

## PROJETO DE PESQUISA INTERCENTROS-2018

### TÍTULO: LIGAS METÁLICAS UTILIZADAS COMO BIOMATERIAIS NA ÁREA DE SAÚDE: ESTUDO DE CORROSÃO E TOXICIDADE

#### IDENTIFICAÇÃO DA PROPOSTA

#### ÁREAS DE ATUAÇÃO

Materiais e Nanotecnologia – Programa 7 – Atividade 730 – Materiais Metálicos

Ciência e Tecnologia Nucleares – Programa 3 – Atividade 310 – Análise por ativação com neutrons

Meio Ambiente – Programa 5 – Atividade 510 – Química Ambiental.

#### COORDENADOR DO PROJETO: DRA ISOLDA COSTA

#### CENTROS PARTICIPANTES NO PROJETO, PROGRAMA E ATIVIDADES:

- Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais (CCTM), Programa 7- Materiais e Nanotecnologia , Atividade: Materiais Metálicos
- Centro do Reator de Pesquisas (CRPq), Programa 3- Ciência e Tecnologia Nucleares- Atividade: Análise por ativação com nêutrons
- Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA), Programa – Meio Ambiente, Atividade: Química Ambiental

#### Pesquisadores participantes do Projeto:

Dra Isolda Costa ( P) – Área de atuação: Materiais e Nanotecnologia

Dr Jesualdo Luiz Rossi (P) - Área de atuação: Materiais e Nanotecnologia

Dra Mitiko Saiki ( P) – Área de atuação: Ciência e Tecnologia Nucleares

MSc Sizue Ota Rogero (P) - Área de atuação: Meio Ambiente

Dr. Cristiano Stefano Mucsi (P) -Área de atuação: Materiais e Nanotecnologia

#### Participante Externo: (P)

Dr. Giorgios Kotsakis (University of Washington)

#### Estudantes de pós-graduação e iniciação científica

- Caio Almeida Justino da Silva (Estudante de Pós Graduação- Nível Mestrado)
- Larissa de Oliveira Berbel (Estudante de Pós Graduação- Nível Doutorado)
- Lílian Ninoska M. Biaguis (Estudante de Pós Graduação – Nível Mestrado)
- Bárbara Victoria Gonçalves de Viveiros (Estudante de Pós Graduação- Nível Mestrado)
- Paulo Guilherme José Fernandes (Iniciação Científica)

## QUALIFICAÇÃO DOS PRINCIPAIS PROBLEMAS A SEREM ABORDADOS

Há uma crescente demanda por novos biomateriais sendo estimado que o setor apresente uma taxa de crescimento de 11 % ao ano. De acordo com Ratner *et al.* (2013) são fabricados cerca de 1 a 2,5 milhões de unidades de biomateriais por ano no mundo para várias aplicações tais como em próteses de quadril e joelho, *stents* cardiovasculares e placas de fixação óssea. Esta crescente demanda de biomateriais se deve a fatores como aumento da expectativa de vida da população, do número de acidentes com lesões graves, crescimento da espera por doações de órgãos e a diminuição de doadores, o que tem feito crescer a necessidade da utilização dos biomateriais. Conseqüentemente, há necessidade de desenvolvimento de novos biomateriais e/ou aprimoramento dos já existentes com vistas a contribuir para o bem estar e saúde das populações.

Com o desenvolvimento e a crescente necessidade de uso de biomateriais, uma grande variedade de dispositivos e tipos de materiais vêm sendo utilizados no tratamento de doenças ou lesões.

Nas últimas décadas, os metais não degradáveis, principalmente o titânio e suas ligas e aços inoxidáveis têm sido amplamente utilizados como biomateriais para implantes ortopédicos. No entanto, as principais limitações de alguns destes biomateriais são as suas propriedades mecânicas, muitas vezes inapropriadas para as aplicações às quais se destinam, e a não degradabilidade destes materiais que deveriam ser removidos após sua função ter sido cumprida como implante temporário, exigindo assim uma segunda cirurgia para remoção do implante. Além desses fatores, a liberação íons tóxicos devido a corrosão ou o processo de desgaste que libera partículas sólidas para os fluidos fisiológicos podem causar osteólise inflamatória.

Recentemente, materiais metálicos biodegradáveis têm despertado interesse crescente e estão sendo investigados, entre eles as ligas de magnésio como uma nova classe de candidatos promissores. Segundo Ding (2016), o magnésio apresenta várias vantagens importantes para aplicações biomédicas, especialmente para implantes ortopédicos e cardiovasculares:

A classe de biomateriais biodegradáveis vem quebrando o paradigma na ciência dos biomateriais que sempre buscava metais com alta resistência à corrosão (WITTE *et al.*, 2009). O uso do Mg como principal elemento de liga em biomateriais é um exemplo desta quebra de paradigma. Uma vez que o Mg puro é incapaz de fornecer as propriedades mecânicas e de corrosão requeridas na maior parte das aplicações de implantes, elementos de liga como o alumínio, zinco, cálcio, terras raras, lítio, manganês e zircônio são adicionados. As ligas de Mg proporcionam as vantagens de serem degradáveis, mas também a vantagem das propriedades mecânicas dos

materiais metálicos, característica não observada nos materiais poliméricos utilizados como biomateriais (KIRKLAND, 2002).

Vale ressaltar outra vantagem na utilização de liga de Mg como biomaterial biodegradável que é o fato de este elemento ser essencial ao organismo. O Mg é um cofator de mais de 300 reações enzimáticas no corpo, como nas sínteses de DNA, RNA e de proteínas, reprodução e crescimento celular e produção de energia celular. Suas propriedades físicas e mecânicas favoráveis, como a baixa densidade, alta tenacidade e módulo de elasticidade próximos ao do osso são outras vantagens do seu uso em relação aos biopolímeros e biocerâmicos.(GU *et.al*, 2014).

As ligas de Mg biodegradáveis, além da vantagem das propriedades mecânicas dos metais, apresentam também a propriedade de diminuição de rigidez (módulo de elasticidade) com o aumento da resistência do osso que ocorre durante o processo de crescimento ósseo. Vale lembrar que os implantes metálicos convencionais, como as ligas de titânio e aços inoxidáveis apresentam módulo de elasticidade praticamente constante o que resulta em “*stress shielding*”, ou seja, processo pelo qual a relação massa/densidade óssea diminui ao redor de um implante devido ao valor de rigidez geralmente maior, transferindo a carga ao osso adjacente durante o processo de cura dos tecidos.

Segundo Witte *et al.* (2009), as ligas de Mg podem ser utilizadas em implantes com função temporária, como placas ortopédicas e *stents* cardiovasculares, proporcionando suporte mecânico temporário, uma vez que corroem completamente após a cura celular. Entretanto, a rápida degradação e o mecanismo de corrosão localizada resultam na degeneração rápida da integridade mecânica dos dispositivos, antes da cicatrização. Além disso, impurezas podem facilitar a evolução do hidrogênio, causando substanciais taxas de corrosão galvânica e cavidades de gás locais potenciais *in vivo*. Conseqüentemente, a investigação do comportamento frente à corrosão de ligas e Mg, os quais envolvam a análise dos produtos de corrosão e da sua citotoxicidade são de suma importância para avaliar a adequação destas para aplicações clínicas.

Além das ligas de Mg como implantes temporários, as ligas de titânio e os aços inoxidáveis são muito utilizados como implantes, seja como implantes ortopédicos ou odontológicos. Na área de odontologia, é recente a proposta de combinação destes dois materiais, aço inoxidável e ligas de titânio como implantes. O efeito do acoplamento galvânico destes dois materiais na resistência à corrosão, todavia, não foi ainda investigado sendo proposta deste projeto realizar esta investigação pela técnica do eletrodo vibratório de varredura (SVET).

## **CONTRIBUIÇÕES DA PROPOSTA RELATIVAS A ASPECTOS CIENTÍFICOS, TECNOLÓGICOS E DE INOVAÇÃO**

### **Aspectos científicos**

O desenvolvimento deste projeto permitirá avançar o conhecimento atual sobre a correlação entre a composição das ligas utilizadas como biomateriais, seus produtos de corrosão, e os componentes destes produtos relacionados com os efeitos tóxicos para os pacientes. A consideração de uso de ligas de Mg como implantes temporários de utilidade para fixação durante a reconstrução óssea de fraturas é recente e o estudo de corrosão destas ligas, de grande interesse da comunidade científica. Ainda não foi estabelecido qual o mecanismo de corrosão destas ligas uma vez que apresentam comportamento diferente do que é comumente observado com a maioria das ligas metálicas. É, portanto, de grande interesse da comunidade científica a compreensão dos mecanismos de corrosão desta. O desenvolvimento deste projeto deve, portanto, gerar publicações em revistas de alto fator de impacto bem como contribuir para a formação de recursos humanos especializados nas áreas de corrosão, citotoxicidade e análise por ativação com nêutrons.

### **Aspectos tecnológicos e de inovação**

Este estudo propõe investigar uma nova configuração de implante odontológico em que são acopladas galvanicamente duas ligas de composição química totalmente diversas, a liga de Ti de grau V (Ti-6Al-4V) e o aço inoxidável ASTM F138 que é um aço de uso como biomaterial. Esta nova configuração permite uma diferente angulação do implante o que favorece sua aplicação. Todavia, os efeitos do acoplamento galvânico destas ligas e das condições de fresta gerada por tais acoplamentos na resistência à corrosão do implante com materiais diversos ainda não foram avaliados e, os resultados obtidos serão, de grande interesse tecnológico.

Os principais impactos deste projeto consistem em identificar as consequências do uso das ligas propostas para estudo na saúde do paciente, seja evitando cirurgias de remoção de implantes desnecessárias ou pela compreensão dos efeitos tóxicos da liberação de produtos de corrosão no meio fisiológico do paciente.

### **Potencial de efetiva interação entre os Centros Integrantes - Comprovação**

A equipe desta proposta tem trabalhado em cooperação/parceria por muitos anos, desde 2000 o que pode ser comprovado pelos 5 trabalhos publicados em periódicos internacionais: *Journal .of Materials Science. Materials in Medicine*, v. 1, p. 1-14, 2013; *Materials. Science Forum*, v. 591-593, p. 18-23, 2008; *Journal of Nuclear Materials*, v. 358, p. 40-46, 2006; *Materials. Science Forum*, v. 498-499, p. 86-92, 2005; v. 416-418, p. 76-81, 2003, *Toxicology in vitro* 14 (6), 497-504, 2000.

## 1. FUNDAMENTAÇÃO DO TEMA DE ESTUDO

A definição ou conceito da natureza essencial de um biomaterial mudou muito ao longo dos anos. Conforme Pires *et al* (2015) no início do uso destes materiais o objetivo foi a obtenção de materiais biocompatíveis para substituição do tecido danificado de maneira a proporcionar suporte mecânico com mínima alteração fisiológica ou comportamental ao paciente. Em seguida, o foco foi colocado no aumento da vida do implante devido ao problema de sua interação com o tecido. Nos últimos anos o enfoque tem sido no desenvolvimento de biomateriais biodegradáveis com a capacidade de serem incorporados ou absorvidos pelo tecido. A meta para o futuro nesta área é o desenvolvimento de materiais que atuem nos processos de recuperação com a introdução de novos conceitos de biomimética.

A evolução dos biomateriais ao longo do seu desenvolvimento mostra que os materiais mais usados clinicamente pertencem às categorias de biocompatíveis, bioativos e biodegradáveis, sendo os mais pesquisados os bioativos, os biodegradáveis e os biomiméticos (PIRES *et al*, 2015)

A definição de biomateriais mais aceita na área científica pela sua generalidade e coerência é a proposta por Park e Lakes (2007). Segundo estes, biomaterial é um *“material usado na fabricação de dispositivos para substituir uma parte ou função do corpo de forma segura, confiável, econômica e fisiologicamente aceitável”*.

Os biomateriais podem ser classificados como naturais, como no caso do polímero à base de quitosana, presente em carcaças de crustáceos, ou como sintéticos, como os metais e ligas, alguns polímeros, cerâmicos e compósitos. Com relação aos biomateriais metálicos, as propriedades de resistência à corrosão têm sido uma preocupação muito séria uma vez que os fluidos corpóreos são corrosivos e entram em contato direto ou indireto com o biomaterial. Os produtos de corrosão são os principais responsáveis pela biocompatibilidade do material, pois podem ocasionar danos aos tecidos vizinhos ou serem transportados por meio dos fluidos corpóreos para os diferentes órgãos do corpo humano. Conseqüentemente, é de grande interesse estudar como os biomateriais se comportam frente à corrosão e como a composição destes e os seus produtos de corrosão afetam sua função. O conhecimento desta propriedade visa propor soluções para combater a corrosão e permitir a biocompatibilidade destes.

A avaliação da composição dos biomateriais é de interesse para detectar a presença de elementos tóxicos como impurezas na liga ou elementos de sua composição fora da especificação. Além disso, os resultados destas avaliações fornecem importantes informações para aprimoramento ou desenvolvimento de novos

materiais, assim como para as indústrias ou empresas para produção de biomateriais adequados para uso.

Relativamente às características do Mg, Gu *et al.* (2014) salientam que este elemento apresenta baixa resistência à corrosão, o que é devido ao seu potencial eletroquímico padrão de - 2,363V (em relação ao eletrodo padrão de hidrogênio, EPH) ou de - 2,159V (em relação ao EPH) se óxidos ou hidróxidos de Mg são formados. As reações químicas de Mg que ocorrem nos meios fisiológicos do corpo são discutidas em algumas publicações (GU *et al.*, 2014; SONG, 2005; KIRKLAND, 2002, ESMAIL *et al.*, 2017).

Sobre as metodologias de análise da composição elementar de biomateriais e de seus produtos de corrosão, diferentes técnicas analíticas vêm sendo utilizadas. Dentre estas técnicas destaca-se a espectrometria da fluorescência de raios X por dispersão de energia (WALCZAK *et al.*, 1998; JOSEPH e SHARMA, 1999), voltametria de varredura (CHIBA *et al.*, 1997), espectrometria de absorção atômica (PONKA e EKMAN, 1998; PIERINI *et al.*, 1999, KANERVA *et al.*, 1994) e análise por ativação com nêutrons (ACHARYA *et al.*, 2012; SAIKI *et al.*, 2001; CINCU *et al.*, 2009; OUDADESSE *et al.*, 2004). CINCU *et al.* (2007) realizaram estudo comparativo entre a NAA e outras técnicas espectroscópicas e demonstraram melhor desempenho da NAA nas análises de ligas metálicas. Convém ainda salientar que alta sensibilidade da NAA é um parâmetro importante quando na análise de produtos de corrosão onde os elementos estão em concentrações muito baixas.

Estes trabalhos da literatura mostram que os estudos sobre os mecanismos de corrosão das ligas de Mg são de grande interesse devido ao seu comportamento divergente em relação a outros metais e sua importância no campo de biomateriais. A utilização de ensaios de imersão, técnicas eletroquímicas, testes de citotoxicidade e análise química pós-ensaios tem sido de grande utilidade para melhor compreensão destes mecanismos.

## 2. **OBJETIVOS**

O **objetivo principal geral** deste projeto é investigar a viabilidade de uso de ligas de Mg como biomateriais metálicos degradáveis,

Os objetivos específicos consistem em:

1. Caracterizar a composição dos elementos nas ligas de Mg, na liga de Ti grau V e no aço inoxidável ASTM F138, todos de interesse para uso como biomaterial, especificamente como implantes. Vale ressaltar que tanto no Mg considerado

puro, como em ligas de Mg, e aços inoxidáveis, são encontradas impurezas em baixos teores, mas que têm grande efeito no comportamento eletroquímico do material.

2. Caracterizar os produtos de corrosão das ligas mencionadas no ítem 1 acima, tanto quanto à morfologia por técnicas microscópicas, como quanto à composição química, visando o estudo da corrosão destas ligas..
3. Caracterizar a toxicidade dos elementos que são liberados no meio de ensaio como produtos de corrosão e correlacionar a toxicidade com o tipo e a quantidade do elemento presente nestes produtos por ensaio de citotoxicidade.
4. Investigar o efeito do acoplamento galvânico entre a liga de Ti grau V e o aço inoxidável ASTM F138 na resistência à corrosão destas ligas, investigando o tipo e localização do ataque corrosivo.
5. Propor quais combinações/arranjos entre os diferentes tipos de materiais devem ser preferencialmente utilizados e/ou evitados com base nos resultados de corrosão nos meios fisiológicos usados nos ensaios.

Para atingir os objetivos especificados acima, as seguintes atividades fazem parte deste plano:

- ✓ Estabelecimento de condições experimentais adequadas para análise de biomateriais e produtos de corrosão
- ✓ Avaliação da qualidade dos resultados analíticos com relação a exatidão e precisão dos resultados
- ✓ Análise por ativação com nêutrons das amostras de biomateriais
- ✓ Realização de ensaio de imersão dos biomateriais em solução SBF (fluido corpóreo simulado) para estudo da corrosão e
- ✓ Determinação de elementos químicos e a toxicidade nos fluidos contendo produtos de corrosão.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Materiais**

Amostras de Mg puro, da ligas AZ91 e Ti-6Al-4V (Ti grau V) e do aço inoxidável ASTM F138, serão analisadas por NAA. Para NAA estes biomateriais serão obtidos na forma de pequenos fragmentos e lascas e para os experimentos de corrosão serão utilizadas as folhas cortadas em dimensões de 1 cm x 1 cm.

Para avaliar a qualidade dos resultados analíticos com relação a precisão e exatidão da NAA serão analisados os materiais de referência SRM 363 Steel Cr-V Modified e SRM 58a Ferrosilicon (73 % Si – regular grade) e SRM 57a Silicon Metal procedentes do National Institute of Standards and Technology (NIST), USA.

### **3.2. Análise da composição elementar das ligas e dos produtos de corrosão pelo método de análise por ativação com nêutrons (NAA)**

As análises das ligas e dos seus produtos de corrosão têm como objetivo ampliar os conhecimentos sobre os elementos traço neles presentes que possam causar efeitos prejudiciais ao serem usados como biomateriais de modo a dar segurança ao paciente. Além disso, a concentração de elementos químicos nos produtos de corrosão é muito baixa requerendo metodologia de alta sensibilidade, além de a amostra apresentar baixa solubilidade

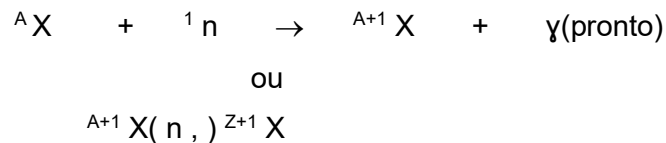
Com o aprimoramento do conhecimento sobre o papel de diversos elementos no organismo as determinações de suas baixíssimas concentrações tem sido um desafio de diversos pesquisadores.

No Laboratório de Análise por Ativação Neutrônica do IPEN-CNEN/SP), o método de ativação com nêutrons (NAA) vem sendo aplicado nos mais variados tipos de amostras visando uma contribuição às pesquisas das áreas da saúde. Dando continuidade a esta linha de pesquisa, na presente proposta o método de NAA será ampliado para análise de ligas para uso como biomateriais e de seus produtos de corrosão. No que concerne a esta metodologia NAA convém salientar que esta técnica nuclear vem sendo amplamente utilizada na análise de ligas devido a qualidade de seus resultados com relação à exatidão e precisão bem como devido ao seu caráter de alta sensibilidade, possibilidade de análise multielementar, a pequena quantidade de amostra requerida e ausência dos problemas de contaminação das amostras após a irradiação no reator. Além disso, a NAA não requer a dissolução da liga para sua análise. Também convém salientar que a caracterização de amostras de interesse nas áreas da saúde como os biomateriais por meio de técnicas nucleares como a ativação neutrônica constitui uma das aplicações mais relevantes dos reatores nucleares de pesquisa.

A análise por ativação com nêutrons é um método para análise qualitativa e quantitativa de elementos. Neste processo os isótopos estáveis são transformados em isótopos radioativos e, portanto, ocorre a produção de radionuclídeos artificiais a partir de elementos estáveis. Este método se baseia na medida de radioatividade que é induzida aos elementos da amostra resultante da sua irradiação com nêutrons.



Este processo de interação para formação de um nuclídeo radioativo pode ser representado pela seguinte reação nuclear:



A medida da radiação emitida pelo  ${}^{A+1}\text{X}$  permite a análise qualitativa e quantitativa do elemento que deu origem a este radioisótopo

A atividade gama induzida a um elemento após certo tempo de irradiação é dada por (De SOETE et al, 1972)

$$A = \{\epsilon \sigma \Phi N m f [1 - e^{-0,693t_i/t_{1/2}}]\} / [M] \quad (4)$$

em que  $A$  = atividade ;  $\epsilon$  = coeficiente de detecção ou eficiência do detetor;  $\Phi$  = fluxo de nêutrons, em  $\text{n cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ;  $\sigma$  = secção de choque em  $\text{cm}^2$ ;  $N$  = constante de Avogadro;  $m$  = massa do elemento;  $f$  = abundância isotópica do nuclídeo alvo;  $M$  = massa atômica do elemento;  $t_i$  = tempo de irradiação;  $t_{1/2}$  = tempo de meia-vida do radionuclídeo considerado.

A massa  $m$  da relação (4) pode ser obtida desde que todos os seus parâmetros nucleares (meia vida, massa atômica, abundância isotópica, secção de choque de nêutrons, intensidade de raios gama, etc.) sejam conhecidos. Para evitar o uso destes parâmetros, que nem sempre são disponíveis com uma boa exatidão, é frequente o uso do método comparativo, onde as amostras são irradiadas simultaneamente com os padrões dos elementos a serem determinados e após a irradiação, são medidos na mesma geometria.

Escrevendo a relação (4), para um mesmo elemento da amostra e do padrão, que foram irradiados e medidos na mesma geometria, pode-se obter as seguintes relações para as atividades para tempo de decaimento  $t = 0$ , isto é, no final da irradiação:

$$A_{a,0} = \{\epsilon \sigma \phi N m_a f [1 - e^{-0,693t_i/t_{1/2}}]\} / \{M\} \quad (5)$$

$$A_{p,0} = \{\epsilon \sigma \phi N m_p f [1 - e^{-0,693t_i/t_{1/2}}]\} / \{M\} \quad (6)$$

em que os índices  $a$  e  $p$  se referem a amostra e padrão, respectivamente. Dividindo-se a relação (5) por (6), e para o tempo de decaimento  $t = t_0 = 0$ , tem-se:

$$A_{a,0} / A_{p,0} = m_a/m_p \quad (7)$$

Nesta relação (7)  $A_{a,0}$  e  $A_{p,0}$  são os valores das atividades em taxas de contagens da amostra e padrão medidos para um mesmo tempo de decaimento. Sendo na prática, a amostra e padrão são medidos para diferentes tempos de decaimento,  $t_{da}$  e  $t_{dp}$ , respectivamente, aplica-se a relação da lei de decaimento radioativo para a correção do tempo de decaimento.

Pela lei de decaimento radioativo tem-se (FRIEDLANDER et al., 1964):

$$A = A_0 e^{-0,693 \text{ td}/t_{1/2}} \quad (8)$$

Na relação (8) A e A<sub>0</sub> são as taxas de contagens para tempos de decaimento t<sub>d</sub> e t=0, respectivamente. Escrevendo a relação (8) para amostra e padrão tem-se:

$$A_a = A_{0a} e^{-0,693 \text{ tda}/t_{1/2}} \quad (9)$$

$$A_p = A_{0p} e^{-0,693 \text{ tdp}/t_{1/2}} \quad (10)$$

Substituindo equações (9) e (10) na equação (7), tem-se:

$$m_a = [m_p \cdot A_a \cdot e^{-0,693(\text{tdp})/t_{1/2}}] / [A_p \cdot e^{-0,693(\text{tda})/t_{1/2}}] \quad (11)$$

Sendo a concentração do elemento na amostra C<sub>a</sub> = m<sub>a</sub>/M<sub>a</sub>, tem-se

$$C_a = [m_p \cdot A_a \cdot e^{-0,693(\text{tdp})/t_{1/2}}] / [M_a A_p \cdot e^{-0,693(\text{tda})/t_{1/2}}] \quad (12)$$

ou

$$C_a = [m_p \cdot A_a \cdot e^{0,693(\text{tda} - \text{tdp})/t_{1/2}}] / [M_a A_p] \quad (13)$$

em que os índices a e p se referem a amostra e padrão, respectivamente; M<sub>a</sub> = massa total de amostra; m<sub>p</sub> = massa do elemento no padrão, C<sub>a</sub> = concentração do elemento na amostra, t<sub>1/2</sub> = meia vida do radioisótopo considerado, t<sub>d</sub> = tempo de decaimento. O termo e<sup>0,693 ( tda - tdp ) / t1/2</sup> da relação (13) permite o cálculo das taxas de contagens da amostra e do padrão para o mesmo tempo de decaimento.

A relação (13) será utilizada no cálculo da concentração dos elementos.

### **Preparação de padrão sintético de elementos.**

Serão utilizadas soluções padrão adquiridas da Spex CertiPrep USA com as concentrações de elementos de interesse certificadas. A partir destas soluções padrão serão preparadas soluções mais diluídas as quais serão pipetadas sobre tiras de papel de filtro Whatman No. 40. Serão utilizados materiais volumétricos (balões volumétricos, pipetas) previamente verificados quanto a sua calibração no preparo destes padrões sintéticos. Estas tiras de papel com as soluções pipetadas serão colocadas num dessecador para a secagem e posteriormente em invólucros de polietileno os quais serão selados com o auxílio de uma seladora elétrica e folha de celofane. As folhas de polietileno incolor para confecção dos invólucros são previamente desmineralizadas com solução de ácido nítrico p.a. diluído e água purificada no sistema de purificação de água da Millipore, MILLIQ, seguida de secagem a temperatura ambiente, tomando-se o cuidado para que não ocorra contaminação. No caso dos padrões para análise de produtos de corrosão os padrões sintéticos serão preparados em cápsulas de alta pureza adquirida da Vrije Universiteit Amsterdam, The Netherlands. As soluções padrões serão pipetadas no interior desta capsula contendo um pequeno fragmento de tira de papel de filtro.

### **Procedimento de NAA.**

O procedimento de NAA consistirá das seguintes etapas: preparação das amostras para irradiação no reator nuclear, irradiação no reator, realização das medidas, processamento de dados e interpretação dos resultados.

### **Análise dos materiais de referência certificados e amostras de biomateriais:**

No caso dos materiais de referência e das amostras de biomateriais cerca de 50 mg de cada amostra pesados em invólucros de polietileno serão irradiados juntamente com os padrões sintéticos de elementos sob fluxo de nêutrons térmicos da ordem de  $2,0 \times 10^{12} \text{ n cm}^{-2}\text{s}^{-1}$  do reator nuclear de pesquisa IEA-R1. Serão realizadas duas séries de irradiações. Irradiações curtas de 10 a 30 s para as determinações dos elementos tais como Al, Cl, Cu, Mg, Mn, Na, Ti e V. Nas irradiações longas de 4 a 8 h serão determinados os elementos como As, Ba, Br, Cd, Co, Cr, Fe, K, Mo, Ni, Rb, Sb, Zn e terras raras. As condições adequadas para irradiação serão estabelecidas neste trabalho.

As medições de atividade gama dos radioisótopos formados serão feitas usando um detector semiconductor de Ge hiperpuro Modelo GC19030 ligado a um analisador digital de espectro DAS 1000 ambos da marca Canberra e a um microcomputador. As amostras e os padrões dos elementos serão medidos em diferentes tempos de decaimento para eliminar o problema de interferências espectrais na análise e determinação de um número maior de elementos. Para aquisição dos espectros gama e seu processamento, o programa Genie 2000 versão 3.1 da Canberra será utilizado. A identificação dos radioisótopos será feita pelas energias dos raios gama e meia vida. As concentrações dos elementos serão calculadas pelo método comparativo de análise por ativação aplicando a relação (13).

### **Análise dos produtos de corrosão.**

Cerca de 100 a 500 microlitros da solução contendo os produtos de corrosão serão pipetados em capsulas de polietileno da alta pureza e após a secagem da solução usando uma lâmpada de raios infravermelhos serão irradiados no reator como no caso das análises dos biomateriais.

### **3.3 Avaliação da citotoxicidade de produtos de corrosão**

A toxicidade da solução de produtos de corrosão será avaliada pelos ensaios de citotoxicidade utilizando o método de incorporação do vermelho neutro,

metodologia descrita no trabalho de Rogero *et al* (2003). Estes ensaios serão realizados no Centro de Química Ambiental (CQMA) do IPEN.

O teste de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro é um ensaio *in vitro* eficaz, de baixo custo, reprodutível, rápido e quantitativo para selecionar substâncias potencialmente tóxicas. Está baseado no fato de que o vermelho neutro é um corante solúvel em água e que atravessa a membrana plasmática celular e se concentra nos lisosomas de células vivas. Muitas substâncias danificam as membranas celulares e lisosomais resultando no decréscimo de captura e ligação do vermelho neutro. Portanto é possível distinguir entre células vivas e mortas pela medida da intensidade de cor no final do ensaio.

A toxicidade será verificada pela medida da viabilidade das células utilizando o corante vital vermelho neutro e fazendo a leitura da densidade óptica nos poços em espectrofotômetro leitor de placa ELISA.

O procedimento do ensaio *in vitro* de citotoxicidade seguirá as normas da *International Standard Organization* (ISO 10993 – 5) e a metodologia descrita na literatura (MORENO, 2009, ROGERO *et al.* 2003).

Conforme o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization –ISO) norma ISO10993 (ISO, 1992) o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é considerado o primeiro método para avaliação da biocompatibilidade, uma vez que este ensaio permite a distinção entre materiais tóxicos e não tóxicos de forma relativamente barata e rápida. Uma vez comprovada a não citotoxicidade o material poderá ser submetido a ensaios em animais de laboratório. A toxicidade de um material é, normalmente, ocasionada pela liberação de um elemento ou composto em quantidades suficientes para matar as células, devido à inibição das vias metabólicas, alterações na permeabilidade celular, inibição enzimáticas, entre outras.

### **Cultura celular e preparo da microplaca**

Será utilizada a linhagem celular NCTC-clone L929 (CCIAL 020) de tecido conectivo de camundongo, proveniente do Núcleo de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz – SP - Brasil. O meio de cultura será o meio *Eagle* (MEM), adicionado de 10% de soro fetal bovino, aminoácidos não essenciais e piruvato de sódio (MEM-uso). O cultivo das células será feito em garrafa de cultura celular, em meio de cultura MEM-uso. Após o crescimento confluyente, as células serão destacadas utilizando-se uma solução ATV (Trypsina 0,2% e Versene 0,02%). O número de células deverá ser acertada para  $3,5 \times 10^5$  células por mL.

Para o preparo da microplaca de 96 poços com células em cultura, serão distribuídos 200  $\mu$ L da suspensão celular em cada poço ( $7 \times 10^4$  células/poço). A placa será incubada em estufa úmida a 37 °C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas, a fim de atingir a confluência desejada. Esta etapa será realizada no Núcleo de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz.

### **Preparo do extrato**

Os extratos das ligas serão preparados em solução extratora (MEM-uso ou solução tampão PBS pH 7,4), na proporção de 1 cm<sup>2</sup> da amostra/ mL da solução extratora, acondicionados em frascos estéreis por 10 dias em incubadora a 37 °C.

### **Realização do teste**

Serão realizadas diluições dos extratos da amostra a ser analisada e dos controles, em meio de cultura celular, nas seguintes diluições: 100; 50; 25; 12,5 e 6,25%. O meio de cultura da microplaca será desprezado e substituído pelas diluições das amostras, em triplicata. O controle positivo a ser empregado será o látex de borracha natural na proporção de 1 cm<sup>2</sup>/mL do MEM-uso e o controle negativo será placa de titânio em solução extratora na mesma proporção da amostra metálica. Em cada microplaca serão reservados 6 poços para o controle de células do ensaio e a substituição do meio de cultura deverá ser feita por MEM-uso fresco.

A microplaca será mantida em incubadora a 37°C e atmosfera úmida contendo 5% CO<sub>2</sub>, durante 24 horas. Após este período, as soluções serão substituídas pelo meio de cultura contendo vermelho neutro, e a placa será deixada por 3h para a incorporação do corante vital. Decorrido este tempo, a microplaca deverá ser lavada duas vezes com PBS (solução-tampão fosfato-salina pH 7,4) e uma vez com solução de lavagem (1% cloreto de cálcio em formaldeído 0,5%). Serão distribuídos 200  $\mu$ L da solução extratora (uma parte de álcool etílico: uma parte de ácido acético 2%) em cada poço e em seguida, realizada a leitura da microplaca em densidade óptica, no espectrofotômetro leitor de ELISA Sunrise da Tecan, após agitação por 10 minutos, em 540 nm e filtro de referência de 620 nm.

Com a obtenção dos resultados da leitura em densidade óptica, será calculada a média da porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle de células (100%), que deverá ser colocada em função da concentração da solução das soluções-teste em gráfico para obter as curvas de viabilidade celular. Através desta curva será encontrado o índice de citotoxicidade (IC50%) que significa a concentração da amostra que induz 50% de lise ou morte celular. No gráfico, a curva de viabilidade celular da amostra que estiver abaixo da linha estabelecida pelo IC50%, a mesma será

considerada citotóxica e a amostra que apresentar a curva de viabilidade celular acima da linha do IC50%, será considerada não citotóxica.

### **3.4. Ensaios de corrosão**

#### **Ensaios de imersão**

Amostras de Mg puro, liga de Mg com área exposta de 1 cm<sup>2</sup> serão expostas a solução teste que simula o fluido corpóreo (SBF) a temperatura 37 °C por período de 1 a 7 dias. A solução de SBF será preparada conforme Kokubo e Takadama (2016). Em períodos crescentes de exposição, amostras serão removidas do meio e a superfície destas será observada por microscopia ótica e eletrônica de varredura. Além disso, as concentrações dos elementos dissolvidos na solução teste serão determinadas pelo método de ativação com nêutrons. Uma parte da solução após diferentes tempos de ensaio será utilizada para avaliação da toxicidade dos produtos de corrosão por meios ensaios de citotoxicidade.

#### **Ensaios pela técnica do eletrodo vibratório de varredura (SVET)**

Amostras da liga de Ti (grau V) acopladas galvanicamente com aço inoxidável ASTM F138, combinação esta utilizada em implantes dentários, serão expostas a saliva artificial e as superfícies expostas serão observadas por microscopia ótica, a composição da solução de ensaio será analisada por NAA e a citotoxicidade dos produtos de corrosão liberados no meio será investigada. Além disso, serão realizados ensaios eletroquímicos locais pela técnica de varredura do eletrodo vibratório (SVET) para investigar o efeito do acoplamento galvânico entre as duas ligas, Ti-6Al-4V e aço inoxidável ASTM F138.

A técnica de varredura do eletrodo vibratório (SVET) será realizada utilizando um equipamento da Applicable Electronics<sup>TM</sup> controlado pelo software “Automated Scanning Electrode Technique ASET 4.0 software (Science Wares<sup>TM</sup>)”. Sondas de Pt-Ir isoladas e com platina preta depositada serão utilizadas como eletrodo vibratório para o sistema SVET. A sonda será colocada a  $(100 \pm 3)$  μm acima da superfície, vibrando nos planos perpendicular (Z) and paralelo (X) à superfície da amostra. A amplitude de vibração será de 19 μm, e as frequências de vibração da sonda serão 174 Hz (X) e 73 Hz (Z). A varredura será realizada sobre a área exposta para obtenção de mapas de 35 x 25 pontos. Um intervalo de tempo entre cada ponto de aquisição de densidade de corrente de 0,5 s será adotado. Todos os ensaios serão realizados em uma gaiola de Faraday a  $(20 \pm 2)$  °C. Um adesivo e a resina epóxi de embutimento serão o reservatório para o eletrólito. Os ensaios serão realizados na

solução por 24 h, com os mapas sendo obtidos a cada 2 h. Antes e após a adição do eletrólito, a aquisição de imagem será realizada.

O presente projeto contempla a interação/colaboração de três Centros do IPEN (CCTM, CRPq e CQMA) congregando profissionais muito experimentados nas áreas fundamentais para a sua realização:

- Preparo de amostras de ligas para experimentos de corrosão e Isolda atividades estas que serão realizadas no CCTM
- Determinação de elementos químicos por Ativação Neutrônica (NAA) no CRPq
- Ensaios de citotoxicidade no CQMA

### **3.5. Descarte de resíduos/ rejeitos químicos**

A quantidade de resíduos químicos a serem gerados do desenvolvimento deste plano de trabalho é muito pequena uma vez que será utilizado o método puramente instrumental de ativação com nêutrons. Os resíduos químicos líquidos gerados no Laboratório de Análise por Ativação Neutrônica são transferidos para tanque de retenção para análise e posterior tratamento ou descarte. As amostras radioativas após as medições serão armazenadas em sacos destinados para rejeitos radiativos os quais serão enviados para a Gerência de Rejeito do IPEN.

## **4. TRATAMENTO DE DADOS E INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS**

### **4.1. Diferença padronizada – Z score**

O controle de qualidade dos resultados com relação à exatidão será feito pela análise dos materiais de referência certificados. Para os resultados das análises obtidos serão calculados os desvios padrão relativos, erro percentual e os parâmetros Z score ou diferença padronizada aplicando a equação 15 (KONIECZKA e NAMIEŚNIK, 2009).

$$Zscore = (X_{lab} - X_{ref}) / (SD^2 + u_{(ref)}^2)^{1/2} \quad (14)$$

Sendo,  $X_{lab}$  o valor obtido experimentalmente,  $X_{ref}$  o valor certificado,  $SD$  o desvio padrão do valor obtido e  $u_{(ref)}$  a incerteza combinada do valor certificado. Se  $|Z score| \leq 2$ , o resultado obtido é considerado satisfatório.

### **4.2. Tratamento dos resultados das análises de biomateriais e dos produtos de corrosão.**

O tratamento destes resultados analíticos será por meio da análise estatística descritiva básica (cálculo da média aritmética e do desvio padrão) e testes estatísticos para avaliar a precisão dos resultados e para comparação dos resultados.

### 4.3. Limites de detecção e de determinação.

O limite de detecção (LD) é a concentração mínima que pode ser detectada por um determinado método a um nível de significância (no caso de 5%) e o limite de determinação ou de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser quantificada ao nível de significância de 5%. Estes limites serão avaliados segundo o critério de Currie (CURRIE 1999) por meio dos dados obtidos das relações (15) e (16). Segundo este critério de Currie, na NAA a quantidade mínima detectável e a quantificável em termos de taxas de contagens são dadas, respectivamente, por

$$LDT = 3,29 \times (BG^{1/2} / LT) \quad (15)$$

$$LQT = 10 \times (BG^{1/2} / LT) \quad (16)$$

em que LDT e LQT são as taxas de contagens correspondentes às concentrações mínimas detectáveis e quantificável, respectivamente; BG é taxa de contagem referente a área sob o pico (background) e LT é o tempo de medição ou contagens.

Uma vez obtido LDT e LQT, as concentrações mínimas dos elementos serão calculadas pelo método comparativo utilizando a relação (13).

## 5. INFRAESTRUTURA DISPONÍVEL

Este projeto será desenvolvido nos Laboratórios de Análise por Ativação Neutrônica do Centro do Reator, de Eletroquímica e Revestimentos Protetores do Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais e de Citotoxicidade do Laboratório de Ecotoxicidade do Centro de Química e Meio Ambiente que têm toda a infraestrutura necessária à sua execução.

Os seguintes itens de infraestrutura estão disponíveis no:

### 5.1 Laboratório de Análise por Ativação Neutrônica:

- Laboratórios com bancadas, capelas com exaustão, bombas de vácuo e blindagens de chumbo para trabalhos com material radioativo. As instalações elétricas, hidráulicas, os pisos são apropriados e há os tanques de retenção de resíduos radioativos e químicos com o objetivo de atender os requisitos para a implementação do sistema de gestão de qualidade ambiental.
- Reator nuclear de pesquisa IEA-R1, potência de operação até 4,5 MW, com fluxo de nêutrons térmicos de  $10^{11}$  a  $10^{13} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Este reator está no Centro do Reator de Pesquisas o qual foi re-certificada segundo a norma ISO 9001:2014.
- Uma estação pneumática para irradiações por períodos curtos no reator.
- Salas de medidas nucleares com detectores de Ge hiperpuro para espectrometria gama e detectores Geiger Muller e de plástico para medida da



radiação beta. Diariamente são realizadas as verificações quanto ao funcionamento destes equipamentos. Nas salas de medidas, estão instalados o condicionador de ar central e o sistema ininterrupto de tensão “no break”.

- Salas com balanças analíticas calibradas pelo laboratório pertencente à Rede Brasileira de Calibração do INMETRO
- Sala para armazenamento de amostras para análise e materiais certificados de referência
- Microcomputadores e programas de computação para análise de espectros gama e análise de resultados
- Sala limpa com cabine de fluxo laminar classe 100 para tratamento de amostras
- Sala para freezers, geladeiras para armazenagem de amostras perecíveis.
- Medidores de umidade, estufas com circulação de ar forçada, muflas, liofilizadores, moinhos, sistemas de purificação de água MilliQ da Millipore, medidores de pH, medidor de umidades e condutivímetros
- Espectrômetro de absorção atômica por chama (FAAS) e espectrômetro de absorção atômica por forno de grafite (GF AAS).

### **5.2 Laboratório de Eletroquímica e Revestimentos Protetores do CCTM:**

- Bancadas, capelas, cilindros de gases e estabilizadores de tensão.
- Potenciostato/galvanostatos e analisadores de resposta de frequências.
- Técnica do eletrodo vibratório de varredura (SVET).
- Câmara de névoa salina para ensaios cíclicos, câmaras de exposição à radiação UV.
- Microscópio eletrônico de varredura (MEV) e Microscópio Óptico Leica.
- Politrizes para lixamento mecânico e automático
- pHmetros e condutivímetros
- Microscópio óptico (LEICA)
- Espectrômetro de infravermelho.

### **5.3 Laboratório de Citotoxicidade do CQMA**

- Capela de fluxo laminar.
- Incubadora de CO<sub>2</sub> com cilindro de CO<sub>2</sub>
- Balança analítica
- Microscópio invertido
- Espectrofotômetro leitora de placa ELISA
- Centrífuga

## **6. PREVISÃO DE PRODUÇÃO DE C&T E DISPONIBILIZAÇÃO DOS RESULTADOS DA PESQUISA PARA A SOCIEDADE**

Prevê-se que como resultado deste projeto serão produzidos 4 trabalhos de publicação internacional (2 por ano), o projeto contribuirá para a formação de 1 doutorando e 2 mestrados.

A disponibilização dos resultados da pesquisa para a sociedade se dará por meio da divulgação dos resultados do projeto em congressos, nacionais e internacionais e em workshops do grupo de pesquisa.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ACHARYA R; KOLAY S; REDDY AVR (2012) Determination of nickel in finished product alloys by instrumental neutron activation analysis and spectrophotometry. **J. Radioanal Nucl Chem** 294:309-3013

CHIBA A; SAKAKURA S; KOBAYASHI K; KUSAYANAGI K (1997) Dissolution amounts of nickel, chromium and iron from SUS 304, 316, 444 stainless steels in sodium chloride solutions **J Mat Sci** 32 (8):1995-2000.

CINCU Em; CRACIUM L; MANEA-GRIGORE I; CAZAN IL; MANU V; BARBOS D; COCIS A (2009) Application of the INAA technique for elemental analysis of metallic biomaterials used in dentistry **Appl Radiat Isot** 67:2133-2136.

CINCU Em; MANCA I; MANU V; BARBOS D; SIMA,O; GUSTAVSSON I; VERMAERCKE P; VAJDA V; MOLNAR Js, POLOWSKA-MOTRENKO H (2007) Comparative performance of INAA and other spectroscopy techniques in the elemental analysis of stainless steel materials. **J Radioanal Nucl Chem**, 274(1):199-205.

CURRIE L.A. Detection and quantification: origins and historical overview. **Analytica Chimica Acta**, v.391, p.127-134, 1999.

DE SOETE, D., GIJELS, R; HOSTE, H. **Neutron activation analysis**, London, Wiley Interscience, 1972.

DING W (2016) Opportunities and challenges for the biodegradable magnesium alloys as next-generation biomaterials **Regen Biomater** 3(2):79-86

ESMAILY M; SVENSSON JE; FAJARDO S; BIRBILIS N; FRANKEL GS; VIRTANEN S; ARRABAL R; THOMAS S; JAHANSSON LG (2017) Fundamentals and advances in magnesium alloy corrosion **Prog Mater Sci** 89:92-193.

FRIEDLANDER, G.; KENNEDY, J.W.; MILLER, J. M (1964), **Nuclear and radiochemistry**, 2<sup>nd</sup> edition, London, John Wiley & Sons, p. 6.

GU X.; LO SS; LI XM; FAN YB (2014) *Magnesium based degradable biomaterials: a review.* **Front Mat Sci.** 8(3):200-218.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION (1992) ISO 10.993. Biological evaluation of medical devices, Part 5: Tests for cytotoxicity in vitro methods, p 1-7.

JOSEH D; SHARMA IG (1999) Elemental analysis of Cu-Ni and Nd-Al alloys and, nickel and iron powders by energy dispersive X-ray fluorescence (EDXRF) technique. **J. Radioanal Nucl Chem**, 240(1):353-356.

KANERVA L; SIPILAINMA T; ESTALANDER T; ZITTING A; JOLANKI R; TARVAINEN K (1994) Nickel release from metals, and a case of allergic contact-dermatitis from stainless steel **Contact Derm** 31(5): 299-303.

- KIRKLAND NT (2002) Magnesium biomaterials: past, present and future **Corros Eng Sci Techn** 47(5):322-328.
- KONIECZKA, P.; NAMIEŚNIK, J. **Quality assurance and quality control in the analytical chemical laboratory – A practical approach**, New York: CRC Press, p. 27, 2009.
- KOKUBO T; TAKADAMA H (2006). How useful is SBF in predicting in vivo bioactivity? **Biomaterials** 27:2907-2915.
- MORENO, C.S. (2009) Estudo do efeito radioprotetor do resveratrol. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN/CNEN-SP, São Paulo, Brasil.
- OUADESSE H; MARTIN S; DERRIEN AC; LUCAS-GIROL A; CATHELINEAU G; BLAONDIAU G (2004) Determination of Ca, P, Sr and Mg in the synthetic biomaterial aragonite by NAA. **J. Radioanal Nucl Chem.** 262(2):479-483.
- PARK J; LAKES RS (2007) Biomaterials. An introduction, New York, Springer Science +Business Media, 3<sup>rd</sup> edition.
- PIERINI G; FINI M; GIAVARESI C; DALLARI S; BRUN MB; ROCCA M; ALDINI NN; GIARDINO R (1999) Atomic absorption spectrophotometry (AAS) for the evaluation of metallosis in prostheses and artificial organs: a new approach **Int J Artif Organs** 22(7):522-527.
- PIRES ALR; BIERHALZ ACK.; MORAES, AM (2015) Biomateriais: tipos, aplicações e mercado **Quím Nov**, 38(7):957-971.
- PONKA A; EKMAN A (1998) Insensitivity of the routine dimethylglyoxime test for detecting release of nickel from earrings **Sci Total Environ** 224:161-165
- RATNER BD; HOFFMAN AS; SCHOEN FJ; LEMONS JE (2013) **Biomaterials science - An introduction to materials in medicine**; Elsevier: Oxford, cap. Biomaterials Science: An Evolving, Multidisciplinary Endeavor. *Apud* PIRES ALR; BIERHALZ ACK; MORAES AM(2015) *Biomateriais: tipos, aplicações e mercado*. **Quím Nova**, 38(7):957-971
- ROGERO SO; LUGÃO AB; IKEDA I; CRUZ AS(2003) Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo de duas metodologias. **Mat Res** 6(1):317-320
- SAIKI M; ROGERO SO; COSTA I; CORREA OV; HIGA OZ (2001) Characterization of ear piercing studs and their corrosion products by neutron activation analysis **J Radioanal Nucl Chem** 248(1):133-136.
- SONG G(2005) Recent progress in corrosion and protection of magnesium alloys, **Adv Eng Mat** 7(7):563-586.
- WALCZAK J; SHAHGALDI F; HEATLEY F (1988) In vivo corrosion of 316L stainless-steel hip implants: morphology and elemental compositions of corrosion products. **Biomaterials**, 19:229-237.
- WITTE F; HORT N; VOGT C; COHEN S; KAINER KU; WILLUMEIT R; FEYERABEND F (2009) Degradable biomaterials based on magnesium corrosion **Curr Opin Solid State and Mat Sci**, 12: 63-72.

**8. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES**

| Atividades  | 1º. Ano |         |         |         | 2º. Ano |         |         |         |
|---|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|   | 1º Trim | 2º Trim | 3º Trim | 4º Trim | 1º Trim | 2º Trim | 3º Trim | 4º Trim |
| Atualização da pesquisa bibliográfica                         | X       | X       | X       | X       | X       | X       | X       | X       |
| Aquisição de materiais de consumo e permanente                | X       | X       | X       | X       | X       | X       | X       | X       |
| Estabelecimento de condições adequadas para análise           | X       |         |         |         |         |         |         |         |
| Análise de materiais de referência certificados               | X       |         |         |         | X       |         |         |         |
| Estudo de corrosão  | X       | X       | X       | X       | X       | X       | X       |         |
| Análises de biomateriais e de produtos de corrosão            |         | X       | X       | X       | X       | X       | X       |         |
| Ensaio de citotoxicidade                                      |         | X       | X       | X       | X       | X       |         |         |
| Tratamento estatístico de dados e interpretação de resultados |         |         | X       | X       | X       | X       | X       | X       |
| Divulgação de resultados em eventos científicos               |         |         | X       | X       |         |         | X       | X       |
| Redação e submissão de trabalho para publicação               |         |         |         | X       | X       |         | X       | X       |
| Elaboração de relatórios e prestação de contas                |         |         |         | X       |         |         |         | X       |