

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE**

Thaís Casagrande Paim

**Análise *in vitro* e *in vivo* da
biocompatibilidade de amostras de
Ferro com pureza absoluta (P.A.) de
99,95% e 99,5% produzidas por
metalurgia do pó para uso em
dispositivos médicos**

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre
2020

Thaís Casagrande Paim

**Análise *in vitro* e *in vivo* da
biocompatibilidade de amostras de
Ferro com pureza absoluta (P.A.) de
99,95% e 99,5% produzidas por
metalurgia do pó para uso em
dispositivos médicos**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Ciências da
Saúde de Porto Alegre como requisito
para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dra. Márcia Rosângela Wink

Porto Alegre
2020

Catálogo na Publicação

Casagrande Paim, Thaís

Análise in vitro e in vivo da biocompatibilidade de amostras de Ferro com pureza absoluta (P.A.) de 99,95% e 99,5% produzidas por metalurgia do pó para uso em dispositivos médicos / Thaís Casagrande Paim. -- 2020.

57 p. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2020.

Orientador(a): Márcia Rosângela Wink.

1. Ferro puro. 2. Biocompatibilidade. 3. Materiais metálicos biodegradáveis. 4. Metalurgia do pó. 5. Dispositivos médicos. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

*Dedico à minha avó Matilde (In
Memoriam) que partiu no início
dessa jornada, mas nunca deixou de
estar presente em minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à **Deus** que sempre foi meu alicerce espiritual, amparando-me nos momentos de angústias e abençoando-me em cada novo desafio.

À **Prof Márcia** por ter me orientado em mais essa etapa da vida acadêmica. Sua competência, dedicação e disponibilidade, mesmo em período de férias, me inspiram a ser no futuro uma profissional como você.

Aos meus pais **Domingas** e **Valdecir** que sempre me apoiaram e nunca mediram esforços para que eu tivesse uma educação de qualidade. Se hoje eu completo mais esse ciclo da minha vida é porque eles deram condições para que isso acontecesse.

Ao **Renan** que estava comigo, independentemente da distância que nos separava. Ele foi meu ombro amigo, aquele que com quem compartilhei todas as alegrias e também as tristezas desse período. Sua tranquilidade e otimismo ajudaram a neutralizar minha ansiedade e me fazer valorizar as pequenas conquistas dessa trajetória.

Aos colegas do **Laboratório de Biologia Celular da UFCSPA**. Agradeço em especial à **Lili**, a qual sempre considerei meu anjo da guarda no laboratório; **Isadora** que foi minha companheira de experimentos, sendo solícita e dedicada em todas as atividades. Fico muito contente de ter tido a oportunidade de co-orientar seus primeiros passos na ciência e tenho orgulho da cientista que está se tornando; **Samlai** pelo companheirismo e amizade nesses dois anos de mestrado, sua parceria foi fundamental para mim; **Carla** pela ajuda nos experimentos e parceria desde a iniciação científica; **Raquel** pela ajuda em momentos difíceis, pelos ensinamentos e as alegrias compartilhadas; **Gabi Roliano** por toda ajuda e companheirismo; **Jéssica** pelas discussões científicas, ajuda em protocolos e por compartilhar tantas risadas; **Ana** pelos conselhos, opiniões e toda ajuda prestada; **Luiza** por ser sempre tão solícita e disposta em ajudar; **Cris** por ter me ensinado muito do que eu sei hoje sobre cultivo celular e **Ju** não apenas por ter me ensinado muito sobre a vida

científica, mas também por ter feito eu sentir que tinha um lar e ser minha família em Porto Alegre.

Ao **Diego**, que colaborou imensamente com esse trabalho, produzindo as amostras que foram testadas.

Aos meus **familiares** e **amigos** que sempre me deram apoio e entenderam meus momentos de ausência.

À **Capes** pela bolsa de mestrado e às demais agências de fomento.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte dessa formação, o meu muito obrigada!

“Be the change that you wish to see in the
world.”

— Mahatma Gandhi

SUMÁRIO

1. REFERENCIAL TEÓRICO.....	10
1.1 BIOMATERIAIS.....	10
1.1.1 Classificação dos Biomateriais.....	11
1.2 MATERIAIS METÁLICOS BIODEGRADÁVEIS.....	12
1.3 APLICAÇÃO DOS BIOMATERIAIS METÁLICOS: <i>STENT</i> VASCULARES.....	13
1.4 FERRO COMO BIOMATERIAL PARA STENTS BIODEGRADÁVEIS.....	16
1.4.1 Formas Cristalinas do Ferro.....	17
1.5 MANUFATURA DE STENTS.....	18
1.6 METABOLISMO DO FERRO NO ORGANISMO.....	19
1.7 HISTOFISIOLOGIA DOS VASOS SANGUÍNEOS.....	21
1.8 CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS (MSCS).....	22
2. JUSTIFICATIVA.....	25
3. OBJETIVOS.....	26
3.1 OBJETIVO GERAL.....	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
5. ARTIGO.....	32
6. CONCLUSÃO.....	46
ANEXOS.....	47
ANEXO A – Parecer de aprovação do comitê de Ética da UFCSPA e da ISCMPA: Isolamento de células a partir de material de descarte humano para o uso em medicina regenerativa.....	47
ANEXO B – Parecer de aprovação do comitê de Ética da UFCSPA: Avaliação da hemocompatibilidade de biomateriais.....	53
ANEXO C – Parecer de aprovação do comitê de Ética no uso de animais.....	56
ANEXO D – Normas da revista Materials Science and Engineering: C.....	57

RESUMO

Materiais metálicos biodegradáveis são promissores candidatos ao uso em *stents* vasculares porque eles podem propiciar um suporte estrutural temporário para o vaso durante o período de remodelamento das paredes. Os métodos de moldagem e tratamento termoquímico são os mais utilizados em implantes médicos. Entretanto, como metais e ligas porosas têm menos resistência a corrosão, a metalurgia do pó torna-se uma alternativa. Entre os metais, o ferro tem propriedades mecânicas adequadas, além de estar presente no organismo. No entanto, ainda não há consenso sobre qual o nível de impurezas presentes no ferro é seguro ao organismo e não há estudos utilizando a metalurgia do pó para fabricação de *stents* de ferro puro. Portanto, o objetivo deste trabalho foi produzir amostras de ferro com 99,95% e 99,5% de pureza absoluta (P.A.) por metalurgia do pó e analisar a hemocompatibilidade, biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo*. Células estromais mesenquimais isoladas do tecido adiposo humano (ADSCs) foram utilizadas para verificar a biocompatibilidade *in vitro* do material. Para tal foram realizados ensaios de viabilidade e proliferação celular, bem como observada a morfologia das ADSCs após contato direto e indireto com o ferro. A taxa hemolítica das amostras foi determinada *in vitro* e a biocompatibilidade *in vivo* foi verificada através do implante subcutâneo de um disco na região dorsal de ratos *Wistar*. Os animais foram acompanhados por até 6 meses e após a eutanásia foram realizadas análises hematológicas, sorológicas e histológicas. Ambas as purezas do ferro se mostraram biocompatíveis e hemocompatíveis. No entanto, os resultados *in vitro* sugerem que o ferro com 99.95% P.A. é mais propício para uso em dispositivos médicos.

Palavras Chave: Ferro Puro; Metalurgia do pó, Células estromais mesenquimais; Materiais Metálicos Biodegradáveis; Implante subcutâneo; *stents*

ABSTRACT

Biodegradable metallic materials are promising candidates for use in vascular stents, because they can provide temporary structural support for the vessel during the remodeling period of the walls. Molding and thermochemical treatment methods are the most used in medical implants. However, as porous metals and alloys have less resistance to corrosion, powder metallurgy becomes an alternative. Among metals, iron has adequate mechanical, in addition it is naturally present in the body. However, there is still no consensus on which level of impurities present in iron is safe for the body and there are not studies using powder metallurgy for the manufacturing of pure iron stents. Therefore, the objective of this study was to produce iron samples with purity of 99.95% and 99.5% by powder metallurgy and to analyze their hemocompatibility, biocompatibility *in vitro* and *in vivo*. For this, mesenchymal stromal cells were isolated from human adipose tissue (ADSCs) and used to check the *in vitro* biocompatibility of the material. For this purpose, cell viability and proliferation tests were carried out, as well as the morphology of the ADSCs after indirect and direct contact with iron. The hemolytic rate of the samples was determined *in vitro* and the biocompatibility *in vivo* was verified through the subcutaneous implantation of a disc in the dorsal region of *Wistar* rats. The animals were followed up for up to 6 months and, after euthanasia, were subjected to hematological, serological and histological analyzes. Both purity and iron are shown to be biocompatible and hemocompatible. However, the *in vitro* results suggest that iron with 99.95% P.A. is more suitable for use in medical devices.

Key words: Pure Iron; Powder metallurgy, mesenchymal stromal cells; Biodegradable Metallic Materials; Subcutaneous implant; stents

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 BIOMATERIAIS

Os biomateriais possuem um importante papel na medicina, promovendo a restauração de funções e a cicatrização após uma injúria ou doença (BIOMATERIALS, 2017). Biomateriais podem ser definidos como:

“(..) materiais - sejam naturais ou sintéticos, vivos ou sem vida, e geralmente feitos de múltiplos componentes - que interagem com os sistemas biológicos. Os biomateriais são frequentemente usados em aplicações médicas para aumentar ou substituir uma função natural (BIOMATERIALS - LATEST RESEARCH AND NEWS | NATURE, 2020).

A aprovação de um novo biomaterial para o desenvolvimento de um dispositivo biomédico demanda várias etapas. O ponto de partida deste processo é identificar a necessidade de tratar alguma patologia ou substituir parcial ou totalmente um órgão ou tecido. Em seguida, planeja-se o projeto e desenvolve-se a síntese do material para a realização de diferentes testes (composição, estrutura, propriedades mecânicas, toxicologia, imunorreação, bioestabilidade, etc.). Os materiais que se mostram adequados são produzidos em maior escala, esterilizados e encaminhados para testes mais específicos de biocompatibilidade em modelos *in vitro* e *in vivo*. Caso se encontre resultados promissores nestes testes, é iniciado o processo regulatório referente a pré-aprovação, a qual compreende as etapas da pesquisa clínica em humanos que se estende mesmo após a liberação do biomaterial (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

É esperado que o mercado mundial de biomateriais atinja US\$ 207 bilhões até 2024 e que o segmento de biomateriais metálicos contribua significativamente para essa receita. O mercado de biomateriais no Brasil foi avaliado em mais de US\$ 1.89 bilhões em 2016 e estima-se que atingirá US\$ 5.18 bilhões em 2022, (BIOMATERIALS MARKET GLOBAL FORECAST - 2024, 2019).

O segmento de aplicações cardiovasculares foi o que representou a maior fatia do mercado mundial de biomateriais em 2018. Essa demanda é atribuída à maior prevalência de doenças cardiovasculares, aumento da população idosa, crescimento de procedimentos de angiografia e do uso de *stents* cardíacos, marcapassos e desfibriladores cardíacos implantáveis (BIOMATERIALS MARKET GLOBAL FORECAST - 2024, 2019; TATKARE, 2016)

O primeiro uso histórico de biomateriais data da antiguidade. Civilizações antigas utilizavam materiais como ossos, dentes de animais ou até madeira para substituir dentes, corrigiam defeitos cranianos com ouro e marfim e faziam suturas com linho, crina de cavalo e algodão (MIGONNEY, 2014; STUMPF et al., 2013). Atualmente, biomateriais de cerâmica, polímeros e metais são os mais utilizados em implantes (BHAT, 2002; MORAVEJ; MANTOVANI, 2011).

1.1.1 Classificação dos Biomateriais

Quando um material sintético é implantado no corpo humano, o tecido reage em direção ao implante de várias maneiras, dependendo da sua composição química e conformação mecânica. O mecanismo de interação do tecido, se houver, depende da resposta do tecido à superfície do implante (HENESS; BEN-NISSAN, 2004).

Os biomateriais podem ser classificados em três categorias, conforme a interação que ocorre com o tecido: materiais biotolerantes, bioativos e bioinertes (HERMAWAN, 2012). Os materiais biotolerantes não são rejeitados quando implantados no tecido vivo. Eles são envolvidos por uma camada de tecido fibroso em forma de cápsula, composto principalmente por colágeno e fibroblastos. Os materiais biotolerantes mais utilizados são o silicone e o vidro. Os materiais bioinertes tem mínima interação com o tecido ao seu redor e não induzem o organismo a reagir contra o corpo estranho. Fazem parte desse grupo o titânio, o aço inoxidável e polietileno de alto peso molecular. Em contraste, os materiais bioativos permitem a interação direta do biomaterial com o tecido, estimulando ou retardando funções celulares específicas. Um exemplo seria a troca de íons que ocorre entre o implante ósseo (ex; Bioglass e hidroxiapatita sintética) e os fluidos corporais ao seu redor (MAGNETIC CELL SEPARATION, 2007; SYKARAS et al., 2000).

Os biomateriais biodegradáveis constituem uma nova classe de biomateriais bioativos. Espera-se o que eles forneçam um suporte temporário para o processo de cicatrização de um tecido doente ou órgão e se degradem progressivamente a partir de então. Eles têm sido utilizados na prática médica há bastante tempo, como em suturas feitas com polímeros bioabsorvíveis. Polímeros e metais biodegradáveis são os principais exemplos dessa classe (HERMAWAN, 2012; PURNAMA et al., 2013).

1.2 MATERIAIS METÁLICOS BIODEGRADÁVEIS

Os metais possuem alta resistência ao impacto e ao desgaste, além de uma alta capacidade para absorver elevada energia de deformação comparado a outros materiais. Estas características os fazem propícios para serem usados em implantes biomédicos (MORAVEJ; MANTOVANI, 2011). Os metais são considerados mais adequados que os polímeros para algumas aplicações específicas que exigem alta relação resistência/volume, tais como parafusos e pinos de fixação óssea e *stents* coronários (HERMAWAN, 2012; PURNAMA et al., 2013).

Diferentemente do passado, cujo enfoque era a criação de implantes metálicos com resistência a corrosão, hoje um dos objetivos é o desenvolvimento de próteses mais fortes, duráveis e ao mesmo tempo mais biocompatíveis e biodegradáveis (WEBSTER, 2011). Os metais biodegradáveis têm sido propostos para aplicações cardiovasculares e ortopédicas, sendo esperado que eles desapareçam por corrosão após providenciar o suporte estrutural pelo tempo necessário para que ocorra a regeneração do tecido doente (FAGALI et al., 2015; HERMAWAN et al., 2010).

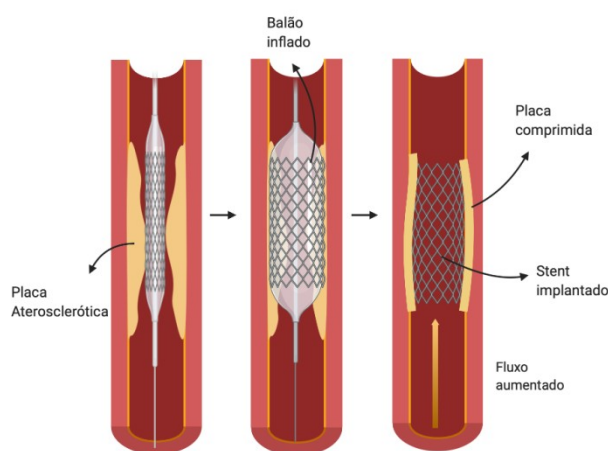
Apesar das vantagens dos metais biodegradáveis, é de extrema necessidade voltar atenção aos produtos de degradação liberados no organismo humano. Os produtos de corrosão dos biometais devem induzir resposta e toxicidade mínimas ao hospedeiro. Assim deve-se evitar ou utilizar apenas o mínimo necessário de componentes conhecidos por induzir esses efeitos. Além disso os produtos de degradação devem ser transportados e eliminados do corpo e não causar acúmulo local ou sistêmico. (GU et al., 2009; HERMAWAN, 2012; MANTOVANI; WITTE, 2013; ZHU et al., 2019).

1.3 APLICAÇÃO DOS BIOMATERIAIS METÁLICOS: *STENT* VASCULARES

Em aplicações cardiovasculares os metais corrosíveis são promissores candidatos ao uso em *stents*, que são endopróteses auto-expansíveis ou expansíveis por balão (Figura 1) (GONZALO; MACAYA, 2012).

Os *stents* são utilizados para prevenir ou impedir a constrição causada pelo entupimento das artérias. Eles são implantados para evitar o recuo elástico do vaso estenótico ou para tratar uma dissecção do vaso durante a angioplastia, prevenindo, assim, a reestenose precoce após o procedimento. Eles também são utilizados para corrigir a estenose cardíaca ou intravascular que ocorre em algumas doenças congênitas (MORAVEJ; MANTOVANI, 2011).

O *stent* é inserido na artéria femoral, radial ou braquial através de um fio guia acoplado a um balão. O fio guia leva o dispositivo até a região obstruída, onde o balão é inflado para aumentar a circunferência da artéria. Paralelamente, o *stent* é expandido e acoplado no local de obstrução para manter a artéria aberta após a retirada do cateter de acesso. (GONZALO; MACAYA, 2012).



Created in BioRender.com bio

Figura 1. Processo de angioplastia e implante do *Stent*. em um vaso obstruído por placa aterosclerótica. Fonte: Do autor (Criado no BioRender.com).

Atualmente, na prática clínica, utiliza-se principalmente stents permanentes, produzidos com metais resistentes à corrosão, tais como o aço inoxidável 316L, níquel-titânio e liga de cromo-cobalto (KAPOOR, 2017; MORI et al., 2017; SARAF; YADAV, 2018).

Entretanto, esses biomateriais têm desvantagens que limitam o uso dos mesmos, tais como: incapacidade para adaptar-se ao crescimento dos pacientes jovens. Além disso podem provocar disfunção endotelial a longo-termo, re-endotelização excessiva do lúmen interno do vaso, trombogenicidade, irritação física permanente inflamatória crônica local e descompasso de contração muscular entre as áreas com e sem *stent* (ERNE; SCHIER; RESINK, 2006).

O uso de materiais biodegradáveis propicia um arcabouço provisório para o vaso e evita problemas clínicos a longo prazo. Alguns potenciais benefícios dos *stents* biodegradáveis em relação aos de uso permanente podem ser observados na Tabela 1 (GONZALO; MACAYA, 2012).

Tabela 1. Características dos *stents* biodegradáveis em relação aos de uso permanente.

Características	<i>Stents</i> biodegradáveis	<i>Stents</i> permanentes
Suporte radial	Transitório	Permanente
Necessidade de prolongada terapia antiplaquetária	Não	Sim
Trombose a longo-termo	Não	Sim
Acompanhamento com técnicas não invasivas	Sim	Não
Ramos laterais presos permanentemente	Não	Sim
Facilidade de intervenção no segmento tratado	Sim	Não
Potencial recuperação da função endotelial	Sim	Não
Possível remodelação expansiva	Sim	Não

Fonte:(GONZALO; MACAYA, 2012)

Um *stent* biodegradável precisa possuir as seguintes características: o dispositivo, bem como os seus produtos de degradação, devem ser biocompatíveis; o material deve permanecer no local de implantação por alguns meses antes de ser completamente bioabsorvido, deve garantir a integridade dinâmica funcional do vaso durante a sua degradação e a força radial deve manter o suporte estrutural do vaso pelo tempo necessário à terapia (NARAYAN et al., 2019; SAITO, 2005).

A biodegradabilidade pode ser crucial no tratamento de crianças com cardiopatias congênitas, uma vez que os vasos poderiam se desenvolver com o

crescimento sem que houvesse a necessidade de um novo procedimento cirúrgico para remoção do dispositivo e também evitaria-se reações inflamatórias a longo prazo (ORMISTON; SERRUYS, 2009; ZARTNER et al., 2007).

Atualmente, os polímeros, comopoli (L-ácido láctico) (PLLA), poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) e a policaprolactona (PCL) são os materiais mais estudados para o uso em *stents* biodegradáveis, inclusive já estão presentes na prática clínica. No entanto, *stents* de metais biocorrosíveis possuem alguns aspectos mais vantajosos. Eles geralmente são mais resistentes e podem ser feitos com um diâmetro menor (ALEXY; LEVI, 2013; STRONG, 2013).

Os *stents* metálicos produzidos com material biodegradável se mostram promissores, pois visam dar suporte a abertura das artérias até o remodelamento das suas paredes, o que normalmente ocorre entre 6 a 12 meses após o implante. Após 12 a 24 meses, eles devem desaparecer progressivamente do organismo por corrosão (Figura 2) (ERNE; SCHIER; RESINK, 2006; HERMAWAN et al., 2010; SAITO, 2005).

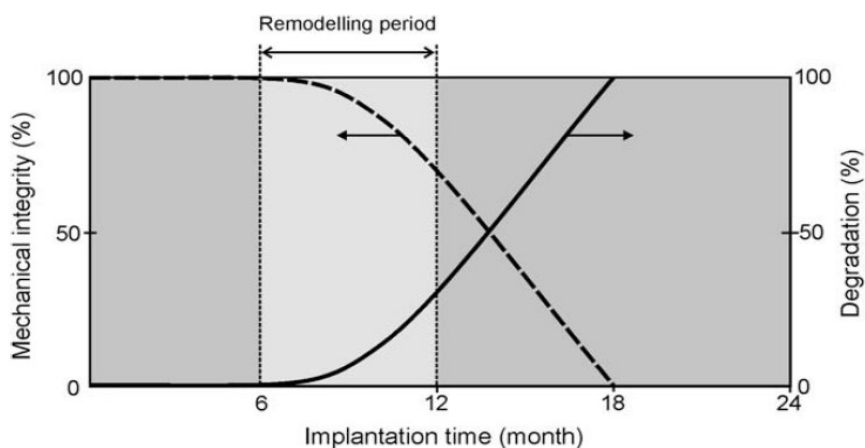


Figura 2. *Stent* biodegradável. Relação entre o tempo de degradação e de implantação de um *stent* biodegradável ideal. Fonte: (HERMAWAN; DUBÉ; MANTOVANI, 2010)

Os materiais candidatos ao uso em *stents* metálicos biodegradáveis devem possuir propriedades mecânicas similares ao aço 316L, que é considerado o padrão ouro para providenciar o suporte mecânico necessário às artérias com lúmen reduzido (MORAVEJ; MANTOVANI, 2011).

A primeira implantação bem-sucedida de um *stent* metálico biodegradável no ser-humano foi na artéria pulmonar de um bebê prematuro, obstruída devido à um problema cardíaco congênito, sendo o dispositivo implantado de magnésio. Não foi observado restenose arterial e o *stent* foi totalmente degradado em 5 meses. O uso

de um *stent* biodegradável permitiu a retomada da função, o remodelamento das paredes do vaso e a continuidade do crescimento, mostrando-se uma metodologia promissora para melhorar a reperfusão de artérias ocluídas (ZARTNER et al., 2005)

1.4 FERRO COMO BIOMATERIAL PARA STENTS BIODEGRADÁVEIS

Stents produzidos com ferro puro têm sido propostos para uso temporário no sistema vascular, uma vez que esse material é biodegradável e naturalmente presente no organismo (SCARCELLO; LISON, 2019). As propriedades mecânicas destes são semelhantes aos já tradicionais *stents* de aço. Em comparação com as ligas de magnésio, o ferro tem maior ductilidade, logo o corte é mais fácil e menos frágil, permitindo a fabricação de estruturas mais finas (MORAVEJ; MANTOVANI, 2011). Outra vantagem é que o ferro é rádio-opaco, não se fazendo necessária adição de marcadores de fluorescência para localizar a endoprótese após o seu implante (WAKSMAN et al., 2008).

O primeiro stent de ferro (Fe > 99,8%) foi implantado na aorta descendente de coelhos em 2001. Os resultados apresentaram uma resposta inflamatória moderada do vaso submetido à desobstrução e ausência de hiperplasia pronunciada. Após 6, 12 e 18 meses de implantação do *stent*, não foram observados restenose do vaso, nem a formação de trombos. A avaliação histopatológica não identificou acúmulo do material degradado nos órgãos, nem toxicidade sistêmica, demonstrando o uso promissor de *stents* produzidos com ferro (PEUSTER et al., 2001).

Outro estudo verificou a segurança de um *stent* de ferro (Fe > 99,5%). Para tal, *stents* de ferro e de aço 316L SS (controle), foram implantados na aorta descendente de miniporcosp, os quais foram acompanhados por 360 dias. As análises histopatológicas do coração, pulmão, baço, fígado, rim e linfonodos não apresentaram sinais de acúmulo de ferro ou toxicidade relacionada ao metal. Também não se constatou diferença na proliferação celular neointimal vascular entre o aço 316 L SS e os *stents* de ferro (PEUSTER et al., 2006).

Efeitos a curto prazo de *stents* de ferro (pureza não informada) e de cromo-cobalto foram avaliados em artérias coronárias porcinas. Após 28 dias do implante, os animais foram eutanasiados e foram observados sinais de degradação nos *stents* de ferro. A superfície dos *stents* de ferro era preta amarronzada e a parede vascular adjacente apresentava uma coloração acastanhada, sem sinais de embolização ou

trombose, nem deposição de fibrina. Não houve diferenças estatísticas em nenhum dos parâmetros mensurados: Vasos (área do vaso, área do *stent*, área do lúmen e área medial), inflamação (injúria, inflamação, fibrina íntima e fibrose) e cicatrização (endotelização e células musculares lisas da íntima) entre os animais que receberam o *stents* de ferro e os que receberam o de cobalto-cromo, embora estatisticamente não significativa, houve menor formação neointimal nos animais com o *stent* de ferro (WAKSMAN et al., 2008).

Nas últimas duas décadas, *stents* de ferro têm sido experimentados em animais apresentando potencial uso médico. No entanto, ainda não foram realizados ensaios clínicos em humanos e a literatura carece de mais dados que verifiquem a segurança e eficiência destes dispositivos.

1.4.1 Formas Cristalinas do Ferro

O Ferro é um elemento metálico encontrado em certos minerais, em quase todos os solos e em águas minerais (KIM et al., 2019). Ele sofre alotropia, ou seja, possui diferentes formas cristalinas que variam conforme as condições de pressão e temperatura. Sob pressão atmosférica, o ferro pode se apresentar como estrutura cristalina cúbica de corpo centrado (CCC) ou cúbica de face centrada (CFC). A estrutura CCC é encontrada no ferro alfa (α) que existe entre -273 e 912 °C e o ferro delta (δ) existente entre 1394 e 1539 °C, que é o ponto de fusão do elemento. A estrutura CFC é encontrada no ferro gama (γ) que existe de 912 a 1394 °C (SMITH; HASHEMI, 2013).

1.5 MANUFATURA DE STENTS

A maioria dos metais para implantação cirúrgica, incluindo os *stents* biodegradáveis, são fabricados por diversos processos de conformação mecânica e de tratamento termomecânico (RATNER et al., 2004). É notório um aumento na busca por novos processos de produção de *stents* metálicos biodegradáveis, visando o sucesso terapêutico e também a redução de custos para a manufatura (MORAVEJ; MANTOVANI, 2011).

A metalurgia do pó convencional é uma das técnicas estudadas atualmente, apesar de ainda haver poucos estudos utilizando essa metodologia proposta para a fabricação de *stents* (HERMAWAN et al., 2008; MORAVEJ; MANTOVANI, 2011). Ela envolve etapas de mistura dos pós, compactação e a sinterização (TORRES et al., 2011).

A compactação consiste na aplicação de pressão em matrizes para a junção dos pós, que podem ser metálicos ou não. A etapa física seguinte é a sinterização, definida como um processo termicamente ativado, que faz com que um conjunto de partículas de um determinado material, inicialmente em contato mútuo, adquira resistência mecânica. Existem dois tipos básicos de sinterização: por fase sólida e por fase líquida. Na sinterização por fase sólida, o material é ligado por difusão entre as partículas sem que haja qualquer tipo de líquido na estrutura. Diferentemente, na fase líquida, ocorre a fusão de parte da liga, o qual torna o processo de sinterização mais rápido e fecha a estrutura mais facilmente. A sinterização com fase líquida é indicada para materiais dificilmente sinterizáveis por fase sólida e para a obtenção de materiais compósitos (BRITO et al., 2008).

Uma vez que metais porosos têm menos resistência a corrosão do que os totalmente densos, o uso da metalurgia do pó torna-se adequado para a produção de materiais biodegradáveis. O melhoramento dos processos dessa técnica possibilitaria um menor custo de produção aos *stents* e, conseqüentemente, facilitaria o acesso dos pacientes a estes dispositivos médicos (BRITO et al., 2008).

1.6 METABOLISMO DO FERRO NO ORGANISMO

O ferro é essencial para organismo, uma vez que tem papel fundamental na síntese de hemoglobina pelos eritrócitos, reações de oxi-redução e proliferação celular. As principais fontes de ferro são a dieta e a reciclagem de hemácias senescentes (GROTTO, 2008; KOHGO et al., 2008).

No intestino, o ferro é absorvido pelos enterócitos duodenais e circula pelo plasma ligado à transferrina, como mostrado na Figura 3. O ferro tem facilidade em

participar de reações de transferência de elétrons pois pode doar e ganhar elétrons através da interconversão entre o íon férrico (Fe^{2+}) e o ferroso (Fe^{3+}). Esta habilidade o torna um componente útil aos citocromos e outras moléculas que se ligam ao oxigênio, como a hemoglobina, a mioglobina e várias enzimas (ANDREWS, 1999; WIJAYANTI; KATZ; IMMENSCHUH, 2004)WALDVOGEL-ABRAMOWSKI et al., 2014)

Em média, um homem possui 4 g de ferro, dos quais 2,5 g está no interior dos eritrócitos na forma de hemoglobina; 1 g está estocado nos macrófagos esplênicos e hepáticos, os quais reciclam a hemoglobina de eritrócitos, e o resto está distribuído em proteínas como a mioglobina, citocromos ou outras ferro proteínas. Apenas cerca de 3 mg estão ligados a transferrina e constituem o compartimento de ferro móvel que supre os estoques intracelulares de ferro (WIJAYANTI ET AL. 2004; WALDVOGEL-ABRAMOWSKI ET AL. 2014).

A homeostase do ferro é regulada por dois mecanismos: um intracelular, de acordo com a quantidade de ferro presente na célula, e o outro sistêmico, no qual a hepcidina, proteína produzida principalmente pelo fígado que atua no controle do ferro plasmático, tem papel de destaque (ANTUNES; CANZIANI, 2016; NAIRZ; WEISS, 2006).

Na presença de inflamação, bem como em situações de aumento dos estoques intracelulares e extracelulares de ferro, a expressão de hepcidina é aumentada e a concentração de ferro circulante reduzida. Inversamente, quando as necessidades de ferro são altas, como no aumento da eritropoiese, os níveis de hepcidina são baixos. A hepcidina bloqueia a exportação de ferro de hepatócitos, macrófagos e enterócitos, ligando-se à ferroportina, permitindo sua internalização e degradação (WALDVOGEL-ABRAMOWSKI et al., 2014).

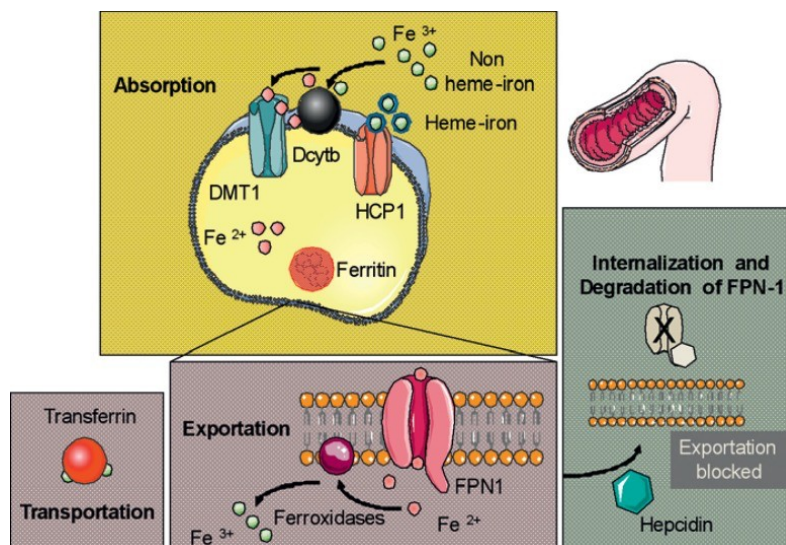
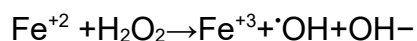


Figura 3. Metabolismo do ferro em enterócitos. O íon férrico é reduzido a ferroso pelo citocromo duodenal B (Dcytb), podendo ser carregado para o interior do enterócito pela proteína transportadora de metal divalente (DMT-1). Dentro do enterócito, o ferro é estocado como ferritina ou realocado para fora da célula pela ferroportina (FPN1). O íon ferroso também é convertido em férrico pela enzima hefaestina, de forma que possa ser carregado pela transferrina para o sangue. A ferroportina é internalizada e degradada na presença de hepcidina e então a exportação de ferro é bloqueada. Inversamente, na ausência de hepcidina, a ferroportina é mantida na membrana celular e o transporte de ferro é facilitado.

Fonte: (WALDVOGEL-ABRAMOWSKI et al., 2014)

Apesar de ser fundamental para as funções biológicas, o excesso de ferro leva ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) através da reação de Fenton. A reação de Fenton envolve Fe^{+2} que reage com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e forma um radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) e um íon hidróxido (OH^-), de acordo com a reação 1 (AGUIAR et al., 2007).



Reação 1: Reação de Fenton

O Radical Hidroxila pode causar danos ao DNA e outras biomoléculas através do estresse oxidativo que é um desequilíbrio entre a produção de EROS e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante (BARBOSA et al., 2010). A exposição intensa a EROS pode resultar em mutações e outras alterações celulares levando a

carcinogênese (VAHIDIAN et al., 2019). O acúmulo de ferro e estresse oxidativo são aptos também a agregar algumas proteínas, tais como A β e α -sinucleína, que possuem um papel crítico no Mal de Alzheimer e de Parkinson, respectivamente (YARJANLI et al., 2017).

Perdemos diariamente 1 a 2 mg de ferro, através de descamação entérica e cutânea e pequenas perdas de sangue, que é equilibrada pela absorção intestinal. No entanto, cabe ressaltar que o organismo não possui um mecanismo ativo para excretar o ferro do corpo. Logo, uma carga contínua excedente de 1 a 2 mg por dia resultará em uma sobrecarga deste metal, podendo causar prejuízo a órgãos como o fígado, coração, tireoide, cérebro e pâncreas, principalmente (KOHGO et al., 2008).

A quantidade de ferro presente em um *stent* exclusivo do metal é igual à ingestão oral mensal de ferro e menor que a quantidade de ferro transfundido com uma unidade de sangue de aproximadamente 450 mL (200–300 mg) (WAKSMAN et al., 2008).

1.7 HISTOFISIOLOGIA DOS VASOS SANGUÍNEOS

O sistema cardiovascular humano é composto por diferentes sistemas: o dos vasos linfáticos (sistema linfático), o das veias (venoso), o das artérias (arterial), além dos pequenos vasos (capilares da microcirculação) e o coração. Os maiores vasos sanguíneos do corpo são as artérias e as veias. Devido à pressão sanguínea, as artérias possuem uma espessa e resistente parede de tecido conjuntivo, ancorando células endoteliais e muitas camadas de células musculares lisas, as quais devem suportar a força exercida pelo coração no momento da contração, como observado na Figura 4. Diferente das artérias, as veias possuem menor quantidade de fibras elásticas e musculares, porém apresentam válvulas na túnica interna que auxiliam o fluxo correto do sangue de volta ao coração (ALBERTS ET AL. 2009).

Os vasos menos calibrosos, os capilares e sinusoides, possuem paredes mais delgadas, constituídas apenas por células endoteliais sobre uma membrana basal e alguns pericitos dispersos que envolvem as células endoteliais (ALBERTS et al., 2009).

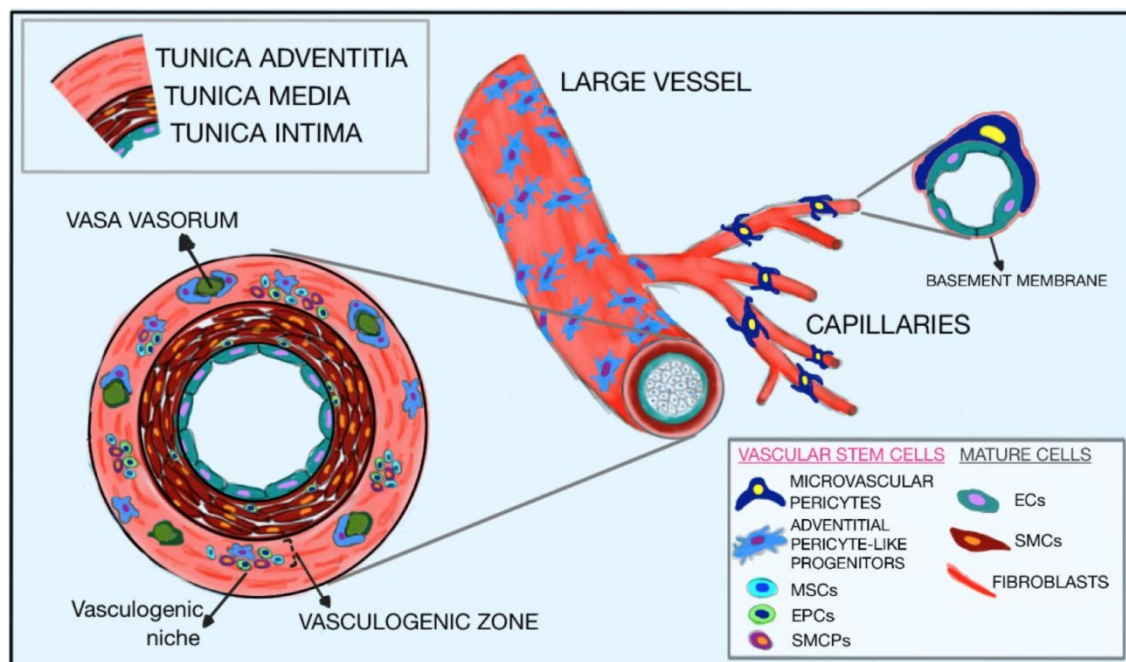


Figura 4. Distribuição de células estromais mesenquimais no sistema vascular. (A) Corte transversal de um vaso sanguíneo apresentando; pericitos; ECs, células endoteliais; SMCs, musculares lisas; MSCs, estromais mesenquimais, fibroblastos; EPCs, progenitoras endoteliais e SMCs, progenitoras musculares lisas. Fonte: (AVOLIO; MADEDDU, 2016)

Os pericitos podem atuar na regulação da neovascularização, no controle mecânico e fisiológico da permeabilidade e estabilidade dos vasos e também secretam componentes da matriz extracelular. Estudos indicam que essas células possuem potencial de diferenciação, secretam moléculas imunomodulatórias e contribuem para o reparo tecidual, tal qual as células estromais mesenquimais (MSCs). Essas características levam alguns grupos de pesquisa a sugerirem que todos os pericitos são MSCs em um estágio diferente de maturidade (MEIRELLES et al., 2009; MILLS; COWIN; KAUR, 2013).

1.8 CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS (MSCS)

MSCs são células imaturas presentes em quase todos os tecidos de mamíferos, tais como: medula óssea, sangue periférico, tecido adiposo, sinovial, derme, periósteo e dentes decíduos e também, em órgãos sólidos, como fígado e o pulmão, como pode ser observado na Figura 5. Elas possuem origem perivascular, existindo uma correlação direta entre a frequências dessas células e a densidade dos

vasos sanguíneos em todo o tecido estromal vascularizado (CAPLAN, 2008; CRISAN et al., 2008; TRAKTUEV et al., 2008).

Em 2006, a Sociedade Internacional para a Pesquisa em Células-tronco (ISSCR), estabeleceu um conjunto de critérios para caracterização das MSCs: adesão ao plástico, capacidade de diferenciação em pelo menos três linhagens especializadas (ex.: osteogênica, condrogênica e adipogênica) e marcação fenotípica positiva às proteínas de membrana: CD105, CD73 e CD90 e negativa à CD45, CD34, CD11b, CD14, CD79a e HLA-DR (DOMINICI et al., 2006).

Células-tronco adiposo derivadas (ADSCs) são células-tronco mesenquimais (MSCs) residentes na fração vascular do tecido adiposo subcutâneo. O isolamento de ADSCs foi inicialmente proposto em 1967 por Rodbell e colaboradores (RODBELL, 1967). Desde então, as ADSCs têm sido consideradas uma das fontes mais fáceis para obtenção de MSCs, comparada a outras como a medula óssea que requer a punção da crista ilíaca posterior. As ADSCs secretam fatores de crescimento e outras proteínas com o mesmo potencial regenerativo que as MSCs de medula óssea (GIMBLE; KATZ; BUNNELL, 2007).

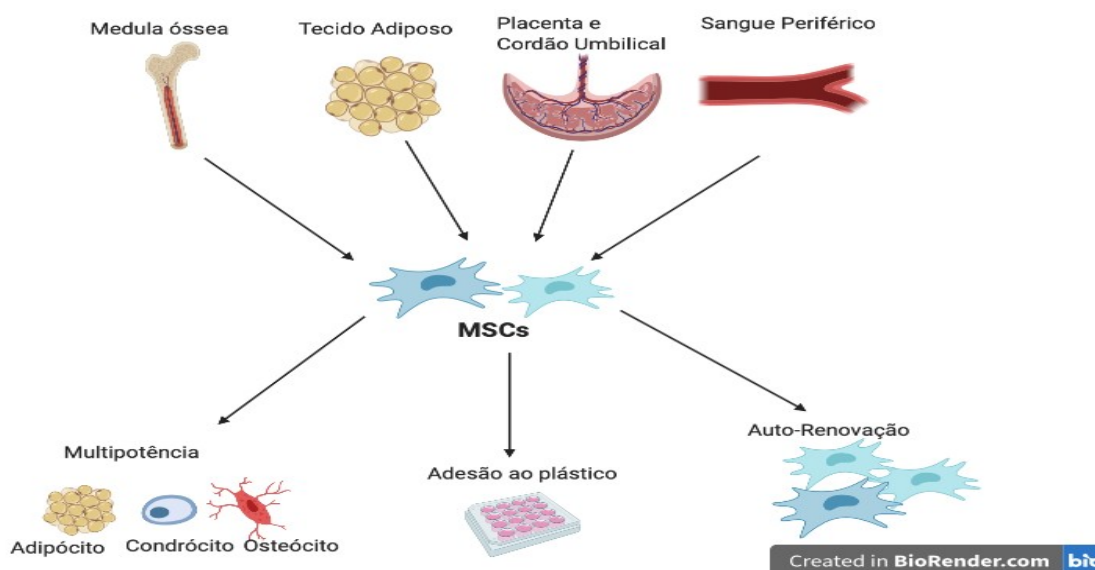


Figura 5. Principais fontes e características das MSCs. As MSCs estão presentes na medula óssea, tecido adiposo, placenta, cordão umbilical e sangue periférico. Elas possuem multipotência, podendo diferenciar-se, após estímulo químico ou físico, em qualquer célula especializada de origem mesodérmica. *In vitro*, elas são capazes de aderir ao plástico e autorenovar-se, mantendo sua ação parácrina com propriedades imunomodulatórias (JOSSEN et al., 2014). Fonte: Criado no BioRender.com

Fatores de crescimentos e quimiocinas secretados pelas MSCs são capazes de desencadear a migração e a proliferação celular da população adjacente, bem como a angiogênese. Moléculas como o fator de crescimento alfa (TGF- α), fator de crescimento beta (TGF- β), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e fator de crescimento endotelial (EGF) podem favorecer o aumento da divisão celular de fibroblastos e a transição de células epiteliais para endoteliais. O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), EGF, IGF-1 e angiotensina-1 atuam recrutando linhagens endoteliais a migrar e iniciar a neovascularização (MEIRELLES et al., 2009; ZIMMERLIN et al., 2013).

Apesar de tão importantes e de estarem presentes em diferentes tecidos, elas são pouco utilizadas para o estudo da citotoxicidade de novos biomateriais produzidos com Ferro.

2. JUSTIFICATIVA

Entre os metais estudados, o ferro é um dos elementos que se destaca para o uso em *stents* biodegradáveis, pois possui características mecânicas semelhantes aos *stents* permanentes. O uso da metalurgia do pó para a fabricação de *stents* de ferro biodegradáveis, se mostra uma opção. No entanto, ainda não é claro qual o limiar de impurezas contidas no ferro não é tóxico ao organismo, nem se a sinterização por metalurgia do pó é adequada para proporcionar um nível de degradação seguro para o organismo. Para responder essas questões, é necessário que ensaios de biocompatibilidade sejam realizados em amostras do material.

A avaliação da biocompatibilidade do ferro com células mesenquimais é importante, uma vez que elas estão presentes nos vasos sanguíneos e são capazes de migrar para regiões de injúria promovendo a regeneração e manutenção dos vasos. Além disso, a avaliação da hemocompatibilidade, bem como da biocompatibilidade *in vivo* do ferro, são igualmente necessárias para verificar o potencial hemolítico do material, sua degradação e toxicidade local e sistêmica no organismo quando implantados no subcutâneo de ratos.

Tendo em vista o exposto, a realização desse estudo torna-se importante, pois avalia o uso da metalurgia do pó e a pureza de ferro adequada para ser utilizada na produção de implantes médicos. Os resultados dos testes são necessários para verificar a viabilidade da produção do protótipo do *stent* para testes pré-clínicos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar *in vitro* e *in vivo* a biocompatibilidade de amostras de Ferro com pureza absoluta (P.A.) de 99,95% e 99,5% produzidas por metalurgia do pó para futura aplicação em *stents* cardíacos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Investigar o efeito do ferro com pureza de 99,5% e 99,95% produzido pela técnica de metalurgia do pó convencional sobre células estromais mesenquimais derivadas de tecidos adiposo;
- b. Avaliar a hemocompatibilidade de implantes de ferro produzido pela técnica de metalurgia do pó convencional.
- c. Avaliar a biocompatibilidade e degradabilidade do ferro produzido pela técnica de metalurgia do pó convencional em modelo *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, A. et al. **Mecanismo e aplicações da reação de fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro**, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422007000300023>>

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Celula - 5.ed.** Porto Alegre: Artmed Editora, 2009.

ALEX, R. D.; LEVI, D. S. Materials and manufacturing technologies available for production of a pediatric bioabsorbable stent. **BioMed research international**, v. 2013, p. 137985, 2013.

ANTUNES, S. A.; CANZIANI, M. E. F. Hecidina: um importante regulador do metabolismo de ferro na doença renal crônica. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 38, n. 3, p. 351–355, 2016. Acesso em: 27 jan. 2020.

AVOLIO, E.; MADEDDU, P. Discovering cardiac pericyte biology: From physiopathological mechanisms to potential therapeutic applications in ischemic heart disease. **Vascular pharmacology**, v. 86, p. 53–63, 2016.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BHAT, S. V. **Biomaterials**, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/978-94-010-0328-5>>

Biomaterials. 2017. Disponível em: <<https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/biomaterials>>. Acesso em: 18 jan. 2020.

Biomaterials - Latest research and news | Nature. 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/subjects/biomaterials>>. Acesso em: 5 mar. 2020.

Biomaterials Market Global Forecast - 2024. 2019. Disponível em: <<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biomaterials-393.html>>. Acesso em: 18 jan. 2020.

BRITO, F. I. G. De et al. UM ESTUDO TEÓRICO SOBRE A SINTERIZAÇÃO NA METALURGIA DO PÓ. **HOLOS**, v. 3, p. 204, 2008.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006.

ERNE, P.; SCHIER, M.; RESINK, T. J. **The Road to Bioabsorbable Stents: Reaching Clinical Reality?**, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00270-004-0341-9>>

FAGALI, N. S. et al. Cytotoxicity of corrosion products of degradable Fe-based stents: relevance of pH and insoluble products. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, [s. l.], v. 128, p. 480–488, 2015.

GIMBLE, J. M.; KATZ, A. J.; BUNNELL, B. A. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. **Circulation research**, v. 100, n. 9, p. 1249–1260, 2007.

GONZALO, N.; MACAYA, C. Absorbable stent: focus on clinical applications and benefits. **Vascular Health and Risk Management**, v. 8, n. 1, p. 125, 2012.

GROTTO, H. Z. W. **Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase**, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s1516-84842008000500012>>

GU, X. et al. In vitro corrosion and biocompatibility of binary magnesium alloys. **Biomaterials**, v. 30, n. 4, p. 484–498, 2009.

HENESS, G.; BEN-NISSAN, B. Innovative bioceramics. **Materials Forum**, v. 27, p. 104–114, 2004.

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

HERMAWAN, H. **Biodegradable Metals: State of the Art**. Berlin: Springer, 2012. p. 13–22

KAPOOR, D. **Nitinol for Medical Applications: A Brief Introduction to the Properties and Processing of Nickel Titanium Shape Memory Alloys and their Use in Stents**, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1595/205651317x694524>>

KIM, S. et al. PubChem 2019 update: improved access to chemical data. **Nucleic acids research**, v. 47, n. D1, p. D1102–D1109, 2019.

KOHGO, Y. et al. **Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload**, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12185-008-0120-5>>

NARAYAN, R. et al. **Encyclopedia of Biomedical Engineering**. United States: Elsevier, 2019. v. 2

Magnetic Cell Separation. 2007. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/s0075-7535\(06\)x3200-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0075-7535(06)x3200-x)>

MANTOVANI, D.; WITTE, F. Acta Biomaterialia Special Issue: 4th Biometal 2012, Maratea, Italy: August 27-September 1, 2012. **Acta biomaterialia**, v. 9, n. 10, p. 8474, 2013.

MEIRELLES, L. da S. et al. **Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells**, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.10.002>>

MIGONNEY, V. **History of Biomaterials**, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/9781119043553.ch1>>

MILLS, S. J.; COWIN, A. J.; KAUR, P. Pericytes, mesenchymal stem cells and the wound healing process. **Cells**, v. 2, n. 3, p. 621–634, 2013.

MORAVEJ, M.; MANTOVANI, D. Biodegradable metals for cardiovascular stent application: interests and new opportunities. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 7, p. 4250–4270, 2011.

MORI, H. et al. **Very Late Pathological Responses to Cobalt–Chromium Everolimus-Eluting, Stainless Steel Sirolimus-Eluting, and Cobalt–Chromium Bare Metal Stents in Humans**, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1161/jaha.117.007244>>

NAIRZ, M.; WEISS, G. Molecular and clinical aspects of iron homeostasis: From anemia to hemochromatosis. **Wiener klinische Wochenschrift**, v. 118, n. 15-16, p. 442–462, 2006.

ORMISTON, J. A.; SERRUYS, P. W. S. Bioabsorbable coronary stents. **Circulation. Cardiovascular interventions**, v. 2, n. 3, p. 255–260, 2009.

PETERS, B.; EWERT, P.; BERGER, F. The role of stents in the treatment of congenital heart disease: Current status and future perspectives. **Annals of pediatric cardiology**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 3, 2009. Acesso em: 04 mar. 2020.

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

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

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Â. M. **BIOMATERIAIS: TIPOS, APLICAÇÕES, E MERCADO**, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150094>>

PURNAMA, A. et al. Gene expression profile of mouse fibroblasts exposed to a biodegradable iron alloy for stents. **Acta biomaterialia**, v. 9, n. 10, p. 8746–8753, 2013.

RODBELL, M. Metabolism of isolated fat cells. VI. The effects of insulin, lipolytic hormones, and theophylline on glucose transport and metabolism in “ghosts”. **The Journal of biological chemistry**, v. 242, n. 24, p. 5751–5756, 1967.

SAITO, S. **New horizon of bioabsorbable stentCatheterization and cardiovascular interventions: official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions**, 2005.

SARAF, A. R.; YADAV, S. P. Fundamentals of bare-metal stents. In: **Functionalised Cardiovascular Stents**. : Woodhead Publishing, 2018. p. 27–44.

SCARCELLO, E.; LISON, D. Are Fe-Based Stenting Materials Biocompatible? A Critical Review of and Studies. **Journal of functional biomaterials**, [s. l.], v. 11, n. 1, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/jfb11010002>>

SMITH, W. F.; HASHEMI, J. **Fundamentos de Engenharia e Ciência dos Materiais**. [s.l.] : AMGH Editora, 2013.

STRONG, W. **Dawson, William Levi**, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/gmo/9781561592630.article.a2249298>>

STUMPF, A. de S. G. et al. Shear bond strength of metallic and ceramic brackets using color change adhesives. **Dental press journal of orthodontics**, v. 18, n. 2, p. 76–80, 2013.

SYKARAS, N. et al. Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. **The International journal of oral & maxillofacial implants**, v. 15, n. 5, p. 675–690, 2000.

TATKARE, D. **Biomaterials Market by Type (Metallic, Polymeric, Ceramic, and Natural) and Application (Cardiovascular, Dental, Orthopedic, Wound Healing, Plastic, Surgery, Ophthalmology, Tissue Engineering) - Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2014 - 2022**: Allied Market Research, 2016.

TORRES, Y. et al. **Conventional Powder Metallurgy Process and Characterization of Porous Titanium for Biomedical Applications**, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11663-011-9521-6>>

VAHIDIAN, F. et al. Interactions between cancer stem cells, immune system and some environmental components: Friends or foes? **Immunology letters**, v. 208, p. 19–29, 2019.

WAKSMAN, R. et al. Short-term effects of biocorrosible iron stents in porcine coronary arteries. **Journal of interventional cardiology**, v. 21, n. 1, p. 15–20, 2008.

WALDVOGEL-ABRAMOWSKI, S. et al. Physiology of iron metabolism. **Transfusion medicine and hemotherapy: offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie**, v. 41, n. 3, p. 213–221, 2014.

WALDVOGEL-ABRAMOWSKI, S. et al. Physiology of iron metabolism. **Transfusion medicine and hemotherapy: offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie**, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 213–221, 2014.

WEBSTER, T. J. (ED.). **Nanotechnology Enabled In situ Sensors for Monitoring Health**. New York: Springer-Verlag, 2011.

WIJAYANTI, N.; KATZ, N.; IMMENSCHUH, S. Biology of heme in health and disease. **Current medicinal chemistry**, v. 11, n. 8, p. 981–986, 2004.

YARJANLI, Z. et al. Iron oxide nanoparticles may damage to the neural tissue through iron accumulation, oxidative stress, and protein aggregation. **BMC neuroscience**, v. 18, n. 1, p. 51, 2017.

ZARTNER, P. et al. First successful implantation of a biodegradable metal stent into the left pulmonary artery of a preterm baby. **Catheterization and cardiovascular interventions: official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions**, v. 66, n. 4, p. 590–594, 2005.

ZARTNER, P. et al. **First biodegradable metal stent in a child with congenital heart disease: Evaluation of macro and histopathology**, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/ccd.20828>>

ZHU, D. et al. Mechanical Strength, Biodegradation, and in Vitro and in Vivo Biocompatibility of Zn Biomaterials. **ACS applied materials & interfaces**, v. 11, n. 7, p. 6809–6819, 2019.

ZIMMERLIN, L. et al. Mesenchymal stem cell secretome and regenerative therapy after cancer. **Biochimie**, v. 95, n. 12, p. 2235–2245, 2013.

5. ARTIGO

Evaluation of *in vitro* and *in vivo* Biocompatibility of Iron produced by powder metallurgy

Thaís Casagrande Paim^{1*}; Diego Pacheco Wermuth^{2*}; Isadora Bertaco dos Santos¹; Carla Zanatelli¹; Liliana Ivet Sous Naasani¹; Mônica Slaviero³; David Driemeier³; Lirio Schaeffer^{2**}, Márcia Rosângela Wink^{1**}

* These authors contributed equally to this work.

**These authors share senior authorship

1 Laboratório de Biologia Celular, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Rua Sarmento Leite 245, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

2 Laboratório de Transformação Mecânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

3 Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, 91540-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author: Márcia Rosângela Wink

E-mails: mwink@ufcspa.edu.br; marciawink@yahoo.com.br

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA

245, Sarmento Leite. Porto Alegre, RS, Brasil, CEP 90050-170

Telephone: +55 (51) 3303.8762; fax: +55 (51) 3303.8810

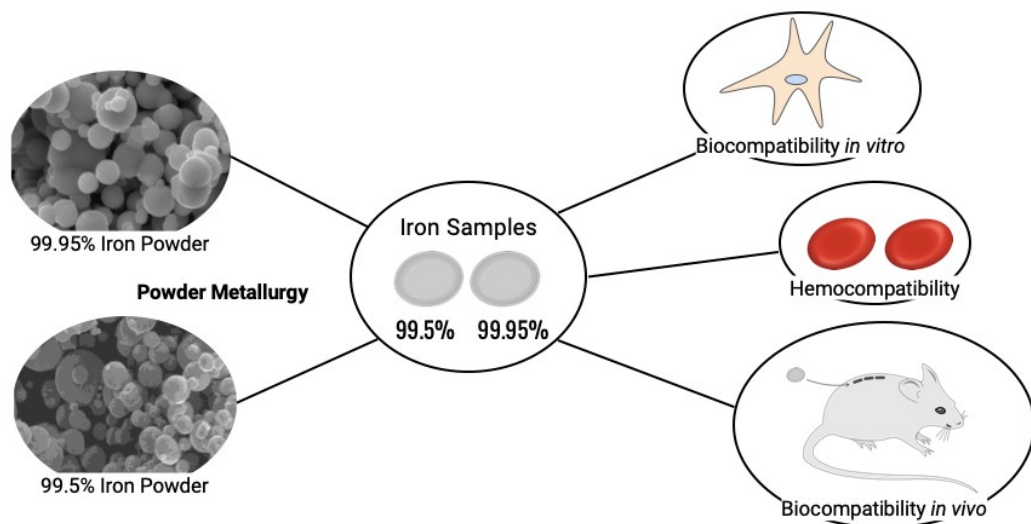
Publicado na revista Materials Science and Engineering C

Fator de Impacto: 4.959

Highlights

- Iron is a promising candidate for biodegradable vascular stents.
- The powder metallurgy process was used to produce iron implants with 99.95 and 99.5% of purity.
- Iron implants are biocompatible with Mesenchymal stromal cells and hemocompatible.
- Iron discs implanted in the subcutaneous tissue of rats did not cause toxicity.

Graphical Abstract





Contents lists available at ScienceDirect

Materials Science & Engineering C

journal homepage: www.elsevier.com/locate/msecEvaluation of *in vitro* and *in vivo* biocompatibility of iron produced by powder metallurgy

Thaís Casagrande Paim^{a,1}, Diego Pacheco Wermuth^{b,1}, Isadora Bertaco^a, Carla Zanatelli^a,
Liliana Ivet Sous Naasani^a, Mônica Slaviero^c, David Driemeier^c, Lirio Schaeffer^{b,2},
Márcia Rosângela Wink^{a,*,2}

^a Laboratório de Biologia Celular, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Rua Sarmento Leite 245, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

^b Laboratório de Transformação Mecânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

^c Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, 91540-000 Porto Alegre, RS, Brazil

A B S T R A C T

Biodegradable metallic materials (BMMs) are expected to corrode gradually *in vivo* after providing the structural support to the tissue during its regeneration and healing processes. These characteristics make them promising candidates for use in stents. These endoprostheses are produced from metal alloys by casting and thermomechanical treatment. Since porous alloys and metals have less corrosion resistance than dense ones, the use of powder metallurgy becomes an option to produce them. Among the metals, iron has been proposed as a material in the manufacturing of stents because of its mechanical properties. However, even then it is unclear what toxicity threshold is safe to the body. Thus, the objective of this research was to verify the biocompatibility of sintered 99.95% and 99.5% pure iron by powder metallurgy *in vitro* with Adipose-derived mesenchymal stromal cells (ADSCs) and *in vivo* with a Wistar rat model. Herein, characterizations of iron powder samples produced by the powder metallurgy and the process parameters as compression pressure, atmosphere, sintering time and temperature were determined to evaluate the potential of production of biodegradable implants. The samples obtained from pure iron were submitted to tests of green and sintered density, porosity, microhardness, hardness and metallography. The biocompatibility study was performed by indirect and direct cell culture with iron. The effects of corrosion products of iron on morphology, viability, and proliferation of ADSCs were evaluated *in vitro*. Hemolysis assay was performed to verify the hemocompatibility of the samples. *In vivo* biocompatibility was evaluated after pure iron discs were implanted subcutaneously into the dorsal area of Wistar rats that were followed up to 6 months. The results presented in this paper validated the potential to produce biodegradable medical implants by powder metallurgy. Both iron samples were hemocompatible and biocompatible *in vitro* and *in vivo*, although the 99.95% iron had better performance *in vitro* than 99.5%.

1. Introduction

Biodegradable metallic materials (BMMs) are expected to corrode gradually *in vivo* after providing the structural support to the tissue during its regeneration and healing processes. The major components of BMMs should be essential metallic elements that can be metabolized by the organism with appropriate degradation rates to avoid overload. Magnesium-based BMMs and Iron-Based BMMs are the most commonly proposed metals to be used in cardiovascular or orthopedic implants [1,2].

In cardiovascular applications, BMMs are promising candidates for use in stents, whose main function is to keep the lumen open after the angioplasty procedure [3,4]. The ideal biodegradable cardiovascular stent must be biocompatible, prompt to disappear without developing

an inflammatory response and it should have mechanical properties providing the required support to the vessel during the necessary period. The degradation must begin at a very slow rate to keep the mechanical integrity of the stent until the arterial vessel remodeling, which is expected to conclude in a period of 6–12 months [5–7].

Most of the cardiovascular stents including BMMs are produced from metallic ingots fabricated using both casting and thermomechanical treatment. Recently, the use of new processes in the fabrication of biodegradable metallic stents, such as powder metallurgy, has been investigated. Because porous alloys and metals normally have less corrosion resistance than fully dense alloys, the use of powder metallurgy became a promising option in the conception of biodegradable stents [3,8].

The conventional process of powder metallurgy consists of metal

* Corresponding author at: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA 245, Sarmento Leite, Porto Alegre, RS CEP 90050-170, Brazil.
E-mail address: mwink@ufcspa.edu.br (M.R. Wink).

¹ These authors contributed equally to this work.

² These authors share senior authorship.

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111129>

Received 31 January 2020; Received in revised form 22 April 2020; Accepted 26 May 2020

Available online 27 May 2020

0928-4931/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

forming metallic powders, alloy powders and non-metallic materials or ceramic powders in reliable parts, within a tool of the desired shape by applying pressure. The parts made by powder metallurgy have a certain porosity, which can be controlled by factors such as compaction pressure, sintering temperature and time, size and shape of the powder particles [4]. The resulting porosity provides greater degradability that can reduce the absorption time of the implant in the organism because of its larger surface area [9]. In addition, this process allows a controlled porosity. This feature would facilitate the adherence of drugs that can be useful to produce drug-eluting stents [10].

Among the BMMs, iron has been proposed as an adequate material in the manufacturing of stents because its mechanical properties are closer to stainless steel 316L (SS316L) than the Mg alloys are. This provides higher confidence for stent application, which requires high strength and ductility [11]. Besides, iron has other benefits for clinical applications: it is essential to human life, possesses low toxicity and the transport mechanisms for clearance of its degradation products are relatively understood. However, its excess can be deleterious [12]. An iron overload may be caused by a continuous load of iron that exceeds 1–2 mg/day. It happens due to the lack of active excretion pathways for iron in the human body, which may lead to organ failures [12]. Henceforth, the level of degradation of an intravascular device composed of this element must be well-known.

It has been discussed that the level of impurities occurring in each production step needs to be determined. However, it is still unclear what level of impurity concentration is considered tolerable, and thus may be left in the material to maintain the device properties. Therefore, in the present study, we produced sintered iron samples with 99.95 and 99.5% of purity by powder metallurgy (99.95 and 99.5% iron) and evaluated *in vitro* and *in vivo* biocompatibility of the biomaterial for future applications in biomedical devices.

2. Materials and methods

2.1. Iron powder samples

The iron powders used in this study have a purity of 99.95% (Lyuelong superfine metal Co., China) and 99.5% (TCK, Yeouli-aero, Korea).

The chemical analysis with the maximum percentages of the elements to guarantee the purity of the powders was provided by the suppliers. Table 1 shows the limits of the elements contained in the powders used in this research.

Scanning Electron Microscope (SEM) was employed to assess the morphology of the iron powders and the granulometry test was performed to determine the particle size distribution.

2.2. Iron samples with 99.95 and 99.5% of purity obtained by powder metallurgy

The samples were compacted by a cylindrical die of tempered steel AISI D6 in manual hydraulic press with a maximum capacity of 30 tons. The compacted samples for *in vitro* experiments measured approximately 13.0 mm in diameter ($\varnothing$) and 11.0 mm in height (h) and the samples used for *in vivo* implantation measured approximately 6.5 mm in diameter ($\varnothing$) and 2.0 mm in height (h). In this study, the compaction pressure used was 600 MPa.

To calculate the density of the compacted samples, the masses were

weighed on an analytical balance and the diameters and heights were measured using a micrometer. The sintering was performed in an electric tube furnace silicon carbide resistor, with electronic control, precision $\pm 1^\circ\text{C}$ at the working temperature and atmosphere of Argon. The sintering cycle used was 1150 $^\circ\text{C}$ for 60 min and the cooling was carried out in the oven. The density of the sintered samples was measured in the same way as the compacted samples.

Mechanical properties analyses of the sintered pure iron samples were performed. The microhardness and hardness were measured using Vickers and Brinell tests, respectively. The Vickers hardness of the sintered pure iron samples was determined by durometer Insize ISH-TDV 1000 with load of 0.5 kgf (4.9 N), according to ASTM E384 [13]. The Brinell hardness was determined by hardness tester MRS Fortel with 2.5 mm diameter indenter and a load of 62.5 kgf (612.92 N), according to ASTM E10 [14]. The sintered metallography was performed according to standard preparation and polishing. The samples were abraded with sandpaper aluminum oxide 100, 200, 400, 600, 800, 1000 and 1200 “mesh” being polished with diamond paste 1 μm and observed by an optical microscope [15].

The ImageJ software was used to improve the quality of the images and evaluate the porosity and the grain size, after the etching by 2% Nital reagent, according to ASTM E 562-02 standard [16].

2.3. Adipose-Derived Stem Cells: Isolation and characterization

Adipose-Derived Stem Cells were extracted from the abdominal adipose tissue of a healthy adult donor undergoing tumescent liposuction. The experimental protocol was approved by the Research Ethics Committee of Santa Casa de Misericórdia of Porto Alegre (ISCPMA) and Research Ethics Committee of the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA) (approval no. 3029.141 and 3.734.612, respectively). The written informed consent was obtained from donors according to the Declaration of Helsinki. The isolation and culture of ADSCs were performed as previously described by our group [17,18].

Briefly, the tissue was washed with phosphate-buffered saline (PBS) and its extracellular matrix was digested with type I collagenase solution (250 U/mg, 1 mg/mL) at 37 $^\circ\text{C}$ for 30 min with periodic shaking. The enzymatic action was neutralized with the addition of Dulbecco's modified Eagle's Medium standard (DMEM)- low glucose (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), supplemented with 10% FBS (Fetal Bovine Serum). Cells were centrifuged at 1200 rpm for 10 min and the supernatant was discarded. Subsequently, they were resuspended in erythrocyte lysis buffer (150 mM NH_4Cl , 10 mM NaHCO_3 and 1 mM EDTA) with simultaneous mechanical shaking and incubated for 15 min at room temperature.

The solution was centrifuged at 1200 rpm for 10 min, a procedure that separates the adipocytes present in the supernatant of the vascular stroma cell fraction (SVF), which consists of a heterogeneous population of cells, including circulating blood cells, fibroblasts, pericytes, endothelial cells, and it is also rich in MSCs. Cells present in the pellet were cultured with the standard medium supplemented with 10% FBS, 100 U L^{-1} penicillin and 100 mg/L streptomycin. It was kept in an aseptic and humidified environment at $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ and 5% CO_2 and routinely passaged at preconfluency using 0.25% trypsin and 0.01% EDTA. For the experiments, cell cultures were used in passages from 4 to 10 [17].

These cells were tested to verify their capabilities to differentiate into adipogenic, chondrogenic and osteogenic cells. The adipogenic and osteogenic differentiation were induced according to Beckenkamp et al., 2018 [19]. Briefly, adipogenesis induction medium (AIM) contained DMEM with high glucose, 10% FBS, 1 μM dexamethasone, 10 $\mu\text{g/L}$ insulin, 200 μM indomethacin, osteogenic induction medium (OIM) contained DMEM with high glucose, 10% FBS, 0.1 μM dexamethasone, 10 mM β -glycerol phosphate, and 200 μM ascorbic acid and StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco®; Invitrogen, Grand Island, NY) were used in the experiment. The differentiated cells

Table 1
Maximum percentage of elemental impurities.

Fe %	C %	H %	N %	S %	O %
≥ 99.95	≤ 0.02	–	–	≤ 0.01	≤ 0.02
≥ 99.5	≤ 0.15	≤ 0.1	≤ 0.01	≤ 0.19	≤ 0.05

(HGB) levels. The hematologic analyses of non-coagulated blood samples were performed in BC-5380 auto hematology analyzer (Mindray, Shenzhen, China). Serum from separation tube was used to assess the levels of aspartate aminotransferase (AST), Alkaline phosphatase (ALP), Alanine transaminase (ALT), ferritin and iron (Bioclin® Kits, Brazil). The analyses were performed in the BS-120 chemistry analyzer (Mindray, Shenzhen, China).

2.7.3. Histological analysis

The implants with surrounding tissue were recovered, carefully separated from the tissue, dried, ultrasonicated for 20 min immersed in alcohol, cleaned, air-dried, and the final mass was measured to determine the change in mass. The tissue around the implant location and organs (liver, heart, lungs, spleen and kidney) were fixed in 10% neutral buffered formalin for histological assessment. They were trimmed, included in paraffin, sectioned (4 μm per section) and deparaffinized on microscopy slides. Finally, tissue samples were stained with hematoxylin and eosin (H&E), and analyzed by a veterinary pathologist to identify inflammatory infiltration, fibrosis and necrosis.

2.8. Statistical analysis

Statistical analysis was conducted with GraphPad Prism biostatistics software (GraphPad Inc., California, USA). Differences between groups were analyzed using two-way ANOVA. $p < 0.05$ was accepted as a statistically significant difference between means. Error bars within figures represent standard errors.

3. Results and discussion

In this study, 99.95% and 99.5% iron samples were produced by powder metallurgy. The physical and mechanical characteristics were analyzed by green density, sintered density, porosity, microhardness (HV), hardness (HB) and metallography. The biocompatibility of these samples was tested *in vitro* using primary mesenchymal stromal cells from adipose tissue and *in vivo* using an animal model.

3.1. Physical and mechanical properties

The SEM micrographs analysis of the iron powder with a purity of 99.95% and 99.5% shows the metal morphology at 10000 $\times$ magnification (Fig. 1). It can be observed that the iron powder samples have a nearly-spherical shape with a homogeneous distribution of particle sizes. The powder samples have this morphology due to its production process by atomization. In addition, the surface of 99.95% iron powder

is smooth (Fig. 1A) and the 99.5% iron powder has protrusions (Fig. 1B). Both purities of iron powders have a diameter ranging between 1 and 5 μm .

Considering that the size of particles is crucial to the manufacturing of sintered components [26], the granulometry test of iron powders was performed (Fig. 2). The average particle size found is 5.75 μm and 7.47 μm , for 99.95% and 99.5% iron, respectively. The results of Fig. 2 are summarized in Table 2.

The green density of the iron compacted samples with 99.95% of purity showed an average green density of 6.6 g/cm^3 and variation between 6.5 and 6.7 g/cm^3 . The compacted samples with 99.5% of purity showed an average green density of 5.65 g/cm^3 and variation between 5.5 and 5.7 g/cm^3 . As it can be seen, there is a difference between the green densities of the samples because the 99.95% iron powder has greater compressibility than 99.5%. This is probably due to the protuberances found in 99.5% iron particles, shown in Fig. 1B.

The densities of both purities of iron were similar after sintering. The average density of 99.95% and 99.5% sintered pure iron samples reached 6.5 $\text{g}/\text{cm}^3 \pm 0.2$ (6.5 to 6.7 g/cm^3 for 99.95% and 6.3 to 6.5 g/cm^3 for 99.5%) in the pressure of 600 MPa, a satisfactory result for the material.

The sintered samples were further evaluated by metallography. The Fig. 3 shows 99.95% and 99.5% iron samples, before (Fig. 3A and C) and after (Fig. 3B and D) etching by Nital 2%. The 99.95% iron (Fig. 3A) showed small pores measuring between 1.1 and 7.9 μm , and larger pores between 13.7 and 30.7 μm (average size 2.3 μm); while 99.5% iron (Fig. 3C) showed small pores measuring between 1.1 and 8.8 μm , and larger pores between 17.6 and 31.1 μm (average size 2.9 μm). Considering the pores average size measured in both samples, they can be considered as small pores.

The iron sintered samples have a porosity whose characteristic is directly related to the density. However, both samples showed a similar density, with an average of 17.41%, lesser than the theoretical density. The variation of density to 99.95% and 99.5% sintered pure iron samples was 0.4 g/cm^3 (6.5 to 6.7 g/cm^3 for 99.95% and 6.3 to 6.5 g/cm^3 for 99.5%).

The analysis of grain sizes showed that both samples presented several grain sizes. The average grain size measured in the 99.95% iron samples was 19.94 $\mu\text{m} \pm 13.06$ (Fig. 3B). The 99.5% iron samples had an average grain size of 34.45 $\mu\text{m} \pm 15.08$ (Fig. 3D). These grain sizes and variations have adequate mechanical properties for medical applications [27].

As mechanical tests, we have chosen to perform the Vickers microhardness (HV) and Brinell hardness (HB) tests. The microhardness measured of 99.95% and 99.5% iron samples were 185.8 HV ± 17.9

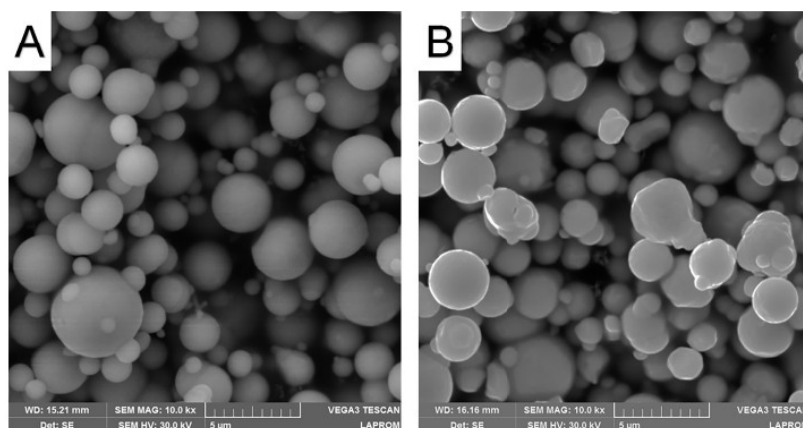


Fig. 1. SEM micrographs of the iron powder morphology with a purity of 99.95% (A) and 99.5% (B).

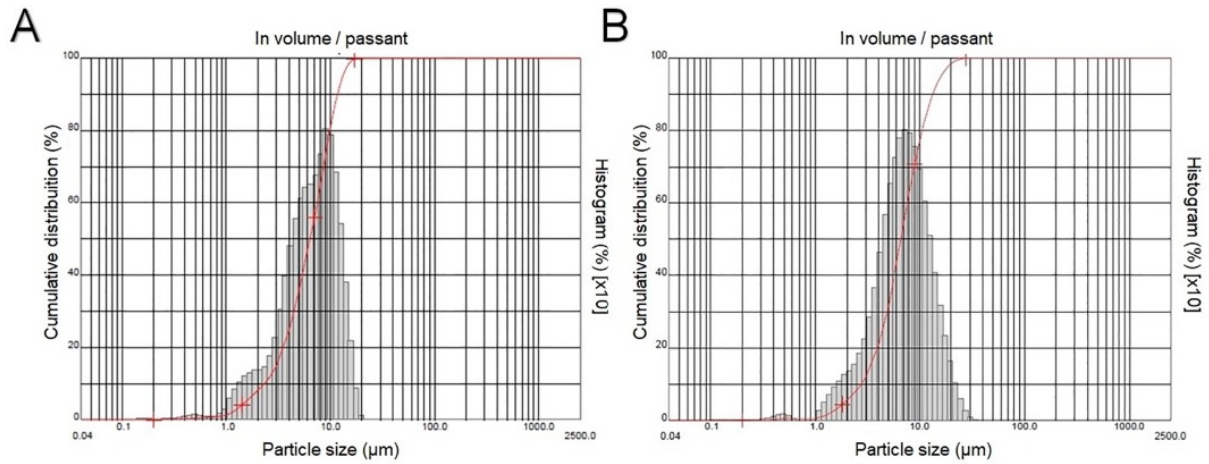


Fig. 2. Particle size distribution of 99.95% (A) and 99.5% (B) iron powder.

Table 2

Particle size analysis of 99.95% and 99.5% iron powders.

	99.95% Iron	99.5% Iron
D90	< 11.69 μm	< 13.36 μm
D50	< 6.33 μm	< 6.61 μm
D10	< 2.3 μm	< 2.70 μm
Average particle size	5.75 μm	7.47 μm

(1822 MPa) and $180.2 \text{ HV} \pm 12.7$ (1767 MPa), respectively. These values were close to 317 L stainless steel, $198.7 \text{ HV} \pm 9.9$ (1949 MPa), which is considered the golden standard to the manufacture of

permanent stents [28]. The Brinell hardness test showed homogeneity in measured values, 99.95% iron samples had $64.4 \text{ HB} \pm 0.6$ and 99.5% iron samples had $62.1 \text{ HB} \pm 1.7$. These results are equivalent to those found in biomedical magnesium alloys applied *in vivo* stent studies with rabbit models [29]. In conclusion, the 99.95% iron samples have greater hardness and microhardness than 99.5% iron samples, which can be due to the pores and grains of the smaller microstructure.

3.2. Isolation and characterization of ADSCs

MSCs isolated from human adipose tissue showed a typical fusiform morphology, adherence to plastic, capacity to self-renew and

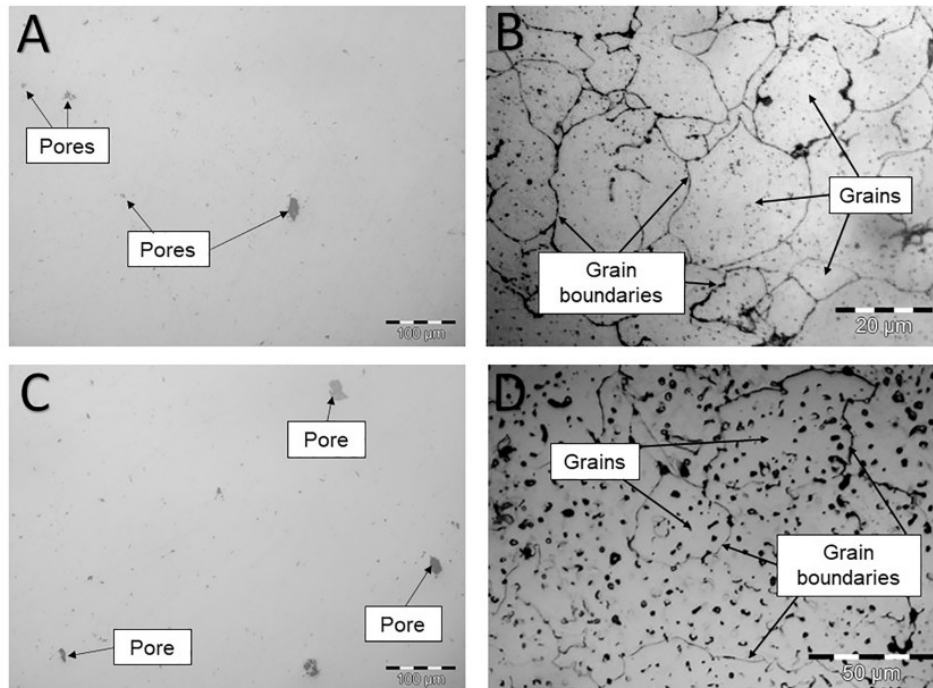


Fig. 3. Metallography of 99.95% sintered iron without etching, 200 $\times$ magnification (A) and after etching of Nital 2%, 1000 $\times$ magnification (B); 99.5% sintered iron without etching, 200 $\times$ magnification (C) and after etching of Nital 2%, 500 $\times$ magnification (D).

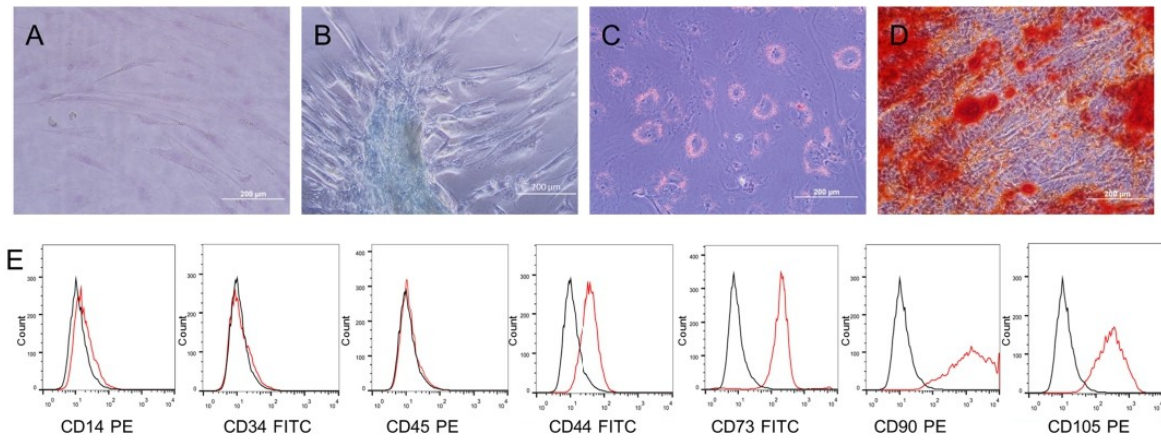


Fig. 4. Characterization of Adipose Derived Stem Cells (ADSCs). (A) Non differentiated control cells. (B–D) Cells show potential for differentiation towards chondrogenic (Alcian Blue), adipogenic (Oil Red O staining) and osteogenic (Alizarin Red) lineages. (E) Flow cytometry of ADSCs shows that cells were negative for CD14, CD34 and CD45 and positive for CD44, CD73, CD90 and CD105. Optical microscopy, 200 $\times$ magnification.

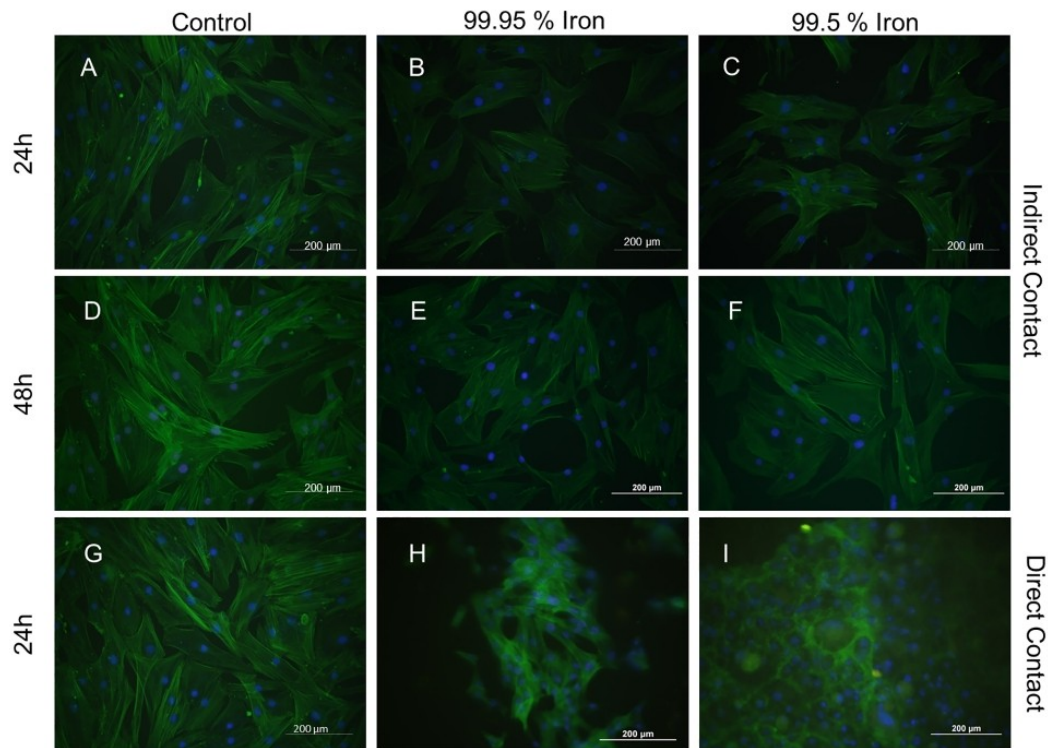


Fig. 5. Micrographs show the F-actin cytoskeleton (green) and nuclei (blue) of the ADSCs treated with 99.95 and 99.5% iron extract of 24 and 48 h for, respectively, the same time (B, C, E, F) and negative control (A, D, G). Fluorescence microscopy, 200 $\times$ magnification.

differentiate *in vitro*. The immunophenotyping results by flow cytometry indicated that cells were positive for the mesenchymal stem cell markers CD44, CD73, CD90 and CD105 but negative for the hematopoietic cell markers CD14, CD34 and CD45. They were also able to differentiate in three cellular lineages: chondrogenic, adipogenic and osteogenic when stimulated with differentiation medium. The intracellular lipid vacuoles in adipocytes were identified with Oil Red O solution, the biosynthesis of proteoglycans by chondrocytes with alcian

blue and the calcium-rich mineralized matrix in osteocytes with alizarin red S staining. These characteristics confirm that the cultured cells are phenotypically mesenchymal as well as functionally multipotent (Fig. 4) [30].

3.3. *In vitro* biocompatibility

In vitro cytocompatibility was assessed on the 99.95 and 99.5%

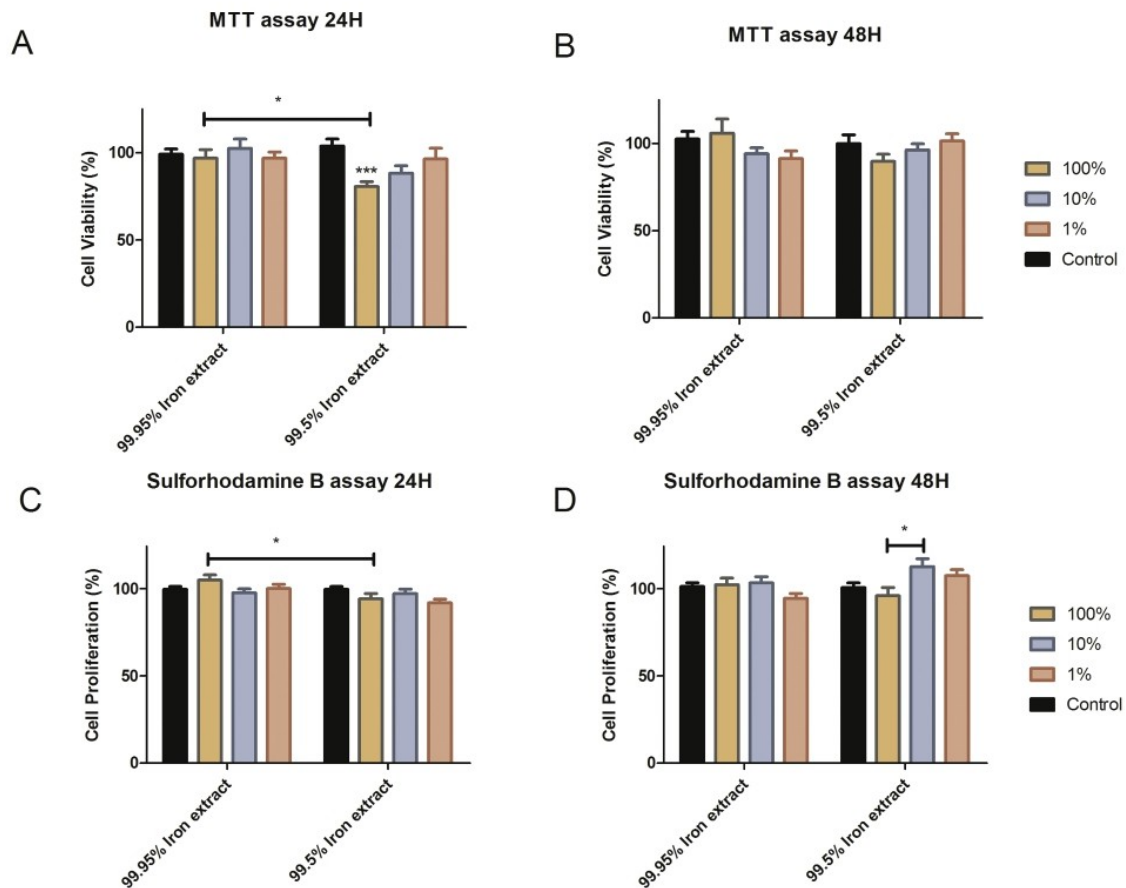


Fig. 6. Graph representing the cell viability (A–B) and proliferation (C–D) after culture with 99.95 and 99.5% iron extracts for 24 h and 48 h. N = 3 *represents $p < 0.05$.

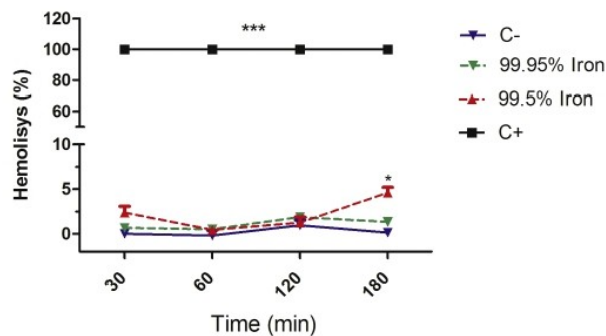


Fig. 7. Hemolysis percentages of 99.5 and 99.95% iron samples after 30, 60, 120 and 180 min. Water was used as positive control and 1 × PBS as negative control. N = 3. *represents $p < 0.05$.

sintered iron samples by (1) analyzing the cytomorphology with DAPI-Phalloidin stain after growing cells using the iron extracts or by directly plating them on the iron discs (Fig. 5); and by (2) exposing ADSCs to media containing degradation products of the materials and analyzing cell viability and proliferation, using the colorimetric MTT assay and Sulfurhodamine B, respectively (Fig. 6).

Cells cultured with 99.95% and 99.5% iron extracts showed adherence to plastic and the typical fusiform morphology of the ADSCs. They also maintained the integrity of the actin cytoskeleton and nuclei as observed by fluorescence microscopy (Fig. 5A–F). Regarding the cells

that were directly plated on the surfaces of iron discs, they were able to adhere and grow. The morphology of ADSCs plated on 99.95% iron disc did not change, in contrast to cells cultured on 99.5% iron that suffered alteration in the fibroblastic morphology due to the disorganization of their actin filaments (Fig. 5G–I).

In addition, the MTT assay results exhibited good cytocompatibility with 100%, 10% and 1% iron extracts in 24 h and 48 h, as shown in Fig. 6A–B. ADSCs presented similar viability when they were compared to the negative control, although the cells cultured with 100% extract of 99.95% iron were statistically more viable than those cells treated with 99.5% after 24 h. SRB assay showed that cells did not lose their proliferation potential after 24 h and 48 h of incubation with iron extracts. Interestingly, when cells were treated for 24 h with 100% extract of 99.95% iron, they were more proliferative than with 99.5% ($p < 0.05$) (Fig. 6C–D).

According to ISO 10993-5 if viability is reduced by $> 30\%$, the biomaterial has a cytotoxic potential. Based on this recommendation, both iron extracts caused no cytotoxic effect on ADSCs in our analysis. In accordance, degradation products of iron with different levels of purity and its alloys *i.e.*, iron-oxides, hydroxides, carbonates, and phosphates, have also been reported to be non-toxic and cytocompatible to fibroblast [6,31] endothelial [32,33], smooth muscle [33,34] and mesenchymal [31] cells [35,36].

3.4. Hemocompatibility in vitro

The hemolysis assay was applied for evaluating the hemocompatibility of iron samples. The ASTM F756-08 materials can be classified

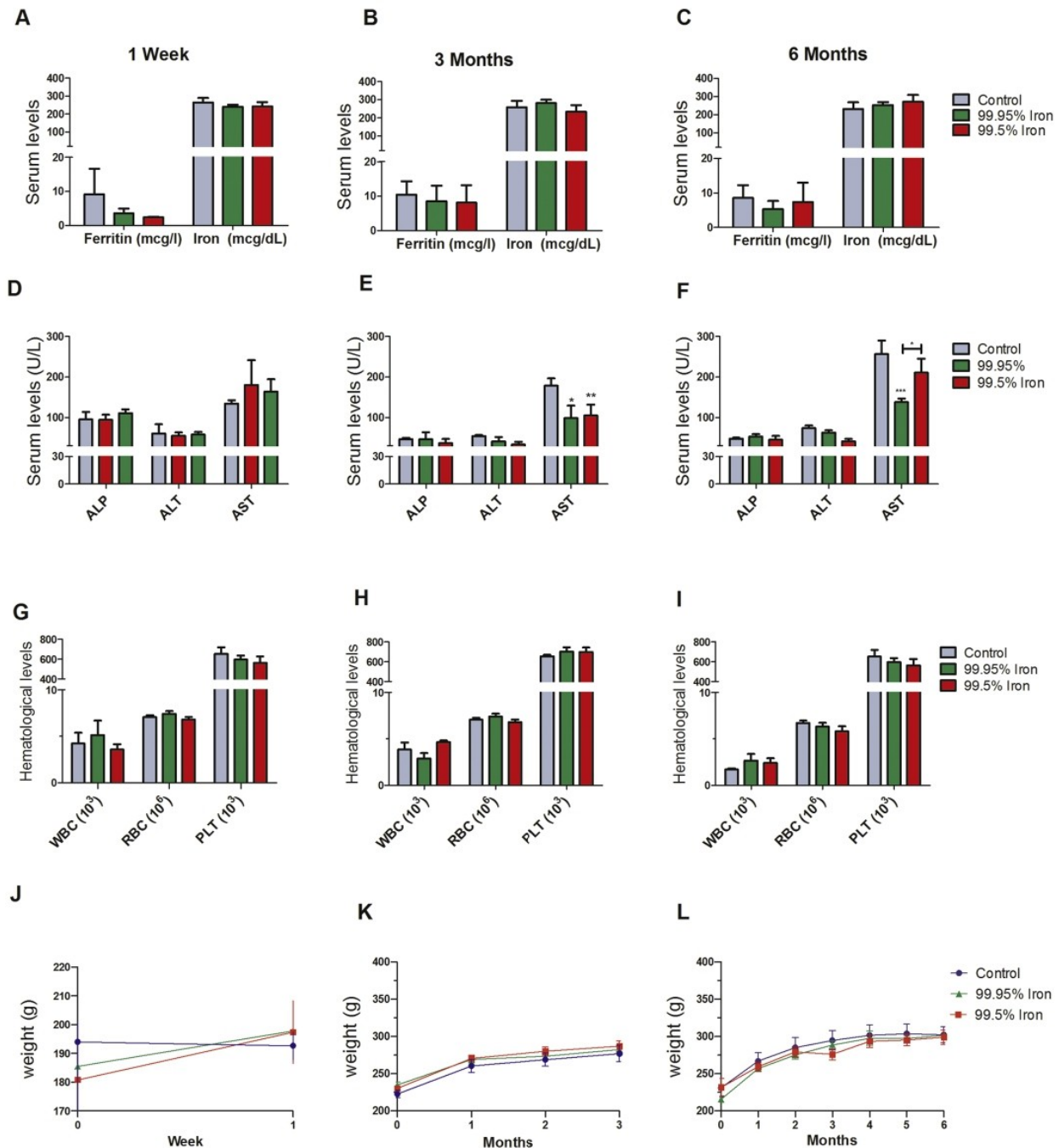


Fig. 8. Serum levels: Ferritin and Iron after 1 week (A), 3 months (B) and 6 months (C). ALP, AST, ALT after 1 week (D), 3 months (E) and 6 months (F). Hematological parameters: Red blood cells (RBC) level (b) Hemoglobin (HGB) level (C) White blood cells (WBC) level after 1 week (G), 3 months (H) and 6 months (I). Body Weight follows after 1 week (J), 3 months (K) and 6 months (L) groups. *represents $p < 0.05$.

into three categories according to the hemolytic index: hemolytic with a percentage of hemolysis over 5%, slightly hemolytic with a hemolytic index between 5% and 2%, and non-hemolytic with the hemolysis percentage below 2% [37].

The hemolytic index of both irons was lower than 5% indicating their hemocompatibility (Fig. 7). Although, 99.95% iron was less hemolytic than the 99.5% one. The analysis of studies found in the literature showed that pure iron and Fe-based materials caused a

hemolysis percentage ranging from 1.46% to 5.327% [33,34,38,39], corroborating our findings. According to the ASTM standards, 99.95% and 99.5% iron produced by powder metallurgy are potential candidates to be considered for medical applications.

3.5. In vivo biocompatibility

The subcutaneous implantation of 99.5 and 99.95% iron discs into

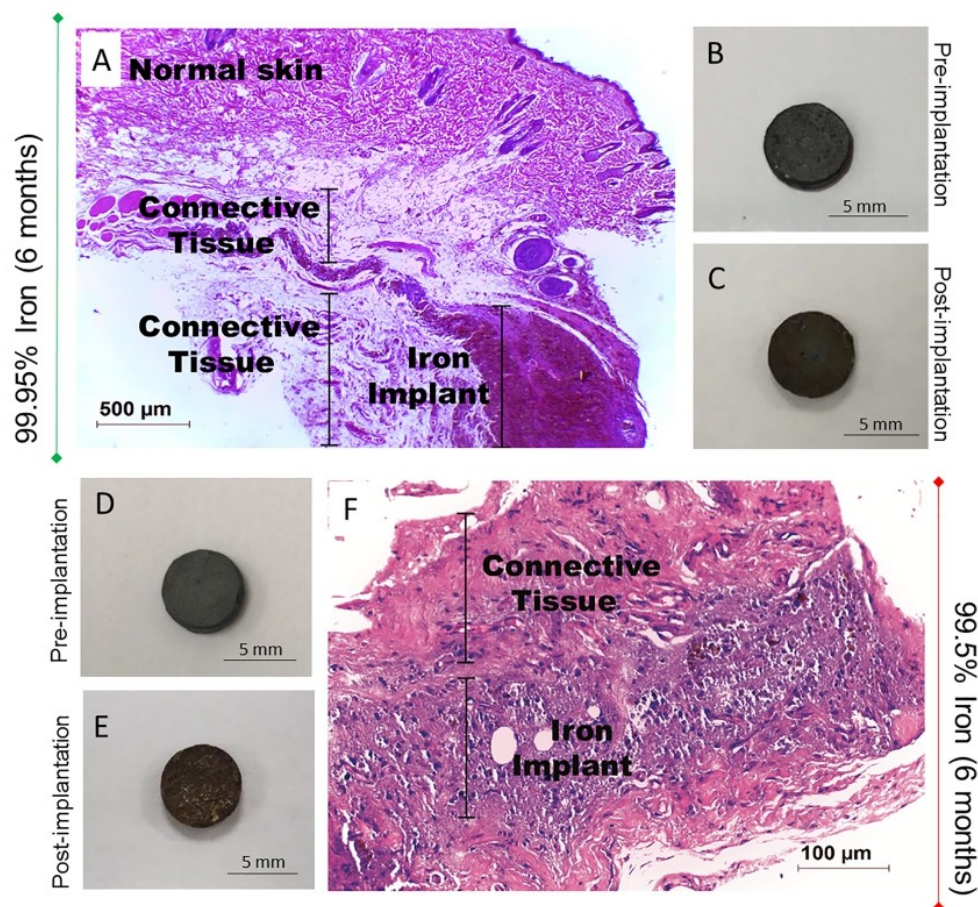


Fig. 9. H&E staining of the subcutaneous tissue around the discs (A, F). 99.95 (B–C) and 99.5% (D–E) iron discs before and after 6 months implantation. The accumulation of iron and the connective tissue that forms in the periphery of the implant were marked in the image.

the dorsal area of rats was performed to evaluate the degradation behavior and biocompatibility under physiological conditions during one week, three and six months.

The ferritin whose major function is to detoxify and store intracellular iron did not show alteration in comparison to control, as well as iron serum levels (Fig. 8A–C) [40]. Serum biochemical and hematological parameters were also analyzed. These analyses revealed similar values for AST, ALT and ALP, when comparing to control and treatments samples (Fig. 8D–F).

RBC, WBC counts and HGB levels in rats implanted with iron discs and controls were similar. This can indicate that the 99.95 and 99.5% iron implants did not cause anemia or general infection (Fig. 8G–I). In addition, all animals with iron implants exhibited normal weight gain, similar to the control group (Fig. 8J–L). Post-implantation assessment including well-being, hair growth and surgical wound healing showed no signs of distress or harmful effects generated by the iron implants.

Histological analysis of the subcutaneous tissue around the iron discs after 6 months are shown in Fig. 9. The implant sites of both irons showed proliferation of fibrous connective tissue, forming a capsule that normally develops around solid, non-corroding or very slow corroding implants [17,41,42]. Subcutaneous tissue and adjacent skin did not present signs of necrosis, but the capsule formed was frequently associated with macrophages with intracytoplasmic granular brownish pigment and occasionally cellular debris and lymphocytes. We neither visualize iron accumulation in the tissues, nor significant changes in the organs (Fig. 10).

Iron stents with 99.8% and 99.5% of purity manufactured by laser cutting processes were implanted, respectively, into the descending aorta of rabbits and minipigs [4,43]. These endovascular stents presented a low thrombogenicity and minimal neointimal hyperplasia. Similarly to our results, in this study, the animals neither showed significant organ accumulation of the degradation products nor systemic and local toxicity. These studies also demonstrated that the degradation rate of iron was low, once large portions of the stents were still intact even after one year of implantation [4,43].

A low degradation rate of iron can prevent fragment embolization in the vase and thus, it is an advantage to use this biomaterial. However, a prolonged degradation time and the difficulty to clear off the degradation products retained in the local tissues are disadvantages of Fe-based metals. The low corrosion can be explained by the formation of an iron oxide passivation layer on the surface that inhibits the chemical attack of the osteogenic body fluid for orthopedic applications and the blood for vascular application [36,44]. To ensure an appropriate degradation rate, it is important to consider the fabrication method and modification of the biomaterial that could accelerate the degradation process, such as surface modification [45], porous ceramic biocomposite [46] and alloying elements [47].

Regarding our study, we also observed a low degradation rate of iron samples implanted in animals, with minimal loss up to six months, without difference between the irons tested (Table 3). In accordance, Drynda and colleagues found that FeMn alloys and pure iron implanted in the subcutaneous tissue of mice did not exhibit significant signs of

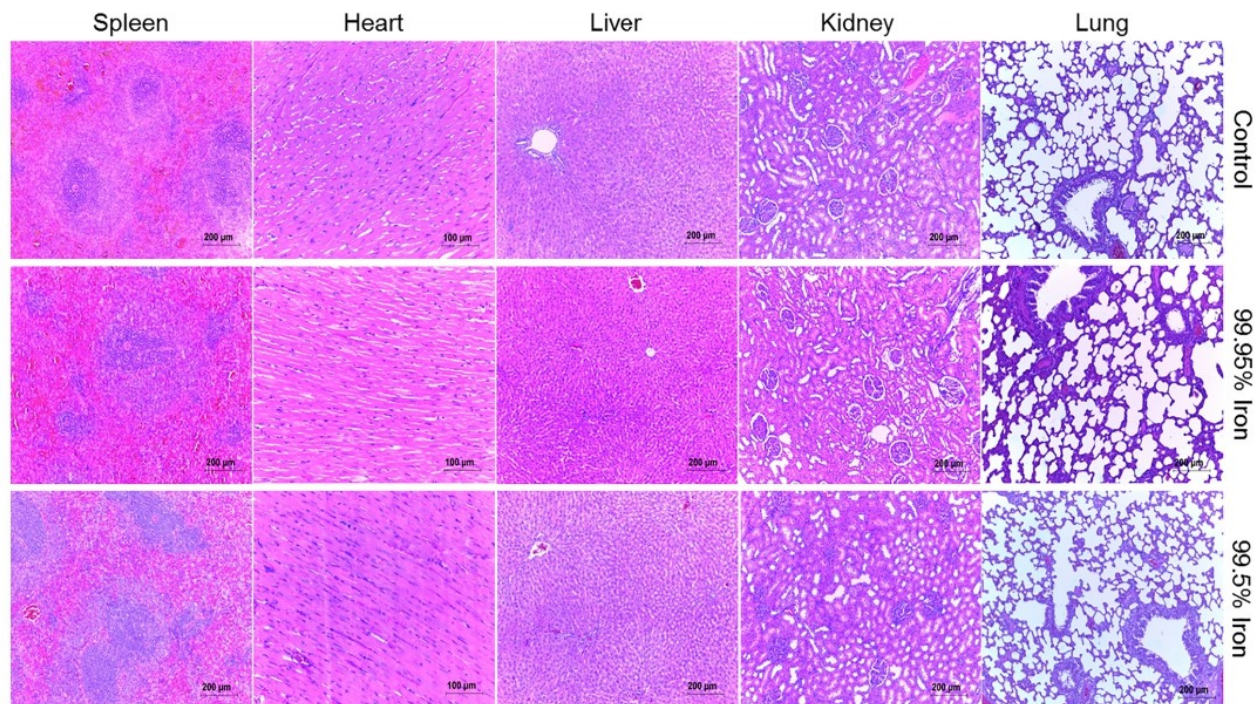


Fig. 10. Histopathology of the major organs after 6 months of iron implantation discs in the subcutaneous tissue. Hematoxylin and eosin staining of tissues harvested from spleen, heart, liver, kidney and lung of the rats. The analysis did not reveal any histological changes between implanted and non-implanted rats.

Table 3

Masses of 99.95 and 99.5% iron discs before and after implantation in the subcutaneous tissue of rats using paired *t*-test.

99.95% Iron					99.5% Iron				
	N	Average pre implantation (SD)	Average post implantation (SD)	p-Value	N	Average pre implantation (SD)	Average post implantation (SD)	p-Value	
6 Months	5	0.455 (0.092)	0.457 (0.093)	0.7077	6	0.371 (0.187)	0.372 (0.189)	0.6432	
3 Months	5	0.351 (0.137)	0.351 (0.138)	0.0597	6	0.458 (0.137)	0.458 (0.137)	0.4743	
1 Week	6	0.379 (0.073)	0.380 (0.073)	0.0064	6	0.344 (0.106)	0.345 (0.107)	0.0214	

Abbreviation: SD = standard deviation.

corrosion after 3, 6, and 9 months [48]. This was expected, once the implants were subcutaneously implanted, avoiding the shear stress. Additionally, other experiments indicated that the degradable rate of pure iron *in vivo* is lower than *in vitro* [32].

A biodegradable metal stent must remain intact in the first 6 months and start its degradation between the 6th and 12th month, which is the interval where the remodeling of the vessel occurs. After this period, the material should progressively increase its degradation [49]. Therefore, the fact that our samples did not show degradation in the first 6 months is a desirable characteristic according to the literature. However, it is important to reinforce a limitation of our study. In our preclinical model, the iron samples were implanted into the subcutaneous of rats, thus avoiding the interaction between the biomaterial and blood vessels. When a stent is expanded in the artery, it is exposed to residual stress, cyclic loading from vessel expansion/contraction, and shear stress by blood flow [50]. These are factors that will influence the degradation rate of the stent.

4. Conclusion

Currently, the manufacturing process of stents involves several steps, such as casting, extrusion and laser cutting of alloys, which lead to an increase in the cost of production. Powder Metallurgy is a relatively recent technique with high precision and productive capacity, in

which the loss of raw material used in the manufacturing of the component is minimal or nonexistent [9]. There are few studies in the literature testing pure iron stents and, so far, none testing the powder metallurgy fabrication method [4,43,51,52].

The Food and Drug Administration (FDA) does not approve specific biomaterials for clinical use, as pure iron. The approvals are only issued for clinical use of specific devices [53]. Despite promising, there is no FDA approved iron stent yet. Therefore, results from engineering, *in vitro* and *in vivo* biocompatibility are necessary to prove that this material can be used with safety [54,55]. In this context, our study is important as it showed that the pure iron samples produced by powder metallurgy are biocompatible *in vitro* and *in vivo*. In addition, they have the physical and mechanical properties necessary to encourage the production of medical devices such as stents, which can be tested intravenously in preclinical models, as minipigs that allow to evaluate the degradation rate under shear stress, as well as the other hemodynamic parameters necessary to consider them for clinical trials.

Funding

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul - Brazil (FAPERGS) FAPERGS/MS/CNPq/SESRS n. 03/

2017 – PPSUS 17/2551-0001 (Process: 416-2, Marcia R. Wink and 413-8, Lírio Schaeffer) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brazil (CNPq) MS-SCTIE-Decit/CNPq n° 12/2018 (441575/2018-8).

Thaís Casagrande Paim, Mônica Slaviero and Liliana Ivet Sous Naasani are recipients of fellowships from CAPES. Diego Pacheco Wermuth, Isadora dos Santos Bertaco and Carla Zanatelli are recipients from CNPq. Márcia Rosângela Wink, Lírio Schaeffer and David Driemeier are recipients of a research productivity fellowship from the CNPq.

CRediT authorship contribution statement

Thaís Casagrande Paim: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Methodology, Investigation, Visualization, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Diego Pacheco Wermuth:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Methodology, Investigation, Visualization, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Isadora Bertaco dos Santos:** Investigation, Validation, Visualization. **Carla Zanatelli:** Conceptualization, Investigation. **Liliana Ivet Sous Naasani:** Conceptualization, Investigation. **Mônica Slaviero:** Investigation, Formal analysis. **David Driemeier:** Formal analysis. **Lírio Schaeffer:** Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Resources, Supervision. **Márcia Rosângela Wink:** Conceptualization, Formal analysis, Methodology, Funding acquisition, Project administration, Resources, Supervision, Writing - original draft, Writing - review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors would like to thank MSc. Cristiano Rodrigues (Laboratório de Biologia Celular, UFCSPA); Giuliano Rizzotto Guimarães and Terezinha Stein (Laboratório de Pesquisa em Patologia, UFCSPA); Camila Romero (Laboratório de Análises Clínicas, UFCSPA); Laura Alencastro de Azevedo (Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas, UFRGS); and Dr. Joana Fisch and Dr. Fernanda Bastos de Mello (Animal facility, UFCSPA) for excellent technical support. The authors also gratefully acknowledge Dr. André Carvalho Tavares (Laboratório de Transformação Mecânica, UFRGS) and Dr. Vinicius Martins (IFSUL) for carrying out the particle size distribution test and the Powder Metallurgy Laboratory, IFSUL-Campus Sapucaia do Sul, for providing technological resources.

References

- N.S. Fagali, C.A. Grillo, S. Puntarulo, M.A. Fernández Lorenzo de Mele, Cytotoxicity of corrosion products of degradable Fe-based stents: relevance of pH and insoluble products, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 128 (2015) 480–488.
- A. Purnama, H. Hermawan, J. Couet, D. Mantovani, Assessing the biocompatibility of degradable metallic materials: state-of-the-art and focus on the potential of genetic regulation, *Acta Biomater.* 6 (2010) 1800–1807.
- M. Moravej, D. Mantovani, Biodegradable metals for cardiovascular stent application: interests and new opportunities, *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 4250–4270.
- M. Peuster, C. Hesse, T. Schloo, C. Fink, P. Beerbaum, C. von Schnakenburg, Long-term biocompatibility of a corrodible peripheral iron stent in the porcine descending aorta, *Biomaterials* 27 (2006) 4955–4962.
- N. Gonzalo, C. Macaya, Absorbable stent: focus on clinical applications and benefits, *Vasc. Health Risk Manag.* 8 (2012) 125–132.
- H. Hermawan, A. Purnama, D. Dube, J. Couet, D. Mantovani, Fe-Mn alloys for metallic biodegradable stents: degradation and cell viability studies, *Acta Biomater.* 6 (2010) 1852–1860.
- A. Schömg, A. Kastrati, H. Mudra, R. Blasini, H. Schühlen, V. Klaus, G. Richardt, F.J. Neumann, Four-year experience with Palmaz-Schatz stenting in coronary angioplasty complicated by dissection with threatened or present vessel closure, *Circulation* 90 (1994) 2716–2724.
- H. Hermawan, H. Alamdari, D. Mantovani, D. Dubé, Iron-manganese: new class of metallic degradable biomaterials prepared by powder metallurgy, *Powder Metall.* 51 (2008) 38–45, <https://doi.org/10.1179/174329008x284868>.
- A.C. Tavares, P. Mariot, D.C.L. Luana, L. Schaeffer, Metal injection molding for production of biodegradable implants: an analysis of the potential of pure iron for application in stents, *American Journal of Materials Science* 9 (2019) 36–43.
- J.J. Elsner, A. Kraitzer, O. Grinberg, M. Zilberman, Highly porous drug-eluting structures: from wound dressings to stents and scaffolds for tissue regeneration, *Biomater* 2 (2012) 239–270.
- H. Hermawan, D. Dubé, D. Mantovani, Degradable metallic biomaterials: design and development of Fe-Mn alloys for stents, *J. Biomed. Mater. Res. A* 93 (2010) 1–11.
- Y. Kohgo, K. Ikuta, T. Ohtake, Y. Torimoto, J. Kato, Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload, *Int. J. Hematol.* 88 (2008) 7–15, <https://doi.org/10.1007/s12185-008-0120-5>.
- E04 Committee, Test Method for Knoop and Vickers Hardness of Materials, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2011, <https://doi.org/10.1520/E0384-11E01>.
- E28 Committee, Test Method for Brinell Hardness of Metallic Materials, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2015, <https://doi.org/10.1520/E0010-15>.
- E04 Committee, Guide for Preparation of Metallographic Specimens, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2011, <https://doi.org/10.1520/E0003-11>.
- E04 Committee, Test Method for Determining Volume Fraction by Systematic Manual Point Count, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2019, <https://doi.org/10.1520/E0562-19>.
- C. Rodrigues, L.I.S. Naasani, C. Zanatelli, T.C. Paim, J.G. Azevedo, J.C. de Lima, M. da Cruz Fernandes, S. Buchner, M.R. Wink, Bioglass 45S5: structural characterization of short range order and analysis of biocompatibility with adipose-derived mesenchymal stromal cells in vitro and in vivo, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 103 (2019) 109781.
- L.I.S. Naasani, L.I. Sous Naasani, C. Rodrigues, J.G. Azevedo, A.F. Damo Souza, S. Buchner, M.R. Wink, Comparison of human denuded amniotic membrane and porcine small intestine submucosa as scaffolds for limbal mesenchymal stem cells, *Stem Cell Rev. Rep.* 14 (2018) 744–754, <https://doi.org/10.1007/s12015-018-9819-8>.
- L.R. Beckenkamp, L.E.B. Souza, F.U.F. Melo, C.H. Thomé, D.A.R. Magalhães, P.V.B. Palma, D.T. Covas, Comparative characterization of CD271 and CD271 subpopulations of CD34 human adipose-derived stromal cells, *J. Cell. Biochem.* 119 (2018) 3873–3884.
- A. Schäffler, C. Büchler, Concise review: adipose tissue-derived stromal cells—basic and clinical implications for novel cell-based therapies, *Stem Cells* 25 (2007) 818–827.
- International Organization for Standardization, Biological Evaluation of Medical Devices—Part 12: Sample Preparation and Reference Materials, (2004).
- H. Zhu, Cell proliferation assay by flow cytometry (BrdU and PI staining), *Bio-protocol* 2 (2012), <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.198>.
- V. Vichai, K. Kirtikara, Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening, *Nat. Protoc.* 1 (2006) 1112–1116.
- L. Mota Ferreira, M. Gehrcke, V. Ferrari Cervi, P. Eliete Rodrigues Bitencourt, E. Ferreira da Silveira, J. Hofstatter Azambuja, A. Prates Ramos, K. Nascimento, M. Beatriz Moretto, E. Braganhol, M. Rorato Sagrillo, L. Cruz, Pomegranate seed oil nanoemulsions with selective antiglioma activity: optimization and evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and oxidative effects on mononuclear cells, *Pharm. Biol.* 54 (2016) 2968–2977.
- E. Zhang, H. Chen, F. Shen, Biocorrosion properties and blood and cell compatibility of pure iron as a biodegradable biomaterial, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 21 (2010) 2151–2163.
- R.M. German, Powder Metallurgy Science, Metal Powder Industry, (1994).
- N. Baltzer, T. Copponnex, Properties and processing of precious metal alloys for biomedical applications, *Precious Metals for Biomedical Applications*, 2014, pp. 3–36, <https://doi.org/10.1533/9780857099051.1.3>.
- S. Wang, X. Zhang, J. Li, C. Liu, S. Guan, Investigation of Mg-Zn-Y-Nd alloy for potential application of biodegradable esophageal stent material, *Bioact. Mater.* 5 (2020) 1–8.
- X.N. Gu, W.R. Zhou, Y.F. Zheng, Y. Cheng, S.C. Wei, S.P. Zhong, T.F. Xi, L.J. Chen, Corrosion fatigue behaviors of two biomedical Mg alloys – AZ91D and WE43 – in simulated body fluid, *Acta Biomater.* 6 (2010) 4605–4613, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.07.026>.
- M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop, E. Horwitz, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy* 8 (2006) 315–317.
- N.M. Daud, N.B. Sing, A.H. Yusop, F.A.A. Majid, H. Hermawan, Degradation and in vitro cell-material interaction studies on hydroxyapatite-coated biodegradable porous iron for hard tissue scaffolds, *Journal of Orthopaedic Translation* 2 (2014) 177–184, <https://doi.org/10.1016/j.jot.2014.07.001>.
- S. Zhu, N. Huang, L. Xu, Y. Zhang, H. Liu, H. Sun, Y. Leng, Biocompatibility of pure iron: in vitro assessment of degradation kinetics and cytotoxicity on endothelial cells, *Mater. Sci. Eng. C* 29 (2009) 1589–1592, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.12.019>.
- J. Cheng, T. Huang, Y.F. Zheng, Microstructure, mechanical property, biodegradation behavior, and biocompatibility of biodegradable Fe-Fe₂O₃ composites, *J. Biomed. Mater. Res. A* 102 (2014) 2277–2287.
- B. Liu, Y.F. Zheng, Effects of alloying elements (Mn, Co, Al, W, Sn, B, C and S) on biodegradability and in vitro biocompatibility of pure iron, *Acta Biomater.* 7 (2011)

- 1407–1420, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.11.001>.
- [35] S. Bagherifard, M.F. Molla, D. Kajanek, R. Donnini, B. Hadzima, M. Guagliano, Accelerated biodegradation and improved mechanical performance of pure iron through surface grain refinement, *Acta Biomater.* 98 (2019) 88–102.
- [36] A.H.M. Yusop, N.M. Daud, H. Nur, M.R.A. Kadir, H. Hermawan, Controlling the degradation kinetics of porous iron by poly(lactic-co-glycolic acid) infiltration for use as temporary medical implants, *Sci. Rep.* 5 (2015) 11194.
- [37] ASTM International, Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials, West Conshohocken, PA, (2008), <https://doi.org/10.1520/#0756-08>.
- [38] A. Oriňák, R. Oriňáková, Z.O. Králová, A.M. Turoňová, M. Kupková, M. Hrubovčáková, J. Radoňák, R. Džunda, Sintered metallic foams for biodegradable bone replacement materials, *J. Porous. Mater.* 21 (2014) 131–140, <https://doi.org/10.1007/s10934-013-9757-4>.
- [39] H. Chen, E. Zhang, K. Yang, Microstructure, corrosion properties and bio-compatibility of calcium zinc phosphate coating on pure iron for biomedical application, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 34 (2014) 201–206.
- [40] K. Watanabe, Y. Yamashita, H. Ohgawara, M. Sekiguchi, N. Satake, K. Orino, S. Yamamoto, Iron content of rat serum ferritin, *J. Vet. Med. Sci.* 63 (2001) 587–589, <https://doi.org/10.1292/jvms.63.587>.
- [41] E. Willbold, K. Kalla, I. Bartsch, K. Bobe, M. Brauneis, S. Remennik, D. Shechtman, J. Nellesen, W. Tillmann, C. Vogt, F. Witte, Biocompatibility of rapidly solidified magnesium alloy RS66 as a temporary biodegradable metal, *Acta Biomater.* 9 (2013) 8509–8517.
- [42] A. Drynda, J. Seibt, T. Hassel, F.W. Bach, M. Peuster, Biocompatibility of fluoride-coated magnesium-calcium alloys with optimized degradation kinetics in a subcutaneous mouse model, *J. Biomed. Mater. Res. A* 101A (2013) 33–43, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34300>.
- [43] M. Peuster, P. Wohlsein, M. Brüggemann, M. Ehlerding, K. Seidler, C. Fink, H. Brauer, A. Fischer, G. Hausdorf, A novel approach to temporary stenting: degradable cardiovascular stents produced from corrodible metal-results 6-18 months after implantation into New Zealand white rabbits, *Heart* 86 (2001) 563–569.
- [44] D. Zhu, I. Cockerill, Y. Su, Z. Zhang, J. Fu, K.-W. Lee, J. Ma, C. Okpokwasili, L. Tang, Y. Zheng, Y.-X. Qin, Y. Wang, Mechanical strength, biodegradation, and in vitro and in vivo biocompatibility of Zn biomaterials, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 11 (2019) 6809–6819.
- [45] Y. Qi, X. Li, Y. He, D. Zhang, J. Ding, Mechanism of acceleration of Iron corrosion by a polylactide coating, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 11 (2019) 202–218.
- [46] M. Heiden, E. Nauman, L. Stanciu, Bioresorbable Fe-Mn and Fe-Mn-HA materials for orthopedic implantation: enhancing degradation through porosity control, *Adv. Healthc. Mater.* 6 (2017), <https://doi.org/10.1002/adhm.201700120>.
- [47] M. Schinhammer, A.C. Hänzli, J.F. Löffler, P.J. Uggowitzer, Design strategy for biodegradable Fe-based alloys for medical applications, *Acta Biomater.* 6 (2010) 1705–1713.
- [48] A. Drynda, T. Hassel, F.W. Bach, M. Peuster, In vitro and in vivo corrosion properties of new iron-manganese alloys designed for cardiovascular applications, *J. Biomed Mater Res B Appl Biomater* 103 (2015) 649–660.
- [49] H. Hermawan, D. Dubé, D. Mantovani, Degradable metallic biomaterials for cardiovascular applications, *Metals for Biomedical Devices* (2010) 379–404, <https://doi.org/10.1533/9781845699246.4.379>.
- [50] Y. Koo, T. Tiasha, V.N. Shanov, Y. Yun, Expandable mg-based helical stent assessment using static, dynamic, and porcine ex vivo models, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1173.
- [51] R. Waksman, R. Pakala, R. Baffour, R. Seabron, D. Hellinga, F.O. Tio, Short-term effects of biocorrodible iron stents in porcine coronary arteries, *J. Interv. Cardiol.* 21 (2008) 15–20.
- [52] H. Hermawan, D. Dubé, D. Mantovani, Developments in metallic biodegradable stents, *Acta Biomater.* 6 (2010) 1693–1697.
- [53] A.S. Hoffman, The History and Evolution of Biomaterials and Medical Devices, Slabo. (n.d.). <http://slabo.org.br/the-history-and-evolution-of-biomaterials-and-medical-devices/> (accessed April 21, 2020).
- [54] Center for Devices, Radiological Health, Metals Used in Medical Devices, U.S. Food and Drug Administration, 2020, <https://www.fda.gov/medical-devices/products-and-medical-procedures/metals-used-medical-devices>, Accessed date: 17 April 2020.
- [55] Q. Chen, G.A. Thouas, Metallic implant biomaterials, *Materials Science and Engineering: R: Reports* 87 (2015) 1–57, <https://doi.org/10.1016/j.mser.2014.10.001>.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostram o promissor uso do ferro sinterizado por metalurgia do pó para a manufatura de implantes médicos, tais como o *stents* vasculares. Amostras do material foram biocompatíveis com células estromais mesenquimais, hemocompatíveis e biocompatíveis *in vivo* com ratos Wistar submetidos a um implante subcutâneo do material.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer de aprovação do comitê de Ética da UFCSPA e da ISCMPA: Isolamento de células a partir de material de descarte humano para o uso em medicina regenerativa

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Isolamento de células a partir de material de descarte humano para estudos em medicina regenerativa

Pesquisador: Marcia Rosangela Wink

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 98290318.5.0000.5335

Instituição Proponente: ISCMPA

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.029.141

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa a ser realizado em parceria com o Laboratório de Biologia Celular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre e as Unidades de Obstetrícia, Oftalmologia e Cirurgia Plástica da Santa Casa de Porto Alegre, utilizando material de descarte hospitalar como lipoaspirado, pele, limbo esclero-corneal, membrana amniótica e cordão umbilical, serão extraídos diferentes tipos celulares humanos (queratinócitos, melanócitos, células estromais mesenquimais e células endoteliais) para o desenvolvimento de novas terapias celulares para medicina regenerativa, como a aplicação de células estromais mesenquimais em sítios lesionados e também para a verificação da biocompatibilidade de materiais propostos para uso clínico, tais como filmes de quitosana e colágeno, stents cardíacos de ferro e geopolímeros.

Objetivo da Pesquisa:

Já referido em parecer anteriormente emitido.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Já referido em parecer anteriormente emitido.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Já referido em parecer anteriormente emitido.

Endereço: R. Profº Annes Dias, 295 Hosp. Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro **CEP:** 90.020-090
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 **Fax:** (51)3214-8571 **E-mail:** cep@santacasa.tche.br

**IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA**



Continuação do Parecer: 3.029.141

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Já referido em parecer anteriormente emitido.

Recomendações:

Inserido nº do CNPJ na Folha de Rosto para Pesquisa envolvendo seres humanos.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências solicitadas foram atendidas conforme carta e documentos anexados, a pesquisa está de acordo com a resolução vigente.

Considerações Finais a critério do CEP:

Após reavaliação do protocolo acima descrito, o presente comitê não encontrou óbices quanto ao desenvolvimento do estudo em nossa Instituição e poderá ser iniciado a partir da data deste parecer.

Obs.: 1 - O pesquisador responsável deve encaminhar à este CEP, Relatórios de Andamento dos Projetos desenvolvidos na ISCMPA. Relatórios Parciais (pesquisas com duração superior à 6 meses), Relatórios Finais (ao término da pesquisa) e os Resultados Obtidos (cópia da publicação).

2 – Para o início do projeto de pesquisa, o investigador deverá apresentar a chefia do serviço (onde será realizada a pesquisa), o Parecer Consubstanciado de aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1200535.pdf	12/11/2018 16:54:02		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	CARTA_RESPOSTA_AO_CEP.pdf	12/11/2018 16:53:24	Samlai Vedovatto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_MATERIAIS_DE_DESCARTE.pdf	12/11/2018 16:50:59	Samlai Vedovatto	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO.pdf	12/11/2018 16:49:40	Samlai Vedovatto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLEs_materiais_descarte_e_justificativas.pdf	12/09/2018 17:57:45	THAIS CASAGRANDE PAIM	Aceito

Endereço: R. Profª Annes Dias, 295 Hosp. Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro **CEP:** 90.020-090
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 **Fax:** (51)3214-8571 **E-mail:** cep@santacasa.tche.br

**IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA**



Continuação do Parecer: 3.029.141

Ausência	TCLEs_materiais_descarte_e_justificativas.pdf	12/09/2018 17:57:45	THAIS CASAGRANDE	Aceito
Outros	Formulario_Cadastro_Projetos_Unidade_Pesquisa.pdf	16/08/2018 16:02:38	Samlai Vedovatto	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_responsavel_setor_onde_realiza_da_pesquisa.pdf	16/08/2018 16:00:56	Samlai Vedovatto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_entrega_relatorios.pdf	16/08/2018 15:59:54	Samlai Vedovatto	Aceito
Outros	Declaracao_de_autorizacao_da_chefia_responsavel.pdf	16/08/2018 15:56:09	Samlai Vedovatto	Aceito
Outros	Formulario_Inscricao_Projetos_pesquisa.pdf	16/08/2018 15:52:48	Samlai Vedovatto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_utilizacao_dados_prontuario.pdf	16/08/2018 15:51:29	Samlai Vedovatto	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_isencao_onus_instituicao.pdf	16/08/2018 15:50:45	Samlai Vedovatto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_confidencialidade_sujeito_estudo.pdf	16/08/2018 15:49:41	Samlai Vedovatto	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaracao_utilizacao_dados_material_biologico.pdf	16/08/2018 15:48:11	Samlai Vedovatto	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 21 de Novembro de 2018

**Assinado por:
ELIZETE KEITEL
(Coordenador(a))**

Endereço: R. Profª Annes Dias, 295 Hosp. Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro **CEP:** 90.020-090
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 **Fax:** (51)3214-8571 **E-mail:** cep@santacasa.tche.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Isolamento de células a partir de material de descarte humano para estudos em medicina regenerativa

Pesquisador: Marcia Rosangela Wink

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 98290318.5.3001.5345

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.214.091

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa a ser realizado em parceria com o Laboratório de Biologia Celular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre e as Unidades de Obstetrícia, Oftalmologia e Cirurgia Plástica da Santa Casa de Porto Alegre, utilizando material de descarte hospitalar como lipoaspirado, pele, limbo esclero-corneal, membrana amniótica e cordão umbilical, serão extraídos diferentes tipos celulares humanos (queratinócitos, melanócitos, células estromais mesenquimais e células endoteliais) para o desenvolvimento de novas terapias celulares para medicina regenerativa, como a aplicação de células estromais mesenquimais em sítios lesionados e também para a verificação da biocompatibilidade de materiais propostos para uso clínico, tais como filmes de quitosana e colágeno, stents cardíacos de ferro e geopolímeros.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Isolar células de tecidos humanos, que seriam descartados, para estudos que gerem novas terapias com potencial uso em medicina regenerativa.

Objetivo Secundário:

-Isolar e caracterizar células estromais mesenquimais de tecidos humanos de descarte: pele, cordão umbilical, gordura e limbo esclerocorneal para serem estudadas e testadas em biomateriais

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 3.214.091

utilizados em regeneração tecidual;-Isolar e caracterizar queratinócitos e melanócitos de pele humana e limbo esclerocorneal, para aplicação em biomateriais;

-Isolar e caracterizar Células Endoteliais da Veia Umbilical Humana (HUVEC) obtidas de cordão umbilical (proveniente de partos a termo) para avaliar a biocompatibilidade in vitro de amostras de ferro, micro moldado por injeção, para uso em stents cardíacos;

-Estudar in vitro a biocompatibilidade de metais biocorrosíveis com células estromais mesenquimais humanas (MSCs);

-Avaliar a biocompatibilidade da membrana amniótica humana e de uma matriz compósita de quitosana e colágeno com células estromais mesenquimais humanas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: O único risco ao doador de material de descarte é não ser respeitada a confidencialidade das suas informações pessoais, para prevenção deste problema os pesquisadores assinarão a declaração de compromisso para utilização de dados de material biológico e a declaração de confidencialidade do sujeito no estudo.

Benefícios:

Provavelmente não haverá benefício imediato para o paciente doador. A doação dos materiais poderá vir a beneficiar futuramente a população como um todo gerando novas opções de tratamento para a medicina regenerativa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto foi iniciado conforme parecer emitido anteriormente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos apresentados.

Recomendações:

A entrega do relatório final está prevista para março/2019, no entanto esta data deverá ser corrigida pois o projeto está sendo aprovado neste mesmo mês/ano.

Lembramos que o projeto deve iniciar apenas após a aprovação do CEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto em andamento.

Aprovar

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmiento

UF: RS

Telefone: (51)3303-8804

CEP: 90.050-170

Município: PORTO ALEGRE

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE**



Continuação do Parecer: 3.214.091

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer do Relator.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1261653.pdf	15/01/2019 16:57:14		Aceito
Outros	termo.pdf	15/01/2019 16:51:23	Marcia Rosangela Wink	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_MATERIAIS_DE_DESCART E.pdf	12/11/2018 16:50:59	Samlai Vedovatto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEs_materiais_descarte_e_justificativas.pdf	12/09/2018 17:57:45	THAIS CASAGRANDE PAIM	Aceito
Outros	Formulario_Cadastro_Projetos_Unidade_Pesquisa.pdf	16/08/2018 16:02:38	Samlai Vedovatto	Aceito
Outros	Declaracao_de_autorizacao_da_chefia_responsavel.pdf	16/08/2018 15:56:09	Samlai Vedovatto	Aceito
Outros	Formulario_Inscricao_Projetos_pesquisa.pdf	16/08/2018 15:52:48	Samlai Vedovatto	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaracao_utilizacao_dados_material_biologico.pdf	16/08/2018 15:48:11	Samlai Vedovatto	Aceito

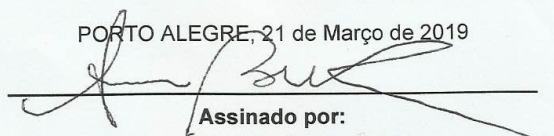
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 21 de Março de 2019


Assinado por:
Fernanda Bordignon Nunes
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

hemocompatibilidade de biomateriais.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da hemocompatibilidade de biomateriais.

Pesquisador: Marcia Rosangela Wink

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 17626719.6.0000.5345

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.594.874

Apresentação do Projeto:

Os biomateriais e dispositivos candidatos ao uso clínico necessitam de análises prévias in vitro para demonstrar a sua biocompatibilidade. Os ensaios de hemocompatibilidade dos materiais que entram em contato com sangue é um dos requisitos recomendados pela International Organization for Standardization (ISO) "ISO 10993 – Biological Evaluation of Medical Devices". O presente projeto visa estudar in vitro a hemocompatibilidade dos seguintes biomateriais para uso em medicina regenerativa: biovidro 45s5 e hidroxiapatita/metakaolinita para regeneração óssea, ferro para uso em stents cardiovascular e matriz compósita de quitosana e colágeno para regeneração cutânea. Serão convidados 20 participantes saudáveis para doarem, de forma espontânea, 10 mL de sangue total para a realização do teste de hemólise e de adesão plaquetária dos biomateriais estudados. Os demais testes in vitro que incluem avaliação de citotoxicidade e genotoxicidade com células primárias humanas provenientes de tecido de descarte hospitalar já foram aprovados (CEP-UFCSPA: 3.214.091) e estão em andamento.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Estudar in vitro a hemocompatibilidade de biomateriais para uso em medicina regenerativa.

Objetivos Secundários:

Analisar a hemocompatibilidade do Biovidro 45s5 e hidroxiapatita/metakaolinita para regeneração

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245

Bairro: Sarmento

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

CEP: 90.050-170

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 3.594.874

óssea;

Verificar a hemocompatibilidade de matriz compósita de quitosana e colágeno para regeneração cutânea;
Investigar a hemocompatibilidade do ferro para uso em stents cardíacos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Hematoma temporário e tontura, podendo haver desmaio após a coleta de sangue.

Benefícios:

Não há benefício direto ao participante da pesquisa. No entanto, pode ser que os resultados deste estudo tragam um benefício para uma parcela de pacientes no futuro.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os participantes serão recrutados por conveniência, sendo membros da comunidade interna UFCSPA, principalmente do Laboratório de Biologia Celular, que se voluntariarem a participar do estudo. Ressalta-se que o nome da instituição não será mencionada, vinculando os doadores, em trabalhos oriundos do referido estudo. SENDO OS MEMBROS DA COMUNIDADE INTERNA HÁ NECESSIDADE DE UM TERMO DE ANUÊNCIA DA REITORIA.

Será utilizada apenas a auto declaração do participante quanto a doença transmissível pelo sangue, uma vez que a presença de alguma doença não afetará a metodologia e o resultado do teste. Para o manuseio de todas as amostras sanguíneas serão utilizados EPIs, evitando intempéries que possam ocorrer.

TCLE ajustado conforme parecer anterior.

A participação no estudo não acarretará custos de deslocamento, uma vez que a coleta ocorrerá no tempo livre do participante na UFCSPA, pois ele já se desloca ao local diariamente para suas atividades de trabalho ou acadêmicas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto devidamente assinada e carimbada.

Termo de anuência assinado e carimbado.

Termo de compromisso para entrega dos relatórios (parcial julho 2021 e final julho 2022).

TCLE ajustado.

Recomendações:

aprovar

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE**



Continuação do Parecer: 3.594.874

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovar

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer do Relator.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1396631.pdf	25/08/2019 19:59:37		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_HEMOCOMPATIBILIDADE.pdf	25/08/2019 19:56:15	THAIS CASAGRANDE PAIM	Aceito
Outros	Carta_de_resposta_ao_cep_ufcspa_projeto_hemocompatibilidade.pdf	25/08/2019 19:54:56	THAIS CASAGRANDE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_HEMOCOMPATIBILIDADE.docx	25/08/2019 19:52:15	THAIS CASAGRANDE PAIM	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_compromisso_para_entrega_de_relatorios.pdf	16/07/2019 16:39:03	THAIS CASAGRANDE	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_de_anuencia_pelo_local_de_pesquisa.pdf	16/07/2019 16:38:21	THAIS CASAGRANDE PAIM	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	16/07/2019 14:50:29	THAIS CASAGRANDE	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 24 de Setembro de 2019

Assinado por:

**Luciane Dalcanale Moussalle
(Coordenador(a))**

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

ANEXO C – Parecer de aprovação do comitê de Ética no uso de animais**COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE****COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA
UFCSPA**

A Comissão de Ética no uso de Animais, analisou o Projeto:

Projeto: 18-247

Versão do Projeto:

Versão do TCLE:

Pesquisadores:

MÁRCIA ROSÂNGELA WINK
THAÍS CASAGRANDE PAIM
LILIANA IVET SOUS NAASANI
ISADORA BERTACO
DIEGO PACHECO WERMUTH

Título: AVALIAÇÃO DA COMPATIBILIDADE E DEGRADAÇÃO IN VIVO DO FERRO 99,5 E 99,9%
P.A. PARA APLICAÇÃO BIOMÉDICA

Este projeto foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Todo e qualquer alteração do projeto, assim com eventos adversos graves, deverão ser comunicados a esta CEUA.

Porto Alegre, 26 de março de 2019.

Prof.ª Fernanda Bastos de Mello
Deptº de Farmacociências
UFCSPA

ANEXO D – Normas da revista Materials Science and Engineering: C

As normas da revista *Materials Science and Engineering: C* podem ser consultadas no seguinte link:

https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/524175?generatepdf=true

