, molhabilidade, resistência à corrosão por métodos eletroquímicos em fluido corpóreo simulado e avaliar quanto a viabilidade celular, propriedades bactericidas e capacidade de formação de hidroxiapatita para determinação da melhor condição de anodização.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo são abordados aspectos relevantes ao embasamento da pesquisa e sua justificativa. Assim como as técnicas de anodização e tratamentos de superfície com objetivo de aprimoramento de osseointegração.

2.1 BIOMATERIAIS

O termo biomaterial refere-se a todo material com finalidade de uso no interior do corpo humano para substituir ou reparar membros danificados. Na atualidade este conceito foi revisto, sendo definido como uma substância projetada com o objetivo de assumir uma forma que, isoladamente ou como parte de um sistema complexo, é usada para orientar, por controle de interações com componentes de sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico, em seres humanos ou animais (GUERRA-FUENTES *et al.*, 2015). Para qualquer substância que atue como biomaterial, duas características são fundamentais: biofuncionabilidade e biocompatibilidade. A primeira é relacionada à um conjunto de propriedades que permitem o desempenho satisfatório da função do dispositivo. Já a biocompatibilidade se relaciona à propriedade do dispositivo continuar desempenhando esta função, o tempo que for necessário de forma efetiva dentro do corpo (EL-HADAD; KHALIFA; NOFAL, 2015).

Estas duas características, ser funcional e compatível com o corpo humano, não está presente de forma satisfatória em qualquer material de oferta abundante em nossa realidade. Mas é possível através dos avanços tecnológicos e da engenharia prover melhorias de ambas características em materiais que já são de uso comum na medicina. Ainda há um grande número de limitações nos materiais convencionais na ordem de disponibilidade, custo, rejeições pelo organismo que necessitam de aperfeiçoamento (KUMAR *et al.*, 2020). Em termos de biocompatibilidade em biomateriais também é importante destacar que estes não bastam ser apenas seguros do ponto de vista biológico, mas também estáveis a degradação, sendo assim qualquer implante deve ser projetado de forma a ser o mais possível adaptado e

próximo das características dos órgãos ao qual serão destinados (BAUER et al., 2013).

Desta forma, os biomateriais ainda podem ser classificados quanto a biocompatibilidade: incompatíveis (liberam substâncias em concentrações tóxicas no organismo, que levam a rejeição do material ou outros problemas de saúde); biotolerantes (liberam substâncias tóxicas, porém em concentrações insignificantes que não afetam o organismo , geralmente sofrem processo de encapsulamento); bioinertes (não liberam substâncias tóxicas e nem induzem resposta positiva); bioativo (induzem o organismo a resposta positiva por meio de interação) e bioabsorvíveis ou biodegradáveis (são degradados ou absorvidos pelos mecanismos de ação dos fluidos corporais sendo eliminados após determinado período de tempo) (BAUER et al., 2013).

Para biomateriais com finalidades ortopédicas deseja-se um resultado biocompatível com o tecido ósseo, ou seja, osseointegração. Favorecimento do crescimento celular de osteoblastos sobre a superfície do material. Desta forma, o objetivo destes materiais é possuir uma superfície mimética ao osso (KUMAR et al., 2020). O osso é definido como um compósito natural formado por uma fase orgânica de colágeno e uma fase mineral de fosfato de cálcio. É constituído por um denso invólucro exterior, seguida de um osso cortical e uma parte interna com núcleo celular poroso, esponjoso ou trabecular com ou sem medula óssea (BIAN *et al.*, 2019). Muitos fatores afetam a osseointegração além da interação direta da interface material e osso. Não se deseja interposição de tecido mole nesta interface, é necessário observar também aspectos do processo cirúrgico como a velocidade de perfuração do osso de modo a evitar a necrose celular (as células ósseas sofrem necrose em temperaturas acima de 47°C/minuto, o que ocorre acima de 200 rpm). A macro e micro geometria do implante pode interferir na distribuição das forças e a qualidade do osso hospedeiro, pessoas portadoras de osteoporose podem sofrer falha precoce do implante, pois ossos porosos possuem menor resistência mecânica (ZHANG *et al.*, 2019).

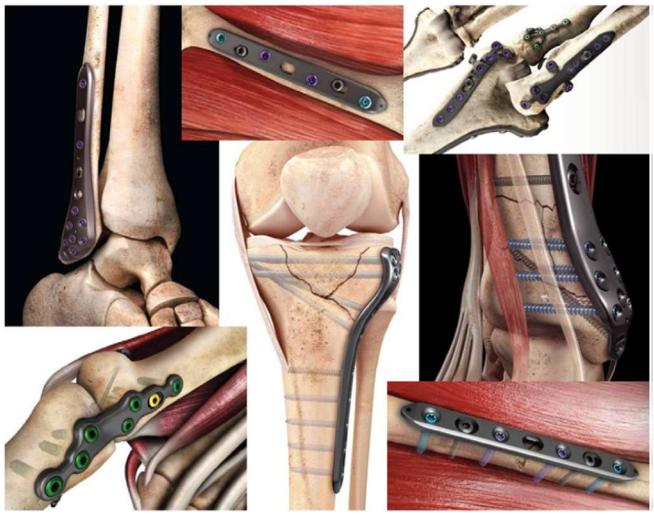
Biomateriais para implantes ortopédicos são fabricados em diversos materiais. Os mais utilizados são ligas metálicas, cerâmicas, polímeros e compósitos. Os que vem apresentando resultados mais positivos são matrizes metálicas com coberturas de superfícies a base de cerâmicas ou compósitos orgânicos. Assim se alia as propriedades mecânicas das ligas metálicas as propriedades de biocompatilidade

ativa de algumas cerâmicas como a hidroxiapatita (AGRAWAL *et al.*, 2020). Muitos resultados positivos vêm sendo encontrados nesta linha de pesquisa com metais de transição como o titânio, tântalo e nióbio, assim como aplicação de nanotecnologia nas modificações de superfícies com dopagem por nanocargas, formação de nanotubos ou nanoporos por diversos processos (KUMAR et al., 2020). Porém estes materiais ainda são de alto custo e baixa disponibilidade comercial (ASOH; NAKATANI; ONO, 2016), principalmente para os sistemas públicos de saúde como no caso do Brasil. O Sistema Único de Saúde (SUS) tem como material mais utilizado em procedimentos ortopédicos o aço inoxidável austenítico AISI 316L, seguido de ligas de titânio e ligas de cromo-cobalto (DATASUS, 2020). Isto ocorre porque o aço inoxidável possui alta disponibilidade, fácil processabilidade, boa resistência à corrosão em relação aos demais biomateriais disponíveis e seu custo se torna mais baixo (CHEN; THOUAS, 2015). O aço inoxidável austenítico AISI 316L na atualidade ainda se apresenta como a alternativa mais utilizada em razão de seu baixo custo e resposta satisfatória para o sistema público de saúde, apesar de apresentar algumas limitações em relação ao tempo de durabilidade no organismo (SILVA, E. F.; OLIVEIRA, 2012).

2.1.1 Inox 316L como biomaterial

É comum o uso de materiais metálicos para a fabricação de implantes ortopédicos, os quais são definidos como dispositivos mecânicos artificiais que substituem ou suportam parte da estrutura do esqueleto do corpo humano. As citações mais antigas do uso de metais em procedimentos cirúrgicos datam a partir de 1545. A partir de então, estes materiais têm encontrado diferentes aplicações no ramo da ortopedia, cirurgias orais, maxilo-faciais e cardiovasculares, conforme ilustrado na Figura 1 (MAHAPATRO, 2015). Os materiais metálicos se destacam neste segmento por suportar apropriadamente cargas de tensão aplicadas ao sistema ósseo (BAUER et al., 2013). As ligas metálicas mais utilizadas para esta finalidade são as ligas de titânio puro (ASTM F76), a base de titânio-alumínio-vanádio (ASTM F136), as ligas a base de cromo-cobalto (ASTM F75 e F90) e aço inoxidável 316L (ASTM F55 e F138) (MAHAPATRO, 2015).

Figura 1: Exemplos de aplicações de biomateriais metálicos como dispositivos de fixação óssea.



Fonte: Mahapatro, 2015.

O aço inoxidável tem como principal característica a alta resistência à oxidação atmosférica, atribuída aos seus elementos de liga. O cromo em especial, confere uma excelente resistência à corrosão, quando comparado aos aços carbono (W. D. CALLISTER, 2008). Isto ocorre em função da oxidação do cromo quando entra em contato com o oxigênio do ar e forma um filme de óxido de cromo (Cr_2O_3) contínuo, aderente, estável e impermeável na superfície exposta ao meio. Este filme é denominado camada de passivação, possui espessura média de 30 a 50 Å e tem como função isolar e proteger o metal abaixo do meio agressivo e dos processos corrosivos (SILVA, E. F.; OLIVEIRA, 2012). Além do cromo, o níquel é extremamente importante para a formação e estabilização da fase austenítica, enquanto que o molibdênio auxilia no aumento da resistência à corrosão por pitting (PAN; KWOK; LO, 2019).

Silva e Oliveira (2011; 2012) realizaram estudo de avaliação da resistência à corrosão, caracterização química e metalográfica de implantes de aço 316L que apresentaram necessidade de remoção em pacientes que apresentaram algum tipo de rejeição ou falha precoce. Dentre os resultados obtidos no estudo citado acima, em algumas próteses foram encontrados graves defeitos de fabricação, como a presença de crescimento de grão da microestrutura austenítica a valores acima do recomendado, aparecimento da ferrita delta (nociva a um biomaterial dessa natureza) e de tensões residuais inerentes do processo de conformação mecânica. Estima-se

que no Brasil um implante de aço 316L tenha vida útil média de 10 anos, enquanto que em países desenvolvidos este é o tempo mínimo de vida útil. Isto ocorre porque até 2010 no Brasil não havia legislação sanitária específica que regulamentava critérios para a fabricação e implantação de próteses em aço inoxidável (SILVA, E. F.; OLIVEIRA, 2011). Em 2010 foi homologada a Resolução RDC/ANVISA n°185/01 que especifica o registro dos materiais para implantes, assim como a exigência das especificações técnicas dos materiais de acordo com alguma norma internacional como ASTM por exemplo (ANVISA, 2020).

As normas ASTM F138 e a versão brasileira NBR ISO 5832-1 correspondem a uma classe especial do AISI 316L, diante da necessidade de aperfeiçoamento nas propriedades biocompatíveis deste aço inoxidável austenítico. Sob processo de refusão ESR/VAR (por escória eletrocondutora e à vácuo), garantindo ao produto, além do controle perfeito da composição química, uma elevada homogeneidade da estrutura e alto grau de pureza, com isso reduzida presença de micro inclusões não-metálicas (BUSS, G. A. M.; DONATH, K. S.; VICENTE, 2011).

Diversos fatores afetam a resistência à corrosão do aço inoxidável, dentre eles pode-se destacar a morfologia da superfície (quanto maior a rugosidade e heterogeneidade da superfície, maior é a tendência a corrosão), a densidade de discordâncias (quanto menor for a energia de falha de empilhamento do material, maior é a densidade de discordâncias, o que resulta uma maior probabilidade de corrosão sob tensão), deformações superficiais (podem levar a descontinuidades na camada de passivação, o que prejudica o material do base), variação na composição química (maiores ou menores proporções dos elementos de liga podem afetar a camada de passivação), presença de impurezas, segregações, precipitados e inclusões (defeitos de fabricação que podem afetar a vida útil do material) (SAJID; KIRAN, 2018).

A corrosão no aço 316L é uma das principais causas de falha prematura e reações tóxicas nos implantes. Isto se dá devido à liberação de íons de Fe, Cr, Ni, Co e Mo que se difundem do material em função da formação de pontos de corrosão ou desgaste. Dentre estes, os íons, os de Ni são considerados os mais perigosos em termos de toxicidade ao paciente. Estão relacionados com inflamações crônicas, desordens de coagulação, hipersensibilidade, efeitos carcinogênicos, mutagênicos e alergênicos. Podem permanecer nos tecidos locais ou migrar para órgãos pela corrente sanguínea (MORAIS; GUIMARÃES; ELIAS, 2007). Superfícies com camadas

anodizadas nanotubulares ou nanoporosa já se comprovaram eficazes na diminuição da densidade de corrente de corrosão em função de sua camada de passivação de óxido. Também por se tratar de uma forma mais estável de ligação química observa-se a diminuição de desprendimento de íons nestas superfícies anodizadas (MIRZAEE; VAEZI; PALIZDAR, 2016).

O aço inoxidável 316L possui baixo teor de carbono na sua composição química, o que permite seu emprego como biomaterial ortopédico. Aços com teor de carbono superior a 0,03% são suscetíveis à sensitização, o que diminui consideravelmente a resistência à corrosão destes materiais. A Tabela 1 ilustra as principais propriedades físicas, químicas e mecânicas do aço inoxidável AISI 316L. Aços com teor de carbono acima de 0,08% permitem um ataque de forma mais agressiva por parte dos fluidos corporais em sua superfície de contato, aumentando a liberação de íons nocivos ao organismo do paciente. Com este fator de toxicidade aumentado, ocorre uma diminuição da vida útil do implante de forma considerável (ZIĘTALA et al., 2016).

Tabela 1: Propriedades do aço inoxidável austenítico AISI 316L

Propriedade	Valor aproximado
Composição química	C- 0,03% | Cr – 17,5% | Ni – 13% | Mo – 2,6% | Mn – 1,7% | Si – 0,4%
Dureza e Microdureza Vickers	155 HV | 215 – 225 HV
Módulo de elasticidade	190 – 200 GPa
Limite de resistência à tração	594 MPa
Tensões de escoamento e ruptura	246 MPa | 540 – 1000 MPa
Condutividade e capacidade térmica	16,2 W/m °C a 100°C | 500 J/kg °C
Coeficientes de Poisson e linear de expansão térmica	0,27 – 0,30 | 19,9 x 10^{-6} mm/mm°C

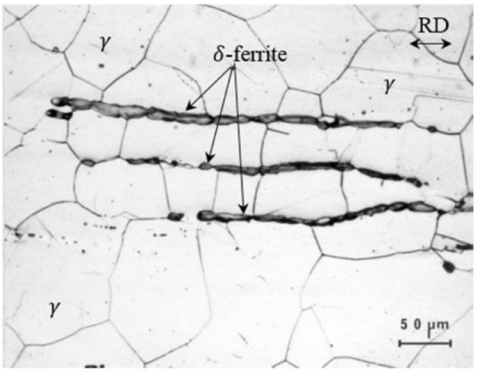
Fonte: Adaptado de Ziętala *et al.*, 2016; Bauer *et al.,* 2013; Mahapatro, 2015.

A resistência a corrosão do aço inoxidável 316L após a implantação no corpo humano se deve as altas concentrações de cromo e níquel presentes no material

(AMANOV; LEE; PYUN, 2017). Todavia, este fato é um aspecto contraditório para seu emprego como biomaterial, tendo em vista que o desprendimento destes íons de Cr e Ni são prejudiciais ao organismo do paciente e comprometem o uso do implante a longo prazo. Outra característica contraditória do uso do aço 316L se refere aos seus altos valores de propriedades mecânicas como módulo de elasticidade em relação ao osso humano. O aço suporta altos esforços de flexão e impacto, desta forma absorvendo todos os esforços solicitados, o que leva o osso hospedeiro a sofrer atrofiamento após determinado tempo de implantação (CHEN; THOUAS, 2015).

Quanto a microestrutura do aço 316L alguns aspectos são considerados muito importantes quando se trata de biomateriais. É de extrema importância que não apresente nenhuma fase secundária além da austenita em sua microestrutura, principalmente ausência de ferrita delta. A ferrita delta é retida na microestrutura do material quando não consegue transformar-se em austenita, normalmente isso ocorre devido a altas temperaturas de austenitização ou composição química com porcentagens indevidas dos elementos de liga. Está fase também é ferromagnética, algo que não se deseja em biomateriais, levando ao aumento da permeabilidade magnética e diminuição de sua resistência à corrosão em função da interrupção na camada de passivação da fase austenítica. A Figura 2 mostra a imagem da microestrutura austenítica (γ) de um aço 316L com presença de pequenas contaminações de ferrita delta (δ) (BEN RHOUMA *et al.*, 2017).

Figura 2: Imagem da microestrutura do aço 316L com presença de ferrita delta.



Fonte: Ben Rhouma et. al., 2017.

Quanto ao aspecto de degradação do aço inoxidável 316L nas aplicações de biomateriais, este ocorre principalmente pelo mecanismo de corrosão localizada (por frestas e/ou pites). A corrosão por frestas e pites se caracteriza por regiões localizadas na superfície. No caso dos pites ocorre a formação de pequenas cavidades normalmente nos locais onde a camada de passivação apresenta alguma fragilidade ou descontinuidade. Uma área de corrosão sempre apresenta um ponto de ataque a camada de passivação (EVANS; LEIVA-GARCIA; AKID, 2018).

De forma geral o uso do aço inoxidável 316L como biomaterial possui aspectos positivos e negativos, alguns relacionados a defeitos do processo de fabricação. São reportados na literatura falhas relativas por fratura plástica, fratura frágil, fadiga, desgaste ou por associação entre estes (GUERRA-FUENTES et al., 2015). Corrosão do implante devido ao contato dos fluídos corpóreos em material com falhas na camada passivada, reações alérgicas devido a liberação de íons e presença de ferrita delta na microestrutura. Isto torna fundamental a importância da qualidade do material usado para fins medicinais com rígido controle de qualidade (SILVA, E. F.; OLIVEIRA, 2011). Também pode-se destacar certo nível de incompatibilidade de propriedades mecânicas em relação ao osso e a superfície dos materiais. Porém na realidade financeira dos sistemas de saúde pública se apresenta como a material mais disponível atendendo de forma razoável as necessidades apresentadas (CHEN; THOUAS, 2015).

2.1.2 Prata em biomateriais

A prata (Ag) como metal ou os sais de prata têm sido reportados desde a antiguidade como potencial agente de controle bactericida. Atualmente este material é utilizada numa infinidade de aplicações biomédicas como biomateriais ortodônticos, cateteres e como medicação para queimaduras graves. Também é bem conhecido o efeito tóxico da prata sobre os microrganismos com estudos evidenciando o real poder biocida sobre mais de 12 espécies de bactérias, sendo os resultados mais expressivos relacionados à ação sobre a Escherichia coli (KIM *et al.*, 2007). Também são relatados estudos da ação bactericida, antiviral e antifúngica de íons de prata, causando um grande interesse de diversas áreas da medicina no uso deste material, principalmente na área cirúrgica e hospitalar que enfrenta grandes desafios no campo das infecções por microrganismos patológicos (CHEN; THOUAS, 2015).

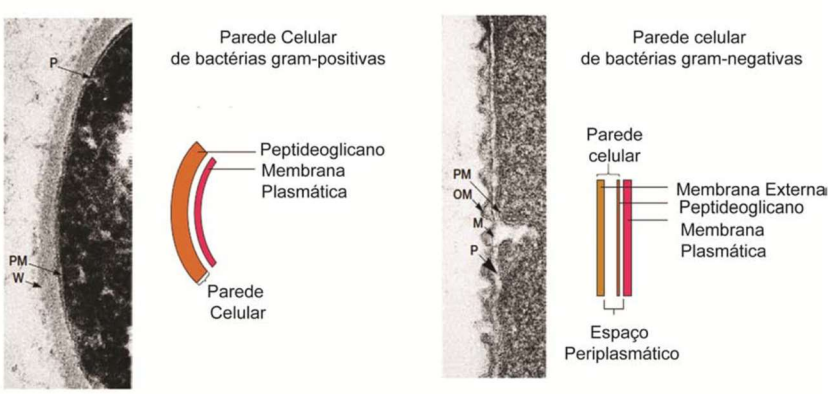
O mecanismo de atuação antibacteriana da prata ainda é parcialmente desconhecido. Diversos estudos tentam elucidar esta ação e algumas hipóteses já vem recebendo maior grau de evidência. Dentre estes estudos se destacam a teoria da atração eletrostática de radicais livres de prata liberados das nanopartículas de prata (AgNPs) com carga positiva e a carga negativa da membrana celular de certas bactérias. Em outra teoria apresentada, a ação bactericida seria em função da concentração de íons de prata associada com a formação de pits na parede celular, provocando permeabilidade e posterior morte celular. Também nesta linha de dano à membrana celular, há uma outra teoria que os pits provocados na membrana causam a depleção dos polissacarídeos e proteínas responsáveis pelas funções respiratórias da célula (KIM et al., 2007). Mas dentre todas teorias apresentadas até o momento a que mais vem ganhando evidência é o mecanismo de ataque por radicais livres de prata (Ag^+) que penetram a membrana celular e se ligam ao grupo funcional tiol das proteínas, causando condensação do DNA e provocando perda das habilidades reprodutivas da célula (MIRZAEE; VAEZI; PALIZDAR, 2016).

A presença de liberação de radicais livres de prata em nanopartículas do próprio metal foi comprovada em estudo de Kim et. al. (2007), onde foi realizado experimento de crescimento microbiológico com solução de nanopartículas de prata e outra solução idêntica acrescida de um antioxidante N-acetilcisteína. Nas amostras com o antioxidante não foi verificada ação bactericida. Também foi constatada a presença de íons Ag^+ por meio da análise de ressonância de rotação eletrônica na amostra somente com AgNPs.

Além da forte evidência da ação antibacteriana ser de responsabilidade dos radicais livres de prata, também muitos estudos apontam a relação proporcional da concentração de prata com a eficácia bactericida (HUANG *et al.*, 2019). Em estudo realizado por Mirzaee, Vaezi e Palizdar (2016) foi proposta uma cobertura de hidroxiapatita dopada com nanocargas de prata sobre substrato de Titânio para aplicações biomédicas. A técnica de cobertura foi através de eletroforese com posterior normalização em forno a 600°C. Os resultados indicaram melhora da molhabilidade da superfície e da ação antibacteriana com o aumento da concentração de prata. Todavia houve uma ligeira diminuição da resistência à corrosão com aumento da concentração de prata. Os autores atribuem isto ao fato de haver uma maior concentração de íons Ag^+ com alto potencial oxidativo que poderia levar a formação de oxigênio atômico em sua vizinhança. Também neste mesmo estudo fica

evidenciado um menor efeito bactericida em bactérias Gram-positivas como *Staphilococos aureous*, em relação as bactérias Gram-negativas. Possivelmente este efeito é relacionada a diferença morfológica da membrana peptideoglicana destes dois tipos de bactérias. Conforme ilustra a Figura 3, as bactérias Gram-postivas possuem ema membrana mais espessa, o que dificultaria a penetração dos radicais de prata (MIRZAEE; VAEZI; PALIZDAR, 2016).

Figura 3: Parede celular de bactérias Gram-positivas/negativas



Fonte: Silva, 2012.

Sabe-se que da mesma forma que os íons de prata atacam as membranas celulares de bactérias também atacam células humanas, porém em outras proporções. São reportados valores a partir de 1,6 ppm de Ag para iniciar danos em células humanas, já para bactérias a concentração 0,1 ppm de Ag já é suficiente para uma ação bactericida satisfatória. Verificou-se que todas as amostras em média apresentaram uma liberação de íons de prata elevados nos primeiros 7 dias, sendo o valor máximo de 1,52 ppm, mas após este período houve estabilização em valores médios liberação de 0,2 ppm. Este ensaio foi realizado imergindo a amostra em SBF por 14 dias e medindo diariamente a concentração de Ag por espectrofotometria de absorção atômica (MIRZAEE; VAEZI; PALIZDAR, 2016). O eletrólito SBF (*simuleted body fluid*) se refere à uma solução que mimetiza os compostos presentes nos fluidos corpóreos. A Tabela 2 ilustra a composição deste fluído (BROOKS; BROOKS; EHRENSBERGER, 2017).

Tabela 2: **Composição química do fluido corpóreo simulado (*SBF – simuleted body fluid*).**

Componente	Concentração (g/L)
NaCl	7,996
$NaHCO_3$	0,35
KCl	0,224
$K_2HPO_4.3H_2O$	0,228
$MgCl_2.6H_2O$	0,305
$CaCl_2$	0,278
Na_2SO_4	0,071
$(CH_2OH)_3CNH_2$	6,057

Fonte: Adaptado de (BROOKS; BROOKS; EHRENSBERGER, 2017).

Nesta mesma linha de pesquisa foi realizado estudo por Sivaraj e Vijayalakshmi (2019) com uma cobertura de hidroxiapatita, nanotubos de carbono de múltipla camada e nanocargas de prata sobre substrato de aço 316L também para aplicações biomédicas. Neste trabalho a técnica de aplicação da cobertura foi através de spray pirólise da solução de nanopartículas e posterior normalização em forno a 500°C. O uso de nanotubos de carbono tem o objetivo de aumentar a superfície de contato e assim evitar a aglomeração das nanopartículas de prata. Os resultados indicam melhoria na ação bactericida e da resistência à corrosão com aumento de concentração de prata. Por outro lado, a citotoxicidade da prata em relação às células humanas foi insatisfatória. Foi realizada análise de viabilidade celular em osteoblastos humanos e está diminuiu com o aumento da concentração de prata.

Em um estudo com objetivo de desenvolvimento de cobertura antibacteriológica em aço naval ASTM A36, foram utilizados nanotubos de carbono de paredes múltiplas para criar uma superfície superhidrofóbica (que inibe a adesão de bactérias) e após ainda adicionadas diferentes concentrações de nanopartículas de Ag sobre essa superfície. Nos resultados do efeito bactericida inicialmente as amostras com e sem prata apresentaram valores satisfatórios, porém com o passar dos dias a amostra

somente com nanotubos de carbono perdeu sua eficácia parcialmente enquanto que as amostras com Ag aumentaram a eficácia bactericida. Os autores sugerem este efeito ao desgaste da camada superhidrofóbica, porém quando há presença de nanopartículas de Ag, o alto potencial oxidativo dos radicais de Ag^{+} liberados tem poder de gerar oxigênio atômico em sua vizinhança, o oxigênio seria responsável por reagir com as ligações duplas dos lipídeos presentes na parede celular da bactéria, assim penetrando na célula e também interagindo com proteínas e lipopolisacarídeos, levando a permeabilidade da membrana da bactéria causando a morte. Esta é mais uma teoria de mecanismo bactericida atribuído a ação de nanopartículas de prata (HUANG et al., 2019).

Recentemente também vem sendo investigada a ação antiviral de nanopartículas de prata (AgNPs). No entanto, estes estudos estão bem menos avançados em relação aos estudos com bactérias. Em infecções virais ocorre o ataque da célula hospedeira pelo vírus aos ácidos nucleicos alterando a programação da célula fazendo-a replicar o vírus. Possivelmente os radicais de prata atuam na superfície envelopada do vírus inibindo fisicamente o contato com a célula hospedeira. Em estudos recentes in vitro foi comprovada ação antiviral semelhante a bacteriana em vírus herpes (HSV), HIV, Influenza, Varíola do macaco e arenavírus. Todos os estudos evidenciam a fundamental importância do tamanho de partícula da prata, quanto menor mais eficaz. No estudo da Influenza os melhores resultados foram reportados com partículas menores de 10 nm. Em contraste, partículas acima de 25 nm potencializaram a ação do vírus sobre as células. Possivelmente a aglomeração de nanopartículas pode potencializar ou facilitar a interação ou internalização de partículas virais com células hospedeiras (NAKAMURA *et al.*, 2019).

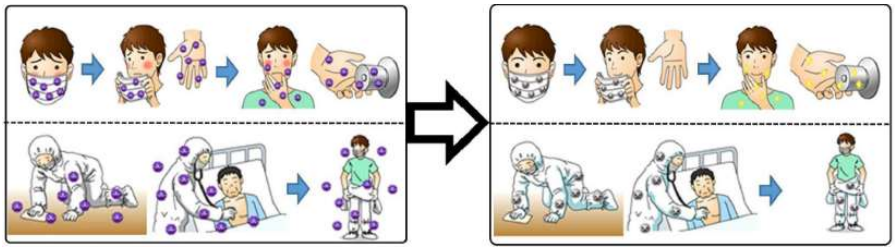
Em estudo de El-Mohamady et. al. (2018) foi evidenciada ação antiviral in vivo, de gel a base de ácido tânico e AgNPs contra vírus do herpes genital. Neste estudo foi evidenciada a inibição do atracamento e penetração do vírus, assim como a transmissão célula para célula. Outro estudo com vírus do herpes bovino tipo 1 indicou eficácia na inibição do ataque viral com partículas entre 15 e 25 nm (EL-MOHAMADY *et al.*, 2018).

Nesta linha de ação antiviral também há estudos da inibição de proliferação de vírus da família do coronavírus. As nanopartículas de prata são analisadas como droga sob forma de nanoaglomerados de sulfeto de prata. O possível mecanismo de ação é proposto com atuação no interior da célula hospedeira inibindo a síntese do

RNA pelo vírus e consequentemente sua proliferação. Este estudo foi realizado in vitro e apresentou resultados com expressiva queda da curva de crescimento da infecção viral. Também foi avaliada a relação de tamanho de partícula com eficácia antiviral, novamente apontando para uma maior eficácia das partículas menores (DU *et al.*, 2018).

Nakamura et. al. (2019) desenvolveram em seu estudo um filme protetivo a base de nanofibras de quitosana com AgNPs para a prevenção de infecções por contato de superfícies em ambientes hospitalares dos trabalhadores da área da saúde. Devido aos efeitos notáveis das AgNPs como biocida, fungicida e antivírus foi elaborada uma solução que pode impregnar os EPI's dos trabalhadores assim como superfícies hospitalares diminuindo drasticamente a proliferação significativa destes patógenos, principalmente em epidemias. A Figura 4 ilustra os principais mecanismos de contaminação dos trabalhadores da saúde, no quadro (a) pela contaminação de máscaras e macacão de proteção no momento de retirar os EPI's; no quadro (b) a sugestão de uso do filme com AgNPs inibindo a contaminação.

Figura 4: Mecanismos de contaminação de bactérias e vírus em ambientes hospitalares por contaminação de EPIs



Fonte: Nakamura et. al., 2019.

O uso de nanopartículas de prata já possui evidências robustas que indicam resultados muito satisfatórios na ação bactericida e antiviral que são fatores muito importante em aplicações biomédicas. Deve-se levar em consideração sempre o custo-benefício do uso da prata em relação a citotoxidade apresentada a células humanas (SIVARAJ; VIJAYALAKSHMI, 2019).

2.2 OSSEOINTEGRAÇÃO

A osseointegração ou osteointegração é definida como a formação direta de uma interface entre o osso e o implante sem que haja interposição de tecido mole a

nível microscópico (COELHO; JIMBO, 2014). Também em outros termos formação de uma união estável e funcional entre osso e a superfície do implante. Este mecanismo envolve a ancoragem de um implante pela formação de tecido ósseo em torno do biomaterial implantado sem crescimento de material fibroso na interface (YUAN *et al.*, 2019).

A interação do organismo com o biomaterial depende da resposta imunológica de cada paciente. O sistema imunológico compreende as células de defesa do organismo que são requeridas diante a qualquer material, bactéria, vírus ou fungo que adentra o corpo humano que possa representar alguma ameaça. Este mecanismo é profundamente complexo e individual podendo ter respostas muito adversas para cada pessoa dependendo de variáveis pré-existentes no indivíduo. No caso de um implante, em geral, ocorrem 3 etapas (VISHWAKARMA *et al.*, 2016):

• Entre 0 e 4 horas após a implantação do biomaterial ocorre resposta imunológica imediata: neste período é desencadeada uma resposta inflamatória aguda, devido a danos nos vasos sanguíneos. São absorvidas proteínas na superfície do biomaterial e ocorre então a formação de uma matriz provisória com plaquetas responsáveis por conectar os vasos sanguíneos lesionados e auxiliar no desenvolvimento de citocinas e fatores de crescimento e início do recrutamento de macrófitos;

• Entre 4 horas e 4 dias após a implantação do biomaterial ocorre resposta imunológica induzida. Nesta etapa se inicia a inflamação crônica, com aumento de macrófagos e estimulação de linfócitos. As células de tecidos são estimuladas e ocorre a regeneração do tecido no local do implante. Porém se o ambiente não for satisfatório para atender esta formação pode ocorrer a fibrose do tecido;

• Entre 4 dias até a cicatrização total ocorre resposta imunológica adaptativa. Nesta etapa segue a regeneração do tecido ou fibrose. A fibrose não é desejada, pois ela indica falta de reabilitação do tecido, sendo substituído por tecido cicatricial que é basicamente constituído por fibras de colágeno.

Em cada etapa ocorre formação de grupos de células funcionais específicas, a correta adsorção destas células no biomaterial tem relação direta com sua topografia, rugosidade, composição química e energia superficial. O sucesso do implante está diretamente ligado ao correto andamento destas etapas que geram resultado final na recuperação e cicatrização do paciente (HUANG *et al.*, 2018).

Outro grande desafio do uso de biomateriais metálicos, além da cicatrização desejada em torno do osso e implante (ancoragem óssea), se trata da compatibilidade mecânica entre os módulos de elasticidade dos materiais. Para uma biofuncionalidade ótima, os módulos de elasticidade do osso e implante devem ser muito próximos. Quando a diferença é grande podem ocorrer danos aos tecidos circundantes e atrofia óssea. Esta compatibilidade mecânica é mais impactante na etapa de resposta imunológica adaptativa onde geralmente o paciente já se encontra em fase de fisioterapia. O crescimento de tecido ósseo é estimulado por impactos, se estes forem praticamente todos absorvidos pelo implante o osso acaba perdendo sua funcionalidade, atrofiando e formando mais fibrose (BOTA *et al.*, 2010). A Tabela 3 ilustra as propriedades mecânicas principais do osso cortical, do aço inox 316L e das ligas de titânio. Fica evidente ao analisar a tabela que os valores do módulo de elasticidade e densidade indicam uma melhor compatibilidade das ligas de titânio, porém ainda distante do ideal. De toda forma, o uso de implantes de titânio é limitado para a população que depende de sistema público de saúde em função de seu maior custo em relação ao aço inox 316L (MORAES *et al.*, 2014).

Tabela 3: Principais propriedades mecânicas do osso cortical e biomateriais metálicos

Material	Módulo de elasticidade (GPa)	Tensão de Ruptura (MPa)	Tenacidade a fratura (MPa)	Densidade (g/cm^3)
Osso cortical	10-30	130-150	2-12	1,06
Aço inox 316L	193	540-1000	100	8
Ligas de Ti	105-125	900	80	4,3

Fonte: Adaptado de Bota et. al., 2010 e Chen e Thouas, 2015.

Esta diferença de propriedades mecânicas dos implantes metálicos indicados na Tabela 3 é responsável pela maior incidência de falhas por afrouxamento asséptico. Está condição ocorre em média de 40% dos casos em tempo relativo de 10 a 20 anos pós implante. O afrouxamento asséptico ocorre pela falta de adesão entre osso e implante (ausência de osseointegração) pela natureza bioinerte do material metálico. Este quadro implica na necessidade de cirurgia imediata para substituição do componente, ou seja, gera custo ao sistema de saúde e aumenta risco de infecções e complicações decorrentes do pós-operatório. A busca por materiais

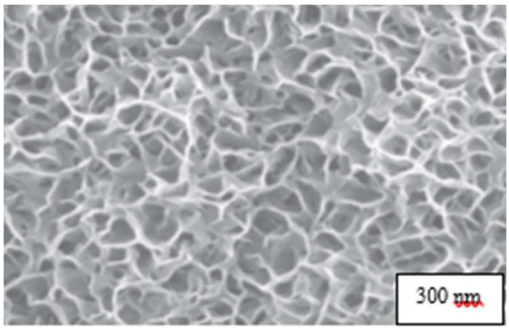
metálicos com tratamentos superficiais que proporcionam a osseointegração tem importância fundamental (HUANG et al., 2018).

Em estudos recentes são apontados com maior importância para a promoção da osseointegração a compatibilidade de superfícies na interface tecido implante, ou seja, uma superfície biomimética (MAHAPATRO, 2015) e uma rugosidade adequada, a nível nanométrico com presença de poros ou tubos que facilitam a atuação dos osteoclastos que preparam a superfície para a atuação dos osteoblastos (ANDERSON; LAMICHHANE; MANI, 2016).

2.2.1 Superfície biomimética

Diversos estudos evidenciam a relação positiva entre as superfícies com maior rugosidade e a resposta mais positiva de osseointegração comparativamente às superfícies planas. Também fica evidenciado que não é qualquer topografia de superfície que promove este efeito, mas a presença de poros ao nível nanométrico, fibras nanométricas e estruturas nanotrabeculares tem os melhores resultados (BOTA et al., 2010). A Figura 5 ilustra uma imagem de MEV de implante com crescimento de hidroxiapatita artificial por imersão em SBF (fluido corpóreo simulado) com resultado de superfície biomimética.

Figura 5: Micrografia ao MEV de superfície biomimética de aço 304 com cobertura de hidroxiapatita.



Fonte: Asoh, Nakatani, Ono, 2016.

É fato que os implantes de tecido ósseo natural são os mais eficazes por sua compatibilidade total, mas raramente é possível realizar este autotransplante. Por isso muitos estudos são realizados buscando aproximar, ou imitar, a superfície óssea nos biomateriais. Além de aproximar dimensionamento, também há excelentes resultados

com a compatibilidade química do tecido ósseo, que é praticamente constituído de uma fração inorgânica de hidroxiapatita e uma fração orgânica de colágeno. Coberturas ou filmes (sobre metais) constituídos destes materiais vem se apresentando muito promissores no processo de osseointegração. Bian et. al. (2019) obteve bons resultados de ativação de células anti-inflamatórias em implante feito de nanofibras de colágeno com hidroxiapatita pela técnica de eletrofiação. De forma análoga, Ferreira et. al. (2019) encontrou resultados satisfatórios com cobertura sobre titânio com hidroxiapatita, nitrato de prata e caprolactama, inclusive com ação antibacteriológica referente a prata.

Em estudo que avaliou a topografia relacionada à ação de células inflamatórias sobre superfícies de politetrafluoretileno expandido com diferentes rugosidades, resultados interessantes foram observados. O material do estudo por se tratar de uma fibra, foi preparado com diferentes escalas internodais na grandeza de 1,2 a 4,4 μm resultando em uma maior porosidade e uma amostra sem poros. Nos ensaios in vivo, aplicando o implante em ratos, verificou-se significativa redução do tamanho do encapsulamento do implante. Isto é muito positivo, pois ocorreu uma menor fibrose na superfície de contato e uma cicatrização melhor. Este resultado positivo motivou um estudo *in vitro* para verificar o mecanismo de atuação dos monócitos e macrófagos que atuam na resposta inflamatória. Verificou-se um aumento significativo da liberação de secreções de citocinas pro-inflamatórias nas primeiras horas do implante, um resultado contrário ao que se esperava (BOTA et al., 2010).

Em estudo similar mais recente de avaliação de resposta de macrófagos em relação a topografia de aço inoxidável 316L e liga de cromo-cobalto *in vitro*, alguns novos resultados trazem alguma direção do mecanismo provável que leva à resposta positiva nos ensaios *in vivo*. Neste estudo mais amplo foi avaliado o comportamento dos macrófagos por 21 dias e se observou que realmente nas primeiras 24 horas as superfícies com maior rugosidade aumentaram a secreção de citocinas pro-inflamatórias indesejadas comparativamente à amostra plana. Porém após 24 horas as amostras planas alcançaram o mesmo nível de efeito nos macrófagos e as secreções anti-inflamatórias benéficas tiveram aumento significativo após 24 horas em todas amostras com efeito proeminente nas amostras de maior rugosidade (ANDERSON; LAMICHHANE; MANI, 2016).

A molhabilidade, também definida como propriedade hidrofílica da superfície, também é um aspecto fundamental nas interações biológicas desencadeadas no processo de osseointegração.

2.2.2 Molhabilidade

A capacidade que um líquido possui de molhar um sólido, ou seja, a molhabilidade de uma superfície sólida está diretamente relacionada a energia de superfície. A molhabilidade pode ser determinada por meio de ângulo de contato de um líquido em relação a superfície do material. Quanto maior a rugosidade da superfície, melhor será a molhabilidade do material (MAXIMO *et al.*, 2016).

Em estudo de Anderson, Lamichhane e Mani (2016) o aumento da rugosidade se mostrou como aspecto fundamental para uma maior ativação dos macrófagos do tecido ósseo, também chamados de osteoclastos, responsáveis pela preparação da superfície para que os osteoblastos iniciem a neoformação óssea. Os osteoblastos, por sua vez, são responsáveis por sintetizar a parte orgânica da matriz óssea, concentrando fosfato de cálcio e participando da mineralização.

Em estudo de Elias *et. al*. (2016) com implantes dentários de titânio tratados com ataque ácido por imersão e posterior eletrodeposição de flúor, cálcio e magnésio *in vivo* apresentou resultados muito satisfatórios. Neste estudo foi realizada a análise de molhabilidade através do ângulo de contato da água com a superfície.

As amostras com cálcio e magnésio apresentaram os melhores resultados de molhabilidade devido a presença de grupos funcionais hidroxila formados na passivação natural da superfície. Todas as amostras mostraram um torque de remoção do implante superior ao titânio não tratado, o que indica um processo de osseointegração mais efetivo (MAXIMO *et al.,* 2016).

2.2.3 SBF e atividade corrosiva

O ambiente no interior do corpo humano está quimicamente e fisicamente em um estado diferente das condições ambientais. Este ambiente muitas vezes pode levar o implante metálico a falhar por incidência de corrosão. O pH e a concentração de oxigênio no interior do corpo humano variam de acordo com sua localização, o que

pode levar determinado material a ter respostas mais positivas de acordo com a localização do implante (CHEN; THOUAS, 2015).

Outro fato prejudicial observado em biomateriais metálicos é a liberação de íons muitas vezes responsáveis por reações alérgicas crônicas. Dentre os mais críticos são os íons de níquel, cromo, cobalto, vanádio e manganês. Estes íons induzem a produção de osteoclastos e consequentemente fibroblastos, responsáveis pela fibrose no local do implante. A liberação de íons também é responsável por afetar a hemocompatibilidade do material, provocando rejeição asséptica e necessidade da retirada do implante (COELHO; JIMBO, 2014).

É importante avaliar o comportamento do biomaterial metálico quanto a seu comportamento anticorrosivo e de liberação de íons em ambiente próximo ou simulado ao interior do corpo humano. Desta forma, pesquisadores desenvolveram o fluido corpóreo simulado (SBF – *Simulated body fluid*) para atender esta necessidade. Este é um fluido utilizado para simular o conteúdo iônico do plasma de sangue humano, reproduzindo artificialmente as condições existentes dentro do corpo humano. Muitas composições deste fluído já foram apresentadas para tentar atingir a maior semelhança possível em relação ao fluído orgânico e suas alterações naturais (BOHNER; LEMAITRE, 2009).

Em condições fisiológicas normais, o pH do fluido corpóreo humano é de aproximadamente 7,2 caracterizando-o como neutro. Todavia, quando ocorre alguma inflamação este valor pode se alterar. Estudos indicam que em estado inflamatório o pH aproxima-se de 5,0 passando para a faixa ácida. Este é um dado importante considerando biomateriais metálicos e deve ser levado em consideração. Para esta avaliação é possível alterar a composição do SBF para atingir este pH utilizando ácido clorídrico (BROOKS; BROOKS; EHRENSBERGER, 2017).

Desta forma é possível avaliar por caracterização eletroquímica o comportamento das propriedades anticorrosivas dos materiais em SBF saudável (normal) e SBF inflamado.

No estudo de Brooks et. al. (2016) o aço inox 316L foi avaliado em SBF normal e em SBF em condições inflamatórias após 24 horas de exposição. As condições inflamatórias envolvem a presença de peróxido de hidrogênio e pH ácido. Nos resultados houve um aumento considerado de áreas suscetíveis a corrosão severa por fendas. Mais destaque para as zonas com acúmulo tensão como por exemplo furações de placas ou em peças de fixação como cabeças de parafusos. Neste estudo

também foi verificado um aumento significativo da liberação de íons de natureza tóxica para o organismo como o cromo e o níquel.

Em outro estudo, desta vez com liga de titânio, alumínio e Vanádio obtida pelo processo de fusão seletiva por laser é avaliada quanto à suas propriedades eletroquímicas em eletrólitos com pH variados comparando com a mesma liga obtida por fundição tradicional. A amostra preparada por fusão a laser possui uma rugosidade maior que a amostra fundida e por isso os autores atribuem um resultado inferior das propriedades corrosivas em eletrólitos com pH na escala ácida. Além do SBF normal, o estudo fez ensaios com solução de NaOH, NaCl e H_2SO_4, sendo o pior resultado de resistência a corrosão da amostra obtida por fusão a laser em eletrólito de ácido sulfúrico (SHARMA *et al.*, 2020).

Levando em conta que o comportamento do implante depende de sua rugosidade superficial, o processo de anodização tem sido muito empregado para obtenção de superfícies porosas em biomateriais.

2.3 ANODIZAÇÃO

A anodização, também chamada de oxidação anódica, é um processo eletroquímico onde ocorrem reações químicas entre metais e eletrodos acionados por campo elétrico em um meio (eletrólito) aquoso ou não. O metal que se deseja anodizar é usado como ânodo e sobre este cresce uma camada de óxido por difusão de íons de oxigênio, o óxido formado pode ser do tipo barreira ou poroso (GENTIL, 2012). A camada de óxido obtida por este processo possui espessura muito superior em relação àquela formada naturalmente ao ar, apresenta maior aderência e maior resistência ao desgaste mecânico e resistência à corrosão (KOWALSKI; KIM; SCHMUKI, 2013).

Empregando diferentes tipos de eletrólitos e alterando os parâmetros de processo como densidade de corrente, temperatura e tempo é possível obter óxidos anódicos com propriedades variadas. Independente das condições utilizadas no processo de anodização, a primeira camada que se forma na interface com o metal é de óxido do tipo barreira (compacta) e a formação da camada porosa só ocorre em um segundo momento. Neste segundo momento ocorre a diluição dos óxidos de metais da camada barreira por íons do eletrólito, o mais utilizado é o flúor (F^-), por sua

alta eletronegatividade. Estes novos óxidos diluídos são atraídos pelo campo elétrico e migram em direção do substrato até a estabilização das forças eletroquímicas envolvidas. Este deslocamento dos óxidos dissolvidos é responsável pela formação dos poros (WANG *et al.*, 2020).

As camadas de óxido formadas são dielétricas ou semicondutoras de natureza amorfa ou policristalina. Geralmente o uso de eletrólitos aquosos são responsáveis pela formação de filmes de óxido tipo barreira. Em metais de transição, por exemplo, eletrólitos com pH ácido, mas com presença de íons F^- resultam em uma camada porosa aleatória ou de estrutura auto organizada de nanoporos ou nanotubos. Os estudos de obtenção de camadas de óxido poroso são principalmente realizados com titânio, nióbio, tântalo, zircônio, tungstênio e alumínio. Ainda há poucos estudos com ligas como aço, por exemplo (KOWALSKI; KIM; SCHMUKI, 2013).

2.3.1 Anodização para obtenção de nanoporos

Os estudos de desenvolvimento de camadas porosas em superfícies de metais válvula começaram a ter grande destaque a partir dos anos 2000. Nas últimas duas décadas grandes avanços nesta tecnologia de nanoestruturas vêm sendo evidenciados. As notáveis propriedades destas superfícies quanto a sua geometria e em alguns casospourbaix natureza semicondutiva proporcionam um amplo campo de aplicações como fotocatálise, agrotecnologia, baterias, células, nanomatrizes, membranas de nanofiltração e biomateriais. A Figura 6 ilustra imagens de topo e seção transversal de diversas estruturas nanotubulares e nanoporosas obtidas em metais de transição (KOWALSKI; KIM; SCHMUKI, 2013).

A obtenção destas camadas porosas por processo de anodização, vem sendo feita principalmente com uso de íons F^- no eletrólito. Este tem apresentado os resultados mais consistentes, destacando-se em substratos de metais de transição, porém ainda são poucos os estudos para obtenção destas camadas de óxidos nanoporosas com ligas como aço inoxidável por exemplo (ASOH; NAKATANI; ONO, 2016).

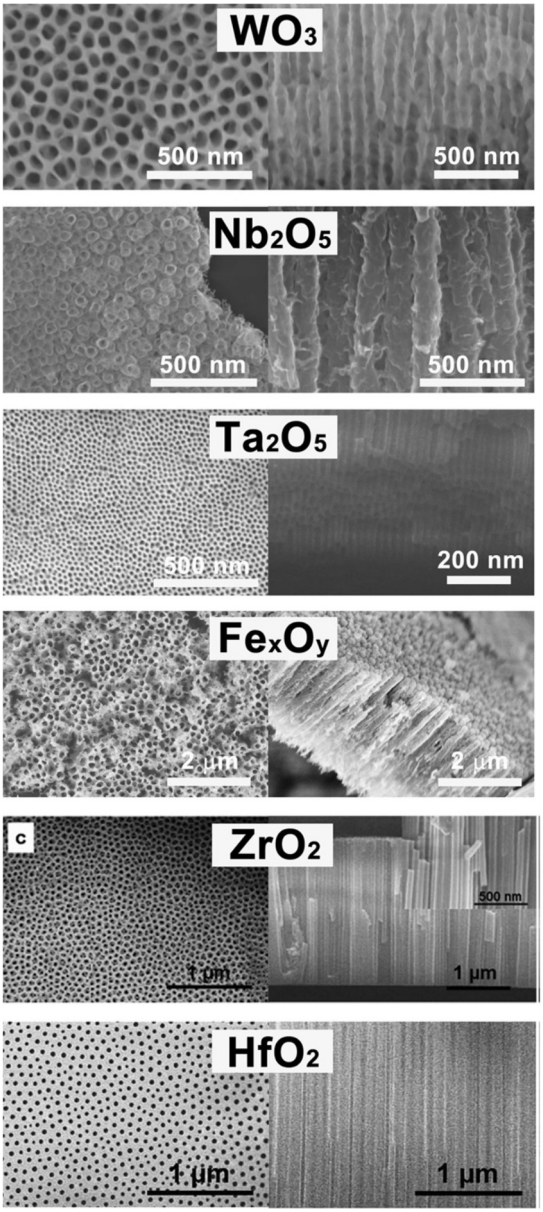
Segundo revisão publicada por Kowalski *et. al.* (2013) outro aspecto relevante para o crescimento de camada de óxido é o emprego de um alto campo elétrico durante a anodização. Desta forma, se favorece o mecanismo fundamental para a geração da porosidade, que é a migração simultânea dos cátions do metal para

interface do metal/filme e dos ânions do eletrólito para interface filme/metal, formando película nos dois sentidos da interface.

A indução de incorporação de espécies no óxido pode ocorrer de duas formas. Uma delas é devida à tensão aplicada, fazendo com que os íons de oxigênio migrem para o interior do óxido podendo ser acompanhados pela incorporação de pequenas espécies aniônica presentes no eletrólito. A outra forma de origem é a externa, em que os íons metálicos migram e reagem na interface externa formando óxido e ao mesmo tempo incorporando as espécies iônicas adsorvidas a partir do eletrólito. Se houver migração do oxigênio, a profundidade máxima de ânions incorporados no interior do óxido é determinada pela taxa de migração relativa ao oxigênio (OZKAN; MAZARE; SCHMUKI, 2018).

Existem casos que a migração de íons do eletrólito para o interior do óxido é muito mais lenta em relação aos íons de oxigênio, podendo ser distribuídos através de uma parte da espessura total do óxido. Por outro lado, os íons que migram mais rapidamente que o oxigênio, como no caso do F^-, podem atravessar toda espessura de óxido e formar uma fina camada de composição diferente do óxido na interface óxido/metal. Está camada rica em fluoreto e deficiente em oxigênio frequentemente é encontrada na base do óxido formando um complexo de fluoreto do metal. A presença de íons F^- no eletrólito e a dissolução de complexos de fluoreto de metal está associada à formação posterior de nanoestruturas tridimensionais como poros, tubos e cones na superfície da camada de óxido (KOWALSKI; KIM; SCHMUKI, 2013).

Figura 6: Micrografias ao MEV de camada com estruturas nanoporosa formadas sobre metais de transição (vista de topo e seção transversal).



Fonte: Kowalski; Kim; Schmuki, 2013.

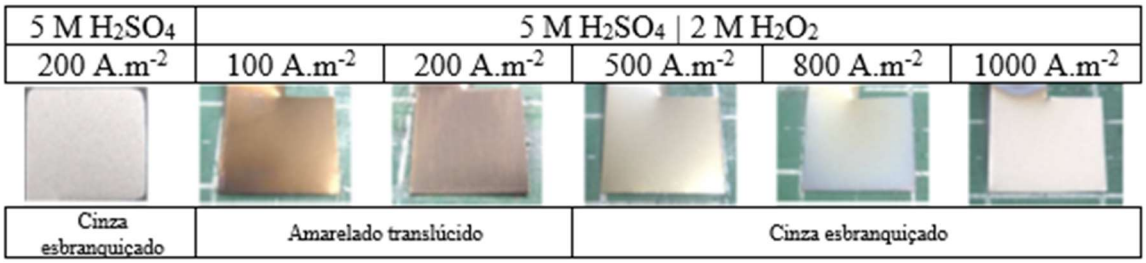
2.3.2 Processos de anodização para obtenção de nanoporos em aço inoxidável

Da mesma forma que os estudos em metais válvula estão mostrando evidentes melhorias nas propriedades de estabilidade, resistência à corrosão e funcionalidades específicas, em ligas como aço estão também sendo encontrados inúmeros aperfeiçoamentos com a obtenção de camadas nanoporosas por processo de anodização.

Em estudo de Asoh, Nakatani e Ono (2016), os autores tiveram como objetivo obter uma camada nanoporosa de óxido insolúvel espessa (maior que 1,0 μm) em aço 304 para posterior biofuncionalização. Para tanto, foi utilizada anodização simples com corrente contínua em eletrólito a base de ácido sulfúrico. O estudo também visou avaliar a influência da adição de peróxido de hidrogênio ao eletrólito em relação ao crescimento da camada de óxido e sua morfologia. Também foram avaliadas diferentes densidades de corrente de anodização.

Inicialmente foi avaliada a curva de anodização da amostra anodizada somente com eletrólito a base de ácido sulfúrico e amostra com ácido sulfúrico adicionada de peróxido de hidrogênio. Está última também foi avaliada em diferentes densidades de corrente. Na Figura 7 estão ilustradas imagens da coloração resultante de cada ensaio. É possível observar que a amostra anodizada em eletrólito somente com ácido sulfúrico apresentou uma coloração cinza esbranquiçada, já as amostras com eletrólito de ácido sulfúrico adicionadas de peróxido de hidrogênio apresentaram coloração amarelada até um certo nível de densidade de corrente de aproximadamente 300 A/m², acima deste valor a coloração retoma novamente ao cinza esbranquiçado.

Figura 7: Resultado das colorações das amostras anodizadas



Fonte: Asoh et. al., 2016

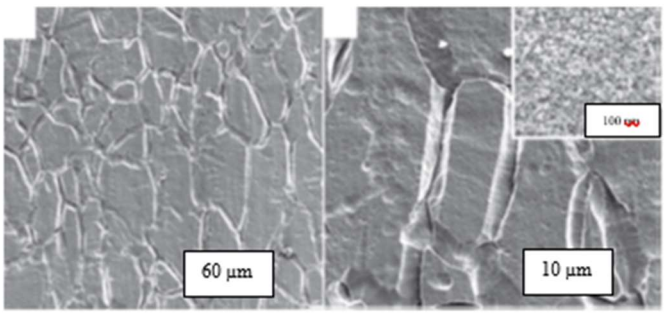
Estas cores resultantes são indicativos de composições diferentes da camada anodizada. Após análise de morfologia por MEV e análise de espectroscopia de energia dispersiva por Raio X (para avaliação de composição química de diferentes pontos da camada de óxido) foi possível concluir que usando somente ácido sulfúrico a camada não ultrapassou a espessura de 50 nm e é composta principalmente por complexo de óxido de cromo. As imagens de MEV (Figura 8) revelam que a textura da superfície é compreendida por cristais granulares da ordem de décimos de microns. Segundo os autores, isso indica uma provável dissolução seletiva das bordas

dos grãos, muito similar aos estudos de anodização de aço somente com camada barreira, não porosa. A dissolução transpassiva em tensão suficientemente alta inibe o crescimento do filme anódico, dando preferência a formação de poros decorrentes da dissolução de óxidos nos contornos dos grãos. Como resultado há formação de nanoporos, porém de profundidade rasa (ASOH; NAKATANI; ONO, 2016).

A partir dos resultados da Figura 7, os autores decidiram optar pela densidade de corrente de 200 $A.m^{-2}$ para uma segunda etapa de avaliação da adição de peróxido de hidrogênio ao eletrólito.

Na segunda etapa foram anodizadas 3 amostras em eletrólito de 5M H_2SO_4| 2M H_2O_2 por tempos distintos de 15, 120 e 240 minutos respectivamente. A Figura 9 ilustra as imagens ao MEV obtidas para cada ensaio (A e B) topo e seção transversal da amostra de 15 minutos; (C e D) topo e seção transversal da amostra de 120 minutos e (E e F) topo e seção transversal da amostra de 240 minutos. Neste ensaio é possível visualizar que a espessura da camada de óxido é proporcional ao tempo de anodização. Foi obtido um filme de espessura de 3,2 μm, como visto na Figura 9f que era o objetivo do estudo dos autores (ASOH; NAKATANI; ONO, 2016).

Figura 8: Micrografia ao MEV da superfície do aço anodizado somente com eletrólito a base de ácido sulfúrico.



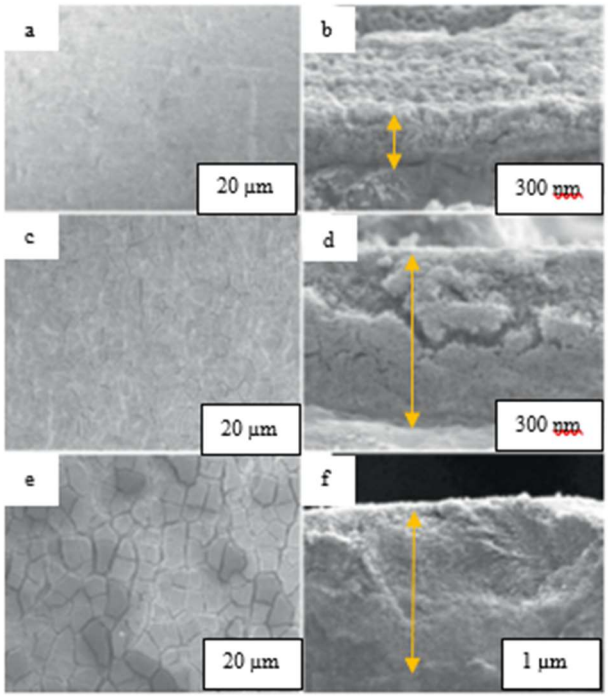
Fonte: Asoh *et. al*, 2016.

Os resultados de análise da microestrutura indicam a obtenção de um filme nanoporoso cristalino granular formado predominantemente por cromita ($FeCr_2O_4$), um óxido espinélio, além de óxido de cromo, hidróxido de cromo e óxidos de ferro e níquel. A curva de anodização mostra uma queda brusca de tensão inicial que indica a formação de camada barreira. Após alguns minutos esta tensão estabiliza indicando a formação de filme anódico pela migração de ânions do eletrólito como O^{-2} e OH^-

para a interface óxido/metal e saída do substrato dos cátions como Fe^{2+}, Fe^{3+}, Cr^{2+} e Ni^{2+} para a interface metal/óxido sobre a influência do campo elétrico.

A adição de peróxido de hidrogênio ao eletrólito de ácido sulfúrico demonstrou o efeito oxidante do peróxido suprimindo a dissolução anódica do substrato e acelerando a formação do filme de óxido. Efeito similar foi encontrado com uso de peróxido de hidrogênio na obtenção de filme óxido anódico em nióbio e tântalo em estudos prévios dos autores. Eles atribuem este aumento da taxa de oxidação à geração de radicais •OH e HO_2• oriundos do peróxido de hidrogênio, seguido de um incremento da oxidação anódica. Todavia, este mecanismo de aceleração da oxidação pelo peróxido de hidrogênio ainda não foi totalmente esclarecido (ASOH; NAKATANI; ONO, 2016).

Figura 9: Micrografias de topo e seção transversal de anodização aço 304 com eletrólito 5M H_2SO_4| 2M H_2O_2 em tempos diferentes: (a/b) 15 minutos; (c/d) 120 minutos; (e/f) 240 minutos.

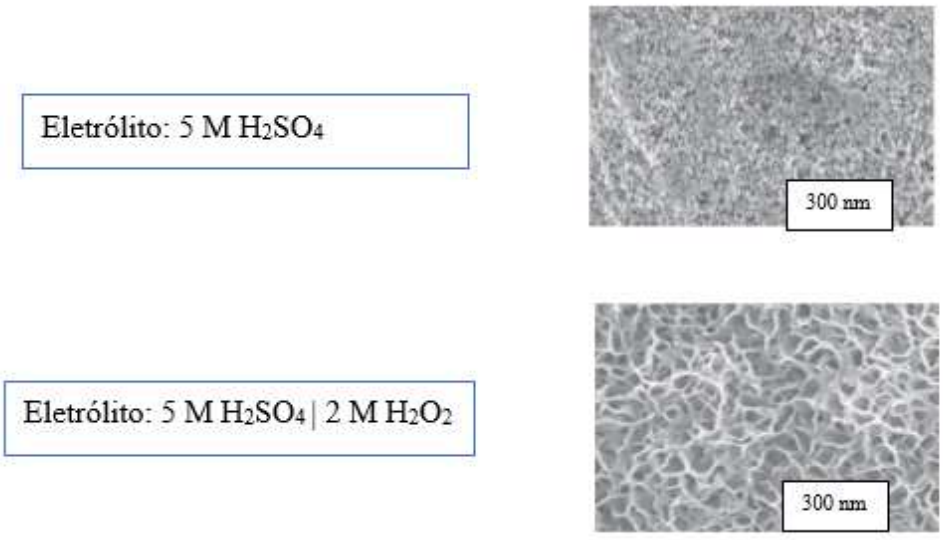


Fonte: Asoh et. al., 2016.

O ensaio de biofuncionalidade deste estudo foi realizado por meio de avaliação da formação de apatita artificial sobre a superfície. A apatita é a parcela mineral de formação do osso humano. Neste ensaio foram avaliadas 2 amostras nas mesmas condições de anodização, sendo fator diferencial 1 amostra com eletrólito somente a

base de ácido sulfúrico e a outra ácido sulfúrico com peróxido de hidrogênio. A Figura 10 ilustra os resultados das imagens ao MEV evidenciando a superior formação de apatita sobre a amostra anodizada com adição de peróxido de hidrogênio. Os autores destacam a boa formação de superfície biomimética na apatita com presença de estruturas trabeculares (Figura 10, com uso de eletrólito com adição de peróxido de hidrogênio) enquanto na amostra somente com ácido sulfúrico ocorreu deposição baixa e irregular, certamente resultado dos poros rasos do filme de óxido anódico.

Figura 10: Micrografias ao MEV ensaio de formação de apatita artificial em diferentes eletrólitos



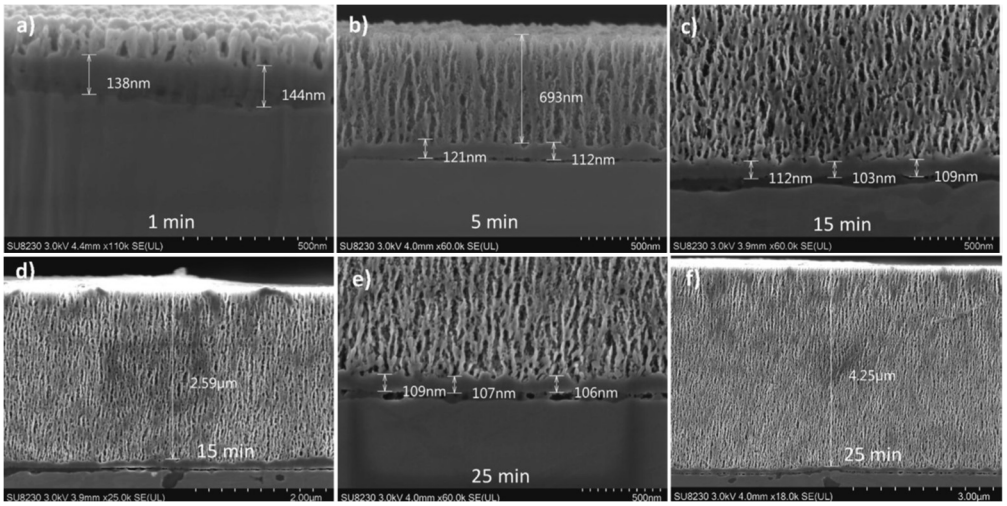
Fonte: Asoh et. al., 2016.

Em estudo mais recente para obtenção de filmes espessos de óxido anodico poroso, Wang et. al. (2020) realizaram uma série de experimentos variando tempo e tensão com a finalidade de modelar o mecanismo de crescimento e morfologia dos poros na camada de óxido anódico de aço inoxidável 304. Para este fim foi realizada anodização com eletrólito de etileno glicol contendo 0,1 M de água destilada e 0,1M de fluoreto de amônia. Neste estudo se observa a atuação do íon F^- como promotor da formação de poros na camada de óxido.

No primeiro experimento variando os tempos de anodização (1, 5, 15 e 25 minutos) com tensão de 50 V é possível observar nitidamente o início da formação da camada porosa a partir da camada inicial barreira que com o passar do tempo apresenta uma leve diminuição de espessura, mas é evidente que esta mantem seu crescimento pela

contínua oxidação do substrato na interface filme/metal. Na figura 11 estão ilustradas as imagens ao MEV das seções transversais indicando que com 15 minutos de anodização já havia sido obtida uma camada de 2,59 μm de espessura (WANG et al., 2020).

Figura 11: Micrografias da seção transversal das amostras anodizada a 50 V em tempos distintos



Fonte: Wang et. al., 2020.

Os autores após análise de espectroscopia eletrônica de raios X e análise morfológica, observaram um mecanismo de formação da camada porosa de óxido que se daria em 2 etapas pelas seguintes reações eletroquímicas:

(i) oxidação do aço substrato:

$2H_2O \rightarrow O_2 + 4H^+ + 4e^-$ (1)

$xM(Fe, Cr, Ni) + ½\ yO_2 \rightarrow M_xO_y$ (Fe_2O_3, Cr_2O_3, NiO) (2)

(ii) dissolução dos óxidos de metais formados por elemento do eletrólito (neste caso ocorreria a dissolução pelos íons F- presentes no eletrólito)

$Fe_2O_3 + 6H^+ + 12F^- \rightarrow 2[FeF3]^{3-} + 3H_2O$ (3)

$Cr_2O_3 + 6H^+ + 12F^- \rightarrow 2[CrF3]^{3-} + 3H_2O$ (4)

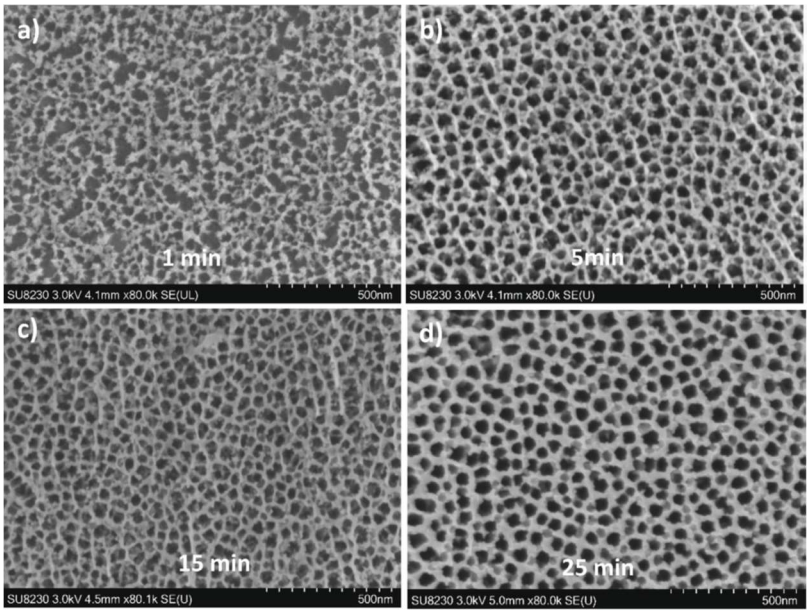
$NiO + 2H^+ + 3F^- \rightarrow [NiF_3]^- + H_2O$ (5)

Na análise de composição química da camada de óxido por espectroscopia eletrônica de raios X, encontrou-se uma predominância de Cr_2O_3 e α-Fe_2O_3 como formadores da camada de óxido. A quantidade de NiO não é tão expressiva, indicando que este óxido é praticamente todo dissolvido no eletrólito ácido.

Pelas imagens das morfologias dos poros em seção transversal, observa-se que diferente do titânio onde é possível fabricar nanotubos de óxido de titânio em ligas isto já se torna mais difícil, pois cada elemento de liga tem uma dissolução seletiva e uma velocidade diferente de difusão durante o processo de oxidação e posterior dissolução dos óxidos de metal. Consequentemente observam-se nanotubos descontinuados e que se encontram aleatoriamente devido às diferenças de velocidade de dissolução dos óxidos de Ni, Cr e Fe principalmente (WANG et al., 2020).

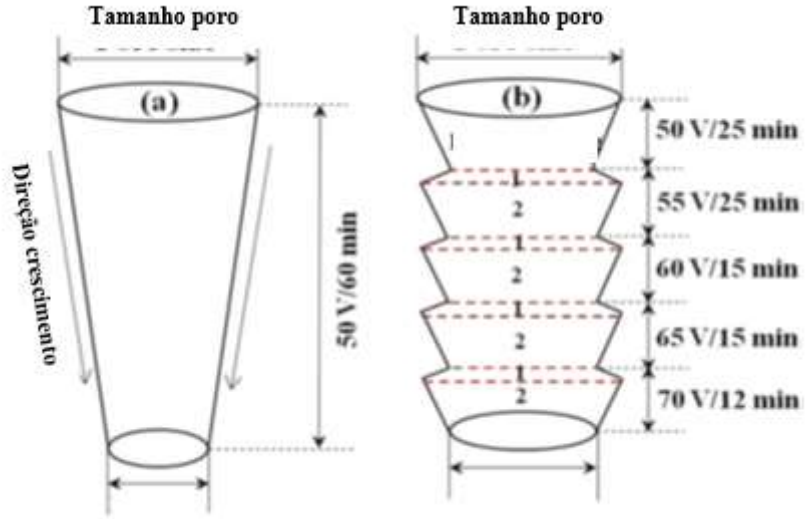
Na figura 12 estão ilustradas as micrografias de topo ao MEV de cada amostra evidenciando que com tempo de 1 minuto ainda não ocorrem poros com distribuição e profundidade adequados. O segundo experimento deste estudo foi a anodização com aumento da tensão por etapas entre 50 e 70 V aumentando 5 V a cada 20 minutos. A partir da análise da seção transversal da camada de óxido os autores propuseram o modelo ilustrado da Figura 13 para a formação do poro e seu crescimento. É possível observar que na anodização com tensão por etapas (Figura 13b) ocorre uma quebra do crescimento do poro a cada aumento instantâneo da tensão, indicando que ocorre um breve aumento da camada barreira nesse ponto, porém em seguida a curva de anodização se estabiliza novamente formando o crescimento constante do poro (WANG et al., 2020).

Figura 12: Micrografias de topo das amostras anodizadas em tempos diferentes na tensão de 50 V.



Fonte: Wang et. al., 2020.

Figura 13: Modelo proposto de crescimento do poro da camada de óxido (a) anodização com tensão constante; (b) anodização com tensão por etapas.



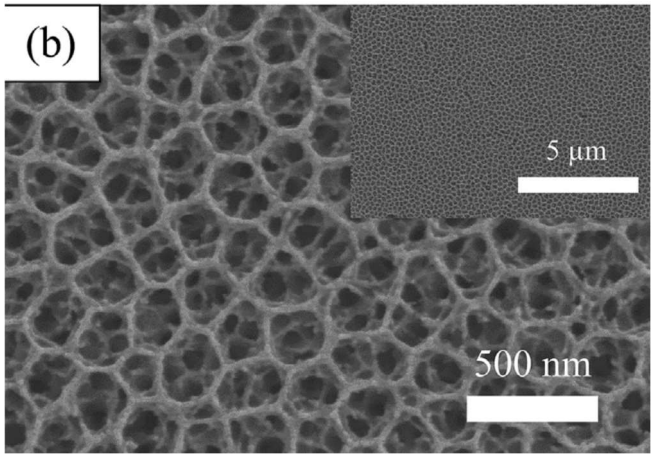
Fonte: Wang et. al., 2020.

O estudo de Saha et. al. (2019) avaliou a melhoria de proteção corrosiva em aço 304 para aplicação naval, em ambiente altamente agressivo. Com esse objetivo os autores obtiveram uma camada de óxido anódico nanoporosa pelo processo de

pré tratamento de eletropolimento (em eletrólito de etileno glicol, éter monobutílico e ácido perclórico em tensão de 60 V por 30 minutos) e posterior anodização com eletrólito de etileno glicol contendo 0,1 M de fluoreto de amônia e 0,1 M de água destilada na tensão de 80 V por 30 minutos. Após esse processo foi realizado um tratamento térmico em parte das amostras em forno mufla a 500 °C por 2 horas com rampa de elevação de temperatura de 2,5 °C por minuto para minimizar a formação de rachaduras na superfície anodizada. Este tratamento térmico é utilizado para remover as espécies fluoretadas da camada de óxido (SAHA *et al.*, 2019).

A Figura 14 ilustra micrografia ao MEV da topografia da amostra após tratamento térmico evidenciando a formação de poros e uma estrutura que lembra favos de mel. Este resultado se deve ao processo de eletropolimento que removeu a camada de passivação natural de óxido de cromo. A análise de composição química da camada de óxido indicou que após o tratamento térmico o óxido amorfo foi convertido em magnetita de fase cristalina (Fe_3O_4), além da formação de uma camada barreira compacta de magnetita térmica estável abaixo da camada porosa que possui excelentes propriedades anticorrosivas (SAHA et al., 2019).

Figura 14: Micrografia de topo da amostra de aço inox 304 anodizada e tratada termicamente.

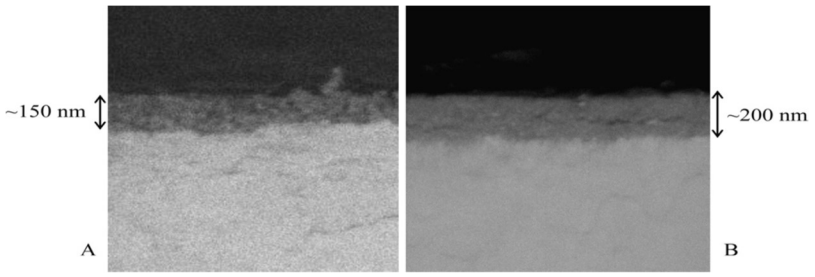


Fonte: Saha et. al., 2019.

Em estudo de Doff et. al. (2011), sobre mecanismo de formação e crescimento de filmes anódicos e catódicos sobre aço AISI 316L, os autores utilizaram eletrólito de 5M de ácido sulfúrico a 60 °C. A formação de filme foi realizada via polarização pulsada de onda quadrada com aplicação de 1 pulso a cada 90 ms durante 20

minutos. Na Figura 15 é possível observar as micrografias ao MEV da seção transversal ilustrando os filmes obtidos sob ambas condições: anódica e catódica.

Figura 15: Micrografias da seção transversal de 316L anodizado destacando a espessura da camada de óxido: (A) condição catódica (B) condição anódica.



Fonte: Doff et. al., 2011.

Os autores encontraram algumas diferenças nos filmes obtidos em cada condição. Na condição anódica foi obtida uma espessura maior de aproximadamente 200 nm, enquanto na condição catódica foi obtida uma espessura de 150 nm. Também ocorreram diferenças na composição dos filmes formados em cada condição, nos resultados obtidos em análise por RBS (espectroscopia de retrodispersão de Rutherford). Observa-se a ausencia de Níquel no filme obtido na condição anódica. Os perfis para outras espécies de metal perto da interface substrato/filme possuem características inexplicáveis, que podem ser resultado de enriquecimentos locais, depleção de espécies e mudanças na porosidade do filme. Enquanto ferro, manganês e níquel foram relativamente ausentes no filme em condição anódica, a análise por RBS mostrou que o molibdênio foi responsável por ~4% dos íons metálicos de o filme (DOFF *et al.*, 2011).

No filme anódico, um gradiente de concentração de espécies de metal é gerado durante a ativação entre o aço inoxidável e o eletrólito. O curva de polarização indica que a dissolução ativa é acompanhada por evolução significativa de hidrogênio, enquanto a redução de oxigênio pode acompanhar o crescimento do filme passivo. A deposição de material é sugerida em função das concentrações de espécies de metal dissolvidas formarem uma alcalinização local, devido às reações catódicas. As observações da superfície do filme indicaram que os contorno de grão do aço inoxidável foram os locais preferidos de ativação (DOFF *et al.*, 2011).

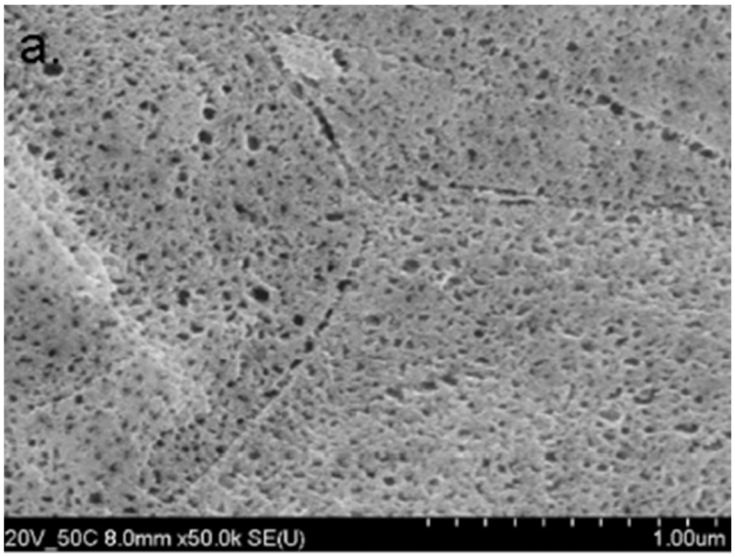
Ambos filmes são ricos em cromo e molibdênio e consistem em sulfatos, óxidos e hidróxidos. A concentração de molibdênio no filme é destacada por um fator de ~2

a 3 em relação ao aço apenas polido. O crescimento do filme é alcançado através de ciclos de dissolução do aço inoxidável, sob condições de ativação ou transpassividade, e subsequente deposição de material no filme. O filme depositado consiste principalmente em produtos contendo Cr^{3+}, formados devido a oxidação de íons Cr^{2+} ou redução de $Cr_2O_7^{2-}$ / CrO_4^{2-}, com baixa solubilidade em relação a produtos contendo ferro, níquel e manganês. A redução de íons cromato parece ser estimulada pela presença de íons Fe^{2+}, que podem ter a concentração aumentada pelo controle do potencial de deposição.A maior presença de cromo no filme é favorecido pelo relativamente lenta dissolução do óxido de cromo em comparação com o óxido de ferro no eletrólito ácido (DOFF *et al.*, 2011).

Burleigh, Schmuki e Virtanen (2008) realizaram estudo utilizando eletrólito altamente alcalino para obtenção de camada nanoporosa em aço carbono AISI 1010. Quando o aço é polarizado na região transpassiva, a corrente elétrica aplicada promove o crescimento de um filme de magnetita (Fe_3O_4) e simultaneamente ocorre a formação de oxigênio e dissolução do ferro.

A metodologia utilizada para a obtenção deste óxido consiste na anodização em eletrólito de solução 12,5M de NaOH em temperaturas elevadas entre 50 e 90°C e potencial aplicado entre 1,6 e 2,6 V por 5 minutos. Os autores obtiveram resultados muito satisfatórios quanto à formação de poros, conforme pode ser observado na Figura 16 onde é ilustrada micrografia ao MEV de amostra anodizada a 2,0 V em eletrólito a 50°C. Foram realizados testes em diversas temperaturas de eletrólito e tensões, levando a conclusão que para este processo os parâmetros mais importantes são: tensão aplicada, temperatura do eletrólito, concentração do eletrólito, saturação do eletrólito, espessura do filme anódico e a composição do metal base (BURLEIGH; SCHMUKI; VIRTANEN, 2008).

Figura 16: micrografia ao MEV de amostra anodizada a 2,0 V em eletrólito NaOH a 50°C.



Fonte: Burleigh, Schmuki e Virtanen, 2008.

Após análise dos resultados de morfologia da superfície e da seção transversal das amostras e também caracterização por espectroscopia de raios X, os autores sugerem dois possíveis mecanismos de crescimento do filme anódico. O primeiro mecanismo proposto seria o crescimento do filme de óxido por dissolução-precipitação. A evidenciação de coloração violeta na região próxima a superfície do anodo indica que inicialmente o Fe se dissolve como Fe^{6+} e reage com o ânion hidroxila presente no eletrólito formando ânions ferrita conforme equação 6:

$$Fe^{6+} + 8\ OH^- \rightarrow FeO_4^{2-} + 4\ H_2O \quad (6)$$

Simultaneamente ocorre evolução de oxigênio na superfície do aço evidenciado pelo aparecimento de bolhas. O oxigênio também consome OH^- do eletrólito ou produz íons H^+, conforme equações 7 e 8, ambos processos reduzem o pH adjacente da interface anodo/solução em relação ao pH da solução original.

$$4\ OH^- \rightarrow 4\ e^- + 2\ H_2O + O_2 \quad (7)$$

$$2\ H_2O \rightarrow 4\ e^- + 4\ H^+ + O_2 \quad (8)$$

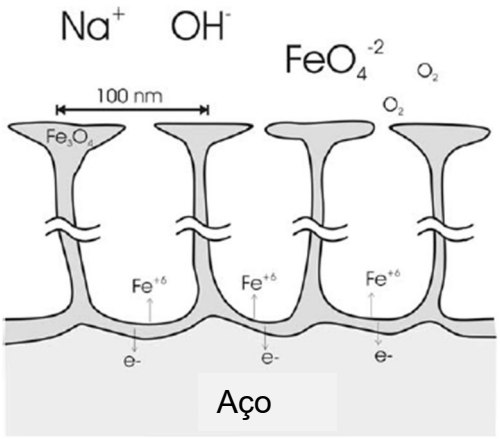
Após iniciados estes dois processos, ocorreria a precipitação da magnetita pela atração do ânion ferrita para a superfície positiva do aço de acordo com duas equações possíveis 9 e 10:

$$3\ FeO_4^{2-} \rightarrow Fe_3O_4 + 4\ O_2 + 6\ e^- \quad (9)$$

$$3\ FeO_4^{2-} + 6\ H^+ \rightarrow Fe_3O_4 + 4\ O_2 + 3\ H_2O \quad (10)$$

O segundo mecanismo proposto é baseado na teoria de geração de poros de filmes anódicos em alumínio. Neste caso, inicialmente o Fe iria se oxidar para Fe^{2+} e Fe^{3+} formando magnetita diretamente e também ocorreria a evolução do oxigênio conforme equações 7 e 8 para propiciar a formação da magnetita. A camada de magnetita flui plasticamente devido a ação de tensões de eletroestricção (stress mecânico proveniente da expansão do volume durante a formação de óxido), empurrando o óxido para os lados formando as paredes dos poros, conforme ilustra a figura 17 (BURLEIGH; SCHMUKI; VIRTANEN, 2008).

Figura 17: Mecanismo proposto de crescimento das paredes de óxido na anodização de aço com eletrólito de 12,5M NaOH.



Fonte: Burleigh, Schmuki e Virtanen, 2008.

Os autores sugerem que muito provavelmente os dois mecanismos ocorrem ao mesmo tempo, sendo que com predominância da formação de poros. Isto explicaria a uniformidade encontrada na espessura do óxido e também na orientação cristalográfica compatível com o grão. Fica evidente nas micrografias que nas

fronteiras de grão ocorre uma mudança no padrão de crescimento do poro, fato que não se explicaria se ocorresse somente o mecanismo de dissolução-precipitação (BURLEIGH; SCHMUKI; VIRTANEN, 2008).

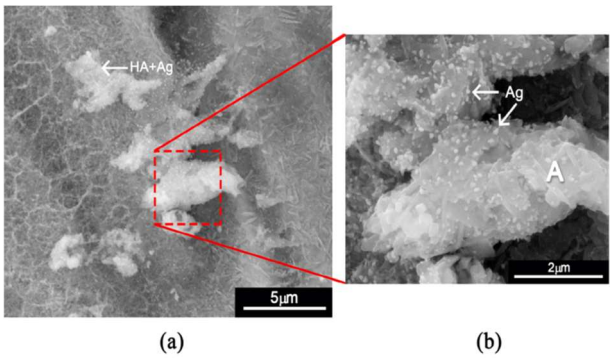
2.4 PROCESSO DE ADIÇÃO DE PRATA

Conforme descrito no item 2.1.2 deste trabalho, o uso de nanopartículas de prata vem sendo promissor na área de biomateriais. O processo de anodização somado à aplicação de nanopartículas de prata sobre esta superfície pode trazer um aperfeiçoamento importante para o uso do aço inox 316L nas aplicações biomédicas.

Com o objetivo de obter um biomaterial com propriedades antibacterianas e boa osseointegração, Ferreira et. al. (2019) desenvolveram uma camada de hidroxiapatita, nitrato de prata e policaprolactama sobre substrato de titânio puro. Para este fim, após aplicação da camada de hidroxiapatita, a amostra de titânio foi submersa em uma solução de 10 ppm de nitrato de prata e deixada em forno a 37°C por 48 horas. Em seguida foi realizada a secagem em temperatura ambiente no dessecador.

Na Figura 18 estão ilustradas as micrografias da superfície resultante, evidenciando a adesão das partículas de prata. Segundo os autores, a estrutura da hidroxiapatita permite substituições catiônicas e aniônicas por isomorfia, o que foi observado na substituição dos íons Ca^{2+} pela Ag^{+} nas amostras (FERREIRA *et al.*, 2019).

Figura 18: Micrografias ao MEV das microestruturas (aglomerados de hidroxiapatita) (a); maior magnificação da área em vermelho para destacar as nanopartículas de Ag (b).



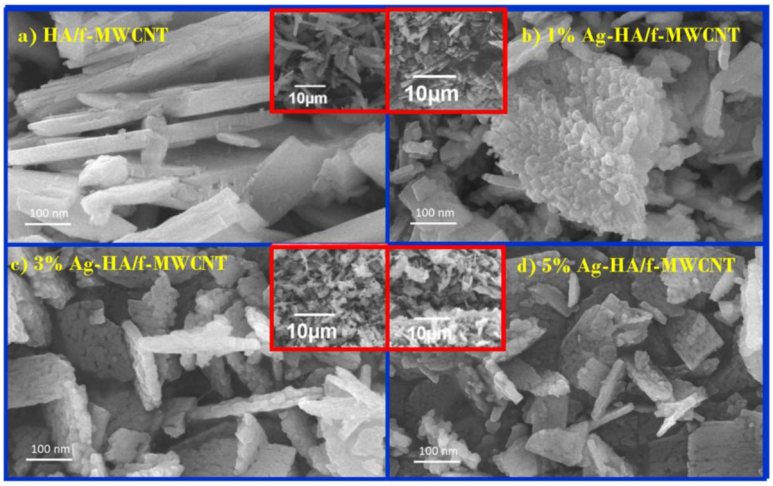
Fonte: Ferreira et. al., 2019.

As amostras contendo prata com cobertura de policaprolactama apresentaram uma queda de 42% de viabilidade celular bacteriana em relação ao titânio puro. Na amostra contendo prata sem cobertura de policaprolactama a redução de viabilidade celular bacteriana chegou a 81%, indicando que o filme de policaprolactama possui um efeito retardante da liberação de íons de prata (FERREIRA et al., 2019).

Em outro estudo de otimização de ação bactericida e resistência à corrosão, Sivaraj e Vijayalakhmi (2019) desenvolveram uma cobertura para o aço inox 316L. Um precursor a base de hidroxiapatita, nitrato de prata e nanotubos de carbono de múltiplas camadas foi elaborado e aplicado sobre a superfície do aço pelo método de spray pirólise. A intenção do uso de nanotubos de carbono neste estudo foi de aumentar a superfície de contato para as nanopartículas de prata que tendem a formar aglomerados.

A superfície resultante exibe partículas de tamanho aproximado entre 50 e 100 nm em forma de bastão, conforme ilustram as micrografias na Figura 19. Foram elaboradas coberturas com 1, 3 e 5% de Ag e todas apresentaram partículas em forma de bastão hexagonal que se combinaram formando folhas. Um grande número de grãos está proximamente empacotado indicando que a concentração de prata exerce influência significante na fase cristalina e na morfologia desta cobertura. O aumento da concentração de prata provocou uma taxa de crescimento e nucleação mais rápida da decomposição térmica e um alto número de partículas se formaram sobre a superfície do aço inox 316L. Segundo os autores, esta morfologia auto organizada dos bastões hexagonais interconectados foi possível devido à decomposição pirolítica utilizada para aplicar o precursor (SIVARAJ; VIJAYALAKSHMI, 2019).

Figura 19: Micrografias da morfologia das amostras sem prata e com concentrações variadas de prata. (b) 1% Ag; (c) 3% Ag e (d) 5% Ag.



Fonte: Sivaraj; Vijayalakshmi, 2019.

Huang et. al. (2018) desenvolveram um biomaterial para finalidades ortopédicas a partir do titânio. Os autores previamente realizaram o ataque do titânio com solução contendo HF, HNO_3 e água na razão de 1:4:5. Após anodizaram o titânio em eletrólito contendo solução de 0,5% p/p de HF por uma hora a temperatura ambiente e tensão variada entre 10 e 30 V. Como resultado obtiveram uma camada de nanotubos de óxido de titânio com diâmetros médios na faixa de 100 nm. Em um segundo processo essa camada foi coberta por hidroxiapatita e dopada com prata e manganês pelo processo de eletrodeposição em uma célula galvânica. A função do manganês é de diminuir o potencial citotóxico da prata reportado em diversos estudos quando ocorre uma liberação acima de 1,6 ppm de Ag em ensaios controlados de liberação de íons onde foi evidenciada apoptose de células humanas (HUANG et al., 2018).

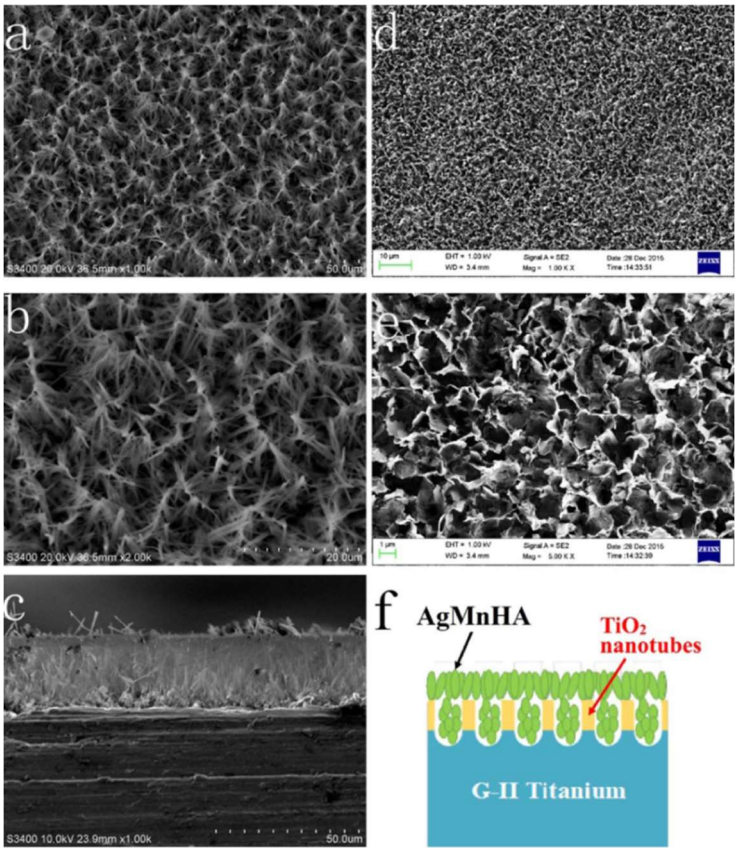
No processo de eletrodeposição, os autores utilizaram eletrólito contendo 40mM $Ca(NO_3)2{\cdot}4H_2O$; 25 mM $NH_4H_2PO_4$; 1 mM $Mn(NO_3)_2$ e 1mM $AgNO_3$ completado com água destilada. Para obter uma deposição homogenea da hidroxiapatita foi realizado pré tratamento do Ti anodizado de imersão em solução 2M NaOH a 55°C por 3 minutos. A eletrodeposição foi conduzida a 65°C utilizando como anodo platina e cátodo a folha de titânio anodizado. Um eletrodo de calomelano foi utilizado como eletrodo de referência e a densidade de corrente foi de 0,09mA/cm². Após a eletrodeposição foi realizada sinterização do Ti a 450°C por 2 horas com

objetivo de aumentar a cristalinidade da cobertura pela transformação de fase amorfa para anatase do óxido de titânio (HUANG et al., 2018).

Como resultado, a amostra contendo somente hidroxiapatita apresentou uma superfície com estruturas em forma de micro agulhas com regiões contendo aglomerados e poros, conforme ilustram as micrografias das Figura 20a e 20b. Já a amostra com hidroxiapatita dopada com Ag e Mn apresentou uma estrutura muito mais compacta com cristais menores em forma de flocos (Figuras 20c e 20d). De acordo com os autores isso ocorre devido à substituição dos cátions Ag^{+} e Mn^{2+} pelos minerais presentes na apatita, aumentando a densidade e diminuindo a porosidade da cobertura. Na Figura 20e está ilustrada a micrografia da seção transversal evidenciando a dupla camada formada com espessura aproximada de 25 μm, uniforme com a camada superior de alta penetração nos nanotubos de óxido de titanio, conforme esquema ilustrado na Figura 20f, demonstrando uma alta afinidade das partículas coloidais de HAAgMn com a superfície de nanotubos de TiO_2. Os autores sugerem este efeito ao pré tratamento do titânio anodizado com NaOH, alterando a densidade de carga da superfície formando mais bordas curvadas e assim adsorvendo mais íons de cálcio. Ou seja, ocorre um favorecimento de áreas de nucleação, o que acelera a formação e o crescimento dos cristais de HAAgMn (HUANG et al., 2018).

Em estudo de Mirzaee, Vaezi e Palizdar (2016) objetivou-se avaliar uma cobertura de hidroxiapatita dopada com prata quanto a sua ação antibacteriana e resistência à corrosão em SBF (*simulated body fluid*). Os autores utilizaram a técnica de eletroforese para aplicar a cobertura sobre titânio previamente anodizado. A metodologia consistiu na obtenção de um pó de hidroxiapatita dopada com prata que foi diluída em etanol, cuja solução foi utilizada como eletrólito após ajuste do pH para 2,0. A eletroforese foi realizada em célula eletrolítica com 3 eletrodos com arranjo para eletrodeposição catódica. O eletrodo de trabalho foi uma folha de titânio anodizado e os contra eletrodos foram 2 folhas de titânio arranjadas paralelamente ao eletrodo de trabalho a uma distância de 1,5 cm. O processo foi conduzido a tensão de 40 V por 300 segundos a temperatura ambiente. Após foi realizada uma sinterização da amostra em forno a 600°C por 1 hora com taxa de aquecimento de 5°C/minuto.

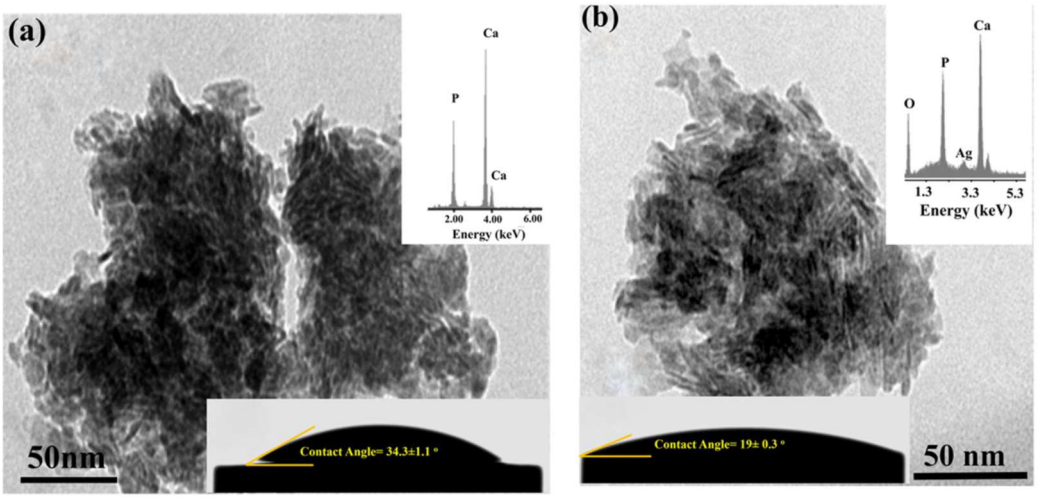
Figura 20: Micrografias de topo das amostras somente com HA (a e b) e com HAAgMn (d e e); micrografia da seção tranversal da amostra com HAAgMn (c); esquema sugerido para a seção transversal da amostra HAAgMn (f).



Fonte: Huang et. al., 2018.

Os resultados das análises microestruturais e de composição química da amostra por espectroscopia eletrônica de difração por raio X indicou a presença de espécies de prata na cobertura em diferentes estados químicos: 75% como Ag^{2+}, 23% como Ag^{+} e apenas 2% no estado metálico Ag^{0} resultando em um filme nanocompósito de alta qualidade. Na Figura 21 estão ilustradas as micrografias dos aglomerados de hidroxiapatita. Na Figura 21a representa a amostra somente com hidroxiapatita e a Figura 21b a amostra com hidroxiapatita dopada com prata. Também é possível verificar nas imagens um aumento da propriedade hidrofílica da amostra com prata. Segundo os autores, isto foi devido à formação de depósitos hexagonais mais espaçados pela interferência da prata durante a eletrodeposição (MIRZAEE; VAEZI; PALIZDAR, 2016).

Figura 21: Micrografia das amostras de titânio anodizado com cobertura de hidroxiapatita sem (a) e com dopagem de Ag (b); composição química da cobertura e ângulo de contato.



Fonte: Mirzaee, Vaezi e Palizdar, 2016.

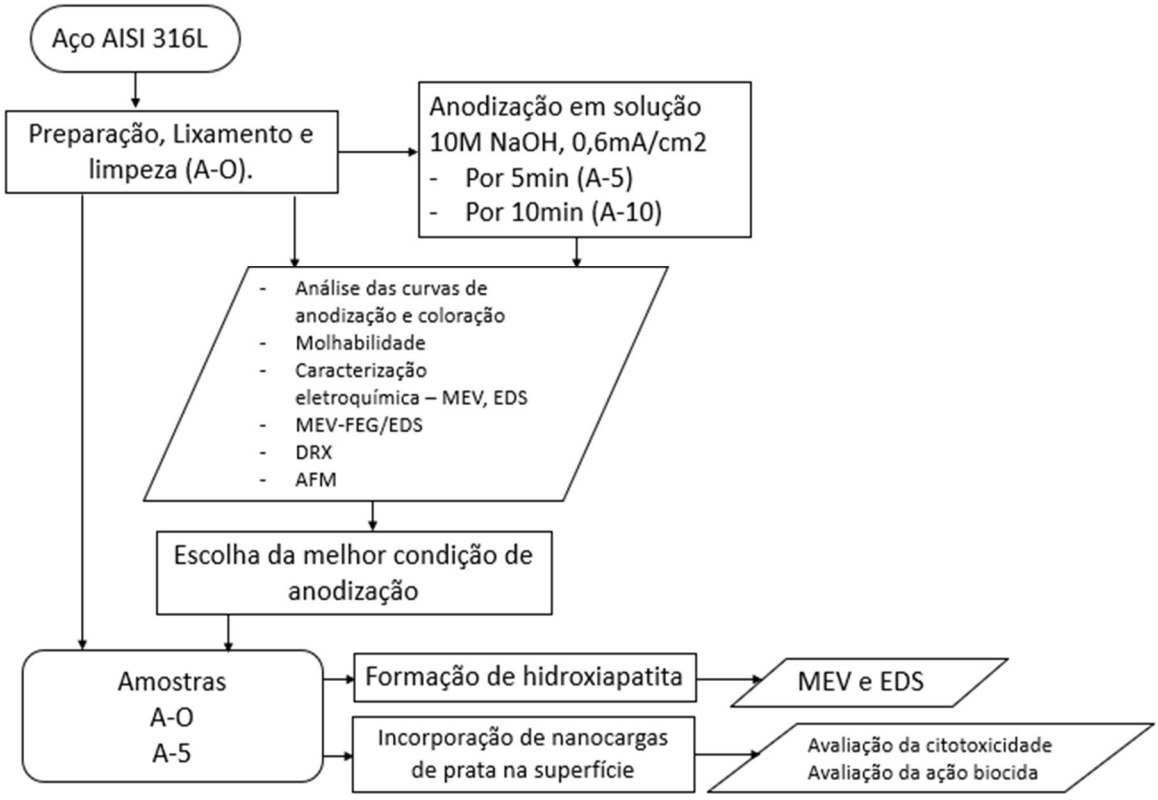
Neste estudo foram obtidos bons resultados de ação antibacteriana em ensaio microbiológico e bom resultado de molhabilidade e superfície biomimética. Todavia, houve uma pequena diminuição das propriedades de resistência à corrosão na amostra com prata devido justamente a melhoria da molhabilidade. Da mesma forma que o aumento da porosidade favorece a osseointegração, também favorece a penetração de espécies oxidativas na superfície, diminuindo a resistência à corrosão (MIRZAEE; VAEZI; PALIZDAR, 2016).

Observa-se, portanto, que os estudos apontam para boas possibilidades de obtenção de superfícies nanoporosas em aço e que o aço inoxidável 316L apresenta-se como uma alternativa mais econômica na classe de biomateriais metálicos. Da mesma forma, as nanocargas têm sido usadas para diversas finalidades de osseointegração, ação bactericida e antiviral. Dessa forma, justifica-se a importância de aperfeiçoar as características de aplicações biomédicas do aço inoxidável 316L para se aproximar das características dos biomateriais mais nobres, porém de maior custo.

3 METODOLOGIA

Neste capítulo são apresentados os materiais utilizados e os métodos empregados para a obtenção e caracterização da superfície anodizada. O fluxograma do processo deste estudo está ilustrado na Figura 22. A partir da caracterização da superfície, a amostra com os melhores resultados seguiu para a incorporação da prata e posterior avaliação de aspectos de biocompatibilidade.

Figura 22: Diagrama de blocos representando o fluxograma de trabalho



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1 MATERIAIS

Para a realização deste trabalho foram utilizadas chapas conformadas de aço inoxidável austenítico AISI 316L (grau médico) cortadas em peças de aproximadamente 2,5 x 2,5 cm.

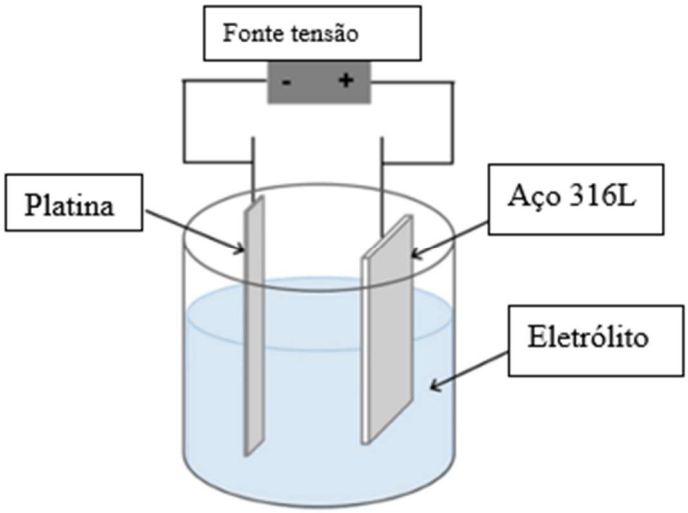
3.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras foram lixadas e polidas em politriz de bancada modelo Polipan-U da marca Pantec, seguindo a sequência de lixa de grão 400, 600, 800, 1200, 2400 e espelhada com lixa grão 4000, finalmente lavada com álcool e seca com fluxo de ar. As amostras foram decapadas em solução de HF:HNO3 1:3, por 30 s, imediatamente antes das anodizações. Após, foram enxaguadas em água corrente e água deionizada, respectivamente.

3.3 PROCESSO DE ANODIZAÇÃO

As anodizações foram realizadas em montagem baseada no esquema da Figura 23 (MBESE; MADIKIZELA, 2019). Foi utilizada uma fonte de tensão de 300V – 500 mA, acoplada a um computador para o registro de dados. O procedimento foi baseado na metodologia descrita por Burleigh, Schmuki e Virtanen (2008). A amostra foi conectada como ânodo e o cátodo utilizado foi um fio de platina, ambos à uma distância de 35 mm entre si. O processo foi realizado em modo galvanostático, ou seja, manteve-se a corrente constante, sem limitação de potencial. Foi utilizada uma densidade de corrente de 0,6 $mA.cm^{-2}$. O eletrólito utilizado foi de solução 10 M NaOH preparada a partir de reagente Hidróxido de Sódio p.a. Fabricante Dinâmica. A anodização foi processada sob temperatura de 70°C e agitação constante para eliminação das bolhas de gás formadas.

Figura 23: Arranjo esquemático para o processo de anodização.



Fonte: Adaptado de Mbese e Madikizela, 2019.

Devido a variação visual observada, principalmente por coloração, optou-se em preparar amostras com tempos distintos de anodização. Sendo assim, foram obtidas amostras com 5 minutos e com 10 minutos de anodização. Desta forma foi adotada uma nomenclatura para cada amostra para um melhor entendimento da discussão dos resultados. A Tabela 4 exibe as nomenclaturas de cada tipo de amostra que foram caracterizadas até o momento.

Tabela 4: Definição das nomenclaturas das amostras.

Nomenclatura	Descrição da amostra
A-O	Aço AISI 316L original lixado
A-5	Aço AISI 316L lixado e anodizado por 5 minutos
A-10	Aço AISI 316L lixado e anodizado por 10 minutos

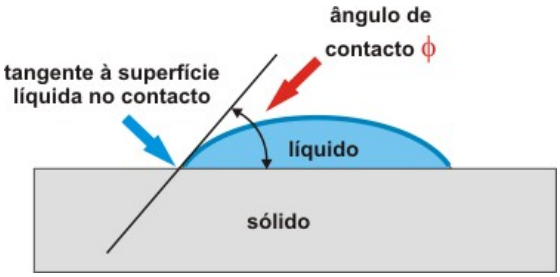
Fonte: Elaborado pelo autor

3.5 CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE

3.5.1 Molhabilidade

A análise de molhabilidade é um parâmetro que permite definir o grau de hidrofilia de uma superfície. Por meio da análise do ângulo de contato entre a superfície sólida e um líquido obtém-se um parâmetro de medida da energia superficial. O ângulo de contato é definido como o ângulo entre um plano tangente a uma gota do líquido e um plano tangente a superfície onde o líquido se encontra depositado, conforme ilustra a Figura 24 (STRNAD *et al.*, 2016).

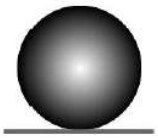
Figura 24: Representação esquemática do ângulo de contato formado por uma gota de um líquido sobre um sólido.



Fonte: Adaptado de Ferreira, 2013.

Na Figura 25 estão ilustradas as classificações de molhabilidade das superfícies. Quando o ângulo de contato $\theta > 90°$ não ocorre espalhamento do líquido pela superfície do sólido, e esta é denominada de hidrofóbica. Se o ângulo $\theta < 90°$ ocorre o espalhamento de líquido espontâneo sobre o sólido e, portanto, esta superfície é denominada hidrofílica. Também há os casos extremos quanto $\theta < 10°$ ou igual a 0° a superfície é denominada superhidrofílica e quando $\theta > 150°$ tem-se uma superfície superhidrofóbica (FERREIRA, 2013).

Figura 25: Classificação do comportamento das superfícies de acordo com o ângulo de contato θ.

Ângulo de Contato	θ < 10°	θ < 90°	θ > 90°	θ > 150°
Forma da gota				
Comportamento	super-hidrofilico	hidrofilico	hidrofóbico	super-hidrofóbico

Fonte: Ferreira, 2013.

A análise de molhabilidade foi realizada nas amostras avaliando a interação com SBF (fluido corpóreo simulado) no equipamento para medição do ângulo de contato, OCA 15EC, marca Labcontrol, que se encontra no Laboratório de Estudos Avançados em Materiais da Universidade Feevale.

3.5.2 Caracterização eletroquímica

As análises de caracterização eletroquímica foram realizadas no equipamento potenciostato, marca AUTOLAB, modelo PGSTAT 302 que se encontra no Laboratório de Estudos Avançados em Materiais da Universidade Feevale. Nestes ensaios foram usados como eletrodo de trabalho as amostras a serem analisadas, como contra eletrodo foi usada a platina e como eletrodo de referência o de calomelano saturado e o eletrólito utilizado foi o SBF.

a) Eletrólitos para ensaios de caracterização eletroquímica

O uso de SBF (*simulated body fluid*) para o estudo do comportamento de biomateriais tem se destacado entre as diversas técnicas existentes. Seu uso como eletrólito para avaliação do comportamento eletroquímico de biomateriais metálicos nas condições simuladas do ambiente corpóreo tem resultados muito promissores (BROOKS; BROOKS; EHRENSBERGER, 2017).

Desta forma, o comportamento relativo às propriedades anticorrosivas das amostras original e anodizadas foi avaliada em ensaios eletroquímicos com uma

solução de SBF normal como eletrólito. Esta solução foi preparada de acordo com o protocolo proposto por Kokubo e Takadama (YILMAZ *et al.*, 2020).

b) Polarização potenciodinâmica

A polarização potenciodinâmica é a técnica para obtenção de curvas de polarização prevendo a varredura contínua do potencial, iniciando-se no potencial de corrosão (aquele que se estabelece quando a mostra é imersa no eletrólito, também chamado de potencial de circuito aberto) ou em potenciais onde predominam reações catódicas (aqueles menores que o potencial de corrosão), elevando-se o potencial a taxa de varredura constante (MAGNABOSCO, 2001). Esta análise foi realizada com varredura de 1 mV/s iniciando em -200 mV/s até +400 mV/s com relação ao potencial de circuito aberto em eletrólito de SBF.

c) Potencial de circuito aberto (OCP)

O potencial de circuito aberto é um dos parâmetros eletroquímicos mais acessíveis para determinação experimental pois se trata da medida direta de potencial em relação à um eletrodo de referência (WOLYNEC, 2013). O potencial de circuito aberto das amostras foi avaliado de forma a acompanhar o valor do potencial de corrosão com o tempo de exposição à solução de SBF sem aplicação de corrente elétrica, bem como estabilizar esse potencial para os ensaios de espectroscopia de impedância eletroquímica. Portanto, os valores de OCP foram obtidos antes das medidas de EIE, no mesmo eletrólito.

d) Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)

A técnica de EIE é um dos métodos mais utilizados para estudos de deterioração e processos corrosivos nos sistemas metal/revestimento. Ao contrário da polarização potenciodinâmica que aplica um potencial de corrente contínua, a técnica de EIE aplica um potencial de corrente alternada com diferentes valores de frequência.

O método de EIE utiliza sinais muito pequenos que não perturbam as propriedades do eletrodo, além de possibilitar uma análise de reações de corrosão e

medidas de taxa de corrosão em meios de baixa condutividade. Assim, está técnica pode ser usada como complementação dos métodos de polarização permitindo aprofundar o estudo do comportamento corrosivo dos materiais (WOLYNEC, 2013). As medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica fornecem informações de simulação de um circuito elétrico identificando as reações de interface. A faixa de frequência utilizada durante a impedância foi de 100 kHz até 3 mHz com sinal senoidal de 20 mV. As análises foram feitas durante 196 horas, com análises a cada 24 horas.

3.5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV/EDS)

A fim de avaliar as superfícies após ensaio de polarização e EIE, por meio de observação morfológica em vista de topo foram realizadas análises de micrografia de MEV e análise de EDS para identificação dos elementos químicos presentes. O equipamento MEV utilizado se trata do modelo JSM-6510LV, Joel localizado no Laboratório de Estudos Avançados em Materiais, na Universidade Feevale.

3.5.4 Microscopia de força atômica (AFM)

Foi realizada análise de microscopia de força atômica (AFM) com objetivo de determinar a rugosidade das amostras pela avaliação por medidas de rugosidade média (Ra). Foi utilizado o microscópio de força atômica Tosca 400 fabricante Anton Paar, modo contato, cantiléver fabricante Nanoworld, tipo Arrow CONTR, mesa de isolamento ativo de vibração para bancadas. Área de varredura de 5 μm^2 em 3 regiões distintas. Estes ensaios foram realizados pela empresa Anton Paar.

3.5.5 Microscopia eletrônica por emissão de campo (MEV-FEG)

Para avaliar as superfícies após a anodização, por meio de observação morfológica em vista de topo foram realizadas análises de micrografia de MEV-FEG e análise de EDS para identificação dos elementos químicos presentes. O equipamento utilizado se trata do modelo INSPEC F50 30 kV da Fabricante FEI, localizado no Laboratório Central de Microscopia e Microanálise (LabCEMM) da PUC-RS.

3.5.6 Espectroscopia de difração de Raios-X (DRX)

Com o objetivo de realizar a caracterização cristalográfica dos filmes anódicos obtidos nas superfícies das amostras foi realizada a análise de difração de Raios-X. O equipamento utilizado foi o difratômetro de Raios-X marca Shimadzu modelo XDR-6000, usando a técnica de incidência de feixe de Raios-X em baixo ângulo. O equipamento possui um tubo gerador de Raios-X com alvo de cobre, sendo utilizada a radiação K alfa desse elemento (1,5406 Angstrom). Este equipamento se encontra no Laboratório de Microanálise do Instituto de Física da UFRGS.

3.5.7 Capacidade de formação de hidroxiapatita

As amostras de aço AISI 316L anodizadas e original foram imersas em SBF para avaliação da bio-mineralização. Após serem imersas em um frasco esterilizado contendo 10 mL de SBF permanecendo em estufa a 80° C por 5 dias, o as amostras foram lavadas com água deionizada e, em seguida, secas ao ambiente (HUANG *et al.*, 2018; LIN *et al.*, 2002) . A morfologia da superfície das amostras após imersão no SBF foram caracterizadas por uma varredura de emissão de campo microscopia eletrônica (MEV) e análise de espectroscopia por energia dispersiva (EDS) para identificação dos elementos químicos presentes. O equipamento MEV utilizado se trata do modelo JSM-6510LV, Joel localizado no Laboratório de Estudos Avançados em Materiais, na Universidade Feevale.

3.6 INCORPORAÇÃO DE NANOCARGAS DE PRATA

Após a análise e discussão dos resultados da caracterização das superfícies anodizadas, foi selecionada a metodologia que apresentou resultado mais promissor para o processo de incorporação de prata na superfície. A incorporação de prata foi realizada em metodologia adaptada de Ferreira *et. al.* (2019) que consiste na agitação ultrassônica da amostra em solução de 5 mM de nitrato de prata por 1 hora em intervalos de 15 minutos para resfriamento da solução. Após a amostra foi seca por 48 horas em temperatura ambiente. As seguintes análises foram realizadas para avaliar as propriedades biofuncionais da superfície obtida:

3.6.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV/EDS)

A fim de avaliar as superfícies após o processo de incorporação de nanopartículas de prata no filme anódico, por meio de observação morfológica em vista de topo foram realizadas análises de micrografia de MEV e análise de EDS para identificação dos elementos químicos presentes. O equipamento MEV utilizado se trata do modelo JSM-6510LV, Joel localizado no Laboratório de Estudos Avançados em Materiais, na Universidade Feevale.

3.6.2 Avaliação de citotoxicidade

A análise de viabilidade celular foi realizada a fim de determinar a citotoxicidade das amostras. Para tanto se avaliou a viabilidade celular de células tipo NIH-3T3.

A linhagem celular NIH-3T3 foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ); foi cultivada em meio DMEM (Dubellco´s Modified Eagle´s Medium, Sigma®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab®). As culturas foram mantidas em atmosfera úmida a 5% de CO2, 37ºC, em sistema semiaberto, utilizando o processo de tripsinização para sua manutenção. Para os diferentes ensaios, 30 000 células/poço foram plaqueadas em microplacas de poliestireno de 96 poços, sendo mantidas em condições usuais até atingirem subconfluência.

Para obtenção dos meios de extração (ME), fragmentos das amostras de aço foram pesados em tubos de 15 mL e em seguida imersos em meio de cultivo sem soro mantendo a proporção de 1g para cada 5 mL de meio. Essa preparação foi mantida em geladeira (5 a 7ºC) por 24 horas, e a seguir esterilizada por filtração em membrana de acetato de celulose 0,22 um. O meio assim obtido foi determinado como ME 100%, sendo as demais concentrações (75, 50 e 25%) obtidas por simples mistura com meio de cultivo usual.

Para a exposição aos MEs, o meio de cultivo celular foi trocado pelos MEs nas diferentes concentrações suplementado com 1% de soro bovino fetal, em quadruplicatas, e as culturas foram mantidas em exposição durante 24 horas. Como controle negativo foram utilizados cultivos mantidos em meio de cultivo com 1% de soro bovino fetal, e como controle positivo foram utilizadas culturas incubadas com peróxido de hidrogênio 1% (Synth®) por 60 minutos.

A citotoxicidade foi avaliada no final do período de incubação através do ensaio de redução do MTT (Sigma®), que determina a funcionalidade mitocondrial. Brevemente, as células foram lavadas com CMF (solução salina tamponada sem cálcio e magnésio), adicionando-se CMF contendo 200 ug/mL de MTT e os cultivos foram mantidos em estufa por 2 horas. Após descarte desse meio, os cristais de formazan (produtos cromogênicos artificiais resultantes da redução de sais tetrazólio por deidrogenases e redutases) foram dissolvidos com DMSO, seguido por leitura em espectrofotômetro de microplacas (Spectramax M3, Molecular Devices®) à 570nm.

3.6.3 Avaliação de ação bactericida e antifúngica

Para a avaliação de formação de biofilme sobre mini placas metálicas foram cultivadas as cepas bacterianas (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosas* ATCC 27853, *E. aureus* ATCC 12598) e a cepa fungica (*C. albicans* ATCC 10231) em ágar sangue. Nas 24h seguintes foram utilizadas as cepas para preparação dos inóculos para a formação do biofilme; esses inóculos foram preparados com Mueller Hinton Broth, próximos a escala 0,5 de MacFarland, que equivale à 1,5 X108 UFC/mL (unidades formadoras de colônias). Em placas estéreis de cultivo celular recobertas por 400 µL ágar Mueller Hinton foram fixadas as placas de metal e aproximadamente 30 min depois foram adicionados 400 µL dos inóculos cobrindo a superfície superior das placas de metal. As placas foram incubadas em estufa (36°C) por 24h. Após, as placas de metal foram transferidas com o auxílio de pinças estéreis para novas placas de cultivo celular onde foram recobertas por 500 µL de Mueller Hinton Broth e permaneceram em estufa por 72h.

Quando completas as 48h de incubação as placas de metal foram coradas por Cristal Violeta. Primeiramente foram adicionados 400 µL de Formaldeído 4% para fixação durante 15min. Em seguida com auxílio de micropipeta removeu-se a parte líquida e foi adicionado o corante, o volume variou conforme necessário para que a superfície das mini placas fossem cobertas em torno de 400-600 µL, durante 30 min. Após esse período foi removido o excesso de cristal, com o auxílio de um papel absorvente, e as mini placas de metal foram transferidas para outros poços de cultivo celular. Para a solubilização foram adicionados 300 µL de álcool etílico absoluto e lidas no comprimento de 580nm pelo espectrofotômetro. O corante violeta fixa-se na

membrana celular, sendo assim, a intensidade da cor é diretamente proporcional a quantidade de microrganismos presente nas placas de metal.

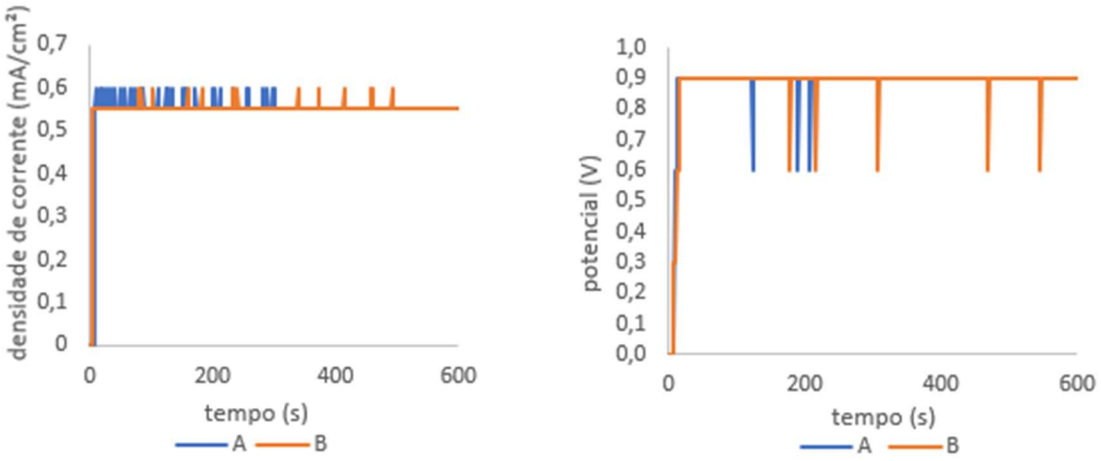
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos da anodização e caracterização das amostras até o momento, assim como a discussão dos resultados obtidos relacionados à literatura utilizada como base para este estudo.

4.1 ANÁLISE DOS TRANSIENTES DE ANODIZAÇÃO

A Figura 26 apresenta os transientes de densidade de corrente e potencial das amostras anodizadas em eletrólito de solução 10 M NaOH a 70°C. Estão apresentadas as curvas de amostra anodizada por 5 minutos (A) e por 10 minutos (B).

Figura 26: Transientes de densidade de corrente e potencial de aço AISI 316L anodizado em solução 10 M NaOH.



Fonte: Elaborado pelo autor.

É possível observar na Figura 26 um pico inicial de densidade de corrente e potencial nos segundos iniciais de anodização atingindo 0,9 V e uma densidade de corrente de 0,55 mA/cm². Estes valores se mantêm constantes até o fim da anodização em ambos tempos analisados e foram obtidos de forma experimental através da otimização dos parâmetros de anodização como concentração e temperatura do eletrólito, potencial, densidade de corrente e pré-tratamentos da amostra.

Na anodização com metais válvula, ocorre uma queda da densidade de corrente para valores quase nulos após atingir potencial constante. Este comportamento é característico da formação de filme compacto em que toda a corrente é utilizada para formação do filme (WANG *et al.*, 2020). Porém, no caso deste estudo com aço (predominância de ferro e cromo), este comportamento não é observado. A densidade de corrente se mantém constante aos valores iniciais definidos após avaliação experimental que apresentaram melhor eficiência de crescimento de óxido, assim como o potencial, indicando a ocorrência de mobilidade iônica por possível mecanismo de dissolução-precipitação e crescimento de óxido durante todo processo (BURLEIGH; SCHMUKI; VIRTANEN, 2009). Isto também é evidenciado pelas cores dos óxidos formados que será discutido no próximo item. Conforme Young (1961) o sobrepotencial é necessário para produzir o filme óxido à medida que ele é consumido. Isso pode aumentar a ddp (diferença de potencial) através de uma ou duas interfaces (óxido/eletrólito ou óxido/metal), ou alterar a força do campo (E) no óxido, o valor de equilíbrio de potencial, ou todos esses fenômenos ao mesmo tempo. O mecanismo de crescimento aponta uma analogia com o crescimento de óxido em metais válvula, sugerindo que o movimento iônico assistido por campo elétrico é o mais provável.

O ferro teve suas características de transição ativa e passiva observadas por estudos já no final dos anos 1800, revelando marcante mudança das propriedades sem mudança da aparência (YOUNG, 1961).

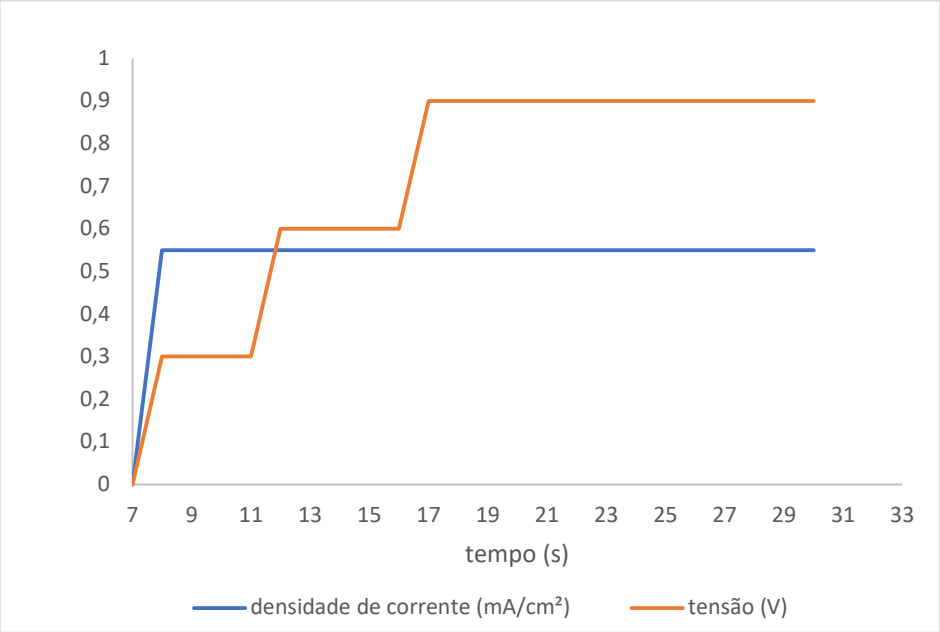
De forma experimental elevou-se a densidade de corrente e o potencial de anodização, porém observou-se que o sistema passou a priorizar a evolução de oxigênio (observação visual da formação de bolhas e coloração esbranquiçada do eletrólito) em detrimento da formação de filme anódico. Isto indica que o sistema passou para novo equilíbrio de propriedades da região transpassiva do ferro com potencial acima de 2 V (GENTIL, 2012). Este baixo valor de potencial para obtenção de filme de óxido também foi empregado por Asoh et. al. (2016) mesmo utilizando um eletrólito ácido de 5 M H_2SO_4 em aço AISI 304. Da mesma forma o aumento da densidade de corrente também inibiu o crescimento de filme anodico devido a dissolução do aço na região transpassiva.

O potencial de Flade do ferro (potencial onde inicia a região de passivação) foi dado por Franck (1949) em torno de 0,6 V. Este valor de fato não corresponde e é superior ao potencial de equilíbrio de qualquer óxido conhecido (Fe_2O_3 , FeO , Fe_3O_4),

ou seja, não é o potencial em que o óxido se torna termodinamicamente estável. A dissolução anódica do ferro é progressivamente inibida por alguma alteração no estado da superfície, isso causa o sobrepotencial observado. Dois processos podem estar envolvidos neste fenômeno: o efeito “cobertor passivo” quando ocorre uma saturação de sal-ferroso na solução próximo ao anodo formando depósitos na superfície possivelmente nucleando pontos com configuração favorável e crescendo lateralmente. Isto causa um aumento da densidade de corrente nas áreas ativas restantes e consequentemente aumento do potencial. Outro processo possível se dá pela depleção de hidrogênio na superfície anódica carregados pela corrente elétrica sem reposição, causaria a deposição de $Fe(OH)_2$ e num segundo momento a formação de filme de óxido pela reação com oxigênio adsorvido (YOUNG, 1961). De fato, nos resultados obtidos com um potencial médio de 0,9 V foi observada a formação de filme óxido, apesar deste valor não corresponder ao potencial de equilíbrio dos óxidos de ferro conhecidos.

O comportamento constante da densidade de corrente pode ser explicado devido à dissolução do ferro ser catalisada na presença de íons OH^- em solução alcalina. Isso é observado também em soluções ácidas mesmo com a mínima concentração de íons OH^-. O processo de dissolução tem forte envolvimento de íons hidroxila, com a formação inicial de $Fe(OH)_2$ ou $Fe(OH)^+$ que rapidamente se decompõem em Fe^{2+} na solução. Isso sugere que o catalisador cuja concentração muda lentamente com o potencial é o íon hidroxila adsorvido e que o processo real de dissolução envolve OH^- livre (YOUNG, 1961). Na figura 27 está ilustrado gráfico do comportamento do potencial e da densidade de corrente. As medidas de densidade de corrente e de potencial iniciam a partir de 7s em função de atraso na medida assim que o equipamento é ligado. É possível observar que enquanto a densidade de corrente rapidamente se estabiliza o potencial ainda aumenta em patamares até alcançar a estabilidade. Isso possivelmente pode ser explicado pela formação inicial de $Fe(OH)_2$ por dissolução dos íons Fe, ainda oferecendo baixa diferença de potencial em relação a dissolução proveniente de íons Fe da nova camada barreira formada após decorrido um certo tempo (WANG *et al.*, 2020).

Figura 27: Comportamento da densidade de corrente e potencial de aço AISI 316L durante anodização em solução 10 M NaOH.

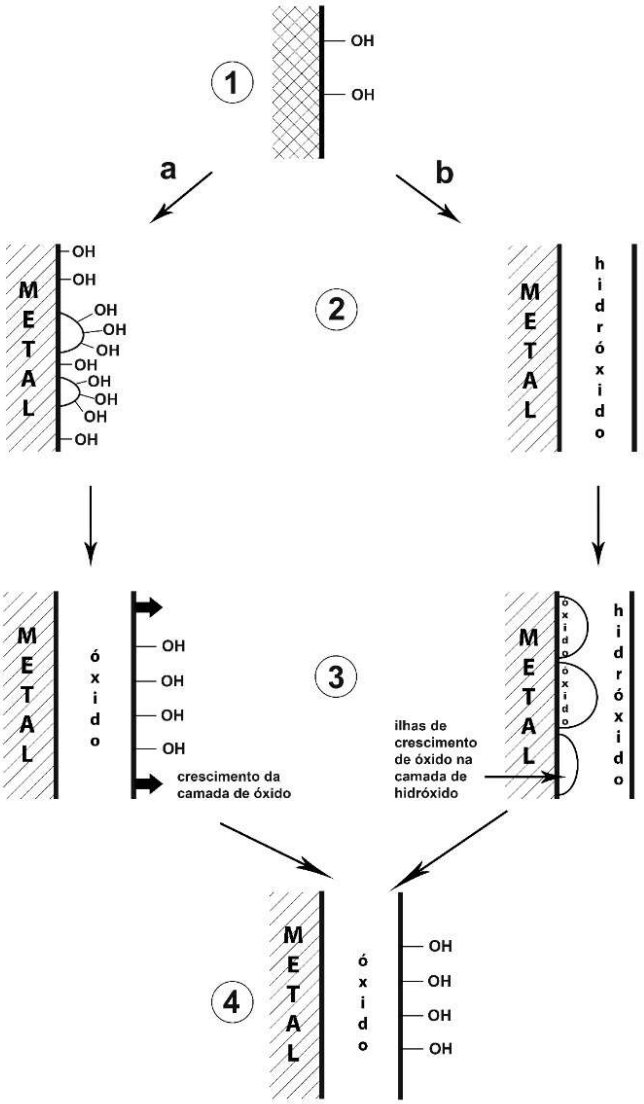


Fonte: Elaborado pelo autor.

As teorias dos mecanismos de crescimento dos filmes passivos em aços inoxidáveis, como da condução mista, incluem diferentes estágios da formação da camada passiva, partindo da superfície exposta do metal até o estado estacionário de passividade. Os dados obtidos por STM (microscopia de varredura por tunelamento) em solução tampão de borato aumentam as evidências de que a formação de filmes passivos passa por um processo de nucleação, seguido pelo crescimento do óxido até a formação de um filme regular contínuo (MARCUS; MAURICE, 2000). Está teoria de crescimento pode relacionar o aumento do potencial em etapas no início do processo conforme ilustra a Figura 27 com a formação das ilhas de óxido ou hidróxido, conforme cada estágio proposto.

A Figura 28 ilustra estes mecanismos baseados nos modelos clássicos e nos dados mais recentes, os estágios da formação do filme passivo. No ponto 1 ocorre uma adsorção dissociativa de H_2O ou adsorção de grupos OH^-, resultando na hidroxilação da superfície. Em seguida o crescimento do filme pode seguir dois caminhos (a e b), dependendo da natureza do metal base, da estabilidade relativa dos óxidos e hidróxidos, do pH do eletrólito, do potencial de passivação e da temperatura.

Figura 28: Mecanismos propostos para formação inicial de filmes passivos.



Fonte: Adaptado de (MARCUS; MAURICE, 2000)

O caminho “a” propõem a recombinação de grupos OH^- adjacentes (desidratação) ou desprotonação resultante da formação de ilhas de óxido de espessura de monocamadas (ponto 2a). Em seguida ocorreria a hidroxilação superficial e crescimento lateral de ilhas de óxido para formar uma monocamada completa de óxido com grupos hidroxila superficiais (ponto 3a). Finalmente o crescimento perpendicular à superfície de um óxido que ainda apresenta hidroxilação superficial (ponto 4).

No caminho “b” é proposto o crescimento perpendicular à superfície de uma camada de hidróxido ou oxi-hidróxido cobrindo completamente o metal (ponto 2b), seguido pela desidratação ou desprotonação e formação de ilhas de óxido na parte interna do filme passivo (ponto 3b) e crescimento lateral de ilhas e formação de uma camada interna de óxido completa sob uma camada externa de hidróxido ou oxi-hidróxido (ponto 4). O avanço desta reação pode lavar a uma desidratação aproximadamente completa do filme passivo com somente uma monocamada de hidróxido ou oxi-hidróxido permanecendo na superfície (MARCUS; MAURICE, 2000).

4.2 ANÁLISE DAS CORES

A imagem fotográfica das amostras após anodização por 5 minutos e por 10 minutos em eletrólito de solução 10 M de NaOH é ilustrada na Figura 29. Pode-se observar uma visível mudança de cor à medida que o tempo de anodização aumenta. Na amostra A-5, a coloração dourada-alaranjada indica uma espessura de filme anódico aproximada de 75 nm de acordo com val apresentada no estudo de Burleigh; Schmuki; Virtanen (2009) que relaciona o índice de refração óptica do óxido com a espessura do mesmo. Apesar da tabela ter sido elaborada em experimentos com aço carbono AISI 1010, os autores relatam que observaram comportamento semelhante nas demais ligas de aço analisadas em estudo anterior (BURLEIGH *et al.*, 2007), sendo estás próximas a composição da quantidade de cromo presente no aço AISI 316L. Esta cor também é associada com a maior presença de óxidos resultantes das reações iniciais de dissolução do substrato formando hidróxidos de ferro, que se oxidam para Fe^{2+} e Fe^{3+}. Por sua vez, no eletrólito ocorre formação do produto intermediário ferrita, que se oxida formando magnetita (Fe_3O_4) e hematita (Fe_2O_3). Se teoriza que também ocorra a formação direta destes óxidos a partir da oxidação dos hidróxidos, e que provavelmente os dois mecanismos ocorram simultaneamente. A amostra A-10 apresentou coloração predominantemente azul royal, indicando uma espessura maior em torno de 170 nm (BURLEIGH; SCHMUKI; VIRTANEN, 2009).

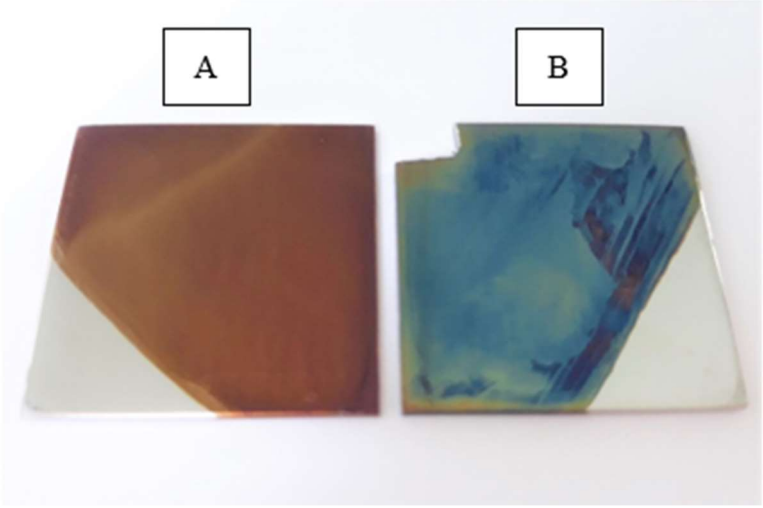
Tabela 5: Espessura do filme dicróico estimado a partir de sua cor, comparando a sílica em silício. Espessura ótica = $n_0t_0 = n_1t_1$.

Espessura do filme (nm) termicamente crescido SiO_2 n = 1,46	Coloração observada	Espessura filme (nm) para magnetita com canais de ar n = 1,0	Espessura filme (nm) para magnetita sólida n = 2,42
50	Amarelo - bronze	75	30
70	Marrom	110	40
100	Violeta escuro	145	60
150	Azul Royal	175	70
170	Amarelo - esverdeado	290	120

Fonte: Adaptado de Burleigh, Schmuki e Virtanen, 2009.

Quanto à composição dos filmes passivos e sua relação com as cores obtidas, deve-se considerar que estes filmes são normalmente constituídos de várias camadas de oxi-hidróxidos, com gradientes de composição e grau de hidratação na direção normal ao metal base. De acordo com o modelo de dupla camada, o filme passivo consiste de uma camada interna de óxido e uma camada externa de hidróxido ou oxi-hidróxido. Para metais com mais de uma valência, como ferro e cromo, os íons de menor valência normalmente estão localizados na parte interna do óxido, enquanto que os de maior valência são encontrados nas regiões externas dos filmes (MARCUS; MAURICE, 2000). A coloração mais escura obtida na amostra A-10 que foi anodizada por mais tempo indica maior presença de magnetita, óxido composto por óxidos de Fe^{2+} e Fe^{3+} indicando que os íons com valência maior difundiram para a parte mais externa do filme.

Figura 29: Imagem fotográfica das amostras após anodização em eletrólito 10 M NaOH. A) A-5 e B) A-10.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Porém, esta formação de magnetita também é relacionada com mecanismos de crescimento do filme passivo. Hofmann et. al. (1989), em seus estudos, verificaram através de análises por XPS e por medidas de corrente passiva, o enriquecimento de cromo em filmes passivos formados em ácido sulfúrico em ligas de Ferro-Cromo. Esse comportamento foi atribuído à dissolução preferencial do ferro no eletrólito e a baixa mobilidade do cromo no filme (HOFMANN; KNOTE; STOEZ, 1989). Desta forma, na amostra anodizada por 5 minutos a camada de filme na coloração amarelada pode indicar maior presença de óxidos de cromo, enquanto que os íons de ferro estão se dissolvendo preferencialmente para o eletrólito. Com o passar do tempo aumenta-se a formação de óxidos de ferro de coloração preta azulada.

Em virtude das características termodinâmicas dos componentes da liga, um dos componentes pode se dissolver preferencialmente em relação aos demais, resultando em uma concentração maior de um dos componentes na superfície do metal. Estudos em XPS revelaram que a concentração de Cr^{3+} na camada interna de óxido é muito maior que o conteúdo nominal de cromo na liga (MARCUS; MAURICE, 2000). O mecanismo de enriquecimento superficial de cromo é baseado na dissolução seletiva de ferro e na segregação oxidativa do cromo. Assim, átomos de ferro são deslocados da superfície migrando para o eletrólito na forma de íons solvatados,

enquanto que os átomos de cromo são rapidamente oxidados, formando o filme passivo. Todavia, o filme passivo não é constituído somente de óxido de cromo, contendo ainda quantidades representativas de Fe^{2+} e Fe^{3+}. Estudos indicam a existência de gradientes de concentração de cromo dentro da camada passiva de ligas de Ferro-Cromo, com um enriquecimento acentuado de cromo na região central e uma maior quantidade de ferro na camada externa, próxima a interface do eletrólito (CALINSKI; STREHBLOW, 1989).

Em estudo realizado em aço AISI 304 por Klimas et. al. (2013), onde foram relacionadas as cores resultantes dos filmes passivos sob diferentes condições de anodização com eletrólito de glicerol e HF, os filmes de cor amarelo-dourado apresentaram espessura fina entre 1 e 1,2 μm e composição de fluoretos de ferro amorfo e oxi-hidróxidos de ferro e cromo e seus coordenados complexos com fluoretos. Quanto maior a tensão aplicada, maior foi o enriquecimento de cromo no filme passivo, indicado pela coloração verde observada. As análises de DRX confirmaram o aumento da presença de cromo no filme proporcional ao aumento da espessura do mesmo. Isto aumenta as evidências da maior presença de cromo no filme passivo formando óxidos inicialmente enquanto que os íons de ferro preferencialmente iniciam se dissolvendo no eletrólito, mas com uma boa quantidade de formação de óxidos de ferro também.

Possivelmente ocorrem simultaneamente formações de óxidos e oxi-hidróxidos simples e complexos de ferro e cromo, assim como óxidos duplos, no caso a cromita. Também existe participação dos elementos de liga como o Níquel, que assim como o cromo pode formar óxidos de cor verde (KLIMAS *et al.*, 2013).

A coloração de aços inoxidáveis é utilizada a muito tempo para fins estéticos, assim como para melhorias de resistência à corrosão. O método de coloração mais conhecido é processo INCO, que consiste simplesmente na imersão de aço inoxidável em uma solução aquosa de trióxido de cromo e ácido sulfúrico à quente. Por meio do controle do potencial é possível monitorar a cor da amostra pelo tempo do processo, resultando em aços que variam da cor marrom leve, passando para azul, dourado, vermelho e verde com aumento do potencial (CONRRADO, 2003). Estudos de XPS confirmaram a presença de nove diferentes espécies neste filme obtido pelo processo INCO, principalmente Fe, Cr e O, as quais não variam com a espessura. O cromo está presente no filme em pelo menos dois estados de valência e pode haver também espécies de cromo em estados intermediários entre Cr^{6+} e Cr^{3+}. A proporção de cromo

no filme, em relação aos outros elementos de liga é maior do que no aço inoxidável (ANSELL; DICKINSON; POVEY, 1978).

4.3 ÂNGULO DE CONTATO

O ensaio de molhabilidade foi realizado nas amostras original, anodizada por 5 minutos e por 10 minutos, com uso de eletrólito SBF (pH = 7,4). A Tabela 6 apresenta os valores médios de ângulo de contato, por amostra, obtidos pelo método da gota séssil.

Tabela 6: **Ângulo de contato obtido pelo método da gota séssil.**

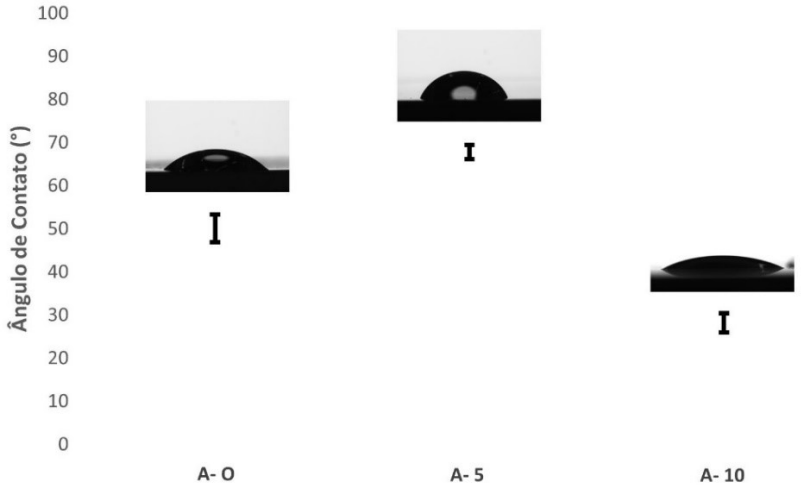
Amostra	Média (°)	Desvio Padrão
A-O	50,10	3,20
A-5	67,85	1,64
A-10	28,20	2,17

Fonte: Elaborado pelo autor

A análise dos resultados permite afirmar que todas as amostras avaliadas possuem uma superfície com caráter hidrofílico, com valores de ângulo de contato inferiores a 90° (superfície com molhamento parcial). A hidrofobicidade da superfície está diretamente ligada a energia superficial do sólido. Ela pode ser avaliada pelo ângulo de contato formado por uma gota de líquido com a superfície. Uma adesão maior de líquidos resulta em um ângulo menor de contato, indicando assim um caráter hidrofílico na superfície. Desta forma, quanto maior for a energia livre superficial, maior será a molhabilidade e consequentemente maior a adesão de líquidos (FRANCISCO, 2013). Todavia, proporcional ao ângulo de contato do líquido com a superfície do revestimento, o grau de hidrofobicidade de uma superfície está diretamente relacionado com sua capacidade de proteção anticorrosiva (EVANS; LEIVA-GARCIA; AKID, 2018; GAMA, 2014). Figura 30 ilustra imagem do ângulo entre as amostras para fins de análise comparativa. Em biomateriais se deseja que o ângulo de contato não seja superior a 70° priorizando certa rugosidade atrelada a molhabilidade nas

interações do material com o tecido ósseo (VOGLER, 1998). Todas as amostras apresentaram valor adequado. Nota-se que a amostra de aço original (A-O) apresenta valor mais baixo de ângulo de contato que a amostra anodizada por 5 minutos (A-5) possivelmente pelo fato de ter sido lixada em lixa grão 4000. O aço AISI 316L é usado como biomaterial em implantes por décadas de modo satisfatório, sendo este valor de ângulo de contato adequado para sua finalidade (MAXIMO *et al.*, 2016; STRNAD *et al.*, 2016).

Figura 30: Ângulo de contato obtido pela gota séssil.



Fonte: elaborado pelo autor.

A amostra A-5 também apresentou um valor satisfatório para uso como biomaterial. A camada de filme passivo formada indica a ocorrência de ativação de energia livre e de certa porosidade. Todavia, o ângulo de contato obtido também traz certo benefício quanto à resistência à corrosão por não ser tão hidrofílica em comparação a amostra A-10 (ANDERSON; LAMICHHANE; MANI, 2016; ANSELL; DICKINSON; POVEY, 1978).

Em estudo de Anderson, Lamichhane e Mani (2016) o aumento da rugosidade se mostrou como aspecto favorável para uma maior ativação dos macrófagos do tecido ósseo, também chamados de osteoclastos, responsáveis pela preparação da superfície para que os osteoblastos iniciem a neoformação óssea. Os osteoblastos, por sua vez, são responsáveis por sintetizar a parte orgânica da matriz óssea, concentrando fosfato de cálcio e participando da mineralização. A amostra A-10 que

apresenta boa qualidade hidrofílica concorda com o fato de possuir uma camada mais espessa de óxido, por consequência maior porosidade. Deve-se considerar também que a anodização foi realizada em eletrólito de 10 M NaOH implicando em uma ativação da superfície com íons hidroxila livre que favorecem a hidratação e a atração de cátions de cálcio, magnésio e potássio presentes no SBF e principais percursores da formação da apatita (substância presente no tecido ósseo). A formação desta substância em coberturas de implantes obteve bons resultados de ativação de células anti-inflamatórias (BIAN *et al.*, 2019; LIN *et al.*, 2002).

Por outro lado, ângulos de contato com valores acima de 70°, caracterizados hidrofóbicos se tratando de biomateriais, indicam dificuldade à permeação do eletrólito, bem como, a lixiviação de íons para o ambiente corpóreo, aumentando seu desempenho anticorrosivo (HUANG *et al.*, 2018). Estas características também são desejáveis para o biomaterial, especialmente quando se trata de uma região de caráter inflamado, onde o fluído corpóreo apresenta pH mais baixo. Um ângulo de contato muito baixo pode indicar um desempenho anticorrosivo baixo e problemas de reações alérgicas, inflamações e rejeição do biomaterial (PENG *et al.*, 2019; YUAN *et al.*, 2019).

De forma geral, para biomateriais, superfícies hidrofílicas são mais desejadas, tendo em vista suas melhores interações com os fluidos corpóreos, células e tecidos durante o processo pós cirúrgico (ANDERSON; LAMICHHANE; MANI, 2016; COELHO; JIMBO, 2014).

4.4 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

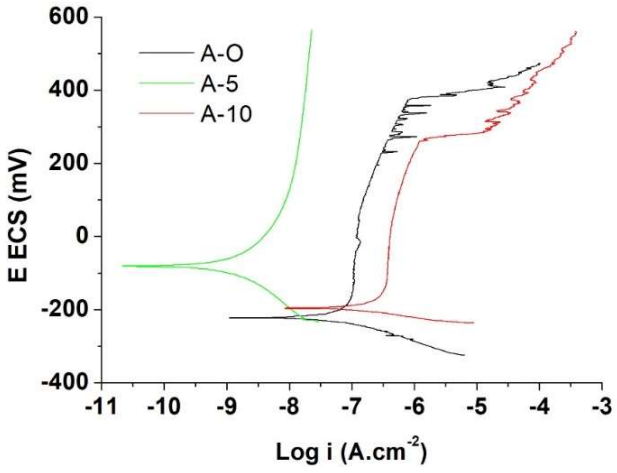
As amostras anodizadas por 5 e por 10 minutos foram avaliadas quanto ao seu comportamento eletroquímico de modo a avaliar seus aspectos mediante a degradação por corrosão. Afim de avaliar variáveis como potencial de corrosão, corrente de corrosão, resistência e impedância, as amostras foram submetidas por monitoramento do Potencial de circuito aberto, obtenção de curvas de polarização e Espectroscopia de impedância eletroquímica.

4.4.1. Polarização potenciodinâmica

Os resultados das curvas de polarização para o aço AISI 316L original, assim como, as amostras anodizadas por 5 e 10 minutos, estão representados na Figura 31.

Na Figura 31 observa-se que, para a polarização anódica, isto é, quando é imposto uma sobretensão que torna o potencial do metal mais nobre, a reação ocorre no sentido da dissolução anódica, evidenciado pelo aumento da densidade de corrente. Da mesma maneira, para a polarização catódica, isto é, se o potencial do metal for tornado menos nobre, têm-se um suprimento de elétrons e a reação procede no sentido de deposição catódica, com a diminuição da densidade de corrente. As densidades de corrente estão representadas em valores absolutos, uma vez que a densidade de corrente na polarização catódica é negativa. Quando o eletrodo está em equilíbrio, isso é, em valores próximos ao seu potencial de circuito aberto, a reação eletroquímica responsável pela formação da dupla camada elétrica, procede tanto no sentido de oxidação como no de redução com a mesma velocidade (densidade de corrente de troca), estabelecendo assim o potencial de equilíbrio de estabilização, conforme pode ser observado na Figura 31. Este potencial é dado, portanto, pela intersecção da curva anódica com a curva catódica, e corresponde ao menor valor de densidade de corrente (log i) (WOLYNEC, 2013).

Figura 31: Representação das curvas de polarização para as amostras de aço AISI 316L original, anodizada por 5 e 10 minutos em solução 10 M NaOH.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As curvas de polarização descreveram o efeito global de todas as reações que ocorrem simultaneamente sobre o eletrodo, demonstrando o comportamento eletroquímico das amostras quanto à resistência à corrosão após submetê-las ao meio corrosivo da solução de SBF com a aplicação crescente de potencial (WOLYNEC, 2013).

As amostras de aço original (A-O) e aço anodizado por 10 minutos (A-10) apresentaram comportamento semelhante de desempenho a corrosão, sendo que a amostra A-10 está ligeiramente deslocada para região mais ativa, portanto com propriedades inferiores anticorrosivas em relação ao aço original. Em ambas amostras também é possível observar, logo após o potencial de corrosão, ocorre uma zona de passivação entre -0,2 V e 0,2 V, seguida de uma breve zona de transpassivação entre 0,2 V e 0,3 V e após ocorre uma zona de ativação acentuada, característica de ruptura de passivação, ou potencial de pite. Após é possível evidenciar o aumento constante de corrente próprio da predominância de evolução de oxigênio (GENTIL, 2012; YOUNG, 1961). Para a amostra A-10 o potencial de pite é observado já em 0,3 V.

Este comportamento da amostra A-10 pode ser relacionado à sua superfície mais porosa, como também foi discutido na análise de ângulo de contato. Em estudo de Berleigh, Schmuki e Virtanen (2009), sobre as propriedades de filmes nanoporosos obtidos por anodização do aço em NaOH 50%, eles observaram em ensaio de polarização em solução tampão de borato, uma relação de aumento da densidade de corrente proporcional ao aumento da espessura do filme anódico. Eles atribuem este fenômeno ao fato do filme consistir de uma rede porosa de canais de magnetita que aparentemente absorvem carga conforme o óxido alterna entre Fe^{2+} e Fe^{3+}.

Observa-se na Figura 31 uma diminuição acentuada da densidade de corrente de corrosão para a amostra A-5. Esta também apresentou comportamento diferente das amostras A-O e A-10 quanto a sua curva sem apresentar zona de transpassivação, ou seja, apresentou somente comportamento passivo durante o ensaio, evidenciando a ação protetiva maior desse filme em relação as outras amostras. Possivelmente este filme permite uma vida mais longa aos implantes, devido a uma menor taxa de dissolução (EL-HADAD; KHALIFA; NOFAL, 2015; HOFMANN; KNOTE; STOEZ, 1989).

Tabela 7: Dados obtidos da extrapolação das curvas de polarização potenciodinâmica.

Amostra	E_{corr} (mV)	I_{corr} ($A.cm^{-2}$)
A-O	-223,1	$2,55x10^{-8}$
A-5	-79,8	$1,02x10^{-9}$
A-10	-195,5	$4,64x10^{-8}$

Fonte: Elaborado pelo autor

A Tabela 6 apresenta os parâmetros obtidos por análise de extrapolação das curvas de Tafel. Os parâmetros de potencial de corrosão (E_{corr}) e densidade de corrente de corrosão (I_{corr}) são os fatores intrínsecos para determinar a capacidade de inibir a degradação por corrosão de uma camada protetiva. Uma camada protetiva apresenta uma melhor resistência à corrosão quando são obtidos valores mais positivos de E_{corr} e valores mais baixos de I_{corr} (BURLEIGH *et al.*, 2007). Estes dados sugerem que a amostra A-5 apresenta uma propriedade de resistência a corrosão superior ao aço original (A-O), todavia a amostra A-10 anodizada por mais tempo não teve a resposta proporcional, apresentando resultado inferior até mesmo ao aço original.

Um dado interessante que deve ser analisado com interesse se trata da aplicação a que se pretende empregar o material. Estudos de aços anodizados em mistura de etileno glicol, fluoreto de amônio e água para aplicações navais (ambiente altamente agressivo devido a presença de íons cloreto) evidenciam que uma camada nanoporosa termicamente tratada apresenta resultado de curva de polarização em potenciais mais nobres que o aço original (SAHA *et al.*, 2019). Os autores atribuem este efeito possivelmente ao mecanismo de impedimento ou atraso da chegada de íons na superfície do metal base proporcionada pela camada barreira compacta de óxido térmico. Ao contrário do que foi evidenciado neste estudo a amostra com maior porosidade apresentou valores menos nobres em relação ao aço original.

É fato relevante que para biomateriais o eletrólito (fluido corpóreo) também contém íons agressivos como cloreto, porém em menor quantidade. Desta forma, pode-se interpretar que se deva trabalhar com um valor ideal de espessura da camada nanoporosa para aplicação em biomateriais. Buscando uma otimização que considere

a proteção à corrosão e simultaneamente apresente aspectos favoráveis à osseointegração (MAHAPATRO, 2015; ZIĘTALA *et al.*, 2016).

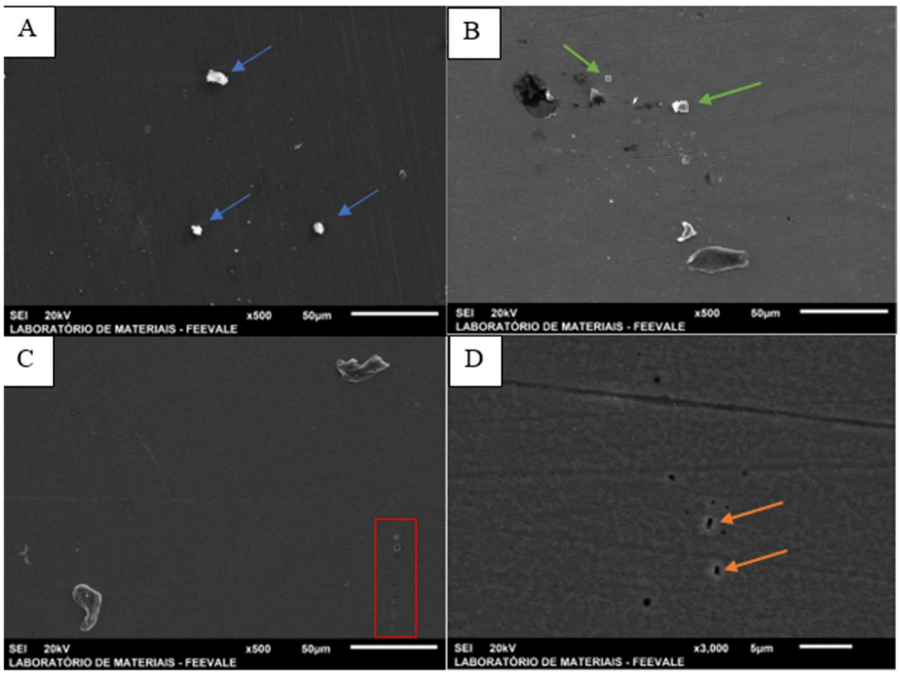
Estes resultados não devem ser tomados como absolutos, por algumas razões que seguem: A taxa de corrosão determinada a partir das curvas de polarização são medidas instantâneas, isso é, servem para avaliar uma corrosão generalizada, nada pode ser afirmado em relação a processos de corrosão dependentes do tempo como corrosão por pites e por frestas. O biomaterial implantado pode apresentar diferença na composição química e processo de fabricação, em relação as amostras que foram avaliadas. Biomateriais quando implantados no corpo humano, poderão estar sujeitos a diferentes tensões, tornando a situação mais crítica quanto à corrosão. Além disso, cada elemento pode ter uma participação menor ou maior na densidade de corrente de corrosão encontrada pela extrapolação das retas de Tafel em função de sua resistência intrínseca à corrosão na solução de SBF que apenas simula o fluído corpóreo, entretanto pode diferir consideravelmente da solução real em situações específicas (BAUER *et al.*, 2013; COELHO; JIMBO, 2014).

4.4.2 Análise morfológica das amostras A-0, A-5 e A-10 após ensaio de polarização potenciodinâmica em SBF, ao MEV.

A Figura 32 ilustra as micrografias obtidas ao MEV para as amostras A-O, A-5 e A-10 após ensaio de polarização potenciodinâmica em solução de SBF.

Por observação macroscópica não foi possível detectar produtos de corrosão em nenhuma amostra. Já nas micrografias apresentadas na Figura 32 nota-se a formação cristais esbranquiçados, possivelmente originados de sais dispersos na superfície em todas as amostras. A Figura 32a está assinalada com setas azuis e na Figura 32b com setas verdes os cristais observados. As amostras A-O e A-5 apresentaram resultados semelhantes. Destaca-se na Figura 32b a formação de cristais de geometria quadrada bem definida, possivelmente trata-se de cristal de cloreto de sódio, pois o eletrólito de SBF possui íons cloreto em sua composição. Este tipo de formação também foi observado em amostras de aço carbono simuladas em ambiente de oxidação a quente na presença de gases H_2S e CO_2 e solução de cloreto de sódio 3,5%. A formação destes cristais pode aumentar o risco de iniciação de pites degradando a camada passiva do aço inoxidável AISI 316L (GONÇALVES *et al.*, 2018; MELLO, 2011).

Figura 32: Micrografia obtidas ao MEV após ensaio de polarização potenciodinâmica em SBF para amostras A-O (A), A-5 (B), A-10 (C) e ênfase aumento amostra A-10 (D).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Figura 32c observa-se também a formação dos cristais superficiais, todavia, chama a atenção a captura de diversas formações puntiformes (destaque no quadro em vermelho). Na Figura 32d foi realizado aumento destas formações, indicando possivelmente ocorrência de pites, o que concorda com a curva de polarização obtida para esta amostra que apresentou uma ruptura de passividade precoce em relação as amostras A-O e A-5. As condições mais propícias para uma boa passivação são aquelas em que a superfície da liga está isenta de qualquer contaminação e o meio de exposição seja oxidante. Porém, caso a camada passiva seja danificada e as condições do meio não permitam a repassivação, as taxas de corrosão podem ser elevadas (HOFMANN; KNOTE; STOEZ, 1989).

4.4.3 Potencial de circuito aberto

O potencial de circuito aberto tem a finalidade de monitorar a variação do potencial em relação ao tempo de imersão permitindo avaliar a homogeneidade do processo de corrosão observado na superfície da amostra. Ele representa o ponto em que o eletrodo deixa de ser cátodo (metal protegido pelo óxido) para se tornar ânodo (já sem óxido) (MELLO, 2011). Esta investigação do potencial de corrosão foi

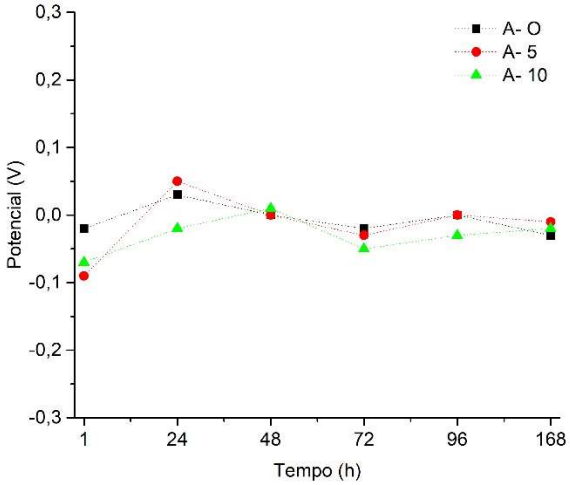
realizada sob imersão das amostras na solução de SBF de forma a simular as condições corpóreas ao longo do tempo.

De forma geral, maiores valores do potencial representam uma melhor passividade da camada anodizada em relação aos processos de corrosão (BOSSARDI, 2007).

A Figura 33 apresenta os resultados dos ensaios de OCP das amostras aço original, aço anodizado 5 minutos e aço anodizado por 10 minutos conforme nomenclatura estabelecida.

As três amostras apresentaram valores próximos durante o monitoramento de OCP, principalmente após o período de 48 horas de imersão. Isto indica que com o passar do tempo a camada anodizada não atua mais de forma influente como barreira física protetiva do substrato metálico, e que os produtos de corrosão formados possuem maior predominância nos eventos de reações eletroquímicas. As amostras anodizadas (A-5 e A-10) assumem caráter similar ao comportamento do aço 316L original (A-O) quanto a atividade eletroquímica. Este fato pode ser tomado como positivo, pois o aço inoxidável AISI 316L é conhecido pela sua boa resistência à corrosão proporcionada pela formação de um filme de óxido passivo aderente, promovendo ao material certa estabilidade frente à ação corrosiva (EL-HADAD; KHALIFA; NOFAL, 2015). Também é conhecido que os aços austeníticos devem sua resistência à corrosão a formação espontânea de uma película protetora superficial de óxido de cromo aderente à superfície do metal, atuando como uma barreira, inibindo o processo de corrosão e mantendo a liberação de íons em níveis muito baixos (GIORDANO *et al.*, 2010). No entanto, o objetivo deste trabalho é obter uma superfície para uso como biomaterial que apresente um equilíbrio positivo quanto a resistência a corrosão e a bioatividade.

Figura 33: Medidas de potencial de circuito aberto para as amostras de aço AISI 316L original, anodizada por 5 e 10 minutos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

É possível observar fenômenos distintos entre as amostras na medição após 1 hora de imersão em SBF. A amostra de aço original apresenta valor de potencial mais elevado, ou seja, menos ativo, em relação as amostras anodizadas, indicando que sua camada passiva natural formada ao ar está atuando de forma satisfatória. O óxido de cromo natural formado no aço AISI 316L é característico da quantidade de cromo presente como elemento de liga. O mecanismo de formação desta camada se baseia na capacidade de migração dos íons de cromo para as regiões ativas de contornos de grão, tendo assim sua oxidação preferencial ao ferro, o que potencializa sua ação protetiva a corrosão (HOFMANN; KNOTE; STOEZ, 1989). As amostras anodizadas, apesar de apresentarem potencial mais baixo (~-0,08V) em relação ao aço original (~-0,02V), está diferença não é muito discrepante, apresentando valores de até 0,05V.

Foi observado potencial mais baixo da amostra A-10 em relação a amostra A-O após 1 hora de imersão. Este resultado era esperado em relação ao que foi discutido na análise de ângulo de contato (Figura 30). Superfícies mais porosas favorecem a permeabilidade do eletrólito através da camada anodizada, e isto por sua vez, contribui para uma menor resistência a corrosão do metal (SAHA *et al.*, 2019). Porém esta relação não é possível para explicar o resultado da amostra A-5, que

apesar de apresentar menor potencial que o aço original após 1 hora de imersão, apresentou menor hidrofilia que o aço original no ensaio de ângulo de contato.

Uma possibilidade que poderia ter relação com o menor potencial das amostras anodizadas após 1 hora de imersão pode estar relacionado a superfície altamente ativa, rica em radicais livres hidroxila presentes na superfície. Isto é proposto no mecanismo de formação de filme passivo (MARCUS; MAURICE, 2000), estes radicais livres (Figura 28) podem favorecer as reações com os íons da solução de SBF no momento inicial de formação da dupla camada elétrica.

Após período de imersão de 24 horas observa-se uma mudança de condição da amostra A-5, apresentando potencial mais nobre que o próprio aço AISI 316L original. Isto indica que a camada anodizada obtida nesta amostra tem características de proteção superior ao aço original (A-O). Assim como observado no estudo de Burleigh et. al. (2007) aços anodizados por menos tempo geraram camadas de óxido mais finas e aderentes devido à maior presença de cromo. Da mesma forma estas camadas mais aderentes também apresentaram resultados mais satisfatórios nos ensaios de resistência à corrosão. Os autores observaram através de análises de DRX que o cátion presente no eletrólito (sódio ou potássio) estava presente na camada anodizada, cogitando assim a formação de óxidos de cromo sódio, além dos óxidos de cromo ferro e óxidos de ferro esperados. A presença deste tipo de óxido de cromo-sódio estável além do óxido de cromo natural protetivo apresentou bons resultados de resistência a corrosão em estudos com uso de SBF e água salina (BURLEIGH *et al.*, 2007; CONRRADO, 2003; LIN *et al.*, 2002).

A amostra A-10 ainda apresenta resultado de potencial inferior as outras em 24 horas de imersão, indicando propriedades inferiores de resistência à corrosão. Isto vem de acordo com os resultados de ângulo de contato, polarização. Provavelmente este comportamento está ligado ao fato desta camada anodizada, apesar de possuir espessura maior, ser formada por muitos óxidos de ferro de baixa aderência como maghemita (γ-Fe_2O_3) e hematita (α- Fe_2O_3) em detrimento de ser constituída preferencialmente por magnetita (cúbica-Fe_3O_4) que é mais aderente com uma maior capacidade de resistência à corrosão (BURLEIGH *et al.*, 2007).

4.4.5 Espectroscopia de impedância eletroquímica

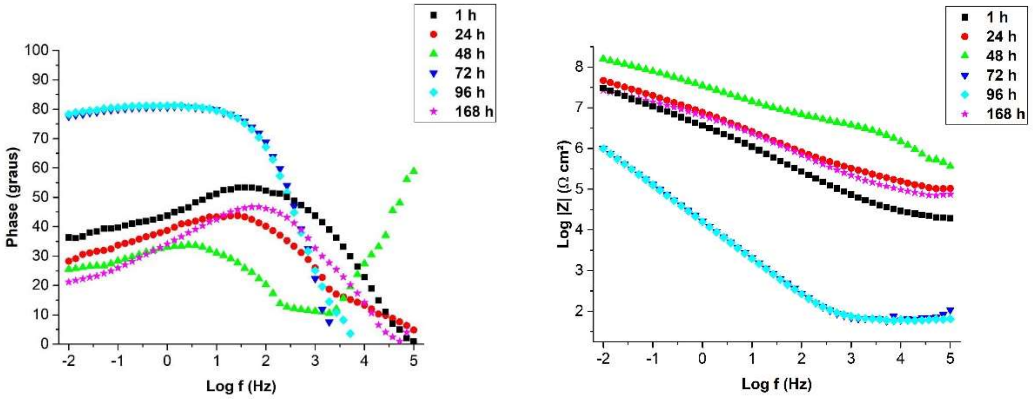
Pelo método da EIE é possível analisar as reações e taxas de corrosão em meios de baixa condutividade e, além disso, determinar a resistência de polarização e a capacitância da dupla camada em uma mesma medida (WOLYNEC, 2013). Estas informações são muito interessantes na eletroquímica aplicada para o estudo do comportamento geral de um sistema quando grande número de processos correlacionados como de difusão ou transferência de carga ocorre em diferentes velocidades (PACHECO, 2007).

Nos diagramas de Bode, a primeira representação leva em consideração o logarítmico da frequência (log f) pelo ângulo de fase (θ), que determina a resistência da amostra com o aumento da frequência, isto é, o meio vai se tornando cada vez mais resistivo. A segunda representação analisa os valores de impedância (log IZI) em função de log f e se pode dizer que quanto maior os valores de log IZI em função do aumento do log f mais protetivo é o filme no intervalo de tempo que está em imersão. Enquanto que menor é a resistência do filme quanto menor for a frequência necessária para a mudança de região, neste ponto se determina a queda do potencial com o aumento da corrente (RIBEIRO; SOUZA; ABRANTES, 2015).

A Figura 34 apresenta os resultados obtidos pelo ensaio de impedância eletroquímica da amostra de aço original polido (A-O), realizado por um período de 168 horas de imersão na solução de SBF nas duas representações do diagrama de Bode.

A amostra de aço original apresentou as características de passividade conhecidas do aço inox 316L atribuídas a camada natural de óxido de cromo aderente de espessura muito fina. Na varredura após 1 hora de imersão na solução de SBF, nota-se o comportamento usual de metais passiváveis. Em alta frequência está predominante a resistência da solução evidenciada pelo ângulo de fase praticamente nulo, este comportamento puramente resistivo pode ser atribuído à resistência ôhmica da solução de SBF (BROOKS; BROOKS; EHRENSBERGER, 2017). O sistema apresenta uma constante de alta para média frequência em valores próximos a 50°, indicando uma certa permeabilidade pela camada de óxido. Em baixa frequência ocorre uma redução do ângulo de fase para valores em torno de 38° indicando a ocorrência de processos corrosivos no substrato do metal. Este comportamento já em 1 hora de imersão pode ser relacionado a presença de íons cloreto na solução de SBF que são muito danosos ao aço e responsáveis pela elevação da taxa de corrosão do material (SAHA *et al.*, 2019).

Figura 34: Gráficos de EIE de Bode (a) ângulo de fase e (b) módulo de impedância para amostra de aço original (A-O).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após 24 horas de imersão nota-se comportamento similar da curva na varredura de 1 hora. Porém, com um leve deslocamento para ângulo de fase mais baixo (em torno de 30°) em baixa frequência. Este fato indica que houve formação de produtos de corrosão mais resistivos na interface óxido/metal e maior predominância de reações governadas por transferência de massa em detrimento da transferência de cargas.

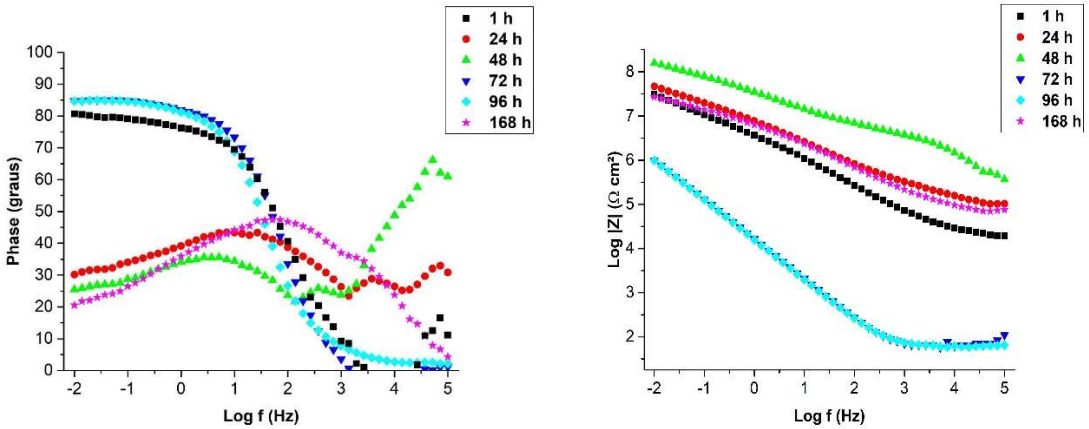
Em 48 horas de imersão ocorre uma mudança significativa na curva de varredura, possivelmente atribuída a formação dos produtos de corrosão de natureza resistiva e a habilidade de regeneração da camada passiva de óxido de cromo dos aços inoxidáveis (PADILHA; GUEDES, 1994). Em baixa frequência o comportamento resistivo permanece estável em valores de 25° a 30°. Em média para alta frequência surge uma constante de caráter resistivo indicando uma espécie de bloqueio da camada passiva para transferência de cargas e predominância de transferência de massa, deslocando a transferência de cargas para a interface óxido/eletrólito. Este comportamento é favorável a proteção corrosiva do metal e justifica o módulo de impedância (Figura 34) maior quando comparado aos resultados de 1 e 24 horas. Comportamento similar é obtido em sistemas revestidos que denotam proteção superior à corrosão em relação a proteção temporária promovida por óxidos (RIBEIRO; SOUZA; ABRANTES, 2015).

Todavia, após 72 horas de imersão ocorre nova alteração do perfil do sistema protetivo do substrato metálico, relacionado ao provável limite de permeabilidade através dos produtos de corrosão e que protegem temporiamente. É observado um comportamento altamente capacitivo em baixa e média frequência, com ângulo de fase em torno de 80° denotando permeação da camada passiva e formação de produtos de corrosão na interface metal/óxido. No gráfico Log|Z|, observa-se uma queda acentuada na resistividade total do sistema em relação as varreduras anteriores, indicando aumento da transferência de cargas em baixa e média frequências. Esta instabilidade da proteção da camada de óxido passivo natural do aço inox também foi observada nos estudos de Giordano et. al. (2010), os autores atribuem este comportamento a característica particular dos aços inox austeníticos apresentarem corrosão por pite e possuírem a capacidade de repassivação dos mesmos, conforme foi observado em micrografias por MEV do estudo. O comportamento da curva de polarização corrobora com o surgimento de corrosão por pite na amostra A-O, pelo súbito aumento da densidade de corrente na curva anódica. Em 96 horas de imersão ainda é observado o mesmo comportamento sem alteração notável.

Em um último momento a amostra foi deixada em imersão por um período de 168 horas. Nesta varredura foi observada a retomada do comportamento similar apresentado em 1 e 24 horas de imersão. Este resultado era esperado por se tratar de aço inoxidável, claramente ocorreu a regeneração da camada passiva, confirmando as excelentes propriedades anticorrosivas do aço AISI 316L (MELLO, 2011). Mas é importante notar que o ângulo de fase em baixa frequência resultou em um valor mais baixo, em torno de 20°, indicando que a nova camada da interface metal/oxido é diferente da inicial de 1 hora. É provável que houve incorporação dos produtos de corrosão nas interfaces do metal e óxido alterando o comportamento em relação a camada passiva original (CONRRADO, 2003).

A Figura 35 apresenta os resultados obtidos pelo ensaio de impedância eletroquímica da amostra de aço anodizada por 5 minutos em eletrólito 10M NaOH (A-5), realizado por um período de 168 horas de imersão na solução de SBF nas duas representações do diagrama de Bode.

Figura 35: Gráficos de EIE de Bode (a) ângulo de fase e (b) módulo de impedância para amostra de aço anodizada por 5 minutos em eletrólito de 10M NaOH (A-5).



Fonte: Elaborado pelo autor.

A amostra anodizada A-5 apresentou de modo geral, comportamento semelhante ao aço original (A-O) principalmente a partir de 24 horas de imersão em SBF. Houve uma diferença notável na varredura após 1 hora de imersão, ou seja, logo no começo da análise. Em baixa frequência a amostra apresentou ângulo de fase em torno de 80°, permanecendo neste comportamento capacitivo na passagem de baixa para média frequência, denotando permeabilidade do eletrólito. Isto revela de fato a presença de uma camada de óxido com características diferentes da camada de óxido natural presente no aço original. Este fato corrobora com o resultado obtido na análise de OCP, que apresentou potencial inicial inferior ao aço original. Por sua vez, no ensaio de ângulo de contato, a amostra A-5 apresentou hidrofilia superior ao aço original, que pode sugerir que está não possui porosidade que justifique este comportamento de permeabilidade de eletrólito tão acentuada em 1 hora de imersão.

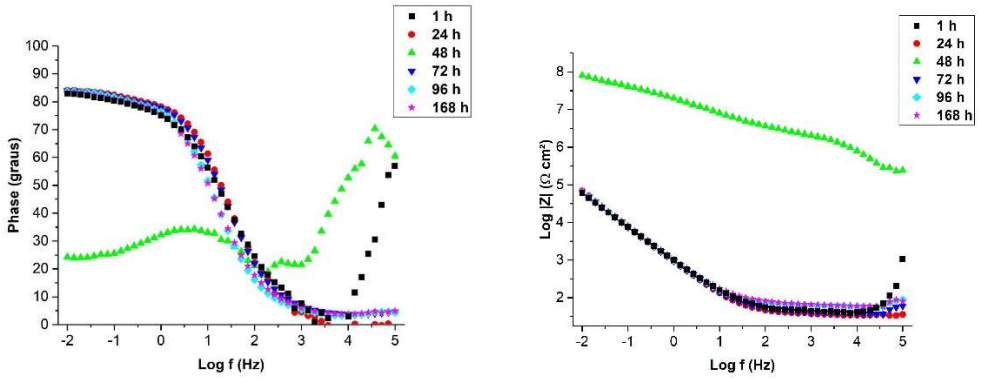
Esta atividade intensa no período inicial na interface metal/óxido possivelmente é atribuída a superfície anodizada que passa a apresentar uma quantidade alta de hidroxilas livres pela característica do eletrólito utilizado na anodização (MARCUS; MAURICE, 2000). Estes radicais hidroxila atraem os íons da solução de SBF, deixando a camada de óxido mais permeável. A camada de óxido obtida na amostra A-5 possui uma constituição com maior presença de cromo e sódio. A presença do sódio na camada de óxido pode ser correlacionada com estudos de adição de prata em filmes protetivos a base de zircônia sobre aço 304L. Foi observado neste estudo que a incorporação de Ag diminui a resistência a corrosão devido ao aumento da

atividade eletroquímica do filme cerâmico, propicia a incidência do aumento de sítios ativos na camada protetiva e aumento dos caminhos de permeação da solução eletrolítica devido ao aumento dos contornos de grãos (CALDERON VELASCO *et al.*, 2014).

Após 24 horas de imersão em SBF, a amostra A-5 já apresentou comportamento análogo a amostra de aço original. Isto pode ser atribuído a resistência agora adicionada dos produtos de corrosão formados na interface metal/óxido. Observa-se de forma diferente da amostra A-O, eventos acoplados em alta frequência indicando a presença de uma atividade levemente capacitiva na interface óxido/eletrólito, ou seja, alguma alteração desta região talvez atribuída a formação de compostos de natureza cerâmica, como hidroxiapatita, pela reação dos radicais livres hidroxila com íons da solução de SBF. Lin et. al. (2002) observou uma maior deposição de hidroxiapatita em aço AISI 316L com pré tratamento alcalino.

A Figura 36 apresenta os resultados obtidos pelo ensaio de impedância eletroquímica da amostra de aço anodizada por 10 minutos em eletrólito 10M NaOH (A-10), realizado por um período de 168 horas de imersão na solução de SBF nas duas representações do diagrama de Bode.

Figura 36: Gráficos de EIE de Bode (a) ângulo de fase e (b) módulo de impedância para amostra de aço anodizada por 10 minutos em eletrólito de 10M NaOH (A-10).



Fonte: Elaborado pelo autor.

A amostra A-10 apresentou um comportamento claramente diferente em relação as amostras A-O e A-5. É possível observar já na varredura após 1 hora de imersão um comportamento altamente capacitivo em baixa frequência com ângulo de fase em torno de 83°. Este comportamento também foi observado na amostra A-5, porém na varredura após 24 horas de imersão a amostra A-5 já apresenta comportamento similar a amostra A-O, enquanto que na amostra A-10 se repete o comportamento inicial. Isso informa que ainda estão ocorrendo reações de formação de produtos de corrosão na interface do metal/óxido. Este fenômeno vem de encontro ao comportamento do tipo de óxido formado nesta amostra: óxidos de ferro como hematita e maghemita, de baixa aderência, que propiciam uma maior permeabilidade da camada anodizada (BURLEIGH *et al.*, 2007). Esta maior permeabilidade do eletrólito também corrobora com a análise de ângulo de contato, sugerindo uma superfície mais porosa e composta por óxidos de baixa aderência. São observados eventos de permeabilidade através da camada anodizada em regiões de média frequência. Esta maior atividade da superfície no momento inicial corrobora com os resultados obtidos para a amostra A-10 quanto ao potencial de circuito aberto.

. Observando os gráficos de log|Z| pode-se chegar a conclusão que esta amostra mesmo apresentando comportamento similar a amostra A-5, possui uma resistência a corrosão inferior, pois a impedância total é razoavelmente inferior aos valores apresentados pelas amostras A-O e A-5.

Na varredura após 48 horas de imersão, analogamente as outras amostras, nota-se o comportamento protetivo proveniente da atuação predominante dos produtos de corrosão formados. Observa-se intenso aumento da impedância total do sistema e os fenômenos de baixa frequência passam a apresentar predominância do caráter resistivo observado pelo ângulo de fase em valor aproximado de 25°. Também conforme a amostra A-5, esta apresenta agora uma constante em média para alta frequência, indicando a formação de algum produto barreira que induz comportamento capacitivo na interface óxido/eletrólito. A formação de produtos de corrosão com capacidade provisória de proteção corrosiva é muito comum em ligas de aço e alumínio, como ainda há uma certa quantidade de íons metálicos responsáveis pela formação de óxido disponíveis, estes preferencialmente são responsáveis pelo comportamento de aumento da impedância total do sistema, principalmente pela resistência imposta à permeação de eletrólito com o passar do tempo (CAO *et al.*, 2017).

Conforme observado em todas as amostras, este limite protetivo atinge uma saturação a partir de 72 horas de imersão no SBF. O mesmo comportamento ocorre com retorno de constante em baixa frequência de comportamento altamente capacitiva, mas observa-se ao contrário das amostras A-O e A-5, novamente impedância total inferior, nos mesmos valores obtidos em 1 e 24 horas de imersão.

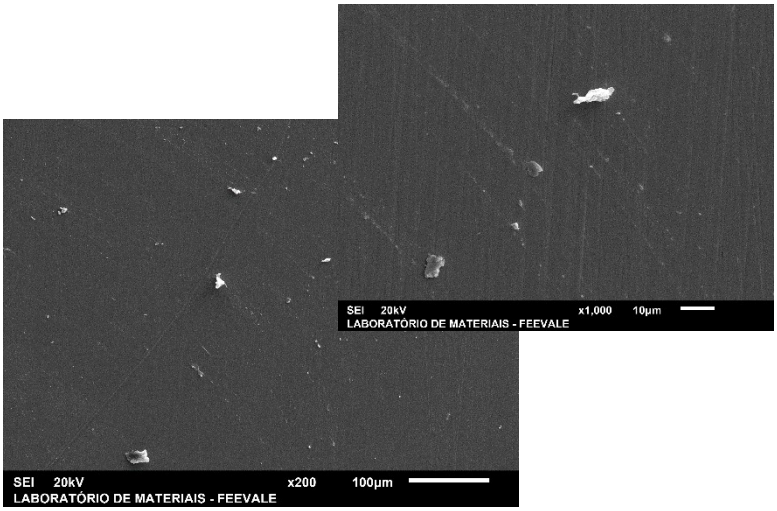
Ao contrário do observado nas outras amostras, a amostra A-10 não conseguiu recuperar o comportamento inicial após a varredura de 168 horas de imersão. Ela manteve o comportamento observado a partir de 72 horas de imersão, isto pode ser relacionado ao tipo de produto de corrosão formado, de baixa aderência e maior permeabilidade. A permeabilidade excessiva da camada anodizada neste caso mostrou-se negativa do ponto de vista de resistência a corrosão, denotando a necessidade de alguma barreira de forma a desacelerar o processo de permeação. A importância da presença de uma camada barreira no revestimento do metal foi observada no estudo de Saha et. al. (2019) ao avaliar aço AISI 304 original, anodizado e anodizado e termicamente tratado. Os autores evidenciaram uma performance de resistência a corrosão superior do aço anodizado termicamente tratado pois desta forma foi obtida uma camada barreira compacta de óxido térmico no interior da camada porosa anodizada. Esta camada de óxido térmico é responsável pela diminuição significativa da taxa de corrosão evidenciada pelos valores de resistência de polarização. O aço apenas anodizado apresentou resultado inferior ao original, fato que os autores relacionam a porosidade da camada de óxido que favorece a permeabilidade do eletrólito comparativamente ao óxido protetivo formado ao ar presente no aço original.

Este resultado da amostra A-10 ratifica a maior densidade de corrente de corrosão encontrado nas curvas de polarização (Figura 31), imprimindo uma menor resistência a corrosão desta amostra. Em biomateriais este aspecto pode ocasionar problemas de inflamação no corpo humano causada por cirurgia ou lesão, uma vez que esse cenário acarreta na queda do pH do fluído corpóreo em regiões próximas ao implante, devido à secreção das células inflamatórias (CHEN; THOUAS, 2015).

4.4.6 MEV/EDS após EIE

A Figura 37 apresenta as micrografias obtidas ao MEV para a mostra de aço original polida (A-O) após ensaio de espectrografia de impedância eletroquímica (EIE) por 168 horas de imersão na solução de SBF.

Figura 37: **Micrografias obtidas ao MEV após EIE para amostra A-O.**

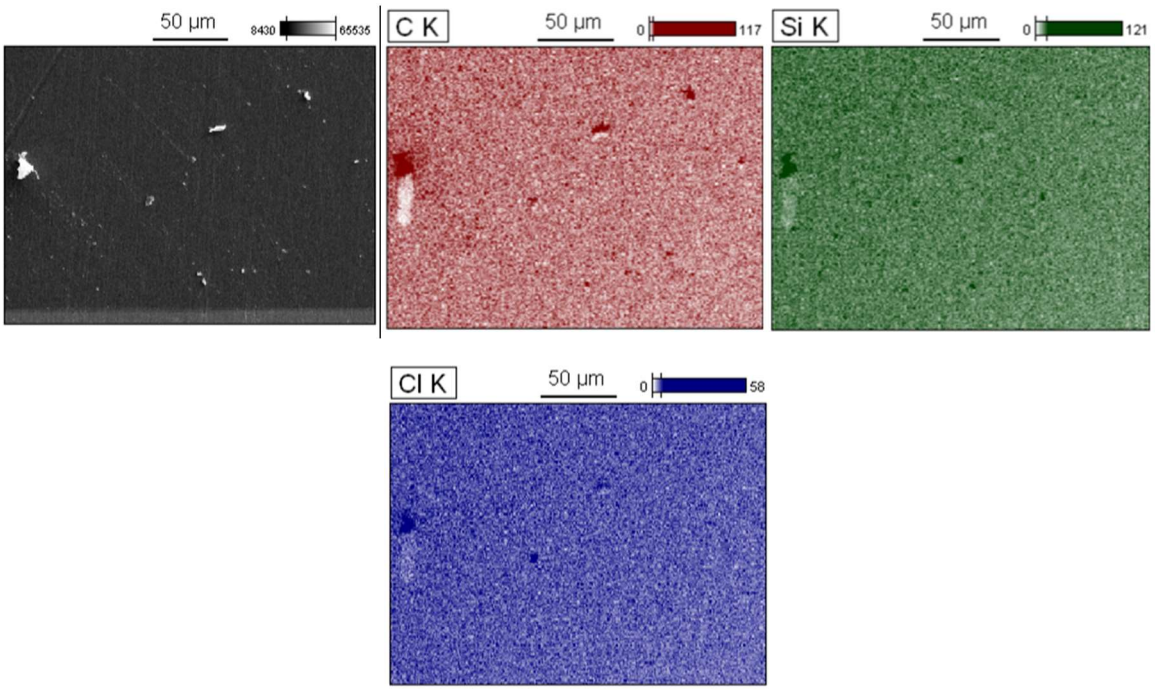


Fonte: Elaborado pelo autor

Não foi possível detectar a presença de produtos de corrosão visualmente após EIE nos substratos metálicos avaliados nem alterações das superfícies dos 3 sistemas analisados. Nas imagens de MEV obtidas da área em contato com o eletrólito, observa-se o aparecimento de cristais, de cor esbranquiçada, possivelmente devido a produtos de corrosão, como óxidos dispersos na superfície. A Figura 38 ilustra a varredura por EDS com a finalidade de investigar a composição dos cristais observados na superfície, na imagem encontram-se os mapeamentos obtidos dos átomos com maior intensidade nos pontos de interesse. Observa-se que estes cristais são principalmente compostos por átomos de carbono, silício e cloro, denotando a interação dos íons de sais presentes no eletrólito de SBF, em especial ao cloreto que atua de forma mais aguda nos processos corrosivos (BAUER *et al.*, 2013). A presença de silício, elemento que não está presente na formulação do eletrólito de SBF, pode estar associada ao processo de preparação da amostra por lixamento em lixa de carbeto de silício.

A baixa incidência de produtos de corrosão observados era esperada pois após 168 horas de imersão a amostra apresenta um ângulo de fase de ~20° em baixa frequência.

Figura 38: Mapeamento por EDS após EIE para amostra A-O.



Fonte: Elaborado pelo autor

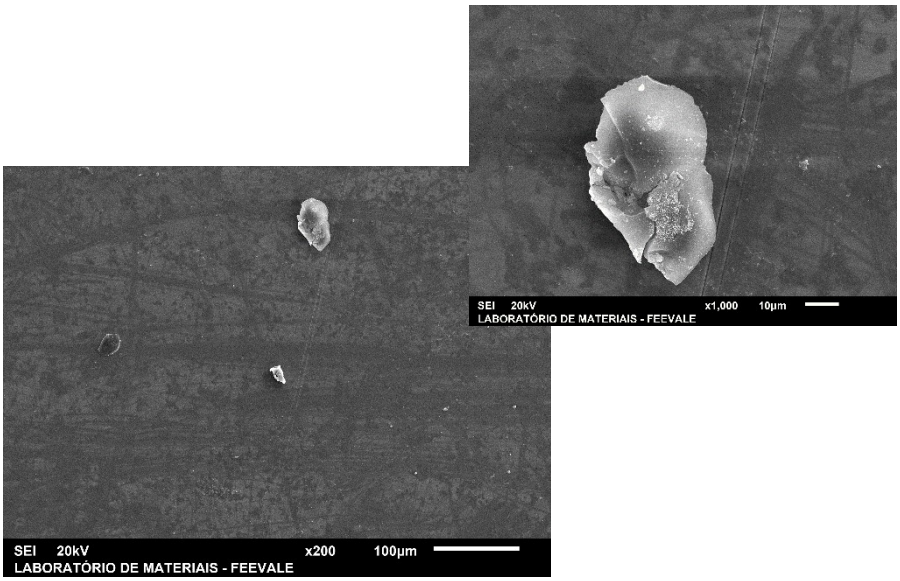
A formação destes cristais por consequência do tipo de eletrólito utilizado, pode ser responsável por futuras heterogeneidades responsáveis pelo início de processos corrosivos danosos.

A Figura 39 apresenta as micrografias obtidas ao MEV para a mostra de aço anodizada por 5 minutos em solução 10M NaOH (A-5) após ensaio de espectrografia de impedância eletroquímica (EIE) por 168 horas de imersão na solução de SBF.

De forma similar com a amostra A-O, a amostra A-5 também apresentou aparecimento de cristais, de cor esbranquiçada, possivelmente devido a produtos de corrosão, como óxidos dispersos na superfície. Isto era esperado em função dos resultados de EIE com comportamento semelhante das amostras A-O e A-5. Observa-se uma alteração na análise de EDS em relação a amostra A-O, onde agora se encontra a presença mais acentuada de silício, sódio e oxigênio, além dos átomos observados na amostra A-O, tanto na composição dos cristais como na superfície. Isto se relaciona a camada anodizada da superfície, pela característica da anodização

em solução de NaOH e a formação de óxido provocada pelo crescimento da camada passiva, a interação do íon de sódio nas reações é evidenciada por sua presença no filme anódico (BURLEIGH *et al.*, 2007).

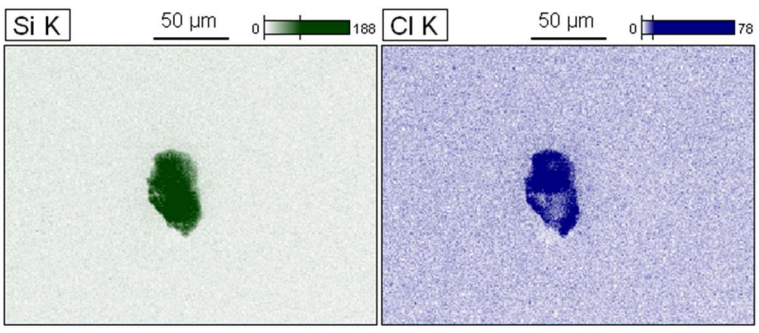
Figura 39: Micrografias obtidas ao MEV após EIE para amostra A-5.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 40 apresenta o mapeamento por EDS de um cristal observado indicando como maiores constituintes silício e cloro.

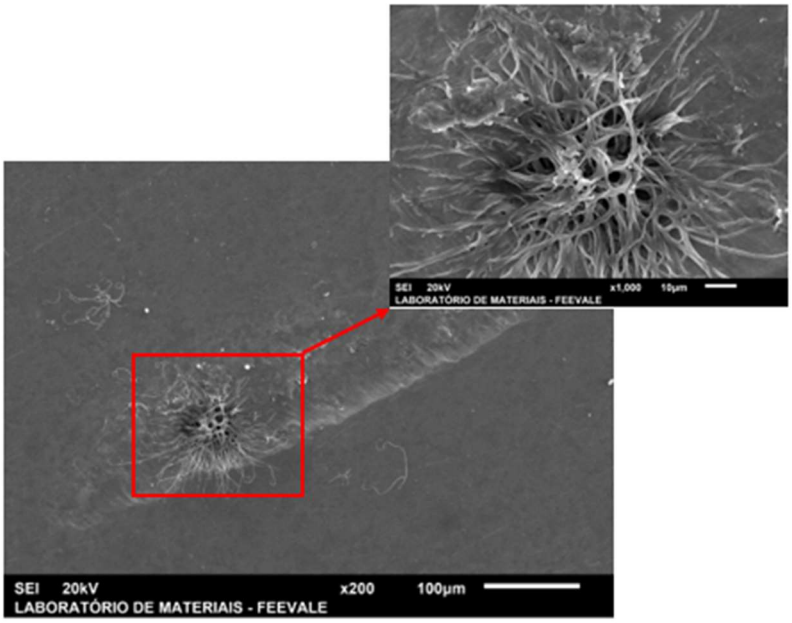
Figura 40: Mapeamento por EDS após EIE para amostra A-5.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 41 apresenta as micrografias obtidas ao MEV para a mostra de aço anodizada por 10 minutos em solução 10M NaOH (A-10) após ensaio de espectrografia de impedância eletroquímica (EIE) por 168 horas de imersão na solução de SBF.

Figura 41: Micrografias obtidas ao MEV após EIE para amostra A-10.



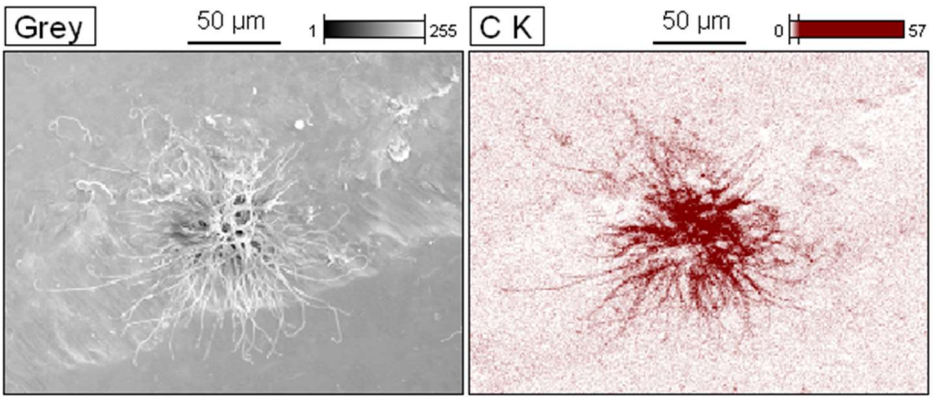
Fonte: Elaborado pelo autor.

A amostra A-10 macroscopicamente não apresentou produtos de corrosão visíveis, porém na micrografia ao MEV (Figura 41) foram observadas formações filiformes de aspecto ramificado. O aparecimento destes produtos de corrosão condiz com os resultados obtidos nos ensaios de polarização potenciodinâmica e de EIE, onde a amostra A-10 apresentou rendimento inferior quanto a resistência a corrosão em comparação as amostras A-O e A-5.

Conforme verificado nas curvas de Bode (fase) para a amostra A-10, após 168 horas de imersão em SBF a mesma apresenta fenômeno em baixa frequência com ângulo próximo a 90° associado a permeabilidade do eletrólito através da camada anodizada.

A Figura 42 apresenta o mapeamento por EDS da formação filiforme observada na amostra A-10.

Figura 42: Mapeamento por EDS após EIE para amostra A-10



Fonte: Elaborado pelo autor.

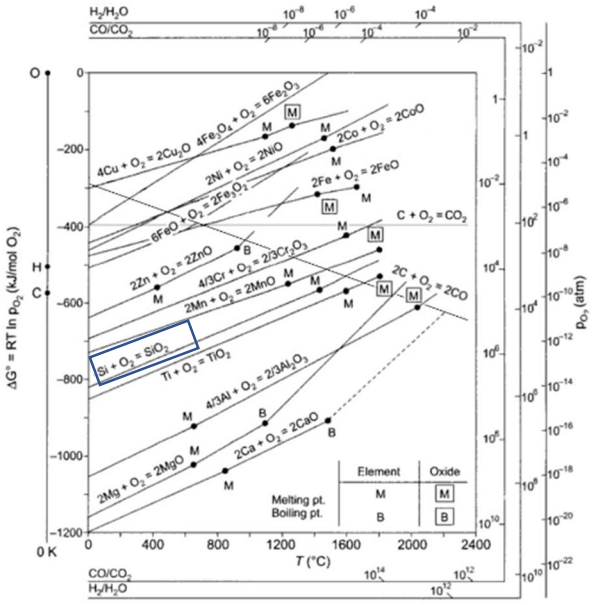
Como resultado, o principal elemento constituinte da afloração é carbono. Este tipo de produto de corrosão não é muito comum em aços devido ao baixo teor de carbono. Produtos grafíticos são normalmente presentes em um tipo de corrosão seletiva denominada grafitização filiforme, recorrente em ferros fundidos cinzentos. A causa mais comum se dá por uma heterogeneidade qualquer inicial, provocando a oxidação do ferro e o grafite (carbono) permanece inalterado, formando assim uma pilha Fe/Grafite, na qual o grafite se comporta como catodo em relação a matriz metálica (COLPAERT, 2008; CONRRADO, 2003; GENTIL, 2012).

O surgimento deste tipo de produto de corrosão, pelo mecanismo descrito para o ferro fundido cinzento pode ser possível pelo fato da amostra A-10 ter apresentado maior porosidade e hidrofilia no ensaio de ângulo de contato e pela análise de cor, possivelmente a camada anodizada possui maior constituição de óxidos de ferro menos aderentes. Esta alta quantidade de óxidos de ferro permitiu a formação de micronúcleos de carbono em estado livre sobre a superfície iniciando o crescimento em forma de ramos contínuos, conforme evidenciado nas micrografias da amostra A-10. Também deve se considerar a presença de carbonatos no eletrólito de SBF, que podem ter uma interação quando em forma dissociada contribuindo nas aflorações de carbono observadas (BROOKS; BROOKS; EHRENSBERGER, 2017).

A presença de maior quantidade de silício na amostra A-5 em comparação a amostra A-O pode ser explicada pela maior tendência à formação de óxidos que apresentam variação de energia livre de Gibbs mais negativa. A Figura 43 apresenta o Diagrama de Ellingham para formação de óxidos. Observa-se que o silício é oxidado preferencialmente ao cromo e ao ferro devido ao fato da energia livre de Gibbs de

formação do dióxido de silício (SiO_2) ser mais negativa que as energias livres de Gibbs de formação do óxido de cromo (Cr_2O_3) e dos óxidos de ferro (Fe_2O_3, Fe_3O_4 e FeO) (VICENTE *et al.*, 2017).

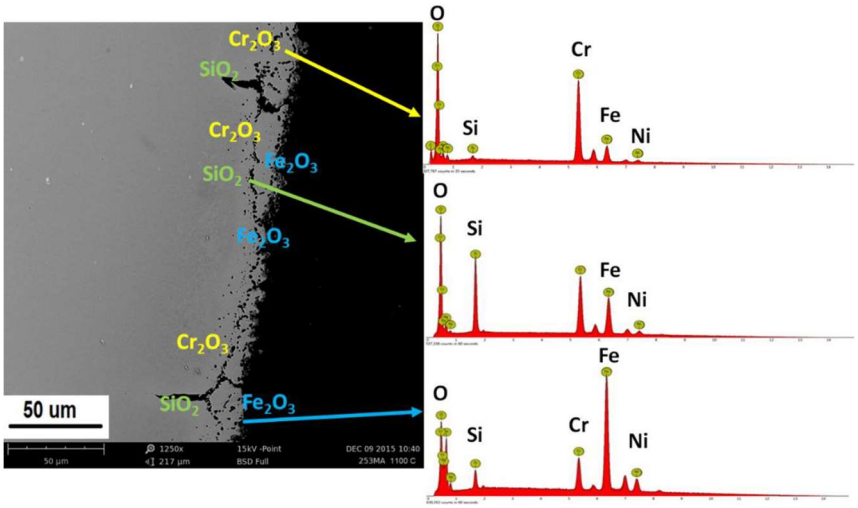
Figura 43: Diagrama de Ellingham de formação de óxidos.



Fonte: Adaptado de Biswas (1981).

No estudo de Vicente et. al. (2017) foi realizada a análise por EDS e a caracterização dos óxidos formados na superfície do corpo de prova do aço inoxidável austenítico laminado (tipo 253 MA®) após ensaios isotérmicos de oxidação ao ar a 1100°C. Os autores observaram em difratograma picos bem definidos de austenita e a presença dos óxidos protetivos SiO_2 e Cr_2O_3 bem como dos óxidos de ferro FeO, Fe_3O_4 e Fe_2O_3. Conforme a Figura 44 mostra que, durante o processo de oxidação ocorre a formação de uma camada de óxido não protetora de óxidos de ferro e posterior formação de uma camada protetora mais espessa de óxido de cromo. Mais internamente observa-se a formação de óxido de silício.

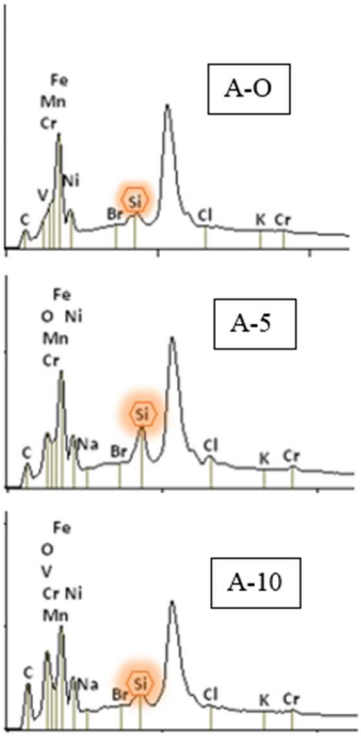
Figura 44: Micrografia por MEV (seção transversal) e difratogramas evidenciado a presença de óxido de silício em região mais interna de camada de óxidos.



Fonte: Vicente et. al. (2017)

A Figura 45 apresenta o resultado de EDS para as amostras A-O, A-5 e A-10, destacando os valores de silício obtidos. Como a diferença entre as amostras A-5 e A-10 é somente o tempo de anodização, é possível traçar uma analogia com o diagrama de Ellingham de formação de óxidos. Na amostra A-O ocorre apenas a camada de óxido passiva natural, no processo de anodização ocorre a aplicação de uma energia que desloca o equilíbrio termodinâmico na direção da formação de óxidos, assim como ocorre com a temperatura responsável pela oxidação no estudo de Vicente et. al. (2017). Quando o processo é encerrado com 5 minutos observa-se uma maior quantidade de silício presente na análise de EDS, conforme Figura 45, indicando que neste momento ainda não há uma presença considerável de óxidos de cromo e principalmente de ferro. À medida que o processo segue a diante e mais energia é aplicada, o que se traduz na amostra A-10 já é observado uma depleção da quantidade de silício e maior presença de ferro. De forma análoga, a camada mais externa obtida por Vicente et. al. (2017) formada por óxidos de ferro menos aderentes e protetivos, também foram obtidos com o tempo de anodização de 10 minutos neste estudo.

Figura 45: Varreduras obtidas por análise de EDS após EIE.



Fonte: Elaborado pelo autor.

De forma geral, a amostra A-5 apresentou os resultados mais satisfatórios, ficando muito próxima do comportamento do aço inoxidável original AISI 316L, que por si só já é um material com excelentes propriedades de resistência a corrosão. A amostra A-5 apresentou um resultado melhor no ensaio de polarização potenciodinâmica, porém no ensaio de EIE seu rendimento ficou levemente inferior ao aço original (A-O) quanto a capacidade de regeneração da camada passiva.

Avaliar biomateriais quanto ao comportamento em meio corrosivo é fundamental, pois após a implantação de um dispositivo ortopédico, uma reação inflamatória é iniciada tanto em resposta a invasão devido ao procedimento, quanto a presença do dispositivo como um corpo estranho ao organismo. Essa reação resulta na produção de espécies reativas de oxigênio por macrófagos, neutrófilos e outras células devido a resposta infamatória. Observa-se um aumento local da concentração de peróxido de hidrogênio, os neutrófilos produzem ácido lático levando a um aumento do pH ácido na interface entre o meio em que o biomaterial está inserido (ANDERSON; LAMICHHANE; MANI, 2016).

4.5 ANÁLISE DA TOPOGRAFIA SUPERFICIAL POR MEV-FEG

A Figura 46 apresenta as micrografias obtidas ao MEV-FEG em vista de topo para as amostras A-O, A-5 e A-10 nas magnitudes de 10 000, 20 000 e 100 000 vezes.

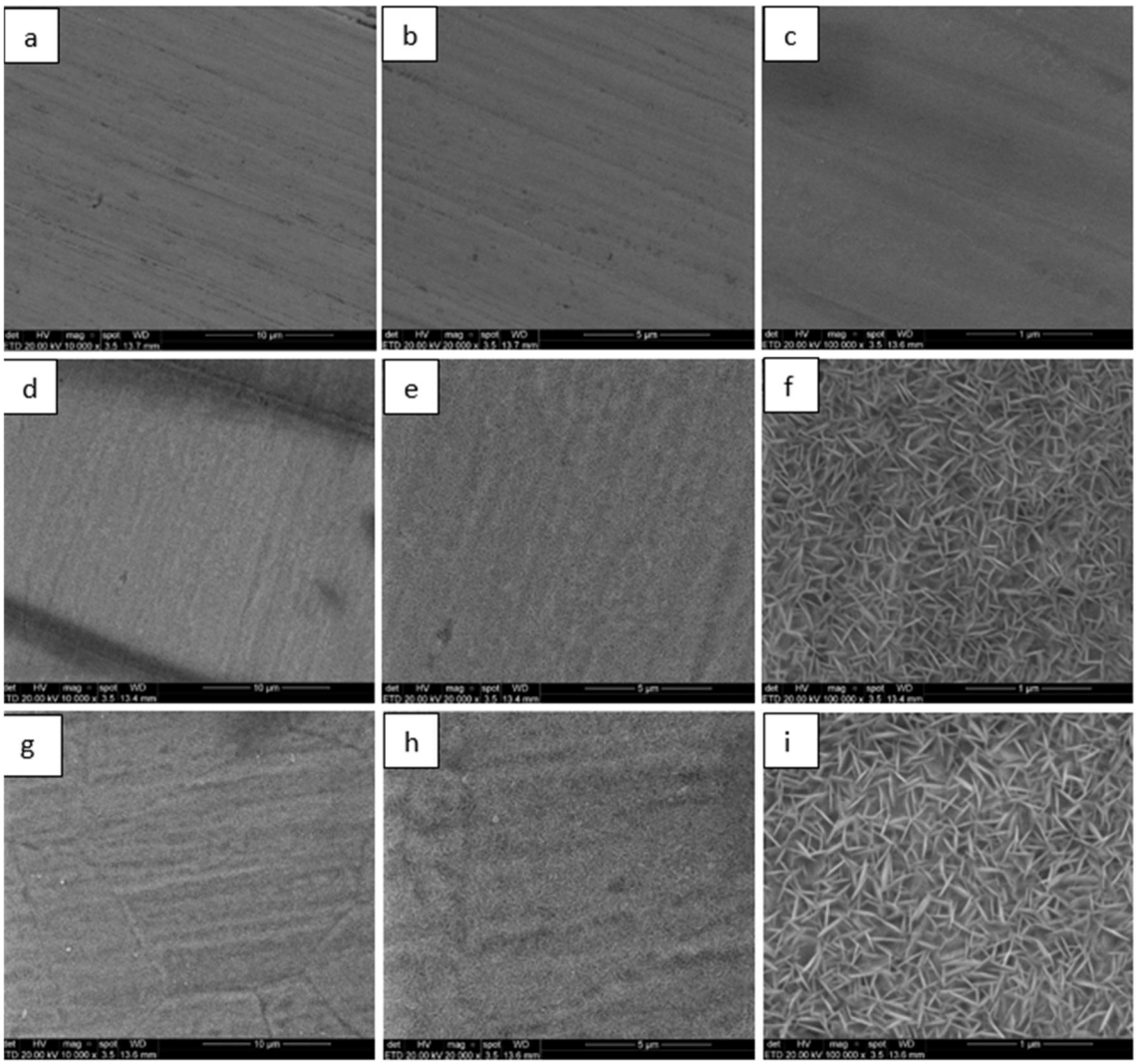
Observa-se nas micrografias da Figura 46 (a,b,c) que se referem ao aço AISI 316L original (A-O) apenas polido que não há presença de nenhuma estrutura específica, somente riscos alongados compatíveis com o processo de lixamento, considerando a magnificação das imagens, ao qual a chapa de origem das amostras foi submetida. Estas imagens indicam que a superfície do aço é uniforme e homogênea. As micrografias concordam com os resultados obtidos para o aço AISI 316L sem tratamentos por Saha et. al. (2019) e Longhi (2021). A literatura indica que existe uma formação de fina camada de óxido passivo natural da ordem de 1 a 3 nm de espessura, devido a este valor muito baixo de espessura é difícil identificar qualquer estrutura com os recursos de equipamento aqui utilizado (SAHA *et al.*, 2019).

Na Figura 46d, observam-se também riscos na superfície da amostra, oriundos do lixamento, o que indica que o óxido formado apresenta espessura bastante fina. Nas Figuras 46 (e,f) é possível observar a formação de estruturas com arranjo de nanoplacas com ângulos bem definidos. Porém como se esperava não ocorreu formação de poros com aberturas circunferenciais de acordo com o resultado obtido por Burleigh et. al. (2009) utilizando eletrólito de 12,5 M de NaOH e substrato de aço de composição com baixo teor de cromo. Estas diferenças em relação ao estudo realizado aqui podem explicar a morfologia diferenciada obtida nas amostras A-5 e A-10.

De acordo com o observado na amostra A-5, a amostra A-10 (Figura 46- g,h,i) apresentou comportamento similar, destacando-se uma sutil diferença no comprimento das nanoplacas resultantes, indicando um comprimento maior com maior tempo de anodização.

Nas micrografias da Figura 46 (d, g h) observa-se que o crescimento das nanoplacas ocorre de forma perpendicular a superfície dos contornos de grãos. Isto leva ao indício que o mecanismo predominante de crescimento da camada de óxido ocorre por eletroestricção (Figura 17) em detrimento ao mecanismo de dissolução-precipitação. Se o mecanismo de dissolução-precipitação fosse dominante, resultaria em uma camada de óxido homogênea e compacta, característica de filmes tipo barreira (BURLEIGH; SCHMUKI; VIRTANEN, 2009).

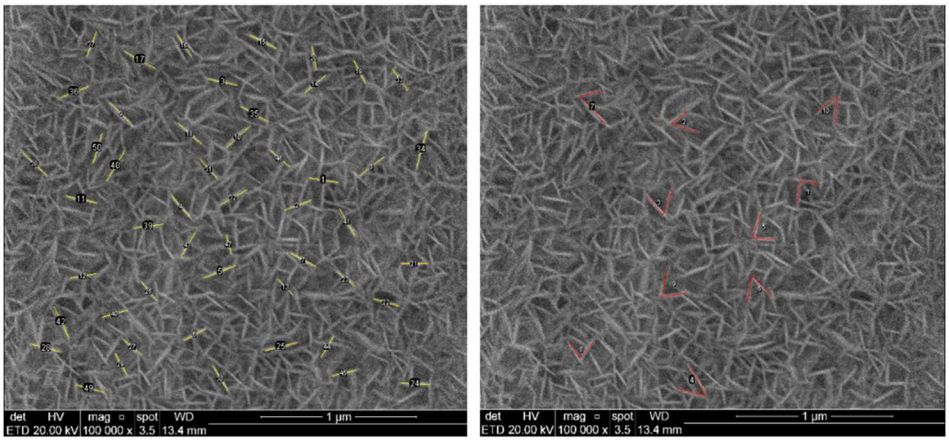
Figura 46: Micrografias obtidas ao MEV em vista de topo das amostras nas seguintes magnificações: (a,b,c) amostra A-O; (d,e,f) amostra A-5 e (g,h,i) amostra A-10 em 10 000, 20 000 e 100 000 vezes respectivamente.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Afim de avaliar melhor as estruturas obtidas, foi utilizado o software ImageJ@ como ferramenta para medição do comprimento médio das nanoplacas e dos ângulos formados entre elas. A Figura 47 apresenta as micrografias com as devidas marcações das medições apresentadas na Tabela 7 para a amostra A-5.

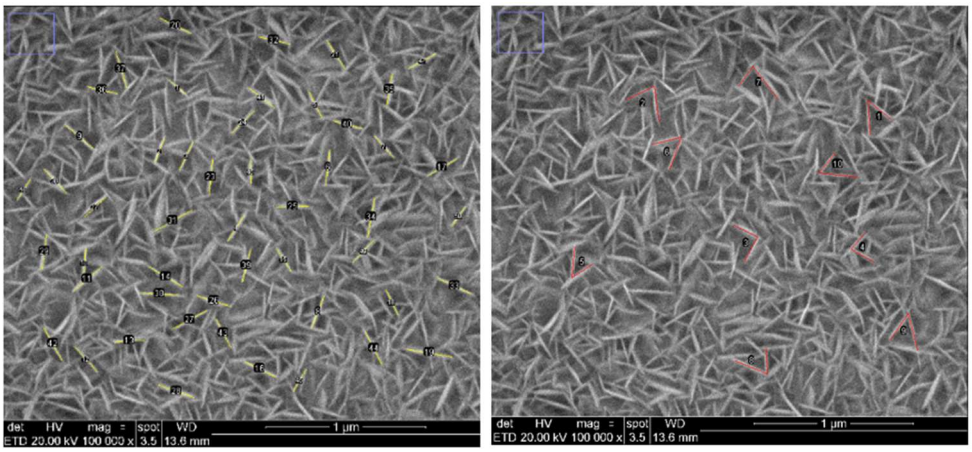
Figura 47: Micrografias obtidas ao MEV em vista de topo da amostra A-5 (magnificação de 100 000 x) com as medições de comprimento de nanoplacas e ângulos entre nanoplacas realizadas no software ImageJ@.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 48 apresenta as micrografias com as devidas marcações das medições apresentadas na tabela 8 para a amostra A-10. A análise dos valores ilustrados na Tabela 8 evidenciam que as nanoplacas da amostra A-10 possuem comprimento médio maior em relação as obtidas na amostra A-5 indicando que com maior tempo de anodização, além da espessura da camada de filme aumentar, a formação por eletroestricção parece se maximizar. Observa-se que a placa aumenta até encontrar outra placa provocando uma obstrução mútua do caminho de crescimento. Neste ponto a placa procura um novo caminho preferencial para continuar a deposição. Fenômeno similar foi observado por Wang et. al. (2020) na formação de filme espesso nanoporoso em aço AISI 304. Os autores atribuem esta mudança do caminho de formação do poro a dissolução seletiva e distribuição aleatória de espécies de Níquel presentes no substrato. Assim como neste estudo, a mecânica de crescimento da camada porosa em aços apresenta ainda grande discussão, pois devido a presença de vários elementos de liga, muitos comportamentos são apresentados simultaneamente (WANG *et al.*, 2020). Mas é possível inferir que a heterogeneidade nos dois casos é provocada por obstruções físicas do mecanismo de eletroestricção.

Figura 48: Micrografias obtidas ao MEV em vista de topo da amostra A-10 (magnificação de 100 000 x) com as medições de comprimento de nanoplacas e ângulos entre nanoplacas realizadas no software ImageJ@.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A Tabela 8 apresenta o valor de ângulo entre as nanoplacas aproximado de 60°, que remete ao ângulo interno das estruturas hexagonais características do α-Cr_2O_3 obtido em análise de STM (espectroscopia de tunelamento) por Marcus e Maurice (2000). Isto pode estar relacionado a nucleação primordial dos óxidos na superfície que possivelmente teve influência na orientação do crescimento em arranjos de nanoplacas conforme observado.

Tabela 8: Resultados medições em micrografias obtidas ao MEV-FEG em vista de topo da amostra A-5 e A-10 (magnificação de 100 000 x) comprimento de nanoplacas e ângulos entre nanoplacas realizadas no software ImageJ@.

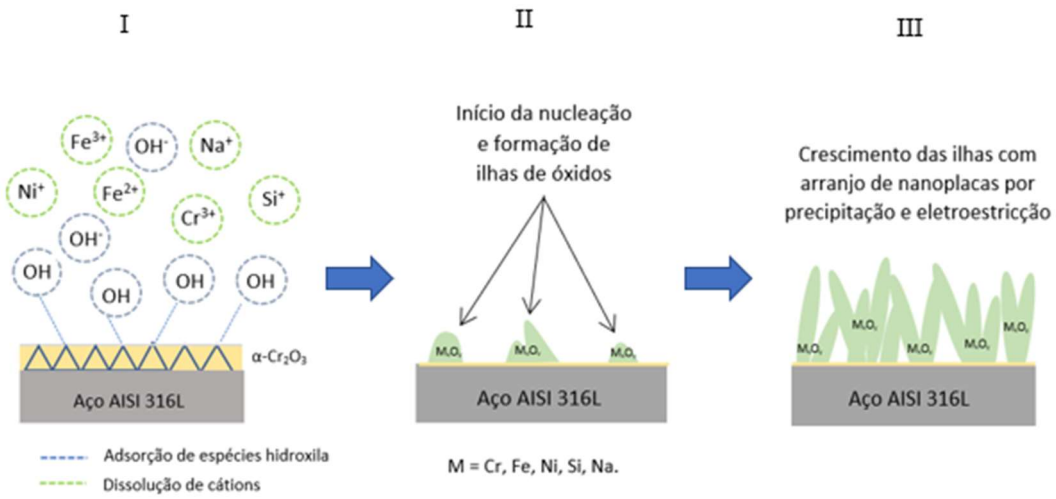
Amostra	Comprimento médio (nm)	Desvio padrão Comprimento	Ângulo entre nanoplacas (°)	Desvio padrão ângulo
A-5	182,66	25,85	62,99	12,39
A-10	203,63	31,05	63,55	13,92

Fonte: Elaborado pelo autor.

O possível processo de formação das nanoplacas da camada de óxido obtido é ilustrado na Figura 49, onde propõem-se que no momento inicial, estágio I, do

processo ocorre a dissolução dos íons para o eletrólito simultâneo ao processo de adsorção de íons hidroxila na superfície do metal, que já possui uma fina camada passiva de óxido de cromo. No estágio II inicia-se formação de ilhas de óxidos, por precipitação e crescimento destes óxidos por processos de dissolução-precipitação e eletroestricção, no estágio III.

Figura 49: Possível processo de formação das nanoplacas de óxido.



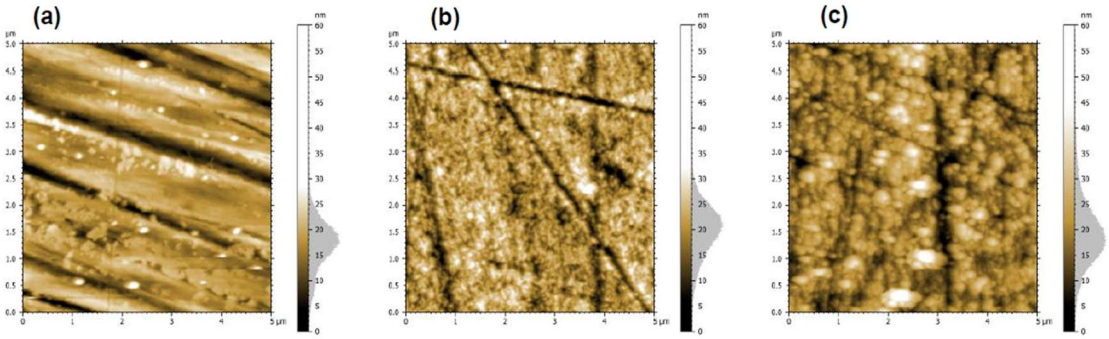
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6 ANÁLISE DA TOPOGRAFIA SUPERFICIAL POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATOMICA (AFM)

A Figura 50 apresenta as imagens bidimensionais obtidas por microscopia de força atômica (AFM) com área de 5 μm² para as amostras A-O, A-5 e A-10.

Na Figura 50 pode-se observar que a amostra A-O apresenta uma superfície mais homogênea em relação as amostras A-5 e A-10. Nas 3 amostras são percebidos riscos direcionais característicos da preparação das amostras em politriz, porém observa-se que a medida que aumenta o tempo de anodização os riscos se tornam menos profundos, sendo ocupados por pequenas partículas de óxido.

Figura 50: Imagens 2D obtidas por microscopia de força atômica com área de 5μm² das amostras: (a) A-O; (b) A-5 e (c) A-10.

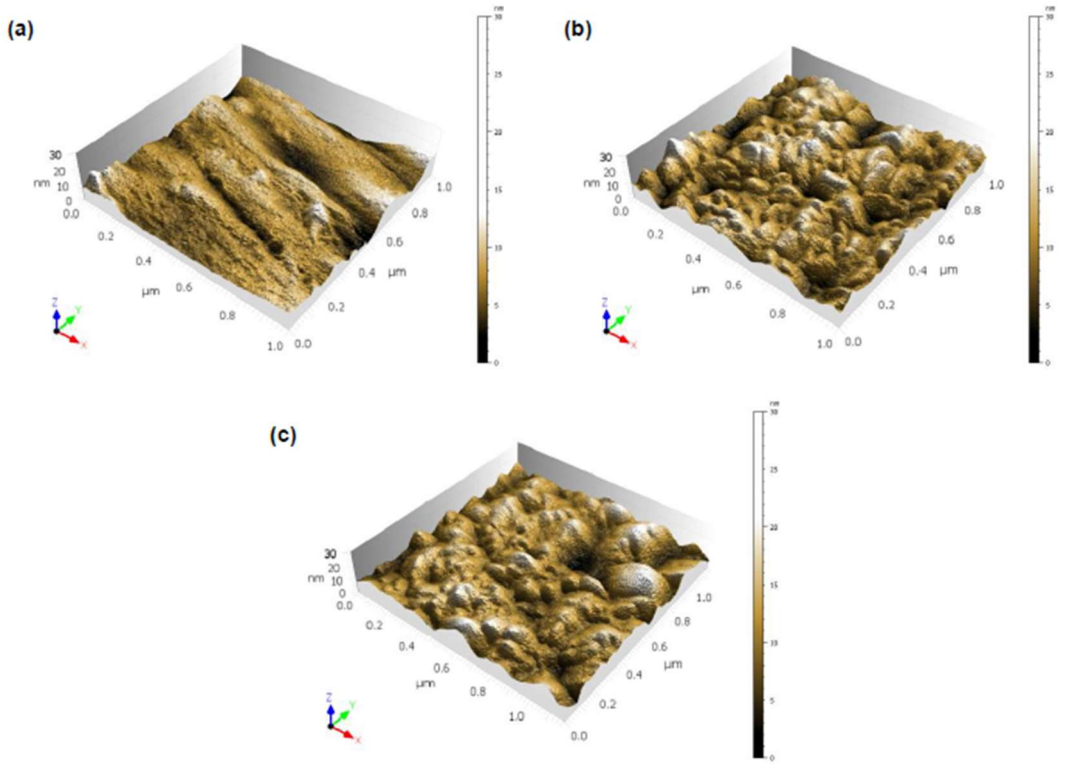


Fonte: Elaborado pelo autor

A Figura 51 apresenta as imagens tridimensionais obtidas por microscopia de força atômica (AFM) com área de 5 μm² para as amostras A-O, A-5 e A-10. É possível observar uma diferença interessante quanto a superfície de aço original, mais uniforme e regular em relação as amostras anodizadas A-5 e A-10. Estes resultados se complementam aos observados pelas micrografias ao MEV-FEG (Figura 46) sendo que nas amostras anodizadas formaram-se pequenas estruturas nodulares de uma camada de óxido condizente com as nanoplacas vistas nas micrografias.

A Figura 51 também reforça a evidência do mecanismo proposto de crescimento do filme de óxido. Uma vez que houve um preenchimento dos riscos de forma homogênea e perpendicular a superfície, observa-se que quanto maior o tempo de anodização, maior o volume dos nódulos formados, o que vem de encontro com a proposta da formação de ilhas de óxidos com crescimento por precipitação e eletroestricção (MARCUS; MAURICE, 2000; WANG *et al.*, 2020).

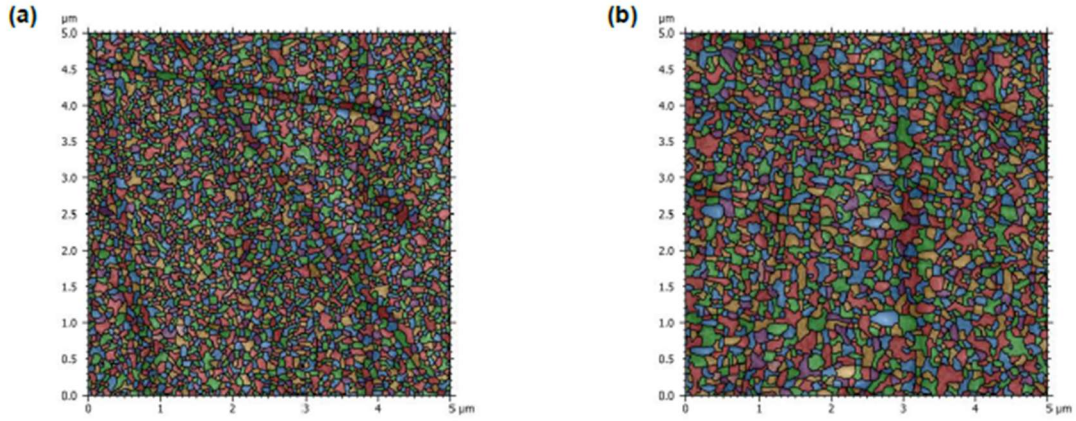
Figura 51: Imagens 3D obtidas por microscopia de força atômica com área de 5µm² das amostras: (a) A-O; (b) A-5 e (c) A-10.



Fonte: Elaborado pelo autor.

De forma complementar foi realizada análise do tamanho médio de partículas nas amostras A-5 e A-10, utilizando software específico, onde se nota a predominância de partículas maiores de forma homogênea que corrobora com as imagens obtidas em 3D. A Figura 52 ilustra as imagens, onde se pode observar que mesmo no interior dos riscos a formação dos nódulos é proporcional aos formados na superfície mais plana. A Tabela 9 apresenta os resultados de tamanho médio de partículas na área analisada de 5 µm².

Figura 52: Análise de tamanho médio de partículas das amostras (a) A-5 e (b) A-10.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 9: Resultados medições de tamanho médio de partículas.

Amostra	Área média das partículas (µm²)	Desvio quadrático médio
A-5	$8{,}4 \times 10^{-3}$	$\pm 0{,}3 \times 10^{-3}$
A-10	$13{,}9 \times 10^{-3}$	$\pm 2{,}0 \times 10^{-3}$

Fonte: Elaborado pelo autor.

A Tabela 10 apresenta os parâmetros de rugosidade média (Ra) e desvio quadrático médio obtidos no ensaio de AFM. Nenhuma das amostras apresentou um valor de rugosidade (Ra) com diferença significativa, conforme observado, todas as amostras apenas apresentaram microrugosidade baixa. Conforme Costa et. al. (2014), a estabilidade primária do implante com morfologia microrugosa foi confirmada com taxas de sucesso relativamente mais altas, devido ao aumento da camada de óxido disponível, que é um dos fatores mais relevantes no processo de adesão celular, auxiliando assim o crescimento ósseo diretamente na superfície.

Tabela 10: Resultados de rugosidade média das amostras analisadas.

Amostra	Valor de Ra (nm)	Desvio quadrático médio
A-O	6,7	±3,2
A-5	6,0	±1,1
A-10	5,1	±1,2

Fonte: Elaborado pelo autor.

Segundo muitos autores, o comportamento frente à processos corrosivos podem ser relacionados com a rugosidade da superfície. De modo geral, quanto maior o parâmetro de rugosidade da superfície de um sistema, isto é, mais rugoso, menor é a sua resistência à corrosão, visto que, a rugosidade superficial aumenta a área de contato do revestimento às soluções responsáveis pelos ataques químicos, no caso de biomateriais, o fluído corpóreo, acelerando assim o processo de corrosão que venha a acontecer e deteriorando inicialmente a superfície do substrato (BROOKS; BROOKS; EHRENSBERGER, 2017; PARRA *et al.*, 2006).

Todavia, para biomateriais, uma superfície lisa, sem rugosidade, não permite uma boa biocompatibilidade, pois a integração de implantes ao tecido ósseo *in vivo* está relacionada com um aumento da rugosidade da superfície do implante, uma vez que, os osteoblastos humanos se aderem melhor a superfícies rugosas em detrimento as lisas. A adesão normalmente aumenta em superfícies com rugosidade média (Ra) em até 1μm (ANDERSON; LAMICHHANE; MANI, 2016; PFEIFFER *et al.*, 2003).

Algumas células possuem preferência por topografias ásperas e outras suaves, como é o caso dos osteoblastos ou análogas que preferem superfícies mais rugosas da ordem de 2 μm, enquanto fibroblastos, tipo de célula mais comumente encontrada no tecido conjuntivo, possuem melhor aderência a superfícies mais suaves da ordem de 0,04 μm (KUNZLER *et al.*, 2007).

Neste contexto, deve-se relacionar a baixa performance da amostra A-10 nos ensaios eletroquímicos (Figuras 31 e 32) que apesar de não apresentar rugosidade maior em relação as outras amostras, evidencia partículas maiores na análise de tamanho de partícula, nas micrografias ao MEV-FEG também apresenta nanoplacas

maiores e também apresenta molhabilidade excessiva (Figura 30) para aplicação com biomaterial. Assim, aspectos de microrugosidade são impactantes para os resultados globais de características de superfícies.

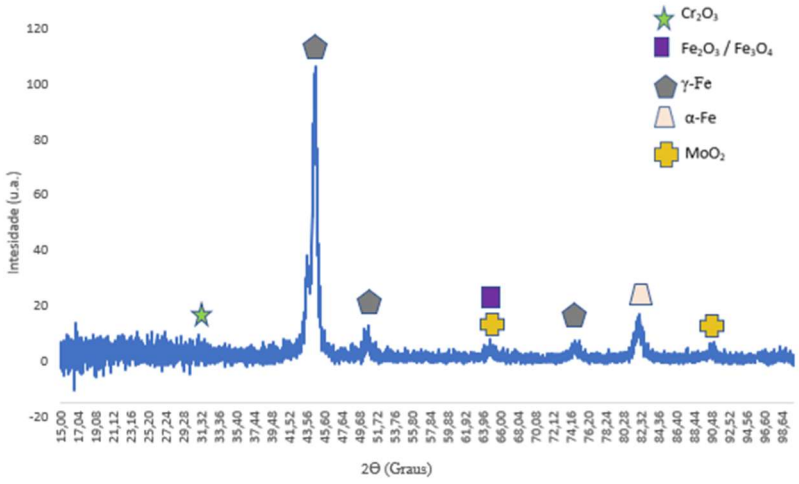
Busca-se um biomaterial que apresente um equilíbrio entre propriedades de resistência a corrosão e biocompatibilidade, a amostra A-5 mais uma vez apresentou-se promissora na boa relação de superfície com microrugosidade mais visível que a amostra de aço original (A-O) e boas propriedades de resistência a corrosão.

4.7 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DA CAMADA DE ÓXIDO POR DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DRX) E ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA (EDS)

A Figura 53 apresenta o difratogramas da amostra A-O com identificação dos picos observados. A amostra A-O apresenta os picos característicos das fases austenita e ferrita. Observa-se também alguns picos de baixa intensidade relativos a formação de alguns óxidos superficiais provenientes da exposição ao ambiente como óxidos de cromo, ferro e molibdênio conforme relatado na literatura (GONÇALVES *et al.*, 2018; KLIMAS *et al.*, 2013; SAHA *et al.*, 2019).

A Figura 54 apresenta os difratogramas das amostras A-5 e A-10 com escala de intensidade aumentada e identificação dos picos, para uma análise dos possíveis produtos que poderiam ser formados baseado na literatura de referência sobre processo de anodização em aço inoxidável e também com eletrólito de solução de hidróxido de sódio. Conforme citado anteriormente no comparativo dos difratogramas, não houve formação de picos definidos de algum óxido específico, mas ocorreu acentuada perda de intensidade dos picos do substrato indicando que algum material de origem pouco cristalina ocupou este intervalo (SAHA *et al.*, 2019).

Figura 53: Difratograma da amostra A-O.



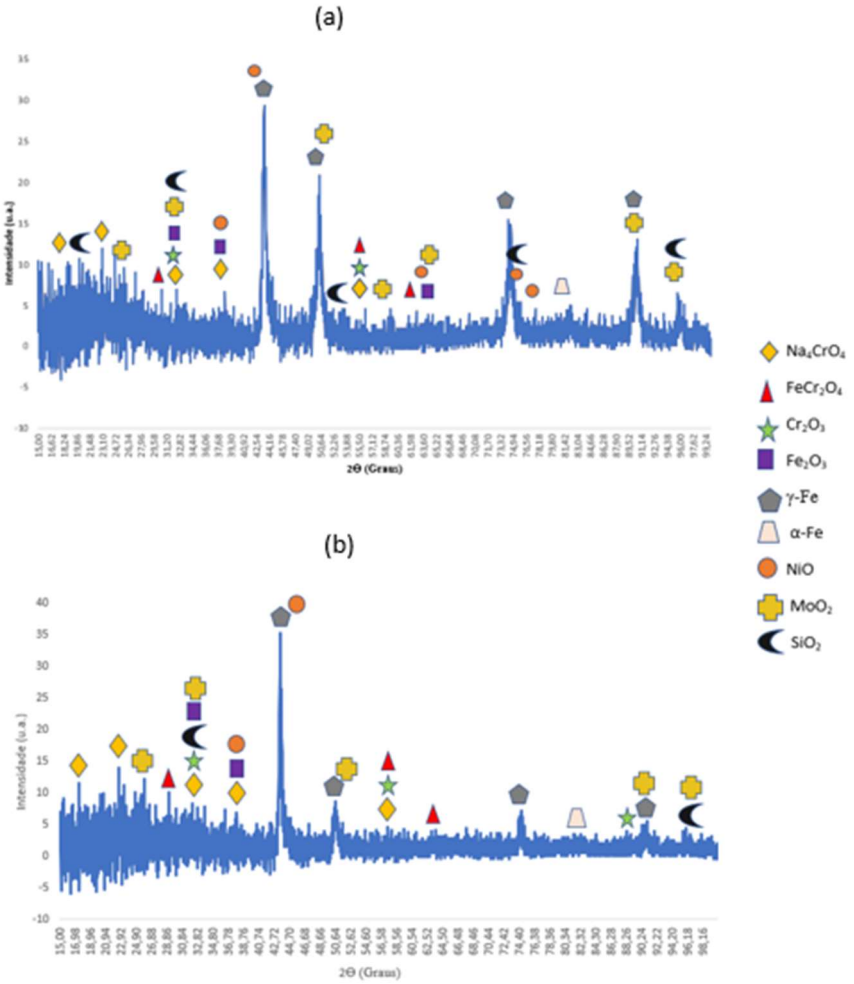
Fonte: Elaborado pelo autor.

No difratograma da amostra A-5 também se observa o aumento de intensidade de picos de padrão de óxido de silício, condizentes com os resultados discutidos sobre a formação de óxidos térmicos relacionado com o diagrama de Ellingham (Figura 43) relacionada a Energia Livre de Gibbs mais negativa deste óxido (VICENTE *et al.*, 2017). Esperava-se encontrar picos definidos de óxidos de ferro e de cromo em ambas amostras, porém não foram observados, possivelmente devido a baixa espessura e cristalinidade dos óxidos formados. Todavia, fica visível uma perturbação na região dos picos dos padrões de Fe_2O_3 e Fe_3O_4. Em estudo de anodização de aço no eletrólito 50% NaOH foram observados aumento dos picos de padrão de magnetita a medida que aumentava a temperatura de anodização (BURLEIGH; SCHMUKI; VIRTANEN, 2009). Para finalidade de uso como biomaterial, uma maior quantidade de óxidos de ferro menos aderentes poderiam trazer prejuízos quanto a resistência a corrosão (BROOKS; BROOKS; EHRENSBERGER, 2017; ZIĘTALA *et al.*, 2016), como observado nos ensaios de caracterização eletroquímica, a amostra A-10 apresenta este comportamento.

Em estudo de Lin et. al. (2002) onde aço AISI 316L sofreu pré-tratamento alcalino com solução 10M de hidróxido de sódio, foi avaliada a formação de hidroxiapatita em diversas temperaturas e concentrações de SBF. O pré-tratamento alcalino em questão foi a imersão do aço em uma solução 10M de hidróxido de sódio a 60°C por 24 horas, na sequencia as amostras são lavadas e tratadas em forno de 500 a 800°C por 1 hora. Na análise por DRX foi observada a formação de óxido de

cromo sódio, que se apresentou como uma solução interessante para a baixa adesão de hidroxiapatita, devido a baixa afinidade do aço (com ligações metálicas) com a hidroxiapatita, ou tecido ósseo (material cerâmico com ligações covalente). O óxido de cromo sódio desta forma possui o papel de intercamada ou ponte entre os dois materiais, que faria uma grande diferença para os resultados de biocompatibilidade, por produzir um aumento na superfície de grupos hidroxila, que agem como pontos de nucleação (LIN *et al.*, 2002).

Figura 54: Difratograma das amostras (a) A-5 e (b) A-10.



Fonte: Elaborado pelo autor.

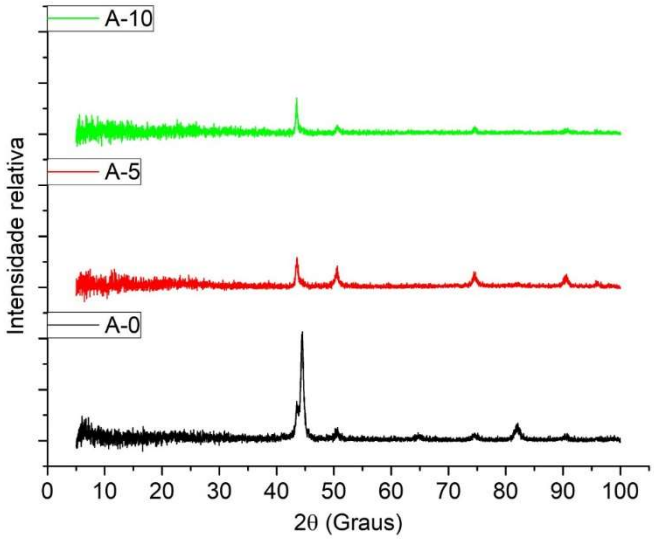
Este produto de óxido de cromo sódio seria proveniente da reação do hidróxido de sódio com o óxido de cromo presente na superfície do aço AISI 316L, conforme reação da equação 11 (LIN *et al.*, 2002):

$$8Na(OH) + Cr_2O_3 \rightarrow 2Na_4CrO_4 + 3H_2O + H_2 \quad (11)$$

O padrão deste óxido foi comparado com os difratogramas obtidos das amostras A-5 e A-10, pois este produto poderia também se formar pela metodologia empregada neste estudo. Entretanto não foi observado pico com intensidade definido que poderia afirmar a presença deste óxido conforme ilustra a Figura 54. Da mesma forma, não foram observados picos definidos de óxido de níquel, que é um elemento de liga abundante no aço AISI 316L, o óxido de níquel, assim como o óxido de cromo atuam de forma determinante na formação de camadas porosas em aço AISI 304 por anodização com eletrólito de etileno glicol e HF, devido a suas características de dissolução em períodos distintos (WANG *et al.*, 2020).

A Figura 55 apresenta os difratogramas resumidos das amostras A-O, A-5 e A-10. Observa-se que ocorre uma redução da intensidade dos picos característicos da fase austenítica nas amostras anodizadas, e com o aumento do tempo de anodização esta redução aumenta, indicando que está havendo uma formação de filme de óxidos na superfície do aço. Efeito semelhante foi observado no estudo de Saha et. al. (2019) no estudo de formação de filme anódico sobre o aço AISI 304. A amostra de aço como recebida apenas apresentou os picos característicos da fase austenita (γ-Fe) e da fase ferrita (α-Fe) como se espera. Após a anodização ocorre a redução da intensidade destes picos, mas sem presença de novos picos nítidos, o que os autores sugerem ser relativo à natureza amorfa ou pouco cristalina dos óxidos formados no processo de anodização. Já após o tratamento térmico da amostra anodizada surgem picos visíveis de fase magnetita. Portanto, observa-se na Figura 55 que nas amostras anodizadas a ocorrência da formação de óxidos de baixa cristalinidade, pois apenas são observadas perturbações baixas de intensidade ao longo do difratogramas, mas uma visível redução de intensidade dos picos em relação a amostra original (A-O). Este resultado também pode ser atribuído ao fato da camada de óxido ser muito fina, como foi revelado durante análise por MEV-FEG (NASCIMENTO *et al.*, 2016).

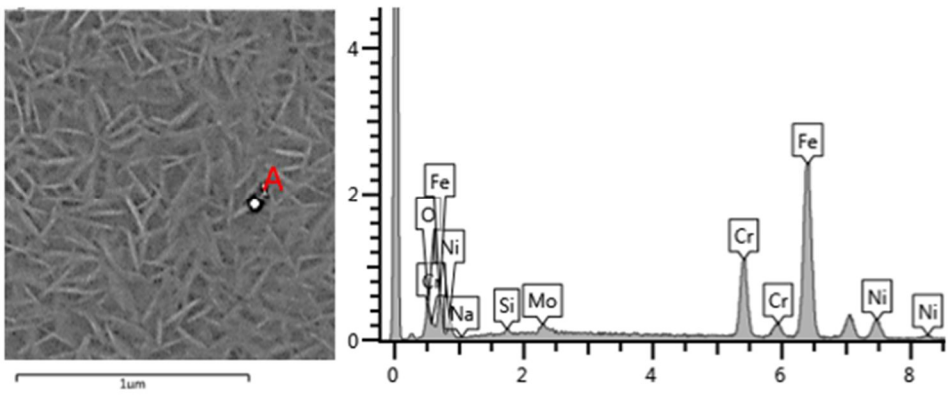
Figura 55: Comparativo dos difratogramas das amostras A-O, A-5 e A-10.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 56 apresenta análise por EDS do ponto A na amostra A-5. Observa-se a presença de oxigênio e sódio no ponto sobre uma nanoplaca, além dos elementos presentes no substrato.

Figura 56: Micrografia por MEV da amostra A-5 com EDS do ponto A.

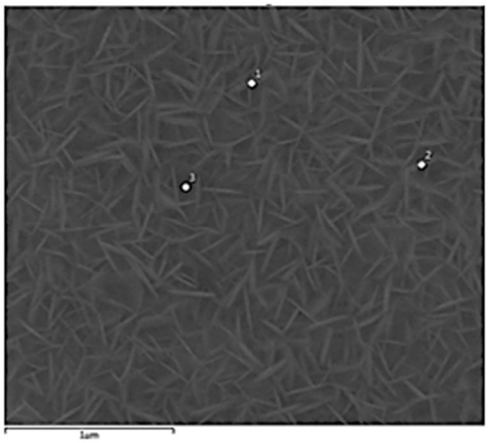


Fonte: Elaborado pelo autor.

A presença de sódio e oxigênio indica a formação de um composto similar ou análogo ao obtido no estudo de Lin et.al. (2002), tendo que se considerar que não foi realizado tratamento térmico no estudo atual, algumas variações de estrutura

cristalina são passíveis de ocorrer. Isto pode estar relacionado ao fato de não ocorrência de picos de intensidade definida na análise por DRX.

Figura 57: Micrografia por MEV da amostra A-10 com EDS dos pontos 1, 2 e 3.



Elemento	Peso relativo (%)		
	1	2	3
O	22.16	19.48	16.30
Na	0.16	0.52	0.00
Si	0.45	0.54	0.64
Cr	15.48	15.45	16.61
Fe	47.08	50.19	54.40
Ni	12.61	12.28	10.37
Mo	2.05	1.53	1.68
Total	100.00	100.00	100.00

Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 57 apresenta os resultados de EDS dos pontos 1, 2 e 3 com respectivo valor de peso relativo de cada elemento no ponto respectivo. O ponto 3 foi selecionado como área que não apresenta formação de nanoplaca. Conforme o resultado indica, não foi detectado sódio no ponto 3. Isto leva a forte evidencia de que o sódio participa da estrutura formadora das nanoplacas.

Os resultados obtidos nas análises de DRX e EDS não são conclusivos o suficiente para afirmar a composição exata das nanoplacas obtidas. É muito provável que existem diversos óxidos presentes neste filme devido à natureza do próprio substrato de aço austenítico e seus processos oxidativos específicos (PENG *et al.*, 2019; VICENTE *et al.*, 2017).

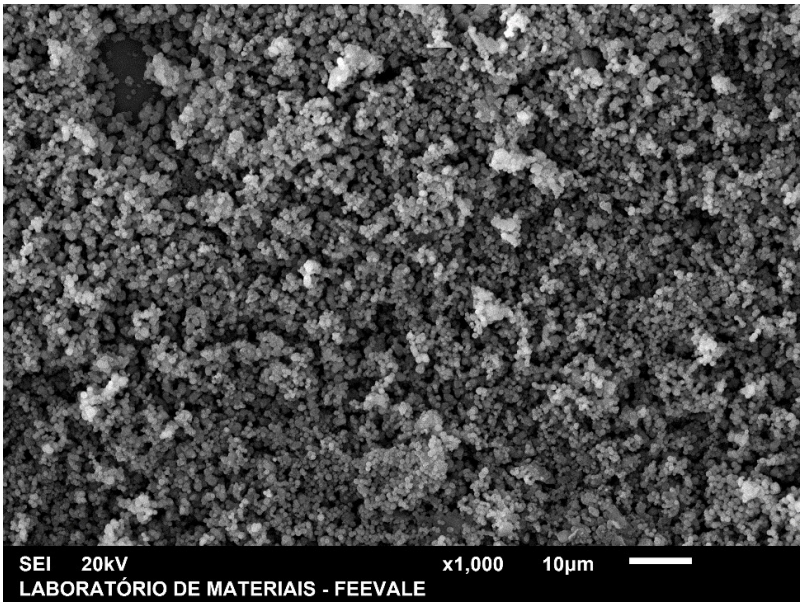
4.8 FORMAÇÃO DE HIDROXIAPATITA

A Figura 58 apresenta as micrografias ao MEV após ensaio de formação de hidroxiapatita sobre a amostra A-5 (a) e amostra A-O (b). Optou-se em realizar o ensaio somente com a amostra A-5 pois está apresentou resultados mais satisfatórios de molhabilidade e resistência à corrosão em relação a amostra A-10 que indicam uma melhor biofuncionalidade. Desta forma obteve-se uma comparação com o aço original que é utilizado normalmente como biomaterial.

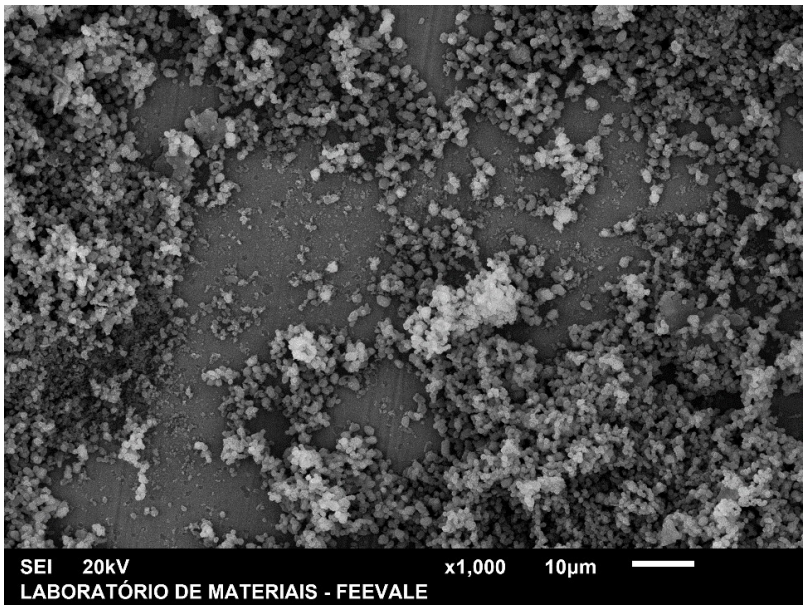
Na Figura 58 é possível observar que a amostra A-5 apresentou um resultado de formação mais homogênea e regular de recobrimento por hidroxiapatita. Este fato pode ser atribuído ao mecanismo de crescimento da camada anódica que resulta em uma superfície com radicais OH livres em abundância (MARCUS; MAURICE, 2000).

Figura 58: Micrografia ao MEV das amostras (a) A-5 e (b) A-O com magnificação de 1000x após ensaio de formação de hidroxiapatita.

(a)



(b)

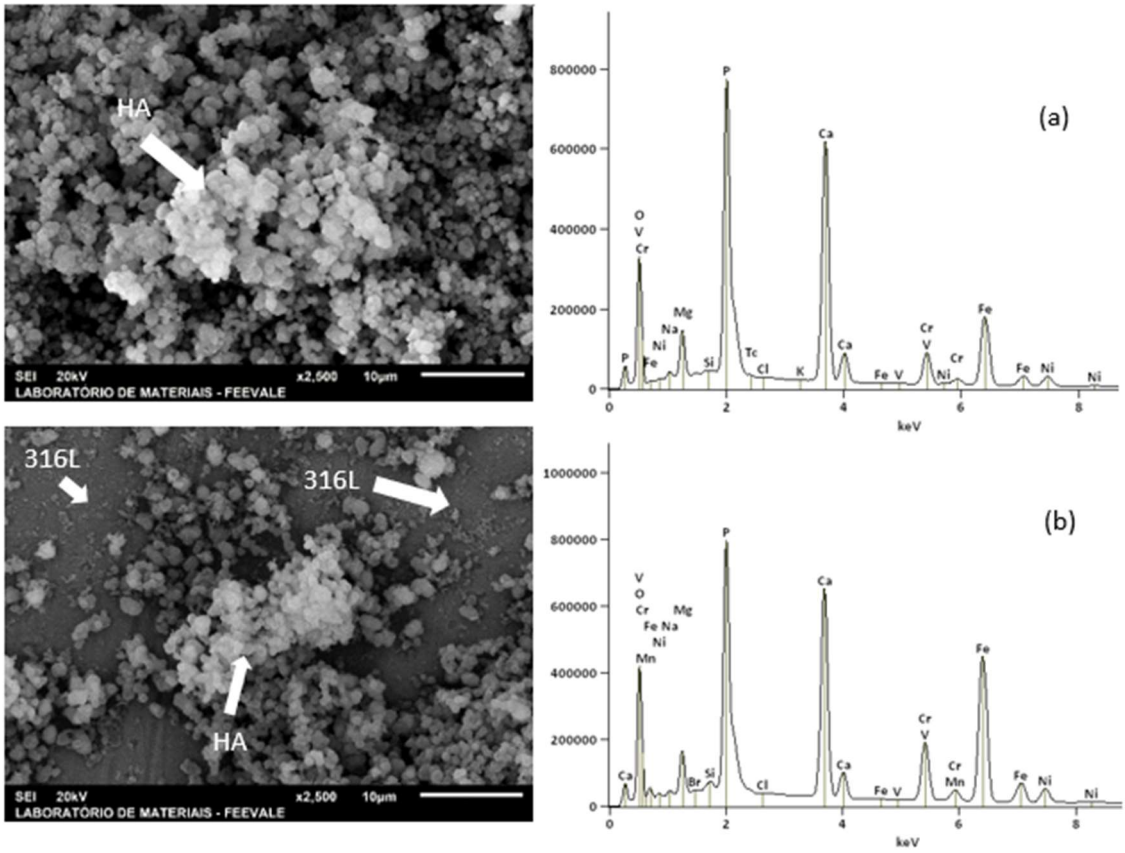


Fonte: Elaborado pelo autor.

Esta característica cria uma grande afinidade com os cátions presentes na solução de SBF como Ca^{2+}, Na^{+}, K^{+} e Mg^{2+}, iniciando uma nucleação mais intensa devido ao aumento da concentração de cátions para a superfície, atraindo os ânions da solução de SBF, principalmente o ânion fosfato e desta forma aumentando a camada de hidroxiapatita (HUYNH; NGO; GOLDEN, 2019).

Na Figura 59 estão apresentadas as micrografias ao MEV e EDS das amostras A-5 e A-O com magnificação de 2500x.

Figura 59: Micrografia ao MEV e EDS das amostras (a) A-5 e (b) A-O com magnificação de 2500x após ensaio de formação de hidroxiapatita.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Com estes resultados se torna claro como houve baixa cobertura de camada de hidroxiapatita na amostra de aço original (A-O). Na Figura 59b é possível visualizar áreas nítidas de substrato de aço AISI 316L aparentes. Os conglomerados brancos indicados pelas setas se referem a hidroxiapatita conforme indicam os resultados de EDS. Na amostra A-O nota-se uma dificuldade de dispersão, indicada pela nucleação concentrada observada. No EDS verifica-se que a intensidade de elementos do

substrato como ferro, cromo e níquel é superior na amostra A-O em relação à amostra anodizada (A-5).

A presença de um intercomposto na camada anodizada com presença de sódio e cromo também pode atuar como catalisador da formação de hidroxiapatita. Uma conexão entre material metálico (substrato aço AISI 316L) e um material cerâmico (hidroxiapatita presente no tecido ósseo) pode ser a chave para uma biocompatibilidade de sucesso (LIN *et al.*, 2002).

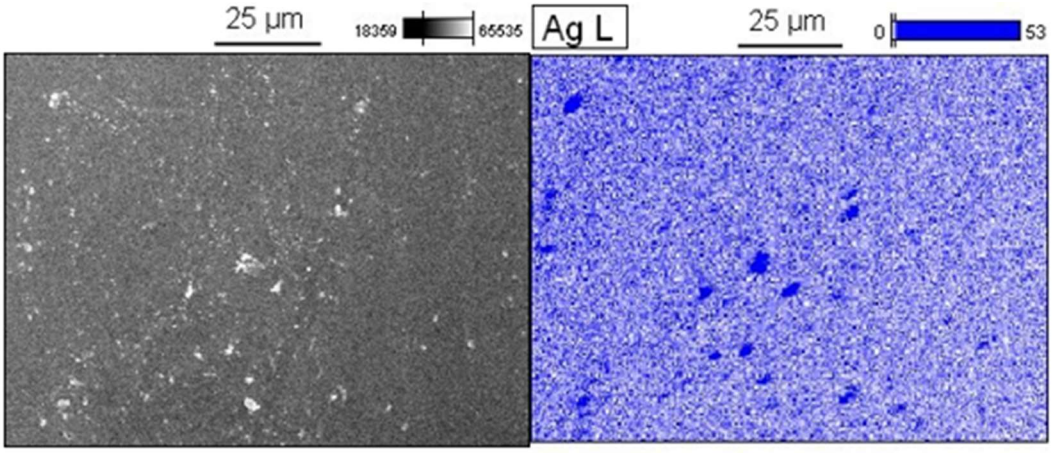
O fator de topografia da superfície, discutido no item 4.6 deste estudo também pode ser relacionado ao melhor resultado obtido na formação de hidroxiapatita na amostra anodizada. Em estudo de eletrodeposição de HA sobre camada de nanotubos anodizados de titânio para implantes odontológicos, foi observado que ocorreu uma interligação mecânica maior entre a camada de HA na superfície com nanotubos mais profundos (PARCHAROEN *et al.*, 2014).

Os três fatores relacionados: superfície ativada com hidroxilas livres, intercomposto de óxido de cromo sódio e topografia podem estar operando simultaneamente para a explicar o resultado promissor observado na formação de HA sobre a superfície da amostra A-5.

4.9 INCORPORAÇÃO DE NANOCARGAS DE PRATA NA SUPERFÍCIE

A Figura 60 apresenta o mapeamento por EDS da amostra A-5 após incorporação da prata. A amostra A-5 foi selecionada devido aos resultados promissores apresentados nas caracterizações da superfície para uso como biomaterial, destacando a molhabilidade e a resistência à corrosão. Na Figura 60 se observa que ocorreu uma dispersão muito favorável das espécies de prata, de aspecto homogêneo e regular sem áreas carentes de prata visíveis. De forma análoga ao efeito observado na formação de hidroxiapatita sobre a superfície, a presença de radicais hidroxila livres (MARCUS; MAURICE, 2000) é provável responsável pela ligação dos íons de prata à superfície. A grande dificuldade para dopagem de superfícies com prata está relacionada ao tamanho de partículas para um efeito bactericida satisfatório. Quanto menor a partículas de prata, maior o efeito bactericida (KIM *et al.*, 2007; SIVARAJ; VIJAYALAKSHMI, 2019).

Figura 60: Micrografia ao MEV e mapeamento por EDS da amostra A-5 após incorporação da prata na superfície.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As partículas de prata tendem a criar aglomerados que não possuem um efeito agudo na capacidade de penetração de radicais de prata nas membranas das bactérias, afetando diretamente seu DNA. Este é um dos mecanismos propostos da ação bactericida da prata, que ainda não é totalmente conhecido (FERREIRA *et al.*, 2019; KIM *et al.*, 2007). De fato, observa-se na Figura 60 alguns aglomerados que proporcionam baixa ativação de radicais de prata livre.

Para aplicações em biomateriais, deseja-se uma quantidade ideal de partículas de prata com ação bactericida, mas que ao mesmo tempo não comprometa a viabilidade celular dos osteoblastos e todos os processos envolvidos na recuperação do tecido ósseo afetado (HUANG *et al.*, 2019; PFEIFFER *et al.*, 2003; SHEIKH *et al.*, 2015).

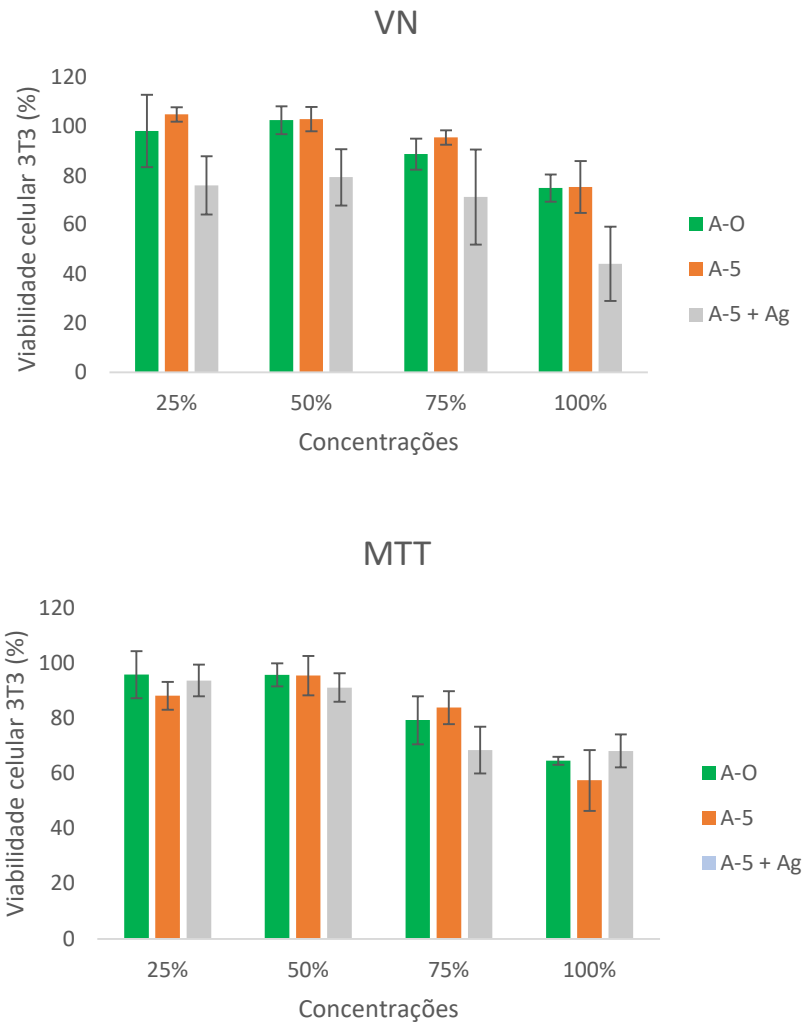
4.10 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE

A Figura 61 apresenta a avaliação de citotoxicidade através dos ensaios *in vitro* de captação do Vermelho Neutro (VN) pelos lisossomos e a avaliação da atividade mitocondrial pelo ensaio de redução do corante MTT.

O significado dos efeitos citotóxicos para situações *in vivo* está relacionado principalmente a quatro áreas: 1) irritação e inflamação; 2) proliferação celular e hiperplasia; 3) estresse oxidativo; e 4) diminuição da função de um órgão. Todas essas

injúrias citotóxicas podem levar a uma condição patológica se mantidas cronicamente (ANDREOLI; GIGANTE; NUNZIATA, 2003).

Figura 61: Citotoxicidade avaliada para as amostras aço original (A-O), aço anodizado (A-5) e aço anodizado com incorporação de prata (A-5 + Ag).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tanto o ensaio de redução do MTT quanto o da recaptação do VN avaliam o funcionamento de organelas celulares que é interpretado, na maioria dos estudos, como viabilidade celular. Na Figura 61 observa-se que no ensaio VN ocorre nítida ação danosa da amostra com prata sobre a viabilidade celular à medida que a concentração do meio aumenta. A amostra de aço original (A-O) e anodizado (A-5) apresentam resultados próximos com a mesma tendência. Nas três amostras ocorre degradação da função celular com aumento da concentração do meio de estudo,

possivelmente ocorre relação proporcional com a quantidade de íons metálicos presentes no meio. Todavia, na amostra com prata (A-5 + Ag) este dano é mais acentuado e já presente em baixa concentração, enquanto as outras apresentam degradação celular a partir de 75% de concentração do meio. O lisossomo é a organela terminal da via endocítica, por isso o ensaio de recaptação do VN reflete o estado final da célula após exposição a um agente estressante (FIGUEIRÓ, 2016; SVENDSEN *et al.*, 2004).

No ensaio de avaliação da atividade mitocondrial (MTT) observa-se na Figura 61 que a amostra contendo prata acompanha a mesma tendência de diminuição da viabilidade celular com aumento da concentração. não há variação significativa entre as três amostras. Deve-se observar que o cristal formado pelo reagente utilizado para este ensaio possui algumas características relevantes. Em células mortas, a mitocôndria pode manter intacta a atividade da enzima succinato desidrogenase, responsável pela formação do cristal, que pode ser erroneamente interpretada como sobrevivência. Citoplasma, compartimento endolisossomal e a membrana plasmática podem estar associados à redução do MTT. Estudos indicam que alguns compostos podem aumentar ou diminuir a atividade da succinato desidrogenase sem afetar a sobrevivência ou proliferação celular ou ainda interagir por si com o sal do MTT. Esse último pode ser particularmente importante se o complexo a ser estudado possuir substâncias com potencial redutivo intrínseco. Além disso pode ocorrer aumento no número de organelas sem que ocorra proliferação celular. Por causa dos resultados multifacetados, não é recomendado usar apenas o ensaio do MTT para monitorar a viabilidade celular, e é importante interpretar seu resultado como uma informação sobre o status mitocondrial (ANDREOLI; GIGANTE; NUNZIATA, 2003; FIGUEIRÓ, 2016; FIGUEIRÓ *et al.*, 2016).

Na Figura 61 os resultados ilustrados para atividade mitocondrial possivelmente houve a ocorrência de um fenômeno muito comum quando se trata de citotoxidade de metais. Como o ensaio MTT é relativamente rápido, pode estar apresentando um cenário inicial de dano da atividade mitocondrial, onde a ação dos metais de caráter redutor estão causando um efeito de geração de radicais de oxigênio , que momentaneamente favorecem a atividade metabólica da mitocôndria, porém com o passar do tempo e da degradação de outras organelas, a mitocôndria também segue para o estado de depleção vital (JAFARI; SIMCHI; KHAKPASH, 2010; KRAWCZYŃSKA *et al.*, 2015; SONG *et al.*, 2010).

Observando os resultados das duas análises em conjunto, verifica-se que a adição da prata foi responsável pela diminuição da viabilidade celular, pois fica evidente sua ação pela resposta da atividade lisossômica. Em estudo com camada de hidroxiapatita funcionalizada com nanotubos de carbono e diversas concentrações de prata sobre aço AISI 316L, observou-se que ocorreu uma diminuição da viabilidade celular de osteoblastos humanos à medida que se aumentou a concentração de prata na camada. Os autores destacam a ação citotóxica da prata, porém ainda em níveis aceitáveis, indicando 75% de viabilidade celular em ensaio de MTT (SIVARAJ; VIJAYALAKSHMI, 2019).

Foi reportado por Krawcsynska et. al. (2015) efeito toxicológico em células do sistema neurológico em estudo com ratos que tiveram administração intravenosa de nanopartículas de prata. O estudo propõe que o acúmulo de nanopartículas de prata da origem a geração de espécies de oxigênio reativo, que são responsáveis por danos oxidativos e degradação da membrana celular.

A adição de prata em biomateriais deve seguir a premissa de não gerar danos às células e simultaneamente combater os agentes patógenos como as bactérias, fungos e vírus. Está relação é tênue e sensível (HUANG *et al.*, 2018).

Destaca-se também que a amostra A-5 mais uma vez não teve perda de desempenho em relação ao aço original usado como biomaterial, não se destacou aumento de citotoxicidade e foram obtidos valores ligeiramente mais favoráveis nas concentrações de 75% de meio em ambos ensaios.

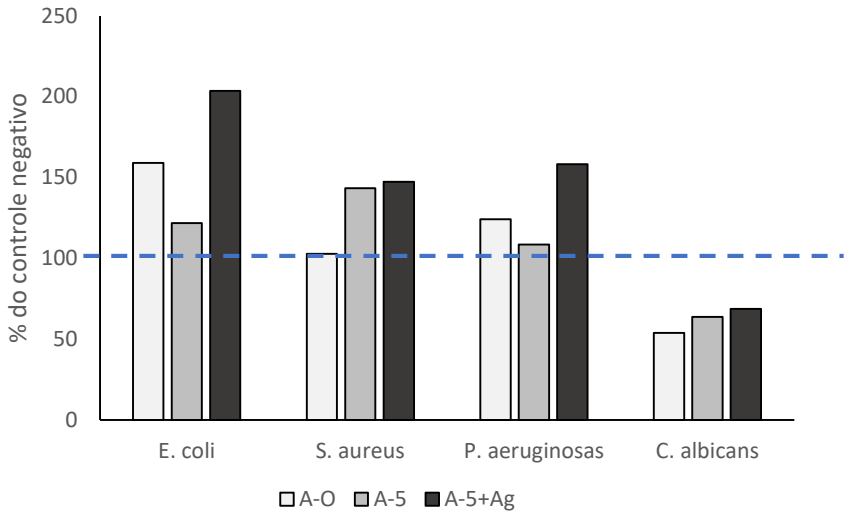
4.11 AVALIAÇÃO DE AÇÃO BACTERICIDA E ANTIFUNGICA

A Figura 62 apresenta os resultados da ação bactericida das amostras de aço original (A-O), aço anodizado (A-5) e aço anodizado com incorporação de prata (A-5 + Ag) diante de *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* e ação antifúngica sobre *C. albicans*. Estes patógenos foram selecionados por sua presença recorrente em ambientes de blocos cirúrgicos (NAKAMURA *et al.*, 2019). Desta forma a convivência com os dispositivos de aço utilizados em cirurgias ortopédicas que são o ponto focal deste estudo.

Os resultados são apresentados em função de percentual do controle. Não se observa alteração na amostra com prata em relação às amostras de aço original e aço anodizado como era esperado. Para as espécies bacterianas não se encontra um

resultado de ação bactericida em nenhuma das amostras, indicando que para estas espécies o substrato se apresentou muito favorável para crescimento bacteriano.

Figura 62: Avaliação do crescimento de biofilme para as amostras aço original (A-O), aço anodizado (A-5) e aço anodizado com incorporação de prata (A-5 + Ag) em percentual do controle negativo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Apenas para a *C. albicans* foi observada uma inibição de crescimento de biofilme em relação ao controle negativo. Todavia a anodização e incorporação de prata sugere ter favorecido o crescimento de biofilme para esta espécie, pois fica evidente que a própria superfície de aço original já proporciona uma dificuldade para o desenvolvimento do biofilme de *C. albicans*. Pesquisas revelam que tanto AgNPs quanto íons de prata tem capacidade de causar perda intracelular de potássio na espécie *C. albicans*, levando a uma dissipação do potencial da membrana citoplasmática e sua desestabilização (ARTUNDUAGA BONILLA *et al.*, 2015; VAZQUEZ-MUÑOZ; AVALOS-BORJA; CASTRO-LONGORIA, 2014).

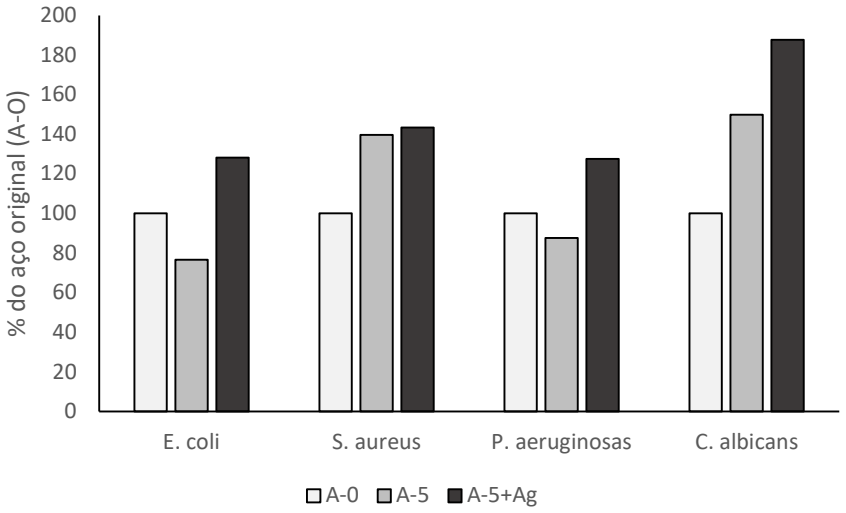
Alguns fatores podem ter contribuído para estes resultados: topografia favorável das superfícies, presença de nitrogênio e oxigênio na superfície, proporcionando nutrientes ao biofilme e concentração subinibitória de prata.

Estudos vem demonstrando que doses sub letais de AgNPs ou $AgNO_3$ estão inferindo em uma maior viabilidade celular de certas bactérias como *E. coli*. Os autores sugerem que o efeito hormético pode ter sido desencadeado pela presença em baixa dose destes conhecidos antimicrobianos. Desta forma, a presença de baixas doses

de agentes tóxicos para as células bacterianas podem ativar mecanismos de reparo celular contra os efeitos nocivos. Observou-se como resposta destes estudos a maior formação de biofilme pelas bactérias, indicando um mecanismo de resistência. Os biofilmes podem proteger as bactérias de algumas condições ambientais adversas, como antibióticos e o sistema imune humano. O biofilme também aumenta a resistência à ação de sanitizantes físico-químicos (HOFFMAN *et al.*, 2005; XIU *et al.*, 2012).

Em estudo de Jang et. al. (2018) verificou-se o efeito de nanotextura sobre o aço AISI 316L na adesão microbiana. Os autores constataram uma diminuição da adesão na superfície com nanoporos já reportada em estudos anteriores que estimaram a interação das forças superfície-bactéria usando o cálculo estendido DVLO que demonstrou que a redução de adesão bacteriana da superfície nanoporosa se origina da repulsão sinérgica devido a eletrostática, forças repulsivas de caráter ácido-base e energia livre efetiva da superfície. Com base nos cálculos, os autores reportam que o diâmetro de poro eficaz para inibir a adesão bacteriana é de 15 a 25 nm. A rugosidade média (Ra) também é um parâmetro importante que afeta o comportamento da adesão bacteriana. Superfícies com rugosidade média entre 1,68 e 5,18 nm apresentam resultados favoráveis de diminuição da adesão bacteriana. Destaca-se também que nanoprotrusões da superfície exibem um caráter bactericida atribuído a tensão mecânica exercida sobre a membrana da bactéria aderida, resultando em alongamento, ruptura e morte da membrana (ANDERSON; LAMICHHANE; MANI, 2016; JANG *et al.*, 2018). Foi observado nos resultados uma melhora discreta da resposta bactericida nas amostras anodizadas (A-5) em relação ao aço original (A-O) nas espécies *E. coli* e *P. aeruginosa* conforme ilustra a Figura 63 onde são apresentados os resultados de crescimento de biofilme em relação ao resultado do aço original (A-O). Esta ação pode ser relacionada a nanotopografia obtida no processo de anodização conforme discutido na Figura 51. A tabela 8 que apresenta os valores de rugosidade média aponta para valores próximos de 5,0 nm de acordo com os resultados encontrados por Jang et. al. Todavia a ação inibitória ainda foi muito insatisfatória.

Figura 63: Avaliação do crescimento de biofilme para as amostras aço anodizado (A-5) e aço anodizado com incorporação de prata (A-5 + Ag) em percentual relativo ao aço original (A-O).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Outro ponto que se relaciona a baixa concentração de prata está na insuficiência de geração de oxigênio reativo que seria um dos mecanismos propostos para degradação do núcleo da célula bacteriana (KIM *et al.*, 2007). A Figura 60 indica grande presença de prata na superfície do forma homogênea porém esta pode estar ligada aos hidróxidos da superfície anodizada e não sob forma de partícula elementar de Ag^0 ou íons livres Ag^+ que são muito mais reativos e responsáveis pela geração de danos celulares (KRAWCZYŃSKA *et al.*, 2015; SIVARAJ; VIJAYALAKSHMI, 2019). Da mesma forma, a ligação de prata na superfície com energia livre devido à presença de radicais hidroxila também pode ser a responsável pela presença considerável de nitrogênio na superfície, observado pelo EDS da amostra A-5+Ag. Uma vez que uma grande quantidade de cátions é atraída para a superfície, ânions nitrato provenientes do nitrato de prata utilizado na incorporação de prata se ligaram aos radicais livres. Uma superfície porosa e com presença de nitrogênio e oxigênio cria um ambiente favorável para o crescimento de biofilme (KORA; ARUNACHALAM, 2011; MAHAPATRO, 2015).

A superfície ativa apresenta fatores positivos como a melhora da biofuncionalidade, evidenciada nos ensaios de molhabilidade, formação de hidroxiapatita e de citotoxicidade. Porém também favorece o crescimento de espécies

indesejadas em um procedimento cirúrgico, por exemplo. O desafio do desenvolvimento de materiais se tange na performance idealizada entre excelente biofuncionalidade e uma ação eficaz contra patógenos indesejados.

5 CONCLUSÃO

Concluiu-se, com base nos resultados discutidos, que é possível obter uma camada nanorugosa em aço AISI 316L pelo processo de anodização em eletrólito de 10M NaOH. Esta camada adquire características distintas com a variação do tempo de anodização, como coloração, rugosidade e resistência à corrosão.

A camada anodizada em aço inoxidável AISI 316L contém elementos Fe, Cr, Mo, Ni, Na, Si indicando que é formada por óxidos variados como cromato de sódio, magnetita, hematita, cromita, óxidos de molibdênio, silício e níquel.

O tempo de anodização torna a camada oxidada mais rugosa, o que foi associado a maior hidrofílicidade e maior densidade de corrente de corrosão e menor potencial de pit em meio SBF. Verificou-se que a camada obtida com tempo de anodização de 5 minutos apresentou eficiência de proteção anticorrosiva quando em contato com os fluidos corpóreos, denotando uma boa resistência à corrosão, o que consequentemente reduz a lixiviação de íons dissolvidos pelo corpo humano. A camada anodizada teve bom desempenho eletroquímico, indicando uma maior resistência de polarização e altos módulos de impedância, não ocorrendo perda de propriedades anticorrosivas em relação ao aço original.

A formação da camada anodizada ocorre por um processo de formação das nanoplacas, em três estágios conforme processo proposto. No momento inicial, estágio I, do processo ocorre a dissolução dos íons para o eletrólito simultâneo ao processo de adsorção de íons hidroxila na superfície do metal, que já possui uma fina camada passiva de óxido de cromo. No estágio II inicia-se a formação de ilhas de óxidos, por precipitação e crescimento destes óxidos por processos de dissolução-precipitação e eletroestricção, no estágio III.

Os resultados de DRX e EDS não foram conclusivos o bastante para comprovar a composição dos óxidos formadores das nanoplacas, indicam que supostamente as nanoplacas são formadas por óxidos de baixa cristalinidade com presença de cromo, ferro, níquel e sódio.

Os resultados de formação de hidroxiapatita na amostra A-5 mostraram que a superfície anodizada obtida possui grande afinidade com elementos cálcio e fósforo, proporcionando uma nucleação volumosa de hidroxiapatita com formação homogênea e densa.

A metodologia utilizada para incorporação de prata na superfície não apresentou os resultados esperados, necessitando de mais estudos para aperfeiçoar esta técnica e obter uma ação eficaz no que diz respeito às propriedades biocidas da superfície anodizada. Nos ensaios de ação bactericida ocorreu apenas uma leve ação na amostra A-5 em relação ao aço original em algumas espécies. As amostras com prata apresentaram aumento do crescimento de biofilme indicando que a superfície apresentava condições favoráveis como presença de nitrogênio e oxigênio e uma topografia salutar para o desenvolvimento das espécies.

O desempenho mais satisfatório atingido nas caracterizações foi apresentado pela amostra A-5 em relação as propriedades de resistência à corrosão e molhabilidade, rugosidade, apresentando bons resultados para formação de hidroxiapatita, que é uma biofuncionalidade importante. Desta forma, esta camada obtida se mostra como uma alternativa promissora para futuras aplicações em áreas biomédicas, principalmente em implantes ortopédicos quando comparada ao aço original AISI 316L utilizado atualmente para estas funcionalidades.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

a) Avaliar a possibilidade de inserir a prata na superfície durante o processo de anodização;

b) Avaliar outros métodos de incorporação com nanopartículas de prata na superfície que apresentem uma resposta mais satisfatória quanto a ação bactericida;

c) Avaliar a funcionalidade da superfície para outras aplicações como metais hospitalares e dispositivos de instrumentação cirúrgica que carecem de propriedades bactericidas e antifúngicas.

7 PRODUÇÃO CIENTÍFICA ORIUNDA DESTE TRABALHO

Participação em feiras e congressos:

PETRY, M.; KUNST, S.R.; MORISSO, F.D.; FERREIRA, J.Z.; OLIVEIRA, C.T. Obtenção e caracterização de aço inoxidável austenítico 316L anodizado para aplicações biomédicas. In: II **MultiMat – II Encontro em Ciência e Engenharia dos Materiais do Sul do Brasil**, 2021. Porto Alegre: UFRGS. Poster Virtual. Disponível em: https://youtu.be/83O5a027I1s?list=PLhUKuKqArcsM-PIsY6VekLqSPHBa0qxgF.

PETRY, M. Propriedades e aplicações do aço inoxidável austenítico AISI 316L. In: **Seminário de Pós-graduação (SPG) – Inovamundi** 2021. Novo Hamburgo: Universidade Feevale. Disponível em: https://www.feevale.br/s/2021/sitefeevale/SPG/Anais%20SPG%202021.pdf

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, R. K. *et al.* and cell response of cp-Ti. **Ultrasonics**, *[S. l.]*, p. 106110, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ultras.2020.106110

AMANOV, A.; LEE, S. W.; PYUN, Y. S. Low friction and high strength of 316L stainless steel tubing for biomedical applications. **Materials Science and Engineering C**, *[S. l.]*, v. 71, p. 176–185, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.10.005

ANDERSON, J. A.; LAMICHHANE, S.; MANI, G. Macrophage responses to 316L stainless steel and cobalt chromium alloys with different surface topographies. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, *[S. l.]*, v. 104, n. 11, p. 2658–2672, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1002/jbm.a.35808

ANDREOLI, C.; GIGANTE, D.; NUNZIATA, A. A review of in vitro methods to assess the biological activity of tobacco smoke with the aim of reducing the toxicity of smoke. **Toxicology in Vitro**, *[S. l.]*, v. 17, n. 5–6, p. 587–594, 2003. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S0887-2333(03)00091-2

ANS. **www.ans.gov.br**. *[s. l.]*, *[s. d.]*. Disponível em: www.ans.gov.br. Acesso em: 7 mar. 2020.

ANSELL, R. O.; DICKINSON, T.; POVEY, A. F. of the Films on Coloured Stainless Steel. *[S. l.]*, v. 18, n. December 1976, 1978.

ANVISA. **Resolução implantes Anvisa**. *[s. l.]*, *[s. d.]*.

ARTUNDUAGA BONILLA, J. J. *et al.* In vitro antifungal activity of silver nanoparticles against fluconazole-resistant Candida species. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, *[S. l.]*, v. 31, n. 11, p. 1801–1809, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s11274-015-1933-z

ASOH, H.; NAKATANI, M.; ONO, S.. Fabrication of thick nanoporous oxide films on stainless steel via DC anodization and subsequent biofunctionalization. **Surface and Coatings Technology**, *[S. l.]*, v. 307, p. 441–451, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2016.09.025

BAUER, S. *et al.* Engineering biocompatible implant surfaces: Part I: Materials and surfaces. **Progress in Materials Science**, *[S. l.]*, v. 58, n. 3, p. 261–326, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2012.09.001

BEN RHOUMA, A. *et al.* Correlation between microstructure and intergranular corrosion behavior of low delta-ferrite content AISI 316L aged in the range 550–700 °C. **Journal of Alloys and Compounds**, *[S. l.]*, v. 708, p. 871–886, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2017.02.273

BIAN, T. *et al.* The construction and performance of multi-level hierarchical hydroxyapatite (HA)/collagen composite implant based on biomimetic bone

Haversian motif. **Materials and Design**, *[S. l.]*, v. 162, p. 60–69, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.matdes.2018.11.040

BOHNER, M.; LEMAITRE, J.. Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution? **Biomaterials**, *[S. l.]*, v. 30, n. 12, p. 2175–2179, 2009. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.01.008

BOSSARDI, K. **Nanotecnologia aplicada a tratamentos superficiais para o aço carbono 1020 como alternativa ao fosfato de zinco**. 2007. - UFRGS, *[s. l.]*, 2007. Disponível em: http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/10889/000601310.pdf

BOTA, P. C. S. *et al.* Biomaterial topography alters healing in vivo and monocyte/macrophage activation in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, *[S. l.]*, v. 95 A, n. 2, p. 649–657, 2010. Disponível em: https://doi.org/10.1002/jbm.a.32893

BROOKS, E. K.; BROOKS, R. P.; EHRENSBERGER, M. T. Effects of simulated inflammation on the corrosion of 316L stainless steel. **Materials Science and Engineering C**, *[S. l.]*, v. 71, p. 200–205, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.10.012

BURLEIGH, T. D. *et al.* Anodizing Steel in KOH and NaOH Solutions. **Journal of The Electrochemical Society**, *[S. l.]*, v. 154, n. 10, p. C579, 2007. Disponível em: https://doi.org/10.1149/1.2767417

BURLEIGH, T. D.; SCHMUKI, P.; VIRTANEN, S. Properties of the Nanoporous Anodic Oxide Electrochemically Grown on Steel in Hot 50% NaOH. **Journal of The Electrochemical Society**, *[S. l.]*, v. 156, n. 1, p. C45, 2009. Disponível em: https://doi.org/10.1149/1.3021029

BUSS, G. A. M.; DONATH, K. S.; VICENTE, M. G. **Utilização de aços inoxidáveis em implantes.** *[S. l.: s. n.]*. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/boletim_tecno/boletim_tecno_dezembro_ed_especial/PDF/1-Utiliza%E7%E3o de a%E7os inoxid%E1veis em implantes.pdf.

CALDERON VELASCO, S. *et al.* Structural and electrochemical characterization of Zr-C-N-Ag coatings deposited by DC dual magnetron sputtering. **Corrosion Science**, *[S. l.]*, v. 80, p. 229–236, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.corsci.2013.11.036

CALINSKI, C.; STREHBLOW, H. ISS Depht Profiles of the Passive Layer on Fe/Cr Alloys. **Journal of The Electrochemical Society**, *[S. l.]*, v. 136, p. 1328, 1989.

CAO, Zujun *et al.* Influence of Nd addition on the corrosion behavior of Zn-5%Al alloy in 3.5wt.% NaCl solution. **Applied Surface Science**, *[S. l.]*, v. 426, p. 67–76, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.07.109

CGU. **http://www.portaltransparencia.gov.br/funcoes/10-saude?ano=2020**. *[s. l.]*, *[s. d.]*. Disponível em: http://www.portaltransparencia.gov.br/funcoes/10-

saude?ano=2020. Acesso em: 7 mar. 2020.

CHEN, Q.; THOUAS, G. A. Metallic implant biomaterials. **Materials Science and Engineering R: Reports**, *[S. l.]*, v. 87, p. 1–57, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.mser.2014.10.001

COELHO, P. G.; JIMBO, R. Osseointegration of metallic devices: Current trends based on implant hardware design. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, *[S. l.]*, v. 561, p. 99–108, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.06.033

COLPAERT, H. **Metalografia dos Produtos Siderúrgicos Comuns**. 4 ed ed. São Paulo: Blucher, 2008. *E-book*.

CONRRADO, R. **Avaliação da Resistência à Corrosão de Aços Inoxidáveis Coloridos por Processos Eletroquímicos**. 2003. - Universidade Federal de São Carlos, *[s. l.]*, 2003.

DATASUS. **http://datasus.saude.gov.br/**. *[s. l.]*, *[s. d.]*. Disponível em: http://datasus.saude.gov.br/. Acesso em: 5 mar. 2020.

DOFF, J. *et al.* Formation and composition of nanoporous films on 316L stainless steel by pulsed polarization. **Electrochimica Acta**, *[S. l.]*, v. 56, n. 9, p. 3225–3237, 2011. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.electacta.2011.01.038

DU, T. *et al.* Glutathione-Capped Ag2S Nanoclusters Inhibit Coronavirus Proliferation through Blockage of Viral RNA Synthesis and Budding. **ACS Applied Materials and Interfaces**, *[S. l.]*, v. 10, n. 5, p. 4369–4378, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1021/acsami.7b13811

EL-HADAD, S.; KHALIFA, W.; NOFAL, A. Surface modification of investment cast-316L implants: Microstructure effects. **Materials Science and Engineering C**, *[S. l.]*, v. 48, p. 320–327, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.12.038

EL-MOHAMADY, R. S. *et al.* Inhibitory effect of silver nanoparticles on bovine herpesvirus-1. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, *[S. l.]*, v. 6, n. 2, p. 296–300, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2018.09.002

EVANS, C.; LEIVA-GARCIA, R.; AKID, R. Strain evolution around corrosion pits under fatigue loading. **Theoretical and Applied Fracture Mechanics**, *[S. l.]*, v. 95, n. February, p. 253–260, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.tafmec.2018.02.015

FERREIRA, C. C. *et al.* Titanium Biomimetically Coated With Hydroxyapatite, Silver Nitrate and Polycaprolactone, for Use In Biomaterials (Biomedicine). **Materials Research**, *[S. l.]*, v. 22, n. suppl 1, p. 1–9, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1590/1980-5373-mr-2019-0177

FERREIRA, L. M. V. **Revestimentos hidrofóbicos**. 2013. - Universidade Nova de Lisboa, *[s. l.]*, 2013.

FIGUEIRÓ, L. R. **Avaliação in vitro da Toxicidade do Thirdhand Smoke**. 2016. - UFCSPA, *[s. l.]*, 2016.

FIGUEIRÓ, L. R. *et al.* Thirdhand tobacco smoke: procedures to evaluate cytotoxicity in cell cultures. **Toxicology Mechanisms and Methods**, *[S. l.]*, v. 26, n. 5, p. 355–361, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1080/15376516.2016.1188190

FRANCISCO, J. S. **Avaliação do Pré Tratamento a base de sulfossiloxano sobre aço galvannealed combinado com tintas anticorrosivas.** 2013. - Universidade de São Paulo, *[s. l.]*, 2013. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/3/3137/tde-08072014-123138/publico/Diss_JulianaFrancisco.pdf.

GAMA, R. O. **Controle do comportamento hidrofílico/hidrofóbico de polímeros naturais biodegradáveis através da decoração de superfícies com nano e microcomponentes.** 2014. - Universidade Federal de Minas Gerais, *[s. l.]*, 2014. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-9LFMQ8/1/tese_renata_de_oliveira_gama.pdf.

GENTIL, V. **Corrosão**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012. *E-book*.

GIORDANO, E. J. .. *et al.* Electrochemical behavior of two austenitic stainless steel biomaterials. **Revista Escola de Minas**, *[S. l.]*, v. 63, n. 1, p. 159–166, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/rem/v63n1/27.pdf

GONÇALVES, M. C. *et al.* Influência da concentração de cloreto de sódio na formação dos filmes de sulfeto de ferro e carbonato de ferro no aço API X65 em meios contendo CO2 e H2S. **Intercorr**, *[S. l.]*, v. 1, n. 102, p. 21, 2018.

GUERRA-FUENTES, L. *et al.* Failure analysis in 316L stainless steel supracondylar blade plate. **Engineering Failure Analysis**, *[S. l.]*, v. 57, p. 243–247, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.engfailanal.2015.07.033

HOFFMAN, L. R. *et al.* Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. **Nature**, *[S. l.]*, v. 436, n. 7054, p. 1171–1175, 2005. Disponível em: https://doi.org/10.1038/nature03912

HOFMANN, S.; KNOTE, H.; STOEZ, U. THE PASSIVITY OF IRON-CHROMIUM ALLOYS * THE EXCELLENT corrosion resistance of stainless steels in acid solutions is based on the beneficial role of Cr additions in Fe base alloys . With the aid of modern surface analytical techniques it has been shown tha. *[S. l.]*, v. 29, n. 7, 1989.

HUANG, X. *et al.* Preparation of a novel antibacterial coating precursor and its antibacterial mechanism. **Applied Surface Science**, *[S. l.]*, v. 465, n. September 2018, p. 478–485, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.09.160

HUANG, Y. *et al.* A prospective material for orthopedic applications: Ti substrates coated with a composite coating of a titania-nanotubes layer and a silver-manganese-doped hydroxyapatite layer. **Ceramics International**, *[S. l.]*, v. 44, n. 5, p. 5528–5542, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.12.197

HUYNH, V.; NGO, N. K.; GOLDEN, T. D. Surface Activation and Pretreatments for Biocompatible Metals and Alloys Used in Biomedical Applications. **International Journal of Biomaterials**, *[S. l.]*, v. 2019, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1155/2019/3806504

JAFARI, T.; SIMCHI, A.; KHAKPASH, N. Synthesis and cytotoxicity assessment of superparamagnetic iron-gold core-shell nanoparticles coated with polyglycerol. **Journal of Colloid and Interface Science**, *[S. l.]*, v. 345, n. 1, p. 64–71, 2010. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.01.038

JANG, Y. *et al.* Inhibition of Bacterial Adhesion on Nanotextured Stainless Steel 316L by Electrochemical Etching. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, *[S. l.]*, v. 4, n. 1, p. 90–97, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.7b00544

KIM, J. S. *et al.* Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, *[S. l.]*, v. 3, n. 1, p. 95–101, 2007. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.001

KLIMAS, V. *et al.* Fabrication and characterization of anodic films onto the type-304 stainless steel in glycerol electrolyte. **Journal of Physical Chemistry C**, *[S. l.]*, v. 117, n. 40, p. 20730–20737, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1021/jp407028u

KORA, A. J.; ARUNACHALAM, J. Assessment of antibacterial activity of silver nanoparticles on Pseudomonas aeruginosa and its mechanism of action. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, *[S. l.]*, v. 27, n. 5, p. 1209–1216, 2011. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s11274-010-0569-2

KOWALSKI, D.; KIM, D.; SCHMUKI, P. TiO2 nanotubes, nanochannels and mesosponge: Self-organized formation and applications. **Nano Today**, *[S. l.]*, v. 8, n. 3, p. 235–264, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.nantod.2013.04.010

KRAWCZYŃSKA, A. *et al.* Silver and titanium dioxide nanoparticles alter oxidative/inflammatory response and renin-angiotensin system in brain. **Food and Chemical Toxicology**, *[S. l.]*, v. 85, p. 96–105, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.08.005

KUMAR, S. *et al.* Nanotechnology-based biomaterials for orthopaedic applications: Recent advances and future prospects. **Materials Science and Engineering C**, *[S. l.]*, v. 106, n. May 2019, p. 110154, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110154

KUNZLER, T. P. *et al.* Systematic study of osteoblast and fibroblast response to roughness by means of surface-morphology gradients. **Biomaterials**, *[S. l.]*, v. 28, n. 13, p. 2175–2182, 2007. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.01.019

LE GUÉHENNEC, L. *et al.* **Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=&AN=S0109564106001850

&site=eds-live

LIN, F. H. *et al.* The effect of Ca/P concentration and temperature of simulated body fluid on the growth of hydroxyapatite coating on alkali-treated 316L stainless steel. **Biomaterials**, *[S. l.]*, v. 23, n. 19, p. 4029–4038, 2002. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00154-0

MAGNABOSCO, R. **Influência da microestrutura no comportamento eletroquímico do aço inoxidável UNS S31803 (SAF 2205)**. 2001. - Universidade de São Paulo, *[s. l.]*, 2001.

MAHAPATRO, A. Bio-functional nano-coatings on metallic biomaterials. **Materials Science and Engineering C**, *[S. l.]*, v. 55, p. 227–251, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.05.018

MARCUS, P.; MAURICE, V.. Passivity of Metals and Alloys. *In*: CAREN, R. W.; HASEB, P.; KRAMER, E. J. (org.). **Material Science and Technology**. *[S. l.]*: WILEY-VCH Verlang GmbH & Co KGaA, 2000. *E-book*.

MAXIMO, F. S. *et al.* Análise da superfície e osseointegração de implantes dentários com superfícies biomiméticas contedo Ca, Mg e F. **Revista Materia**, *[S. l.]*, v. 21, n. 1, p. 196–203, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S1517-707620160001.0017

MBESE, J. Z.; MADIKIZELA, A. Structural and Morphological Properties of TiO2 Nanotubes Fabricated via Electro-anodization Process. **Journal of Materials Science & Engineering**, *[S. l.]*, v. 08, p. 1–3, 2019. Disponível em: https://doi.org/https://doi.org/10.4172/2169-0022.1000509

MELLO, L. S. **Estudo de corrosão localizada dos aços inoxidáveis em sistemas de resfriamento industrial**. 2011. - UFRJ, *[s. l.]*, 2011. Disponível em: http://monografias.poli.ufrj.br/monografias/monopoli10003539.pdf

MIRZAEE, M.; VAEZI, M.; PALIZDAR, Y.. Synthesis and characterization of silver doped hydroxyapatite nanocomposite coatings and evaluation of their antibacterial and corrosion resistance properties in simulated body fluid. **Materials Science and Engineering C**, *[S. l.]*, v. 69, p. 675–684, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.07.057

MORAES, L. F. S. *et al.* Gastos com o tratamento da osteoporose em idosos do Brasil (2008 – 2010): Análise dos fatores associados. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, *[S. l.]*, v. 17, n. 3, p. 719–734, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.1590/1809-4503201400030012

MORAIS, L. S. de; GUIMARÃES, G. S.; ELIAS, C. N. Liberação de íons por biomateriais metálicos. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, *[S. l.]*, v. 12, n. 6, p. 48–53, 2007. Disponível em: https://doi.org/10.1590/s1415-54192007000600006

NAKAMURA, S. *et al.* Synthesis and application of silver nanoparticles (Ag nps) for

the prevention of infection in healthcare workers. **International Journal of Molecular Sciences**, *[S. l.]*, v. 20, n. 15, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.3390/ijms20153620

NASCIMENTO C. *et al.* Avaliação da susceptibilidade à corrosão de um aço inoxidável AISI 316L submetido à simulação térmica com o uso da Gleeble. **Anais do IX Congresso Nacional de Engenharia Mecânica**, *[S. l.]*, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.20906/cps/con-2016-0982

OZKAN, S.; MAZARE, A.; SCHMUKI, P. Critical parameters and factors in the formation of spaced TiO2 nanotubes by self-organizing anodization. **Electrochimica Acta**, *[S. l.]*, v. 268, p. 435–447, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.02.120

PACHECO, L. G. **Análise de viabilidade de implantação da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica para controle de processos de tratamento de superfície no setor aeroespacial.** 2007. - USP, *[s. l.]*, 2007. Disponível em: https://sistemas.eel.usp.br/bibliotecas/antigas/2007/EMD07004.pdf

PADILHA, A. F.; GUEDES, L. C. **Aços Inoxidáveis Austeníticos: Microestrutura e Propriedades**. São Paulo: Hemus Editora Limitada, 1994. *E-book*.

PAN, L.; KWOK, C. T.; LO, K. H. Enhancement in hardness and corrosion resistance of AISI 420 martensitic stainless steel via friction stir processing. **Surface and Coatings Technology**, *[S. l.]*, v. 357, n. July 2018, p. 339–347, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2018.10.023

PARCHAROEN, Y. *et al.* Hydroxyapatite electrodeposition on anodized titanium nanotubes for orthopedic applications. **Applied Surface Science**, *[S. l.]*, v. 311, p. 54–61, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.04.207

PARRA, B. S. *et al.* Rugosidade superficial de revestimentos cerâmicos. **Cerâmica Industrial**, *[S. l.]*, v. 11, p. 4, 2006.

PENG, C. *et al.* Tailoring Surface Hydrophilicity Property for Biomedical 316L and 304 Stainless Steels: A Special Perspective on Studying Osteoconductivity and Biocompatibility. **ACS Applied Materials and Interfaces**, *[S. l.]*, v. 11, n. 49, p. 45489–45497, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1021/acsami.9b17312

PFEIFFER, F. *et al.* Cell reactions to microstructured implant surfaces. **Microelectronic Engineering**, *[S. l.]*, v. 67–68, p. 913–922, 2003. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S0167-9317(03)00154-0

PINHEIRO, M. M. *et al.* O impacto da osteoporose no Brasil: dados regionais das fraturas em homens e mulheres adultos - The Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). **Revista Brasileira de Reumatologia**, *[S. l.]*, v. 50, n. 2, p. 113–120, 2010. Disponível em: https://doi.org/10.1590/s0482-50042010000200002

RIBEIRO, D. V. ..; SOUZA, C. A. C. ..; ABRANTES, J. C. C. Uso da espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) para monitoramento da corrosão em concreto

armado. **Revista IBRACON de Estruturas e Materiais.**, *[S. l.]*, v. 8, n. 4, p. 529–549, 2015. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/riem/v8n4/pt_1983-4195-riem-08-04-00529.pdf

SAHA, S. K. *et al.* Self-organized honeycomb-like nanoporous oxide layer for corrosion protection of type 304 stainless steel in an artificial seawater medium. **Journal of Molecular Liquids**, *[S. l.]*, v. 296, p. 111823, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111823

SAJID, H. U.; KIRAN, R.. Influence of corrosion and surface roughness on wettability of ASTM A36 steels. **Journal of Constructional Steel Research**, *[S. l.]*, v. 144, p. 310–326, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jcsr.2018.01.023

SHARMA, A. *et al.* Investigation of electrochemical corrosion behavior of additive manufactured Ti–6Al–4V alloy for medical implants in different electrolytes. **Journal of Alloys and Compounds**, *[S. l.]*, v. 830, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2020.154620

SHEIKH, Z. *et al.* Macrophages, foreign body giant cells and their response to implantable biomaterials. **Materials**, *[S. l.]*, v. 8, n. 9, p. 5671–5701, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.3390/ma8095269

SILVA, E. F.; OLIVEIRA, L. F. C. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E METALOGRÁFICA DOS. **Acta Ortopédica Brasileira**, *[S. l.]*, v. 19, n. 5, p. 280–285, 2011.

SILVA, E. F.; OLIVEIRA, L. F. C. Avaliação da resistência à corrosão de implantes em aços inoxidáveis ISO 5832-9 e F138 removidos de pacientes. **Química Nova**, *[S. l.]*, v. 35, n. 1, p. 59–65, 2012.

SIVARAJ, D.; VIJAYALAKSHMI, K. Enhanced antibacterial and corrosion resistance properties of Ag substituted hydroxyapatite/functionalized multiwall carbon nanotube nanocomposite coating on 316L stainless steel for biomedical application. **Ultrasonics Sonochemistry**, *[S. l.]*, v. 59, n. April, p. 104730, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104730

SONG, M. M. *et al.* Cytotoxicity and cellular uptake of iron nanowires. **Biomaterials**, *[S. l.]*, v. 31, n. 7, p. 1509–1517, 2010. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.034

STRNAD, G. *et al.* Contact Angle Measurement on Medical Implant Titanium Based Biomaterials. **Procedia Technology**, *[S. l.]*, v. 22, p. 946–953, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.protcy.2016.01.094

SVENDSEN, C. *et al.* A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: Is it a workable earthworm biomarker? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, *[S. l.]*, v. 57, n. 1, p. 20–29, 2004. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.08.009

VARIOLA, F. *et al.* Nanoscale surface modifications of medically-relevant metals:

state-of-the art and perspectives. *[S. l.]*, 2010. Disponível em: https://doi.org/10.1039/c0nr00485e

VAZQUEZ-MUÑOZ, R.; AVALOS-BORJA, M.; CASTRO-LONGORIA, E. Ultrastructural analysis of candida albicans when exposed to silver nanoparticles. **PLoS ONE**, *[S. l.]*, v. 9, n. 10, p. 1–10, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108876

VICENTE, A. de A. *et al.* Caracterização Microestrutural Das Camadas Protetivas De Óxidos Formados Nas Superfícies De Um Aço Inoxidável Austenitico Laminado (253 Ma®) Oxidado a Altas Temperaturas Ao Ar. *[S. l.]*, n. March, p. 54–65, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.5151/1516-392x-30090

VISHWAKARMA, A. *et al.* Engineering Immunomodulatory Biomaterials To Tune the Inflammatory Response. **Trends in Biotechnology**, *[S. l.]*, v. 34, n. 6, p. 470–482, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.03.009

VOGLER, E. A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, *[S. l.]*, v. 74, n. 1–3, p. 69–117, 1998. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S0001-8686(97)00040-7

W. D. CALLISTER, Jr. **Ciência e Engenharia de Materiais uma introdução**. 7 ed ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008. *E-book*.

WANG, Y. *et al.* Fabrication and formation mechanisms of ultra-thick porous anodic oxides film with controllable morphology on type-304 stainless steel. **Applied Surface Science**, *[S. l.]*, v. 505, n. May 2019, p. 144497, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.144497

WOLYNEC, S. **Técnicas eletroquímicas em corrosão**. São Paulo: Editora Universidade de São Paulo, 2013. *E-book*.

XIU, Z. M. *et al.* Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. **Nano Letters**, *[S. l.]*, v. 12, n. 8, p. 4271–4275, 2012. Disponível em: https://doi.org/10.1021/nl301934w

YILMAZ, B. *et al.* Historical development of simulated body fluids used in biomedical applications: A review. **Microchemical Journal**, *[S. l.]*, v. 155, n. February, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104713

YOUNG, L. **Anodic oxide films**. *[S. l.: s. n.]*. *E-book*.

YUAN, Y. *et al.* Osteogenesis stimulation by copper-containing 316L stainless steel via activation of akt cell signaling pathway and Runx2 upregulation. **Journal of Materials Science and Technology**, *[S. l.]*, v. 35, n. 11, p. 2727–2733, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jmst.2019.04.028

ZHANG, X. M. *et al.* Ta-coated titanium surface with superior bacteriostasis and osseointegration. **International Journal of Nanomedicine**, *[S. l.]*, v. 14, p. 8693–8706, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.2147/IJN.S218640

ZIĘTALA, M. *et al.* The microstructure, mechanical properties and corrosion resistance of 316 L stainless steel fabricated using laser engineered net shaping. **Materials Science and Engineering A**, *[S. l.]*, v. 677, p. 1–10, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.msea.2016.09.028