

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
CURSO DE ODONTOLOGIA

Fernanda Willemann

**Influência da esterilização por raios-gama em arcabouços
confeccionados com PLGA, HA/ β TCP e Sinvastatina**

Florianópolis
2021

Fernanda Willemann

**Influência da esterilização por raios-gama em arcabouços
confeccionados com PLGA, HA/ β TCP e Sinvastatina**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Cirurgiã-Dentista.

Orientadora: Prof. Dra. Ariadne Cristiane Cabral da Cruz

Coorientadora: MSc. Mariane Beatriz Sordi

Florianópolis
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Willemann , Fernanda

Influência da esterilização por raios-gama em arcabouços confeccionados com PLGA, HA/BTCP e sinvastatina / Fernanda Willemann ; orientadora, Ariadne Cristiane Cabral da Cruz , coorientadora, Mariane Beatriz Sordi , 2021.
68 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Odontologia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Odontologia. 2. Regeneração . 3. Raios gama . 4. Arcabouço . 5. Sinvastatina . I. da Cruz , Ariadne Cristiane Cabral . II. Sordi , Mariane Beatriz . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Odontologia. IV. Título.

Fernanda Willemann

**Influência da esterilização por raios-gama em arcabouços
confeccionados com plga, HA/ β TCP e sinvastatina**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de
Cirurgiã-Dentista e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em
Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa
Catarina

Florianópolis, 12 de abril de 2021.

Prof^a Dr^a Glaucia Santos Zimmermann
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof^a Dr^a Ariadne Cristiane Cabral da Cruz
Orientador(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Cesar Augusto Magalhães Benfatti
Avaliador(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

MSc. Raissa Borges Curtarelli
Avaliador(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho aos meus pais, Élio e Eliani, e à minha irmã, Amanda. Pelo amor incondicional e por nunca medirem esforços para que eu realizasse este sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, à **Deus**, razão da minha existência, por me fazer enxergar que é possível amá-lo de todo o coração, nas tarefas do dia a dia, na simplicidade de quem se é, sempre, e em tudo!

Aos meus pais, **Élio e Eliani**, por todo incentivo, confiança e oportunidades que me deram. À minha irmã, **Amanda**, por sempre acreditar em mim e trazer alegria para nossa família. Essa conquista não valeria de nada, se não fosse dedicada a vocês que não mediram esforços para que eu realizasse este sonho. Amo vocês incondicionalmente!

A toda **minha família, avós, tios e primos**. Por todo apoio, incentivo e confiança depositados em mim. Em especial à minha **Tia Vanda**, que me acolheu em sua casa durante o primeiro ano morando na “cidade grande” e por nunca me deixar desistir do sonho de me formar na UFSC. Agradeço às minhas primas, **Helena e Gisele**, por estarem sempre perto e serem inspirações em minha vida!

À minha orientadora, **Ariadne C. Cabral da Cruz**, por ser um exemplo de mulher, mãe, dentista e pesquisadora. Não tenho palavras para agradecer por todos os ensinamentos, pela paciência que teve comigo durante esses anos de trabalho juntas e por me confiar essa pesquisa desafiadora que tanto me fez crescer. Você é inspiração para mim, em todos os sentidos!

À minha coorientadora, **Mariane B. Sordi**, por ser sempre tão atenciosa e disposta a ajudar. Esteve comigo desde o início da minha iniciação científica, cedendo seus horários para me ensinar com grande paciência e delicadeza. Você é um exemplo de pessoa, a qual eu admiro muito e foi fundamental para que este trabalho se concretizasse!

À minha dupla de pesquisa, **Graziela Fermiano**, por compartilhar essa experiência comigo. Não teria como expressar aqui a quão grata eu sou pela tua amizade e por me carregar nos dias que eu não tinha mais forças. Foram muitos bons momentos vividos contigo e jamais esquecerei das madrugadas limpando o laboratório. Você tornou essa caminhada muito mais leve, e eu devo muito a ti.

Ao professor, **Cesar Augusto Magalhães Benfatti** que para mim, é uma referência na área de Implantodontia, por compartilhar suas experiências e conhecimentos. Ao professor, **Ricardo de Souza Magini**, por fazer eu me apaixonar

pela Periodontia desde a primeira aula e tornar a relação aluno/professor tão mais leve e acolhedora.

A toda **Família LVA**, por me acolherem durante o tempo em que realizei a pesquisa, todos me ajudaram de alguma maneira. Em especial, à **Raissa** e ao **Lenin**. Obrigada por todos os ensinamentos compartilhados, vocês são profissionais e seres humanos admiráveis e tiveram um papel importantíssimo na minha trajetória.

A todas as amigadas que fiz durante esses anos dentro da UFSC. Em especial, ao grupo “**Petus**”, aquelas com quem convivi diariamente, que me apoiaram em tudo e trouxeram muito sentido a essa graduação. **Ana Luísa, Bruna Herdt, Flávia, Giullia, Lia, Lisya, Monique, e Manu**, vocês estarão sempre no meu coração!

Agradeço à minha dupla, **Emanuelle C. Maiola**, por estar ao meu lado desde a pré-clínica, e me escolher antes mesmo disso. Por me entender com um simples olhar e pela amizade única que a gente construiu. És inspiração pra mim e os momentos que vivemos juntas durante esses mais de 5 anos, jamais serão esquecidos.

À minha **turma 16.1**, a qual sinto tanto carinho e construí verdadeiras amigadas. Em especial, à **Letícia Zacchi, Letícia Scarduelli e Pauline**, obrigada por me ajudarem a seguir os caminhos desta terra na esperança de encontrar o reino que não é deste mundo. Amo vocês!

Aos meus amigos de infância e a todos os outros que fizeram parte da minha vida, em especial àqueles que permaneceram comigo até hoje. **Amanda C. Santos, Bárbara Nienkötter, Bruno Sezerino, Emerson Sebold, Giordana Augusta, Taynara Damann, Monique, e Marcela Junckes**. Sou muito grata a vocês!

Ao Movimento de Emaús, por trazer sentido a minha vida e por tantas amigadas maravilhosas. **Amanda Nascimento, Amanda Scapini, Barbara Schwabe, Caroline Minéo, Emanuelle T. B. Meirelles, Giovani Junior, Isabella Bianco, Isabela Vieceli, Julia Kurtz, Melina Stähelin e Sara Dias**. A amizade de vocês é essencial em minha vida.

Aos meus colegas e amigos dentistas, que abriram as portas do consultório para que eu pudesse aprender mais sobre a Odontologia clínica e tanto me inspiram, sendo pessoas incríveis e profissionais admiráveis. **Daiana Momm Amarante, Henrique Rhee Schuldt e Heron A. Stähelin**, muito obrigada por toda troca durante esses anos!

A todos os professores que tive durante a vida, desde a infância e ensino fundamental, que me incentivaram a seguir este sonho. A todos os professores da graduação, que de forma direta ou indireta, me ajudaram a trilhar essa jornada. À **Michelle Tillmann Biz**, por ser exemplo de professora, esposa e mãe, a qual tenho imensa admiração desde as fases iniciais do curso com a excelência e amor pelo ensino e por ser uma verdadeira amiga até hoje. Muito obrigada por tudo!

A todos os **servidores, pacientes e alunos**, que de alguma forma contribuíram para a minha formação, meu muito obrigada!

Por fim, à **Universidade Federal de Santa Catarina**, por ser minha casa, por me proporcionar o sonho de ser cirurgiã-dentista e por me permitir viver os melhores anos da minha vida. Serei eternamente grata pela oportunidade de ter aprendido tanto e ter conhecido pessoas tão inspiradoras aqui dentro!

Que a tua vida não seja uma
vida estéril. Sê útil. Deixa rasto.

São Josemaría Escrivá

RESUMO

Sabe-se que após as extrações dentárias ou em decorrência de doenças periodontais, ocorre uma perda de tecido ósseo tanto em espessura como em altura, o que pode dificultar ou inviabilizar reabilitações protéticas futuras. A busca por biomateriais que otimizem a regeneração ou reparo de defeitos ósseos tem sido muito explorada nos últimos anos. Tendo em vista os princípios de engenharia tecidual – biocompatibilidade, osteogênese, osteocondução e osteoindução – os biomateriais aplicados para regeneração de tecido ósseo devem ainda apresentar condições de esterilidade para serem utilizados clinicamente. Os arcabouços podem ser produzidos utilizando diferentes biomateriais que visam a osteocondução e a osteoindução, além de permitir a osteogênese que é dada pela presença de células viáveis. Muitos estudos vêm aplicando diferentes biomateriais e técnicas de confecção de arcabouços. Contudo, estudos *in vitro* com culturas celulares e estudos *in vivo* exigem que estes biomateriais estejam estéreis para evitar qualquer tipo de contaminação, bem como o uso clínico futuro destes biomateriais. Sendo assim, nesse estudo, avaliou-se as alterações físico-químicas causadas pela esterilização utilizando raios gama em arcabouços produzidos com ácido polilático-co-glicólico (PLGA) e hidroxiapatita (HA) associada a beta fosfato tricálcio (β TCP) e incorporação de sinvastatina (SIN). Os arcabouços foram divididos nos seguintes grupos: G1 – PLGA+HA/ β TCP e G2 – PLGA+HA/ β TCP+SIN. Os arcabouços foram confeccionados no interior de uma câmara de fluxo laminar. Em seguida receberam os seguintes tratamentos: T0 – sem tratamento (controle positivo), T1 – esterilização por raios gama e T2 – esterilização por autoclave (controle negativo). Posteriormente, foram avaliadas as propriedades físico-químicas dos arcabouços por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia por energia dispersiva (EDS) e difração de raio-X (DRX). Todas as análises foram realizadas em triplicata. T1 e T2 não interferiram na morfologia dos dois grupos (G1 e G2) e alteraram a porcentagem dos elementos químicos presentes nas amostras. G1 e G2 apresentaram caráter cristalino, após ambos os tratamentos (T1 e T2); contudo, uma interferência maior no pico de cristalinidade do material após esterilização por autoclavagem (T2) foi observada. Desta forma, sugere-se a utilização do tratamento com raios gama para esterilização dos arcabouços a base de PLGA+HA/ β TCP+SIN, pois não interferiu na morfologia e cristalinidade das amostras.

Palavras-chave: Regeneração 1. Raios Gama 2. Arcabouço 3. Sinvastatina 4.

ABSTRACT

It is known that after tooth extractions or due to periodontal disease, there is loss of bone tissue in both thickness and height, which can make future rehabilitation unfeasible. The search for biomaterials that optimize regeneration or repair of bone defects has been extensively explored in recent years. Bearing in mind the principles of tissue engineering - biocompatibility, osteogenesis, osteoconduction, and osteoinduction - the technical biomaterials for bone tissue regeneration must also present sterile conditions to be applied clinically. Scaffolds can be obtained using different biomaterials that target osteoconduction and osteoinduction, besides to allow the osteogenesis that is given by viable cells. Many studies have been using different biomaterials and scaffolding techniques. However, *in vitro* studies with cell cultures and *in vivo* studies demand that these biomaterials to be sterile to avoid any type of contamination, as well as future clinical studies. Therefore, in this study, it was evaluated the physico-chemical alterations produced by sterilization through gamma radiation on scaffolds of polylactic-co-glycolic acid (PLGA) and hydroxyapatite (HA) associated with a beta-tricalcium phosphate (β TCP), incorporating simvastatin (SIN). The scaffolds were divided into the following groups: G1 - PLGA + HA / β TCP and G2 - PLGA + HA / β TCP + SIN. The scaffolds were produced inside a laminar flow chamber. Then, they received the following treatments: T0 - no treatment (positive control group), T1 - sterilization by gamma radiation and T2 - sterilization by autoclave (negative control group). Subsequently, the physico-chemical properties of scaffolds were evaluated through scanning electron microscopy (SEM), dispersive energy spectroscopy (EDS) and X-ray diffraction (XRD). All analyzes were performed in triplicate. T1 and T2 did not interfere the morphology of the groups (G1 and G2) and altered the percentage of chemical elements present in the samples. G1 and G2 showed crystalline character after both treatments (T1 and T2); however, a higher interference in the peak of crystallinity of the material after sterilization by autoclave (T2) was observed. Thus, it is suggested the application of gamma radiation to sterilize scaffolds based on PLGA + HA / β TCP + SIN, as it did not interfere with the morphology and crystallinity of the samples.

Keywords: Regeneration 1. Gamma rays 2. Scaffold 3. Simvastatin 4.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – MEV de arcabouços de PLGA+HA/ β TCP e PLGA+HA/ β TCP+SIN sem tratamento e após esterilização por raios gama e autoclave.....	44
Figura 2 – EDS de arcabouços de PLGA+HA/ β TCP e PLGA+HA/ β TCP+SIN sem tratamento (controle positivo).....	46
Figura 3 – EDS de arcabouços de PLGA+HA/ β TCP e PLGA+HA/ β TCP+SIN após esterilização por raios gama.....	47
Figura 4- EDS de arcabouços de PLGA+HA/ β TCP e PLGA+HA/ β TCP+SIN após esterilização por autoclave.....	48
Figura 5 – Esquema representativo das alterações na porcentagem dos elementos químicos a partir dos resultados de EDS.....	49
Figura 6 – DRX de arcabouços de PLGA+HA/ β TCP e PLGA+HA/ β TCP+SIN após esterilização por raios gama e autoclave.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMPs	Proteínas ósseas morfogenéticas, do inglês <i>Bone morphogenetic proteins</i>
DRX	Difração de Raio-X
EDS	Espectroscopia por Energia Dispersiva, do inglês <i>Energy Dispersive Spectroscopy</i>
OE	Óxido de etileno
FDA	Administração de alimentos e medicamentos, do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier Transform Infrared</i>
ISO	Organização Internacional de Padronização
h	Hora
HA	Hidroxiapatita
KGy	Quilogray
Kv	Quilovolt
m/m	Relação massa/massa
m/v	Relação massa/volume
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Mg	Miligrama
Mm	Milímetro
min	Minuto
PLA	Ácido polilático
PLGA	Ácido polilático-co-glicólico
PGA	Ácido poliglicólico
PVA	Álcool polivinílico
ROG	Regeneração óssea guiada
SIN	Sinvastatina
SAL	Nível de garantia de Esterilidade, do inglês <i>Sterility Assurance Level</i>
UFC	Unidade formadora de colônia
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
μ	Micro
βTCP	β-Tricálcio fosfato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Tecido ósseo.....	18
2.2 Regeneração de tecido ósseo	18
2.2 Propriedades físico-químicas do PLGA+HA/ β TCP.....	22
2.3 Propriedades físico-químicas da SIN.....	24
2.4 Arcabouços de PLGA+HA/ β TCP+SIN.....	27
2.5 Métodos de Esterilização.....	29
2.6 Raios Gama.....	31
2.7 Autoclave.....	38
3 OBJETIVOS.....	40
3.1 Objetivo Geral.....	40
3.2 Objetivos Específicos.....	40
4 METODOLOGIA.....	41
4.1 Confeção dos Arcabouços.....	41
4.2 Esterilização dos Arcabouços.....	42
4.3 Caracterização Físico-Química dos arcabouços.....	42
4.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	43
4.3.2 Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS).....	43
4.3.3 Difração de Raio-X (DRX).....	43
5 RESULTADOS.....	44
5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	44
5.2 Espectrofopia por Energia Dispersiva (EDS).....	45
5.3 Difração de Raios X (DRX).....	49
6 DISCUSSÃO.....	51
7 CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.....	57
ANEXO 1.....	68

1 INTRODUÇÃO

Após extrações dentárias ou decorrente de doenças periodontais, ocorre uma perda de tecido ósseo, tanto em espessura como em altura, o que pode dificultar ou inviabilizar reabilitações protéticas futuras (LINDHE; ARAÚJO, 2005). Esta perda pode ser decorrente de diferentes fatores como traumatismos, perdas dentárias, doenças congênitas, infecções ou até mesmo devido a uma falta de função do rebordo alveolar (FARDIN *et al.*, 2010). Com isto, existe uma busca por biomateriais que otimizem a regeneração ou reparo destes defeitos ósseos (LEKOVIC *et al.*, 1998). Tendo em vista os princípios de engenharia tecidual – biocompatibilidade, osteogênese, osteocondução e osteoindução - os biomateriais aplicados para regeneração do tecido ósseo perdido devem apresentar algumas propriedades desejáveis, incluindo capacidade de osteointegração, possibilidade de adesão e diferenciação celular, bem como capacidade de incorporação e liberação de substâncias osteoindutoras (CIAPETTI; GRANCHI; BALDINI, 2012).

Os substitutos (enxertos) utilizados para repor um tecido perdido são classificados de acordo com sua origem em: autógeno (mesmo indivíduo), alógeno (indivíduo da mesma espécie, mas geneticamente diferente), xenógeno (origem animal / outra espécie) ou aloplástico (sintético) (ELLIS; SINN, 1993). Os enxertos autógenos são originados do próprio indivíduo, e apesar da semelhança com o tecido ósseo original causam morbidade ao paciente, devido a necessidade de uma segunda área cirúrgica durante o procedimento (FARDIN *et al.*, 2010) e risco adicional de infecções no leito doador (PEREZ *et al.*, 2018).

Assim, pesquisas em engenharia de tecidos ósseos trabalham na busca de alternativas com o objetivo de reduzir a morbidade dos procedimentos cirúrgicos, alcançando a excelência biológica da regeneração, por meio de um material disponível em grande quantidade. Uma das alternativas mais promissoras são os biomateriais aloplásticos. Os enxertos sintéticos têm fácil uso e manipulação, não necessitam de um segundo sítio cirúrgico (POTTER; MALMQUIST; ELLIS, 2012) e estão disponíveis no mercado em diversos tamanhos e formatos (SHINDO *et al.*, 2015).

Com o intuito de diminuir o tempo de tratamento regenerativo, otimizar os efeitos da terapia (SILVA *et al.*, 2015), como também favorecer o tratamento de

doenças degenerativas (IAQUINTA *et al.*, 2019), torna-se necessário lançar mão da utilização de biomateriais capazes de serem degradados (reabsorvíveis) ao longo do tempo (IAQUINTA *et al.*, 2019). Assim, os arcabouços tridimensionais agem como substitutos temporários ao tecido original que apresenta uma lesão (CIAPETTI; GRANCHI; BALDINI, 2012).

Dentre os vários materiais poliméricos reabsorvíveis disponíveis para a produção de arcabouços tridimensionais, tem-se dado preferência à utilização do copolímero ácido polilático-co-glicólico (PLGA, do inglês *Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)*). Trata-se de material sintético, biocompatível e biodegradável (CHEN *et al.*, 2016) em produtos não tóxicos, como ácido láctico, ácido glicólico, dióxido de carbono e água (ERBETTA *et al.*, 2012; MIAO *et al.*, 2008). Devido às suas propriedades físico-químicas desejáveis, resistência mecânica regular (LIU; WU; CAI, 2005) e taxa de degradação controlada (SILVA *et al.*, 2015), o PLGA também tem sido muito utilizado no transporte e liberação de fármacos (MOTTA; DUEK, 2007). Este polímero é, portanto, um candidato atraente para as pesquisas em regeneração de tecido ósseo (MAKADIA; SIEGEL, 2011).

As proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs, do inglês *Bone morphogenetic proteins*) são moléculas muito utilizadas quando se trata de regeneração de tecidos ósseos, pois regulam fatores relacionados à etapa de diferenciação de osteoblastos. Entretanto, possuem um custo muito elevado (CASAGRANDE *et al.*, 2011; CIAPETTI; GRANCHI; BALDINI, 2012; SUGIYAMA *et al.*, 2005), o que viabilizou a busca por compostos indutores de BMPs como uma alternativa para regenerar osso. Além dos efeitos indesejáveis decorrentes da necessidade da utilização de elevadas doses destas proteínas clinicamente. Neste âmbito, surgem os estudos com a Sinvastatina (SIN), um medicamento do grupo das estatinas utilizado para reduzir as taxas de colesterol no sangue (MAEDA; KAWANE; HORIUCHI, 2003). A SIN age por um processo que acaba por estimular a proliferação de osteoblastos e resulta em maior formação de osso (MUNDY *et al.*, 1999; ZHANG; DRICU; SJÖVALL, 1997). Além disso, foi comprovado por Montero *et al.* (2014) que a SIN atua como anti-inflamatório, e possui efeito pró-angiogênese (LIU *et al.*, 2016; SOARES *et al.*, 2018; TAKENAKA *et al.*, 2003; XUE *et al.*, 2019). A incorporação de SIN, bem como hidroxiapatita (HA) e β -tricálcio fosfato (β TCP) (que são componentes com a estrutura mineral semelhante aos ossos e dentes) ao PLGA, tem apresentado resultados promissores

na confecção de arcabouços utilizados para regeneração óssea guiada (ROG) (HUANG; MIAO, 2007).

Contudo, a esterilização destes arcabouços é um passo de extrema importância antes de qualquer teste biológico *in vitro* ou *in vivo* e é um desafio, visto que os polímeros são materiais sensíveis ao calor e a umidade gerados pelos métodos de esterilização (ATHANASIOU; NIEDERAUER; AGRAWAL, 1996) e suscetíveis a sofrerem modificações em sua estrutura pela quebra de cadeias e inativação de substâncias (QI *et al.*, 2018). A esterilidade aos biomateriais pode ser conferida através de métodos físicos, por calor seco (estufas), calor úmido (autoclaves), radiação gama ou por métodos químicos (óxido de etileno, OE, por exemplo). Devido as condições de altas temperaturas utilizadas em autoclaves e estufas, é de conhecimento no mundo científico que tais métodos provocam corrosão e deterioração em materiais a base de polímeros (HAN *et al.*, 2018; RUTALA; GERGEN; WEBER, 1998; SASAKI *et al.*, 2018) e a esterilização por OE, apesar de ser realizada em temperatura ambiente, necessita de umidade e gera resíduos nocivos que podem prejudicar o desempenho do biomaterial (ATHANASIOU; NIEDERAUER; AGRAWAL, 1996). A esterilização por raios gama, apesar de alguns estudos afirmarem que tem custo mais elevado (HAN *et al.*, 2018), devido à possibilidade de esterilizar maiores quantidades de produtos (DA SILVA; DA SILVA; DA SILVA AQUINO, 2014) tem ótimo custo-benefício. Além disso, permite que o processo de esterilização possa ser efetuado em condições de baixa temperatura e pressão, gerando o mínimo de resíduos (DESAI; KADOUS; SCHWENDEMAN, 2013; HAN *et al.*, 2018).

Assim sendo, selecionamos alguns dos biomateriais sintéticos mais comuns na regeneração de tecido ósseo para compor uma estrutura tridimensional, isto é, um arcabouço, com propriedades que almejem os princípios de engenharia tecidual. Após a produção e caracterização físico-química, propõem-se através desse estudo avaliar os efeitos causados após esterilização por radiação gama em arcabouços de PLGA+HA/ β TCP+SIN no intuito de viabilizar um método eficaz para conferir esterilidade a estes biomateriais sem comprometer sua estrutura e função, permitindo sua aplicação clínica posteriormente. A esterilização por autoclave foi utilizada como controle negativo deste estudo, enquanto que a não esterilização dos biomateriais foi o controle positivo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Tecido ósseo

O osso é um tipo de tecido mineralizado especializado que possui estrutura bem definida, é vascularizado e fornece sustentação mecânica para o organismo. Entretanto, o tecido ósseo é considerado dinâmico, contribuindo com força, regulação do pH sanguíneo e manutenção dos níveis de cálcio e fosfato para os processos metabólicos do corpo humano (VENKATESAN *et al.*, 2015). É composto essencialmente por quatro tipos celulares: (1) os osteoblastos, que são células responsáveis por produzir matriz óssea; (2) os osteoclastos, que são células gigantes que promovem a reabsorção óssea e a liberação de cálcio no organismo; (3) os osteócitos, os quais são as células adultas, menos ativas, que eram anteriormente chamadas de osteoblastos, mas recebem esse novo nome depois que ficam aprisionadas em lacunas de matriz extracelular mineralizada (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2003); e por fim, (4) as células ósseas de revestimento, que poderão ser reativadas durante o reparo de fraturas ou outras lesões (CARREIRA *et al.*, 2014).

O tecido ósseo possui capacidade limitada de reparação e, quando lesionado, requer estratégias complexas para devolver sua estrutura e função, e, em muitos casos, não se regenera por completo (AZEVEDO *et al.*, 2007). Um novo osso só se forma em locais onde a estabilidade biomecânica é garantida, caso contrário, há formação de um tecido intermediário antes da ossificação (HÄMMERLE; KARRING, 1998). Além disso, quanto maior o defeito ósseo, mais difícil é o reparo.

2.2 Regeneração de tecido ósseo

Originalmente, o princípio biológico que contribuiu ao método de regeneração tecidual guiada foi descoberto por Nyman e Karring no início da década de 1980, na busca por regenerar tecidos periodontais perdidos (HÄMMERLE; KARRING, 1998), resultantes de doença periodontal (COSTA *et al.*, 2016).

A formação de um novo osso utilizando os métodos de regeneração guiada de tecidos foi demonstrada pela primeira vez em animais, inicialmente em coelhos, e depois confirmadas através de outras experiências em ratos e cães. Em todas elas, apresentou-se um padrão de formação óssea semelhante (HÄMMERLE; KARRING, 1998). Posteriormente, Nyman *et al.* (1982) apresentou o primeiro relatório de um dente humano tratado de acordo com o princípio de Regeneração Tecidual Guiada

(RTG). Assim, após o desenvolvimento da técnica de RTG, a possibilidade de gerar tecidos periodontais perdidos tornou-se uma realidade clínica (KARRING *et al.*, 1993).

A regeneração de tecidos é uma solução muito eficiente na área da Odontologia e vem sendo cada vez mais utilizada, principalmente em casos envolvendo o tecido ósseo. Após uma perda ou a extração de um dente, o tecido ósseo sofre algumas alterações, se tornando atrofiado. Visando a reabilitação protética implantossuportada, como forma de repor os dentes que foram perdidos, em casos em que a regeneração óssea é imprescindível, torna-se necessário lançar mão de biomateriais para a Regeneração Óssea Guiada (ROG).

Na Odontologia, são utilizados diferentes tipos de enxertos, principalmente em se tratando de osso. Estes são classificados de acordo com sua origem em: autógeno (mesmo indivíduo), alógeno (indivíduo da mesma espécie, contudo geneticamente diferente), xenógeno (origem animal / outra espécie) ou aloplástico (sintético). Os enxertos autógenos são originados do próprio indivíduo (ELLIS; SINN, 1993) e são os únicos que fornecem células viáveis e imunocompatíveis. Podem ser obtidos de diferentes regiões do corpo humano, tais como costelas, tíbia, mandíbula e calota craniana (DA SILVA-JUNIOR *et al.*, 2009). Porém, a desvantagem do seu uso é a morbidade causada ao paciente, devido a necessidade de uma segunda área cirúrgica (CIAPETTI; GRANCHI; BALDINI, 2012; FARDIN *et al.*, 2010). Além disso, há riscos mais elevados de infecções e hemorragias, além da quantidade limitada de tecido ósseo doador disponível, não sendo assim recomendado para todos os casos (PEREZ *et al.*, 2018). Outro tipo de enxerto existente é o alógeno, que é obtido de um indivíduo da mesma espécie, geralmente encontrado em banco de tecidos musculoesqueléticos. É uma alternativa eficiente, pois não requer um segundo sítio cirúrgico e a quantidade disponível de material é maior, porém, esse tipo de enxerto não participa da fase I da osteogênese, agindo apenas de forma passiva através de fornecimento de matriz de tecido duro. Isso acontece devido a um tratamento realizado para reduzir a antigenicidade nestes enxertos antes de serem utilizados, visto que, o sítio doador e o receptor serão geneticamente diferentes (SOUZA; JR; BARRETO, 2010). Além disto, há a possibilidade da transmissão de doenças infecciosas (POTTER; MALMQUIST; ELLIS, 2012). Há também os substitutos ósseos retirados de uma espécie e transplantados em outra, que é o caso dos enxertos xenógenos. O mais comum na odontologia é o enxerto bovino. A desvantagem de sua utilização é a possibilidade de transmissão de doenças infecciosas e/ou priônicas

(CARLSON *et al.*, 1995). Contudo, é o tipo de enxerto mais utilizado na prática clínica na atualidade.

Pesquisas em engenharia de tecidos ósseos trabalham na busca de alternativas com o objetivo de reduzir a morbidade dos procedimentos cirúrgicos. Uma das alternativas mais promissoras são os biomateriais sintéticos utilizados para regeneração de tecido ósseo. O tipo de material utilizado ainda é muito estudado e inclui um amplo campo, desde polímeros, cerâmicas, metais e biovidros (BUSER, 2010; RIBELLES; ANTO, 2010). Utilizam-se biomateriais inertes com o intuito de reparar tecidos perdidos ou lesionados (HENCH; POLAK, 2002), porém, muitas vezes, os materiais utilizados apresentam propriedades muito diferentes do tecido original, o que faz com que se comportem de maneira inadequada, podendo ser até mesmo rejeitados pelo organismo, trazendo alguns danos para o paciente (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Os substitutos ósseos classificados como sintéticos têm fácil uso e manipulação e a vantagem de não necessitar de um segundo sítio cirúrgico, diminuindo assim a morbidade do paciente (POTTER, MALMQUIST; 2012). Além disto, estão disponíveis no mercado em ampla quantidade, e variedade de tamanhos e formas, podendo ainda ser reabsorvíveis (SHINDO *et al.*, 2015), culminando com menor tempo cirúrgico. Todas estas características tornam os materiais sintéticos vantajosos ao profissional e ao paciente.

O campo da engenharia de tecidos expandiu-se rapidamente desde o ano de 1997 e pesquisadores trabalham para desenvolver alternativas aos enxertos autógenos. Sendo assim, é de interesse na área clínica e científica o estudo de arcabouços usados para guiar a regeneração dos tecidos e reparar os defeitos gerados (WAGONER JOHNSON; HERSCHLER, 2011). Estes substitutos restauram, melhoram e mantêm a função do tecido, além de manter o espaço, para que os defeitos possam ser substituídos por osso recém-formado. Além disto, conforme já salientado, estes enxertos podem facilitar o procedimento cirúrgico, reduzir o tempo da cirurgia, bem como a diminuir a morbidade do paciente (MARTIN; BETTENCOURT, 2018).

A terapia celular, que é também área da regeneração tecidual, vem crescendo muito e aprimorando cada vez mais sua efetividade, sendo uma importante ferramenta para substituição de tecidos. A terapia celular envolve biomateriais que devem ser biocompatíveis e biodegradáveis para confecção de arcabouços que servirão como

suporte para as células serem cultivadas, podendo posteriormente constituir um novo tecido (CHEN *et al.*, 2016).

A combinação de enxertos sintéticos por meio de polímeros e produtos à base de hidroxiapatitas e β TCP (WAGONER JOHNSON; HERSCHLER, 2011) expandiram a gama de utilizações e, pela segurança, dentre outras vantagens, se tornam cada vez mais o material de escolha para a regeneração óssea (BUSER, 2010). Além disto, em muitos estudos, estes materiais são associados à outros tipos de substâncias, tais como moléculas sinalizadoras e fatores de crescimento, como é o caso das BMPs (IAQUINTA *et al.*, 2019; SUN; YANG, 2015).

As BMPs são moléculas muito utilizadas em se tratando de regeneração de tecidos ósseos, pois estas proteínas regulam fatores relacionados a etapa de diferenciação de osteoblastos. Entretanto, possuem um custo muito elevado e uma falta de segurança na sua aplicação clínica (CASAGRANDE *et al.*, 2011; CIAPETTI; GRANCHI; BALDINI, 2012; SUGIYAMA *et al.*, 2005), o que estimulou a busca por compostos indutores de BMPs como alternativas para regenerar osso. Um composto exemplar na ativação de BMPs é a SIN, um fármaco facilmente adquirido (MONTERO; MANZANO; ALBALADEJO, 2014), usado no tratamento de hipercolesterolemia (JADHAV; JAIN, 2006; ZHANG; DRICU; SJÖVALL, 1997) que apresenta potencial de estimular a neoformação óssea (MUNDY *et al.*, 1999). Além disso, tem efeito anti-inflamatório (SAKODA *et al.*, 2006) e angiogênico (MAEDA; KAWANE; HORIUCHI, 2003).

Neste trabalho, confeccionamos arcabouços poliméricos de PLGA e cerâmica bifásica composta por HA e β TCP. Estes biomateriais fazem parte dos enxertos sintéticos e são alvo de grande parte das pesquisas envolvendo ROG, sendo uma opção valiosa de tratamento reabilitador na Odontologia. Sabe-se que os substitutos ósseos compostos por polímero-cerâmica imitam bem as características e funções naturais do osso (VENKATESAN *et al.*, 2015). Além do mais, devido sua natureza sintética, apresentam as vantagens listadas acima, destacando-se a redução da morbidade do paciente no pós-operatórios e menor risco à transmissão de doenças (KIM; RODRIGUEZ; NOWZARI, 2016).

2.3 Propriedades físico-químicas do PLGA+HA/ β TCP

Os biomateriais feitos a partir de polímeros possuem duas naturezas distintas: naturais ou sintéticos. Os polímeros naturais imitam tanto estruturalmente quanto bioquimicamente as propriedades do osso natural e incluem, por exemplo, o colágeno e a quitosana. Apesar de boa parte da matriz óssea ser composta por colágeno, ele na forma pura não possui propriedades mecânicas desejáveis, e por isso, geralmente é associado à outras substâncias, como por exemplo, as cerâmicas, para então ser utilizado (IAQUINTA *et al.*, 2019). Já a quitosana, é um polissacarídeo importante na regeneração de tecidos, biocompatível e biodegradável, porém tem sua eficácia limitada por ser um composto instável e que precisa ser protegido contra a degradação biológica (PRABAHARAN; MANO, 2005).

Quanto aos polímeros sintéticos, estes formam uma classe de biomateriais muito utilizados nas últimas décadas (PILLAI; PANCHAGNULA, 2001) e que possuem aplicações de extrema importância, desde o campo da medicina, da agricultura, e até na área da engenharia (LIU; WU; CAI, 2005). Há cerca de três décadas, houve um crescimento expressivo de pesquisas envolvendo essa classe de polímeros (MAKADIA; SIEGEL, 2011). Inicialmente, eram utilizados em materiais para suturas cirúrgicas (BROWN *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2015) e reparação de fraturas na área de ortopedia e de traumatologia bucomaxilofacial, agindo como substituto de dispositivos metálicos (MOTTA; DUEK, 2007). Além destas aplicações, desde a década de 60, são também utilizados como sistemas de liberação controlada de fármacos (CHEN *et al.*, 2016; FREIBERG; ZHU, 2004; SILVA *et al.*, 2015) com o intuito de diminuir o tempo de tratamento regenerativo, os efeitos indesejáveis da terapia (SILVA *et al.*, 2015) e favorecer o tratamento de doenças degenerativas (IAQUINTA *et al.*, 2019).

Para que os polímeros sejam utilizados na ROG, é necessário que apresentem algumas características específicas, como biocompatibilidade e biodegradabilidade. A busca por biomateriais biodegradáveis surgiu devido ao grande inconveniente que é a necessidade de realizar intervenções cirúrgicas em diferentes sítios, bem como uma alternativa para minimizar a morbidade pós-operatória do paciente (POTTER, MALMQUIST; 2012). Além disso, a tensão que o metal impõe sobre o osso recém-formado, facilita a propensão da incidência de uma nova fratura, já que este apresenta propriedades mecânicas inferiores ao osso natural (MOTTA; DUEK, 2007). Portanto, utilizar biomateriais que sofrem degradação ao longo do tempo, além de evitar uma

segunda operação, permite que as cargas sejam gradualmente transferidas para o osso, evitando assim, um estresse que pode ser gerado no osso neoformado (IAQUINTA *et al.*, 2019).

Dentre vários materiais poliméricos disponíveis, os mais utilizados no campo da Odontologia são os poliésteres alifáticos, especificamente o ácido poliglicólico (PGA) e o ácido polilático (PLA), que através de uma ligação éster formam um copolímero sintético biodegradável e reabsorvível, o PLGA (ALMERÍA *et al.*, 2010). Apesar de os dois polímeros, PLA e PGA, serem solúveis e apresentarem tempo de degradação controlado, apresentam algumas diferenças (IAQUINTA *et al.*, 2019), sendo elas: a parte lactídea (PLA) é mais hidrofóbica comparada a glicólica (PGA), a qual apresenta características cristalinas (LIU; WU; CAI, 2005). Com essa classe de polímeros, é possível modificar as propriedades mecânicas, térmicas e biológicas, controlando assim, as taxas de degradação e as condições de superfície de acordo com a necessidade e o local que será utilizado (MOTTA; DUEK, 2007; PILLAI; PANCHAGNULA, 2001). Contudo, o PLA e o PGA apresentam características inadequadas para o crescimento de células de tecido ósseo, devido à baixa osteocondutividade. Assim, tem se optado pelo PLGA, pois além de apresentar uma resistência mecânica regular (LIU; WU; CAI, 2005) e ser obtido a partir de monômeros, apresenta um tempo de degradação relativamente curto (SILVA *et al.*, 2015).

O PLGA está entre os candidatos mais atraentes nas pesquisas das últimas décadas (MAKADIA; SIEGEL, 2011) por apresentar propriedades físico-químicas desejáveis, características de degradação favoráveis e possibilidade de administração de fármacos de maneira controlada. Além disto, é um polímero aprovado pela US *Food and Drug Administration* (FDA) para pesquisa clínica (JIANG *et al.*, 2019; LIU; WU; CAI, 2005). Devido ao seu *design* e desempenho, compatibilidade com fármacos, cinética de biodegradação e propriedades mecânicas adequadas (MAKADIA; SIEGEL, 2011), o PLGA é muito utilizado atualmente.

Outra vantagem do PLGA é o fato de ser um copolímero biodegradável em ácido láctico, ácido glicólico, dióxido de carbono e água, ou seja, subprodutos não tóxicos (ERBETTA *et al.*, 2012; MIAO *et al.*, 2008) os quais são absorvidos pelo organismo (ERBETTA *et al.*, 2012). Contudo, por ter características de superfície hidrofóbicas (MIAO *et al.*, 2007) e estar relacionado a baixas taxas de adesão e proliferação celular (LEBOURG; ANTÓN; RIBELLES, 2010; LIU *et al.*, 2011), estudos apontam que suas funções podem ser melhoradas através de uma abordagem

combinada entre polímero e compósitos a partir de cerâmicas, tais como HA e β TCP (CIAPETTI; GRANCHI; BALDINI, 2012). Apesar das cerâmicas possuírem características frágeis devido a sua dureza, são frequentemente associadas à derivados do fosfato de cálcio (PEREZ *et al.*, 2018) e conferem assim, ótimas características de biocompatibilidade e bioatividade, tornando-se um material semelhante ao tecido mineral ósseo (TARAFDER *et al.*, 2013). São capazes de minimizar a hidrofobicidade do PLGA (LIAO; ZHANG; HE, 2012), característica que compromete a regeneração óssea (CIAPETTI; GRANCHI; BALDINI, 2012; GENTILE *et al.*, 2016) e até mesmo promover osteocondução (YANG *et al.*, 2015).

O PLGA na odontologia é utilizado na forma de partículas como microesferas, microcápsulas, nanocápsulas e nanoesferas, assim como na confecção de outras geometrias de arcabouços tridimensionais (BAO, 1993). Com a possibilidade de incorporação de substâncias específicas (MAKADIA; SIEGEL, 2011), o arcabouço torna-se uma grande promessa no campo da engenharia regeneradora (PRABAHARAN; MANO, 2005), visto que além de ser um copolímero biodegradável e biocompatível (CHEN *et al.*, 2016), irá melhorar a distribuição local de fármacos e medicamentos (IAQUINTA *et al.*, 2019), auxiliar na cicatrização óssea (BROWN *et al.*, 2015) e ainda fornecer uma estrutura mecanicamente aceitável para o transporte e cultivo de células (BAO, 1993). O processo de incorporação destas substâncias ao polímero pode ser feito de diferentes maneiras, sejam elas mistura física ou carregamento em micropartículas (HASANAIN *et al.*, 2014).

2.4 Propriedades físico-químicas da sinvastatina (SIN)

A SIN faz parte do grupo das estatinas que são medicamentos utilizados para reduzir taxas elevadas de colesterol. São conhecidas no mundo científico como uma alternativa osteoindutora, pois alguns estudos indicam que elas são capazes de interagir com proteínas presentes no processo de reabsorção e regeneração óssea (MAEDA; KAWANE; HORIUCHI, 2003). O mecanismo de ação das estatinas é, de forma resumida, a capacidade de melhorar a atividade osteoblástica e inibir a atividade osteoclástica (MUNDY *et al.*, 1999; YAMASHITA *et al.*, 2008; ZHANG; DRICU; SJÖVALL, 1997). As estatinas inibem a enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, impedindo a conversão do HMG-CoA em mevalonato, e assim, reduz os níveis de colesterol e bloqueia a atividade de proteínas GTPases que mantêm a integridade dos osteoclastos. Este processo de impedir a

função das GTPases estimula a expressão das BMPs, mais especificamente a BMP-2, o que estimula a proliferação dos osteoblastos e ocorre maior formação de osso (ZHANG; DRICU; SJÖVALL, 1997).

Os primeiros a descreverem o desempenho das estatinas no tecido ósseo foram Mundy *et al.* em 1999. Em seus estudos, foi demonstrado o papel das estatinas no aumento de osso neoformado em culturas de células vindas da calvária de ratos. Este processo envolve o aumento da expressão das BMPs (MUNDY *et al.*, 1999). Além do mais, a SIN aumenta a fosfatase alcalina e tem efeito anti-inflamatório, através da diminuição da produção de interleucina-6 e interleucina-8 (SAKODA *et al.*, 2006). Portanto, a incorporação de estatinas em biomateriais enxertivos tem o intuito de reduzir a inflamação e acelerar o desenvolvimento ósseo local (LAÇIN *et al.*, 2019).

As vantagens ao fazer uso da SIN associada à biomateriais para a ROG são o custo reduzido, toxicidade diminuída e a eficácia no processo de regeneração (ENCARNAÇÃO *et al.*, 2016). Apesar de já ser comprovado que a SIN tem a capacidade de estimular a formação óssea *in vitro* e *in vivo*, assim como possui efeito pró-angiogênese através da expressão do fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) (LIU *et al.*, 2016; SOARES *et al.*, 2018; TAKENAKA *et al.*, 2003; XUE *et al.*, 2019), é necessário que sua entrega ao tecido ósseo seja controlada. Sabe-se que as possibilidades para realizar a entrega de fármacos a um tecido específico é muito variada, necessitando de um material mediador ou carreador que seja capaz de controlar a liberação da SIN de forma lenta e gradual, visto que, em doses elevadas, a SIN pode resultar em uma inflamação exacerbada (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

A administração da SIN na forma clínica é feita por via oral e cerca de 5% dos compostos permanecem na circulação sistêmica, resultando em baixíssimas doses no local de interesse. Na tentativa de disponibilizar maiores doses, há risco de sobredosagem, o que pode ocasionar efeitos colaterais como rabdomiólise, lesões hepáticas e insuficiência renal (WANG *et al.*, 2018). Entretanto, o risco da ocorrência de tais efeitos é baixo quando a liberação da droga é controlada, especialmente quando comparado aos benefícios do uso da SIN (BROWN *et al.*, 2015).

Através do método de administração local, alguns estudos foram conduzidos na tentativa de realizar injeções subcutâneas diretamente no osso. É interessante que a formação de novo osso ocorra nos estágios iniciais do reparo, pois enquanto o novo osso não é repostado, ocorre uma migração do epitélio gengival/mucoso para os locais de cavidade, dificultando a reparação do defeito ósseo e trazendo prejuízos ao

indivíduo (AYUKAWA; YASUKAWA; MORIYAMA, 2009). Sugere-se que com a aplicação local de SIN, ocorra um aumento da angiogênese, contribuindo com o ambiente adjacente, visto que, a vasculatura é quem fornece a fonte principal para recrutamento de células para regeneração (TAN, 2015). Entretanto, este método requer inúmeras injeções, o que aumenta a complexidade e o risco de inflamações (XUE *et al.*, 2019), tornando-se um sistema clinicamente inviável (WU; LIU; THE, 2008).

Mesmo após 30 anos da prescrição e uso em tratamentos terapêuticos na ROG, o sucesso da SIN ainda apresenta resultados controversos. Mundy *et al.* (1999) afirmaram que o papel da SIN subcutânea em ossos cranianos de camundongos, assim como por via oral em ratos, aumentou a densidade óssea e apresentou efeitos positivos quanto à regeneração. Yang *et al.* (2013) relataram através de um experimento com injeção local de SIN em fêmur e vértebras de ratos, a melhora significativa da estrutura óssea, além de neoformação óssea precoce. Resultados conflitantes foram apontados por Maritz *et al.* (2015) e Anbinder *et al.* (2006). Segundo eles, não houve diferença significativa quanto à administração de SIN, seja oral ou subcutânea, em defeitos cirúrgicos feitos em ratos; assim como relatado por Rutledge *et al.* (2011) em experimentos com a mesma forma de administração, mas feitos em mandíbula de cães. Maritz *et al.* (2015) ainda afirmam que o fármaco foi incapaz de prevenir a perda óssea.

Como alternativa à essas formas de injeção local da SIN, surge o uso dos polímeros. Um transportador ideal para a SIN deve ser capaz de liberar doses suficientes por um período de tempo prolongado e modular a ação anti-inflamatória da SIN para favorecer o reparo do tecido. Além disso, a dose liberada não pode ser citotóxica ao organismo, ou seja, deve apresentar biocompatibilidade (MARITZ *et al.*, 2015).

Arcabouços de PLGA apresentam excelente potencial dentro da engenharia de tecidos, conforme foi discutido anteriormente. Com o uso deste dispositivo biocompatível e biodegradável, a liberação da SIN pode apresentar um efeito positivo, já que é possível realizá-la de forma controlada. Um estudo de Xue *et al.* (2019) mostrou que conforme a liberação da SIN diminui, as taxas de proliferação das células aumentaram, ou seja, é considerado um sistema de liberação de substância eficaz, pois fornece estímulo de forma sustentada. Zhang *et al.* (2019) também demonstraram resultados positivos utilizando o PLGA como carreador. Em estudo

realizado por Encarnação *et al.* (2016), foram realizados testes para avaliar o efeito da aplicação local de SIN associada a um arcabouço composto por PLGA+ β TCP, onde concluiu-se que embora tenha ocorrido um aumento da expressão de citocinas inflamatórias em tecidos adjacentes, uma formação óssea semelhante, tanto no grupo com incorporação de SIN quanto no grupo sem SIN, foi identificada. Sendo assim, o fator mais importante ao selecionar um sistema de entrega da SIN, é a taxa de liberação. Dependendo da dose do fármaco liberada, há possibilidade de diferentes efeitos (PARK, 2009). Stein *et al.* (1999) descobriram que os sinais clínicos de uma inflamação serão reduzidos diminuindo a dose de SIN aplicada (ILLINGWORTH *et al.*, 2015). Sendo assim, o PLGA, por apresentar taxa de degradação gradual, é capaz de liberar a SIN de forma constante e em baixas doses, proporcionando um efeito por longo período (WU; LIU; THE, 2008).

2.5 Arcabouços de PLGA+HA/ β TCP+SIN

Apesar de não existir um material de enxerto ideal, para que um arcabouço seja utilizado como matriz de suporte, proliferação e diferenciação celular, algumas características básicas são essenciais, como: (1) promover a deposição de matriz óssea, processo conhecido como osteogênese, que é realizado pelos osteoblastos; (2) promover osteoindução, a partir da presença de fatores de crescimento que promovam a diferenciação celular; e (3) permitir a migração e adesão de células, promovendo assim, o processo chamado osteocondução (HÄMMERLE; KARRING, 1998). Além disto, o dispositivo deve conferir permeabilidade para fornecer nutrientes às células do local, não apresentar resposta imunológica ao indivíduo e comprometer a área, além de apresentar porosidade para permitir uma integração entre as células (AZEVEDO *et al.*, 2007). Em resumo, a composição de um substituto ósseo ideal deve ser semelhante ao tecido ósseo, bem como permitir a neoformação do tecido ósseo em quantidade e qualidade adequadas (COSTA *et al.*, 2016).

É possível assim, moldar e controlar as características dos arcabouços. A porosidade é necessária para acomodar um maior número de células e permitir o crescimento celular, vascularização e difusão de nutrientes, e é dada pela adição de substâncias, como a sacarose (BAO, 1993), a qual é posteriormente removida por dissolução. Segundo um estudo de Encarnação *et al.* (2019), as amostras de PLGA+HA/ β TCP+SIN que apresentavam porosidade de 70% tinham muito mais interconexões quando comparadas com amostras com porosidade de 30%.

Para modificar a superfície dos biomateriais poliméricos de enxertia e melhorar os resultados clínicos, é feita a combinação de diferentes compostos, como é o caso das cerâmicas da família dos fosfato de cálcio, por exemplo a HA que induz uma boa resposta às células óssea (LEBOURG; ANTÓN; RIBELLES, 2010) e o β TCP, material reabsorvível com ampla utilização para reparar tecidos duros (TARAFDER *et al.*, 2013). Ciapetti *et al.* (2012) observaram em um estudo *in vitro* com ratos, um aumento na formação óssea após utilização de arcabouços combinados com PLGA e HA. Os materiais a base de fosfato de cálcio são considerados seguros e vêm sendo intensamente estudados, pois podem ser comercializados, e são facilmente disponibilizados em consultórios odontológicos (LE GUÉHENNEC *et al.*, 2020). A adição de substâncias como HA e β TCP, além de serem biocompatíveis e passíveis de sofrerem degradação, propiciam o crescimento ósseo sobre a superfície do arcabouço (HUANG; MIAGO, 2007), tendo assim um papel fundamental dentro da matriz confeccionada. Encarnação *et al.* (2019) apresentaram resultados promissores para arcabouços de PLGA com HA e β TCP, melhorando a resistência mecânica e o processo de degradação. Arafat *et al.* (2011) demonstraram que a adição de β TCP e HA no arcabouço resultaram em um aumento na proliferação e diferenciação celular de células mesenquimais do estroma da medula óssea. Isso também pôde ser comprovado por Wang *et al.* (2018) e Lebourg *et al.* (2010) que classificaram arcabouços com adição destas substâncias como bons candidatos para a reparação de defeitos ósseos (IAQUINTA *et al.*, 2019).

O biomaterial de enxertia confeccionado é capaz de iniciar vias de sinalização e atrair fibroblastos para o local do tecido danificado, fazendo com que ele seja reparado através da excreção de colágeno e fatores de crescimento (CHEN *et al.*, 2016). Entretanto, alguns estudos provaram que a morfologia desse dispositivo influencia no mecanismo de distribuição das substâncias, afeta a degradação da matriz e interfere na cinética de liberação (ALMERÍA *et al.*, 2010). A adição de fármacos como a SIN a arcabouços poliméricos propicia o aumento das taxas de mineralização, o estímulo de fatores de crescimento e colabora com a atividade de células osteoblásticas, contribuindo assim para que aconteça o processo de regeneração óssea. Além disso, estudos de Sakoda *et al.* (2006) mostraram que a SIN apresenta caráter anti-inflamatório, conforme já salientado.

2.6 Métodos de Esterilização

No processo de desenvolvimento e estudo de arcabouços que contenham os materiais necessários e em quantidades ideais, observou-se a necessidade de que os mesmos sejam submetidos a um processo de esterilização, pois são considerados itens críticos, visto que estarão em contato com tecidos e fluidos corporais (RUTALA; GERGEN; WEBER, 1998). No entanto, trata-se de uma perspectiva desafiadora, já que a maioria dos métodos utilizados acaba por causar alterações estruturais e comprometer a eficácia dos biomateriais (ATHANASIOU; NIEDERAUER; AGRAWAL, 1996).

Para a Organização Internacional de Normalização, esterilidade é definida como um local livre de micro-organismos viáveis. Além disto, o processo de esterilização dos dispositivos médicos é considerado uma etapa essencial do processo de fabricação de um produto (LAMBERT; MENDELSON; CRAVEN, 2011). Existem diversos métodos de esterilização que envolvem a natureza física, química e físico-química. Os métodos físicos englobam calor seco, vapor por autoclave e radiação (UV e raios gama). Os métodos químicos, por sua vez, compreendem o Óxido de Etileno (OE), Ozônio, formaldeído e fenóis. (HAN *et al.*, 2018).

O custo, a praticidade e a eficácia devem ser considerados durante a seleção do método de esterilização a ser utilizado; além disso, é importante optar por um método que cause mínimas alterações na estrutura e propriedades do biomaterial (HAN *et al.*, 2018). É imprescindível conhecer a estrutura do produto a ser esterilizado, bem como as propriedades físico-químicas de cada substância que o compõe. Os arcabouços são confeccionados com materiais de diferentes composições, e sua combinação torna a esterilização um desafio ainda maior, visto que é necessário conferir esterilidade de forma particular e reduzir os danos gerados ao biomaterial como um todo (LAMBERT; MENDELSON; CRAVEN, 2011).

Idealmente, os biomateriais (incluindo os arcabouços) seriam fabricados em ambiente asséptico, como em fluxos de cultura celular, com a esterilidade do material conferida em cada etapa de processamento (QI *et al.*, 2018). No entanto, para confecções em larga escala, isso se torna inviável devido a questões econômicas e pela necessidade de prestadores deste tipo de serviço próximo ao local de confecção. (LAMBERT; MENDELSON; CRAVEN, 2011).

Dentre os métodos físicos, a autoclavação que elimina rapidamente os micro-organismos (HAN *et al.*, 2018) e está disponível na maioria dos laboratórios biológicos,

é considerado viável pela praticidade e baixo custo (ARIAS *et al.*, 2020). No entanto, em arcabouços confeccionados a partir de polímeros, provoca corrosão e deterioração do material (HAN *et al.*, 2018), devido ao aquecimento com vapor a temperaturas maiores que 120°C e em superfícies fechadas (SASAKI *et al.*, 2018). Esta degradação acontece porque o PLGA possui baixa temperatura de transição vítrea (cerca de 54-60°C) (ATHANASIOU; NIEDERAUER; AGRAWAL, 1996) e, por esse motivo, a esterilização por calor seco também não é indicada em materiais termosensíveis como os polímeros (HAN *et al.*, 2018; RUTALA; GERGEN; WEBER, 1998). Assim sendo, outras técnicas de esterilização físicas em baixas condições de temperatura são recomendadas, como irradiação gama e ultravioleta (UV).

Os dois métodos de esterilização mais utilizados na indústria de dispositivos médicos são a radiação gama e o óxido de etileno (LAMBERT; MENDELSON; CRAVEN, 2011), cujas aplicações vão desde produtos básicos como aventais cirúrgicos, até os itens mais complexos como válvulas cardíacas, cateteres e outros dispositivos implantáveis. Há algumas vantagens ao utilizar estes métodos, tal como a eficácia em conferir esterilidade, a capacidade de processar grandes volumes de produto, a segurança do paciente e por terem um custo relativamente baixo (LAMBERT; MENDELSON; CRAVEN, 2011). Mas, ainda com estes métodos, os polímeros são suscetíveis a sofrerem modificações em sua estrutura. Degradação de polímeros e proteínas pela quebra de cadeias, inativação de substâncias (QI *et al.*, 2018), oxidação ou formação de radicais livres (RUTALA; GERGEN; WEBER, 1998) e comprometimento do desempenho do material são alterações que podem surgir após o procedimento esterilizador, trazendo falhas quando aplicados em experimentos *in vivo* (ATHANASIOU; NIEDERAUER; AGRAWAL, 1996).

O uso do método químico através de gases como OE é bastante comum - cerca de 50% do mercado de esterilização industrial (LAMBERT; MENDELSON; CRAVEN, 2011) e é considerado o tipo de esterilização de baixa temperatura mais amplamente usado em dispositivos na área da saúde (RUTALA; GERGEN; WEBER, 1998). Contudo, uma desvantagem é que este método gera resíduos nocivos que podem prejudicar o desempenho do biomaterial (ATHANASIOU; NIEDERAUER; AGRAWAL, 1996). Assim, a esterilização por OE requer um tratamento de aeração das amostras para remover estes resíduos tóxicos (DESAI; KADOUS; SCHWENDEMAN, 2013; HOOPER; COX; KOHN, 1997). Além disto, segundo Rutala *et al.* (1998), o uso de OE pode trazer riscos para funcionários e pacientes por ser um produto inflamável e

potencial cancerígeno. Ainda, o OE tem sua eficácia limitada pela incapacidade de envolver os instrumentos em uma embalagem estéril, não sendo recomendado pela *American Dental Association* (HAN *et al.*, 2018). Apesar de Sasaki *et al.* (2018) afirmarem através de um estudo que o tratamento por calor seco induz menor formação de biofilme (*Staphylococcus aureus*) em superfícies de zircônia comparado à esterilização por raios gama, este último método, quando utilizado em baixas doses, apresenta diversas vantagens que o consideram conveniente para ser utilizado em materiais poliméricos (HU *et al.*, 2014; SASAKI *et al.*, 2018).

Em resumo, a esterilização por calor seco e a vapor (autoclaves) apresentam como principal vantagem a capacidade de não gerar resíduos tóxicos. Entretanto, seus prejuízos são consideráveis, já que causam derretimento ou degradação de estruturas poliméricas. Já a radiação gama e a esterilização por óxido de etileno, apesar das desvantagens (quebra de cadeias no polímero e formação de resíduos tóxicos, respectivamente) apresentam vantagens potencializadas, pois utilizam baixas temperaturas, o que reduz a deterioração dos polímeros, é eficaz e tem ótimo custo benefício (ATHANASIOU; NIEDERAUER; AGRAWAL, 1996).

2.7 Raios Gama

A esterilização através de radiação gama é capaz de eliminar todas as formas de micro-organismos, não emite gases e resíduos químicos (DESAI; KADOUS; SCHWENDEMAN, 2013) e seu processo pode ser efetuado em condições de baixa temperatura e pressão (HAN *et al.*, 2018). É capaz de iniciar reações químicas indiferente da fase (gás, líquido ou sólido) e sem o uso de catalisadores (SILVA AQUINO, 2012). Seu uso tem crescido cada vez mais para conferir esterilidade à próteses (CEHRELI *et al.*, 2004), implantes, aloenxertos de tecidos (HARRELL *et al.*, 2018), como também cosméticos, vacinas (ABUHANOĞLU; ÖZER, 2014) e produtos alimentares (DA SILVA; DA SILVA; DA SILVA AQUINO, 2014).

Os raios gama são ondas eletromagnéticas, ou seja, radiações da mesma natureza do raio-X com alta frequência e baixo comprimento de onda, mas que diferem quanto a origem. As duas formas passam facilmente por micro-organismos vivos, contudo, radiação gama tem maior poder penetrante (MCLAUGHLIN; DESROSIERS, 1995).

O processo de irradiação pode ou não provocar ionização, sendo então classificada em radiação ionizante ou não ionizante. A primeira, que é o caso dos raios

gama, UV, infravermelho, entre outras, é considerada mais prejudicial porque penetra no corpo de forma muito eficiente e em exposição prolongada pode provocar formação de câncer (DA SILVA; DA SILVA; DA SILVA AQUINO, 2014). O processo de esterilização ocorre através de colisões entre a radiação e os elétrons dos átomos do material que está sendo esterilizado. Conforme o material vai perdendo elétrons, ocorre a formação de íons, pelo processo conhecido como ionização. Este método é usado há cerca de 45 anos e ocupa cerca de 40% do mercado de esterilização (HASANAIN *et al.*, 2014). Além disto, é considerado seguro, pois os materiais não se tornam radioativos nos níveis de energia baixos ao qual são submetidos (DA SILVA; DA SILVA; DA SILVA AQUINO, 2014).

O processo da irradiação gama acontece através de uma fonte de cobalto-60 (Co-60) (HAN *et al.*, 2018), onde os produtos passam na frente de dispositivo de irradiação que emite elétrons que penetram, de forma intensa e rápida (LAMBERT; MENDELSON; CRAVEN, 2011), pelas embalagens e inativam a carga microbiana existente (DA SILVA; DA SILVA; DA SILVA AQUINO, 2014). Esta inativação pode ocorrer por um mecanismo direto – através da quebra de cadeias de DNA (RYDBERG *et al.*, 1996) ou RNA (BLANCO *et al.*, 2018; HUTCHINSON *et al.*, 1970) dos patógenos, ou por inativação indireta – quando a energia é transferida para moléculas de água, formando radicais livres que impedem a reprodução microbiana (DA SILVA; DA SILVA; DA SILVA AQUINO, 2014).

Cada material possui uma dose máxima aceitável de irradiação, e antes de iniciar o processo esterilizador é preciso conhecer suas propriedades e vida útil, visto que poderão sofrer modificações não só a nível visual, alterando seu tempo de degradação e interferindo posteriormente no tratamento (ATHANASIOU; NIEDERAUER; AGRAWAL, 1996). É importante estar ciente destas informações para que seja determinada quantas vezes o material irá passar em frente à fonte de Co-60. Segundo Lambert *et al.* (2011), o tempo total de exposição dos produtos é em torno de 4 a 8 horas e podem passar em frente à fonte por diversas vezes, até que se tornem estéreis.

O SAL (do inglês, *Sterility Assurance Level*) é uma definição da dose necessária a ser absorvida por um produto para permitir que uma população microbiana tenha uma redução de pelo menos 90%. Para produtos médicos utiliza-se, geralmente, um valor de 10^{-6} e essas doses devem ser escolhidas de acordo com

a carga microbiana inicial de cada material (DA SILVA; DA SILVA; DA SILVA AQUINO, 2014).

A medida gray (Gy) é comumente utilizada para medir a quantidade de exposição à radiação, junto com o rad. 1 Gy corresponde a 100 rads e a aplicação de radiação é classificada em: dose baixa (menor que 1kGy), dose média (1 a 10 kGy) e dose alta (maior que 10 kGy). Como regra geral, proposta pela Organização Internacional de Padronização (ISO) para dispositivos médicos e tecidos biológicos, tem-se utilizados doses mínimas de 25 kGy. Tal dose garante esterilidade a nível de 10^{-6} (SAL) (DESAI; KADOUS; SCHWENDEMAN, 2013). Doses baixas agem diminuindo a transmissibilidade de parasitas e atenuando a infecciosidade (FARKAS, 1998), ao passo que, doses elevadas eliminam completamente bactérias e parasitas (GRIEB *et al.*, 2005). Contudo, Sakar *et al.* (2017) observaram que é possível optar pelo uso de doses mais baixas, desde que se avalie o tipo de material a ser tratado e a carga biológica inicial.

Um estudo de Hu *et al.* (2014) sugere que a dose de irradiação de 25kGy é capaz de esterilizar de forma eficaz os micro-organismos. Os micro-organismos diminuiram consideravelmente com o aumento das doses de irradiação gama. Amostras irradiadas com 5 kGy apresentaram população microbiana de 2,17 UFC/mg (unidades formadoras de colônia) e com uma dose de 15 kGy, o resultado foi de 1,00 UFC/mg. O resultado foi ainda mais promissor quando expostas a doses de 25 e 35 kGy, diminuindo as populações para abaixo do limite de detecção de 1,00 UFC/mg. Este mesmo estudo ainda afirmou que amostras de polímeros tratados com irradiação gama foram capazes de aumentar a viabilidade de células endoteliais.

Um dos benefícios da esterilização por radiação gama é o baixo custo, além de que se tem mais liberdade para acondicionar grandes quantidades de materiais devido a compatibilidade com muitos produtos (desde metais à termoplásticos) (HARRELL *et al.*, 2018; SINGH; SINGH; SINGH, 2016) e permite esterilizar produtos embalados (PREEM *et al.*, 2019; SILVA AQUINO, 2012). Além disto, dispensa reação térmica e não necessita de um segundo tratamento para remoção de resíduos (DESAI; KADOUS; SCHWENDEMAN, 2013; HOOPER; COX; KOHN, 1997).

Infelizmente, as características estruturais dos dispositivos médicos a partir de polímeros sofrem modificações inevitáveis após o processo de esterilização, o que pode reduzir, de certa maneira, o seu potencial regenerativo (DA SILVA; KÁTIA; ARAÚJO, 2008; STANTON, 1987). Componentes estruturais como fibras colágenas,

por exemplo, sofrem alterações que comprometem a resistência e podem resultar em trincas ou quebras (DA SILVA *et al.*, 2019; SCHUSTER *et al.*, 2000). As alterações nos produtos podem afetar seu uso clínico (HARRELL *et al.*, 2018), incluindo redução do peso molecular, geração de subprodutos da radiólise, modificações nas propriedades físicas (resistência à tração, alongamento ou ruptura) e interferência na liberação de fármacos (DA SILVA; DA SILVA; DA SILVA AQUINO, 2014). Estas alterações podem ser evidentes logo após o processo de radiação ou se desenvolver ao longo do tempo (ARIAS *et al.*, 2020). Comprometimento em propriedades estruturais (cisão ou reticulação de cadeias, oxidação (ADAMUS-WLODARCZYK *et al.*, 2018; JEON; LEE; PARK, 2004), formação de radicais livres (CAIRE-MAURISIER *et al.*, 2019), alterações na cristalinidade (ZHU *et al.*, 2002) e, por consequência, na permeabilidade, e no peso molecular das amostras também podem ser observados (DESAI; KADOUS; SCHWENDEMAN, 2013). As mudanças na morfologia dos arcabouços tridimensionais podem alterar a adesão e proliferação celular (LOWERY; DATTA; RUTLEDGE, 2010; WONG; BAJI; LENG, 2008), bem como interferir na liberação de fármacos (XUE *et al.*, 2017).

O efeito prejudicial da irradiação gama depende de alguns fatores, sejam eles a dose de radiação, a energia e a distância da fonte, assim como o tamanho e a densidade da embalagem, que também interferem no poder de penetração dos raios (MCLAUGHLIN; DESROSIERS, 1995). Segundo Blanco *et al.* (2018), a quantidade, ou seja, a dose, e não o tipo de radiação, é considerado o principal fator de dano na maioria das moléculas avaliadas em seu estudo.

Para reduzir os efeitos da degradação causada pela esterilização, avalia-se a dose da irradiação, as condições e a composição do polímero (DELGADO; PANDIT; ZEUGOLIS, 2014). Uma alternativa é reduzir o teor de água existente nas amostras e assim a atividade dos radicais livres são limitadas, impedindo a degradação acelerada (HASANAIN *et al.*, 2014).

A seguir, são descritas as propriedades que podem ser afetadas pela esterilização por radiação gama.

Cristalinidade

Um polímero mais cristalino permite maior difusão molecular que um polímero amorfo. Com o aumento da cristalinidade do polímero, ocorre diminuição da

permeabilidade e com isso menor migração de células. As moléculas pequenas se espalham menos por áreas cristalinas do que amorfas e, por isso, as áreas cristalinas agem como uma barreira, reduzindo a propagação (CAIRE-MAURISIER *et al.*, 2019). O aumento da cristalinidade pela radiação gama pode ser explicado como uma consequência da quebra de cadeia, que faz com que reduza o peso molecular médio. Com a diminuição do peso molecular, diminui também a resistência mecânica. O aumento da cristalinidade é capaz de melhorar a força mecânica (DE CASSAN *et al.*, 2019). Além disto, a cristalinidade de alguns materiais pode mudar durante o processo de esterilização. Este parâmetro deve ser bem avaliado, pois é peça-chave no controle de liberação de fármacos, propriedades mecânicas, taxa de biodegradação, e, conseqüentemente, no desempenho funcional do arcabouço (PREEM *et al.*, 2019)

Temperatura de transição vítrea

Quando ocorrem pequenas alterações na temperatura de transição vítrea significa que o material é pouco amorfo e muito cristalino. Portanto, uma alta dose de radiação faz com que diminua a temperatura de transição vítrea do material (DE CASSAN *et al.*, 2019). Além disto, a temperatura de transição vítrea diminui conforme o polímero se degrada. E faz com que a difusão de água em um arcabouço ocorra de forma mais lenta (ENCARNAÇÃO *et al.*, 2016).

Redução de peso molecular

Bosworth *et al.* (2012) mostraram através de seu estudo que amostras feitas de polímero diminuiriam seu peso molecular a medida que a dose de irradiação foi aumentada, assim como diminuiriam a resistência mecânica do polímero. Adicionalmente, houve um aumento da cristalinidade. A redução do peso molecular ocorre pela ruptura e quebra de ligações na cadeia do polímero. Isto faz com que haja um aumento da mobilidade da cadeia, que fica menos emaranhada e pode resultar em aumento da porosidade (DESAI; KADOUS; SCHWENDEMAN, 2013). Ao formar radicais livres (processo que ocorre principalmente no estado líquido) (BLANCO *et al.*, 2018; LEE; VOLKOV; LEE, 2001), a cadeia pode se degradar ou se reticular (CAIRE-MAURISIER *et al.*, 2019). Estes dois processos ocorrem de maneira concomitante de maneira a tentar se equilibrar. Porém, no fim, haverá uma proporção dominante, e se o resultado for uma reticulação na cadeia, haverá a formação de um polímero mais ramificado, conseqüentemente com um maior peso molecular. Pelo contrário, se o

resultado for uma quebra da cadeia, ocorrerá uma mudança na cristalinidade e, conseqüentemente, uma redução no peso molecular do polímero (HASANAIN *et al.*, 2014). Poliésteres no geral degradam diminuindo o peso molecular, a viscosidade e as propriedades mecânicas (HASANAIN *et al.*, 2014), e, conforme observado por Bosworth *et al.* (2012), aumentando a cristalinidade.

Disposição de fibras

A disposição e orientação das fibras de um arcabouço (biomaterial) também pode influenciar nas propriedades de um material. De Cassan *et al.* (2019) relataram que fibras mais alinhadas eram mais cristalinas do que as que estavam dispostas aleatoriamente e que essa disposição interfere nas propriedades mecânicas após o processo de esterilização. As fibras de um tipo de polímero proposto por Valente *et al.* (2016) perderam sua orientação após esterilização por OE, porém permaneceram sem nenhum dano após esterilização por radiação gama.

Liberação de fármacos

A estabilidade do sistema tridimensional também é de extrema importância para garantir a eficácia da terapêutica quando se quer a liberação de substâncias (PREEM *et al.*, 2019). A liberação de fármacos depende da estrutura química do polímero, como também do fármaco que será transportado, da dose de radiação e das condições de processamento (HASANAIN *et al.*, 2014). A esterilização de produtos que carregam fármacos e outras substâncias podem resultar numa perda devido a degradação que ocorre durante o tempo. Contudo, no estudo de Preem *et al.* (2019), a irradiação gama mostrou os efeitos menos prejudiciais nesse quesito. É importante avaliar a questão da porosidade em relação a liberação de fármacos, pois quanto maiores os poros presentes na matriz, mais acesso e penetração tem o medicamento e rapidamente pode ser degradado (PREEM *et al.*, 2019). Apesar de, na maioria dos casos, o processo de esterilização afetar a liberação de fármacos (MAGGI *et al.*, 2004; PETERSEN *et al.*, 2013), inclusive estudos com liberação de SIN (MIKKONEN *et al.*, 2009), no estudo de Hong *et al.* (2002) a radiação gama foi o método que causou menor degradação do fármaco.

Quebra de cadeias

Quanto mais ocorrer cisão de cadeias moleculares, maior será a geração de radicais livres que irão migrar pela matriz do polímero e podem inclusive, induzir a riscos de toxicidade (CAIRE-MAURISIER *et al.*, 2019), além de diminuir o peso molecular dos compostos. A conversão de radicais livres em peróxidos é um dos efeitos indesejados que pode ocorrer após esterilização por radiação gama. Isso depende de alguns fatores para acontecer, como a composição e a estrutura do polímero, dose de radiação, tamanho da amostra e também alguns fatores ambientais como temperatura e oxigênio (DORATI *et al.*, 2008; SINTZEL *et al.*, 1997). Com a diminuição de água das amostras, ocorre redução da atividade dos radicais livres e, conseqüentemente, evita-se a degradação do polímero (HASANAIN *et al.*, 2014).

Resposta celular

A utilização de radiação ionizante para induzir o sistema imunológico através de dispositivos implantados em animais é um método proposto há alguns anos. Estudos de Yang *et al.* (2014) e Shimura *et al.* (2014) mostraram que baixas doses de radiação levam à um desdobramento de proteínas que modificam sua conformação de forma a permitir aderência de anticorpos à sua estrutura, induzindo o processo de resposta imunológica (FORSSTRÖM *et al.*, 2015).

Radiação gama em baixas doses é capaz de induzir a formação de fatores de crescimento que estão envolvidos com as BMPs (HARRELL *et al.*, 2018) e alguns autores, como Kluger *et al.* (2003), afirmam que osteoclastos irradiados reduziram a capacidade de reabsorção óssea. A radiação de raios gama também é muito conhecida por influenciar na atividade celular através de produção de espécies reativas de oxigênio (KAWASE *et al.*, 2016). Os efeitos biológicos do tratamento com raios gama estão também associados a absorção e adesão celular, de forma a diminuir a porcentagem de carbono atômico (UENO *et al.*, 2012). O estudo de True *et al.* (1992) avaliou a resposta celular em torno de um tendão irradiado e concluiu que a radiação gama pode ter um efeito de superfície, visto que uma parte do volume de enxerto permanece inalterada. Este resultado se mostrou bastante interessante, pois seria até mesmo benéfico para um sistema tridimensional, pois promoveria maior integração dele ao tecido hospedeiro. (DELGADO; PANDIT; ZEUGOLIS, 2014)

2.8 Autoclave

A esterilização por autoclave é um procedimento obrigatório em aplicações clínicas e é implementada frequentemente em campos médicos. É muito utilizada por apresentar praticidade, baixo custo e rapidez (SASAKI *et al.*, 2018). Neste método, os micro-organismos tornam-se inviáveis por aquecimento com vapor em uma superfície fechada e a uma temperatura de 121 °C (ARIAS *et al.*, 2020; ATHANASIOU; NIEDERAUER; AGRAWAL, 1996; KURIBARA *et al.*, 2012). A autoclavação ainda é o método escolhido para eliminação de micro-organismos em instrumentais odontológicos (ARIAS *et al.*, 2020), mas no campo das pesquisas *in vitro*, onde frequentemente são utilizados materiais que não suportam altas temperaturas, como polímeros (HAN *et al.*, 2018), este método causa deterioração, corrosão e destruição de estruturas cristalinas, sendo contraindicado (SASAKI *et al.*, 2018).

A elevação das condições de temperatura e de umidade dentro das autoclaves faz com que dispositivos de base orgânica, entre outros materiais, sofram alterações morfológicas devido à expansão térmica (KURIBARA *et al.*, 2012; UGUZ *et al.*, 2016). Mais especificamente, isso ocorre devido ao vapor, que é o mecanismo principal de destruição microbiana através de autoclave. Além disto, com a contribuição do calor latente à uma alta pressão, ocorre o processo de condensação, que é a transformação da água do estado gasoso para o líquido. Este processo umedece e aquece o material e provoca a esterilização pela troca de calor (GRAZIANO *et al.*, 2003; PERKINS *et al.*, 1983). O vapor leva a hidrólise (quebra de moléculas) dos polímeros, processo chamado de degradação, por conta de altas condições de temperatura, pressão e umidade. Isto foi observado por Ahmed *et al.* (2013) em membranas porosas de poli (carbonato-ureia) uretano não biodegradáveis e biodegradáveis. Estes biomateriais não resistiram às condições a que foram submetidos em autoclave e perderam a sua integridade. Em contrapartida, em um estudo de Abuhanoglu *et al.* (2014), observou-se que a esterilização por autoclave não induziu modificações no peso molecular de polímeros. Isto reafirma o que foi apontado anteriormente, onde a susceptibilidade à degradação não depende apenas do método esterilizador escolhido, mas também das propriedades da matriz (natureza do polímero) (PREEM *et al.*, 2019).

Apesar de ainda não existir um método de esterilização dito ideal, é importante uma análise específica, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, para realizar a melhor escolha. O tratamento esterilizador deve conferir esterilidade ao biomaterial sem comprometer as

propriedades mecânicas e biológicas e evitar contaminações ao paciente, contribuindo para sua saúde geral (RUTALA; GERGEN; WEBER, 1998). Sendo assim, a decisão do tipo de método esterilizador mais adequado é dependente do dispositivo (DELGADO; PANDIT; ZEUGOLIS, 2014) e deve-se levar em consideração sua forma, tamanho (KEMPNER; SCHLEGEL, 1979; PETERS; JANSEN; NAUTA, 1984; VENTER *et al.*, 1983) e composição, bem como, custo, praticidade e segurança (DELGADO; PANDIT; ZEUGOLIS, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a influência da esterilização por raios gama sobre a morfologia, a composição química e a cristalinidade de arcabouços de PLGA com HA e β TCP incorporando SIN.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a morfologia de arcabouços de PLGA+HA/ β TCP, com e sem SIN, por meio de MEV.
- Avaliar a composição química de arcabouços de PLGA+HA/ β TCP, com e sem SIN, por meio de análises de EDS.
- Avaliar a cristalinidade de arcabouços de PLGA+HA/ β TCP, com e sem SIN, por meio de análises de DRX.
- Comparar os arcabouços esterilizados por raios gama com os grupos sem tratamento (controle positivo) e com tratamento por esterilização por autoclave (controle negativo).

4 METODOLOGIA

4.1 Confeção dos Arcabouços

A confecção dos arcabouços foi realizada no Laboratório de Virologia Aplicada da Universidade Federal de Santa Catarina (LVA – UFSC) seguindo todos os protocolos para evitar a contaminação das amostras. A produção das amostras foi realizada com base em experimentos relatados anteriormente por Sordi *et al.*, (2017) e Encarnação *et al.*, (2016). Os arcabouços foram feitos a partir dos polímeros LT 706S (Poly (L-lactide-co-trimethylene carbonate, Resomer® Evonik, Essen, Alemanha) e LG 824S (Poly(L-lactide-co-glycolide) 82:18, Resomer® Evonik, Essen, Alemanha) e cerâmica bifásica composta por HA e β TCP (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, Estados Unidos). Para o grupo de arcabouço experimental, foram adicionados os mesmos polímeros e cerâmica bifásica, com acréscimo de SIN (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, Estados Unidos). O método utilizado para a confecção dos arcabouços foi pela evaporação do solvente clorofórmio (Synth®, Diadema, SP, Brasil) e a porosidade foi proporcionada através da adição de sacarose (Merck®, Darmstadt, Alemanha), a qual foi posteriormente removida com banhos de álcool polivinílico (C₂H₄O)_n, Synth®, Diadema, SP, Brasil).

Inicialmente, o copolímero PLGA, na proporção 1:1 (polímero baseado em lactídeo:poli (L-ácido láctico-co-trimetileno carbonato), foi dissolvido em clorofórmio (10% v/m), em temperatura ambiente e sem agitação. Após a dissolução completa dos polímeros, foram adicionadas partículas de sacarose (80% m/m) com granulação inferior a 500 μ m, bem como partículas de cerâmica bifásica (50 μ m de HA (70%) e β TCP (30%)), na proporção 1:1 entre polímero e cerâmica. Esta solução foi então vertida em moldes cilíndricos de 6 mm de diâmetro e mantida nos moldes até a evaporação total do solvente. Os cilindros obtidos foram seccionados com lâmina de bisturi para obtenção de amostras com espessura de 1 mm. A sacarose foi removida das amostras obtidas usando-se solução de álcool polivinílico a 1% em banho de 24h, seguido por banho de 24 h com água destilada, ambos os banhos sob agitação constante. Para os arcabouços com SIN incorporada, o fármaco a uma concentração de 2% (20,4 mg) em relação ao PLGA foi diluído em clorofórmio, ao qual adicionou-se sacarose e HA/ β TCP ao polímero já diluído em clorofórmio. Os demais passos para a obtenção do arcabouço com sinvastatina foram os mesmos já descritos acima. Os

arcabouços confeccionados possuíam um peso médio de 18 mg para os arcabouços sem SIN e de 25 mg para arcabouços com SIN.

4.2 Esterilização dos arcabouços

Após a produção das amostras, os arcabouços foram separados e embalados em papel grau cirúrgico (35x20 cm), os quais continham três unidades de amostra para cada embalagem. As amostras foram organizadas em diferentes grupos: G1 – PLGA+HA/ β TCP e G2 – PLGA+HA/ β TCP+SIN. E os grupos foram identificados da seguinte maneira:

- 1) Arcabouço de PLGA+HA/ β TCP não esterilizado
- 2) Arcabouço de PLGA+HA/ β TCP+2% SIN não esterilizado
- 3) Arcabouço de PLGA+HA/ β TCP esterilizado por radiação gama
- 4) Arcabouço de PLGA+HA/ β TCP+2% SIN esterilizado por radiação gama
- 5) Arcabouço de PLGA+HA/ β TCP esterilizado por autoclave
- 6) Arcabouço de PLGA+ HA/ β TCP+2% SIN esterilizado por autoclave

As amostras dos grupos 3 e 4 foram então enviadas para o Centro de Tecnologia das Radiações (CETER IPEN/ CNEN, São Paulo, SP, Brasil) para esterilização através de radiação gama. A dose de radiação a que foram submetidos foi de 18kGy, 2kGy/h. A escolha da dose foi baseada em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, após uma revisão de literatura. (DESAI; KADOUS; SCHWENDEMAN, 2013)

As amostras dos grupos 5 e 6 foram embaladas em grau cirúrgico e levadas à Central de Esterilização do departamento de Odontologia da UFSC (CME-UFSC) para passar pelo processo de autoclavação.

Todos os grupos passaram pelos testes de caracterização físico-química para avaliação dos resultados.

4.3 Caracterização físico-química dos arcabouços

Todos os grupos foram então avaliados quanto as suas propriedades físico-químicas utilizando-se microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva (EDS) e difração de raio-X (DRX) para avaliar possíveis alterações nos arcabouços causadas pelos diferentes métodos de esterilização.

4.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para as análises morfológicas e dimensionais, foi empregado microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-6390LV Scanning Electron Microscope MEV) com fonte de elétrons de Tungstênio, detector de elétrons secundários e tensões entre 10 e 15 kV, localizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Foram analisadas três amostras de cada grupo e, para cada amostra, foram obtidos registros com diferentes ampliações (X100 e X500).

4.3.2 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

Os arcabouços foram analisados por EDS associada ao MEV (JEOL JSM-6390LV Scanning Electron Microscope MEV) para determinar a composição química e elementar das amostras, através do mapeamento da composição das amostras através de uma análise química qualitativa.

4.3.3 Difração de Raios-X (DRX)

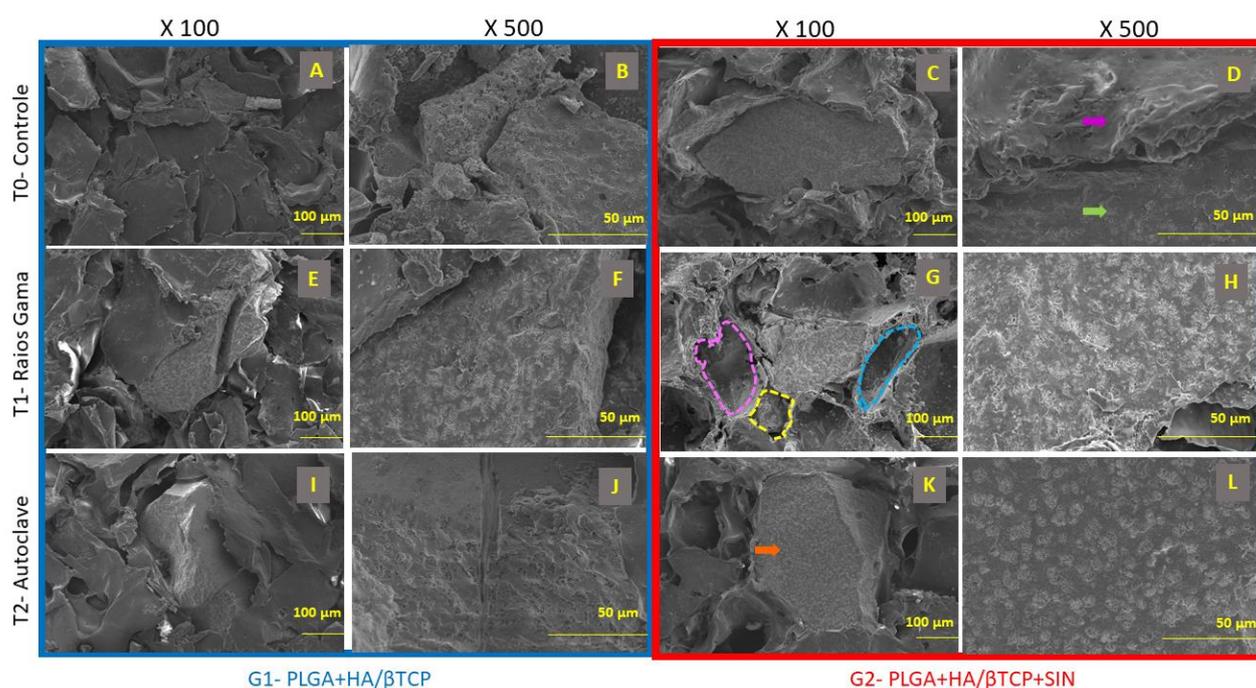
As amostras foram analisados pelo difratômetro de raio-X (MiniFlex600, Rigaku, Texas, USA) para identificar partículas ou minerais, medir propriedades estruturais, identificar outros arranjos atômicos e definir se o material é cristalino ou amorfo. As amostras foram analisadas com um detector D/teX Ultra e uma fonte de cobre que operou a uma tensão de 40kV e corrente de 15 mA. As análises foram feitas num intervalo de 5 a 90° (2 θ) com step-size de 0,05° e velocidade de 10°/min.

5 RESULTADOS

5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras foram analisadas por MEV e as imagens obtidas estão dispostas na Figura 1. As amostras apresentaram poros em diferentes dimensões (indicado pelas linhas tracejadas em rosa, amarelo e azul). Não se observou nenhuma alteração morfológica e as porosidades foram observadas antes e após os tratamentos, tanto em T1 quanto T2. Observou-se partículas de HA/ β TCP dispersas na estrutura polimérica (seta laranja, Figura 1K). A seta roxa indica área de polímero PLGA e a seta verde indica área de cerâmica (Figura 1D).

Figura 1 - MEV de arcabouços de PLGA+HA/ β TCP e PLGA+HA/ β TCP+SIN sem tratamento e após esterilização por autoclave e radiação gama.



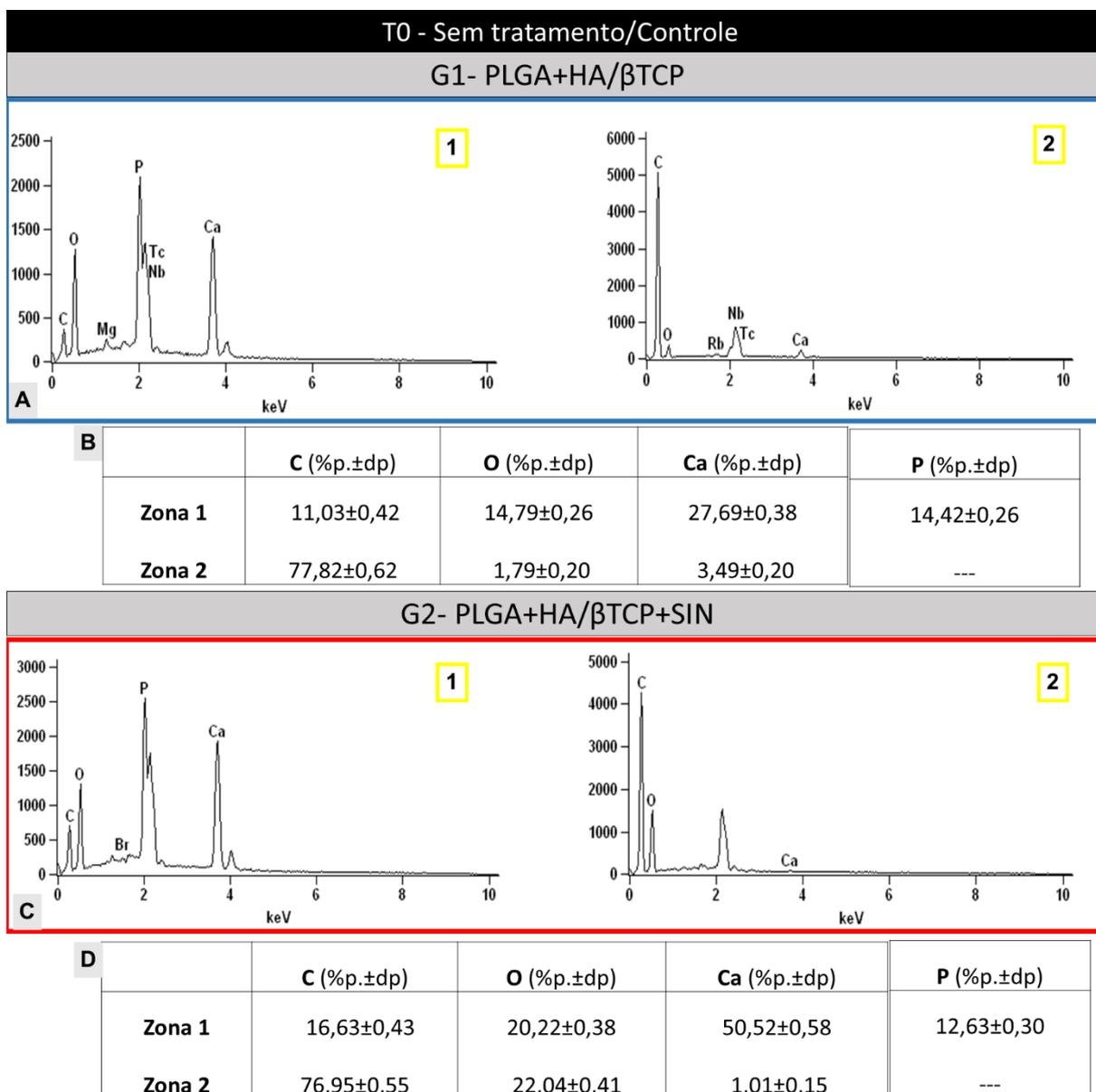
Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em ampliação de X100 e X500 a partir de amostras dos arcabouços de PLGA+HA/ β TCP (azul) e PLGA+HA/ β TCP+SIN (vermelho).

Área de polímero (seta roxa, 1D) e área de cerâmica (seta verde 1D). Presença de diferentes tamanhos de poros nas amostras (linhas tracejadas). Partículas de HA/ β TCP dispersas na estrutura polimérica (seta laranja, figura 1K).

5.2 Espectroscopia por energia dispersiva (EDS)

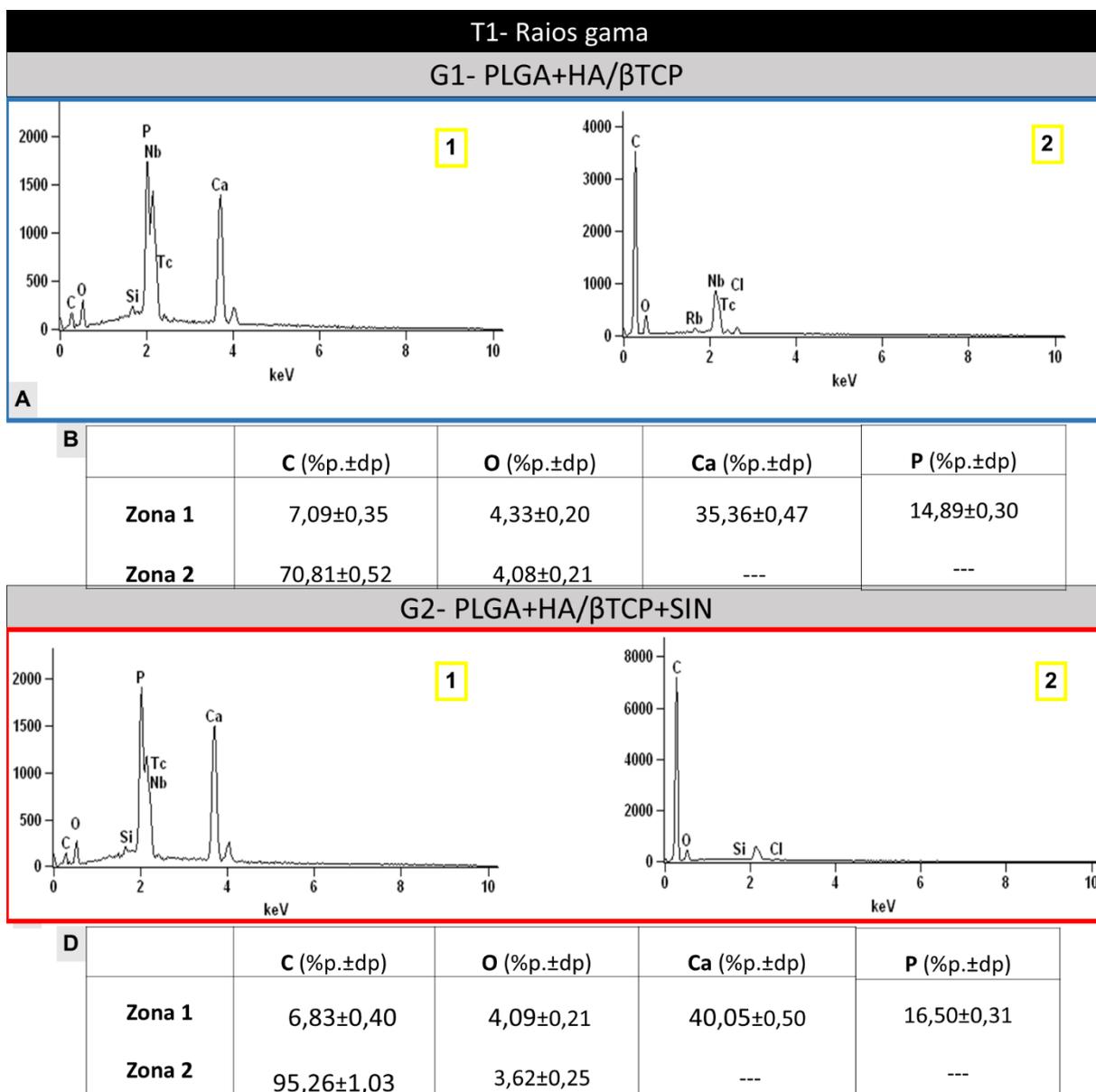
As análises de EDS nas superfícies das amostras dos dois grupos PLGA+HA/ β TCP e PLGA+HA/ β TCP+SIN demonstraram que os arcabouços foram formados essencialmente pelos elementos Carbono (C) e Fósforo (P). Além deles, é possível observar em todas as amostras Oxigênio (O), com bastante alteração comparado ao grupo sem esterilização, e Cálcio (Ca), sem alterações significativas. Alguns elementos novos surgiram depois das amostras serem esterilizadas. No caso da radiação gama, nota-se a presença do Cloro (Cl). Além deles, pode-se perceber ainda resquícios de Mercúrio (Hg) e Bismuto (Bi).

Figura 2 – EDS de arcabouços de PLGA+HA/ β TCP e PLGA+HA/ β TCP+SIN sem receber tratamento (grupo controle).



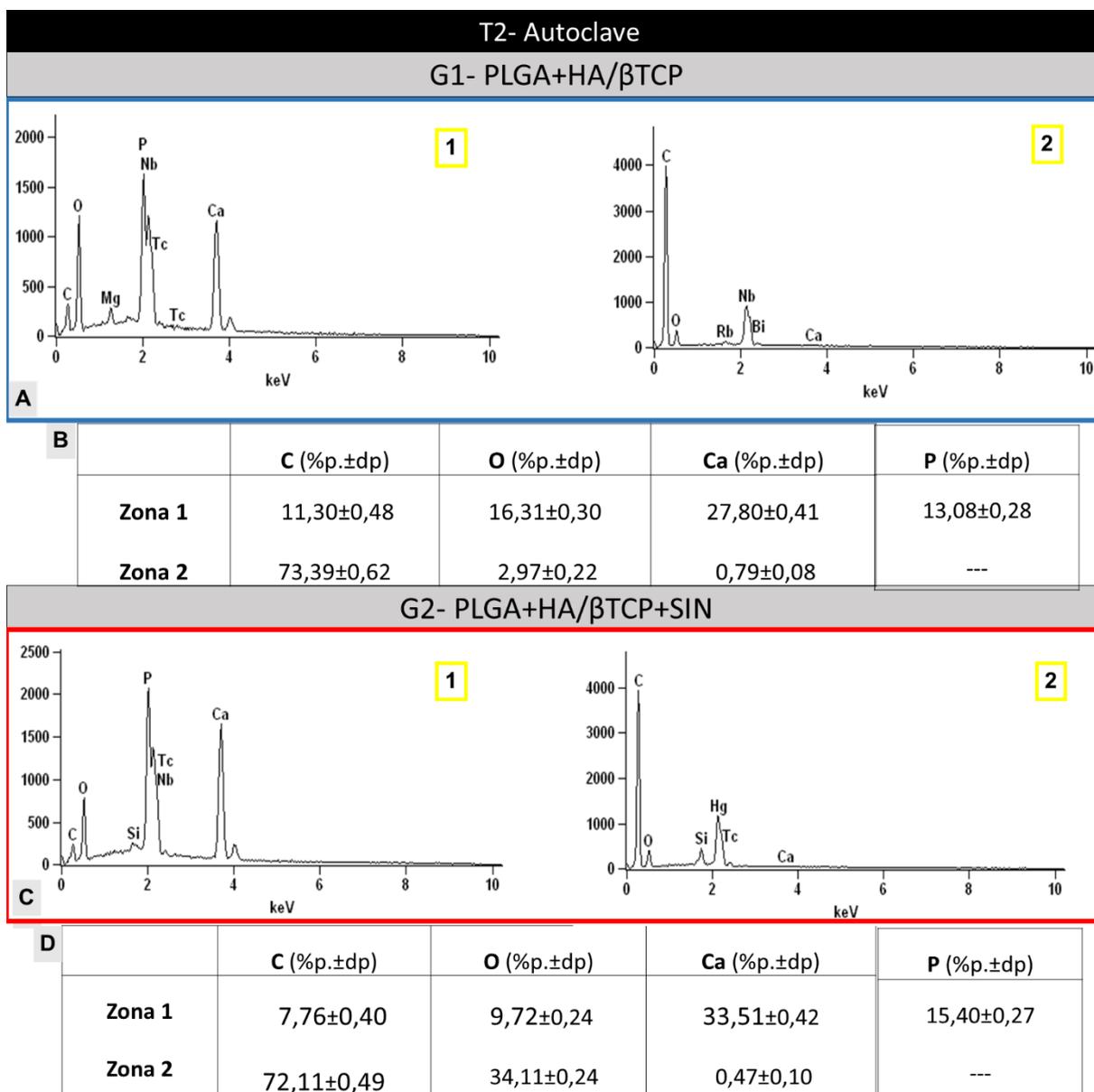
A) Gráficos obtidos a partir da espectroscopia por energia dispersiva (EDS) de arcabouço de PLGA+HA/ β TCP (G1) não esterilizado. B) Porcentagem dos elementos químicos encontrados em diferentes áreas da amostra de G1. C) Gráficos obtidos a partir da EDS de arcabouço de PLGA+HA/ β TCP+SIN (G2) não esterilizado. D) Porcentagem dos elementos químicos detectados em diferentes áreas da amostra de G2.

Figura 3 – EDS de arcabouços de PLGA+HA/ β TCP e PLGA+HA/ β TCP+SIN após esterilização por raios gama.



A) Gráficos obtidos a partir da espectroscopia por energia dispersiva (EDS) de arcabouço de PLGA+HA/ β TCP (G1) esterilizado por raios gama. B) Porcentagem dos elementos químicos encontrados em diferentes áreas da amostra de G1. C) Gráficos obtidos a partir da EDS de arcabouço de PLGA+HA/ β TCP+SIN (G2) esterilizado por raios gama. D) Porcentagem dos elementos químicos detectados em diferentes áreas da amostra de G2.

Figura 4 – EDS de arcabouços de PLGA+HA/ β TCP e PLGA+HA/ β TCP+SIN após esterilização por autoclave.



A) Gráficos obtidos a partir da espectroscopia por energia dispersiva (EDS) de arcabouço de PLGA+HA/ β TCP (G1) esterilizado por autoclave. B) Porcentagem dos elementos químicos encontrados em diferentes áreas da amostra de G1. C) Gráficos obtidos a partir da EDS de arcabouço de PLGA+HA/ β TCP+SIN (G2) esterilizado por autoclave. D) Porcentagem dos elementos químicos detectados em diferentes áreas da amostra de G2.

Figura 5 – Esquema representativo das alterações na porcentagem dos elementos a partir dos resultados de EDS.

RAIOS GAMA		C		O		Ca		P	
		Zona 1	Zona 2						
G1		↓	↓	↓	↑	↑	--	↑	--
G2		↓	↑	↓	↓	↓	--	↑	--

AUTOCLAVE		C		O		Ca		P	
		Zona 1	Zona 2						
G1		↑	↓	↑	↑	↑	↓	↓	--
G2		↓	↓	↓	↑	↓	↓	↑	--

Os resultados descritos resumem as alterações na porcentagem dos elementos químicos detectados nas amostras de G1 (PLGA+HA/ β TCP) e G2 (PLGA+HA/ β TCP+SIN), após esterilização por raios gama (Figura 5A) e por autoclave (Figura 5B) em relação ao grupo controle (sem tratamento).

5.3 Difração de Raios X (DRX)

Em todas as amostras observou-se presença de diversos picos na faixa de intensidade de 3.500 u.a, o que indica que o arcabouço de PLGA+HA/ β TCP é um material cristalino. As regiões de pico observadas (15°, 15,5°, 20°, 20,5° e 35°) nas faixas de intensidade entre 3.000 u.a e 4.000 u.a para G1 e 2.500 u.a e 7.000 u.a para G2 indicam cristalinidade e se dá devido a presença da cerâmica bifásica. As regiões com picos menos proeminentes são áreas de material amorfo (no caso, o PLGA).

Conforme a figura 6, observou-se que ambos os grupos PLGA+HA/ β TCP (G1) e PLGA+HA/ β TCP+SIN (G2) apresentaram uma estrutura cristalina após a esterilização por raios gama e autoclave, bem como sem tratamento (controle positivo), apesar do tratamento por autoclave ter demonstrado picos com maiores

intensidades. Observou-se que após tratamento por autoclave (T1), o pico de cristalinidade elevou-se nos dois grupos (G1 e G2).

Figura 6 - DRX de arcabouços de PLGA+HA/ β TCP e PLGA+HA/ β TCP+SIN após esterilização por radiação gama e autoclave.

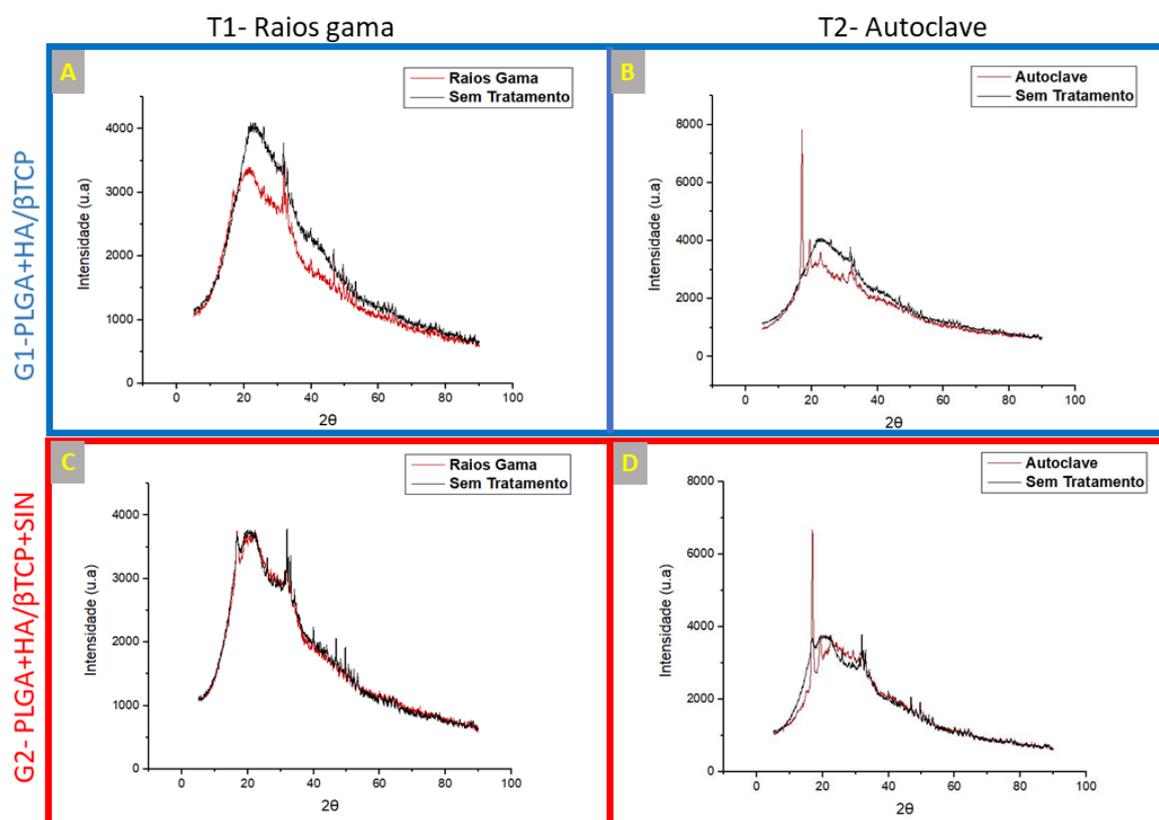


Gráfico obtido através da análise de difração de raios X (DRX) de arcabouços de PLGA+HA/ β TCP (G1) e PLGA+HA/ β TCP+SIN (G2) esterilizados (linha vermelha) ou não (linha preta) por raios gama (Figura A e C) e autoclave (Figura B e D).

6 DISCUSSÃO

A perda de tecido ósseo decorrente de traumas e doenças infecciosas pode dificultar ou mesmo inviabilizar as reabilitações protéticas. Assim, tem-se buscado constantemente biomateriais que otimizem a regeneração óssea (FARDIN *et al.*, 2010). Além de todas as propriedades ostoecondutoras e osteoindutoras que os substitutos ósseos idealmente devem apresentar, estes devem ser passíveis de serem esterilizados, tendo em vista que serão implantados em tecidos humanos. Assim, este trabalho objetivou avaliar a influência da esterilização por raios gama sobre a morfologia, a composição química e a cristalinidade de arcabouços de PLGA com HA e β TCP incorporando SIN. Em resumo, observou-se por meio de MEV que as características morfológicas e de superfície de G1 (PLGA+HA/ β TCP) e G2 (PLGA+HA/ β TCP+SIN) mantiveram-se após a esterilização por raios gama (T1) e autoclave (T2), em comparação com o grupo controle positivo (T0 - sem tratamento). Através de EDS, notou-se alterações na porcentagem dos elementos químicos presentes nos dois grupos (G1 e G2), após ambos tratamentos (T1 e T2), comparado ao grupo controle não esterilizado (T0). Por meio do teste de DRX, observou-se que os G1 e G2 apresentaram caráter cristalino, após ambos os tratamentos (T1 e T2); contudo, uma interferência maior no pico de cristalinidade do material após esterilização por autoclavação (T2) foi observada. Desta maneira, sugere-se através deste trabalho, a utilização do tratamento com raios gama para esterilização dos arcabouços a base de PLGA+HA/ β TCP+SIN, pois foi o tratamento testado que apresentou menor interferência sobre as amostras, visto que não alterou a morfologia e a cristalinidade.

Comparando os resultados observados em MEV no presente estudo com a literatura vigente, observa-se que os achados estão de acordo com diversos autores. Bosworth *et al.* (2012), Augustine *et al.* (2015) e Preem *et al.* (2019) afirmam não observar alterações morfológicas em arcabouços de Policaprolactona (PCL) após esterilização por radiação gama. Desai *et al.* (2013) obtiveram os mesmos resultados, porém em microesferas de PLGA, bem como Mohr *et al.* (1999) em partículas de PLGA carregadas com Estradiol. As amostras também mantiveram suas características superficiais nos estudos de Adamus-Wlodarczyk *et al.* (2018) em blocos de Poli (ácido láctico) e policarbonato de trimetileno e por Delgado *et al.* (2014) em simples dispositivos com propriedades de colágeno.

Em contrapartida, Neves *et al.* (2014) e Devanne *et al.* (2005) observaram alterações consideráveis nas características superficiais de amostras irradiadas por raios gama. Neves *et al.* (2014) notaram que uma irradiação de 50 kGy foi capaz de favorecer o aumento de grânulos dispersos em dispositivos de redes epoxídicas com dois co-mônômeros do tipo amina cicloalifática e observou um aplainamento das superfícies que foram irradiadas. Devanne *et al.* (2005) concluíram que as superfícies das redes epoxídicas com amina se tornaram fragilizadas após uma dose de radiação de 20 kGy e as amostras apresentaram um estado quebradiço, ou seja, foram altamente degradadas. Holy *et al.* (2001), no entanto, afirmam que raios gama não alteraram estruturas morfológicas em seu estudo com arcabouços de PLGA; contudo, as amostras foram degradadas mais rapidamente quando comparadas àquelas submetidas à esterilização por Óxido de Etileno, concluindo que a radiação com raios gama seria mais prejudicial, impactando no tempo de meia-vida das amostras expostas a este tipo de esterilização. De Cassan *et al.* (2019) observaram pequenas alterações no diâmetro das fibras existentes em um dispositivo a base de policaprolactona (PCL), o que poderia trazer alterações nas propriedades mecânicas. Nosso estudo utilizou uma dose de radiação menor (18kGy) comparado a outros estudos como de Neves *et al.* (2014) e Preem *et al.* (2019) que utilizaram 50 kGy. Possivelmente por essa razão, observamos menos alterações nas estruturas das amostras.

No caso da esterilização por autoclave, Uguz *et al.* (2016) não observaram mudanças significativas na morfologia de um polímero condutor do tipo Poli (3,4- Etilenodioxitiofeno) dopado com Poli (Sulfonato de Estireno) (PEDOT:PSS), afirmando ser um método viável para esse tipo de material. No entanto, Ahmed *et al.* (2013) testaram este mesmo método em membranas sólidas e porosas de Poli (carbonateureia-uretano) (POSS-PCU) e Poli (caprolactona- biodegradável-uréia-uretano) (POSS-PCL), sendo que as amostras de POSS-PCL não puderam ser examinadas detalhadamente, pois foram destruídas.

Quanto ao EDS, pode-se afirmar que os arcabouços de PLGA+HA/ β TCP são compostos essencialmente por carbono (C), oxigênio (O), cálcio (Ca) e fósforo (P). Este resultado concorda com o estudo descrito por Encarnação *et al.* (2016). Tanto os grupos que tiveram incorporação de SIN quanto os grupos sem incorporação apresentaram composição similar, o que se explica pelo fato de que o PLGA é composto por carbono, oxigênio e hidrogênio, assim como a SIN ($C_{25}H_{38}O_5$) (MENG

et al., 2011). Vale ressaltar que o motivo pelo qual o Hidrogênio não apareceu no teste EDS se deve ao fato de que só são detectados elementos com número atômico a partir de 5, o que não é o caso do Hidrogênio. A presença marcante de Fósforo e Cálcio se dá pela cerâmica na composição das amostras, a qual é rica nesses compostos e pode ser observada de forma dispersa nas amostras (Figura 1). Assim como foi observado por Encarnação *et al.* (2016) em seu estudo, depois da incorporação de SIN surgiram novos elementos como é o caso do Cloro (Cl) (Figura 3), o que foi justificado pelo uso de PBS como meio de avaliar o comportamento das amostras.

Ambos os métodos, esterilização por raios gama (T1) e autoclave (T2) alteraram a porcentagem dos elementos químicos presentes nos dois grupos (G1 e G2), comparado ao grupo sem tratamento (T0), principalmente o elemento Oxigênio. Desai *et al.* (2013) afirmam que a presença de oxigênio nas amostras durante a radiação gama leva a formação de radicais livres no polímero, que podem levar a quebra de cadeias e formação de novos elementos. Uma investigação detalhada do processamento se faz necessária, visto que nossas amostras foram embaladas em papel grau cirúrgico, já nesse experimento foram colocadas em ampolas para evitar presença de oxigênio.

Autores como Adamus-Wlodarczyk *et al.* (2018), Dorati *et al.* (2008) e Desai *et al.* (2013) relatam em seus estudos que a esterilização por radiação gama não resultou em novos elementos químicos formados nem remoção dos existentes. O que vai de acordo com Preem *et al.* (2019) e Bosworth *et al.* (2012), que afirmam ser improvável que qualquer ligação química tenha sido quebrada ou formada durante o procedimento esterilizador, pois não foram observadas nenhuma alteração nos grupos funcionais ou na composição química das amostras. No entanto, Augustine *et al.* (2015), em um estudo com arcabouços de policaprolactona, afirmaram que, pela clivagem de ligações éster, observou-se uma diferença considerável que indicam alterações nos grupos funcionais após a radiação gama. Em concordância, Ahmed *et al.* (2013) testaram membranas de poli caprolactona uretano, as quais passaram pelos mesmos tratamento de autoclavagem e radiação gama, onde observou-se diminuição dos picos de ligação éster, trazendo modificações consideráveis nos elementos químicos presentes nas amostras.

Com relação às análises de DRX, apesar de ambos os grupos (G1 e G2) permanecerem com caráter cristalino antes (T0) e após esterilização, nos dois

tratamentos realizados (T1 e T2), é notável a presença de um pico com maior intensidade após a autoclavação. Uma das possíveis explicações para isso é que a Temperatura de Transição Vítreo do PLGA (82:18, utilizado nessa amostra), que é em torno de 54 a 60 °C (ATHANASIOU; NIEDERAUER; AGRAWAL, 1996; MOTTA, 2006) foi ultrapassada e gerou um pico de cristalinidade (COWIE *et al.*, 1991). Sencadas *et al.* (2012) observaram que em uma das fases do processo de evaporação do solvente, a parte amorfa do polímero pode cristalizar acima de sua temperatura de transição vítreo, trazendo alterações perceptíveis nos gráficos. É provável que isso tenha acontecido também neste estudo, pois sabe-se que uma das etapas da autoclavação requer altas temperaturas (cerca de 120°C) (SASAKI *et al.*, 2018), sendo a razão pela alteração observada nos gráficos (Figura 6).

É interessante que um substituto implantável seja cristalino ou semi-cristalino, pois permitirá maior difusão molecular, bem como adesão e proliferação celular, sem degradar rapidamente (CAIRE-MAURISIER *et al.*, 2019). Estudos como de Bosworth *et al.* (2012), Preem *et al.* (2019) e Valente *et al.* (2016) que avaliaram tanto amostras de policaprolactona (PCL) como poli (ácido láctico) (PLA), mostraram que as amostras analisadas apresentavam caráter semi-cristalino, o qual foi mantido, porém com um leve aumento nos picos de cristalinidade após esterilização por radiação gama em comparação aos grupos sem tratamento. Contrariamente, foi observado por Adamus-Wlodarczyk *et al.* (2018) e Jozwiakowska *et al.* (2011), no mesmo tipo de polímero (policarbonato de trimetileno), que houve apenas um leve aumento no pico de cristalinidade durante o primeiro aquecimento, não sendo estaticamente considerável. Cabe aqui ressaltar que a literatura carece de informações referentes às análises de DRX em se tratando de esterilização por autoclave.

É imprescindível conhecer as características dos biomateriais que serão esterilizados, bem como as propriedades físico-químicas das substâncias que os compõe (LAMBERT; MENDELSON; CRAVEN, 2011). Convém salientar ainda da importância deste trabalho para estudos na área de biomateriais, já que o material entrará em contato com o tecido humano, bem como aliado ao fato de que há pouca literatura disponível sobre o tema.

Como limitações deste trabalho, pode-se citar que é um trabalho *in vitro* e incluem-se apenas testes de MEV, EDS e DRX. Assim, sugere-se que sejam feitos testes adicionais de Espectroscopia no Infravermelho Transformada por Fourier para determinar a qualidade, quantidade e consistência das amostras e testes de

proliferação celular e citotoxicidade para avaliar o impacto biológico dos métodos de esterilização sobre as amostras.

7 CONCLUSÃO

Com base nos estudos realizados, conclui-se que tanto a esterilização por raios gama (T1), quanto por autoclave (T2), não interferiram na morfologia dos arcabouços de PLGA+HA/ β TCP (G1) e PLGA+HA/ β TCP+SIN (G2). Ambos os métodos (T1 e T2) alteraram a porcentagem dos elementos químicos presentes nos dois grupos (G1 e G2), comparado ao grupo sem tratamento (T0). O método de autoclavação interferiu na cristalinidade dos arcabouços (G1 e G2), enquanto a radiação gama não impactou na cristalinidade dos grupos analisados. Testes adicionais avaliando o comportamento celular frente a esses biomateriais esterilizados são necessários.

REFERÊNCIAS

ABUHANOĞLU, G.; ÖZER, A. Radiation sterilization of new drug delivery systems. **Interventional Medicine and Applied Science**, v. 6, n. 2, p. 51–60, 2014.

ADAMUS-WLODARCZYK, A. et al. On the mechanisms of the effects of ionizing radiation on diblock and random copolymers of poly(Lactic Acid) and poly(Trimethylene Carbonate). **Polymers**, v. 10, n. 6, 2018.

AHMED, M. et al. Effects of sterilization treatments on bulk and surface properties of nanocomposite biomaterials. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 101, n. 7, p. 1182–1190, 2013.

ALMERÍA, B. et al. Controlling the morphology of electrospray-generated PLGA microparticles for drug delivery. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 343, n. 1, p. 125–133, 2010.

ANBINDER, A. L.; JUNQUEIRA, J. C. Influence of Simvastatin on Bone Regeneration of Tibial Defects and Blood Cholesterol Level in Rats. **Braz Dent Journal**, v. 17, p. 267–273, 2006.

ARAFAT, M. T. et al. Biomimetic composite coating on rapid prototyped scaffolds for bone tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 2, p. 809–820, 2011.

ARIAS, A. et al. Effect of gamma-ray sterilization on phase transformation behavior and fatigue resistance of contemporary nickel-titanium instruments. **Clinical Oral Investigations**, v. 24, n. 9, p. 3113–3120, 2020.

ATHANASIOU, K. A.; NIEDERAUER, G. G.; AGRAWAL, C. M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. **Biomaterials**, v. 17, n. 2, p. 93–102, 1996.

AUGUSTINE, R. et al. Dose-Dependent Effects of Gamma Irradiation on the Materials Properties and Cell Proliferation of Electrospun Polycaprolactone Tissue Engineering Scaffolds Dose-Dependent Effects of Gamma Irradiation on the. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 64, p. 37–41, 2015.

AYUKAWA, Y.; YASUKAWA, E.; MORIYAMA, Y. Local application of statin promotes bone repair through the suppression of osteoclasts and the enhancement of osteoblasts at bone-healing sites in rats. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology**, v. 107, n. 3, p. 336–342, 2009.

AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2.3, p. 27–34, 2007.

BAO, Y. Poly(glycolic-acid) bonded fiber structures for cell attachment and transplantation. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 27, p. 183–189, 1993.

BLANCO, Y. et al. Effects of Gamma and Electron Radiation on the Structural Integrity of Organic Molecules and Macromolecular Biomarkers Measured by Microarray

Immunoassays and Their Astrobiological Implications. **Astrobiology**, v. 18, n. 12, p. 1497–1516, 2018.

BOSWORTH, L. A.; GIBB, A.; DOWNES, S. Gamma irradiation of electrospun poly(ϵ -caprolactone) fibers affects material properties but not cell response. **Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics**, v. 50, n. 12, p. 870–876, 2012.

BROWN, A. et al. Porous magnesium/PLGA composite scaffolds for enhanced bone regeneration following tooth extraction. **Acta Biomaterialia**, v. 11, n. C, p. 543–553, 2015.

CAIRE-MAURISIER, F. et al. Effects of electron beam sterilization on polyethylene terephthalate: Physico-chemical modifications and formation of non-volatile organic extractables. **Annales Pharmaceutiques Francaises**, v. 77, n. 4, p. 276–285, 2019.

CARLSON, E. R. et al. The potential for HIV transmission through allogeneic bone A review of risks and safety. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, v. 80, n. 1, 1995.

CARREIRA, A. C. et al. Bone morphogenetic proteins: Facts, challenges, and future perspectives. **Journal of Dental Research**, v. 93, n. 4, p. 335–345, 2014.

CASAGRANDE, L. et al. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. **The Society of the Nippon Dental University**, p. 1–7, 2011.

CEHRELI, M. C. et al. Cytotoxicity of Eluates from a Gamma-ray-polymerized Poly(Methyl Methacrylate). **Journal of Biomaterials Applications**, v. 18, n. 3, p. 223–231, 2004.

CHEN, Z. et al. Comparison of the properties of collagen–chitosan scaffolds after γ -ray irradiation and carbodiimide cross-linking. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 27, n. 10, p. 937–953, 2016.

CIAPETTI, G.; GRANCHI, D.; BALDINI, N. The Combined Use of Mesenchymal Stromal Cells and Scaffolds for Bone Repair. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, p. 1796–1820, 2012.

COSTA, J. B. Z. et al. O Uso De Membranas Biológicas Para Regeneração Óssea Guiada Em Implantodontia: Uma Revisão De Literatura. **Journal of Dentistry & Public Health**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2016.

DA SILVA-JUNIOR, A. A. et al. Thermal behavior and stability of biodegradable spray-dried microparticles containing triamcinolone. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 368, n. 1–2, p. 45–55, 2009.

DA SILVA, A. F. et al. Estudo comparativo da osteointegração de enxertos ósseos irradiados e não irradiados utilizados em pacientes com revisão de artroplastia do quadril. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 54, n. 04, p. 477–482, 2019.

DA SILVA, F. F.; KÁTIA, K. A.; ARAÚJO, E. S. Effects of gamma irradiation on poly(vinyl chloride)/polystyrene blends: Investigation of radiolytic stabilization and miscibility of the mixture. **Polymer Degradation and Stability**, v. 93, n. 12, p. 2199–2203, 2008.

DA SILVA, R. C.; DA SILVA, R. M.; DA SILVA AQUINO, K. A. The interaction of gamma radiation with matter in the process of sterilization. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 6, p. 1624–1641, 2014.

DE CASSAN, D. et al. Impact of sterilization by electron beam, gamma radiation and X-rays on electrospun poly-(ϵ -caprolactone) fiber mats. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 30, n. 4, p. 1–11, 2019.

DELGADO, L. M.; PANDIT, A.; ZEUGOLIS, D. I. Influence of sterilisation methods on collagen-based devices stability and properties. **Expert Review of Medical Devices**, v. 11, n. 3, p. 305–314, 2014.

DESAI, K. H.; KADOUS, S.; SCHWENDEMAN, P. S. Gamma Irradiation of Active Self-Healing PLGA Microspheres for Efficient Aqueous Encapsulation of Vaccine Antigens. **Springer Science Business Media**, p. 1768–1778, 2013.

DEVANNE, T. et al. Radiochemical ageing of an amine cured epoxy network . Part I : change of physical properties. **Elsevier Science**, v. 46, p. 229–236, 2005.

DORATI, R. et al. γ -irradiation of PEGd,IPLA and PEG-PLGA multiblock copolymers: II. Effect of oxygen and EPR investigation. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 9, n. 4, p. 1110–1118, 2008.

ELLIS, E.; SINN, D. P. Use of homologous bone in maxillofacial surgery. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 51, n. 11, p. 1181–1193, 1993.

ENCARNAÇÃO, I. C. et al. Analysis of bone repair and inflammatory process caused by simvastatin combined with PLGA+HA+ β TCP scaffold. **Implant Dentistry**, v. 25, n. 1, p. 140–148, 2016.

ENCARNAÇÃO, I. C. et al. Release of simvastatin from scaffolds of poly(lactic-co-glycolic) acid and biphasic ceramic designed for bone tissue regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 107, n. 6, p. 2152–2164, 2019.

ERBETTA, C. D. C. et al. Synthesis and Characterization Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) Copolymer. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 124, n. 3, p. 557–563, 2012.

FARDIN, A. C. et al. Enxerto ósseo em odontologia: revisão de literatura. **Innovations Implant Journal: Biomaterials and Esthetics**, v. 5, n. 3, p. 48–52, 2010.

FARKAS, J. Irradiation as a method for decontaminating food: A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 189–204, 1998.

FORSSTRÖM, B. et al. Dissecting antibodies with regards to linear and conformational epitopes. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–11, 2015.

FREIBERG, S.; ZHU, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 282, n. 1–2, p. 1–18, 2004.

GENTILE, P. et al. Localised controlled release of simvastatin from porous chitosan – gelatin scaffolds engrafted with simvastatin loaded PLGA-microparticles for bone tissue engineering application. **Materials Science & Engineering C**, v. 59, p. 249–257, 2016.

GRIEB, T. A. et al. Effective use of optimized, high-dose (50 kGy) gamma irradiation for pathogen inactivation of human bone allografts. **Biomaterials**, v. 26, n. 14, p. 2033–2042, 2005.

HÄMMERLE, C. H. F.; KARRING, T. Guided bone regeneration at oral implant sites. **Periodontology 2000**, v. 17, n. 1, p. 151–175, 1998.

HAN, A. et al. Effects of different sterilization methods on surface characteristics and biofilm formation on zirconia in vitro. **Dental Materials**, v. 34, n. 2, p. 272–281, 2018.

HARRELL, C. R. et al. Risks of using sterilization by gamma radiation: The other side of the coin. **International Journal of Medical Sciences**, v. 15, n. 3, p. 274–279, 2018.

HASANAIN, F. et al. Gamma sterilization of pharmaceuticals - A review of the irradiation of excipients, active pharmaceutical ingredients, and final drug product formulations. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 68, n. 2, p. 113–137, 2014.

HENCH, L. L.; POLAK, J. M. Third-generation biomedical materials. **Science**, v. 295, n. February, p. 1014–1017, 2002.

HOLY, C. E. et al. Optimizing the sterilization of PLGA scaffolds for use in tissue engineering. **Elsevier Science**, v. 22, p. 25–31, 2001.

HONG, L. et al. Identification and evaluation of radiolysis products of irradiated chloramphenicol by HPLC-MS and HPLC-DAD. **Chromatographia**, v. 55, n. 1–2, p. 13–18, 2002.

HOOPER, K. A.; COX, J. D.; KOHN, J. Comparison of the effect of ethylene oxide and γ -irradiation on selected tyrosine-derived polycarbonates and poly(L-lacti acid). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 63, n. 11, p. 1499–1510, 1997.

HU, T. et al. Effects of gamma irradiation and moist heat for sterilization on sodium alginate. **Bio-Medical Materials and Engineering**, v. 24, n. 5, p. 1837–1849, 2014.

HUANG, X.; MIAO, X. Novel Porous Hydroxyapatite Prepared by Combining H₂O₂ Foaming with PU Sponge and Modified with PLGA and Bioactive Glass. **Journal of Biomaterials Applications**, 2007.

HUTCHINSON, D. P. et al. Magnetic moment of the positive muon. **Physical Review Letters**, v. 24, n. 22, p. 1254–1256, 1970.

IAQUINTA, M. R. et al. Innovative biomaterials for bone regrowth. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, p. 1–17, 2019.

ILLINGWORTH, D. R. et al. Efficacy and Safety of Lovastatin. **Jama Network**, v. 281, n. 2, p. 137–144, 2015.

JADHAV, S. B.; JAIN, G. K. Statins and osteoporosis: new role for old drugs. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, n. 1, p. 3–18, 2006.

JEON, D. H.; LEE, K. H.; PARK, H. J. The effects of irradiation on physicochemical characteristics of PET packaging film. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 71, n. 5, p. 1059–1064, 2004.

JIANG, L. et al. Effect of bamboo fiber on the degradation behavior and in vitro cytocompatibility of the nano-hydroxyapatite/poly(lactide-co glycolide) (n-HA/PLGA) composite. **Cellulose**, v. 26, n. 2, p. 1099–1110, 2019.

JOZWIAKOWSKA, J. et al. Influence of electron beam irradiation on physicochemical properties of poly (trimethylene carbonate). **Polymer Degradation and Stability**, v. 96, n. 8, p. 1430–1437, 2011.

KARRING, T. et al. Development of the biological concept of guided tissue regeneration - animal and human studies. **Periodontology 2000**, v. 1, p. 26–35, 1993.

KAWASE, T. et al. Non-invasive, quantitative assessment of the morphology of γ -irradiated human mesenchymal stem cells and periosteal cells using digital holographic microscopy. **International Journal of Radiation Biology**, v. 92, n. 12, p. 796–805, 2016.

KEMPNER, E. S.; SCHLEGEL, W. Size determination of enzymes by radiation inactivation. **Analytical Biochemistry**, v. 92, n. 1, p. 2–10, 1979.

KIM, Y.; RODRIGUEZ, A. E.; NOWZARI, H. The Risk of Prion Infection through Bovine Grafting Materials. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 18, n. 6, p. 1095–1102, 2016.

KLUGER, R. et al. Removal of the surface layers of human cortical bone allografts restores in vitro osteoclast function reduced by processing and frozen storage. **Bone**, v. 32, n. 3, p. 291–296, 2003.

KURIBARA, K. et al. Organic transistors with high thermal stability for medical applications. **Nature Communications**, v. 3, p. 723–727, 2012.

LAÇIN, N. et al. The effect of graft application and simvastatin treatment on tibial bone defect in rats. A histological and immunohistochemical study¹. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 34, n. 4, 2019.

LAMBERT, B. J.; MENDELSON, T. A.; CRAVEN, M. D. Radiation and Ethylene Oxide Terminal Sterilization Experiences with Drug Eluting Stent Products. **The American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 12, n. 4, p. 1116–1126, 2011.

LE GUÉHENNEC, L. et al. In vitro and in vivo biocompatibility of calcium-phosphate scaffolds three-dimensional printed by stereolithography for bone regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 108, n. 3, p. 412–425, 2020.

LEBOURG, M.; ANTÓN, J. S.; RIBELLES, J. L. G. Characterization of calcium phosphate layers grown on polycaprolactone for tissue engineering purposes. **Elsevier Composites Science and Technology**, v. 70, n. 13, p. 1796–1804, 2010.

LEBOURG, M.; ANTÓN, S. J.; GOMEZ RIBELLES, J. L. Hybrid structure in PCL-HAp scaffold resulting from biomimetic apatite growth. **Springer Science Business Media**, p. 33–44, 2010.

LEE, E. J.; VOLKOV, V. I.; LEE, C. H. Electron spin resonance studies of free radicals in γ -irradiated soybean paste. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 7, p. 3457–3462, 2001.

LEKOVIC, V. et al. A Bone Regenerative Approach to Alveolar Ridge Maintenance Following Tooth Extraction. Report of 10 Cases. **Journal Periodontol**, v. 68, n. 6, 1998.

LIAO, X.; ZHANG, H.; HE, T. Preparation of Porous Biodegradable Polymer and Its Nanocomposites by Supercritical CO₂ Foaming for Tissue Engineering. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, 2012.

LINDHE, J.; ARAÚJO, M. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. **Journal of Clinical Periodontology**, n. 1967, p. 212–218, 2005.

LIU, H. et al. Incorporating simvastatin/poloxamer 407 hydrogel into 3D-printed porous Ti6Al4V scaffolds for the promotion of angiogenesis, osseointegration and bone ingrowth. **Biofabrication**, v. 8, n. 4, p. 1–13, 2016.

LIU, L.; WU, Y.; CAI, W. Synthesis and characterization of poly(l-lactide-co-glycolide). **Journal Wuhan University of Technology, Materials Science Edition**, v. 20, n. SUPPL., p. 217–219, 2005.

LIU, X. et al. Hydroxyapatite/biodegradable poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone) composite microparticles as injectable scaffolds by a Pickering emulsion route. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 2, p. 821–828, 2011.

LOWERY, J. L.; DATTA, N.; RUTLEDGE, G. C. Effect of fiber diameter, pore size and seeding method on growth of human dermal fibroblasts in electrospun poly(ϵ -caprolactone) fibrous mats. **Biomaterials**, v. 31, n. 3, p. 491–504, 2010.

MAEDA, T.; KAWANE, T.; HORIUCHI, N. Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation.

Endocrinology, v. 144, n. 2, p. 681–692, 2003.

MAGGI, L. et al. Polymers-gamma ray interaction. Effects of gamma irradiation on modified release drug delivery systems for oral administration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, n. 2, p. 343–351, 2004.

MAKADIA, H. K.; SIEGEL, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. **Polymers**, p. 1377–1397, 2011.

MARITZ, F. J. et al. Effect of Statins on Bone Mineral Density and Bone Histomorphometry in Rodents. **Journal of the American Heart Association**, 2015.

MARTIN, V.; BETTENCOURT, A. Bone regeneration: Biomaterials as local delivery systems with improved osteoinductive properties. **Materials Science and Engineering**, v. 82, p. 363–371, 2018.

MCLAUGHLIN, W. L.; DESROSIERS, M. F. Dosimetry systems for radiation processing. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 46, n. 4- 6 PART 2, p. 1163–1174, 1995.

MENG, Z. X. et al. Preparation and characterization of electrospun PLGA/gelatin nanofibers as a potential drug delivery system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, n. 1, p. 97–102, 2011.

MIAO, X. et al. Porous calcium phosphate ceramics modified with PLGA – bioactive glass. **Elsevier Science**, v. 27, p. 274–279, 2007.

MIAO, X. et al. Mechanical and biological properties of hydroxyapatite / tricalcium phosphate scaffolds coated with poly (lactic-co-glycolic acid). **Acta Biomaterialia**, v. 4, p. 638–645, 2008.

MIKKONEN, J. et al. Drug-eluting bioabsorbable stents - An in vitro study. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 8, p. 2894–2900, 2009.

MOHR, D.; WOLFF, M.; KISSEL, T. Gamma irradiation for terminal sterilization of 17 β -estradiol loaded poly- (D , L -lactide-co-glycolide) microparticles. **Journal of Controlled release**, v. 61, p. 203–217, 1999.

MONTERO, J.; MANZANO, G.; ALBALADEJO, A. The role of topical simvastatin on bone regeneration : A systematic review. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 6, n. 3, p. 286–290, 2014.

MOTTA, A. C.; DUEK, E. A. R. Síntese, Caracterização e Degradação “in vitro” do Poli (L-ácido láctico). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 16, n. 1, p. 26–32, 2006.

MOTTA, A. C.; DUEK, E. A. R. Síntese e Caracterização do Copolímero Poli (L-co-D,L Ácido Láctico). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 17, p. 123–129, 2007.

MUNDY, G. et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. **Science**, v. 286, n. 5446, p. 1946–1949, 1999.

NEVES, J. C. et al. Efeito da Irradiação Gama nas Propriedades Mecânicas e Térmicas de Redes DGEBA/Amina Cicloalifática com Potencial para Aplicações Médicas. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 23, n. 6, p. 814–822, 2014.

NYMAN, S. et al. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 9, p. 290–296, 1982.

OLIVEIRA, S. et al. Engineering endochondral bone: In vitro and in vivo studies. **Tissue Engineering: Part A**, v. 15, n. 3, p. 234, 2008.

PARK, J. The use of simvastatin in bone regeneration. **Oral Medicine and Pathology**, v. 14, n. 9, p. 485–488, 2009.

PEREZ, J. R. et al. Tissue Engineering and Cell-Based Therapies for Fractures and Bone Defects. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 6, n. July, p. 1–23, 2018.

PETERS, W. H. M.; JANSEN, P. L. M.; NAUTA, H. The molecular weights of UDP-glucuronyltransferase determined with radiation-inactivation analysis. A molecular model of bilirubin UDP-glucuronyltransferase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 19, p. 11701–11705, 1984.

PETERSEN, S. et al. In vitro study of dual drug-eluting stents with locally focused sirolimus and atorvastatin release. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 24, n. 11, p. 2589–2600, 2013.

PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Polymers in drug delivery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, p. 447–451, 2001.

POTTER, J. K.; MALMQUIST, M.; ELLIS, E. Biomaterials for Reconstruction of the Internal Orbit Orbital floor injury Orbital reconstruction Biomaterials Bone grafts. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of NA**, v. 24, n. 4, p. 609–627, 2012.

PRABAHARAN, M.; MANO, J. F. Chitosan-Based Particles as Controlled Drug Delivery Systems. **Taylor&Francis Healthsciences**, p. 41–57, 2005.

PREEM, L. et al. Effects and efficacy of different sterilization and disinfection methods on electrospun drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 567, n. April, 2019.

QI, F. et al. Recent research and development of PLGA / PLA microspheres / nanoparticles : A review in scientific and industrial aspects. **Frontiers of Chemical Science and Engineering**, 2018.

RUTALA, W. A.; GERGEN, M. F.; WEBER, D. J. Comparative evaluation of the sporicidal activity of new low-temperature sterilization technologies: Ethylene oxide, 2 plasma sterilization systems, and liquid peracetic acid. **American Journal of Infection Control**, v. 26, n. 4, p. 393–398, 1998.

RUTLEDGE, J. et al. Simvastatin Application to Augment Facial Jaw Bone in a Dog

Model : Pilot Study. **Journal Periodontol**, v. 82, n. 4, 2011.

SAKAR, F. et al. Nano drug delivery systems and gamma radiation sterilization. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 22, n. 6, p. 775–784, 2017.

SAKODA, K. et al. Simvastatin decreases IL-6 and IL-8 production in epithelial cells. **Journal of Dental Research**, v. 85, n. 6, p. 520–523, 2006.

SASAKI, S. et al. Effect of Gamma Ray Irradiation on Friction Property of Poly(vinyl alcohol) Cast-Drying on Freeze-Thawed Hybrid Gel. **Gels**, v. 4, n. 2, p. 30, 2018.

SCHUSTER, J. M. et al. Use of structural allografts in spinal osteomyelitis: A review of 47 cases. **Journal of Neurosurgery**, v. 93, n. 1 SUPPL., p. 8–14, 2000.

SENCADAS, V. et al. Thermal Properties of Electrospun Poly (Lactic Acid) Membranes. **Journal of Macromolecular Science, Part B : Physics**, p. 37–41, 2012.

SHIMURA, N.; KOJIMA, S. Effects of low-dose-gamma rays on the immune system of different animal models of disease. **International Dose-Response Society**, v. 12, n. 3, p. 429–465, 2014.

SHINDO, M. L. et al. Facial Skeletal Augmentation Using Hydroxyapatite Cement. **Jama Network**, 2015.

SILVA, A. T. C. R. et al. Synthesis, Characterization, and Study of PLGA Copolymer *in Vitro* Degradation. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 06, n. 01, p. 8–19, 2015.

SILVA AQUINO, K. A. DA. Sterilization by Gamma Irradiation. **Gamma Radiation**, 2012.

SINGH, R.; SINGH, D.; SINGH, A. Radiation sterilization of tissue allografts: A review. **World Journal of Radiology**, v. 8, n. 4, p. 355, 2016.

SINTZEL, M. B. et al. Influence of Irradiation Sterilization on Polymers Used as Drug Carriers-A Review. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 23, n. 9, p. 857–878, 1997.

SOARES, D. G. et al. Simvastatin and nanofibrous poly(L-lactic acid) scaffolds to promote the odontogenic potential of dental pulp cells in an inflammatory environment. **Acta Biomaterialia**, v. 68, p. 190–203, 2018.

SORDI, M. B.; MAGINI, R. DE S.; CORDEIRO, M. M. R. Produção, caracterização, degradação e citotoxicidade de arcabouços de PLGA+HA/ β TCP com sinvastatina incorporada. **Вестник Росздравнадзора**, v. 4, p. 9–15, 2017.

SOUZA, D. O.; JR, E. D. A.; BARRETO, I. C. Aplicações de enxertos de bancos de ossos em Odontologia. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, p. 45–48, 2010.

STANTON, W. J. Formation and Elution of Toxic compounds from sterilized medical products: Methylenedianiline Formation in Polyurethane. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 9, n. 2, p. 183–205, 1987.

SUGIYAMA, O. et al. Lentivirus-Mediated Gene Transfer Induces Long-Term Transgene Expression of BMP-2 in Vitro and New Bone Formation in Vivo. **Molecular Therapy**, v. 11, n. 3, p. 390–398, 2005.

SUN, H.; YANG, H. L. Calcium phosphate scaffolds combined with bone morphogenetic proteins or mesenchymal stem cells in bone tissue engineering. **Chinese Medical Journal**, v. 128, n. 8, p. 1121–1127, 2015.

TAKENAKA, M. et al. Simvastatin stimulates VEGF release via p44/p42 MAP kinase in vascular smooth muscle cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 301, p. 198–203, 2003.

TAN, J. Single-Dose Local Simvastatin Injection Improves Implant Fixation via Increased Angiogenesis and Bone Formation in an Ovariectomized Rat Model. **Medical Science Monitor**, p. 1428–1439, 2015.

TARAFDER, S. et al. 3D printed tricalcium phosphate bone tissue engineering scaffolds: effect of SrO and MgO doping on in vivo osteogenesis in a rat distal femoral defect model. **Biomaterials Science**, p. 1250–1259, 2013.

TRUE, K. et al. f Gamma Irradiation ioprosthesis. **Clinical Materials**, v. 9, p. 149–154, 1992.

UENO, T. et al. Gamma ray treatment enhances bioactivity and osseointegration capability of titanium. **Journal of biomedical materials research**, v. 100, n. 8, p. 2279–2287, 2012.

UGUZ, I. et al. Autoclave Sterilization of PEDOT:PSS Electrophysiology Devices. **Advanced Healthcare Materials**, v. 5, n. 24, p. 3094–3098, 2016.

VALENTE, T. A. M. et al. Effect of sterilization methods on electrospun poly(lactic acid) (PLA) fiber alignment for biomedical applications. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 8, n. 5, p. 3241–3249, 2016.

VENKATESAN, J. et al. Alginate composites for bone tissue engineering: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 269–281, 2015.

VENTER, J. C. et al. Molecular size of the human platelet alpha2-adrenergic receptor as determined by radiation inactivation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 116, n. 3, p. 1070–1075, 1983.

WAGONER JOHNSON, A. J.; HERSCHLER, B. A. A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 1, p. 16–30, 2011.

WANG, C. Z. et al. Combination of a bioceramic scaffold and simvastatin nanoparticles

as a synthetic alternative to autologous bone grafting. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, p. 1–19, 2018.

WONG, S. C.; BAJI, A.; LENG, S. Effect of fiber diameter on tensile properties of electrospun poly(ϵ -caprolactone). **Polymer**, v. 49, n. 21, p. 4713–4722, 2008.

WU, Z.; LIU, C.; THE, G. Z. The effect of simvastatin on remodelling of the alveolar bone following tooth extraction. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 2, p. 170–176, 2008.

XUE, J. et al. Electrospun Nanofibers: New Concepts, Materials, and Applications. **Accounts of Chemical Research**, v. 50, n. 8, p. 1976–1987, 2017.

XUE, Y. et al. In vitro and in vivo evaluation of chitosan scaffolds combined with simvastatin-loaded nanoparticles for guided bone regeneration. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 30, n. 4, 2019.

YAMASHITA, M. et al. Simvastatin antagonizes tumor necrosis factor- α inhibition of bone morphogenetic proteins-2-induced osteoblast differentiation by regulating Smad signaling and Ras/Rho-mitogen-activated protein kinase pathway. **Journal of Endocrinology**, v. 196, n. 3, p. 601–613, 2008.

YANG, G. et al. Low-dose ionizing radiation induces direct activation of natural killer cells and provides a novel approach for adoptive cellular immunotherapy. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v. 29, n. 10, p. 428–434, 2014.

YANG, L. E. et al. Vascularization of repaired limb bone defects using chitosan- β - tricalcium phosphate composite as a tissue engineering bone scaffold. **Molecular medicine reports**, p. 2343–2347, 2015.

YANG, N. et al. Local injection of a single dose of simvastatin augments osteoporotic bone mass in ovariectomized rats. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, 2013.

ZHANG, J.; DRICU, A.; SJÖVALL, J. Studies on the relationships between 7 α -hydroxylation and the ability of 25-and 27-hydroxycholesterol to suppress the activity of HMG-CoA reductase. **Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1344, n. 3, p. 241–249, 1997.

ZHANG, Z. Z.; ZHANG, H. Z.; ZHANG, Z. Y. 3D printed poly(ϵ -caprolactone) scaffolds function with simvastatin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres to repair load-bearing segmental bone defects. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 17, n. 1, p. 79–90, 2019.

ZHU, Z. et al. Modification of polyethylene terephthalate under high-energy heavy ion irradiation. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 191, n. 1–4, p. 723–727, 2002.



ATA DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos **12** dias do mês de **abril** de **2021**, às **15** horas, em sessão pública na sala virtual de web conferencia desta Universidade, na presença da Banca Examinadora presidida pela Professora Ariadne Cristiane Cabral da Cruz e pelos examinadores:

1- Cesar Augusto Magalhães Benfatti,

2 - Raissa Borges Curtarelli,

a aluna Fernanda Willemann apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação intitulado: "Influência da esterilização por raios-gama em arcabouços confeccionados com PLGA, HA/βTCP e sinvastatina" como requisito curricular indispensável à aprovação na Disciplina de Defesa do TCC e a integralização do Curso de Graduação em Odontologia.

A Banca Examinadora, após reunião em sessão reservada, deliberou e decidiu pela **APROVAÇÃO** do referido Trabalho de Conclusão do Curso, divulgando o resultado formalmente à aluna e aos demais presentes, e eu, na qualidade de presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais componentes da Banca Examinadora e pelo aluno orientando.



Documento assinado digitalmente
Ariadne Cristiane Cabral da Cruz
Data: 12/04/2021 15:48:49-0300
CPF: 024.403.869-90
Verifique as assinaturas em <https://vufsc.br>

Presidente da Banca Examinadora



Documento assinado digitalmente
Raissa Borges Curtarelli
Data: 12/04/2021 14:32:40-0300
CPF: 068.230.658-84
Verifique as assinaturas em <https://vufsc.br>

Examinador 1



Documento assinado digitalmente
Cesar Augusto Magalhães Benfatti
Data: 12/04/2021 10:45:09-0300
CPF: 278.187.338-81
Verifique as assinaturas em <https://vufsc.br>

Examinador 2



Documento assinado digitalmente
Fernanda Willemann
Data: 12/04/2021 08:39:48-0300
CPF: 083.682.913-09
Verifique as assinaturas em <https://vufsc.br>

Aluna